

Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria

**Caracterização funcional de uma nova proteína SET humana,
SETD4 envolvida na proliferação de células de câncer de mama**

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Março de 2014

Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria

**Caracterização funcional de uma nova proteína SET humana,
SETD4 envolvida na proliferação de células de câncer de mama**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Pittella Silva

Belo Horizonte

2014

Esse trabalho foi realizado na instituição:

- Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte - MG.

E com o suporte financeiro das agências

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.
- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brasil.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.
- National Institutes of Health (NIH).

AGRADECIMENTOS

Muito especialmente, desejo agradecer ao meu orientador Prof. Dawidson Assis Gomes, pelo empenho, atenção dispensada, incentivo e confiança no meu trabalho. Obrigada por contribuir com meu crescimento científico.

Ao Professor Alfredo, profissional incrível e grande conselheiro. Obrigada pela oportunidade!

Ao Professor Fábio Pittella Silva pela excelente colaboração.

Ao Dr. Michael H. Nathanson pela oportunidade de desenvolver pesquisa em uma instituição de ponta! À toda a equipe do Nathanson's lab, em especial à MJ e ao Mateus, que tanto me ajudaram em Yale!

Às Professoras Glória Franco, Helenice Gobbi e Fabiana Machado pelas contribuições na minha qualificação.

Aos membros da banca de defesa do doutorado, pelo aceite e dedicação a avaliação desse trabalho: Dra. Carolina Cavaliéri Gomes, Dra. Luciana Maria Silva, Dra. Liza Figueiredo Vilela, Dr. Rafael Malagoli Rocha.

Ao Juliano, pela presteza e ajuda no NAGE!

Aos amigos do laboratório LCMI 1: Betinha, Cíntia, Carol Reis, Ana Claudia, Juliana, Alessandra, Thaís, Maira, Marina, Cris, Estefânia, Elis, Eliza, Pedro, Alexandra, Lílian, Ludmila, Daniela, Priscila, Mariane, Catherine, Aline e Humberto.

À equipe LCMI 2! Ao jovem Arthur, pela ótima convivência. Às minhas focas maras: À Mari, sempre alegre e prestativa. Ao ser Andrade, pela braveza e por ter sido muito importante neste trabalho! À Carol Melo pelo apoio! À menina Ana, que mesmo nestes 2 anos que nos mantivemos distantes foi sempre uma ótima amiga e conselheira! Silda, ser raciocínio racional (não podia faltar!), pelo

suporte, discussão na construção do conhecimento e claro por fomentar meu lado humorista!

À todos os professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia pelos ensinamentos que foram fundamentais à minha formação acadêmica.

Às amigas: Jú, Gomes, Ví, Kênia, Ellenzita, Ritinha, Mariana Cardoso e Pri!

À Dani e Itálo, amigos fantásticos que eu me aguentam na marra!

À minha amiga, Tati, por saber ler o que não está escrito e saber ouvir o que não foi dito, obrigada por cultivar sempre nossa amizade!

Ao amigos incríveis que fiz em New Haven, Sankalpa, Erin e em especial a Hetty! À médica e doutora Fernanda, preciosa amiga na terra do tio Sam!

Aos meu pais, José e Jane, meus amores e meu porto seguro. Obrigado pelo exemplo incrível de generosidade e amor.

Ao meu querido irmão Jordan pelo apoio incondicional.

Aos meus familiares e em especial a minha querida Vó Deusmira.

À Fapemig, CAPES, NIH e CNPq pelo suporte financeiro.

Agradeço a Deus por ter uma família tão especial e ter tantos amigos incríveis no meu caminho: eles foram mestres e incentivadores deste trabalho e certamente o continuarão sendo por toda a minha vida.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
I. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	I
II. LISTA DE FIGURAS	V
III. LISTA DE TABELAS	VI
IV. RESUMO	VII
V. ABSTRACT	VIII
1.INTRODUÇÃO	1
1.1. CÂNCER DE MAMA.....	2
1.2. REGULAÇÃO EPIGENÉTICA: METILAÇÃO DE HISTONAS.....	3
1.3. FAMÍLIA DAS PROTEÍNAS SET.....	5
1.4. PROTEÍNAS COM DOMÍNIO SET E CÂNCER.....	6
2.OBJETIVOS	11
2.1. OBJETIVO GERAL.....	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3.MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1. ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	14
3.1.1. <i>Análise de domínios proteicos e predição de localização subcelular</i>	14
3.1.2. <i>Modelagem comparativa</i>	14
3.2. CULTURA CELULAR.....	15
3.2.1. <i>Cultivo de linhagens celulares tumorais</i>	15
3.2.2. <i>Obtenção e cultivo de células normais</i>	16
3.3. ESPÉCIMES TUMORAIS.....	16
3.4. COLETA DE TECIDOS DE RATO.....	17
3.5. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA.....	17
3.6. PCR SEMIQUANTITATIVO.....	18
3.7. PCR EM TEMPO REAL.....	18
3.8. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS E FRACIONAMENTO CELULAR.....	20
3.9. WESTERN BLOT.....	21
3.10. CONSTRUÇÕES UTILIZADAS.....	22
3.10.1. <i>Construções adquiridas da empresa Origene</i>	22
3.10.2. <i>Subclonagem de SETD4 no vetor pCMV6-AC-GFP</i>	22
3.10.3. <i>Obtenção do vetor pCMV-GFP sem insertos</i>	24
3.10.4. <i>Sequenciamento</i>	24

3.11. TRANSFEÇÃO DOS DNAs PLASMIDIAIS PARA ESTUDO DE LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR	25
3.12. IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	26
3.13. IMUNOCITOQUÍMICA.....	26
3.14. TRANSFORMAÇÃO ESTÁVEL DE CÉLULAS	27
3.15. ENSAIO DE MTT	28
3.16. ENSAIO CLONOGÊNICO	29
3.17. CITOMETRIA DE FLUXO	30
3.18. ENSAIO DE ATIVIDADE DO GENE REPÓRTER LUCIFERASE.....	30
3.19. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4.RESULTADOS.....	32
4.1. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DE SETD4.....	33
4.2. DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DE SETD4.....	41
4.3. O NÍVEL DE MRNA SETD4 É DISTINTOS NAS DIFERENTES CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA.....	42
4.4. CORRELAÇÃO NEGATIVA ENTRE O PERFIL DE EXPRESSÃO DE SETD4 E DOS RECEPTORES HORMONAIS EM TUMORES DE MAMA.	45
4.5. SETD4 LOCALIZA-SE NO NÚCLEO E CITOSOL.....	48
4.6. REDUZIDA EXPRESSÃO DE SETD4 SUPRIME A PROLIFERAÇÃO E ALTERA O PERFIL DO CICLO CELULAR.....	54
4.7. A SUPREXPRESSÃO DE SETD4 AUMENTA A PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	63
5.DISSCUSSÃO	70
6.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	82
7.BIBLIOGRAFIA	84
8.ANEXOS A.....	97
9.ANEXOS B.....	112

I. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	<i>Protein kinase B</i> (proteína cinase B)
AP-1	<i>Activator protein 1</i> (proteína ativadora 1)
ATF	<i>Activating transcription factor</i> (fator de ativação transcricional)
BRCA-1	<i>Breast cancer associated gene 1</i> (gene associado ao câncer de mama 1)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina de soro bovina)
CARM1	<i>Coactivator-associated arginine methyltransferase</i> (arginina metiltransferase associada a coativador)
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> (cinase dependente de ciclina)
cDNA	DNA complementar
CDYL1	<i>Chromodomain protein Y like</i> (proteína cromodomínio tipo Y)
CEBIO	Centro de Bioterismo
C/EBPB	<i>CCAAT-enhancer-binding protein beta</i> (proteína beta intensificadora de ligação a CCAAT)
CETEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CMV	Citomegalovírus
C-MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog protein</i>
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CRE	<i>cAMP response element</i> (elemento responsivo ao AMP cíclico)
CREB	<i>Cyclic AMP responsive element binding protein</i> (proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico)
DAB	Tetrahydrocloro de 3,3-diaminobenzidina
DIM-5	<i>Histone H3 methyltransferase DIM-5</i> (histona H3 metiltransferase DIM-5)
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (meio de cultura modificado de Dulbecco)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxorribonucléico)
DNase I	<i>Deoxyribonuclease I</i> (desoxirribonuclease)
DNMT1	<i>DNA methyltransferase 1</i> (DNA metiltransferase 1)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DOT1	<i>Disruptor of telomeric silencing 1</i> (disruptor de silenciamento telomérico 1)
DZNep	<i>3-deazaneplanocin A</i>
E2F1	<i>E2F1 transcription factor</i> (Fator de transcrição E2F1)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> (quimioluminescência intensificada)
EDTA	ácido N,N,N',N'-etilenodiaminotetracético
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (fator de crescimento epidermal)
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (receptor do fator de crescimento epidermal)

EHMT2	<i>Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2</i> (histona-lisina metiltransferase da eucromatina 2)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> (cinase regulada por estímulos extracelulares)
EST	<i>Expressed sequence tag</i> (etiqueta de sequência expressa)
EZH1	<i>Enhancer of zeste homolog 1</i> (intensificador homólogo de Zeste 1)
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i> (intensificador homólogo de Zeste 2)
GAPDH	<i>Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (proteína verde fluorescente)
GLP1	<i>G9a-like protein 1</i> (Proteína tipo G9a)
GSK-3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i> (glicogênio sintase cinase 3)
HDAC	<i>Histone deacetylase</i> (histona deacetilase)
HER2/ERBB2	<i>Epidermal growth factor receptor 2</i> (receptor do fator de crescimento epidermal 2)
HP1	<i>Heterochromatin protein 1</i> (proteína da heterocromatina 1)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxidase de raiz forte)
HSV-1	Herpes simplex virus 1
IMPC	<i>International Mouse Phenotyping Consortium</i> (Consórcio internacional de genotipagem de camundongos)
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i> (sítio interno de entrada de ribossomo)
KMT	<i>Lysine methyltransferase</i> (lisina metiltransferase)
LB	Luria-Bertani
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i> (fator de ligação ao facilitador linfóide 1)
LSMT	<i>Rubisco large subunit lysine methyltransferase</i> (Lisina metiltransferase da subunidade maior da Rubisco)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (proteínas cinases ativadas por mitogêno)
MLL1	<i>Mixed lineage leukemia 1 protein</i> (proteína de linhagem mista leucêmica 1)
MLL2	<i>Mixed lineage leukemia 2 protein</i> (proteína de linhagem mista leucêmica 2)
MLL3	<i>Mixed lineage leukemia 3 protein</i> (proteína de linhagem mista leucêmica 3)
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> (proteína alvo da rapamicina em mamíferos)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NAGE	Núcleo de análise de genoma e expressão gênica
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i> (Centro nacional para informação em biotecnologia)
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> (Fator de Transcrição nuclear Kappa B)
NSD1	<i>Nuclear receptor binding SET domain protein 1</i> (proteína de ligação ao receptor nuclear contendo domínio SET)
pb	pares de bases

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (banco de dados de proteínas)
PGDF	Platelet-derived growth factor (fator de crescimento derivado de plaquetas)
pH	potencial hidrogeniônico
PHD	<i>Plant homeodomain</i> (homeodomínio de plantas)
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i> (fosfoinositídeo-3-cinase)
PRDM1	<i>PR domain containing protein 1</i> (Proteína contendo domínio PR 1)
PRDM14	<i>PR domain containing protein 14</i> (Proteína contendo domínio PR 14)
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i> (difluoreto de polivinildieno)
RA	Receptor androgênico
RAR α	<i>Retinoic acid receptor alpha</i> (receptor de ácido retinóico alfa)
RB	<i>Retinoblastoma protein</i> (proteína do retinoblastoma)
RE	Receptor de estrógeno
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucléico)
RNase	Ribonuclease
RP	Receptor de progesterona
RPS27	<i>Ribosomal protein S27</i> (proteína ribossomal S27)
RsK-2	<i>Ribosomal s6 kinase -2</i> (cinase ribossomal s6 -2)
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase- polymerase chain reaction</i> (Transcrição reversa -reação em cadeia da polimerase)
SAM	<i>S-adenosyl-Methionine</i> (S-adenosil-metionina)
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SET1	<i>SET domain containing protein 1</i> (proteína contendo domínio SET 1)
SET7	<i>SET domain containing protein 7</i> (proteína contendo domínio SET 7)
SET8	<i>SET domain containing protein 8</i> (proteína contendo domínio SET 8)
SETD2	<i>SET domain containing protein 2</i> (proteína contendo domínio SET 2)
SETD3	<i>SET domain containing protein 3</i> (proteína contendo domínio SET 3)
SETDB1	<i>SET domain bifurcated protein 1</i> (proteína com domínio SET bifurcada 1)
SFB	Soro fetal bovino
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i> (Pequeno grampo de RNA)
SMYD2	<i>SET and MYND domain containing protein 2</i> (proteína contendo domínios SET e MYND 2)
SMYD3	<i>SET and MYND domain containing protein 3</i> (proteína contendo domínios SET e MYND 3)
SRE	<i>Serum response element</i> (elemento de resposta ao soro)
SRF	<i>Serum response factor</i> (fator de resposta ao soro)
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i> (Transdutora de sinal e ativadora da transcrição 3)

TBS-T	<i>Tris-buffered saline and tween</i> (Solução salina tamponada de Tris com tween)
TRC	<i>Cell T receptor</i> (receptor de célula T)
U	Unidade
UTR	<i>Untranslated region</i> (região não traduzida)
UV	Ultravioleta
VEGFR1	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 1</i> (receptor do fator de crescimento endotelial vascular 1)
WIZ	<i>Widely interspaced zinc finger motifs</i> (motivos dedos de zinco amplamente intercalados)

II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização estrutural do gene que codifica SETD4.....	34
Figura 2. Alinhamento das 4 isoformas preditas da proteína SETD4	36
Figura 3. Modelagem comparativa de SETD4.....	40
Figura 4. Alinhamento das sequências primárias de SETD4 e de caracterizadas proteínas SET humanas	41
Figura 5. Expressão tecido-específica de SETD4	42
Figura 6. O <i>SETD4</i> é superexpresso em algumas linhagens celulares de câncer de mama	44
Figura 7. Expressão de <i>SETD4V1/V3</i> nas células MDA-MB 231 e MCF-7.	45
Figura 8. A expressão de SETD4 é distinta entre as linhagens de câncer	46
Figura 9. Expressão de SETD4 em tumores de mama positivos e negativos para os receptores hormonais	48
Figura 10. SETD4 está presente na fração nuclear (FN) e não nuclear (FNN).....	50
Figura 11. Localização subcelular de SETD4	52
Figura 12. Localização de SETD4 fusionado à etiqueta DDK	53
Figura 13. Localização subcelular das isoformas 1 e 2 de SETD4 fusionadas a GFP.	54
Figura 14. Confirmação dos clones com redução de SETD4.....	56
Figura 15. Metabolização de MTT reduzida nos clones ShSETD4.....	57
Figura 16. A redução de SETD4 diminui a capacidade de formação de colônias a partir de uma única célula.....	58
Figura 17. Redução de SETD4 altera o perfil do ciclo celular	60
Figura 18. Reduzida expressão de ciclina D1 nos clones <i>knockdown</i> para <i>SETD4</i>	61
Figura 19. Reduzida expressão de SETD4 não modula os elementos responsivos (SRE e CRE) presentes na região promotora de <i>c-fos</i>	62
Figura 20. Expressão transiente de SETD4 fusionada à proteína verde fluorescente na linhagem MCF-7	64
Figura 21. Confirmação dos clones superexpressando a proteína SETD4	65
Figura 22. Metabolização de MTT elevada nos clones superexpressando SETD4.....	66
Figura 23. A superexpressão de SETD4 aumenta a capacidade de formação de colônias a partir de uma única célula.	67
Figura 24. A superexpressão de SETD4 eleva o número de células na fase S do ciclo celular	69

III. LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sítios alvos e funções de algumas histonas lisinas metiltransferases humanas	5
Tabela 2. Substratos de algumas lisinas metiltransferases humanas	9
Tabela 3. Listagem dos oligonucleotídeos para qRT-PCR	20

IV. RESUMO

O câncer compreende uma variedade de alterações epigenéticas, incluindo a perda global e ganho local de metilações de DNA, assim como, alterações no processo de metilações de histonas. A desregulação de algumas histonas metiltransferases tem sido associada com a agressividade tumoral. Neste trabalho, nosso principal objetivo foi analisar a expressão e o papel funcional de uma nova metiltransferase humana, SETD4, no câncer de mama. A proteína SETD4 possui o domínio SET, um domínio altamente conservado presente nas histonas/lisinas metiltransferases. Análises da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (qPCR) mostraram uma elevada expressão de SETD4 em algumas linhagens de câncer de mama. A expressão de SETD4 foi confirmada por análises de western blot revelando uma correlação entre elevada expressão de SETD4 e perda da expressão de receptores de estrógeno e progesterona em tumores de mama. Estudos de fracionamento celular e microscopia confocal revelaram a localização nuclear e citoplasmática desta nova proteína. Estudos funcionais mostraram que a redução da expressão de SETD4 diminuiu a habilidade de proliferação e formação de colônias das células. Em adição, a redução de SETD4 levou a uma parada na transição na fase G1/S do ciclo celular sem contudo afetar a morte celular. Além disso, a redução da expressão de SETD4 apresentou uma diminuição na expressão da ciclina D1, sugerindo o envolvimento de SETD4 na regulação do ciclo celular. Em contraste, a superexpressão de SETD4 aumentou a proliferação celular e induziu a progressão das fases G1/S do ciclo celular. Estes dados indicam que SETD4 parece ter um papel crucial na carcinogênese e pode ser um novo alvo molecular para o desenvolvimento de novas estratégias para o diagnóstico e tratamento do câncer de mama.

Palavras-chave: SETD4, Lisina metiltransferase, câncer de mama, epigenética, proliferação celular.

V. ABSTRACT

Cancer is comprised of a multitude of epigenetic abnormalities, including the global loss and regional gain of DNA methylation as well as alterations in histone methylation. Deregulation of some histone methyltransferases has been associated with cancer aggressiveness. In this study, we aim to analyze the expression and functional role of a new human methyltransferase, SETD4 in breast cancer. The SETD4 protein contains a SET domain, highly conserved domain found in histone/lysine methyltransferase. Quantitative real-time PCR (qPCR) analysis showed elevated expression levels of SETD4 in several breast cancer cell lines. SETD4 expression was confirmed by western blot analysis revealing a correlation between high expression of SETD4 and a lack of the estrogen and progesterone receptor in breast tumors. Cell fractionation studies and confocal immunofluorescence microscopy revealed the nuclear and cytoplasmic localization of this new protein. Functional studies found that *SETD4* knockdown decreased the ability of the cells to proliferate and form colony. In addition, SETD4 reduction delayed the G1/S cell cycle transition without affecting apoptosis. Furthermore, knockdown of *SETD4* showed decreased cyclin D1 expression, suggesting the involvement of SETD4 in cell cycle regulation. In contrast, SETD4 overexpression increased cell proliferation and induced G1/S cell cycle progression. These data indicate that SETD4 plays a crucial role in breast carcinogenesis and could be a novel molecular target for the development of new strategies for the diagnosis and treatment of breast cancer.

Key-words: SETD4, Lysine methyltransferase, breast cancer, epigenetics, cell proliferation.

1.INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de mama

A incidência de câncer no mundo cresceu 20% na última década (*World Cancer Research Fund* (WRCF). No Brasil, para 2014 estima-se 576 mil novos casos da doença, sendo 57.120 de câncer de mama (Instituto Nacional de Câncer; (INCA). O câncer de mama é tipo mais comum de câncer em incidência, prevalência e mortalidade entre as mulheres. As taxas de incidência variam nas diversas partes do mundo (Kamangar, Dores, & Anderson, 2006). Diferenças nos fatores reprodutivos e hormonais, bem como, a oferta de serviços de diagnósticos são alguns dos determinantes para a variação mundial em sua incidência (Bray, McCarron, & Parkin, 2004; Jemal et al., 2011).

A etiologia do câncer de mama ainda não é totalmente conhecida, visto que, os fatores de risco identificados explicam somente uma pequena parte dos casos. Baseado em estudos epidemiológicos conduzidos em diferentes populações, os fatores de risco já bem estabelecidos incluem: a predisposição genética, nuliparidade, obesidade, primeira gestação em idade avançada, uso de contraceptivos orais e terapia hormonal pós-menopausa. Além disso, a ingestão de álcool está também relacionada ao maior risco de câncer de mama (Anothaisintawee et al., 2013; Sundaram, Johnson, & Makowski, 2013; Varela-Rey, Woodhoo, Martinez-Chantar, Mato, & Lu, 2013)

O tamanho do tumor, o envolvimento dos gânglios linfáticos, o grau histopatológico, e a análise da presença de marcadores como os receptores hormonais são alguns parâmetros avaliados no diagnóstico e tratamento dos pacientes (Goldhirsch et al., 2011; Wolff et al., 2007).

Tumores positivos para os receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) e tumores positivos para Her-2/ERBB2 compreendem 75-80% e 15-20%, respectivamente, dos casos de câncer de mama. Sendo que cerca de metade dos casos Her-2 positivos co-expressam os receptores hormonais. Os restantes, 10-15% dos tumores são denominados triplo-negativos definindo assim a ausência de expressão dos marcadores (Konecny et al., 2003; Nielsen et al., 2004; Slamon et al., 1989).

Os tradicionais testes para o diagnóstico de câncer de mama incluem o exame físico, mamografia e citologia aspirativa. Porém, infelizmente esses métodos não são sensíveis o suficiente para identificar o câncer de mama em estágios iniciais (Radpour et al., 2011).

Durante a última década, o avanço no estudo da biologia do câncer de mama tem revelado como esta doença requer a interconexão de muitas vias de sinalização e do microambiente celular. Tais fatores influenciam a patofisiologia da doença e a resposta ao tratamento (Eroles, Bosch, Perez-Fidalgo, & Lluch, 2012; Hanahan & Weinberg, 2011).

A transformação maligna de uma célula é um processo multipassos, que envolve diversas alterações genéticas que culminam na perda do controle do ciclo celular e do processo de diferenciação. A sustentação crônica da proliferação, evasão dos mecanismos de supressão do crescimento, resistência aos mecanismos de morte celular, indução da angiogênese e a ativação dos mecanismos de invasão são características centrais do processo de formação do tumor. Tais processos são resultantes da alteração na função de vários genes, bem como, variações no padrão de expressão. Perturbações genéticas, como mutações pontuais e alterações cromossômicas, somam-se as alterações epigenéticas na causa desta patologia (Hanahan & Weinberg, 2011; P. A. Jones & Baylin, 2007).

1.2. Regulação epigenética: metilação de histonas

Os mecanismos de regulação epigenéticos envolvem modificações no DNA e caudas das histonas, alteração na expressão de miRNAs e remodelamento local da cromatina. Modificações no controle epigenético são comuns em muitas doenças, e no câncer podem se configurar como eventos preliminares no processo de transformação maligna (Y. Huang, Nayak, Jankowitz, Davidson, & Oesterreich, 2011).

No câncer de mama, modificações pós-traducionais anormais de histonas e hipermetilação de DNA são frequentemente associados com instabilidade genômica e silenciamento epigenético de genes supressores de tumor (P. A. Jones & Baylin, 2007). A notável explosão da pesquisa envolvendo

as alterações epigenéticas no câncer de mama permite estender tais achados para aplicação clínica (Y. Huang et al., 2011).

Alterações no padrão de metilação do DNA são frequentemente encontradas em diversas doenças incluindo nas neoplasias. Dois tipos de alterações no padrão de metilação são comumente encontrados em tumores: a hipometilação global do genoma e a específica hipermetilação na região promotora de genes supressores de tumor (Choi & Lee, 2013; P. A. Jones & Baylin, 2007).

Acetilação, metilação, ubiquitinação, fosforilação, sumoilação e ribosilação correspondem as modificações pós-traducionais que ocorrem nas caudas amino-terminais das histonas. As distintas modificações podem afetar, sinergisticamente ou antagonicamente, as proteínas associadas à cromatina, as quais por sua vez, ditam a transição dinâmica entre silenciamento e ativação transcricional. Algumas modificações podem ser executadas por mais de uma enzima, pertencente a uma mesma família proteica. Tal característica sugere que as especializações funcionais das mesmas ocorre por meio de um padrão de expressão diferencial. Além disso, a característica combinatória das diferentes modificações revela o código de histona, e assim estende a informação do código genético (Islam, Richter, Jacobs, Lopez-Bigas, & Benevolenskaya, 2011; Jenuwein & Allis, 2001).

A metilação das histonas pode ocorrer tanto nos resíduos de lisina quanto arginina. Oito principais sítios de metilação de lisina foram identificados nas histonas (H3K4, H3K9, H3K14, H3K27, H3K36, H3K79, H4K20, H4K59), sendo que alguns resíduos podem ser metilados duas ou três vezes (Jenuwein & Allis, 2001). Em geral, a monometilação dos resíduos (9, 27 e 79) na histona H3 e H4K20 estão associadas com estado transcricional ativado. Em oposição, a trimetilação dos resíduos H3K9, H3K27 e H3K79 é relacionada ao estado de silenciamento gênico (Barski et al., 2007). A perda global da trimetilação no resíduo de lisina 20 e acetilação na lisina 16 da histona H4 constituem uma marca das células cancerosas (Fraga et al., 2005).

A adição do grupo metil nas histonas e os efeitos decorrentes desta marca são reguladas por histonas metiltransferases específicas, demetilases e proteínas "leitoras". Estas últimas correspondem as proteínas que reconhecem

os resíduos de lisina metilados através dos domínios pertencentes a 2 classes: Royal e PHD *fingers* (Egorova, Olenkina, & Olenina, 2010). As funções atribuídas a algumas marcas de metilação por lisinas metiltransferases humanas podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1. Sítios alvos e funções de algumas histonas lisinas metiltransferases humanas adaptado de (Dillon, Zhang, Trievel, & Cheng, 2005)

Alvo	Função	Lisinas metiltransferases
H3K4	Ativação transcricional	MLL1, MLL2, MLL3, SET7
	Ativação transcricional e alongação	SET1
H3K9	Silenciamento eucromatina e metilação DNA	EHMT2, GLP1
	Silenciamento eucromatina	SETDB1
H3K27	Silenciamento eucromatina	EZH1, EZH2
H4K20	Silenciamento dependente de ciclo celular	SET8

As enzimas responsáveis pela metilação dos resíduos de lisina nas histonas possuem o domínio conservado SET e apresentam a designação E.C. 2.1.1.43 (IUPAC-IUBMB).

1.3. Família das proteínas SET

Uma parcela significativa das proteínas em todos os organismos compreende as enzimas que catalisam a transferência do grupo metil do cofator S-adenosil-L-metionina para um substrato (Martin & McMillan, 2002; Petrossian & Clarke, 2011; Schubert, Blumenthal, & Cheng, 2003). As metiltransferases estão envolvidas na biossíntese de lipídios, inativação hormonal, diferenciação tecidual e no controle epigenético (Albert & Helin, 2010; Baba et al., 2004; Eom et al., 2011; Lehmann, Jiang, & Wagner, 2008). A análise do metiltransferosoma humano revelou a presença de 208 proteínas pertencentes a este grupo, o que equivale a cerca de 0,9% de todos os produtos gênicos humanos. Cerca de 30% das metiltransferases estão associadas com doenças, sendo mais frequentemente ligadas a desordens do

sistema nervoso central e câncer (Albert & Helin, 2010; Petrossian & Clarke, 2011).

Com base nos arranjos estruturais, as metiltransferases são agrupadas em duas classes (Martin & McMillan, 2002; Schubert et al., 2003): A primeira classe constituem os membros que possuem o domínio SET. A segunda classe são as proteínas que contém o domínio DOT1 (*disruptor of telomeric silencing*), os quais metilam K79 na região globular da histona H3, e não apresentam o domínio SET (Dillon et al., 2005). SET é o acrônimo das primeiras proteínas caracterizadas com este domínio em *Drosophila* {*Suppressor of variegation* [Su(var)3-9], *Enhancer of zeste* [E(z)] e *Trithorax*} (R. S. Jones & Gelbart, 1993; Stassen, Bailey, Nelson, Chinwalla, & Harte, 1995; Tschiersch et al., 1994). O domínio SET contém três discretas folhas β que circundam uma estrutura do tipo *Knot*. No segmento C-terminal do domínio estão presentes os dois motivos conservados do domínio: ELxF/YDY e NHS/CxxPN (sendo x qualquer aminoácido).

Em concordância com a elevada especificidade aos seus substratos, os domínios SET de diferentes lisinas metiltransferases apresentam baixa similaridade de sequência. Além disso, com a exceção dos dois motivos apresentados acima, não há conservação entre os resíduos que configuram o sítio ativo destas enzimas. As regiões que flanqueiam o domínio, embora requeridas para a catálise, não são estritamente conservadas. Interessantemente, sugere-se que as sequências flanqueando a lisina alvo seja o motivo consenso para o reconhecimento do substrato pela metiltransferase (Qian & Zhou, 2006; Taylor, Xiao, Gamblin, & Lin, 2003). As proteínas SET são agrupadas em 10 famílias (Classes I-VII, PRDM, H4K20 e SET7, de acordo com seus substratos) (Petrossian & Clarke, 2011).

1.4. Proteínas com domínio SET e câncer

A função de várias proteínas contendo o domínio SET já caracterizadas está diretamente relacionada a doenças humanas, e em especial ao câncer (He, Korboukh, Jin, & Huang, 2012; Nimura, Ura, & Kaneda, 2010). Os membros da família NSD (*nuclear receptor binding SET domain-containing*

protein) têm sido relacionados a doenças congênitas e a leucemia mielóide aguda (Tatton-Brown et al., 2005; Wang, Cai, Pasillas, & Kamps, 2007). O gene *EZH2* (*Enhancer of zeste homolog 2*) foi demonstrada ser superexpresso em vários tipos de câncer: linfoma, coloretal, gástrico, próstata e mama (Collett et al., 2006). Em adição, outros genes que codificam histonas metiltransferases (*PRDM14*, *CARM1*, *PRMT1* e *SMYD3*), também apresentaram elevada expressão no câncer de mama revisado por (Albert & Helin, 2010).

A enzima *SMYD3* regula transcricionalmente o gene *MMP-9* (*Matrix metalloproteinase 9*), o qual codifica uma colagenase, com papel importante na progressão tumoral e metástase. Esta metiltransferase cataliza a trimetilação dos resíduos de lisina 4 das H3 presentes na região promotora de *MMP-9*, induzindo a transcrição deste gene e por conseguinte a proliferação e invasão celular (Cock-Rada et al., 2012).

Para *SETD2* (*SET domain containing protein 2*) foi observada uma correlação na redução nos níveis de mRNA *SETD2* com os mais elevados estágios dos tumores, dados que conferem consistência à função supressora de tumor deste gene no câncer de mama (Al Sarakbi et al., 2009; Su et al., 2005). Este mesmo perfil de expressão foi também verificado para o gene *SMYD4* (Hu, Zhu, Qi, & Zhu, 2009).

Evidências indicam que a expressão da enzima *EHMT2* (*Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2*) está associada ao fenótipo maligno de vários tipos de tumores (M. W. Chen et al., 2010; Lu et al., 2013). A inibição desta histona metiltransferase reduz a proliferação, motilidade, invasão de células de neuroblastomas (Lu et al., 2013).

A função regulatória da metilação de proteínas não é restrita ao código de histonas, mas também vinculada a vários outros processos celulares. Esta modificação ocorre em proteínas citosólicas e nucleares, e alguns exemplos são reportados na tabela 2 (Egorova et al., 2010; X. Zhang, Wen, & Shi, 2012). Em geral, as funções decorrentes da metilação nestas proteínas ainda não foram caracterizadas.

A metilação do fator supressor de tumor, p53, corresponde a modificação mais estudada. Esta proteína possui papel central no controle do ciclo celular, apoptose e reparo de DNA em resposta a vários tipos de estresse,

fato que torna seu estudo crucial para a terapêutica do câncer (Brooks & Gu, 2010). A metilação dos resíduos de lisina presentes no domínio regulatório C-terminal regula positiva e negativamente a função de p53. A SET7 metila o resíduo 372, e eleva a expressão dos genes alvos de p53 (Chuikov et al., 2004). Em contraste, a metilação de Lys382 por SET8 e Lys370 por SMYD2 suprime a atividade transcricional (J. Huang et al., 2006; Shi et al., 2007).

A enzima SET7 apresenta vários alvos não histonas e a modificação dos resíduos de lisina por esta enzima regula a interação dos alvos com outras proteínas (X. Zhang et al., 2012). A metilação da proteína retinoblastoma leva a sua associação com HP1 (*Heterochromatin Protein 1*), e o complexo promove a repressão gênica e diferenciação (Munro, Khaire, Inche, Carr, & La Thangue, 2010). Em adição, a metilação de p53 e do receptor de estrógeno pela SET7 é necessária para a atividade transcricional destes fatores (Chuikov et al., 2004; Subramanian et al., 2008). Em contrapartida, a metilação de NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) por SET7 regula negativamente sua estabilidade e atividade transativadora (X. D. Yang et al., 2009). Em células imunes, a metilação da subunidade RelA de NF-κB por SETD3 é reconhecida por outra histona metiltransferase GLP (G9a-like protein 1), a qual atua reprimindo os genes alvos deste transfator (Levy et al., 2011).

Em plantas, a enzima LSMT (*Rubisco large subunit lysine methyltransferase*) é uma metiltransferase contendo domínio SET que cataliza a trimetilação do resíduo de lisina 14 na subunidade maior da Rubisco, enzima fotossintética essencial. Entretanto, o caráter funcional desta modificação permanece desconhecido (Trievel, Beach, Dirk, Houtz, & Hurley, 2002; Trievel, Flynn, Houtz, & Hurley, 2003).

Tabela 2. Substratos de algumas lisinas metiltransferases humanas (adaptado de (X. Zhang et al., 2012))

Lisinas metiltransferases	Alvos
EHMT2	p53, EHMT2, C/EBPB, RAR α , DNMT1, CDYL1, WIZ
SETDB1	Tat, HDAC1/2
NSD1	NF- κ B
SMYD2	p53, RB
SMYD3	VEGFR1
SET8	p53
SET7	p53, TAF7, TAF10, RE, RA, NF- κ B, RB, STAT3, E2F1

Diferentemente das mutações genéticas, as modificações epigenéticas podem ser revertidas. A sinalização desencadeada pelo receptor de estrógeno modula a reprogramação epigenética no miométrio em desenvolvimento através da via PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*)/AKT (*Protein Kinase B*). A AKT fosforila EZH2 levando a diminuição de sua atividade e conseqüentemente dos níveis de trimetilação em H3K27. A redução desta marca repressora da transcrição culmina na indução dos genes responsivos a estrógeno (Greathouse et al., 2012).

A reprogramação do estado epigenético aberrante das células neoplásicas consiste em um recurso terapêutico em expansão. Em células de câncer de mama negativas para RE, inibidores específicos das atividades de histona deacetilases (HDAC) são capazes de reativar a expressão do gene *RE* e *PR* (Keen et al., 2003; Zhou, Atadja, & Davidson, 2007). Alguns inibidores de HDAC, como o *Vorinostat* e *MS-275* (*entinostat*), combinados com outras terapias já estão em fase de estudos clínicos (clinicaltrials.gov, 2014).

Vários compostos que atuam inibindo a metilação e demetilação das histonas também são capazes de induzir a re-expressão de genes silenciados e importantes na tumorigênese do câncer de mama (Y. Huang et al., 2011). Como exemplo, o inibidor de EZH2, DZNep induz apoptose nas células de câncer de mama (Tan et al., 2007).

Sendo assim, ampliar o entendimento dos processos de modificações pós-traducionais relacionados ao câncer de mama possibilita traduzir tais

conhecimentos para a clínica médica. Além disso, o estudo das lisinas metiltransferases humanas ainda é incipiente, e muitas enzimas ainda não foram caracterizadas (X. Zhang et al., 2012).

A correlação existente entre as várias metiltransferase e o câncer de mama reforçam a necessidade de investigação desta família de proteínas nesta patologia, na qual despontam como promissores alvo para as estratégias terapêuticas. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa realizou a avaliação da expressão das proteínas contendo o domínio SET ainda não caracterizadas em humanos. Os resultados indicaram uma alta expressão de SETD4 em linhagens tumorais de mama. Sendo assim, apresentamos nosso projeto de caracterização de uma nova lisina metiltransferase humana, SETD4. A elucidação do papel funcional deste gene irá aprofundar nosso conhecimento acerca dos mecanismos de metilação de proteínas, bem como, identificar um possível papel desta metiltransferase no câncer de mama.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar a expressão e a função da proteína SETD4 em linhagens celulares de câncer de mama.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar, por meio da análise *in silico*, a sequência gênica e proteica de SETD4 e obter um modelo estrutural para a proteína SETD4 humana.
- Avaliar o perfil de expressão de SETD4 em linhagens de câncer de mama, tumores primários de mama e de diferentes tecidos de rato.

Para tanto, diferentes metodologias, a citar, PCR em tempo real, western blot, imunocitoquímica foram empregadas para acessar o perfil de expressão de SETD4 em linhagens celulares e tumores primários de câncer de mama. Adicionalmente, foi avaliada a distribuição tecidual de SETD4 em ratos.

- Analisar a localização subcelular de SETD4.

Utilizamos técnicas de detecção da proteína endógena, como a imunofluorescência, bem como, construções expressando SETD4 fusionado tanto à proteína verde fluorescente (GFP) quanto às etiquetas MYC e DDK.

- Investigar o papel funcional de SETD4 em células de câncer de mama.

Para esta finalidade, utilizamos uma construção expressando short-hairpins específicos para reduzir a expressão de SETD4, assim como estratégias para a superexpressão desta proteína. Tais procedimentos permitiram investigar o papel desta proteína na proliferação e ciclo celular.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Análises *in silico*

3.1.1. Análise de domínios proteicos e predição de localização subcelular

A pesquisa das sequências que codificam SETD4 foi conduzida no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A busca por domínios conservados nas sequências proteicas foram obtidas no NCBI (CD-Search) e no banco de dados Pfam (Finn et al., 2008; Marchler-Bauer et al., 2009). Para o alinhamento das sequências foi utilizado o programa CLUSTALW e DNATagger (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)(Scherer & Basso, 2008; Thompson, Higgins, & Gibson, 1994).

Por meio da ferramenta de análise online (SMS: Sequence Manipulation Suite) (Stothard, 2000), foi realizada a previsão de massa molecular das proteínas. Os programas de predições da localização subcelular utilizados foram: PSORT II (<http://www.psort.org/>) (Horton & Nakai, 1997) ESLpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/eslpred/>) (Bhasin & Raghava, 2004) e NucPred (<http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/>) (Brameier, Krings, & MacCallum, 2007).

Diferentes banco de dados "The Gene Expression Atlas (EMBL-EBI)"; (<http://www.ebi.ac.uk/gxa/>), GeneHub-GEPIS (<http://www.gepis.org/>) (Y. Zhang et al., 2007) e UNIGENE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) foram acessados para a avaliação do perfil de expressão gênica.

3.1.2. Modelagem comparativa

A etapa de identificação de proteínas moldes adequadas para a modelagem molecular foi feita através do programa BLAST no banco de dados PDB. A estrutura da proteína SETD3 (Human SET domain-containing protein 3) depositada no bando de dados PDB (3SMT) foi utilizada como molde. As sequências da isoformas 1 SETD4 e do molde foram alinhadas no programa PROMALS3D usando os parâmetros básicos (*default*) (Pei & Grishin, 2007).

Os modelos moleculares foram gerados usando o software Modeller (versão 9.7) (Eswar, Eramian, Webb, Shen, & Sali, 2008). A presença do grupo ligante, SAM (SAM, S-adenosil-metionina), bem como o refinamento das regiões de loops (compreendendo os resíduos 261-220; 303-307) foram considerados na geração de 100 modelos estruturais candidatos. A validação das estruturas de SETD4 foram analisadas no tocante às suas qualidades esteroquímicas e valores de energia por meio dos plots de Ramachandran gerados pelo Procheck (version 3.5.4), Rampage e Z- score do ProSA (Lovell et al., 2003; Morris, MacArthur, Hutchinson, & Thornton, 1992; Wiederstein & Sippl, 2007). A estrutura de SETD4 apresentando os melhores scores nas avaliações citadas acima foi selecionada e analisada manualmente. As visualizações e manipulações das imagens foram realizadas no programa PyMOL (Ordog, 2008).

3.2. Cultura celular

3.2.1. Cultivo de linhagens celulares tumorais

Neste trabalho foram utilizadas células de câncer de mama: MDA-MB 231 e células MCF-7 assim como, células endoteliais humanas de tumor hepático, SKHep-1. Tais linhagens celulares foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC). Células MDA-MB 231 são negativas para a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, ao passo que, a linhagem MCF-7 é positiva para tais marcadores. Ambas células originárias de carcinomas ductais invasivos. Outras linhagens de câncer de mama estudadas foram MACL-1 e MGSO3, (Correa, Bertollo, & Goes, 2009) oriundas de tumores primários de pacientes com câncer de mama e estabelecidas pelo nosso grupo de pesquisa. As células tumorais foram cultivadas em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio, 100 U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de streptomina (Life Technologies) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cripion Biotecnologia Ltda.) (DMEM completo) à 37°C, na estufa úmida com 5% CO₂.

3.2.2. Obtenção e cultivo de células normais

As células de mama normais foram obtidas de fragmentos da mama de pacientes internadas na Clínica de Cirurgia Plástica, do Núcleo de Cirurgia Plástica, coordenada pelo Dr. Luiz Lamana dos Santos, localizada em Belo Horizonte, Minas Gerais. As células foram isoladas segundo protocolo adaptado de Speirs e colaboradores 1999 (Speirs, White, & Green, 1996). A parte fibrosa da mama foi incubada em colagenase IV 0,25% (Life Technologies) na estufa por 18 horas à 37°C.

Após a dissolução do material, foi realizada uma filtração em gaze estéril e o filtrado centrifugado a 250 g. Os pellets derivados dessas centrifugações, bem como, o sobrenadante da última centrifugação foram mantidos em frascos de cultura celular com meio de cultura de Dulbecco (*Dulbecco's modification of Eagle's médium*, DMEM, Sigma-Aldrich) com 4,5 g/L de glicose e 4 mM L-glutamina, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Life Technologies), 100 unidades/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Life Technologies), à 37°C em 5% CO₂. Para os experimentos, foram utilizadas células até a quinta passagem. O procedimento já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG sob número ETIC 0312 0203 000 10 (Anexo B).

3.3. Espécimes tumorais

A utilização de amostras de tumores de mama de pacientes foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (número do projeto 025/09). Obteve-se o consentimento informado de todos os participantes. As amostras foram coletadas dos tecidos mamários removidos de pacientes com câncer de mama, imediatamente após a cirurgia no Hospital da Universidade de Brasília.

Amostras das áreas não tumorais adjacentes aos tumores foram coletadas. A expressão dos marcadores foi avaliada por imunohistoquímica. Todos os casos representam carcinoma ductal *in situ*. Estas amostras foram analisadas pela técnica de western blot.

3.4. Coleta de tecidos de rato

Ratos fêmea wistar (6 a 8 semanas) foram obtidos do centro de bioterismo CEBIO da UFMG. Estes animais eram destinados a experimentação para o isolamento de tecido adiposo inguinal, sendo relacionado a outro trabalho de tese do nosso laboratório (Aprovação CETEA; número de protocolo 239/2010, Anexo B). Após a eutanásia, os tecidos foram coletados e lavados com tampão fosfato (PBS) e imediatamente homogeneizados. A extração de proteínas totais foi realizada seguindo o protocolo detalhado no tópico 3.8.

3.5. Extração de RNA total e síntese de cDNA

A extração de RNA total foi conduzida com o uso do reagente Trizol (Life Technologies) seguindo as recomendações do fabricante. Todas as garrafas de células utilizadas na extração apresentavam 70% de confluência. Em cada garrafa T75 cm² foram adicionados 3 ml de Trizol com agitação leve. O conteúdo das garrafas foi transferido para tubos seguindo com a adição de 200 µl de clorofórmio. Ao sobrenadante coletado foi adicionado isopropanol na proporção 1:1. A precipitação do RNA total foi realizada a temperatura ambiente por 15 minutos, e em seguida centrifugado por 10 minutos a 14000 g na temperatura de 4°C. Decorrida a centrifugação, o sobrenadante foi vertido e ao precipitado (*pellet*) foi adicionado 1 ml de etanol 70%. O *pellet* foi ressuspenso em 30 µl de água livre de RNases. O RNA total foi quantificado no espectrofotômetro Biophotometer (Eppendorf) e analisado em gel de agarose 1,5 % (p/v), corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL (Life Technologies).

Para eliminação do DNA contaminante, 1 micrograma RNA total foi tratado com 1 unidade de DNase I livre de RNases (Promega). Em seguida, foi realizada um passo de precipitação com fenol:clorofórmio na proporção 1:1. A síntese de cDNA foi realizada com 4 µg de RNA total utilizando oligo-dT(18) e a enzima transcriptase reversa fornecida pelo kit “*RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis*” (Thermo Fisher Scientific).

3.6. PCR semiquantitativo

A primeira fita de cDNA sintetizada foi submetida a técnica de PCR semiquantitativo. Em resumo, 1 µl de cDNA, 200 µM de cada dNTP, tampão de PCR 1X (200 mM Tris-HCl pH 8.4), 1,5 mM MgCl₂, 5 pmol de cada oligonucleotídeo e 0.25 U de *Taq* DNA Polymerase (Life Technologies) foram utilizados em uma reação de 25 µl. As condições adotadas para amplificação foram: Um primeiro passo a 3 minutos à 94 °C para a completa desnaturação. Seguiram-se ciclos de 94 °C por 45 segundos para a desnaturação, temperaturas de anelamento entre 50-60 °C (dependendo do iniciador) por 30 segundos e a extensão dos amplicons foi realizado à 72 °C por 1 minuto. O número de ciclos foi padronizado a partir do nível de expressão de cada gene. No passo final, a extensão foi de 10 minutos à 72 °C. As reações foram realizadas no termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5 % (p/v) e corados com brometo de etídio (0,1 µg/ml) sendo visualizados em transiluminador com luz UV.

3.7. PCR em Tempo Real

Todo o procedimento de PCR em Tempo Real, incluindo testes, validações e experimentos foram conduzidos seguindo os manuais da Applied Biosystems. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho ABI Prism® 7900HT (Applied Biosystems) no NAGE (Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica), com os oligonucleotídeos específicos desenhados no programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) (Tabela 3), cDNAs das células tumorais e não tumorais e SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de 94°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Para a quantificação da expressão gênica, foram utilizados os métodos comparativos de Ct: $2^{-\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Os produtos da PCR foram avaliados pela análise da curva de dissociação. Oligonucleotídeos para amplificar as variantes transcricionais 1 e

3 de SETD4 (SETV1/3), variantes 2 e 4 (SETDV2/4), bem como, oligonucleotídeos que amplificam ambas (SETD4) foram desenhadas. Como controle endógeno, os oligonucleotídeos específicos para o gene *β-actina* (NM_001101) e *RPS27* (NM_001030) foram selecionados (Tabela 3).

Tabela 3. Listagem dos oligonucleotídeos para qRT-PCR

Oligonucleotídeos	Sequência
SETV1/3F	AGGATGAAAAAGAGGCCCTGATA
SETV1/3R	AATCTTTAGCTCTTCCGTCCACAA
SETV2/4F	TACGGCCCTCACGATAATCAA
SETV2/4R	TAAGAACAAAGTTGATTCCAACCTCTT
SETD4F	TAGCCACATGTCCAGGTAAAA
SETD4R	TCTCCAACGTGAAGTCGTTCTAATT
RPS27F	TCGTGGTGGTGCTAAGAAAA
RPS27R	TCTCGACGAAGGCGACTAAT
β -actinaF	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
β -actinaR	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA

3.8. Extração de proteínas totais e fracionamento celular

A extração de proteínas totais das linhagens tumorais (MACL-1, MGSO3, MDA-MB 231, MCF-7, SKHep-1) e células normais de mama foi realizada utilizando o tampão NETN, composto por: 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 0,5% de Nonidet P-40 e 1% dos coquetéis de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich). O homogenato foi sonificado por 1 minuto, incubado no gelo por 10 minutos e centrifugado a 16.100 g, 20 minutos à 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado à -20°C.

Para o fracionamento celular, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (11,4 mM KH_2PO_4 , 3,6 mM K_2HPO_4 e 137 mM NaCl, pH7,4 –PBS), e adicionado o tampão de lise (20 mM HEPES, pH7,0, 10 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0,5% Nonidet P-40 e 1% de inibidores de proteases). Após incubação de 10 minutos no gelo, as amostras foram homogeneizadas

por vórtex, e por fim, realizada a centrifugação a 1.500 g por 5 minutos para sedimentação do núcleo. O sobrenadante foi centrifugado a 16.000 g por 20 minutos e coletado, consistindo na fração não-nuclear. O *pellet* nuclear foi lavado três vezes com tampão de lise para remoção dos contaminantes da fração não nuclear. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensão em tampão NETN e sonificado por 1 minuto. O lisado nuclear foi coletado após centrifugação (16.000 g, 20 minutos, 4°C).

Os extratos proteicos totais e os decorrentes do fracionamento celular foram dosados em placas de 96 poços pelo método de Bradford (Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante. A curva padrão foi preparada utilizando albumina de soro bovina, e a leitura das absorvâncias a 595 nm avaliadas no leitor de placas ELx 800 Universal Microplate reader (BioTEK INSTRUMENTS, INC.).

3.9. Western blot

Os extratos proteicos foram resolvidos em gel desnaturante de poli(acrilamida com concentrações de 10%. Ao término da corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (BioRad) pelo sistema de transferência semi-seco (BioRad). A membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em solução salina tamponada de Tris (20 mM Tris e 200 mM NaCl, pH7,4 – TBS) com 0,5% Tween-20 (Sigma-Aldrich) (TBS-T) por 1 hora e depois incubadas entre 18h as 8h do dia seguinte (*overnight*) à 4°C com anticorpo primário diluído em TBS-T com 5% de leite desnatado.

Os anticorpos utilizados foram: anti-SETD4 policlonal (1:100) (Santa Cruz Biotechnology), anti-ciclinas D1, D2, D3 (Cell Signaling) (1:500), fosfo-p44/42 MAPK(ERK 1/2)(Thr 202/Tyr 204) (1:500), p44/42 MAPK(ERK 1/2) (Cell Signaling) (1:500), anti- α -tubulina monoclonal (1:10000) (Sigma-Aldrich), anti-lamina B1 policlonal (1:5000) (Abcam), anti-GAPDH (1:5000) e anti- β -actina (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Previamente a incubação de 1 hora com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com TBS-T. Os anticorpos secundários usados são conjugados a peroxidase

(1:5000) (Millipore). As bandas foram reveladas por reação de quimioluminescência com ECL Plus (GE Healthcare). Os filmes Carestream[®] Kodak[®] BioMax[®] MR foram escaneados e as análises quantitativas foram realizadas utilizando o software Image J.

3.10. Construções utilizadas

3.10.1. Construções adquiridas da empresa Origene

As construções contendo as sequências codificantes das variantes transcricionais 1 e 2 de *SETD4* (número de acesso: NM_017438.4, NM_001007259.2, respectivamente) clonadas no vetor *Precision Shuttle* pCMV6-Entry foram obtidas da empresa Origene (Anexo A1). Neste vetor, a sequência codificante é expressa fusionada às etiquetas MYC (sequência polipeptídica derivada da proteína c-MYC) e DDK (sequência polipeptídica similar à FLAG[®], marca registrada da Sigma-Aldrich).

Adicionalmente, 6 construções para o estabelecimento de células apresentando reduzida expressão de *SETD4* também foram obtidos da Origene. Dentre eles: quatro plasmídeos shRNA, pGFP-V-RS com sequências similares a sequência de *SETD4*, bem como, o vetor controle contendo um sequência aleatória inespecífica (*scrambled*), e vetor vazio (ausência de sequência). O vetor pGFP-V-RS contém 2 sequências complementares de 29 nucleotídeos separadas por 7 nucleotídeos, os quais formam o *loop*. Este plasmídeo codifica dois distintos cassetes de expressão, sendo o primeiro o cassete de shRNA contra o gene *SETD4* sob controle do promotor U6, e o cassete de expressão que codifica *GFP* sob controle do promotor constitutivo CMV (Anexo A2).

3.10.2. Subclonagem de SETD4 no vetor pCMV6-AC-GFP.

A estratégia de transferências das sequências do vetor de entrada pCMV6-Entry para outros vetores como pCMV6-AC-GFP mantém o inserto na mesma orientação e na mesma janela de leitura. As mesmas enzimas de

restrição foram usadas na transferência entre os vetores: *SgfI* na extremidade 5' e *MluI* na extremidade 3' (Anexo A1).

A reação de restrição enzimática foi realizada com 3 µg de DNA plasmidial pCMV6-Entry-SETD4-MYC/DDK, no tampão 1X tango™ e 5 unidades da enzima *SfaAI*(*AsiSI*) (Thermo Fisher Scientific) (isosquisômero de *SgfI*) e 10 unidades de *MluI* (Thermo Fisher Scientific) durante 2 hora. O fragmento de interesse foi purificado do gel utilizando-se o kit *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN) conforme as especificação do fabricante. Paralelamente, o vetor pCMV6-AC-GFP contendo a sequência codificadora de SMYD5 clonada foi submetido a digestão nas mesmas condições especificadas anteriormente. Ao término da reação, foram adicionadas 2,5 U da enzima fosfatase alcalina conforme as recomendações do fabricante (Shrimp Alkaline Phosphatase) (Promega).

A reação de ligação foi realizada em um volume final de 10 µL, empregando-se 1 µL de T4 DNA ligase (Promega), 1 µL de tampão 10X da ligase, aproximadamente 100 ng do plasmídeo pCMV-AC-GFP, 400 ng do fragmento purificado e água para completar o volume. As reações foram incubadas à 4°C durante 15-20 horas.

Em ambiente estéril, a reação de ligação foi adicionada as bactérias eletrocompetentes (DH5α), as quais foram submetidas a uma descarga elétrica de 2300 volts por 5,2 milisegundos no eletroporador (Electroporator 2510, Eppendorf). Para a recuperação das células, foram adicionados 1 ml de meio Luria Bertani (LB) (1% bacto-triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) e a cultura mantida à 37°C sob agitação no período de 1 hora. Em seguida, 200 µl da cultura foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas à 37°C por cerca de 16 horas.

Para a análise dos transformantes, foram selecionadas 5 colônias crescidas na placa e a confirmação feita por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene *SETD4* desenhados para o experimento de PCR em Tempo Real. Para isolamento dos DNAs plasmidiais foram utilizados os kit *QIAprep Spin Miniprep* e *QIAGEN Plasmid Maxi* (QIAGEN).

3.10.3. Obtenção do vetor pCMV-GFP sem insertos.

De posse da construção contendo *SETD4* clonado em pCMV-AC-GFP, fez-se necessário obter o vetor controle pCMV-AC-GFP vazio para a expressão somente da proteína GFP. O vetor foi digerido com as enzimas *SfaAI*(*AsiSI*) e *MluI* como detalhado no item anterior e submetido as atividades de 3'- 5' exonuclease e 5'- 3' DNA polimerase. Para tal, a reação foi realizada com 1 µg do DNA digerido e purificado, 0,1 mM de dNTPs, 1 unidade da T4 DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific). Após a incubação à 11 °C por 20 minutos, seguiu-se com a inativação à 75°C por 10 minutos.

A reação da T4 DNA ligase teve como substrato 150 ng de DNA plasmidial e seguiu as exigências do fabricante (Promega). O procedimento de transformação bacteriana foi conduzido como citado no item 3.10.2. Os clones obtidos foram submetidos a reação de sequenciamento.

3.10.4. Sequenciamento

O sequenciamento dos clones obtidos foi realizado em sequenciador automático *MegaBACE 1000* (GE Healthcare), usando o kit *DYEnamic™ ET Dye Terminators* (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante. As reações de sequenciamento foram baseadas na técnica de sequenciamento por terminação de cadeia por didesoxinucleotídeos (ddNTPs) (Sanger, Nicklen, & Coulson, 1992).

Cada fita do DNA foi sequenciada empregando-se os oligonucleotídeos direto VP1.5 (GGACTTTCCAAAATGTCG) e reverso XL39 (ATTAGGACAAGGCTGGTGGG). O mínimo de 3 reação para cada fita do DNA foram realizadas. As sequências de DNA obtidas foram analisadas no Vector NTI® Express Designer Software (Life Technologies) e comparadas com sequências depositadas nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e da empresa Origene (sequências completas dos vetores).

3.11. Transfecção dos DNAs plasmidiais para estudo de localização subcelular

Para a transfecção das células com o vetor vazio e plasmídeos contendo a sequência de *SETD4* foi utilizado o reagente Lipofectamina™ 2000 (Life Technologies) como veículo. No dia anterior, as células MDA-MB 231 e SKHep-1 foram plaqueadas em lamínula de 22x22 mm em placas de 6 poços na densidade de 2×10^5 células/poço. Para o experimento, o meio das células foi retirado e adicionado 1,5 ml de Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Life Technologies). O volume correspondente dos plasmídeos (2µg) e 10 µl de Lipofectamina™ 2000 foram incubados em 250 µl de Opti-MEM® em dois tubos independentes por 5 minutos, ao quais foram posteriormente combinados por 25 minutos. Em seguida, essa mistura foi gotejada às células. Decorridas 4 horas da transfecção, o meio foi trocado para DMEM completo. 48 horas após o ensaio de transfecção, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas, em seguida, com 0,1% Triton X-100 em PBS.

Para a marcação nuclear foi utilizada a incubação com o iodeto de propídeo ou com a sonda Hoechst 33258 (Life Technologies). No último método, a sonda de núcleo fluorescente Hoechst foi incubada na concentração (200 ng/mL) em PBS. Alternativamente, a marcação com o iodeto de propídeo exigiu o tratamento prévio das células com RNase A (0,2 mg/ml) por 30 minutos, seguindo com a incubação do iodeto de propídeo (0,1 µg/ml). Após 5 lavagens de 5 minutos com PBS, as lamínulas foram montadas usando a solução de montagem Prolong gold (Life Technologies). As imagens de fluorescência foram obtidas no microscópio de fluorescência Olympus IX70 e no microscópio confocal Zeiss LSM 510 meta com objetiva de imersão em óleo de 63X, abertura numérica de 1,4. As células transfectadas com o plasmídeo pCMV-Entry-SETD4 seguiu o protocolo de imunofluorescência descrito no próximo tópico.

3.12. Imunofluorescência

As células SKHep-1 e MDA-MB 231 foram plaqueadas em lamínula de 22x22 mm na densidade de 2×10^5 células/mL. Após 24 horas do plaqueamento das células, estas foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos, lavadas três vezes com PBS e, em seguida, permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 em PBS. As lamínulas foram incubadas em uma solução de bloqueio (PBS contendo 1% de BSA, 0,1% Triton e 5% soro de cabra) por 1 hora. Após o bloqueio, as células foram mantidas por 12 horas em PBS 1% BSA contendo os anticorpos primários [anti-SETD4 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology); anti-DDK (1:1000) (Origene); anti-MYC (1:500) (Sigma-Aldrich)]. Após o período de incubação, foram realizadas três lavagens com PBS, por 5 minutos. Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora em PBS 1% BSA contendo o anticorpo secundário: anti-coelho ou anti-camundongo conjugado com Alexa 488 (Life Technologies) na diluição de 1:500.

Ao término da incubação com o anticorpo secundário por 50 minutos a temperatura ambiente foi adicionada a sonda de núcleo fluorescente Hoechst 33258 (Life Technologies) na concentração de 200 ng/mL por 10 minutos. Após 5 lavagens de 5 minutos com PBS, as lamínulas foram montadas usando a solução de montagem Prolong gold (Life Technologies). As imagens de imunofluorescência foram obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 meta com objetiva de imersão em óleo de 63X, abertura numérica de 1,4.

3.13. Imunocitoquímica

As lâminas esterilizadas foram tratadas com solução de poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich) por 30 minutos, e em seguida lavadas 2 vezes com PBS. Após a secagem da lâmina, as células MACL-1, MGSO3, MCF-7 e MDA-MB 231 foram plaqueadas na densidade de 1×10^6 células/mL. Após 24 horas do plaqueamento das células, estas foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos, lavadas três vezes com PBS. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com a imersão das lâminas na solução de peróxido de

hidrogênio 30% por 30 minutos. Seguiu-se com 3 lavagens de 5 minutos na solução de Tris-HCl 20 mM.

As lâminas foram incubadas por 1 hora na solução de bloqueio (solução de Tris-HCl 20mM contendo 2% de BSA e 0,1% de Tween 20). Em seguida, foram realizadas as incubações *overnight* à 4°C com o anticorpo primário (anti-SETD4 (1:100) (Santa Cruz Biotechnology) diluído na solução diluente de Tris-HCl 20 mM. A lâmina referente ao controle negativo, por sua vez, foi incubada com a solução de Tris-HCl 20 mM. O anticorpo secundário conjugado a biotina (Biotinylated Link Universal - Dako) foi incubado no escuro por 30 minutos, seguindo com 3 lavagens de 5 minutos com solução de Tris-HCl 20 mM. As lâminas foram incubadas com o complexo streptavidina (Streptavidin + HRP - Dako) por 30 minutos no escuro, seguindo com 3 lavagens de 5 minutos com solução de Tris-HCl 20 mM.

A revelação procedeu-se com a aplicação de uma gota do substrato cromogênico DAB (3,3- diaminobenzidina) (Liquid DAB + Substrate Chromogen System - Dako) sobre a lâmina. Rapidamente, foi realizada o bloqueio da revelação com a lavagem das lâminas na solução de Tris-HCl 20 mM e com 5 lavagens rápidas em água deionizada. Em adição, foi realizada a contracoloração com hematoxilina de Harris. Seguiu-se com passos de desidratação nas soluções de etanol 70%, 90%, 100%. A diafanização foi realizada com a imersão das lâminas em xilol por 5 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas com entelan e lamínulas de 22x22 mm e mantidas na estufa à 37°C para secagem.

3.14. Transformação estável de células

Previamente a transfecção das células, foi necessário determinar a concentração mínima requerida do agente seletivo que leva a morte das células não transfectadas. As células MDA-MB 231 e MCF-7 foram plaqueadas na densidade de 1×10^4 em placas de 24 poços. Após 24 horas, os meios contendo os compostos de seleção foram adicionados nas concentrações finais de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2 mg/ml para G418. Para a puromicina, foram utilizadas as concentrações finais de 0,05; 0,20; 0,35; 0,5 µg/ml. . Ao longo de

14 dias de pressão, renovava-se o meio contendo as drogas e observava-se a morte celular, no microscópio.

Com a finalidade de obter células com reduzida expressão de SETD4, os plasmídeos shRNA pGFP-V-RS foram utilizados para a transfecção das células MDA-MB 231. Já as construções, pCMV-AC-GFP-SETD4 e pCMV6-Entry-SETD4-MYC/DDK usadas na transfecção de células MCF-7 e MDA-MB231 para geração de clones superexpressando SETD4.

Determinada a concentração da droga procedeu-se com a transfecção dos plasmídeos usando LipofectaminaTM 2000 (Life Technologies) como no item 3.11. Após 72 horas da transfecção, o meio com os agentes de seleção foi adicionado e a pressão realizada durante os 14 dias com renovação do meio a cada 2 dias. Ao fim deste tempo, uma diluição seriada foi preparada com a população mista de células estáveis para o plaqueamento de 1 célula por poço. A colônia gerada por uma célula isolada foi acompanhada por microscopia de luz e fluorescência. As células foram transferidas das placas ao atingir uma colônia com cerca de 50-70 células e o protocolo de 14 dias de pressão foi novamente aplicado. Foram selecionados 3 clones independentes com reduzida expressão de SETD4 (ShSETD4 2, ShSETD4 3 e ShSETD4 4). Como controlo negativo, utilizou-se um clone que expressa de forma estável o shRNA *scrambled*. A expressão deste shRNA ativa a via de interferência de RNA, mas teoricamente não leva ao silenciamento de nenhum gene. Adicionalmente, como controle, o plasmídeo pGFP-V-RS sem nenhuma sequência inserida também foi usado.

No estudo de superexpressão, 2 clones superexpressando SETD4 fusionada às etiquetas (MYC e DDK), 2 clones superexpressando SETD4 fusionado à proteína GFP foram selecionados, bem como, células controle transformadas com o vetor vazio.

3.15. Ensaio de MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste com o reagente MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina], o qual se constitui um método colorimétrico sensível e quantitativo. Neste ensaio, o MTT é acumulado

pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal, pelas enzimas desidrogenases mitocondriais resulta na formação de cristais de formazan com coloração azul que se acumulam nas células (Mosmann, 1983).

Neste experimento, as células estáveis foram plaqueadas na densidade de 1×10^4 células/poço e mantidas na estufa de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 24 horas, e decorridas 72 horas do plaqueamento, o meio foi removido e adicionados 105 µl de meio acrescido de 85 µl da solução estoque de MTT (5 mg/ml), em cada poço. Após 2 horas, os cristais de formazan formados foram solubilizados com a adição de 210 µl de solução SDS em 10% de HCl. Ao término de 18 horas na estufa de CO₂, a solução foi homogeneizada e seguiu-se com a leitura a 595nm no leitor de placas ELx 800 Universal Microplate reader (Bio-TEK INSTRUMENTS, INC.). Os resultados foram expressos como a porcentagem da absorbância presente nas células transformadas comparadas às células controle.

3.16. Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico ou ensaio de formação de colônia detecta a capacidade de uma única célula gerar células-filhas após tratamentos que podem ocasionar a morte reprodutiva. Clones estáveis com reduzida expressão de SETD4, superexpressando SETD4 e seus respectivos controles foram utilizados neste ensaio. Foram plaqueadas 900 células em placas de 35 mm, e estas foram mantidas na estufa de CO₂ por 10 dias. A troca do meio foi realizada a cada 3 dias. Após os 10 dias, o meio foi removido e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 5 minutos, lavadas com PBS e adicionada a solução corante (6% de glutaraldeído e 0,5 % de cristal violeta) por 1 hora. A solução corante foi removida e o excesso do reagente eliminado com a imersão das placas em água (Franken, Rodermond, Stap, Haveman, & Van Bree, 2006). As placas foram fotografadas e as imagens utilizadas para a contagem das colônias usando o software Image J. Com os resultados das contagens foram calculados o fator de sobrevivência (FS) e a eficiência de plaqueamento (EP) através das seguintes equações:

EP= (nº células contadas/ nº células plaquedadas) x 100;

FS= (EP tratamento/ EP controle) x100

3.17. Citometria de fluxo

O ensaio de citometria de fluxo utilizado difere as fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) em decorrência das diferenças no conteúdo de DNA. O uso de uma solução hipotônica contendo iodeto de propídeo constitui um protocolo rápido e de fácil marcação do DNA para análise no citômetro de fluxo (Riccardi & Nicoletti, 2006). Este método permite a quantificação de células mortas e análise simultânea dos parâmetros do ciclo celular nas células vivas.

As células estáveis foram plaqueadas em placas de 24 poços na densidade de 1×10^4 células/poço e mantidas na estufa de CO₂. Após 48 horas, a placa foi centrifugada a 200 g por 10 minutos e após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 300 µl da solução fluorocrômica (HPS, hypotonic fluorochromic solution - 0,1 % citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100, 20 µg/ml iodeto de propídeo) e mantidas à 4 °C por 1-2 horas na ausência de luz. Em seguida, a suspensão de células foi transferida para tubos de 1,5 ml e os dados coletados no citômetro de fluxo (Guava Easy Cyte, Milipore) e analisados no software FlowJo (TreeStar).

3.18. Ensaio de atividade do gene repórter luciferase

A região promotora do gene *c-fos* clonado no plasmídeo plightswitch (S721638, SwitchGear Genomics), bem como o plasmídeo controle pRL-TK foram usados na co-transfecção das células estáveis. A construção repórter pFos-Luc contém 1023 nucleotídeos da sequência 5' do gene *fos* humano (ID2353) e inclui os elementos regulatórios: SRE: elemento resposta ao soro (-317a -298) e CRE: elemento de resposta a AMP cíclico (-67 a -57) (Fisch, Prywes, Simon, & Roeder, 1989; Janknecht, Cahill, & Nordheim, 1995; Sassone-Corsi, Ransone, Lamph, & Verma, 1988).

Adicionalmente, a região promotora (1000 pb) do gene *β-actina* (ID 60) clonado no plasmídeo plightswitch foi usado para normalização dos resultados

(S717678, SwitchGear Genomics). O plasmídeo pRL-TK expressa a luciferase de *Renilla reniformis* sob o controle do promotor da timidina cinase do HSV-1 e foi utilizado para normalizar a transfecção. O procedimento de transfecção utilizando o reagente Lipofectamina™ 2000 seguiu o protocolo documentado na secção 3.11.

O ensaio de luciferase foi realizado com o kit “Dual-Glo® Luciferase Assay System” (Promega). 48 horas após a transfecção, 75 µL de reagente Dual-Glo foram adicionados a igual volume de meio DMEM nas placas em cultura para a lise celular. Após 10 minutos, os extratos foram transferidos para a placa FluoroNunc™ (Thermo Fisher Scientific) de 96 poços, e mensurada a luminescência no leitor Synergy 2 (Biotek). Para normalizar a eficiência da transfecção, a reação de oxidação do substrato da luciferase foi interrompida para a medição da atividade de Renilla. A atividade de luciferase foi expressa em unidades relativas de luz (RLU) e normalizada pela atividade de Renilla. Os dados de atividade relativa do promotor de *c-fos* foi normalizado em relação a atividade do promotor de *B-actina*.

3.19. Análise estatística

Os gráficos foram gerados no programa GraphPad Prism 5. Com o objetivo de avaliar a significância das diferenças observadas entre os grupos estudados foi realizado o procedimento de análise one-way ANOVA. O teste de comparação de médias utilizado foi o teste de tukey usando o programa SAEG 9.1 (Sistema para Análise Estatísticas). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM).

4.RESULTADOS

4.1. Análise *in silico* de SETD4.

SETD4 é uma proteína conservada em diferentes espécies e que ainda não foi caracterizada em nenhum organismo (Anexo A3). A sequência gênica de SETD4 está localizada no cromossomo 21 humano, na região q22.13, e transcreve um mRNA de 3001 bp, o qual codifica um proteína de aproximadamente 44 kDa (440 resíduos de aminoácidos). A busca por domínios proteicos conservados nas sequências de SETD4 revela a presença do domínio SET na região amino-terminal (resíduos 59-273; E-value $1.4e^{-10}$), bem como do domínio Rubs-sub-bind na região carboxi-terminal. (resíduos 307-425; E-value $8.1 e^{-23}$) (Figura 1).

O domínio SET está presente nas lisinas metiltransferases, sendo que, grande parte das proteínas contendo este domínio atuam como histonas lisinas metiltransferases. Este domínio catalítico é responsável pela transferência do grupo metil do cofator SAM ao grupo amino do resíduo de lisina presente no substrato (histonas ou outras proteínas) (Dillon et al., 2005; Schapira, 2011).

O domínio Rubs-sub-bind presente na extremidade carbóxi-terminal foi inicialmente identificado na metiltransferase LSMT, a qual atua na subunidade maior da enzima rubisco. O domínio Rubs-sub-bind permite a ligação da proteína ao seu substrato, tais como as caudas N- terminais das histonas H3 e H4, e outras subunidades alvos como a enzima rubisco (Trievel et al., 2003).

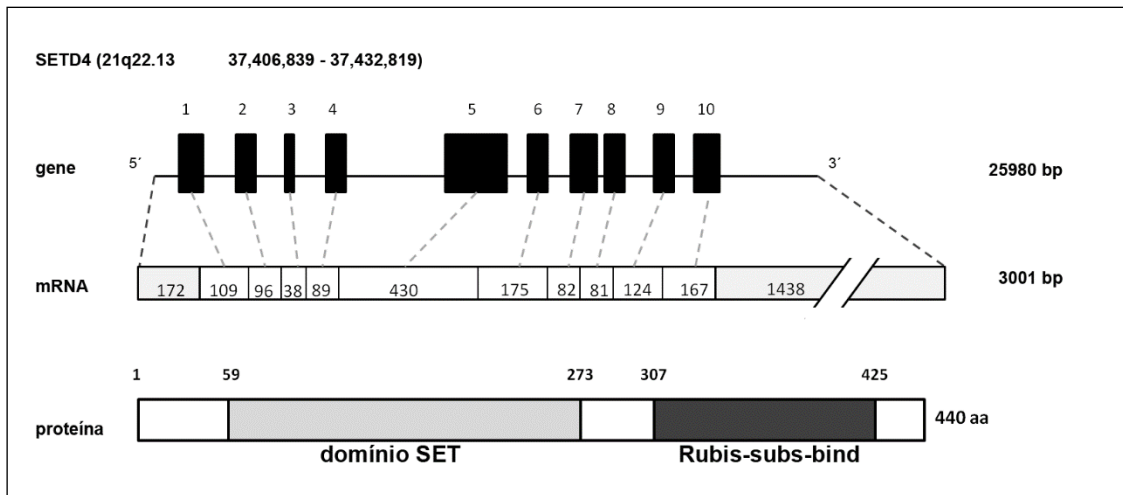


Figura 1. Organização estrutural do gene que codifica SETD4. Representação esquemática da estrutura gênica e proteica de SETD4. Os éxons estão representados em quadrados pretos (na sequência gênica numerados de 1 a 10), e em branco na estrutura do mRNA. Os números de nucleotídeos de cada éxon é indicado nos quadrados brancos. As regiões não traduzidas na sequência do mRNA são demarcados em cinza. Os domínios proteicos presentes na sequência de SETD4 são mostrados em cinza, domínio SET (pfam00856), e em preto, domínio Rubis-subst-bind (pfam09273).

Para diferentes espécies, como rato, camundongo e macacos são preditas uma única proteína (439/440 resíduos de aminoácidos) codificada pelo gene *SETD4* como mostrado no anexo A3. Em contrapartida, em função de eventos de *splicing* alternativo, em humanos são preditas 4 variantes transcricionais que codificam 4 isoformas de SETD4. As quatro variantes transcricionais de *SETD4* divergem somente nas regiões de extremidades de suas sequências. A variante 1 (1323 nucleotídeos) é a mais longa e codifica uma proteína de 440 resíduos de aminoácidos (Anexo A4 e Figura 2). A variante 2 difere na sequência 5'UTR e apresenta um éxon alternativo de *splicing* 3' conferindo uma mudança da fase de leitura (*frameshift*) comparada a variante 1 (Anexo A4). Deste modo, a isoforma 2 apresenta a região carboxi-terminal distinta da isoforma 1 (Figura 2). Em comum, as variantes 3 e 4 apresentam um éxon 5' adicional levando a iniciação da tradução em um códon alternativo comparado as sequências 1 e 2 (Figura 2). Já nas extremidades 3' das sequências, a variante 3 é similar a variante 1, ao passo que, a sequência 4 equipara-se a 2 (Anexo A4).

A análise *in silico* das 2 isoformas preditas para o gene *SETD4* em chimpanzé revelam a alta homologia das sequências com as isoformas 1 e 2

humanas (Anexo A5). Muito embora, os eventos de *splicing* de *SETD4* nestas duas espécies sejam conservados, em humanos, os dois sítios de *splicing* (5' e 3') são combinados gerando 4 possíveis variantes. Análise de RNA-seq em amostras de fígados humanos e de chimpanzés apontaram que somente 7% dos genes expressos neste tecido apresentam divergência no *splicing* alternativo entre as duas espécies. Neste estudo, os transcritos *SETD4* expressos em fígado não divergiram entre as espécies analisadas (humanos, chimpanzés e macacos) (Blekhman, Marioni, Zumbo, Stephens, & Gilad, 2010).

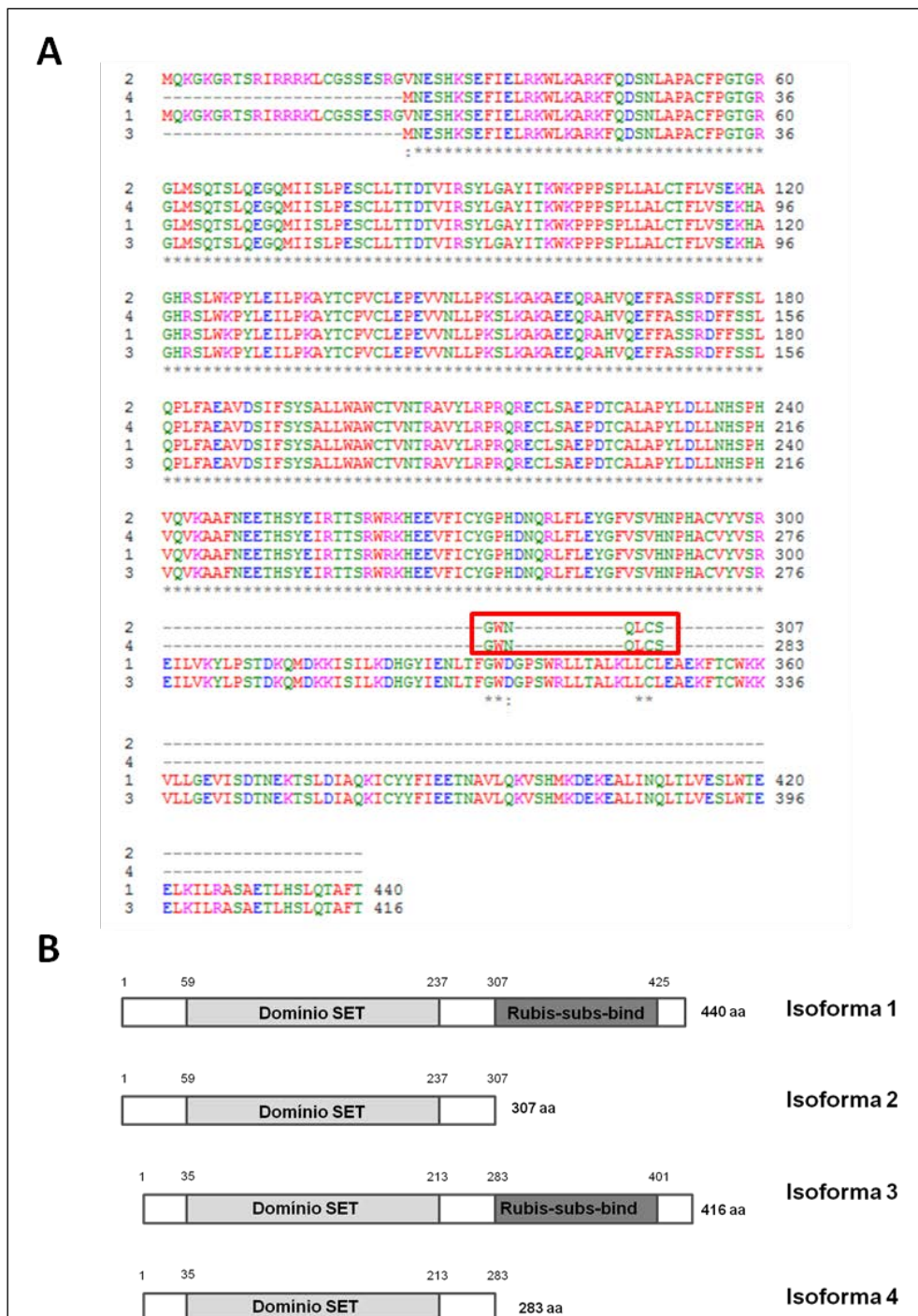


Figura 2. Alinhamento das 4 isoformas previstas da proteína SETD4. (A) As sequências proteicas das isoformas 1 (440 aa), 2 (307 aa), 3 (416 aa) e 4 (283 aa), depositadas no banco de dados do NCBI, foram alinhadas utilizando o programa Clustal W. A caixa vermelha indica os 7 resíduos de aminoácidos divergentes na cauda C-terminal das isoformas. Os resíduos de aminoácidos de caráter básico são marcados em rosa, os ácidos em azul, os polares neutros em verde e os apolares em vermelho. (B) Representação esquemática das isoformas 1-4 de SETD4 e seus domínios: SET (pfam00856), e domínio Rubs-sub-bind (pfam09273).

Com o objetivo de estender o conhecimento estrutural da proteína SETD4 foi realizada um ensaio de modelagem molecular. A modelagem molecular tem papel fundamental tanto na interpretação de dados experimentais de elucidação estrutural, como na predição de estruturas de proteínas e análise das propriedades físico-químicas das biomoléculas e da interação destas com seus ligantes. Modelos virtuais da proteína podem ser elaborados por comparação da similaridade de sua sequência primária com as sequências de proteínas homólogas resolvidas e depositadas no PDB (Deane & Blundell, 2003).

A etapa de identificação de proteínas moldes adequadas foi feita pelo programa BLAST no banco de dados PDB, sendo selecionada a proteína humana SETD3, *SET domain-containing protein 3* (PDB ID: 3SMT chain A, resolução 2.04 Å). O alinhamento entre as sequências de SETD3 e SETD4 apresentou 24% de identidade, reduzido *E-value* ($1e^{-12}$) e alta cobertura da sequência alvo (81%) (Anexo A6). Muito embora, o valor de identidade entre as sequências seja baixo para os ensaios de modelagem, verifica-se a existência de alta similaridade em composição de elementos de estrutura secundária entre as proteínas (Anexo A6).

A localização do grupo doador de metil (SAM, S-adenosil-metionina) na região do sítio ativo da enzima é de crucial importância para a catálise das metiltransferases (Marmorstein, 2003). Por isso, foi realizada a inserção do grupo ligante no modelo. Quanto ao molde SETD3 foi realizada a substituição de resíduos de selenometionina, empregados para o faseamento experimental da proteína, por resíduos de metionina, sem modificação das coordenadas do PDB. Algumas modificações foram introduzidas manualmente no alinhamento sequencial para adaptá-lo, como a remoção dos seis primeiros resíduos na sequência de SETD4, e dos 50 primeiros resíduos na região amino-terminal do molde, os quais mostraram-se sem correspondentes na sequência de SETD4.

Os candidatos estruturais gerados pelo Modeller foram analisados nos programas ProSA e Procheck para a seleção da estrutura com menor pseudo-energia. A validação estrutural foi realizada para verificar se os modelos apresentavam corretos e aceitáveis valores de estereoquímica como: comprimentos e ângulos das ligações, planaridade das ligações peptídicas e

dos anéis das cadeias laterais, quiralidade e impedimento estérico entre pares de átomos não ligados.

Com base na validação e visualização da estrutura, fez-se necessário a realização da otimização das regiões de loops. O diagrama de Ramachandran do modelo SETD4 selecionado apontou 92,8% dos resíduos de aminoácidos em regiões permitidas (Anexo A7). O valor de Z-core pelo ProSa foi de - 8.07.

A análise visual da estrutura mostrou que os resíduos E88, S99, P146, G330 e K398 localizados em regiões desfavoráveis no plot de Ramachandran apresentam-se coerentes com seu ambiente químico favorável como mostrado pelo programa Verify 3D. Outro fato a ser apontado é que tanto esses resíduos, quanto outros 6, pertencentes a regiões adicionais do gráfico de Ramachandran encontram-se em regiões de baixa identidade sequencial e em regiões de loop, as quais são regiões muito flexíveis, com grande dificuldade para a modelagem estrutural.

O modelo da proteína humana SETD4 foi depositado no banco de dados *Protein Model DataBase* (PMDb), com o número de identificação PM0078503 (<http://mi.caspur.it/PMDb/>) (Figura 3A). A sobreposição da estrutura molde e do modelo de SETD4 é apresentado na figura 3B. As estruturas das proteínas SET resolvidas experimentalmente, revelam a presença de um core folha β flanqueado por uma variável extensão amino e carboxi-terminal divergente no domínio SET (Schubert et al., 2003; Trievel et al., 2003). A divergência principal na sobreposições do molde e modelo são localizadas nas regiões de loop (Figura 3B).

As características do domínio SET são apresentadas na Figura 4, a qual mostra o alinhamento deste domínio em proteínas SET humanas incluindo SETD4. O domínio SET consiste de 2 regiões não contínuas localizadas nas regiões amino e carboxi-terminais da sequência primária, regiões estas denominadas SET-N e SET-C, respectivamente. Cada região possui curtas cadeias β (3 a 4), uma curta α -hélice e muitos loops, os quais conectam estes elementos de estrutura secundária (Figura 4) (Marmorstein, 2003).

Três regiões de alta similaridade de sequência são encontradas no domínio SET, uma na região SET-N (resíduos 58-62 na proteína SETD4) e duas na região SET-C (resíduos 235-240; 266-273 em SETD4). Além disso, as

estruturas SET revelam um invariante resíduo de tirosina como o resíduo chave na catálise (Figura 4). Os resíduos de aminoácidos conservados e em interação com o cofator SAM são evidenciados na Figura 3C e 4.

Cada estrutura SET possui divergências nas regiões flanqueando SET-N e SET-C, bem como na região de inserção, SET-I. Esta última região apresenta considerável variedade estrutural e de sequência entre as proteínas SET (Marmorstein, 2003; Trievel et al., 2002). O comprimento da região SET-I de SETD4 (131 resíduos) e SETD3 (127 resíduos) diferem da extensão apresentada pelas demais proteínas SET (Figura 4). Tal divergência somente na extensão da região SET-I parece não estar vinculada a especificidade ao um substrato, uma vez que proteínas com idêntica especificidade (Suv39H1 e SETDB1) apresentam uma grande variação na região SET-I (Marmorstein, 2003).

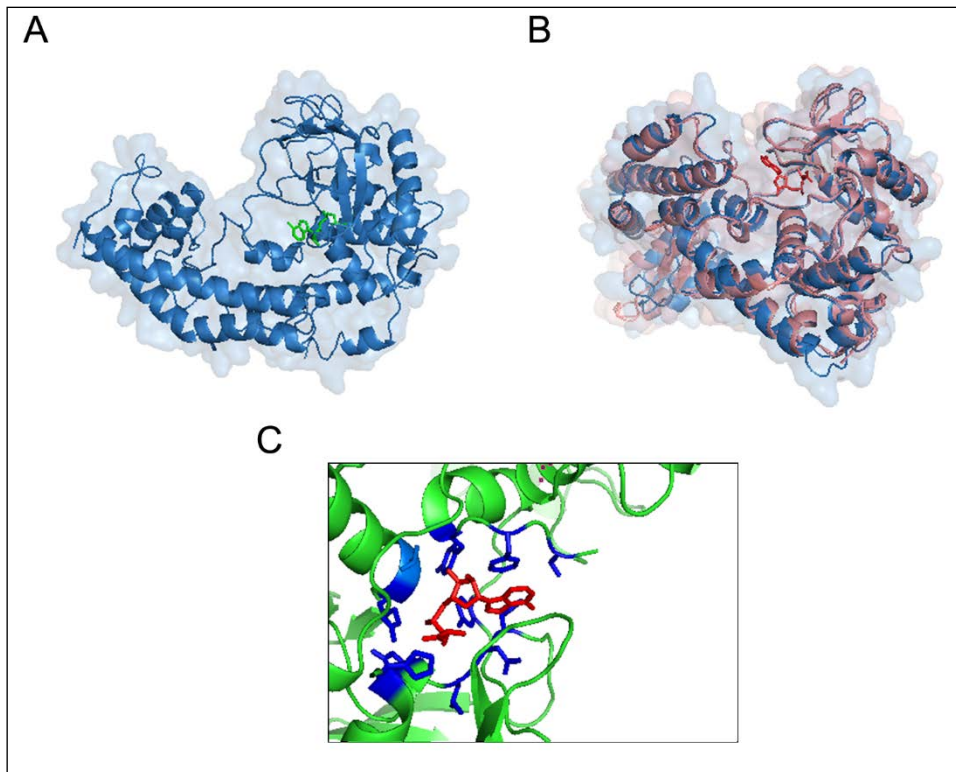


Figura 3. Modelagem comparativa de SETD4. (A) A estrutura tridimensional do modelo SETD4 é mostrada na presença do cofator SAM (verde), no interior da estrutura. (B) Sobreposição da estrutura molde SETD3 e da estrutura modelada de SETD4. Nesta imagem, o cofator SAM é mostrado em vermelho. (C) Visão detalhada da região do modelo de SETD4 que interagem com SAM. Resíduos de aminoácidos conservados são representados em azul, e o cofator SAM em vermelho.

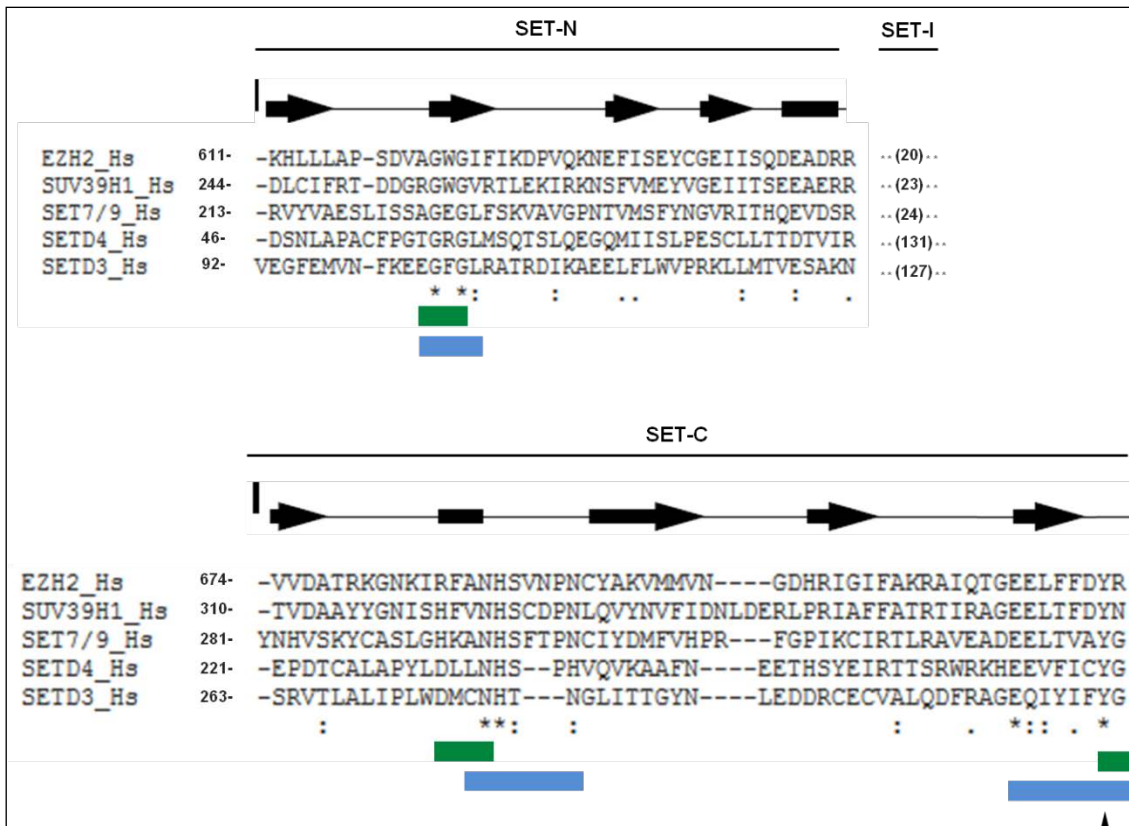


Figura 4. Alinhamento das sequências primárias de SETD4 e de caracterizadas proteínas SET humanas. Alinhamento das sub-regiões amino (SET-N) e carbóxi (SET-C) do domínio SET e a indicação da extensão da região de inserção (SET-I). Os elementos de estrutura secundária conservados são mostrados acima do alinhamento (seta = cadeia β ; retângulo = α -hélice). As regiões envolvidas na ligação do cofator são indicados com a barra verde abaixo do alinhamento. Já a barra azul, destaca as 3 regiões de sequências conservadas. O resíduo de tirosina conservado é destacado com o triângulo preto.

4.2. Distribuição tecidual de SETD4.

O website GeneHub-GEPIS permite a avaliação global da expressão em tecidos humanos e de camundongos, com base na abundância das sequências de EST (*Expressed Sequence Tag*) (Y. Zhang et al., 2007). Neste contexto, o cérebro, tecidos embrionários, pulmões, olhos, testículos e pâncreas foram os tecidos com as mais elevadas abundâncias de sequências *SETD4* em humanos (Warnatz et al., 2010). Em camundongos, os tecidos com os mais maiores valores de expressão foram: cérebro, rim, nervos, retina e testículos. A análise no banco de dados de transcriptoma do NCBI (UNIGENE) apontam os tecidos embrionários, cérebro, olho, ovário e tecido conjuntivo como fontes de *SETD4* em ratos.

Deste modo, com o objetivo de avaliar o padrão de expressão de SETD4 nos tecidos de rato foi realizado a técnica de western blot usando um anticorpo comercial específico para SETD4 (Figura 5). Uma única proteína SETD4 de aproximadamente 49 kDa (439 resíduos de aminoácidos) é predita em ratos. O anticorpo reconheceu nos extratos proteicos uma única banda com peso molecular de aproximadamente 45 kDa. SETD4 não apresenta uma expressão ubíqua nos tecidos de rato, sendo expressa em pele, olhos e músculo esquelético.

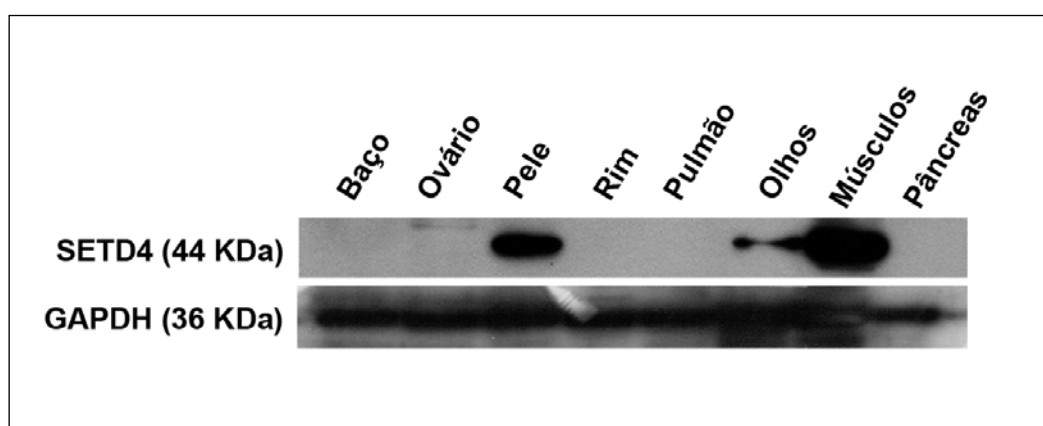


Figura 5. Expressão tecido-específica de SETD4. Western blot dos extratos de proteínas totais dos diferentes tecidos de rato: baço, ovário, pele, rim, pulmão, olhos, músculos esquelético e pâncreas. Foram aplicadas no gel, 35µg de proteínas, e a membrana incubada com os anticorpos anti-SETD4 e anti-GAPDH.

4.3. O nível de mRNA SETD4 é distintos nas diferentes células de câncer de mama.

Uma combinação de anormalidades genéticas e epigenéticas podem resultar na desregulação da função e expressão gênica no câncer (Jones & Baylin, 2007). Neste contexto, a expressão de histonas metiltransferases tem sido reportada como alterada em diversos tipos de tumores incluindo pulmão, próstata, fígado e mama (Hamamoto et al., 2004; Ozdag et al., 2006; Simon & Lange, 2008). A busca dos dados integrados de expressão gênica depositados no banco de dados "*The Gene Expression Atlas* (EMBL-EBI)"; (<http://www.ebi.ac.uk/gxa/>) indica uma alteração na expressão do gene *SETD4*

em diferentes linhagens de câncer de mama. Tais dados apontam elevada expressão do gene que codifica SETD4 nas células MDA-MB 231 e SkBR-3, assim como reduzida expressão em MCF-7 e HCC-1937. Coletivamente, estas informações despertaram nosso interesse em avaliar a expressão de *SETD4* em células tumorais.

Para a análise por PCR em Tempo Real, foram escolhidos 5 candidatos a genes constitutivos: *β-actina*, *MRPL19* (*proteína ribossomal mitocondrial L19*), *RPS27* (*proteína ribossomal S27*), *HPRT* (*hipoxantina fosforibosiltransferase 1*) e *TBP* (*proteína de ligação a TATA-box*). Tais genes não apresentaram alterações significativas na expressão entre células tumorais e o controle normal. *β-actina* e *RPS27* mostraram-se como as referências mais estáveis (menor variação) entre os genes constitutivos avaliados.

Os oligonucleotídeos para a amplificação das variantes transcricionais de SETD4 foram desenhados (SETV1/3, SETV2/4), bem como, para a região comum às variantes (denominado SETD4). Previamente, os iniciadores foram validados e os valores de eficiência da PCR estimados com base na determinação da inclinação da reta (*slope*) da curva padrão seguindo a equação: $E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$. As eficiências dos oligonucleotídeos foram 97,67% para SETD4, 95,85% SETV1/3, 98,03% RPS27 e 99% para *β-actina*.

A quantificação da expressão de *SETD4* foi conduzida em diferentes linhagens de câncer de mama (HCC-1954, MCF-7, CAMA-1, SkBR-3, MDA-MB 231, MDA-MB 436, MDA-MB 468), tendo como célula controle HCC-1954-BL. Esta última é oriunda de linfoblasto do mesmo indivíduo, no qual foi isolado o tumor de mama HCC-1954. Os resultados mostram um aumento significativo na expressão de *SETD4* nas células HCC-1954, MDA-MB 231, MDA-MB 436 e SkBR-3 em relação à célula controle HCC-1954-BL (Figura 6A). Em contrapartida, nas linhagens MDA-MB 468, MCF-7 e CAMA-1, a expressão de *SETD4* não diferiu do controle.

A amplificação foi também realizada nas células não tumorais de mama, as quais configuraram-se como melhor grupo normalizador. A expressão de *SETD4* foi em torno de 4 vezes superior nas células MDA-MB 231 comparadas as células normais (não tumorais). Em oposição, a expressão de *SETD4* nas células MCF-7 não diferem das células normais (Figura 6B).

A análise da curva de dissociação para ampliações das variantes curtas (SETV2/4) revelou a presença de dímeros de oligonucleotídeos ou outros produtos inespecíficos, sendo por isso removidos da análise. A confecção de oligonucleotídeos para amplificação específica das variantes 2 e 4 é limitada pela curta sequência divergente entre as variantes na extremidade 3' (Figura 2).

A quantificação relativa do mRNA das variantes transcricionais 1 e 3 revelou uma redução na expressão nas células MCF-7 em comparação às células não tumorais, e um aumento nas células MDA-MB 231 (Figura 7). Desta forma, a contribuição para o perfil de expressão do gene *SETD4* em células de mama tumorais e não tumorais parece estar relacionado diretamente a expressão destas variantes transcricionais.

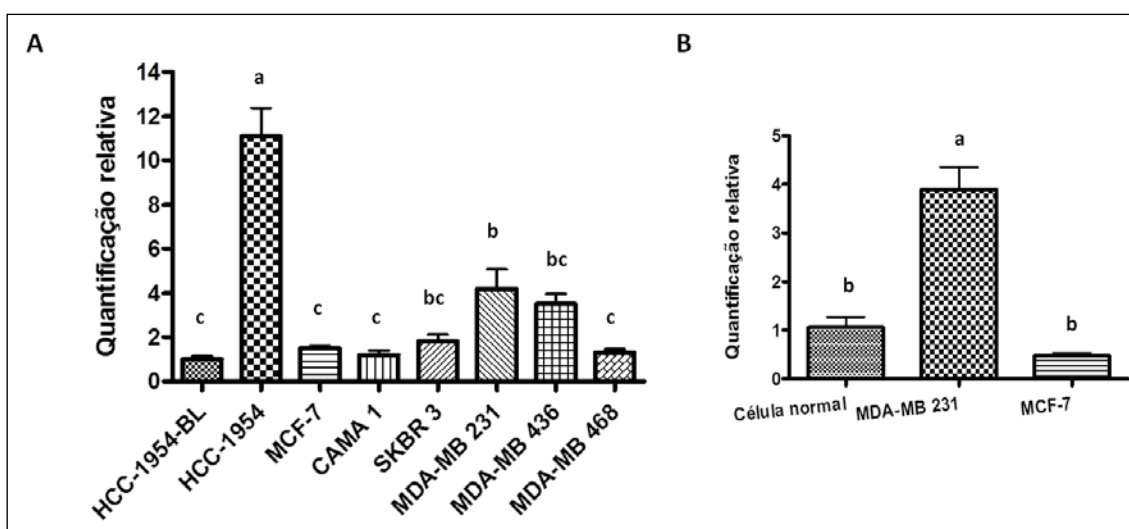


Figura 6. O *SETD4* é superexpresso em algumas linhagens celulares de câncer de mama.

A expressão do gene *SETD4* foi avaliada por RT-PCR em tempo real usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. (A) Os valores de expressão para HCC-1954, MCF-7, CAMA-1, SKBR 3, MDA-MB 231, MDA-MB 436 e MDA-MB 468 foram normalizados em relação às células controle HCC-1954-BL, tendo como controle endógeno, o gene β -actina. (B) A expressão de *SETD4* nas células MDA-MB 231 e MCF-7 foi analisada tendo como controle endógeno *RPS27*, e normalizada comparada as células normais (não tumorais) (média de 3 doadoras). As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, ao passo que, letras distintas diferem pelo teste de Tuckey a 1% de probabilidade.

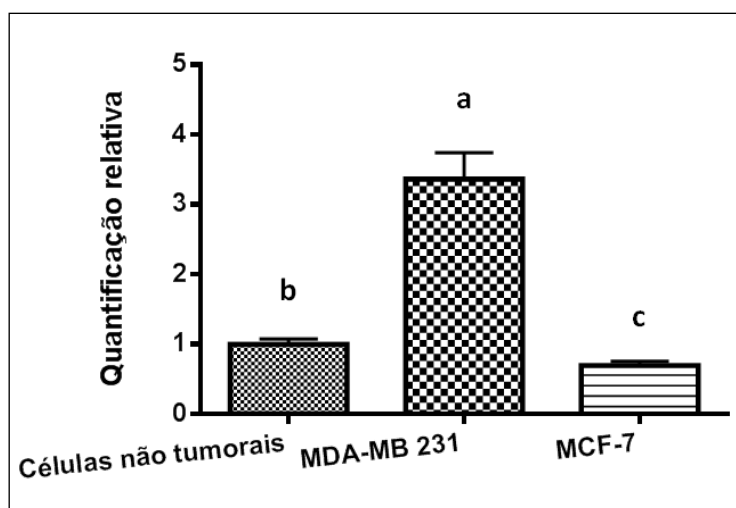


Figura 7. Expressão de *SETD4V1/V3* nas células MDA-MB 231 e MCF-7. A expressão das variantes transcricionais longas (1 e 3) de *SETD4* foi avaliada por RT-PCR em tempo real usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O valor de expressão das células tumorais foi normalizada em relação às células de mama não tumorais utilizando a expressão do controle *RPS27*. As letras distintas diferem pelo teste de Tuckey a 1% de probabilidade.

4.4. Correlação negativa entre o perfil de expressão de SETD4 e dos receptores hormonais em tumores de mama.

A expressão da proteína SETD4 foi avaliada nas células de câncer de mama (MACL-1, MGSO3, MDA-MB 231 e MCF-7) e células de tumor hepático (SKHep-1). Os lisados celulares foram submetidos a análise quantitativa pela técnica de western blot, e a expressão nas células não tumorais de mama utilizada para a normalização. Somente uma única proteína de aproximadamente 44 kDa foi detectada em todos os lisados sugerindo a expressão predominante de apenas uma das isoformas, possivelmente a isoforma longa (1). A expressão nas células de câncer de mama MACL-1, MGSO3 e MDA-MB 231, bem como, na célula SKHep-1 é cerca de duas vezes superior a expressão nas células não tumorais de mama. Em oposição, a expressão nas células MCF-7 é reduzida na ordem de quatro vezes comparada ao controle (Figura 8). As análises de imunocitoquímica confirmam o perfil de elevada expressão de SETD4 nas células MDA-MB 231, MACL-1, MGSO3 comparadas à linhagem MCF-7 (Figura 8C e anexo A8).

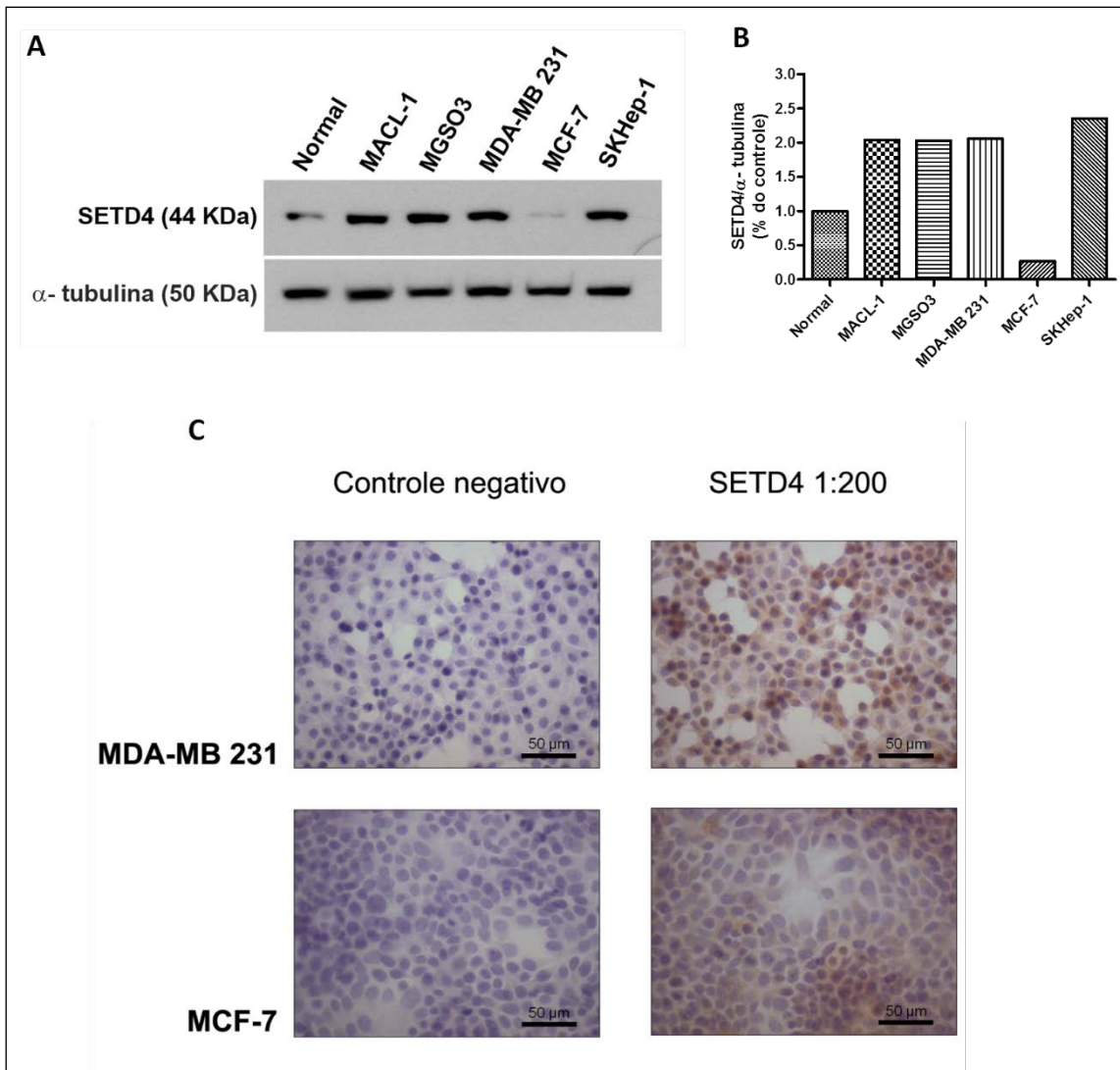


Figura 8. A expressão de SETD4 é distinta entre as linhagens de câncer. (A) Western blot dos extratos proteicos das linhagens de câncer de mama (MDA-MB 231, MACL-1, MGSO3, MCF-7) e tumor de fígado SKHep-1, bem como de células mamárias não tumorais (normal). 30µg de proteínas foram aplicados no gel, e a membrana incubada com os anticorpos anti-SETD4 e anti-α-tubulina. (B) A expressão de SETD4 foi normalizada com a proteína controle α-tubulina usando o software ImageJ. (C) Imunocitoquímica das linhagens celulares MDA-MB 231 e MCF-7. Após a fixação, as células foram incubadas somente com a solução diluente Tris-HCl 20 mM (controle negativo), ou com o anticorpo SETD4 na solução. A revelação procedeu-se com a aplicação do substrato da peroxidase, o DAB (3,3- diaminobenzidina) e o núcleo foi corado com hematoxilina.

A elevada expressão de SETD4 nas linhagens estabelecidas no nosso laboratório (MACL-1 e MGSO3) é condizente com os dados de microarranjo de DNA realizada pelo nosso grupo (N. C. R. Corrêa, 2013). Neste estudo foi observado uma alta expressão do gene *SETD4* nas células MACL-1 (fold change 9,46 e *p*valor de 4,01E-06) e MGSO3 (fold change 3,09 e *p*valor de 0,025) comparadas a células normais.

O receptor de estrógeno (RE), o receptor de progesterona (RP) e o receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER-2/ERBB2) são marcadores comumente utilizados na análise patológica cuja análise é recomendada pelo Colégio de Patologistas Americanos e Sociedade Americana de Oncologia Clínica (Goldhirsch et al., 2011; Hammond, Hayes, & Wolff, 2011; Wolff et al., 2007).

As linhagens de câncer de mama MDA-MB 231, MACL-1 e MGSO3 são negativas para os marcadores RE, RP e Her-2 (Cailleau, Olivé, & Cruciger, 1978; N. C. Corrêa et al., 2013) e apresentam superexpressão da proteína SETD4. Em contraste, MCF-7, expressa todos os receptores citados e possui baixos níveis da proteína SETD4 (Horwitz, Costlow, & McGuire, 1975) (Figura 6-8). Para acessar a relevância desta correlação, o perfil de expressão de SETD4 foi avaliado em tumores primários de mama. Os tecidos tumorais foram submetidos ao exame histopatológico e classificados quanto a expressão dos marcadores (RE, RP e Her2) (Anexo A9).

A proteína SETD4 foi superexpressa nos tumores triplo-negativos, sendo esta elevação em torno de 3 vezes nos tecidos tumorais comparados aos sadios. Paralelamente, os tumores expressando os receptores de estrogênio e progesterona e com baixa expressão de Her2 não apresentaram alterações significativas na expressão de SETD4 comparada ao controle (Figura 9).

Interessante notar que em alguns lisados tumorais foi detectada uma banda adicional de peso molecular inferior à previamente detectada, a qual pode corresponder a isoforma 3 de SETD4 (Figura 9). Entretanto, o perfil de expressão desta proteína é variável. Em alguns casos, como para os indivíduos 0036 e 0019, a banda está presente tanto na amostra tumoral quanto na controle. Em outros, somente no lisado tumoral (0002 e 0014) ou somente no controle (não tumoral) (0004 e 0005).

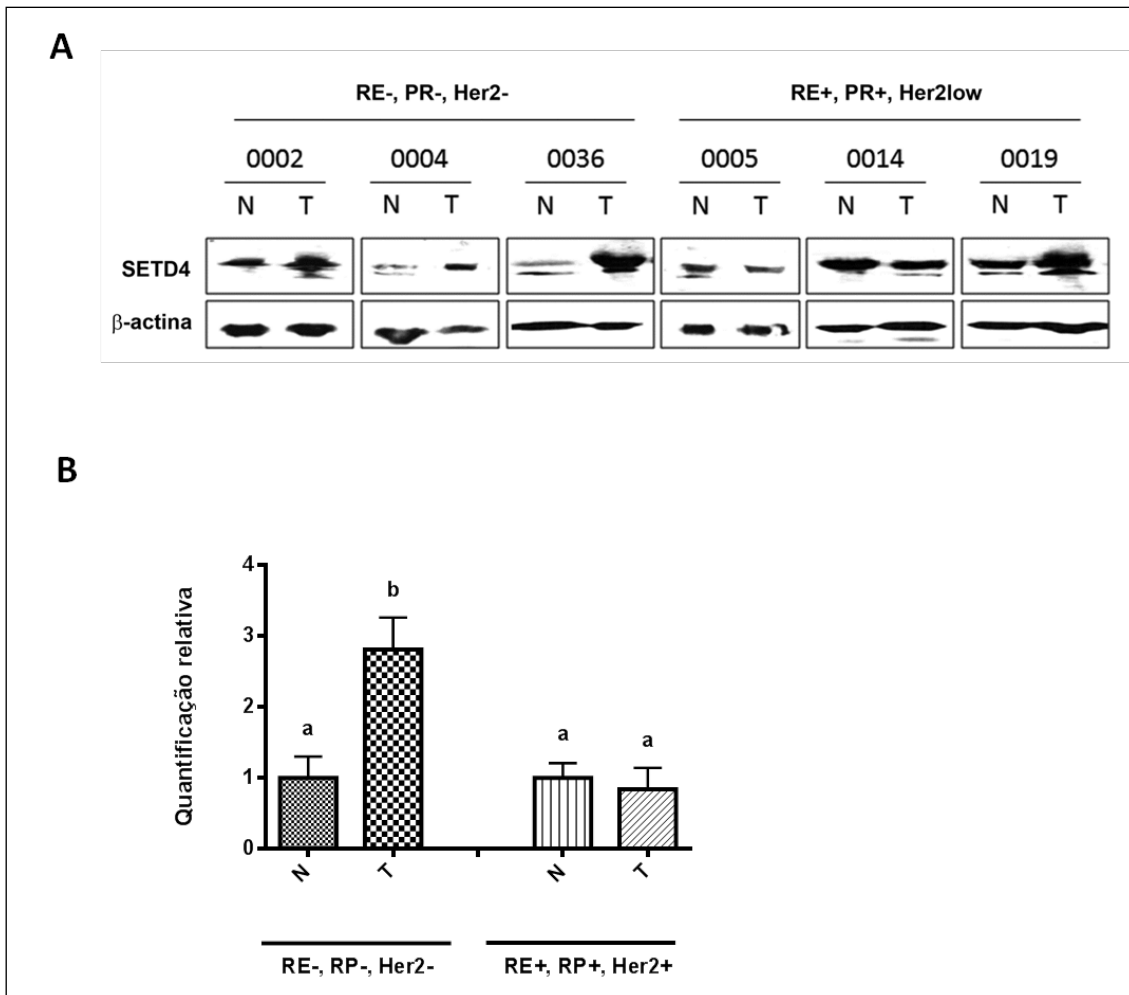


Figura 9. Expressão de SETD4 em tumores de mama positivos e negativos para os receptores hormonais. (A) Western blot dos extratos proteicos obtidos de tumores negativos (T0002, T0004, T0036) e tumores positivos para RE, RP e Her2 (T0005, T0014 e T0019). A amostra correspondente ao tecido não tumoral (mama contralateral) de cada paciente também foi analisada (N). A membrana foi incubada com anticorpos anti-SETD4 e anti-β-actina. (B) A análise densitométrica foi realizada agrupando os 3 tumores de cada grupo (triplo-positivos e triplo-negativos). Para cada amostra, a expressão de SETD4 foi normalizada com a expressão de β-actina.

4.5. SETD4 localiza-se no núcleo e citosol.

A análise *in silico* utilizando os programas PSORTII e ESLpred predizem uma localização nuclear para SETD4. A predição fornecida pelo programa NucPred revelou para SETD4 um score de 0,58, sugestivo de localização não nuclear. Isto porque, pelo programa, as sequências com score acima ou igual a 0,8 são preditas nucleares, com 93% de exatidão (Brameier et al., 2007).

Paralelamente à predição computacional, a localização subcelular de SETD4 foi investigada nas frações celulares das linhagens de câncer de mama. A proteína SETD4 está presente tanto nos extratos nucleares quanto nas frações não nucleares (Figura 10). A ausência de contaminação nas duas frações foi comprovada com a visualização da expressão de α -tubulina e lamina B1, as quais são localizadas exclusivamente no citosol e no núcleo, respectivamente. As células de câncer de mama (MACL-1, MGSO3 e MDA-MB 231) e as células SKHep-1 apresentaram nítida expressão de SETD4 em ambas as frações. A ausência de bandas referentes à SETD4 nos extratos de MCF-7 é decorrência da baixa expressão nesta linhagem celular (Figura 8), como também, da reduzida quantidade de extrato utilizado.

Com o intuito de avaliar se a sinalização envolvendo EGF e seu receptor (EGFR) alteram o conteúdo e localização de SETD4 foi realizado o fracionamento das células após o estímulo com este fator de crescimento. As frações celulares das células SKHep-1 estimuladas com o fator de crescimento epidermal (EGF) não diferiram do perfil apresentado pelas células não estimuladas (controle) (Figura 10B). Embora, o curto período de tempo do estímulo (10 minutos) seja suficiente para o acúmulo do receptor e ligante no núcleo (De Angelis Campos et al., 2011), a modulação na transcrição e por conseguinte a alteração na síntese proteica, demanda um período mais extenso (Hung et al., 2008). Muito embora a distribuição subcelular de SETD4 não se altere com a translocação de EGFR, a expressão de SETD4 pode ser alterada após longo estímulo. Futuros experimentos poderão elucidar esta questão.

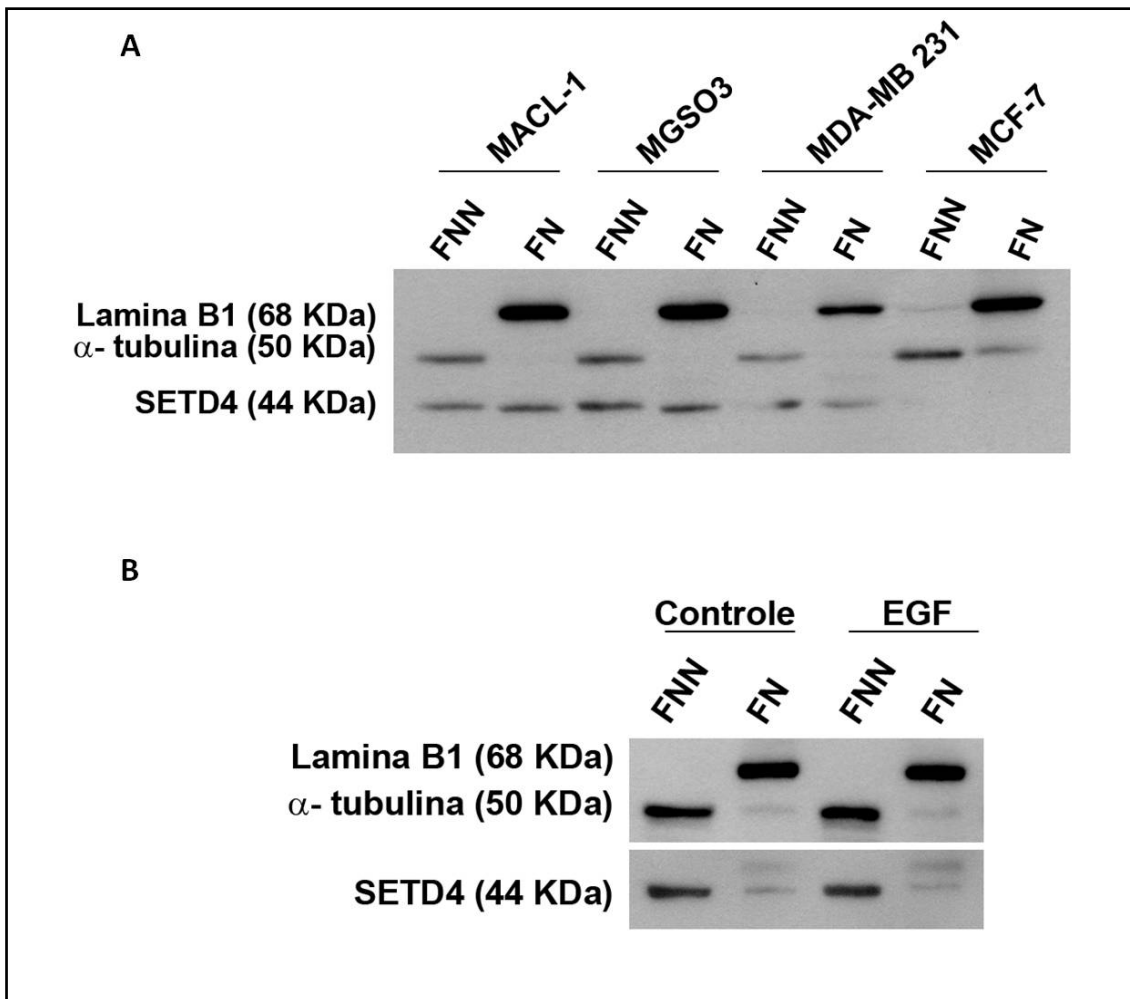


Figura 10. SETD4 está presente na fração nuclear (FN) e não nuclear (FNN). Western blot dos extratos protéicos obtidos após o fracionamento celular. 25 μ g de proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida, e transferidas para membrana de PVDF. (A) Os anticorpos anti-SETD4, anti-Lamina B1 e anti- α -tubulina foram usados nos extratos das células (MDA-MB 231, MACL-1, MGSO3, MCF-7). (B) Células SKHep-1 foram privadas de soro por 20 horas sendo estimuladas por 10 minutos com 200 ng/mL de EGF. As células não estimuladas são designadas controle.

O perfil apresentado pelas frações não nucleares das células de câncer de mama, SKHep-1 e células de mama não tumorais assemelha-se ao perfil do extrato total das células (Anexo A10; Figura 8). Tal padrão similar no extrato total e na fração não nuclear sugere uma distribuição predominantemente citoplasmática para SETD4. Em adição, os resultados sugerem que a distribuição de SETD4 é equivalente em células tumorais e não tumorais.

Com o objetivo de comprovar a localização de SETD4 no compartimento nuclear, foi feita uma reconstrução tridimensional (3D) das células SKHep-1 incubadas com o anticorpo específico para SETD4 utilizando microscopia

confocal. O anticorpo secundário usado foi o Alexa 488. A marcação nuclear foi realizada com a sonda Hoechst, uma sonda de afinidade a DNA dupla fita. As imagens seriadas foram coletadas e a reconstrução 3D realizada com o software Zeiss LSM Image Browser (Figura 11). A proteína SETD4 encontra-se presente ao longo de toda a região citoplasmática. No plano medial observa-se pontos verdes co-localizados com pontos azuis, indicando a localização da proteína no interior do núcleo. O somatório das fatias ópticas nos planos x-z e y-z estão mostrados acima e à direita, respectivamente (Figura 11). Coletivamente, estes resultados demonstram a localização nuclear e citoplasmática de SETD4.

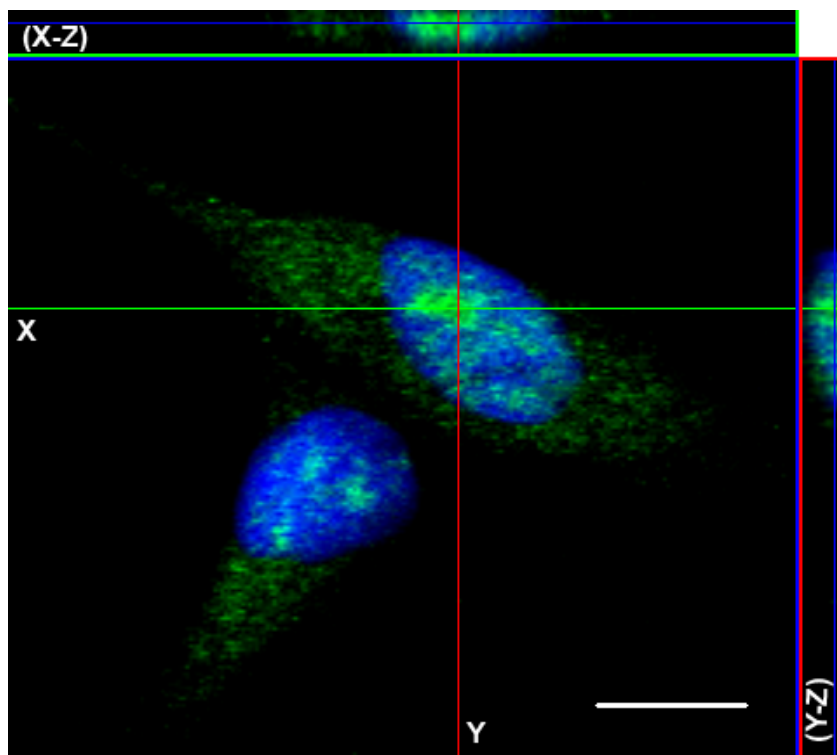


Figura 11. Localização subcelular de SETD4. Células SKHep-1 foram incubadas com anti-SETD4 e o anticorpo secundário conjugado com alexa 488 (verde). O núcleo foi incubado com a sonda Hoechst (azul). Painel central: plano medial em uma região no interior do núcleo. Acima: reconstrução 3D no plano x-z. À direita: reconstrução 3D no plano y-z. Escala = 10 μ m.

Além de acessar a localização da proteína endógena, foram analisadas a distribuição celular da proteína expressa transientemente. Para tal, as construções com as sequências codificantes das variantes 1 e 2 de *SETD4* (pCMV6-Entry-SETD4-MYC/DDK) foram usadas na transfecção de células MDA-MB 231. Neste sistema, as isoformas 1 e 2 foram expressas fusionadas à MYC e DDK (Anexo A1).

Ambas as isoformas 1 e 2 localizaram-se ao longo de todo citoplasma (Figura 12). A marcação com anticorpo anti-DDK indicou uma localização pontual da isoforma 1 em algumas regiões do núcleo. As imagens demonstram o mesmo perfil de localização predominantemente citosólica apresentado pela proteína endógena na imunofluorescência (Figura 11).

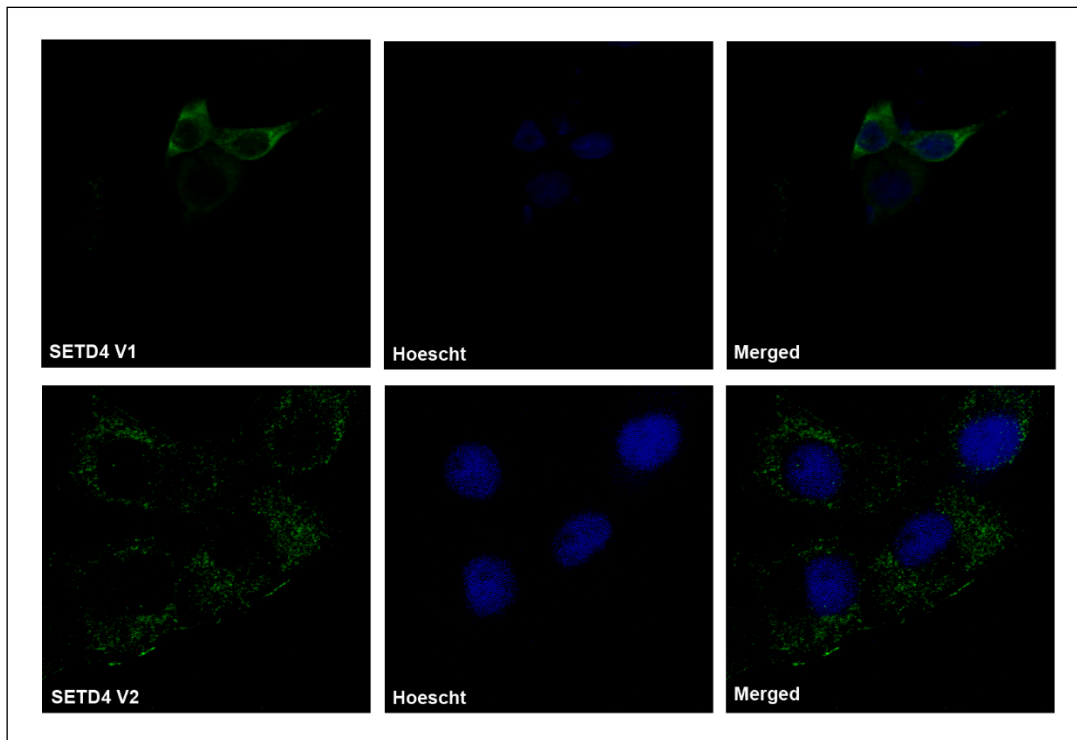


Figura 12. Localização de SETD4 fusionado à etiqueta DDK. Células MDA-MB 231 foram transfectadas com as construções SETD4V1 e SETD4V2, as quais expressam as isoformas 1 e 2, respectivamente, fusionadas às etiquetas MYC e DDK. As células foram incubadas com o anticorpo que reconhece DDK, e em seguida com o anticorpo secundário conjugado com Alexa 488 (verde). A marcação nuclear foi realizada com iodeto de propídeo (azul).

Com a finalidade de obter as construções expressando SETD4 fusionado à GFP foi realizada a subclonagem das sequências das variantes 1 e 2 no vetor pCMV6-AC-GFP. A confirmação dos transformantes foi realizada por meio da PCR utilizando os oligonucleotídeos desenhados para os experimentos de PCR em Tempo Real (dados não mostrados) e por meio da restrição enzimática dos clones obtidos (Anexo A11). Adicionalmente, os clones foram submetidos a reação de sequenciamento.

De posse destas construções, a localização subcelular das proteínas recombinantes foi avaliada por microscopia confocal. A reconstrução tridimensional das células expressando as isoformas 1 e 2 de SETD4 revela a ampla distribuição citosólica para ambas (Figura 13). A co-localização dos pontos verdes e azuis é observada na célula expressando a isoforma 1 indicando a localização nuclear da mesma.

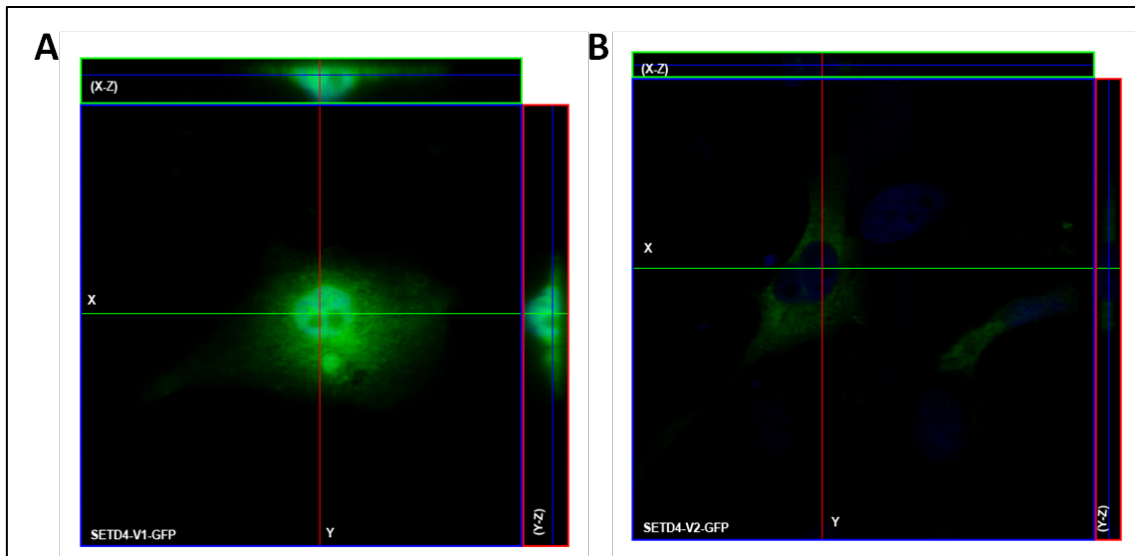


Figura 13. Localização subcelular das isoformas 1 e 2 de SETD4 fusionadas à GFP. Células MDA-MB 231 foram transfectadas com as construções que expressam as isoformas de SETD4 fusionadas à GFP. O núcleo foi marcado com iodeto de propídeo (azul). Painel central: plano medial em uma região no interior do núcleo. Acima: reconstrução 3D no plano x-z. À direita: reconstrução 3D no plano y-z. (A) isoforma 1, SETD4-V1-GFP e (B) isoforma 2, SETD4-V2-GFP.

A distribuição predominantemente citosólica da isoforma 2 (Figuras 12 e 13) contrasta com os dados de fracionamento celular, os quais apontam a presença de SETD4 no núcleo. Em adição, a marcação apresentada na imunofluorescência de SETD4 endógena assemelha-se à obtida para a isoforma 1 (Figuras 11-13). Estas observações reforçam os dados de PCR em tempo real sugerindo a expressão predominante da isoforma longa de SETD4 nas células em estudo.

4.6. Reduzida expressão de SETD4 suprime a proliferação e altera o perfil do ciclo celular.

Objetivando investigar a função de SETD4 nas células de câncer de mama, o conteúdo das sequências de mRNA que a codificam foi reduzido abordando o mecanismo de RNA de interferência (RNAi). Neste trabalho, foram testados 4 distintos shRNAs (ShSETD4 1 a 4) similares em sequência a quatro regiões do mRNA *SETD4* (Anexo A2).

Como procedimento inicial à transfecção estável, foi realizado o ensaio de curva de morte nas células MDA-MB 231 e MCF-7 não transformadas na

presença das drogas de seleção (Anexo A12). Este teste faz-se necessário uma vez que, cada tipo celular difere em relação a sua susceptibilidade às drogas. Além disso, a diferença nos lotes de cada produto pode apresentar eficiência distinta (Mortensen, Chestnut, Hoeffler, & Kingston, 2001).

A obtenção de clones expressando os shRNAs foi conduzida nas células MDA-MB 231, visto que, tais células apresentam superexpressão da proteína SETD4 (Figura 8). Desta forma, a seleção dos plasmídeos pGFP-V-RS nas células MDA-MB 231 foi conduzida com a droga puromicina (0,35 µg/ml) (Anexo A12).

A eficiência de cada construção shRNAs na redução da expressão SETD4 foi avaliada nos clones estáveis obtidos. Os níveis de expressão de SETD4 foram analisados por western blot e Real Time PCR. A presença do vetor pGFP-V-RS sem insertos expressando GFP não alterou a expressão de SETD4 (Figura 14C). Este perfil, semelhante às células MDA-MB 231 não transformada é também observado nos clone que expressa shRNA *scrambled* (Anexo A13).

Os clones contendo a construção 1 (ShSETD4 1) apresentaram diminuição no conteúdo de mRNA *SETD4* e redução expressiva (superior a 50%) nos níveis proteicos (Figura 14). Os clones gerados a partir das construções ShSETD4 2, 3 e 4 não apresentaram redução efetiva nos níveis da proteína (Anexo A13).

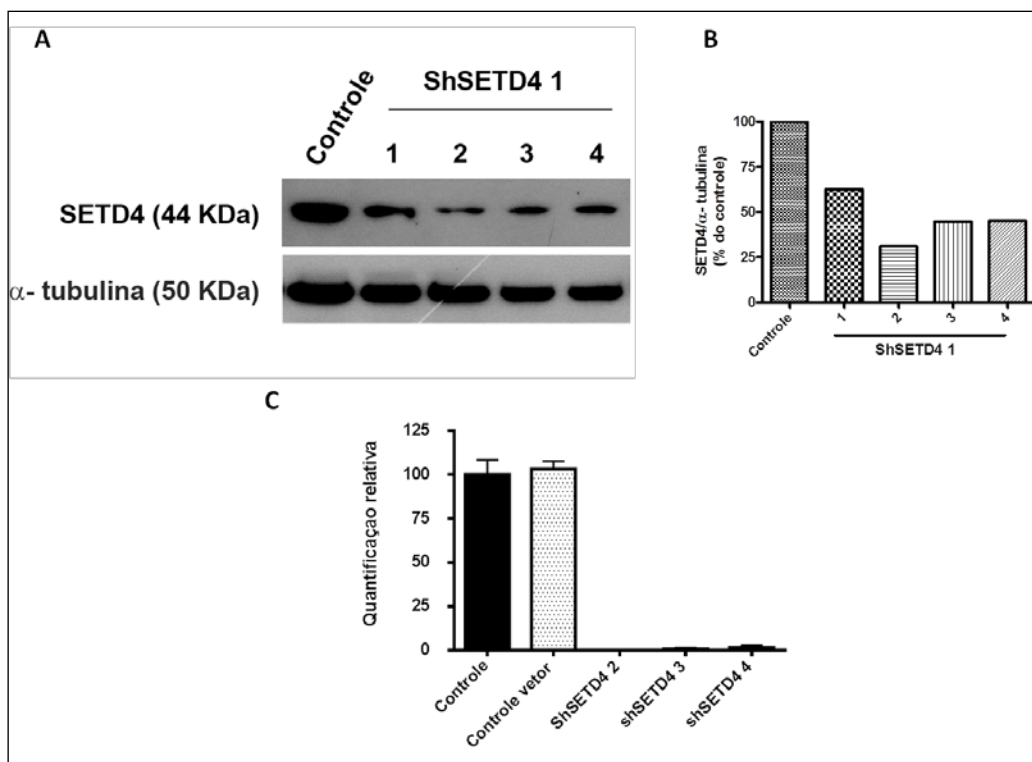


Figura 14. Confirmação dos clones com redução de SETD4. (A) Western blot dos extratos proteicos de células MDA-MB 231 não transfectadas e 4 clones independentes transformados com a sequência ShSETD4 1. Um total de 30 μ g de proteínas foi aplicado e a membrana incubada com anticorpos anti-SETD4 e anti- α -tubulina. (B) A expressão de SETD4 foi normalizada com α -tubulina e expressa em relação ao controle. (C) O *knockdown* de SETD4 foi avaliado por PCR em tempo real. Os valores de expressão para os clones vetor (transformados com o vetor vazio) e ShSETD4 2, 3 e 4 foram normalizados em relação às células não transformadas, tendo como controle endógeno, o gene *RPS27*.

Células transformadas estavelmente controle (vetor vazio) e os 3 clones independentes *knockdown* para SETD4 (ShSETD4 2, ShSETD4 3 e ShSETD4 4) não apresentaram distinções morfológicas (Anexo A14).

Para avaliar se a expressão de SETD4 estava relacionada a viabilidade e proliferação de células tumorais de mama foi realizado o ensaio de MTT (Figura 15). Os clones estáveis ShSETD4 3 e ShSETD4 4 cultivados na presença de soro fetal bovino tiveram reduzida metabolização do MTT em comparação com as células controle suplementadas com SFB. Considerando os grupos controles avaliados, controle com soro (células não transformadas) e controle vetor com soro não houve diferença significativa entre eles. Perfil similar é observado para o controle com soro e controle *scrambled*. Para efeitos comparativos, células não transformadas (controle) e controle vetor foram mantidas na ausência de soro. Tal privação de fatores tróficos leva o

bloqueio da divisão e indução de morte celular (Raff, 1992). A viabilidade das células ShSETD4 3 e ShSETD4 4 é inferior as células controle cultivadas sem SFB. Já, a metabolização de MTT por ShSETD4 4 compara-se as células controle vetor sem soro. Estes dados sugerem que SETD4 pode modular a viabilidade de células tumorais.

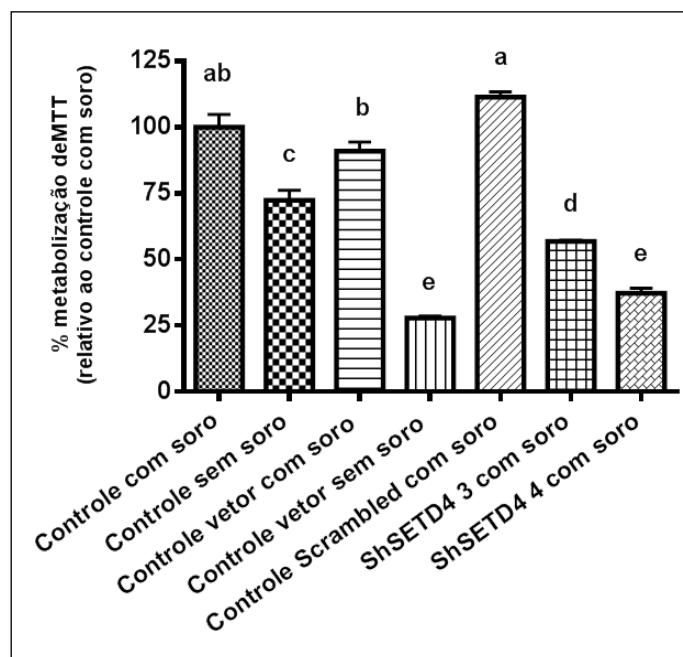


Figura 15. Metabolização de MTT reduzida nos clones ShSETD4. As células controle, controle vetor (vetor vazio), controle *scrambled* e as células ShSETD4 3 e 4 foram plaqueadas no meio com soro fetal bovino. Células controle e controle vetor foram mantidas em meio sem a presença de soro fetal. Os resultados são expressos em relação ao metabolismo das células não transformadas. As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, ao passo que, letras distintas diferem pelo teste de Tuckey a 1% de probabilidade.

Células com baixa expressão de SETD4 apresentam redução no fator de sobrevivência comparada a células não transformadas e controle vetor (Figura 16). No ensaio de clonogenicidade, avalia-se os efeitos do tratamento na proliferação e sobrevivência, sendo as células plaqueadas em baixa densidade, o que permite analisar a capacidade de cada célula em formar uma colônia. Não somente o número de colônias formadas foi reduzido nas células ShSETD4, como também, o número de células que constituem a colônia (Anexo A15).

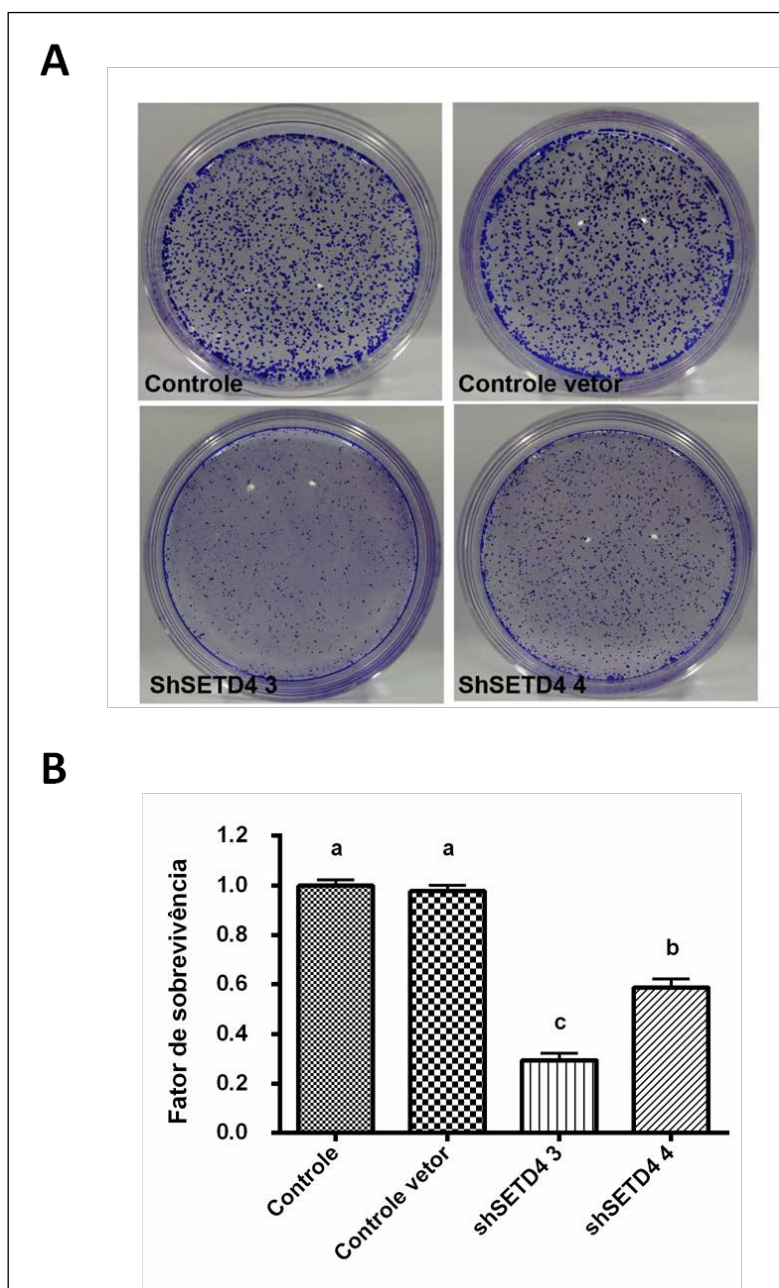


Figura 16. A redução de SETD4 diminui a capacidade de formação de colônias a partir de uma única célula. Células MDA-MB 231 não transformadas (controle), controle vetor e as células ShSETD4 3 e 4 foram crescidas em placas 35 mm. (A) Após a coloração com cristal violeta, as colônias foram contadas no software image J. (B) A obtenção do valor de eficiência de plaqueamento permitiu o cálculo do fator de sobrevivência, o qual foi normalizado em relação ao controle. As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, ao passo que, letras distintas diferem pelo teste de Tuckey a 1% de probabilidade.

Com o objetivo de verificar alterações no ciclo celular decorrentes da redução de *SETD4*, foi realizada a quantificação do número de células em cada fase do ciclo. A distribuição das células nas fases G1 e S diferiram entre as

populações analisadas, ao passo que, a porcentagem das células em G2/M não diferiu entre os grupos (Figura 17A). A fração de células ShSETD4 2 e 3 na fase G1 foi superior aos valores das células controle (não transformadas) e controle vetor. Em adição, o número de células com redução de SETD4 na fase S foi inferior ao apresentado para as células controle e controle vetor.

Para avaliar se a redução na proliferação dos clones ShSETD4 era decorrente de morte celular, a análise indicadora de morte celular foi realizada. A porcentagem de células mortas presentes na população dos clones estáveis e nas células não transformadas foi determinada por citometria de fluxo. A porcentagem de núcleos sub-diplóides não diferiu entre as células analisadas (Figura 17B).

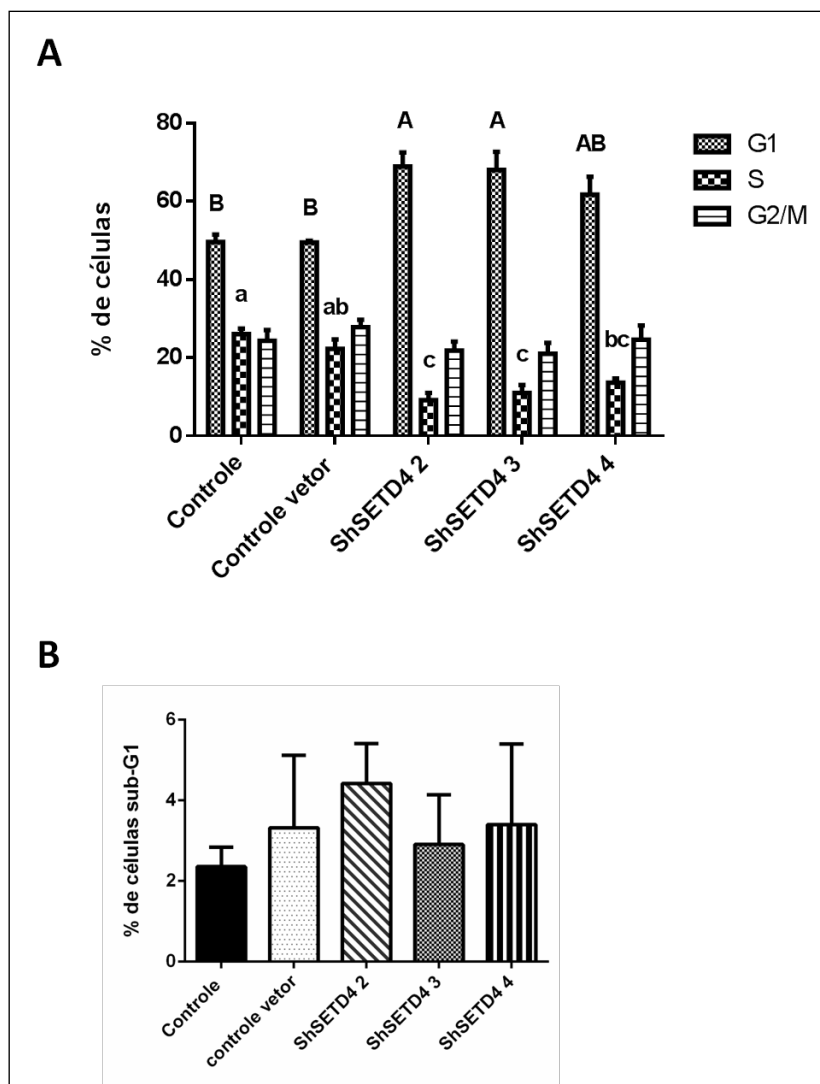


Figura 17. Redução de SETD4 altera o perfil do ciclo celular. Células MDA-MB 231 não transformadas (controle), clone controle vetor (vetor vazio) e as células ShSETD4 2, 3 e 4 foram ressuspensas em solução fluorocrômica e avaliadas no citômetro de fluxo. (A) Quantificação das células controle e dos clones estáveis nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2/M). Letras maiúsculas e minúsculas correspondem as análises da fase G1 e S, respectivamente. As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, ao passo que, letras distintas diferem pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade. (B) Porcentagem de núcleos sub-diplóides advindos de células controle e dos clones estáveis. Não há diferença entre as médias pelo teste de Tuckey a 1% de probabilidade.

A parada das células *knockdown* para *SETD4* na fase G1 repercute em uma redução no número de células desta população na fase S. Tal dado sugere uma possível participação de SETD4 nos eventos de regulação do ciclo celular.

Para testar esta hipótese a expressão de diversas ciclinas foram avaliadas. A progressão do ciclo celular é regulada pela ativação de complexos

específicos formados pelas ciclinas e cinases dependentes de ciclina (CDKs). Estas proteínas de checagem asseguram que os eventos de uma dada fase tenham sido completados antes do início da próxima (Hartwell & Weinert, 1989). Assim, a expressão das ciclinas D, reguladores específicos da fase G1 foram analisadas nas células estáveis (Sherr, 1995).

Células ShSETD4 mostraram uma redução na expressão de ciclina D1 comparada com os clones controle vetor e controle *scrambled* (Figura 18). Em contrapartida, a redução na expressão de *SETD4* não afetou a expressão das ciclinas D2 e D3.

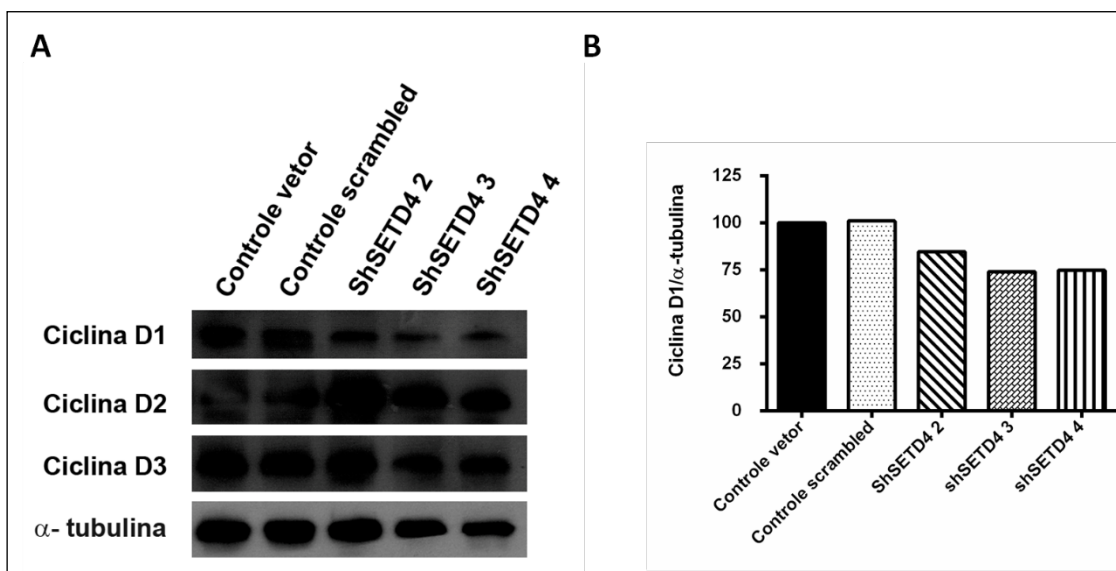


Figura 18. Reduzida expressão de ciclina D1 nos clones *knockdown* para *SETD4*. (A) Western blot dos extratos protéicos de células não transformadas, controle *scrambled* e dos 3 clones com reduzida expressão de *SETD4*. A expressão de ciclina D1, D2 e D3 e α -tubulina foram avaliadas. (B) A expressão de ciclina D1 foi normalizada com α -tubulina e expressa em relação ao controle vetor.

Após estímulos externos, a indução transcricional de *ciclina D1* requer a ativação da via de proteínas cinases ativadas por mitogêno (Ras-Raf-ERK), e é precedida pela indução de genes imediatos, como o proto-oncogene *c-fos* (Brown et al., 1998; Klein & Assoian, 2008). Para investigar se a supressão da progressão celular dos clones ShSETD4 envolveu a alteração transcricional de *c-fos*, a ativação deste promotor foi avaliada. Neste experimento, a ativação da região promotora *c-fos* foi acessada pelo ensaio de gene repórter luciferase.

As células estáveis foram transfectadas com o plasmídeo contendo a região promotora de *c-fos* (incluindo os elementos responsivos ao soro e a AMPc) controlando a expressão do gene *luciferase*. Não foi observada diferença na atividade da luciferase entre as células controle e *knockdown* para *SETD4* (Figura 19). Assim, a redução na expressão de *SETD4* parece não alterar a transcrição de *c-fos*, assim como, também não parece alterar a ativação da proteína cinase ativada por estímulos extracelulares (ERK) (Anexo A16). Coletivamente, estes dados indicam que o efeito na supressão de *SETD4* parece não afetar a sinalização *upstream* à indução de *ciclina D1* por fatores mitóticos.

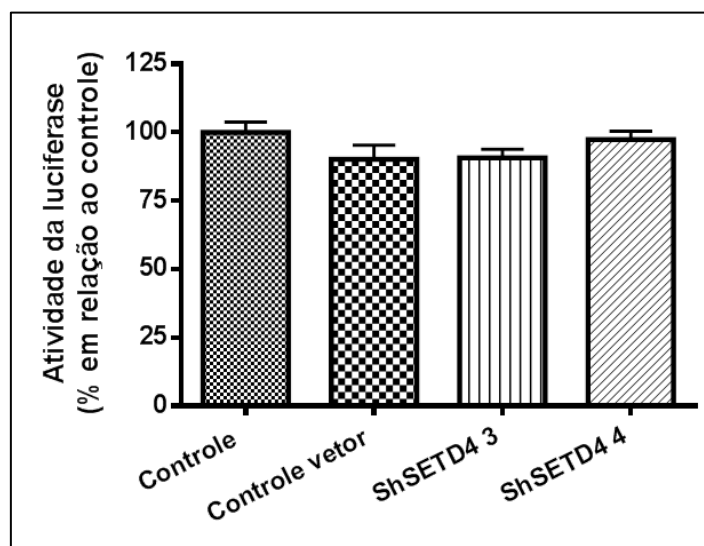


Figura 19. Reduzida expressão de SETD4 não modula os elementos responsivos (SRE e CRE) presentes na região promotora de *c-fos*. Células estáveis foram transfectadas com os plasmídeos plightswitch-*c-fos*-Luc e o plasmídeo normalizador (pRL-TK). Em paralelo, as células foram transformadas com o plasmídeo plightswitch - β -actina para normalização dos dados. Os extrato celulares foram coletados e as atividades da luciferase determinadas pela captura da luminescência. Primeiramente, os resultados foram normalizados pela razão da atividade da luciferase do vagalume sobre a de *Renilla*. O valor da atividade da luciferase relativa expressa por plightswitch-*c-fos*-Luc foi normalizada com os dados de atividade do vetor controle plightswitch - β -actina. Por fim, os dados foram expressos em relação ao grupo controle (células não transformadas). Não há diferença entre as médias pelo teste de Tuckey a 1% de probabilidade.

4.7. A supressão de SETD4 aumenta a proliferação celular.

A construção pCMV-SETD4-GFP foi utilizada para obtenção de clones estáveis superexpressando a proteína SETD4. Entretanto, não dispúnhamos da construção controle requerida para este experimento, o vetor pCMV6-GFP vazio. Tendo por objetivo a obtenção do vetor controle, o plasmídeo linearizado após a restrição enzimática foi modificado pela T4 DNA polimerase. As extremidades abruptas geradas foram ligadas e os clones confirmados por sequenciamento. A expressão da proteína GFP foi observada nas células transfectadas com o plasmídeos gerado (Anexo A17). A proteína GFP (27 kDa) difunde-se passivamente entre o núcleo e o citosol, de modo bidirecional, pelo complexo do poro nuclear (Prasher, Eckenrode, Ward, Prendergast, & Cormier, 1992; Wei, Henke, Strubing, Brown, & Clapham, 2003). Assim, como esperado, a imagem de microscopia confocal revela a localização nuclear e citosólica da proteína GFP (Anexo A17).

O objetivo inicial era estabelecer clones estáveis superexpressando SETD4 nas células MCF-7, as quais apresentam baixa expressão desta proteína (Figura 8). Contudo, isso não foi possível. As células eram transfectadas com a construção e expressavam transientemente a proteína fusionada à GFP. Todavia, com o passar do tempo, as células transformadas não sobreviviam e não proliferavam (Anexo A18). Seis dias após a transfecção com o vetor vazio, verificou-se a presença de células expressando GFP formando colônias, um indicativo da proliferação das mesmas. Além disso, neste grupo não houve evidência de células mortas (Figura 20). Em contrapartida, as células MCF-7 expressando a isoforma 1 de SETD4 fusionada à GFP apresentaram uma morfologia arredondada e não aderida (Figura 20). Tentativas de obtenção de clones MCF-7 expressando SETD4 fusionada às etiquetas MYC e DDK também foram realizadas mas não houve sucesso. Todavia, foi possível a seleção de clones estáveis MDA-MB 231.

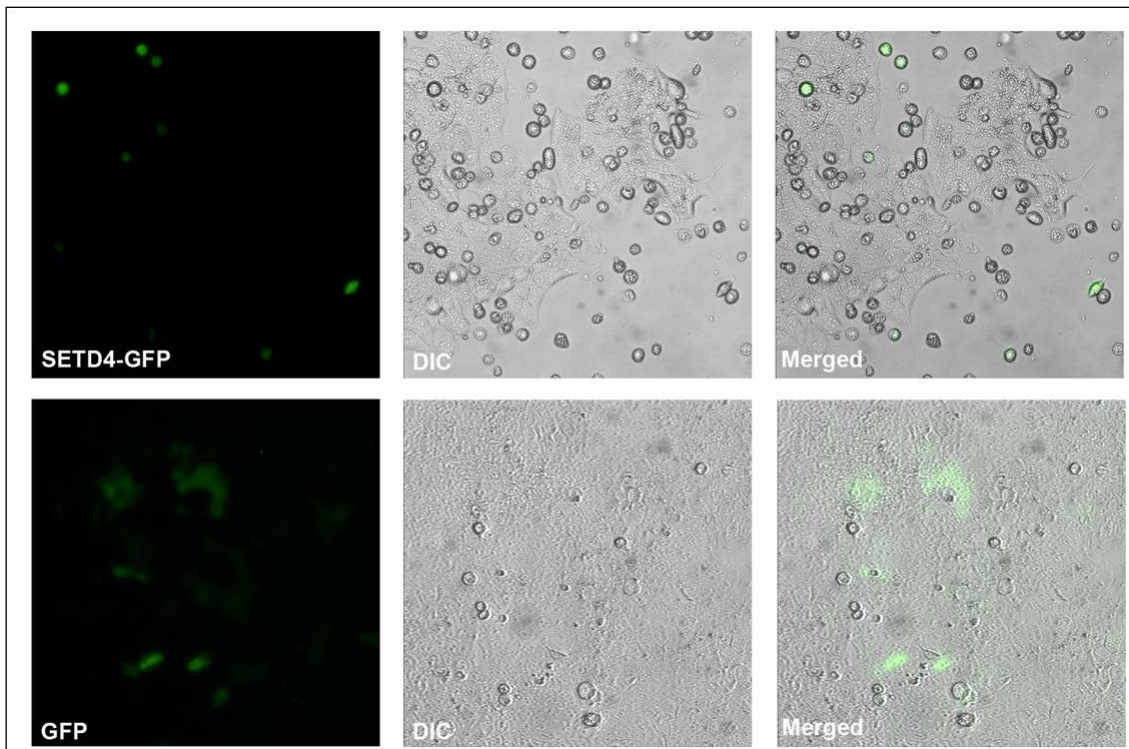


Figura 20. Expressão transitente de SETD4 fusionada à proteína verde fluorescente na linhagem MCF-7. Imagens das células 6 dias após a transfeção com as construções (SETD4-GFP e vetor vazio expressando GFP) e cultivadas na ausência da droga de seleção. As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência usando objetiva 10X. Luz transmitida (DIC) e sobreposição (merged).

Para a estratégia de superexpressão, as construções utilizadas foram pCMV-SETD4-GFP e pCMV6-SETD4-MYC/DDK, ambas contendo a sequência codificante da isoforma 1 de SETD4. Ambos plasmídeos apresentam o gene de resistência a droga G418 (Anexo A1). Assim, o teste de curva de morte foi realizado nas células MDA-MB 231, e a concentração mínima necessária para a pressão com G418 foi de 1,0 mg/ml (Anexo A12). Clones MDA-MB 231 estáveis superexpressando SETD4 foram gerados e confirmados por western blot, PCR semiquantitativo e imunofluorescência (Figura 21 e Anexo A19).

A predição da massa molecular da proteína recombinante contendo GFP indicou uma massa de 77 kDa, sendo tal banda detectada por western blot (Figura 21A). Foram selecionados 2 clones independentes superexpressando SETD4 fusionada à proteína GFP e 2 clones expressando SETD4 fusionada às pequenas caudas, MYC e DDK. As proteínas recombinantes contendo as etiquetas apresentam peso molecular muito próximo ao da proteína endógena,

e o nível de expressão foi em média 3,5 vezes superior às células controle (não transformadas) e transformadas com o vetor pCMV-AC-GFP vazio (Figura 21B e C).

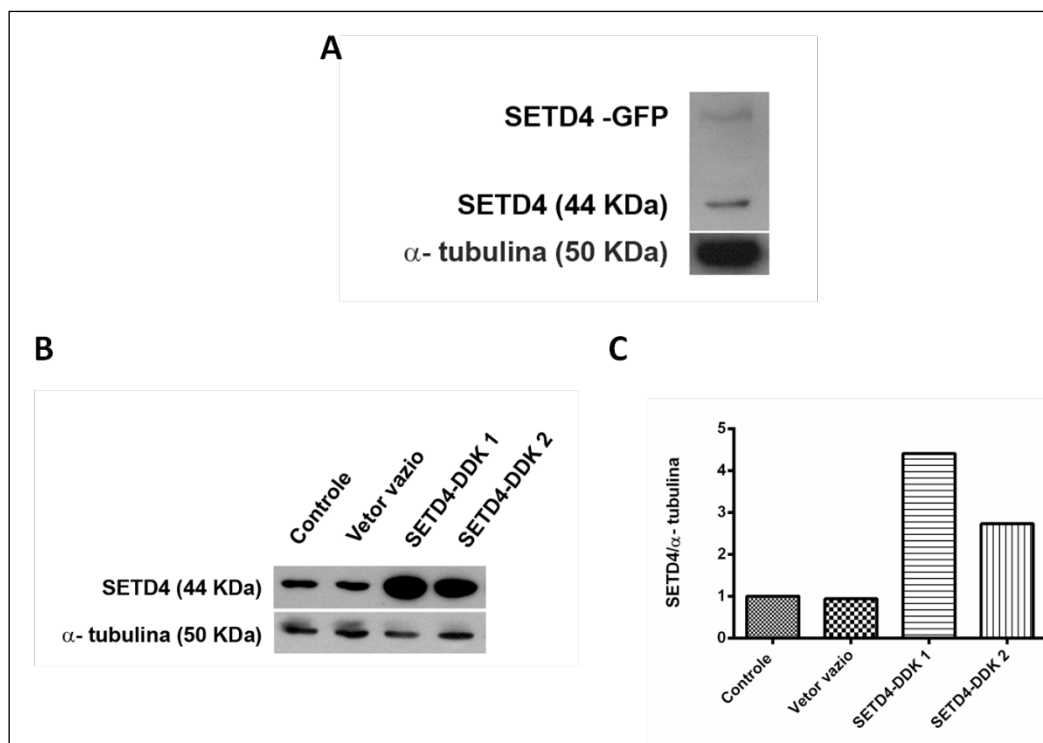


Figura 21. Confirmação dos clones superexpressando a proteína SETD4. (A) Western blot dos extratos proteicos de células transformadas com a sequência SETD4 fusionada à proteína GFP. A membrana foi incubada com anticorpos anti-SETD4 e anti- α -tubulina. (B) Superexpressão de SETD4 fusionada à etiqueta DDK em 2 clones independentes (SETD4-DDK1 e 2). A expressão de SETD4 foi normalizada com α -tubulina e expressa em relação ao controle.

O ensaio de MTT e de clonogenicidade foi realizado a fim de avaliar se a superexpressão de SETD4 afetou a capacidade proliferativa das células de câncer de mama. Células superexpressando SETD4 mostraram uma maior porcentagem de metabolização do MTT em relação ao controle transformado com o vetor vazio GFP (Figura 22). Corroborando este resultado, a capacidade de formação de colônias dos clones superexpressando SETD4 também foi superior ao do grupo controle (Figura 23). Tanto as células expressando SETD4 fusionada à DDK quanto à GFP apresentaram um fator de sobrevivência maior do que as células expressando somente GFP.

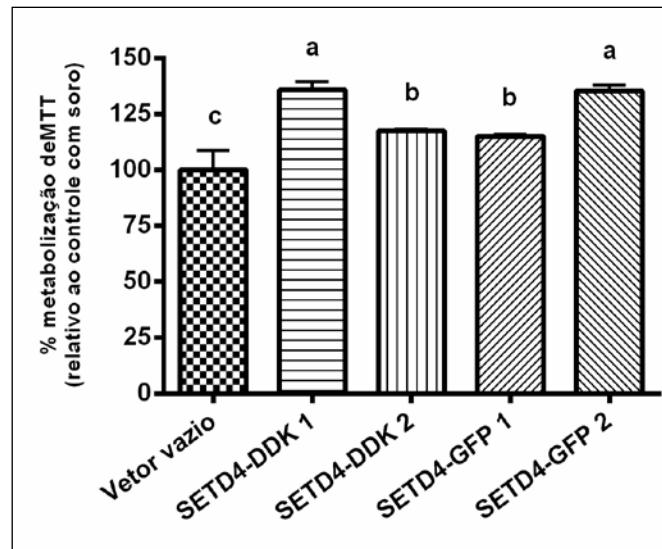


Figura 22. Metabolização de MTT elevada nos clones superexpressando SETD4. As células transformadas com o vetor (vetor vazio) e as células superexpressando SETD4 foram plaqueadas no meio com soro fetal bovino. Os resultados são expressos em relação ao metabolismo das células controle vetor. As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, ao passo que, letras distintas diferem pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

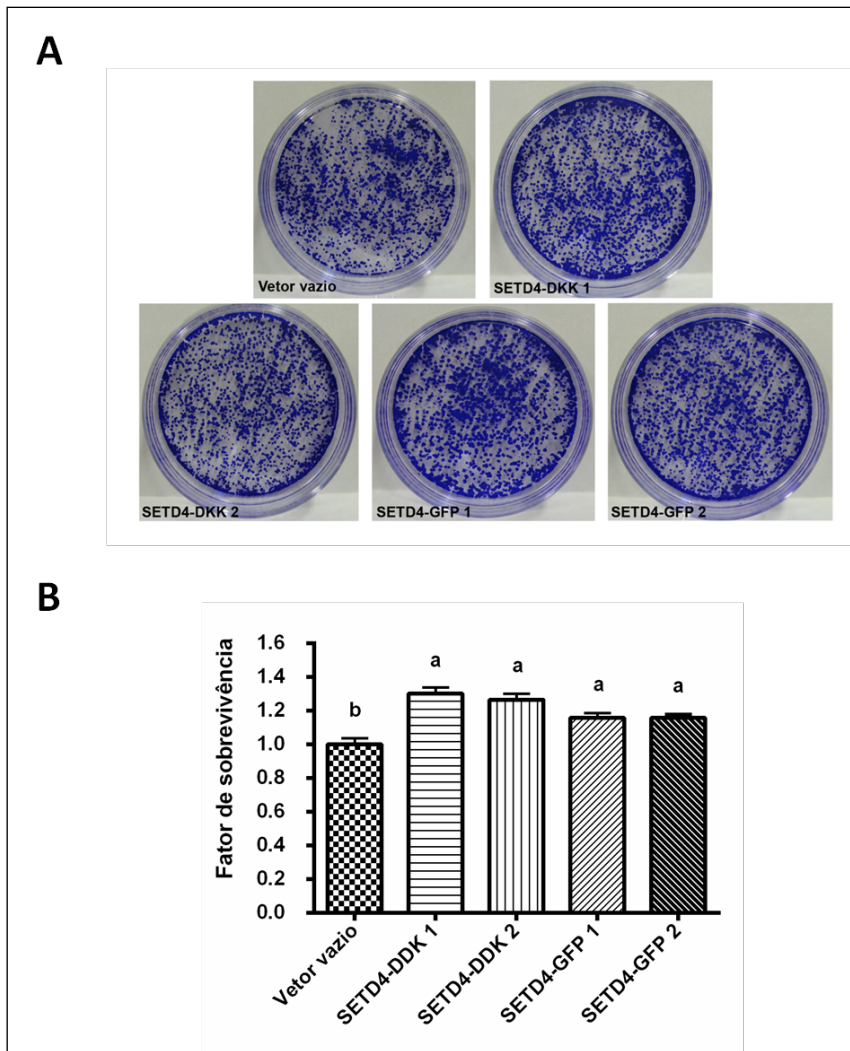


Figura 23. A superexpressão de SETD4 aumenta a capacidade de formação de colônias a partir de uma única célula. Clone controle vetor (vetor vazio) e as células com superexpressão SETD4 foram plaqueadas e mantidas em placas 35 mm. (A) As colônias foram coradas com cristal violeta e contadas no software image J. (B) A obtenção do valor de eficiência de plaqueamento permitiu o cálculo do fator de sobrevivência, o qual foi normalizado em relação ao controle (vetor vazio). As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, ao passo que, letras distintas diferem pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade.

A quantificação das células em cada fase do ciclo celular foi conduzida para avaliar se o aumento observado na proliferação das células superexpressando SETD4 alterava o perfil do ciclo. A análise por citometria de fluxo indicou um perfil distinto entre o grupo superexpressando a proteína e os grupos controle (não transformadas e transformadas com o vetor vazio) (Figura 24 A).

Na fase G1, 2 clones superexpressando SETD4 (SETD4-DDK 2 e SETD4-GFP 1) apresentaram um menor número de células nesta fase comparado aos controles (não transformados e vetor vazio). Os outros clones (SETD4-DDK 1 e SETD4-GFP 2) não diferiram dos grupos controle. Os 4 clones independentes superexpressando SETD4 mostraram número de células superior na fase S do ciclo em comparação aos grupos controle. Já para a fase G2/M, com a exceção de SETD4-DDK 1, clones SETD4 não diferiram significativamente da fração de células não transformadas. Nesta fase, a fração de células transformadas com o vetor vazio foi inferior ao apresentado pelos 3 clones superexpressando a proteína (SETD4-DDK 2, SETD4-GFP 1 e SETD4-GFP 2). Além disso, a porcentagem de células mortas nos clones SETD4 não apresentou diferença significativa com os controles (Figura 24B). Em suma, as diferenças nos perfis do ciclo celular entre os grupos revela que a superexpressão eleva o número de células na fase S, a fase da duplicação do DNA e parece não relacionada a processos de morte celular.

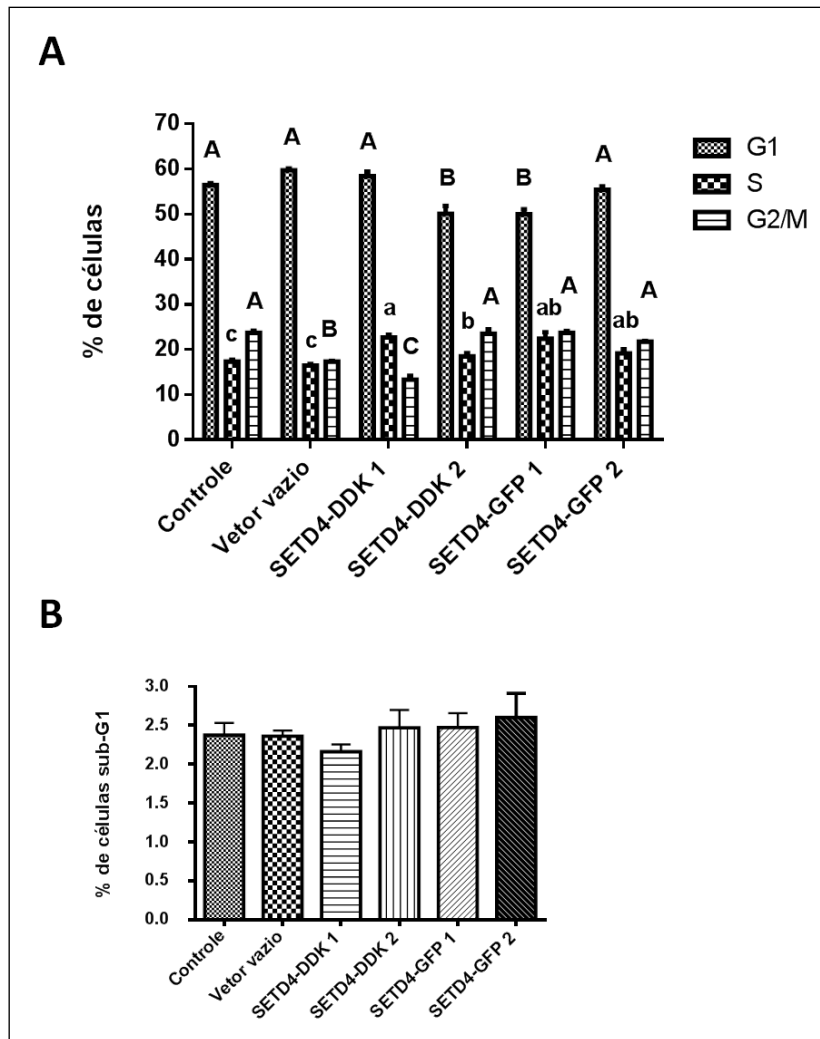


Figura 24. A superexpressão de SETD4 eleva o número de células na fase S do ciclo celular. Células controle (não transformadas), clones vetor vazio e os 4 clones superexpressando SETD4 (SETD4-DDK 1, 2 e SETD4-GFP 1 e 2) foram ressuspensas em solução fluorocrômica e avaliadas no citômetro de fluxo. (A) Quantificação das células controle e dos clones estáveis nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2/M). As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, ao passo que, letras distintas diferem pelo teste de Tuckey a 5% de probabilidade. Cada fase do ciclo foi analisada separadamente para todos os tratamentos, sendo que letras maiúsculas representam dados das fases G1 e G2/M e minúsculas, a fase S. (B) Porcentagem de núcleos sub-diplóides advindos de células controle e dos clones estáveis. Não há diferença entre as médias pelo teste de Tuckey a 1% de probabilidade.

5.DISSCUSSÃO

A metilação das histonas corresponde uma das modificações associadas com alterações no perfil de expressão de uma célula. Neste sentido, a desregulação funcional das histonas metiltransferases está diretamente relacionada a indução e progressão tumoral (Y. Huang et al., 2011; Jenuwein & Allis, 2001). A transferência do grupo metil para a cadeia lateral dos resíduos de lisina nas histonas é catalizada pelas enzimas contendo domínio SET. Alterações funcionais, e no perfil de expressão das proteínas SET estão diretamente associadas à indução e progressão tumoral (Collett et al., 2006; He et al., 2012; Nimura et al., 2010). Algumas proteínas SET são apontadas como marcadores prognósticos no câncer de mama despontando como alvos promissores de tratamento (Albert & Helin, 2010; Chang & Hung, 2012).

Neste sentido, faz-se necessário estender a compreensão sobre novas lisinas metiltransferase humanas, no âmbito funcional, e sua correlação com doenças complexas, como o câncer. Este trabalho teve como por objetivo, a caracterização de uma nova lisina metiltransferase humana, SETD4, bem como a sua função em linhagens de câncer de mama.

A SETD4 (proteína contendo domínio SET 4) é uma proteína altamente conservada em diferentes espécies. SETD4 juntamente com SETD3 e SETD6 são classificadas como metiltransferases não histonas clássicas contendo domínio SET, e agrupadas na classe VII das lisinas metiltransferases humanas. A classificação em classes destas proteínas decorre da similaridade entre as regiões do domínio SET. A classe I compreendendo EZH2 contém atividade KMT H3-K27, enquanto os membros da classe V, (suvar-39) possuem atividade H3K9. Em adição, a classe VI (SMYD) apresenta especificidade H3K36 e/ou H3K4. Estes dados sugerem que as diferenças estruturais dentro do domínio SET definem os resíduos alvo na cauda das histonas (Petrossian & Clarke, 2011). Com base nesta analogia, SETD4 poderia ter atividades de histona metiltransferase similar aos membros de sua classe. Contudo, SETD3 e SETD6 divergem na especificidade dos substratos. SETD3 é uma H3K4 e H3K36 metiltransferase, ao passo que, SETD6 monometila K4 na histona variante H2AZ. Além disso, SETD6 metila uma subunidade do fator NF-κB (Binda et al., 2013; Eom et al., 2011; Levy et al., 2011).

As sequências de SETD3 e SETD4 são similares à enzima rubisco metiltransferase (LSMT) (Petrossian & Clarke, 2011). Em plantas, a enzima LSMT cataliza a metilação de resíduos de lisina nas subunidades maiores da ribulose 1,5 bifosfato carboxilase (Rubisco) e frutose 1,6 bifosfato aldolase de cloroplastos. Tais modificações não alteram a cinética e os parâmetros de ativação destas enzimas. Postula-se que a significância funcional destas metilações advém de mecanismos regulatórios envolvendo interação proteína-proteína (Mininno et al., 2012; Trievel et al., 2002).

Uma vez que, até o momento, não existem estruturas de SETD4 resolvidas experimentalmente foi gerado um modelo estrutural para esta proteína humana. A estratégia de modelagem por homologia baseia-se no conhecimento de que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada que sua sequência de aminoácidos durante o processo evolutivo, e que pequenas mudanças na sequência, em geral, resultam em, apenas sutis modificações na estrutura tridimensional (Marti-Renom et al., 2000; Nayeem, Sitkoff, & Krystek, 2006). O alinhamento estrutural entre proteínas consideradas de uma mesma família, mesmo que seja apenas na região do sítio ativo, pode ser um importante método para se inferir a função da sequência em estudo (Laskowski, 2001).

A proteína molde selecionada, SETD3 regula a expressão dos fatores específicos de diferenciação muscular por meio das marcas H3K4 e H3K36 (Eom et al., 2011). A proteína SETD3 truncada (ausência do domínio SET) apresenta característica oncogênica em linfomas de células B periféricas (Z. Chen, Yan, Dou, Viboolsittiseri, & Wang, 2013).

O domínio SET apresenta uma estrutura de enovelamento única que a distingue das outras classes de metiltransferases cujo cofator é S-adenosil-L-metionina (Qian & Zhou, 2006). O correto posicionamento de SAM na estrutura destas proteínas é um ponto crítico para a catálise enzimática (Marmorstein, 2003). Inicialmente, o cofator e o resíduo de lisina do substrato precisam se ligar de modo orientado na bolsa catalítica do domínio SET. Assim, o resíduo de tirosina próximo desprotona o grupo ϵ -amino do resíduo de lisina. A cadeia lateral da lisina realiza o ataque nucleofílico no grupo metil do átomo de enxofre

de SAM, transferindo assim o grupo metil para a cadeia lateral da lisina do substrato (Trievel et al., 2002).

O alinhamento das sequências dos domínios SET das proteínas já caracterizadas e SETD4 indicou uma alta similaridade na região dos motivos conservados (motivo NHS e EEL), bem como, a conservação do resíduo de tirosina do sítio ativo. A importância destes motivos para a catálise foi observada em ensaios com SMYD3. Mutantes deletérios para os motivos NHSC e EEL, tomados em conjunto ou separadamente, aboliram a atividade de metilação das histonas (Kim et al., 2009).

Muito embora, o alinhamento das sequências de SETD3 e SETD4 revelaram uma baixa identidade, a conservação das sequências mostra-se nos resíduos chaves do domínio catalítico. Neste contexto, os resíduos conservados, Asn236, His237 e Tyr272 (usando a numeração dos resíduos de aminoácidos de SETD4) estão corretamente posicionados no modelo proposto. Mutações nestas posições nas proteínas DIM-5 e SET7 mostraram uma drástica redução na atividade catalítica (Trievel et al., 2002; Wilson et al., 2002; X. Zhang et al., 2002). De modo geral, a inferência funcional de lisina metiltransferase de SETD4 é sustentada pela análise comparativa do modelo de SETD4 e da proteína SETD3. Embora, os substratos específicos desta enzima e seus sítios de modificações permanecem a serem estabelecidos.

Interessantemente, a sequência de *SETD4* localiza-se na região da banda cromossômica 21q22, a qual tem sido relacionada às características da síndrome de Down. Este segmento cromossômico apresenta, nos indivíduos afetados, os genes estruturais e seus produtos em dose tripla, efeito da dosagem gênica (Shapiro, 1983). De fato, em células de paciente com esta síndrome, SETD4 é superexpresso na ordem de 1,5 vezes comparado ao grupo não portador da síndrome (Li et al., 2006; Salemi et al., 2012). Uma das principais malformações associadas a esta desordem são cardíacas (Opitz & Gilbert-Barness, 1990). A hibridização de RNA *in situ* em diferentes estágios embrionários de camundongos indicaram a expressão de *SETD4* nos precursores da artéria pulmonar e ventrículo direito (Reymond et al., 2001). Como síndrome complexa de origem genética e epigenética, esta análise abre uma perspectiva de atuação de SETD4 na síndrome de Down.

De modo geral, a predição do perfil de distribuição de SETD4 nos tecidos foi confirmada pela técnica de western blot. A expressão de SETD4 em olhos e a importância desta proteína no tecido é sustentada por dados do IMPC (*International Mouse Phenotyping Consortium*) (<http://www.mousephenotype.org/>). Resultados preliminares indicam que o camundongo *knockout* para SETD4 apresenta alteração na morfologia e pigmentação da retina. Adicionalmente, dados de expressão diferencial entre retinoblastoma, um raro tumor ocular, e retina normal revelam que SETD4 é superexpresso na ordem de duas vezes em retinoblastoma (Ganguly & Shields, 2010). Neste mesmo sentido, nas células de melanoma Sk-mel28, *SETD4* é cerca de 4 vezes mais expressos que no controle (Frank et al., 2012).

Assim como SETD3, SETD4 é altamente expresso no tecido muscular esquelético (Eom et al., 2011). Em comparação a uma linhagem leucêmica, o *SETD4* é um dos genes com a maior expressão na célula TE-671, derivada de rabdomyossarcoma, um tumor maligno da musculatura esquelética (Lambrou et al., 2012).

As modificações nas histonas são plataformas regulatórias importantes para vários processos como expressão gênica, replicação e reparo de DNA. O padrão das marcas epigenéticas é dependente da distribuição temporal e espacial das enzimas modificadoras como as metiltransferases e demetilases. Alterações na expressão de tais enzimas foram identificadas em uma variedade de cânceres humano (Albert & Helin, 2010; Islam et al., 2011; Ozdag et al., 2006).

A expressão de SMYD3 é elevada em tumores de mama e em linhagens celulares como MDA-MB 231 e MCF-7. SMYD3 regula diretamente a expressão do proto-oncogene *WNT10B* (Hamamoto et al., 2006). Análise de PCR em Tempo Real, imunocitoquímica e western blot mostraram que o perfil de expressão de SETD4 é distintos entre as linhagens celulares de câncer de mama. Comparada com os respectivos controles, as linhagens celulares e tumores expressando os receptores hormonais (RE e RP) e Her-2 não apresentam alteração na expressão de SETD4. Em contraposição, SETD4 mostrou-se superexpressa nas linhagens de câncer de mama e tumores triplo-negativos. Esta correlação inversa dos marcadores do câncer de mama e

expressão da proteína SET é bem caracterizada para EZH2. Esta proteína apresenta elevada expressão em câncer de mama agressivo e metastático (Kleer et al., 2003). Vários trabalhos têm mostrado que a expressão de EZH2 correlaciona com marcadores do subtipo basal de câncer de mama, o qual é caracterizado por infrequente expressão dos receptores hormonais e rara superexpressão de Her-2 mas com a presença dos marcadores de diferenciação mioepitelial (Collett et al., 2006; Kleer et al., 2003).

Em linhagens benignas e fibroblastos, a expressão de EZH2 acumula-se na transição das fases G1/S. Entretanto, esta regulação é perdida em células tumorais (Bracken et al., 2003; Gonzalez et al., 2009). A redução na expressão de EZH2 nas células MDA-MB 231 eleva a expressão e fosforilação da proteína supressora BRCA-1, o que leva a uma parada no ciclo celular na transição G2/M. Em adição, o *knockdown* de *EZH2* também reduziu o crescimento tumoral *in vivo*. Paralelamente, a superexpressão de EZH2 aumenta a fração mitótica e, conseqüentemente a proliferação celular. (Bracken et al., 2003). Assim como para SETD4, a supressão da expressão de SMYD3 nas células MDA-MB 231 leva a uma parada na fase G1 do ciclo celular com redução na expressão de ciclina D1 (Ren et al., 2011).

A reduzida expressão de SETD4 em MDA-MB 231 diminuiu a proliferação e a capacidade clonogênica destas células. Além disso, clones independentes superexpressando SETD4 apresentaram um aumento na capacidade proliferativa e clonogênica. Estes experimentos funcionais revelaram que a característica oncogênica de SETD4 parece envolver a transição das fases G1/S do ciclo celular.

A progressão do ciclo celular é coordenada por uma série de pontos de checagem, os quais previnem que a célula entre em uma fase até que tenha completado com sucesso a fase anterior (Malumbres & Barbacid, 2001). Tal progressão envolve a ativação coordenada das cinases dependentes de ciclinas (cdks), por meio da ligação com ciclinas específicas, de modo que diferentes complexos ciclinas/cdks operam durante as distintas fases do ciclo celular. O nível das ciclinas oscila durante o ciclo celular e sua disponibilidade é uma maneira de controlar a atividade das cdks e a progressão do ciclo (Neganova & Lako, 2008).

As ciclinas D e E são as mais abundantes na fase G1 do ciclo celular (Diehl, 2002). Embora haja alta similaridade das sequências que codificam as ciclinas D, estas são diferencialmente reguladas. Células epiteliais mamárias codificam as três isoformas D1, D2 e D3 (Buckley et al., 1993). Ciclina D1 é regulador alostérico de CDK4 e CDK6 e promove a progressão da fase G1 em resposta a estímulos mitogênicos. A resposta mitogênica induz a expressão de ciclina D1, a associação desta com CDK4/6, os quais são responsáveis pela inativação dependente de fosforilação da proteína retinoblastoma (RB). Este evento repercute na liberação do fator de transcrição E2F e ativação transcricional de genes envolvidos na progressão para a fase S (Diehl, 2002; Massague, 2004). Concordando com seu perfil oncogênico, *Ciclina D1(CCND1)* é um dos genes comumente amplificados e superexpressos no câncer de mama (Arnold & Papanikolaou, 2005).

A redução na expressão de SETD4 levou ao aumento no número de células na fase G1 e concomitante redução de células na fase S. Em adição, houve uma redução nos níveis da proteína ciclina D1. Os níveis de ciclina D1, por sua vez, podem ser regulados transcricionalmente ou pós-traducionalmente (Musgrove, 2006).

Os mais bem caracterizados ativadores transcricionais de ciclina D1 são modulados pela sinalização mitogênica desencadeada por fatores de crescimento. A via canônica das MAPK cinases (Ras-ERK) (proteínas cinases ativadas por mitógeno) tem papel central nesta sinalização. Em resposta ao estímulo, ERK é fosforilado e ativa o fator de transcrição ELK-1, o qual por sua vez promove a transcrição de genes imediatos como os membros da família *fos*. O reconhecimento dos elementos de resposta ao soro (SRE), presentes na região promotora de genes *fos*, é mediada pela interação ELK-1 e SRF (Balmanno & Cook, 1999; Latinkic, Zeremski, & Lau, 1996; Musgrove, 2006).

As proteína da família (*fos*, *fosB*, *fos-L1* e *fos-L2*) formam heterodímeros com membros da família Jun e ATF, tais complexos ligam-se aos elementos regulatórios, AP-1 e ATF, respectivamente, presentes nas regiões regulatória do genes alvos. Desta forma, os complexos *fos* induzem a transcrição de genes de resposta tardios, críticos para a fase G1, como *ciclina D1*. A ativação de ERK regula um outro fator transcricional, CREB (proteína de ligação ao

elemento regulado por cAMP), através da atividade da cinase Rsk2. Elementos regulados por CREB (CRE), por sua vez, estão presentes na região regulatória do gene *c-fos* (Brown et al., 1998; Klein & Assoian, 2008; Won, Xiong, Beach, & Gilman, 1992).

Células com reduzida expressão de SETD4 não apresentaram alterações na ativação de ERK e na indução transcricional de *c-fos*. Nesta perspectiva, a modulação da sinalização mitogênica (no eixo ERK e *c-fos*) parece não ser a via pela qual os mecanismos ativados por SETD4 modulam os níveis de ciclina D1 nas células tumorais de mama.

Evidências tem demonstrado que a via PI3K/Akt pode regular a transcrição de *ciclina D1*. A ativação sequencial de PI3K e Akt por fatores mitógenos, leva a fosforilação e inativação da enzima GSK-3 β , a qual controla a estabilidade de β -catenina. Desta forma, β -catenina transloca-se para o núcleo, e por associação com o transfator LEF, induz a transcrição de *ciclina D1* (Shtutman et al., 1999).

A via de sinalização Wnt também inativa GSK-3 β (Rimerman, Gellert-Randleman, & Diehl, 2000). Além disso, um dos alvos da cinase GSK-3 β é a proteína ciclina D1, que ao ser fosforilada é exportada do núcleo e degradada no proteassomo (Diehl, Cheng, Roussel, & Sherr, 1998). Deste modo, a regulação de GSK-3 β converge a modulação transcricional e traducional de ciclina D1. Outro alvo da via PI3K/Akt, mTOR também regulada a taxa de tradução do mRNA *ciclina D1* (Richter & Sonenberg, 2005).

A amplitude de regulação dos níveis de ciclina D1 descritos previamente apontam uma gama de possíveis alvos diretos ou indiretos de SETD4 . A investigação do envolvimento da via PI3K/Akt na sinalização desencadeada por SETD4 mostra-se um ponto interessante. A superexpressão de EZH2 ativa a via PI3K/kt resultando na exportação nuclear do supressor BRCA-1 culminando na instabilidade genômica (Gonzalez et al., 2011).

EZH2 é parte do complexo PRC (*Polycomb Repressive Complex*). As proteínas deste grupo são repressoras transcricionais importantes para a manutenção da identidade celular. Este complexo induz a tumorigênese por meio da repressão transcricional de genes supressores de tumor, como os inibidores p16 e p14. p16 atua como inibidor das CDK4 e CDK6, e sua

expressão causa uma parada na fase G1 do ciclo celular. p14 modula a atividade de p53 inibindo sua degradação via proteassomo. Ao reprimir tais genes, o complexo PRC suspende importantes mecanismos de defesa contra a proliferação irrestrita, como senescência induzida por oncogenes e apoptose (Bracken et al., 2007; Reynolds et al., 2006; Rocco & Sidransky, 2001).

Os dados obtidos na análise funcional de SETD4 sugerem que esta metiltransferase contribui para os passos regulatórios que acionam a progressão da fase G1. Além disso, a superexpressão de SETD4 nas células MDA-MB 231 induzem a proliferação não ativando mecanismos de morte. Logo, assim como as proteínas do complexo PRC, SETD4 pode estar regulando a repressão de alguns inibidores da progressão do ciclo celular.

A expressão transiente da proteína SETD4 fusionada à GFP e DDK, assim como o a marcação da proteína endógena mostraram a presença desta proteína no núcleo e citosol. Nas imagens de microscopia confocal visualiza-se a distribuição de SETD4 em toda a extensão do citoplasma, e uma presença pontual no núcleo. Dada a esta distribuição subcelular, os alvos de SETD4 podem ser tanto as caudas N-terminais das histonas e proteínas nucleares, como substratos presentes no citoplasma.

O complexo Jumonji, por meio das atividade das histonas metiltransferases G9a e GLP, metila a histona H3 (K9) reprimindo a transcrição de *ciclina D1*. Tal repressão é necessária para a regulação negativa da proliferação em cardiomiócitos (Shirato et al., 2009). Em contrapartida, reduzida expressão de JMJD2B, uma histona demetilase suprime a proliferação celular com diminuição da população de células na fase S e aumento na fase G1 do ciclo. JMJD2B demetila resíduos K9 de H3 presentes na região promotora de *CDK6* resultando na redução da transcrição deste gene (Toyokawa et al., 2011).

Estes estudos revelam como as enzimas modificadoras de histonas regulam o ciclo celular. Neste sentido, dentre os mecanismos especulativos de atuação de SETD4, esta poderia metilar as caudas das histonas presentes na região promotora de *ciclina D1*, induzindo sua transcrição. Ou mesmo indiretamente atuando sobre proteínas ativadoras e repressoras no núcleo.

Fatores transcricionais e enzimas modificadoras de DNA e histonas têm sido descritos como alvos das lisinas metiltransferases. Um dos mecanismos pelo qual estas modificações modulam seus alvos é a regulação, tanto elevada ou inibida, das interações proteína-proteína. Além disso, a metilação pode influenciar a estabilidade da proteína alvo (Egorova et al., 2010; X. Zhang et al., 2012).

Vários reguladores transcricionais incluindo HDAC1/2 e mSin3A/B foram descritos associados a SETDB1, uma histona metiltransferase (H3K9) (L. Yang et al., 2003). Interessantemente, células expressando SETDB1 fusionada à GFP indicaram uma localização predominantemente citoplasmática. Esta retenção citoplasmática para a proteína superexpressa ocorre como um mecanismo regulatório para limitar a atividade nuclear de SETDB1, a qual em excesso resulta na modificação e alteração global da transcrição (Cho, Park, & Kang, 2013). Neste sentido, a predominância citoplasmática de SETD4 pode atuar como mecanismo de regulação de sua função. Em adição, em decorrência da distribuição nuclear e citoplasmática de SETD4, é possível que esta metiltransferase tenha alvos diferentes nos distintos compartimentos.

A enzima SMYD3 localiza-se predominantemente no citosol nas fases G0/G1 do ciclo celular, enquanto acumula-se no núcleo durante a fase S e G2/M. No núcleo, SMYD3 interage com a RNA polimerase II e apresenta atividade metiltransferase H3K4 (Hamamoto et al., 2004). SMYD3 também metila K831 de VEGFR1, o qual localiza-se na membrana endoplasmática (Kunizaki et al., 2007; Mittar et al., 2009). Adicionalmente, SMYD3 promove a translocação do núcleo para o citoplasma da proteína Tax (Yamamoto et al., 2011).

Condizente com a função de modificação das caudas das histonas, EZH2 localiza-se predominantemente no núcleo de vários tipos celulares (Cao et al., 2002). Entretanto, a localização citosólica também é observada em células T, fibroblastos e HEK-293. No citosol, EZH2 promove a polimerização de actina induzida por PGDF e TRC em fibroblastos e células T, respectivamente (Su et al., 2005).

Em leveduras, a lisina metiltransferase Rkm1 cataliza a dimetilação da proteína ribossomal L23ab (em 2 sítios distintos), e as proteínas SETD4

humana e de camundongos foram citadas como sequências homólogas a Rkm1 (Porras-Yakushi, Whitelegge, & Clarke, 2007). A função destas modificações na proteína ribossomal ainda não foram esclarecidas (Egorova et al., 2010). Células tumorais demandam um aumento global na síntese de proteínas para suportar a alta taxa proliferativa. A ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais podem levar, por exemplo, a um aumento no número de ribossomos em função da atividade da RNA polimerase I (Marcel, Catez, & Diaz, 2013). O supressor tumoral p53 reprime transcricionalmente a expressão do gene que codifica a fibrilarina, uma rRNA metiltransferase. A superexpressão de fibrilarina está associado a um baixa sobrevivência em pacientes com câncer de mama. Os altos níveis desta enzima leva a modificações no padrão de metilação dos rRNA, que por sua vez, aumenta a iniciação da tradução mediada por IRES de vários oncogenes (Marcel, Ghayad, et al., 2013). Neste sentido, caracterizar proteínas ribossomais como substrato para SETD4 pode estender o efeito da regulação traducional na carcinogênese.

Interessantemente, a superexpressão de SETD4 nas células MCF-7, que constitutivamente possuem baixa expressão desta proteína apontou um fenótipo sugestivo de morte celular. Tal fato não foi observado nas células MDA-MB 231, as quais constitutivamente apresentam superexpressão de SETD4. Nesta última, SETD4 atua como um possível oncogene participando na progressão da fase G1 do ciclo celular. Desta forma, estes dados sugerem que o tipo de sinalização mediada por esta lisina metiltransferase seja linhagem específica e dependente da ausência dos receptores hormonais.

O receptor de estrógeno é um receptor nuclear que regula a transcrição mediante ativação com o ligante 17 β -estradiol (Govind & Thampan, 2001). A terapia endócrina com a administração de anti-estrógenos e remoção dos ovários, tem sido estabelecida no tratamento de câncer de mama positivos para este receptor (Davidson, 2000). Entretanto, muitos tumores perdem a expressão de RE quando do diagnóstico e muitos perdem a expressão durante a progressão do tumor (Hortobagyi, 1998). As alterações epigenéticas têm um papel importante na inativação da expressão do gene *RE* (Ottaviano et al., 1994).

Os tumores triplo-negativos apresentam um perfil tumoral mais agressivo e com alto índice mitótico (Carey et al., 2006). Em função de seu perfil de expressão, estes tumores são resistentes aos tratamentos hormonais e com inibidores da ativação do EGFR/Her-2, como trastuzumab (Cleator, Heller, & Coombes, 2007). Tratamento de tumores triplo-negativos com inibidores de DNA metiltransferase e histona deacetilase induz a síntese de RE e ativa esta sinalização com a expressão do gene alvo, o qual codifica o receptor da progesterona (X. Yang et al., 2001).

Vários inibidores de histonas metiltransferases e demetilases têm sido descritos como capazes de induzir a expressão dos genes silenciados pela atividade destas enzimas (Y. Huang et al., 2011). O composto Novobiocin reduz a expressão de SMYD3 inibindo a proliferação e migração das células MDA-MB 231 (Luo, Zou, Wang, Zhang, & Xi, 2010). Neste contexto, a nítida correlação de SETD4 e a progressão tumoral de mama sugere esta proteína como um possível marcador e candidato terapêutico para tumores triplo-negativos. Neste sentido, futuros experimentos reforçarão a importância de SETD4 como marcador e efetor da progressão do câncer de mama, assim como possibilitarão elucidar os mecanismos envolvendo a atividade desta enzima.

6.CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Vários estudos têm demonstrado o envolvimento das lisinas metiltransferases na progressão tumoral (Albert & Helin, 2010). Neste trabalho, reportamos pela primeira vez na literatura, o envolvimento da proteína SETD4 humana na proliferação de células tumorais de mama. Reduzida expressão desta proteína leva a parada na fase G1 do ciclo celular e diminuição nos níveis de ciclina D1. Dados de expressão em tumores primários e linhagens celulares sugerem uma correlação negativa entre a superexpressão de SETD4 e dos receptores hormonais. Para confirmar esta relação, faz-se necessário ampliar a análise da expressão de SETD4 em um conjunto maior de amostras de tumores de mama.

SETD4 apresenta localização tanto nuclear quanto citoplasmática. Neste sentido, temos como perspectiva elucidar os substratos nucleares e/ou citosólicos de SETD4, bem como a sinalização regulada pela sua atividade. Avanços neste campo irão ampliar nosso entendimento do papel de SETD4 na tumorigênese.

Os modelos gerados por modelagem baseada na homologia estrutural têm oferecido um excelente suporte no planejamento de potentes agentes farmacológicos (Diller & Li, 2003; Enyedy et al., 2001). O *screening* virtual de ligantes utiliza de métodos computacionais para a descoberta de possíveis ligantes (Fan, Irwin, & Sali, 2012). O modelo estrutural de SETD4 pode, portanto ser um ponto inicial de estudo pra a seleção de drogas candidatas no tratamento de tumores triplo-negativos.

Em decorrência dos seus efeitos de reprogramação epigenética, as lisinas metiltransferases estão envolvidas diretamente nos processos de manutenção de pluripotência e diferenciação celular (Eom et al., 2011; Pasini et al., 2008). Neste sentido, o estudo funcional de SETD4 pode ser ampliado e analisado nestes eventos.

7.BIBLIOGRAFIA

- Al Sarakbi, W., Sasi, W., Jiang, W. G., Roberts, T., Newbold, R. F., & Mokbel, K. (2009). The mRNA expression of SETD2 in human breast cancer: correlation with clinicopathological parameters. *BMC Cancer*, *9*, 290. doi: 10.1186/1471-2407-9-290
- Albert, M., & Helin, K. (2010). Histone methyltransferases in cancer. *Semin Cell Dev Biol*, *21*(2), 209-220. doi: 10.1016/j.semcdb.2009.10.007
- Anothaisintawee, T., Wiratkapun, C., Lersitthichai, P., Kasamesup, V., Wongwaisayawan, S., Srinakaran, J., . . . Thakkestian, A. (2013). Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Asia Pac J Public Health*, *25*(5), 368-387. doi: 10.1177/1010539513488795
- Arnold, A., & Papanikolaou, A. (2005). Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol*, *23*(18), 4215-4224. doi: 10.1200/JCO.2005.05.064
- Baba, S. W., Belogradov, G. I., Lee, J. C., Lee, P. T., Strahan, J., Shepherd, J. N., & Clarke, C. F. (2004). Yeast Coq5 C-methyltransferase is required for stability of other polypeptides involved in coenzyme Q biosynthesis. *J Biol Chem*, *279*(11), 10052-10059. doi: 10.1074/jbc.M313712200
- Balmano, K., & Cook, S. J. (1999). Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene*, *18*(20), 3085-3097. doi: 10.1038/sj.onc.1202647
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., . . . Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, *129*(4), 823-837. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.009
- Bhasin, M., & Raghava, G. (2004). ESLpred: SVM-based method for subcellular localization of eukaryotic proteins using dipeptide composition and PSI-BLAST. *Nucleic acids research*, *32*(suppl 2), W414-W419.
- Binda, O., Sevilla, A., LeRoy, G., Lemischka, I. R., Garcia, B. A., & Richard, S. (2013). SETD6 monomethylates H2AZ on lysine 7 and is required for the maintenance of embryonic stem cell self-renewal. *Epigenetics*, *8*(2), 177-183. doi: 10.4161/epi.23416
- Blekhman, R., Marioni, J. C., Zumbo, P., Stephens, M., & Gilad, Y. (2010). Sex-specific and lineage-specific alternative splicing in primates. *Genome Res*, *20*(2), 180-189. doi: 10.1101/gr.099226.109
- Bracken, A. P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., . . . Helin, K. (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev*, *21*(5), 525-530. doi: 10.1101/gad.415507
- Bracken, A. P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., & Helin, K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J*, *22*(20), 5323-5335. doi: 10.1093/emboj/cdg542
- Brameier, M., Krings, A., & MacCallum, R. M. (2007). NucPred--predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics*, *23*(9), 1159-1160. doi: 10.1093/bioinformatics/btm066
- Bray, F., McCarron, P., & Parkin, D. M. (2004). The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res*, *6*(6), 229-239. doi: 10.1186/bcr932
- Brooks, C. L., & Gu, W. (2010). New insights into p53 activation. *Cell Res*, *20*(6), 614-621. doi: 10.1038/cr.2010.53

- Brown, J. R., Nigh, E., Lee, R. J., Ye, H., Thompson, M. A., Saudou, F., . . . Greenberg, M. E. (1998). Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. *Mol Cell Biol*, *18*(9), 5609-5619.
- Buckley, M. F., Sweeney, K. J., Hamilton, J. A., Sini, R. L., Manning, D. L., Nicholson, R. I., . . . Sutherland, R. L. (1993). Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene*, *8*(8), 2127-2133.
- Cailleau, R., Olivé, M., & Cruciger, Q. V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, *14*(11), 911-915.
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., . . . Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*, *298*(5595), 1039-1043. doi: 10.1126/science.1076997
- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., . . . Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, *295*(21), 2492-2502. doi: 10.1001/jama.295.21.2492
- Chang, C. J., & Hung, M. C. (2012). The role of EZH2 in tumour progression. *Br J Cancer*, *106*(2), 243-247. doi: 10.1038/bjc.2011.551
- Chen, M. W., Hua, K. T., Kao, H. J., Chi, C. C., Wei, L. H., Johansson, G., . . . Kuo, M. L. (2010). H3K9 histone methyltransferase G9a promotes lung cancer invasion and metastasis by silencing the cell adhesion molecule Ep-CAM. *Cancer Res*, *70*(20), 7830-7840. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0833
- Chen, Z., Yan, C. T., Dou, Y., Viboolsittiseri, S. S., & Wang, J. H. (2013). The role of a newly identified SET domain-containing protein, SETD3, in oncogenesis. *Haematologica*, *98*(5), 739-743. doi: 10.3324/haematol.2012.066977
- Cho, S., Park, J. S., & Kang, Y. K. (2013). Regulated nuclear entry of over-expressed Setdb1. *Genes Cells*, *18*(8), 694-703. doi: 10.1111/gtc.12068
- Choi, J. D., & Lee, J. S. (2013). Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. *Genomics Inform*, *11*(4), 164-173. doi: 10.5808/GI.2013.11.4.164
- Chuikov, S., Kurash, J. K., Wilson, J. R., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, G. S., . . . Reinberg, D. (2004). Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature*, *432*(7015), 353-360. doi: 10.1038/nature03117
- Cleator, S., Heller, W., & Coombes, R. C. (2007). Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol*, *8*(3), 235-244. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70074-8
- clinicaltrials.gov. (2014). <http://clinicaltrials.gov/>. U.S. National Institutes of Health.
- Cock-Rada, A. M., Medjkane, S., Janski, N., Yousfi, N., Perichon, M., Chaussepied, M., . . . Weitzman, J. B. (2012). SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res*, *72*(3), 810-820. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1052
- Collett, K., Eide, G. E., Arnes, J., Stefansson, I. M., Eide, J., Braaten, A., . . . Akslen, L. A. (2006). Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res*, *12*(4), 1168-1174. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1533
- Correa, C. R., Bertollo, C. M., & Goes, A. M. (2009). Establishment and characterization of MACL-1 and MGSO-3 cell lines derived from human primary breast cancer. *Oncol Res*, *17*(10), 473-482.

- Corrêa, N. C., Kuasne, H., Faria, J. A., Seixas, C., Santos, I. G., Abreu, F. B., . . . Gobbi, H. (2013). Genomic and phenotypic profiles of two Brazilian breast cancer cell lines derived from primary human tumors. *Oncol Rep*, 29(4), 1299-1307.
- Corrêa, N. C. R. (2013). *Caracterização fenotípica e genômica de duas linhagens de câncer de mama brasileiras derivadas de tumores primários humanos*. (Doutorado Tese de doutorado), Universidade Federal de Minas Gerais.
- Davidson, N. E. (2000). Combined endocrine therapy for breast cancer--new life for an old idea? *J Natl Cancer Inst*, 92(11), 859-860.
- De Angelis Campos, A. C., Rodrigues, M. A., de Andrade, C., de Goes, A. M., Nathanson, M. H., & Gomes, D. A. (2011). Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 412(2), 341-346. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.100
- Deane, C., & Blundell, T. (2003). Protein comparative modelling and drug discovery. In C. G. WERMUTH (Ed.), *The Practice of Medicinal Chemistry*. London: Elsevier Academic Press.
- Diehl, J. A. (2002). Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol Ther*, 1(3), 226-231.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, 12(22), 3499-3511.
- Diller, D. J., & Li, R. (2003). Kinases, homology models, and high throughput docking. *J Med Chem*, 46(22), 4638-4647. doi: 10.1021/jm020503a
- Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C., & Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol*, 6(8), 227. doi: 10.1186/gb-2005-6-8-227
- Egorova, K. S., Olenkina, O. M., & Olenina, L. V. (2010). Lysine methylation of nonhistone proteins is a way to regulate their stability and function. *Biochemistry (Mosc)*, 75(5), 535-548.
- Enyedy, I. J., Lee, S. L., Kuo, A. H., Dickson, R. B., Lin, C. Y., & Wang, S. (2001). Structure-based approach for the discovery of bis-benzamidines as novel inhibitors of matriptase. *J Med Chem*, 44(9), 1349-1355.
- Eom, G. H., Kim, K. B., Kim, J. H., Kim, J. Y., Kim, J. R., Kee, H. J., . . . Seo, S. B. (2011). Histone methyltransferase SETD3 regulates muscle differentiation. *J Biol Chem*, 286(40), 34733-34742. doi: 10.1074/jbc.M110.203307
- Eroles, P., Bosch, A., Perez-Fidalgo, J. A., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38(6), 698-707. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.11.005
- Eswar, N., Eramian, D., Webb, B., Shen, M. Y., & Sali, A. (2008). Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol*, 426, 145-159. doi: 10.1007/978-1-60327-058-8_8
- Fan, H., Irwin, J. J., & Sali, A. (2012). Virtual ligand screening against comparative protein structure models. *Methods Mol Biol*, 819, 105-126. doi: 10.1007/978-1-61779-465-0_8
- Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H.-R., . . . Sonnhammer, E. L. (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, 36(suppl 1), D281-D288.

- Fisch, T. M., Prywes, R., Simon, M. C., & Roeder, R. G. (1989). Multiple sequence elements in the c-fos promoter mediate induction by cAMP. *Genes Dev*, 3(2), 198-211.
- Fraga, M. F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., . . . Esteller, M. (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*, 37(4), 391-400. doi: 10.1038/ng1531
- Frank, A., David, V., Aurelie, T. R., Florent, G., William, H., & Philippe, B. (2012). Regulation of MMPs during melanoma progression: from genetic to epigenetic. *Anticancer Agents Med Chem*, 12(7), 773-782.
- Franken, N. A., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & Van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, 1(5), 2315-2319.
- Ganguly, A., & Shields, C. L. (2010). Differential gene expression profile of retinoblastoma compared to normal retina. *Mol Vis*, 16, 1292-1303.
- Goldhirsch, A., Wood, W., Coates, A., Gelber, R., Thürlimann, B., & Senn, H.-J. (2011). Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology*, 22(8), 1736.
- Gonzalez, M. E., DuPrie, M. L., Krueger, H., Merajver, S. D., Ventura, A. C., Toy, K. A., & Kleer, C. G. (2011). Histone methyltransferase EZH2 induces Akt-dependent genomic instability and BRCA1 inhibition in breast cancer. *Cancer Res*, 71(6), 2360-2370. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1933
- Gonzalez, M. E., Li, X., Toy, K., DuPrie, M., Ventura, A. C., Banerjee, M., . . . Kleer, C. G. (2009). Downregulation of EZH2 decreases growth of estrogen receptor-negative invasive breast carcinoma and requires BRCA1. *Oncogene*, 28(6), 843-853. doi: 10.1038/onc.2008.433
- Govind, A. P., & Thampan, R. V. (2001). Proteins interacting with the mammalian estrogen receptor: proposal for an integrated model for estrogen receptor mediated regulation of transcription. *J Cell Biochem*, 80(4), 571-579.
- Greathouse, K. L., Bredfeldt, T., Everitt, J. I., Lin, K., Berry, T., Kannan, K., . . . Walker, C. L. (2012). Environmental estrogens differentially engage the histone methyltransferase EZH2 to increase risk of uterine tumorigenesis. *Mol Cancer Res*, 10(4), 546-557. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-11-0605
- Hamamoto, R., Furukawa, Y., Morita, M., Iimura, Y., Silva, F. P., Li, M., . . . Nakamura, Y. (2004). SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol*, 6(8), 731-740. doi: 10.1038/ncb1151
- Hamamoto, R., Silva, F. P., Tsuge, M., Nishidate, T., Katagiri, T., Nakamura, Y., & Furukawa, Y. (2006). Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci*, 97(2), 113-118. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00146.x
- Hammond, M. E., Hayes, D. F., & Wolff, A. C. (2011). Clinical notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists guideline recommendations on ER/PgR and HER2 testing in breast cancer. *Journal of clinical Oncology*, 29(15), e458-e458.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013

- Hartwell, L. H., & Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, *246*(4930), 629-634.
- He, Y., Korboukh, I., Jin, J., & Huang, J. (2012). Targeting protein lysine methylation and demethylation in cancers. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, *44*(1), 70-79. doi: 10.1093/abbs/gmr109
- Hortobagyi, G. N. (1998). Treatment of breast cancer. *N Engl J Med*, *339*(14), 974-984. doi: 10.1056/NEJM199810013391407
- Horton, P., & Nakai, K. (1997). Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, *5*, 147-152.
- Horwitz, K., Costlow, M., & McGuire, W. (1975). MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids*, *26*(6), 785-795.
- Hu, L., Zhu, Y. T., Qi, C., & Zhu, Y. J. (2009). Identification of Smyd4 as a potential tumor suppressor gene involved in breast cancer development. *Cancer Res*, *69*(9), 4067-4072. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4097
- Huang, J., Perez-Burgos, L., Placek, B. J., Sengupta, R., Richter, M., Dorsey, J. A., . . . Berger, S. L. (2006). Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature*, *444*(7119), 629-632. doi: 10.1038/nature05287
- Huang, Y., Nayak, S., Jankowitz, R., Davidson, N. E., & Oesterreich, S. (2011). Epigenetics in breast cancer: what's new? *Breast Cancer Res*, *13*(6), 225. doi: 10.1186/bcr2925
- Hung, L. Y., Tseng, J. T., Lee, Y. C., Xia, W., Wang, Y. N., Wu, M. L., . . . Chang, W. C. (2008). Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression. *Nucleic Acids Res*, *36*(13), 4337-4351. doi: 10.1093/nar/gkn417
- INCA. <http://www.inca.gov.br/estimativas>. *Estimativas 2014; Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)-Ministério da Saúde*.
- Islam, A. B., Richter, W. F., Jacobs, L. A., Lopez-Bigas, N., & Benevolenskaya, E. V. (2011). Co-regulation of histone-modifying enzymes in cancer. *PLoS One*, *6*(8), e24023. doi: 10.1371/journal.pone.0024023
- IUPAC-IUBMB. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>. *INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY*.
- Janknecht, R., Cahill, M. A., & Nordheim, A. (1995). Signal integration at the c-fos promoter. *Carcinogenesis*, *16*(3), 443-450.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, *61*(2), 69-90. doi: 10.3322/caac.20107
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, *293*(5532), 1074-1080. doi: 10.1126/science.1063127
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, *128*(4), 683-692. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.029
- Jones, R. S., & Gelbart, W. M. (1993). The *Drosophila* Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol Cell Biol*, *13*(10), 6357-6366.

- Kamangar, F., Dores, G. M., & Anderson, W. F. (2006). Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*, *24*(14), 2137-2150. doi: 10.1200/JCO.2005.05.2308
- Keen, J. C., Yan, L., Mack, K. M., Pettit, C., Smith, D., Sharma, D., & Davidson, N. E. (2003). A novel histone deacetylase inhibitor, scriptaid, enhances expression of functional estrogen receptor alpha (ER) in ER negative human breast cancer cells in combination with 5-aza 2'-deoxycytidine. *Breast Cancer Res Treat*, *81*(3), 177-186. doi: 10.1023/A:1026146524737
- Kim, H., Heo, K., Kim, J. H., Kim, K., Choi, J., & An, W. (2009). Requirement of histone methyltransferase SMYD3 for estrogen receptor-mediated transcription. *J Biol Chem*, *284*(30), 19867-19877. doi: 10.1074/jbc.M109.021485
- Kleer, C. G., Cao, Q., Varambally, S., Shen, R., Ota, I., Tomlins, S. A., . . . Chinnaiyan, A. M. (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(20), 11606-11611. doi: 10.1073/pnas.1933744100
- Klein, E. A., & Assoian, R. K. (2008). Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci*, *121*(Pt 23), 3853-3857. doi: 10.1242/jcs.039131
- Konecny, G., Pauletti, G., Pegram, M., Untch, M., Dandekar, S., Aguilar, Z., . . . Slamon, D. J. (2003). Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, *95*(2), 142-153.
- Kunizaki, M., Hamamoto, R., Silva, F. P., Yamaguchi, K., Nagayasu, T., Shibuya, M., . . . Furukawa, Y. (2007). The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3. *Cancer Res*, *67*(22), 10759-10765. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1132
- Lambrou, G. I., Zaravinos, A., Adamaki, M., Spandidos, D. A., Tzortzatou-Stathopoulou, F., & Vlachopoulos, S. (2012). Pathway simulations in common oncogenic drivers of leukemic and rhabdomyosarcoma cells: a systems biology approach. *Int J Oncol*, *40*(5), 1365-1390. doi: 10.3892/ijo.2012.1361
- Laskowski, R. A. (2001). PDBsum: summaries and analyses of PDB structures. *Nucleic Acids Res*, *29*(1), 221-222.
- Latinkic, B. V., Zeremski, M., & Lau, L. F. (1996). Elk-1 can recruit SRF to form a ternary complex upon the serum response element. *Nucleic Acids Res*, *24*(7), 1345-1351.
- Lehmann, L., Jiang, L., & Wagner, J. (2008). Soy isoflavones decrease the catechol-O-methyltransferase-mediated inactivation of 4-hydroxyestradiol in cultured MCF-7 cells. *Carcinogenesis*, *29*(2), 363-370. doi: 10.1093/carcin/bgm235
- Levy, D., Kuo, A. J., Chang, Y., Schaefer, U., Kitson, C., Cheung, P., . . . Gozani, O. (2011). Lysine methylation of the NF-kappaB subunit RelA by SETD6 couples activity of the histone methyltransferase GLP at chromatin to tonic repression of NF-kappaB signaling. *Nat Immunol*, *12*(1), 29-36. doi: 10.1038/ni.1968
- Li, C. M., Guo, M., Salas, M., Schupf, N., Silverman, W., Zigman, W. B., . . . Tycko, B. (2006). Cell type-specific over-expression of chromosome 21 genes in fibroblasts and fetal hearts with trisomy 21. *BMC Med Genet*, *7*, 24. doi: 10.1186/1471-2350-7-24

- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., 3rd, de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., . . . Richardson, D. C. (2003). Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins*, 50(3), 437-450. doi: 10.1002/prot.10286
- Lu, Z., Tian, Y., Salwen, H. R., Chlenski, A., Godley, L. A., Raj, J. U., & Yang, Q. (2013). Histone-lysine methyltransferase EHMT2 is involved in proliferation, apoptosis, cell invasion, and DNA methylation of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs*, 24(5), 484-493. doi: 10.1097/CAD.0b013e32835ffdbb
- Luo, X. G., Zou, J. N., Wang, S. Z., Zhang, T. C., & Xi, T. (2010). Novobiocin decreases SMYD3 expression and inhibits the migration of MDA-MB-231 human breast cancer cells. *IUBMB Life*, 62(3), 194-199. doi: 10.1002/iub.288
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*, 1(3), 222-231. doi: 10.1038/35106065
- Marcel, V., Catez, F., & Diaz, J. J. (2013). Ribosomes: the future of targeted therapies? *Oncotarget*, 4(10), 1554-1555.
- Marcel, V., Ghayad, S. E., Belin, S., Therizols, G., Morel, A. P., Solano-Gonzalez, E., . . . Diaz, J. J. (2013). p53 acts as a safeguard of translational control by regulating fibrillarin and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell*, 24(3), 318-330. doi: 10.1016/j.ccr.2013.08.013
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., . . . Gwadz, M. (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic acids research*, 37(suppl 1), D205-D210.
- Marmorstein, R. (2003). Structure of SET domain proteins: a new twist on histone methylation. *Trends Biochem Sci*, 28(2), 59-62. doi: 10.1016/S0968-0004(03)00007-0
- Marti-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sanchez, R., Melo, F., & Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29, 291-325. doi: 10.1146/annurev.biophys.29.1.291
- Martin, J. L., & McMillan, F. M. (2002). SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr Opin Struct Biol*, 12(6), 783-793.
- Massague, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432(7015), 298-306. doi: 10.1038/nature03094
- Mininno, M., Brugiére, S., Pautre, V., Gilgen, A., Ma, S., Ferro, M., . . . Ravel, S. (2012). Characterization of chloroplastic fructose 1,6-bisphosphate aldolases as lysine-methylated proteins in plants. *J Biol Chem*, 287(25), 21034-21044. doi: 10.1074/jbc.M112.359976
- Mittar, S., Ulyatt, C., Howell, G. J., Bruns, A. F., Zachary, I., Walker, J. H., & Ponnambalam, S. (2009). VEGFR1 receptor tyrosine kinase localization to the Golgi apparatus is calcium-dependent. *Exp Cell Res*, 315(5), 877-889. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.12.020
- Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G., & Thornton, J. M. (1992). Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins*, 12(4), 345-364. doi: 10.1002/prot.340120407

- Mortensen, R., Chestnut, J. D., Hoeffler, J. P., & Kingston, R. E. (2001). Selection of transfected mammalian cells. *Curr Protoc Neurosci, Chapter 4, Unit 4 6*. doi: 10.1002/0471142301.ns0406s00
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods, 65*(1), 55-63.
- Munro, S., Khaire, N., Inche, A., Carr, S., & La Thangue, N. B. (2010). Lysine methylation regulates the pRb tumour suppressor protein. *Oncogene, 29*(16), 2357-2367. doi: 10.1038/onc.2009.511
- Musgrove, E. A. (2006). Cyclins: roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth Factors, 24*(1), 13-19. doi: 10.1080/08977190500361812
- Nayeem, A., Sitkoff, D., & Krystek, S., Jr. (2006). A comparative study of available software for high-accuracy homology modeling: from sequence alignments to structural models. *Protein Sci, 15*(4), 808-824. doi: 10.1110/ps.051892906
- Neganova, I., & Lako, M. (2008). G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. *J Anat, 213*(1), 30-44. doi: 10.1111/j.1469-7580.2008.00931.x
- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., . . . Perou, C. M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res, 10*(16), 5367-5374. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0220
- Nimura, K., Ura, K., & Kaneda, Y. (2010). Histone methyltransferases: regulation of transcription and contribution to human disease. *J Mol Med (Berl), 88*(12), 1213-1220. doi: 10.1007/s00109-010-0668-4
- Opitz, J. M., & Gilbert-Barness, E. F. (1990). Reflections on the pathogenesis of Down syndrome. *Am J Med Genet Suppl, 7*, 38-51.
- Ordog, R. (2008). PyDeT, a PyMOL plug-in for visualizing geometric concepts around proteins. *Bioinformation, 2*(8), 346-347.
- Ottaviano, Y. L., Issa, J. P., Parl, F. F., Smith, H. S., Baylin, S. B., & Davidson, N. E. (1994). Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res, 54*(10), 2552-2555.
- Ozdag, H., Teschendorff, A. E., Ahmed, A. A., Hyland, S. J., Blenkiron, C., Bobrow, L., . . . Caldas, C. (2006). Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *BMC Genomics, 7*, 90. doi: 10.1186/1471-2164-7-90
- Pasini, D., Bracken, A. P., Agger, K., Christensen, J., Hansen, K., Cloos, P. A., & Helin, K. (2008). Regulation of stem cell differentiation by histone methyltransferases and demethylases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 73*, 253-263. doi: 10.1101/sqb.2008.73.009
- Pei, J., & Grishin, N. V. (2007). PROMALS: towards accurate multiple sequence alignments of distantly related proteins. *Bioinformatics, 23*(7), 802-808.
- Petrossian, T. C., & Clarke, S. G. (2011). Uncovering the human methyltransferasome. *Mol Cell Proteomics, 10*(1), M110 000976. doi: 10.1074/mcp.M110.000976
- Porras-Yakushi, T. R., Whitelegge, J. P., & Clarke, S. (2007). Yeast ribosomal/cytochrome c SET domain methyltransferase subfamily: identification of Rpl23ab methylation sites and recognition motifs. *J Biol Chem, 282*(17), 12368-12376. doi: 10.1074/jbc.M611896200

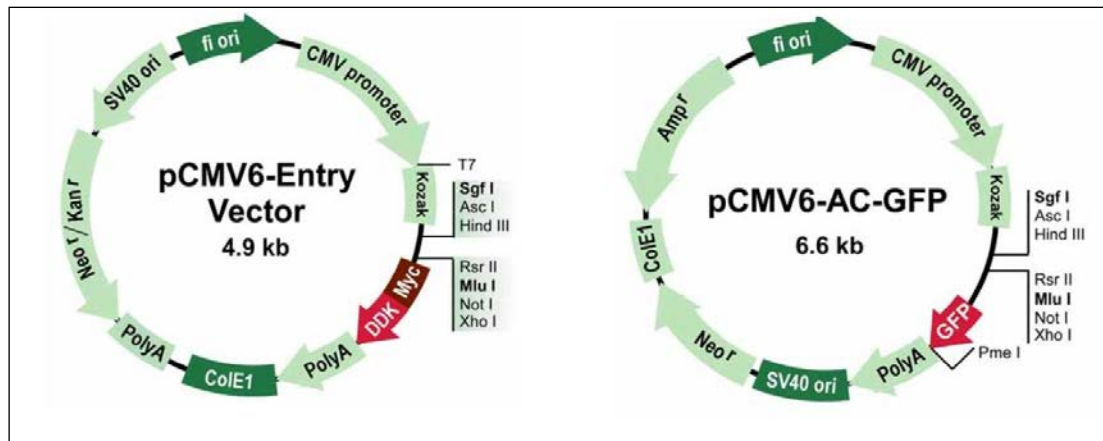
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, *111*(2), 229-233.
- Qian, C., & Zhou, M. M. (2006). SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cell Mol Life Sci*, *63*(23), 2755-2763. doi: 10.1007/s00018-006-6274-5
- Radpour, R., Berekati, Z., Kohler, C., Lv, Q., Burki, N., Diesch, C., . . . Zhong, X. Y. (2011). Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. *PLoS One*, *6*(1), e16080. doi: 10.1371/journal.pone.0016080
- Raff, M. C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, *356*(6368), 397-400. doi: 10.1038/356397a0
- Ren, T. N., Wang, J. S., He, Y. M., Xu, C. L., Wang, S. Z., & Xi, T. (2011). Effects of SMYD3 over-expression on cell cycle acceleration and cell proliferation in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Med Oncol*, *28 Suppl 1*, S91-98. doi: 10.1007/s12032-010-9718-6
- Reymond, A., Friedli, M., Henrichsen, C. N., Chapot, F., Deutsch, S., Ucla, C., . . . Antonarakis, S. E. (2001). From PREDs and open reading frames to cDNA isolation: revisiting the human chromosome 21 transcription map. *Genomics*, *78*(1-2), 46-54. doi: 10.1006/geno.2001.6640
- Reynolds, P. A., Sigaroudinia, M., Zardo, G., Wilson, M. B., Benton, G. M., Miller, C. J., . . . Tlsty, T. D. (2006). Tumor suppressor p16INK4A regulates polycomb-mediated DNA hypermethylation in human mammary epithelial cells. *J Biol Chem*, *281*(34), 24790-24802. doi: 10.1074/jbc.M604175200
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*, *1*(3), 1458-1461.
- Richter, J. D., & Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature*, *433*(7025), 477-480. doi: 10.1038/nature03205
- Rimerman, R. A., Gellert-Randleman, A., & Diehl, J. A. (2000). Wnt1 and MEK1 cooperate to promote cyclin D1 accumulation and cellular transformation. *J Biol Chem*, *275*(19), 14736-14742.
- Rocco, J. W., & Sidransky, D. (2001). p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res*, *264*(1), 42-55. doi: 10.1006/excr.2000.5149
- Salemi, M., Barone, C., Romano, C., Zolezzi, F., Romano, C., Scavuzzo, C., . . . Bosco, P. (2012). Gene expression profiling and qRT-PCR expression of RRP1B, PCNT, KIF21A and ADRB2 in leucocytes of Down's syndrome subjects. *J Genet*, *91*(1), e18-23.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology*, *24*, 104-108.
- Sassone-Corsi, P., Ransone, L. J., Lamph, W. W., & Verma, I. M. (1988). Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature*, *336*(6200), 692-695.
- Schapiro, M. (2011). Structural Chemistry of Human SET Domain Protein Methyltransferases. *Curr Chem Genomics*, *5*(Suppl 1), 85-94. doi: 10.2174/1875397301005010085
- Scherer, N., & Basso, D. (2008). DNATagger, colors for codons. *Genet Mol Res*, *7*, 853-860.

- Schubert, H. L., Blumenthal, R. M., & Cheng, X. (2003). Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem Sci*, 28(6), 329-335. doi: 10.1016/S0968-0004(03)00090-2
- Shapiro, B. L. (1983). Down syndrome--a disruption of homeostasis. *Am J Med Genet*, 14(2), 241-269. doi: 10.1002/ajmg.1320140206
- Sherr, C. J. (1995). Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc Assoc Am Physicians*, 107(2), 181-186.
- Shi, X., Kachirskaia, I., Yamaguchi, H., West, L. E., Wen, H., Wang, E. W., . . . Gozani, O. (2007). Modulation of p53 function by SET8-mediated methylation at lysine 382. *Mol Cell*, 27(4), 636-646. doi: 10.1016/j.molcel.2007.07.012
- Shirato, H., Ogawa, S., Nakajima, K., Inagawa, M., Kojima, M., Tachibana, M., . . . Takeuchi, T. (2009). A jumonji (Jarid2) protein complex represses cyclin D1 expression by methylation of histone H3-K9. *J Biol Chem*, 284(2), 733-739. doi: 10.1074/jbc.M804994200
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., & Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(10), 5522-5527.
- Simon, J. A., & Lange, C. A. (2008). Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res*, 647(1-2), 21-29. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2008.07.010
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., . . . et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244(4905), 707-712.
- Speirs, V., White, M. C., & Green, A. R. (1996). Collagenase III: a superior enzyme for complete disaggregation and improved viability of normal and malignant human breast tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 32(2), 72-74.
- Stassen, M. J., Bailey, D., Nelson, S., Chinwalla, V., & Harte, P. J. (1995). The Drosophila trithorax proteins contain a novel variant of the nuclear receptor type DNA binding domain and an ancient conserved motif found in other chromosomal proteins. *Mech Dev*, 52(2-3), 209-223.
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28(6), 1102, 1104.
- Su, I. H., Dobenecker, M. W., Dickinson, E., Oser, M., Basavaraj, A., Marqueron, R., . . . Tarakhovskiy, A. (2005). Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell*, 121(3), 425-436. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.029
- Subramanian, K., Jia, D., Kapoor-Vazirani, P., Powell, D. R., Collins, R. E., Sharma, D., . . . Vertino, P. M. (2008). Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Mol Cell*, 30(3), 336-347. doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.022
- Sundaram, S., Johnson, A. R., & Makowski, L. (2013). Obesity, metabolism and the microenvironment: Links to cancer. *J Carcinog*, 12, 19. doi: 10.4103/1477-3163.119606
- Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Jiang, X., Chen, W., Lee, P. L., . . . Yu, Q. (2007). Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev*, 21(9), 1050-1063. doi: 10.1101/gad.1524107

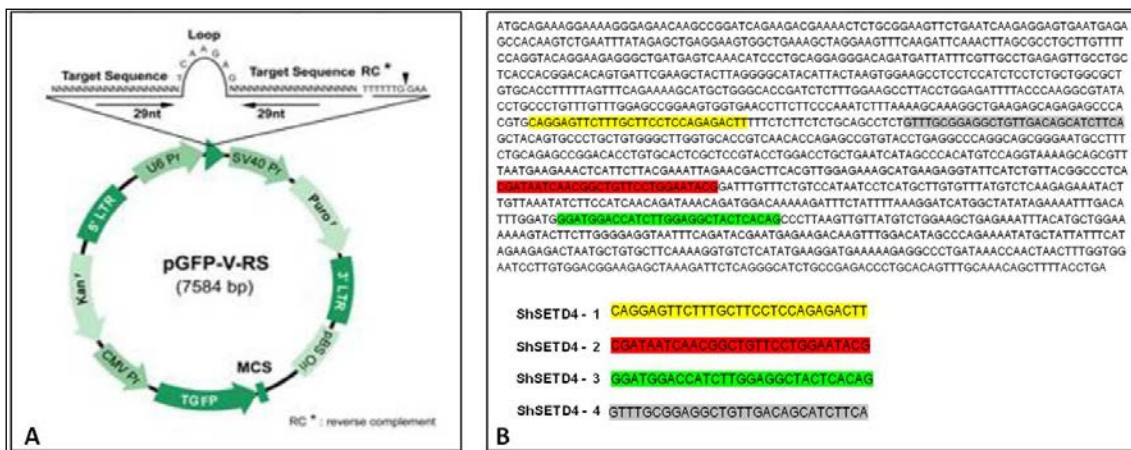
- Tatton-Brown, K., Douglas, J., Coleman, K., Baujat, G., Cole, T. R., Das, S., . . . Childhood Overgrowth, C. (2005). Genotype-phenotype associations in Sotos syndrome: an analysis of 266 individuals with NSD1 aberrations. *Am J Hum Genet*, *77*(2), 193-204. doi: 10.1086/432082
- Taylor, W. R., Xiao, B., Gamblin, S. J., & Lin, K. (2003). A knot or not a knot? SETting the record 'straight' on proteins. *Comput Biol Chem*, *27*(1), 11-15.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, *22*(22), 4673-4680.
- Toyokawa, G., Cho, H. S., Iwai, Y., Yoshimatsu, M., Takawa, M., Hayami, S., . . . Hamamoto, R. (2011). The histone demethylase JMJD2B plays an essential role in human carcinogenesis through positive regulation of cyclin-dependent kinase 6. *Cancer Prev Res (Phila)*, *4*(12), 2051-2061. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0290
- Trievel, R. C., Beach, B. M., Dirk, L. M., Houtz, R. L., & Hurley, J. H. (2002). Structure and catalytic mechanism of a SET domain protein methyltransferase. *Cell*, *111*(1), 91-103.
- Trievel, R. C., Flynn, E. M., Houtz, R. L., & Hurley, J. H. (2003). Mechanism of multiple lysine methylation by the SET domain enzyme Rubisco LSM1. *Nat Struct Biol*, *10*(7), 545-552. doi: 10.1038/nsb946
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., & Reuter, G. (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO J*, *13*(16), 3822-3831.
- Varela-Rey, M., Woodhoo, A., Martinez-Chantar, M. L., Mato, J. M., & Lu, S. C. (2013). Alcohol, DNA methylation, and cancer. *Alcohol Res*, *35*(1), 25-35.
- Wang, G. G., Cai, L., Pasillas, M. P., & Kamps, M. P. (2007). NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. *Nat Cell Biol*, *9*(7), 804-812. doi: 10.1038/ncb1608
- Warnatz, H.-J., Querfurth, R., Guerasimova, A., Cheng, X., Haas, S. A., Hufton, A. L., . . . Vingron, M. (2010). Functional analysis and identification of cis-regulatory elements of human chromosome 21 gene promoters. *Nucleic acids research*, *38*(18), 6112-6123.
- Wei, X., Henke, V. G., Strubing, C., Brown, E. B., & Clapham, D. E. (2003). Real-time imaging of nuclear permeation by EGFP in single intact cells. *Biophys J*, *84*(2 Pt 1), 1317-1327. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74947-9
- Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res*, *35*(Web Server issue), W407-410. doi: 10.1093/nar/gkm290
- Wilson, J. R., Jing, C., Walker, P. A., Martin, S. R., Howell, S. A., Blackburn, G. M., . . . Xiao, B. (2002). Crystal structure and functional analysis of the histone methyltransferase SET7/9. *Cell*, *111*(1), 105-115.
- Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J., . . . Langer, A. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*, *131*(1), 18-43.

- Won, K. A., Xiong, Y., Beach, D., & Gilman, M. Z. (1992). Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(20), 9910-9914.
- WRCF. <http://www.wcrf.org/>.
- Yamamoto, K., Ishida, T., Nakano, K., Yamagishi, M., Yamochi, T., Tanaka, Y., . . . Watanabe, T. (2011). SMYD3 interacts with HTLV-1 Tax and regulates subcellular localization of Tax. *Cancer Sci*, *102*(1), 260-266. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01752.x
- Yang, L., Mei, Q., Zielinska-Kwiatkowska, A., Matsui, Y., Blackburn, M. L., Benedetti, D., . . . Chansky, H. A. (2003). An ERG (ets-related gene)-associated histone methyltransferase interacts with histone deacetylases 1/2 and transcription co-repressors mSin3A/B. *Biochem J*, *369*(Pt 3), 651-657. doi: 10.1042/BJ20020854
- Yang, X., Phillips, D. L., Ferguson, A. T., Nelson, W. G., Herman, J. G., & Davidson, N. E. (2001). Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)-alpha by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER-alpha-negative breast cancer cells. *Cancer Res*, *61*(19), 7025-7029.
- Yang, X. D., Huang, B., Li, M., Lamb, A., Kelleher, N. L., & Chen, L. F. (2009). Negative regulation of NF-kappaB action by Set9-mediated lysine methylation of the RelA subunit. *EMBO J*, *28*(8), 1055-1066. doi: 10.1038/emboj.2009.55
- Zhang, X., Tamaru, H., Khan, S. I., Horton, J. R., Keefe, L. J., Selker, E. U., & Cheng, X. (2002). Structure of the Neurospora SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase. *Cell*, *111*(1), 117-127.
- Zhang, X., Wen, H., & Shi, X. (2012). Lysine methylation: beyond histones. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, *44*(1), 14-27. doi: 10.1093/abbs/gmr100
- Zhang, Y., Luoh, S. M., Hon, L. S., Baertsch, R., Wood, W. I., & Zhang, Z. (2007). GeneHub-GEPIS: digital expression profiling for normal and cancer tissues based on an integrated gene database. *Nucleic Acids Res*, *35*(Web Server issue), W152-158. doi: 10.1093/nar/gkm381
- Zhou, Q., Atadja, P., & Davidson, N. E. (2007). Histone deacetylase inhibitor LBH589 reactivates silenced estrogen receptor alpha (ER) gene expression without loss of DNA hypermethylation. *Cancer Biol Ther*, *6*(1), 64-69.

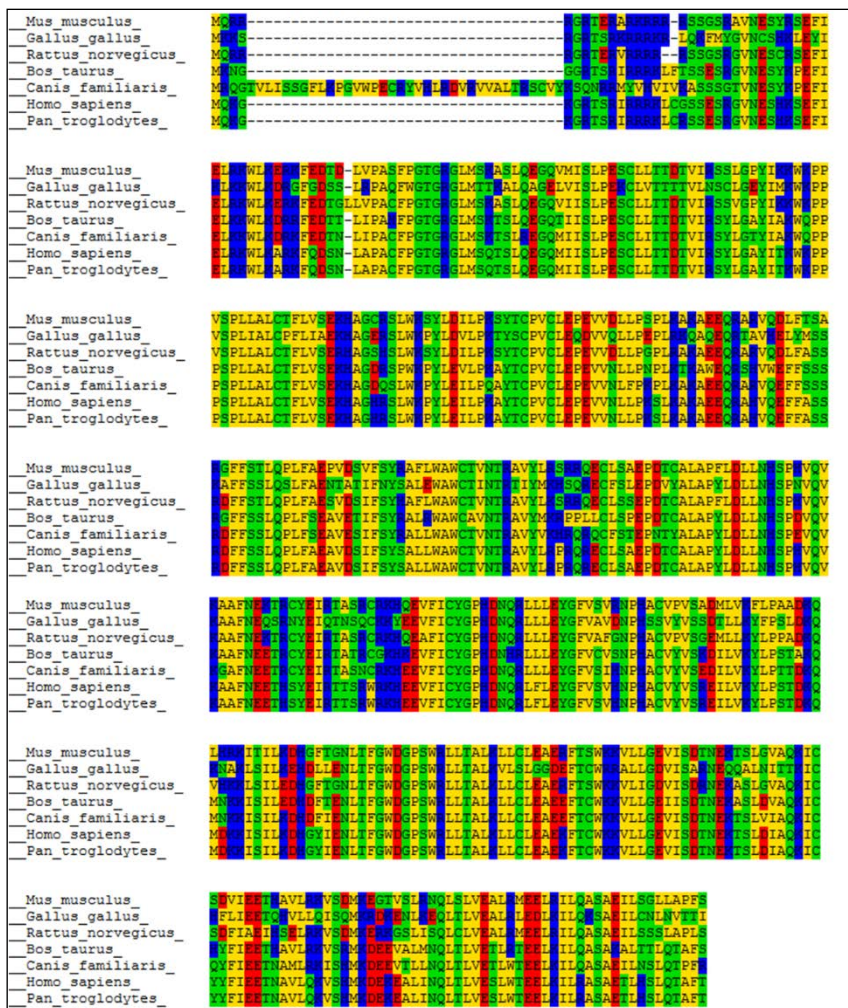
8.ANEXOS A



Anexo 1. Mapas dos vetores pCMV6-Entry e pCMV6-AC-GFP. Mapas dos vetores pertencentes ao sistema comercializados pela Origene. As enzimas de restrição da clonagem nestas construções estão em negrito [Sgf I (5') e Mlu I (3')].



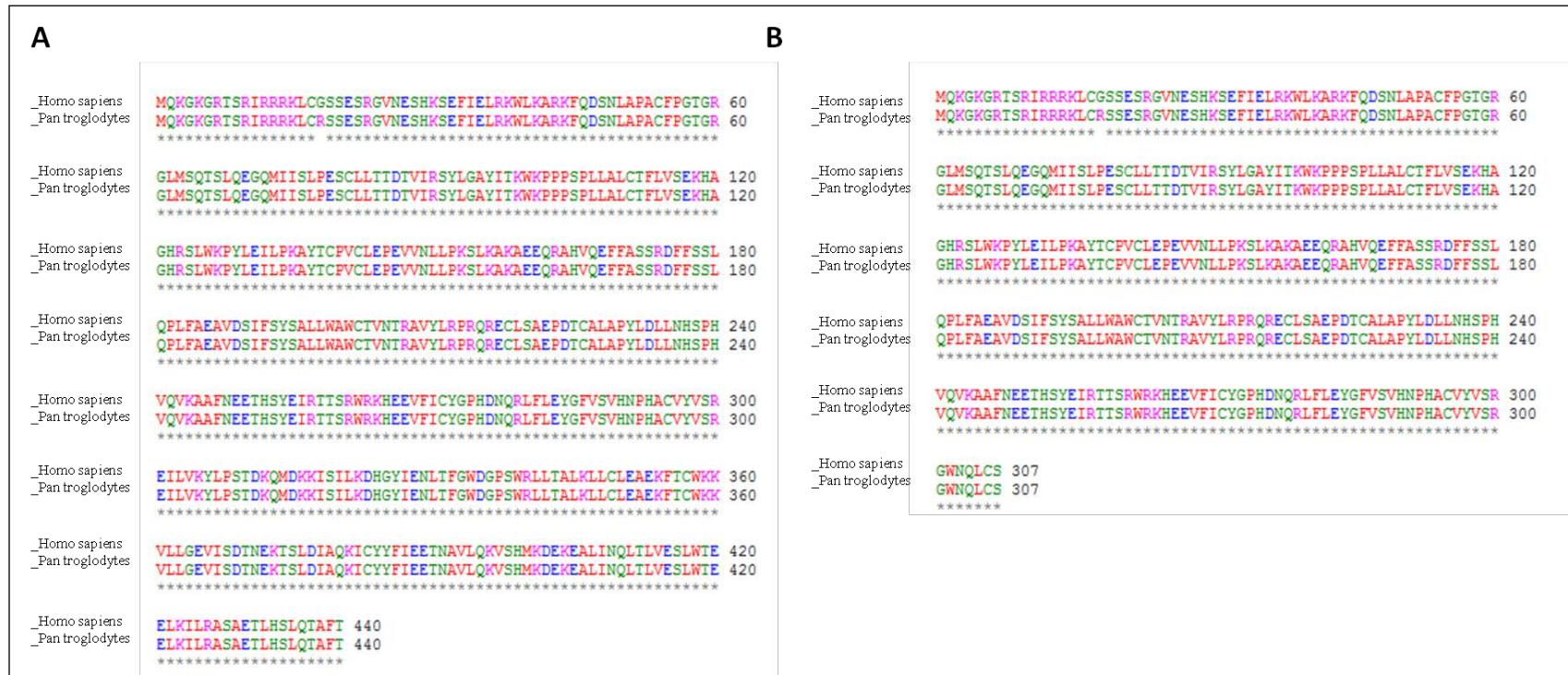
Anexo 2. Construção para knockdown específico de SETD4. (A) O vetor pGFP-V-RS possui as sequências senso e antiseno separadas por uma região loop conservada. Este vetor possui os genes de resistência para a seleção bacteriana (canamicina) e eucariótica (puromicina) dos transformantes. (B) Localização correspondente no mRNA SETD4 dos 4 oligonucleotídeos clonados no vetor (ShSETD4 1 a 4).



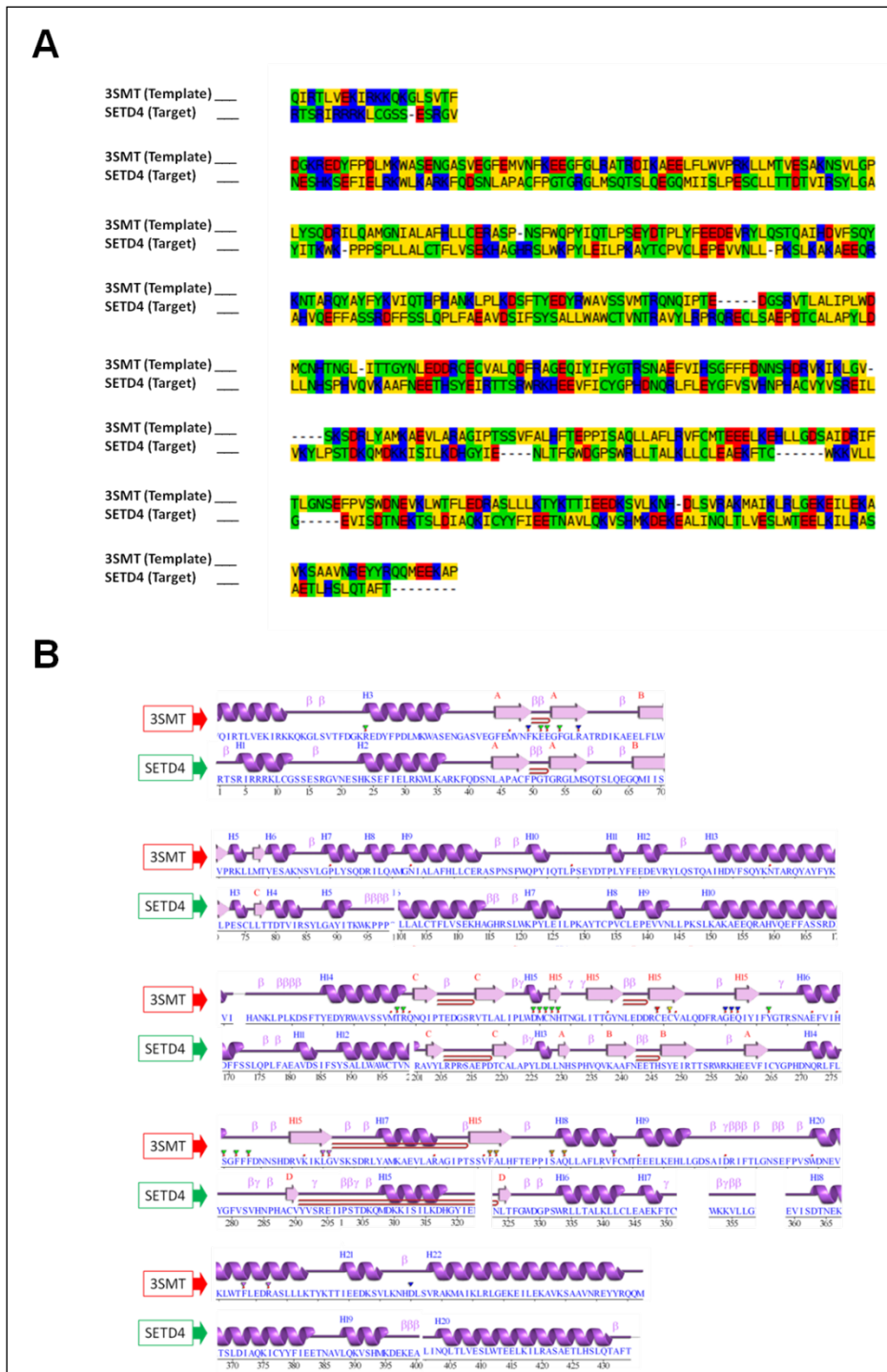
Anexo 3. Alinhamento das proteínas SETD4 de diferentes organismos. As seqüências de SETD4 de camundongo (*Mus musculus*), galinha (*Gallus gallus*), rato (*Rattus norvegicus*), boi (*Bos taurus*), cachorro (*Canis familiaris*), seres humanos (*Homo sapiens*), e chimpanzé (*Pan troglodytes*) depositadas no banco de dados do NCBI, foram alinhadas utilizando o programa Clustal W e analisados com o programa DNATagger. Os resíduos de aminoácidos de caráter ácidos estão em vermelho, os básicos em azul, os polares neutros em verde e os apolares em amarelo.

2	ATCCAGAAAGAAAAGGAGAACACCCGATCAGAGACGAAACTCTCGGAAATTC 60	2	GTITGTTTGGAGCGGAGTGGTGAACCTTCTCCCAATCTTTAAAGCAAAGGCTGA 460	2	TTCTGGAAACGGATTGTGTTCTGTCCATAATCTCATCTGTGTGTTATGTCTCAAG 900
4	ATCCAGAAAGAAAAGGAGAACACCCGATCAGAGACGAAACTCTCGGAAATTC 60	4	GTITGTTTGGAGCGGAGTGGTGAACCTTCTCCCAATCTTTAAAGCAAAGGCTGA 408	4	TTCTGGAAACGGATTGTGTTCTGTCCATAATCTCATCTGTGTGTTATGTCTCAAG 828
1	ATCCAGAAAGAAAAGGAGAACACCCGATCAGAGACGAAACTCTCGGAAATTC 60	1	GTITGTTTGGAGCGGAGTGGTGAACCTTCTCCCAATCTTTAAAGCAAAGGCTGA 460	1	TTCTGGAAACGGATTGTGTTCTGTCCATAATCTCATCTGTGTGTTATGTCTCAAG 900
3	ATCCAGAAAGAAAAGGAGAACACCCGATCAGAGACGAAACTCTCGGAAATTC 60	3	GTITGTTTGGAGCGGAGTGGTGAACCTTCTCCCAATCTTTAAAGCAAAGGCTGA 408	3	TTCTGGAAACGGATTGTGTTCTGTCCATAATCTCATCTGTGTGTTATGTCTCAAG 828
2	GAATCAAGAGAGTGAATGAGGCCAAGTCTGAATTTATAGAGCTGAGGAAAGTGGCTG 120	2	GAGCAGAGAGCCACGTCAGAGATTTCTTCTCTCTCCAGAGCTTTTTCTCTCTCTG 540	2	G-----GTTGG-----ATCAC-----TTTGT 919
4	GAATCAAGAGAGTGAATGAGGCCAAGTCTGAATTTATAGAGCTGAGGAAAGTGGCTG 48	4	GAGCAGAGAGCCACGTCAGAGATTTCTTCTCTCTCCAGAGCTTTTTCTCTCTCTG 468	4	G-----GTTGG-----ATCAC-----TTTGT 847
1	GAATCAAGAGAGTGAATGAGGCCAAGTCTGAATTTATAGAGCTGAGGAAAGTGGCTG 120	1	GAGCAGAGAGCCACGTCAGAGATTTCTTCTCTCTCCAGAGCTTTTTCTCTCTCTG 540	1	GAATACCTGTAAATATCTCCATCAACAGATAAACAGATGGACAAAAGATTCTATT 960
3	GAATCAAGAGAGTGAATGAGGCCAAGTCTGAATTTATAGAGCTGAGGAAAGTGGCTG 48	3	GAGCAGAGAGCCACGTCAGAGATTTCTTCTCTCTCCAGAGCTTTTTCTCTCTCTG 468	3	GAATACCTGTAAATATCTCCATCAACAGATAAACAGATGGACAAAAGATTCTATT 888
2	AAAGCTAGGAGTTCAGATTCAGACTTAACTAGCCCTCTGTTTCCAGGTACAGGAGGA 180	2	CAGCCCTGTTTGGAGGCTGTGACAGCATCTTCACTACAGTGCCTCTCTCTCTCTG 600	2	CTTAA----- 924
4	AAAGCTAGGAGTTCAGATTCAGACTTAACTAGCCCTCTGTTTCCAGGTACAGGAGGA 108	4	CAGCCCTGTTTGGAGGCTGTGACAGCATCTTCACTACAGTGCCTCTCTCTCTCTG 528	4	CTTAA----- 852
1	AAAGCTAGGAGTTCAGATTCAGACTTAACTAGCCCTCTGTTTCCAGGTACAGGAGGA 180	1	CAGCCCTGTTTGGAGGCTGTGACAGCATCTTCACTACAGTGCCTCTCTCTCTCTG 600	1	TTAAGGATCATGGCTATAGAAAATTGACATTTGGATGGATGGACCTCTGGAGG 1020
3	AAAGCTAGGAGTTCAGATTCAGACTTAACTAGCCCTCTGTTTCCAGGTACAGGAGGA 108	3	CAGCCCTGTTTGGAGGCTGTGACAGCATCTTCACTACAGTGCCTCTCTCTCTCTG 528	3	TTAAGGATCATGGCTATAGAAAATTGACATTTGGATGGATGGACCTCTGGAGG 948
2	GGGCTGATGATCAAACTCCCTGAGGAGGAGCAGATGATTAATTTGTTGCTGAGAGT 240	2	TGGTCCACCTCAACACAGAGCCGTTACTTGGAGCCAGGCGAGGAAATGCTTTCT 660	2	----- 1080
4	GGGCTGATGATCAAACTCCCTGAGGAGGAGCAGATGATTAATTTGTTGCTGAGAGT 168	4	TGGTCCACCTCAACACAGAGCCGTTACTTGGAGCCAGGCGAGGAAATGCTTTCT 588	4	CTACTCACGCCCTTAAGTGTATGTCTGGAGCTGGAAATTTACATCTGGAAAAAA 1080
1	GGGCTGATGATCAAACTCCCTGAGGAGGAGCAGATGATTAATTTGTTGCTGAGAGT 240	1	TGGTCCACCTCAACACAGAGCCGTTACTTGGAGCCAGGCGAGGAAATGCTTTCT 660	1	CTACTCACGCCCTTAAGTGTATGTCTGGAGCTGGAAATTTACATCTGGAAAAAA 1080
3	GGGCTGATGATCAAACTCCCTGAGGAGGAGCAGATGATTAATTTGTTGCTGAGAGT 168	3	TGGTCCACCTCAACACAGAGCCGTTACTTGGAGCCAGGCGAGGAAATGCTTTCT 588	3	----- 1080
2	TGCTGCTCACCAAGGACAGTGTATGAGACTTAAAGGACAGATTAAGTGG 300	2	GCGAGCCGGACACTGTGCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 720	2	----- 1140
4	TGCTGCTCACCAAGGACAGTGTATGAGACTTAAAGGACAGATTAAGTGG 228	4	GCGAGCCGGACACTGTGCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 648	4	GTACTTCTGGGAGGTAATTCAGATCAAGTGGAGACAGTTTGGACATAGCCAG 1140
1	TGCTGCTCACCAAGGACAGTGTATGAGACTTAAAGGACAGATTAAGTGG 300	1	GCGAGCCGGACACTGTGCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 720	1	GTACTTCTGGGAGGTAATTCAGATCAAGTGGAGACAGTTTGGACATAGCCAG 1068
3	TGCTGCTCACCAAGGACAGTGTATGAGACTTAAAGGACAGATTAAGTGG 228	3	GCGAGCCGGACACTGTGCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 648	3	----- 1068
2	AAGCTCTCCATCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 360	2	GTCCAGTAAAGCAGGCTTTAATGAGAACTCATCTTACGAAATTAGAGACTTCA 780	2	----- 1200
4	AAGCTCTCCATCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 288	4	GTCCAGTAAAGCAGGCTTTAATGAGAACTCATCTTACGAAATTAGAGACTTCA 708	4	AAAAATGCTATTATTCATAGAAAGGACTAATGCTGTGCTTCAAAAAGTGTCTCATATG 1200
1	AAGCTCTCCATCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 360	1	GTCCAGTAAAGCAGGCTTTAATGAGAACTCATCTTACGAAATTAGAGACTTCA 780	1	AAAAATGCTATTATTCATAGAAAGGACTAATGCTGTGCTTCAAAAAGTGTCTCATATG 1128
3	AAGCTCTCCATCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 288	3	GTCCAGTAAAGCAGGCTTTAATGAGAACTCATCTTACGAAATTAGAGACTTCA 708	3	----- 1128
2	GGGACCGATCTTTTGGAGGCTTAACTGGAGATTTTACCAGGCGTATACCTGCGCT 420	2	CGTTGGAGAAACATGAGAGGTAATCACTGTTAGCGGCTCAGGATAATCAACGGGTG 840	2	----- 1320
4	GGGACCGATCTTTTGGAGGCTTAACTGGAGATTTTACCAGGCGTATACCTGCGCT 348	4	CGTTGGAGAAACATGAGAGGTAATCACTGTTAGCGGCTCAGGATAATCAACGGGTG 768	4	GGACTAAGATTCTCAGGGCATCTGCGAGACCTTCCAGATTTGCAAAAGCTTTTACC 1320
1	GGGACCGATCTTTTGGAGGCTTAACTGGAGATTTTACCAGGCGTATACCTGCGCT 420	1	CGTTGGAGAAACATGAGAGGTAATCACTGTTAGCGGCTCAGGATAATCAACGGGTG 840	1	GGACTAAGATTCTCAGGGCATCTGCGAGACCTTCCAGATTTGCAAAAGCTTTTACC 1248
3	GGGACCGATCTTTTGGAGGCTTAACTGGAGATTTTACCAGGCGTATACCTGCGCT 348	3	CGTTGGAGAAACATGAGAGGTAATCACTGTTAGCGGCTCAGGATAATCAACGGGTG 768	3	----- 1248
2	-----	2	-----	2	-----
4	-----	4	-----	4	---
1	-----	1	-----	1	TGA 1323
3	-----	3	-----	3	TGA 1251

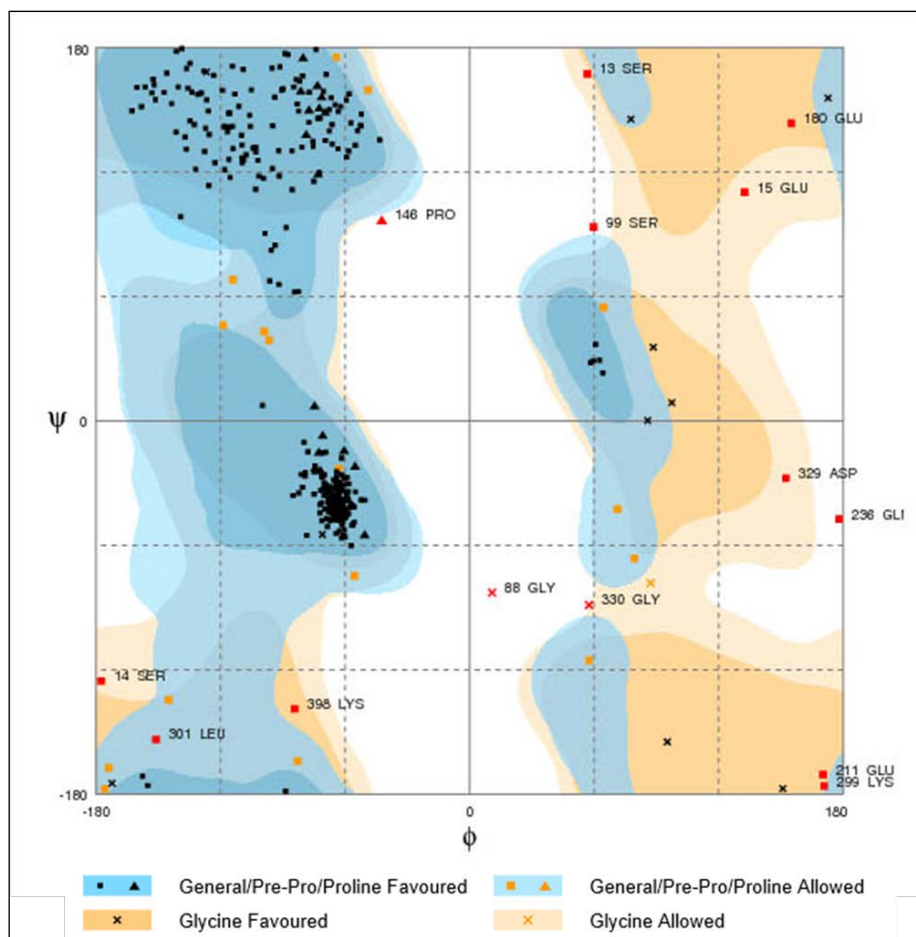
Anexo 4. Alinhamento das 4 variantes transcricionais humanas do gene *SETD4*. As seqüências das variantes 1 (1323 nts), 2 (924 nts), 3 (1251 nts) e 4 (825 nts), depositadas no banco de dados do NCBI, foram alinhadas utilizando o programa Clustal W.



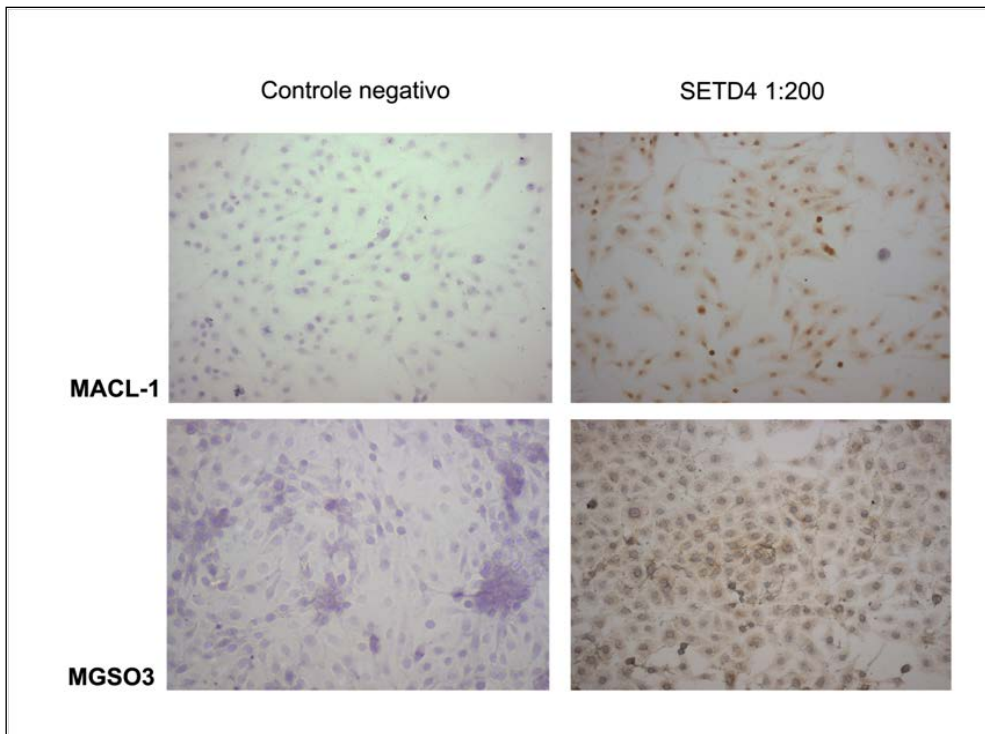
Anexo 5. Alinhamento das isoformas de SETD4 humana e de chimpanzé. (A) As sequências protéicas das isoformas longas (440 aa), e (B) das isoformas mais curtas (307 aa) presentes em humanos e chimpanzés foram alinhadas utilizando o programa Clustal W. Os resíduos de aminoácidos de caráter ácidos estão em azul, os básicos em rosa, os polares neutros em verde e os apolares em vermelho.



Anexo 6. Alinhamento das sequências primárias e das estruturas secundárias do molde (3SMT/SETD3) e da proteína SETD4. (A) Alinhamento das sequências proteicas do molde e modelo utilizando os programas Promlas3D e DNATagger. **(B)** Alinhamento das estruturas secundárias da proteína SETD4 e SETD3(3SMT) obtidas no PDBSum.



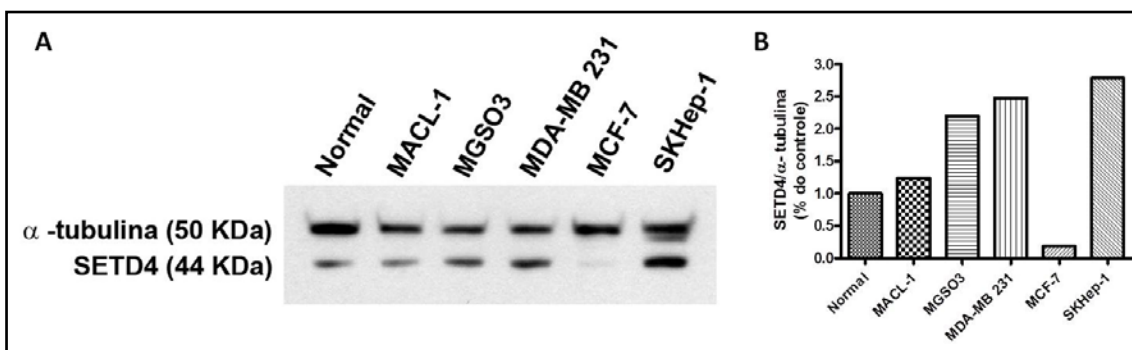
Anexo 7. Diagrama de Ramachandran do modelo da proteína SETD4. Os plots para os dados dos resíduos de glicina (cor laranja), e os demais (cor azul) estão combinados mostrando as regiões favoráveis (cores escuras), as permitidas (cores claras) e as desfavoráveis (em branco).



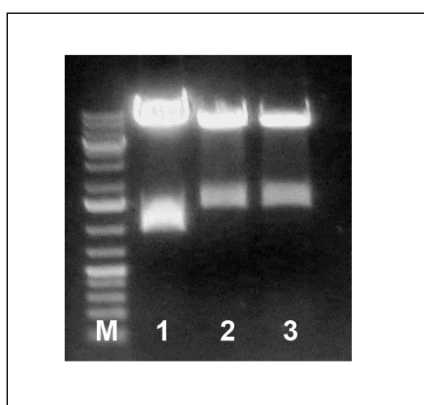
Anexo 8. Imunocitoquímica das linhagens celulares MACL-1 e MGSO3. Após a fixação, as células foram incubadas somente com a solução diluente Tris-HCl 20mM (controle negativo), ou com o anticorpo SETD4 na solução diluente. A revelação procedeu-se com a aplicação do substrato da peroxidase, o DAB (3,3- diaminobenzidina), e o núcleo corado com hematoxilina. Aumento:20X.

NI	Conteúdo tumoral	Seio	Idade	Gradação histopatológica	Estádios	Quimioterapia	Her2	RE	RP
002	80%	Esquerdo	64	Intermediaria	ypT4pN1M0	Sim	-	-	-
004	100%	Esquerdo	58	Alta	T3N2aM0	Sim	-	-	-
036	80%	Esquerdo	56	Alta	T2N1aM0	Sim	-	-	-
005	80%	Direito	60	Baixa	T2N1 M0	Sim	baixa	+	+
014	100%	Direito	61	Alta	T2N0 M0	Sim	baixa	+	+
019	80%	Esquerdo	54	Intermediaria	T4dN3 M0	Sim	baixa	+	+

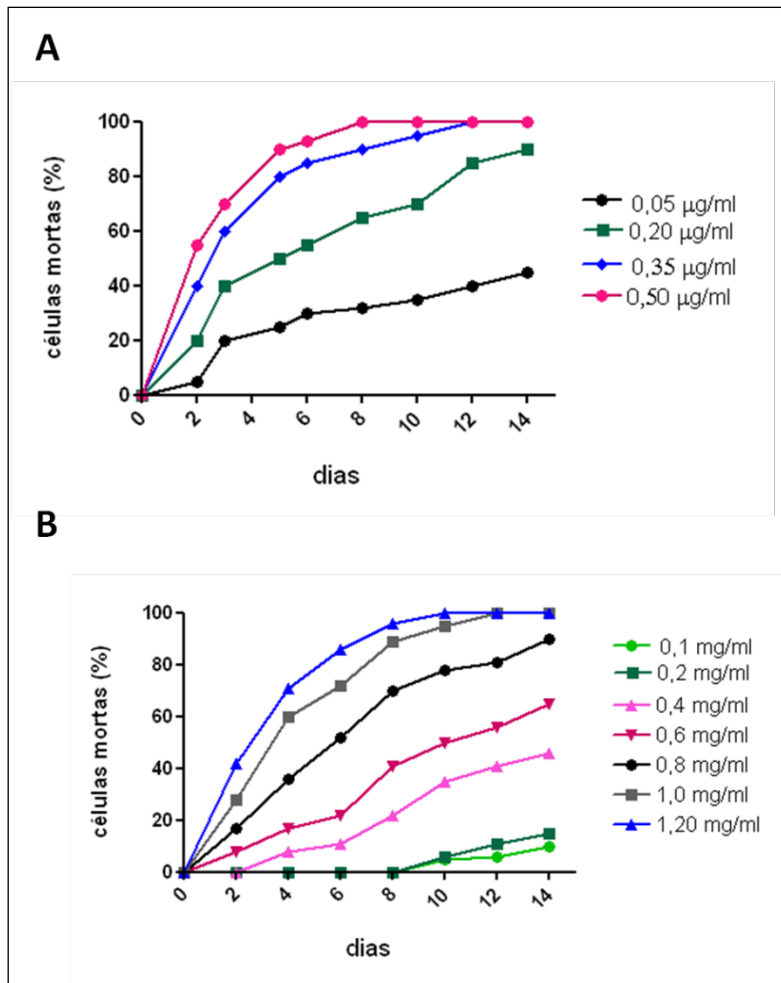
Anexo 9. Características clínicas e histopatológicas das amostras de tumores primários de mama. A identificação do tecido tumoral foi baseado no exame histopatológico, sendo todos os tipos de câncer de mama incluídos. As amostras foram selecionadas baseadas no conteúdo tumoral determinado por análise patológica (mínimo de 80% das amostras composta de tumores). Adicionalmente, foi realizada a coleta de amostras de tecido normal dos mesmos paciente. A expressão dos marcadores foi avaliada por imunohistoquímica. Todos os casos representam carcinoma ductal *in situ*. NI: numero de identificação da amostra; HER2: receptor do fator de crescimento epidermal 2; RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona.



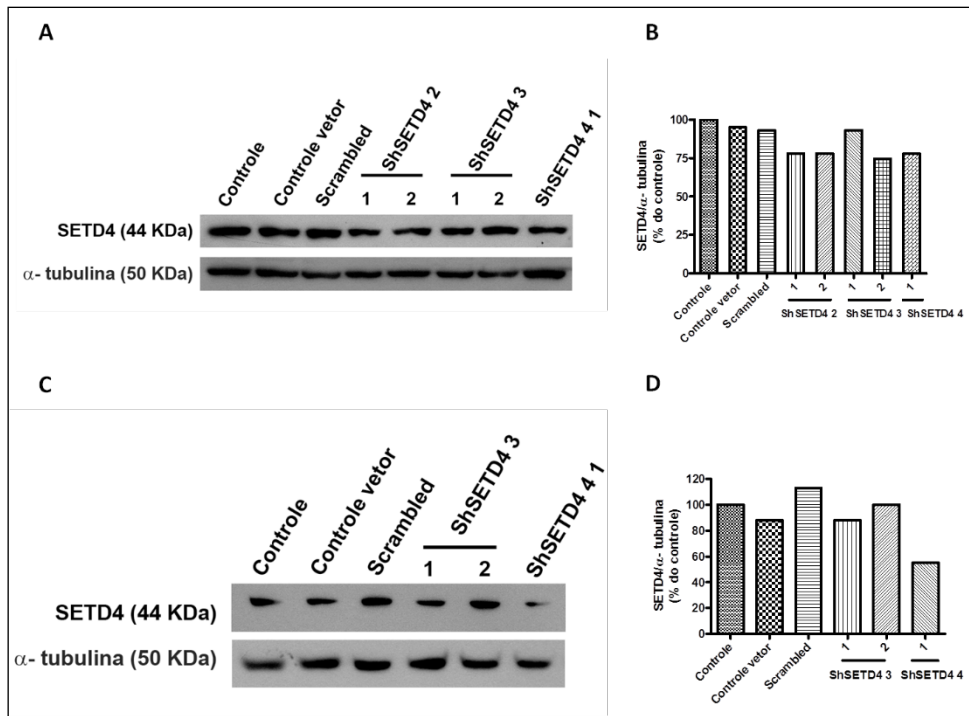
Anexo 10. Expressão de SETD4 na fração não nuclear. (A) Western blot das proteínas da fração não nuclear das linhagens de tumor de mama (MDA-MB 231, MACL-1, MGSO3, MCF-7) e tumor de fígado SKHep-1. 30 μ g de proteínas foram aplicados e a membrana incubada com anticorpos anti-SETD4 e anti- α -tubulina. (B) A expressão de SETD4 foi normalizada com a proteína α -tubulina usando o software ImageJ.



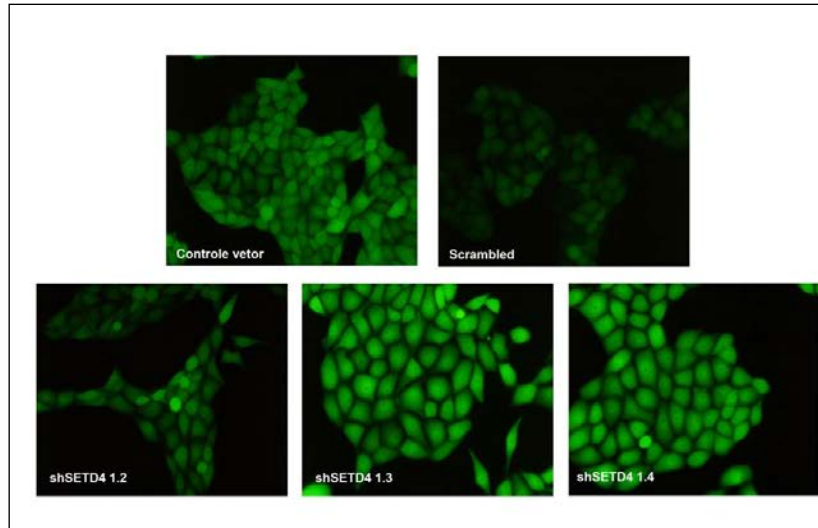
Anexo 11. Subclonagem da sequência SETD4V1 e SETD4V2 no vetor pCMV6-AC-GFP. (A) Análise eletroforética, em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo da reação de digestão enzimática do vetor pCMV6-AC-GFP, contendo as sequências SETD4V2 (1) e sequências SETD4V1 (2 e 3) clonadas. Os DNAs plasmidiais foram digeridos com as enzimas AsiSI(SgI) e MluI. M: marcador de peso molecular 1Kb.



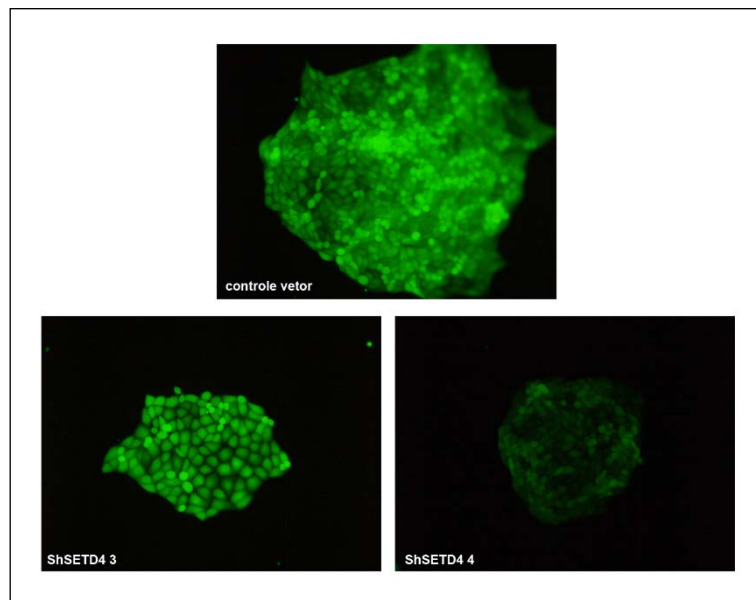
Anexo 12. Curva de morte das células MDA-MB 231 em resposta as drogas de seleção. (A) As células foram testadas para várias concentrações de puromicina e a porcentagem de morte celular foi avaliada. (B) Cinética de morte das células na presença de diferentes concentrações de G418.



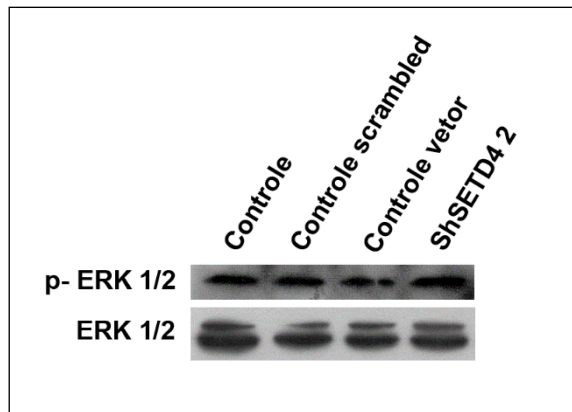
Anexo 13 Análise da expressão de SETD4 nos clones estáveis. Western blot dos extratos protéicos de células MDA-MB 231 não transfectadas e diferentes células transformadas com vetor vazio (controle vetor), vetor *scrambled* (*Scrambled*) e com as seqüências ShSETD4 2 a 4. Um total de 30 μ g de proteínas foi aplicado e a membrana incubada com anticorpos anti-SETD4 e anti- α -tubulina. A expressão de SETD4 foi normalizada com α -tubulina e expressa em relação ao controle (**B** e **D**). Foram avaliados: 2 clones independentes ShSETD4 2, 4 clones ShSETD4 3 e 2 clone ShSETD4 4 (**A** e **C**).



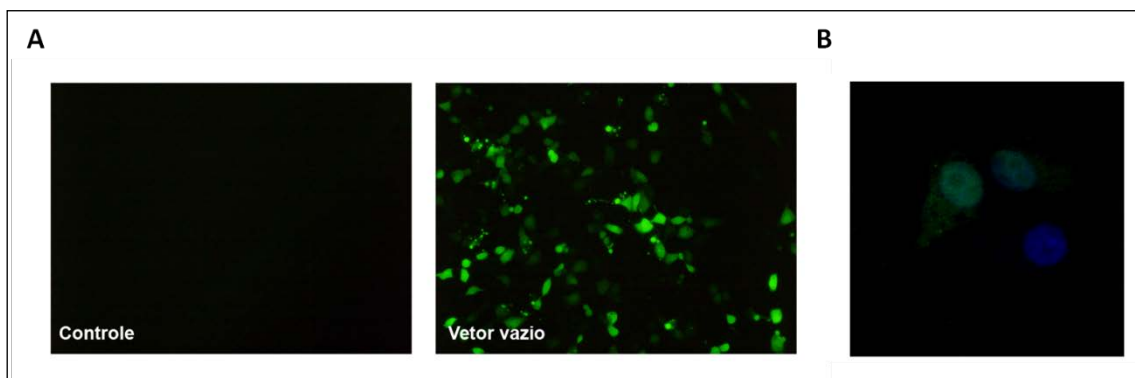
Anexo 14. Imagem das células estáveis. Os clones obtidos na seleção apresentam expressão constitutiva da proteína GFP. Controle vetor: célula transformada com o vetor vazio; *Scrambled*: clone estável expressando shRNA para a sequência *scrambled*; 3 clones independentes expressando ShSETD4 1. Imagens obtidas no microscópio de fluorescência usando objetiva 20X.



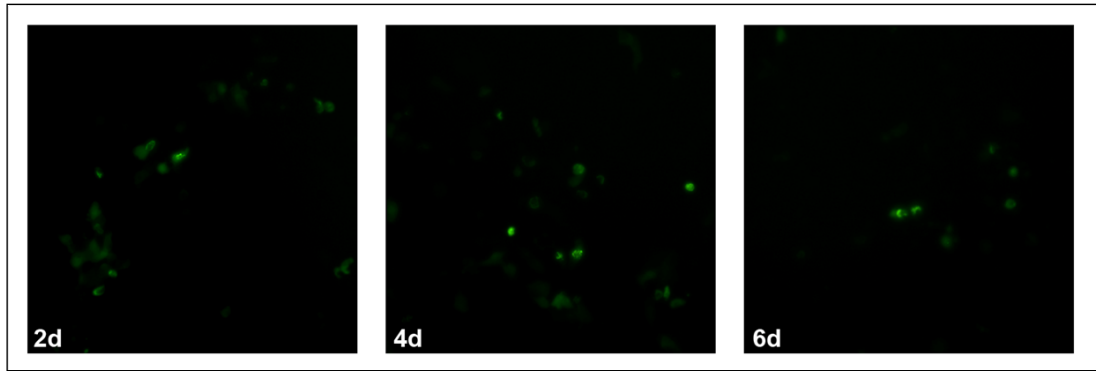
Anexo 15. A redução de SETD4 diminui o número de células nas colônias formadas a partir de uma única célula. Células transformadas com o vetor controle e as células *knockdown* ShSETD4 3 e 4 cultivadas por 10 dias formando uma colônia. Imagens obtidas no microscópio de fluorescência usando a objetiva 10X.



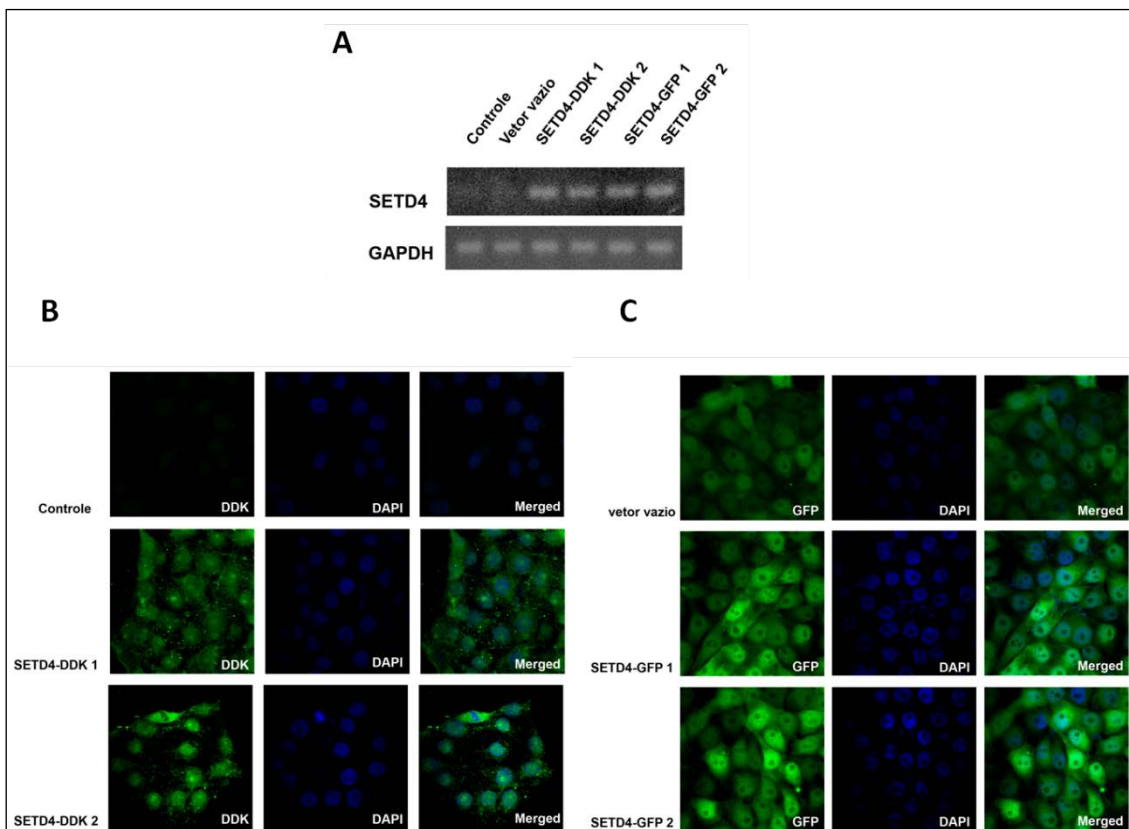
Anexo 16. A ativação de ERK não é alterada com a redução de SETD4. Western blot dos extratos protéicos de células MDA-MB 231 não transfectadas (controle), controle vetor, vetor *scrambled* e o clone ShSETD4 2. Foram utilizados os anticorpos anti-ERK 1/2 fosforilado (painel superior) e anti-ERK 1/2 total (painel inferior).



Anexo 17. Localização da proteína GFP expressa pelo vetor vazio. (A) Expressão transiente da proteína verde fluorescente nas células MDA-MB 231 documentada por microscopia de fluorescência com objetiva 10X. (B) Microscopia confocal das células MDA-MB 231 expressando a proteína GFP. O núcleo é marcado com iodeto de propídeo (azul).



Anexo 18. Perfil temporal das células MCF-7 expressando SETD4-GFP. Imagens após 2, 4 e 6 dias da transfecção com a construção expressando SETD4 fusionada à proteína verde fluorescente. Imagens obtidas no microscópio de fluorescência usando objetiva 10X.



Anexo 19. Confirmação dos clones superexpressando SETD4 (A) Análise RT-PCR semiquantitativa das células controle (MDA-MB231 não transformada), transformada com o vetor vazio (vetor vazio) e clones estáveis superexpressando SETD4 (SETD4-DDK 1 e 2; SETD4-GFP 1 e 2). A amplificação da sequência que codifica GAPDH foi usado como controle interno (B). Imunofluorescência dos clones transformados com a construção que expressa SETD4 fusionada às etiquetas MYC/DDK. Incubação com o anticorpo que reconhece DDK, e em seguida a marcação com anticorpos secundários conjugados com Alexa 488 (verde). A marcação nuclear foi realizada com DAPI (azul). (C) Clones estáveis expressando SETD4 fusionado à proteína GFP.

9.ANEXOS B

- **Certificado CETEA**
- **Parecer COEP**
- **Faria, J.A.Q.A.**; Corrêa, N.C.; De Andrade, C.; Campos, A.C.; Almeida, R.S.S.; Rodrigues, T.S.; Goes, A.M.; Silva, F.P.; Gomes, D.A. SET domain-containing Protein 4 (SETD4) is a Newly Identified Cytosolic and Nuclear Lysine Methyltransferase involved in Breast Cancer Cell Proliferation.. *Journal of Cancer Science & Therapy*, v. 5, p. 58-65, 2013. <http://omicsonline.org/1948-5956/JCST-05-058.php?aid=11029>
- Corrêa, N.C.; Kuasne, H.; **Faria, J.A.Q.A.**; Seixas, C.C.; Santos, I.G.; Abreu, F.B.; Nonogaki, S.; Rocha, R.M.; Silva, G.P.B.; Gobbi, H.; Rogatto, S.R.; Goes, A.M.; Gomes, D.A. Genomic and phenotypic profiles of two Brazilian breast cancer cell lines derived from primary human tumors.. *Oncology Reports* v. 29, p. 1299-1307, 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3621816/>
- Melo, C.S.B; **Faria, J.A.Q.A.**; Corrêa, N.C.; De Andrade, C.; Carvalho, J.L.; Goes, A.M.; Rodrigues, M.A.; Gomes, D.A. Cytoplasmic-targeted parvalbumin blocks the proliferation of multipotent mesenchymal stromal cells in prophase. *Stem cell research & therapy*, v. 4, p. 92, 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3854775/>
- **FARIA, J.A.Q.A** ; Melo, C.S.; Campos, A.C.; Rodrigues, M.A.; Gomes, D.A. Indicadores de Cálcio. In: Em: Resende, R.R.; Leite, M.F.; Guatimosim, S. (Org.). *Sinalização de Cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares*. 1ed.São Paulo. : Sarvier. 2012.v. 1, p. 26-41. (Capítulo de livro).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 239/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Papel do cálcio nuclear e citosólico na proliferação celular de células tronco mesenquimais**", que tem como responsável(is) **Dawidson Assis Gomes**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **1/ 12/2010**.

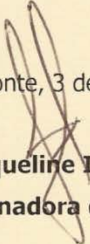
Este certificado expira-se em **1/ 12/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 239/2010**, related to the project entitled "**Role of nuclear and cytosolic calcium in cell proliferation of mesenchymal stem cell**", under the supervisors of **Dawidson Assis Gomes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 1, 2010**.

This certificate expires in **December 1, 2015**.

Belo Horizonte, 3 de Dezembro de 2010.


Prof.ª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**


Parecer nº. ETIC 0312.0.203.000-10

**Interessado(a): Prof. Alfredo Miranda de Goes
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 24 de novembro de 2010, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Análise da expressão gênica diferencial em linhagens de câncer de mama resistentes à radiação gama**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**



SET domain-containing Protein 4 (SETD4) is a Newly Identified Cytosolic and Nuclear Lysine Methyltransferase involved in Breast Cancer Cell Proliferation

Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria¹, Natássia Caroline Resende Corrêa¹, Carolina de Andrade¹, Ana Carolina de Angellis Campos¹, Rubens dos Santos Samuel de Almeida², Thiago Souza Rodrigues³, Alfredo Miranda de Góes¹, Dawlison Assis Gomes^{1*} and Fábio Pittella Silva^{2#}

¹Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

²Laboratory of Molecular Pathology of cancer, Faculty of Health Sciences, University of Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil

³Computer department, Federal Center of Technological Education of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

*These authors contributed equally to this work.

Abstract

Cancer is comprised of a multitude of epigenetic abnormalities, including the global loss and regional gain of DNA methylation as well as alterations in histone methylation. Here, we characterize a new methyltransferase, SET domain-containing protein 4 (SETD4), which is involved in breast carcinogenesis. Quantitative real-time PCR (qPCR) showed elevated expression levels of SETD4 in several breast cancer cell lines. SETD4 overexpression was confirmed by western blot analysis suggesting a correlation between high expression of SETD4 and a lack of the estrogen receptor (ER) in breast cancer. In addition, cell fractionation studies and confocal immunofluorescence revealed the nuclear and non-nuclear localization of this new protein. SETD4 knockdown in breast cancer cell lines significantly suppressed their proliferation and delayed the G1/S cell cycle transition without affecting apoptosis. Furthermore, western blot analysis showed that knockdown of SETD4 decreased cyclin D1 expression, revealing the involvement of SETD4 in cell cycle regulation. These data imply that SETD4 plays a crucial role in breast carcinogenesis and could be a novel molecular target for the development of new strategies for the diagnosis and treatment of breast cancer.

Introduction

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer and the leading cause of cancer death in women worldwide. An estimated 1.38 million women globally were diagnosed with breast cancer in 2008, accounting for nearly one-quarter of all cancers diagnosed in women [1]. Cancer can evolve from a combination of epigenetic and genetic abnormalities, resulting in deregulated gene expression and function [2].

Histone modification regulates chromatin structure as well as transcriptional activation and repression and includes acetylation, ribosylation, ubiquitylation, phosphorylation, sumoylation, and methylation. Histone modification occurs at selected residues that function in a combined or sequential fashion to dictate 'histone codes' that are closely linked to biological outcomes [3]. In breast cancer, abnormal histone modification in combination with DNA hypermethylation is frequently associated with the epigenetic silencing of tumor suppressor genes and genomic instability. Understanding the mechanisms of deregulation of histone tail post-translational modifications and their contribution to breast tumorigenesis is critically important for developing novel targeted therapies for breast cancer patients [4].

Histone lysine methylation has been shown to be catalyzed exclusively by the conserved SET domain family proteins. The exception to this rule is the DOT1 family, members of which are structurally unrelated to the SET domain proteins [5,6]. Recent data have revealed that SET domain-containing proteins can catalyze the lysine methylation of non-histone cellular proteins, such as p53, VEGFR, ERα and NF-κB [7].

Several lysine methyltransferases have shown altered expression in

many diseases, including cancer [8]. For instance, EZH2 and SMYD3 are overexpressed in various types of cancer, including breast cancer and have been closely linked to breast carcinogenesis through distinct mechanisms [9,10]. In the present paper, we report the characterization of SETD4, a human SET domain-containing protein that is overexpressed in human ER-negative breast cancer cells. Furthermore, SETD4 up-regulation is also associated with the proliferation of breast cancer cell line MDA-MB 231. Our data should yield new insights into breast carcinogenesis and could contribute to the development of novel approaches for breast cancer treatment.

Materials and Methods

Bioinformatics tools and comparative modeling

Analysis of functional domains was performed using the NCBI Conserved Domains and Pfam databases [11,12]. The 3D molecular models of SETD4 were built by comparative modeling. Human SET

*Corresponding author: Dawlison Assis Gomes, Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil; Tel: 55-31-34092631; E-mail: dawlison@icb.ufmg.br

Received December 14, 2012; Accepted January 18, 2013; Published January 21, 2013

Citation: Arantes Faria JAQ, Resende Corbá NC, de Andrade C, de Angellis Campos AC, de Almeida RDSS, et al. (2013) SET domain-containing Protein 4 (SETD4) is a Newly Identified Cytosolic and Nuclear Lysine Methyltransferase Involved in Breast Cancer Cell Proliferation. J Cancer Sci Ther 5: 058-065. doi:10.4172/1948-5956.1000185

Copyright: © 2013 Arantes Faria JAQ, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

domain-containing protein 3 (SETD3) from the PDB database (3SMT) was used as a template for modeling. Molecular models were generated using Modeller (version 9.7) [13], considering the presence of heteroatoms (SAM, S-adenosyl methionine) and loop refinement. One hundred candidate models were generated for each protein system, and each model was evaluated using stereochemical quality Ramachandran plots generated using Procheck (version 3.5.4) [14] and energy values according to Prosa (ProSa 2003) [15]. Visualization and manipulation of molecular images were performed using Pymol (version 1.2) [16].

Cell culture

HCC-1954-BL, HCC-1954, CAMA-1, SKBR-3, MCF-7, MDA-MB 231, MDA-MB 436 and MDA-MB 468 human cell lines were purchased from the American Type Cell Culture Collection (ATCC). Two primary breast cancer cell lines were used: MACL-1 and MGSO-3. These cell lines were established from fragments of breast tumors at our laboratory [17]. Primary cultures of normal human mammary epithelial cells were isolated from reduction mammoplasties, as previously described [18]. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cripion Biotechnology, Andradina, SP, Brazil) and penicillin/streptomycin (100 U/mL; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) at 37°C and 5% CO₂. MDA-MB 231 cells were transfected with shSETD4 (TG301750; OriGene, Rockville, MD, USA) using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Stable clones were selected using 800 µg/ml G418 (Sigma-Aldrich) for 14 days.

Tumor specimens

Sample collection was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brazil, based on resolution 196/96 of the National Health Council/Brazilian Ministry of Health, project number 025/09. Written informed consent was obtained from all participants. The samples were collected from surgically removed breast tissue from patients with breast cancer immediately after surgery at the University of Brasília Hospital. The clinical and histopathological characteristics of the patients are summarized in Table 1.

cDNA synthesis and qPCR analysis

Total RNA was extracted using TRIzol (Life Technologies) treated with RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA) and the synthesis of cDNA was performed with RevertAid™ H Minus M-MuLV RT (Fermentas, Waltham, MA, USA) using an oligo(dT) adapter primer. Gene expression was quantified using the comparative Ct (2^{-ΔΔCt}) method. RPS27a and β-actin were used as endogenous control genes for data normalization.

cDNA microarray

Double-strand cDNA from MACL-1, MGSO-3 and normal cells was synthesized using SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) and Human Gene Expression 12x135K array chip (Roche NimbleGen Inc., Madison WI, USA) was used. Data were normalized on software NimbleScan (Roche), as described by Bolstad and co-workers [19]. Gene information was generated using RMA algorithm [20]. Volcano plots were generated and only genes that displayed more than a twofold-change and p<0.05 on Student's t test were considered as differentially expressed [21].

Sample preparation and immunoblotting

Subcellular fractionation and immunoblots were performed as described previously [22,23]. Commercially available antibodies against SETD4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), lamin B1 (Abcam, Cambridge, MA, USA), α-tubulin (Sigma-Aldrich) and cyclins D1, D2 and D3 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) were used. Blots were visualized by enhanced chemiluminescence and quantitatively analyzed using Image software.

Immunofluorescence

Confocal immunofluorescence was performed as described [23]. The samples were incubated with a 1:200 dilution of rabbit polyclonal anti-human SETD4 (Santa Cruz Biotechnology). The nuclei were counterstained with 0.2 µg/mL Hoechst (Life Technologies). All confocal images were collected with a Zeiss LSM 510 or Zeiss 5 Live confocal microscope using a 63x, 1.4 NA objective lens with excitation

ID	Sample Malignancy	Breast	Age	Histological grade	Stage	Chemotherapy	c-erbB2	ER	PR
002	80%	Left	64	Intermediate	YPT4PN1M0	Yes	-	-	-
004	100%	Left	58	High	T3N2aM0	Yes	-	-	-
036	80%	Left	56	High	T2N1aM0	Yes	-	-	-
005	80%	Right	60	Low	T2N1 M0	No	low	+	+
014	100%	Right	61	High	T2N0 M0	No	low	+	+
019	80%	Left	54	Intermediate	T4N3 M0	Yes	low	+	+

Table 1: Clinical and histopathological characteristics of breast cancer samples.

The identification of tumor tissue from the removed sample was based on the histopathological examination, and all types of breast cancer were included. Samples were selected based on tumor content (minimally 80% tumor), as determined by microscopic pathological analysis. A sample of normal tissue was collected from each patient whenever possible. All cases represent ductal carcinoma in situ.

c-erbB2: HER2/neu Epidermal Growth Factor Receptor; ER: Estrogen Receptor; PR: Progesterone Receptor.

at 488 nm and observation at 505–550 nm to detect Alexa Fluor 488 staining and excitation at 405 nm and observation at 420–460 nm to detect Hoechst staining.

MTT assay

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Life Technologies) was used to determine cell viability [24]. After 72 h, cells were plated, 210 μ L of medium and 170 μ L MTT at 5 mg/mL were added to each well. The blue formazan crystals were dissolved in 210 μ L of a 10% SDS/HCl (Sigma-Aldrich) solution and the absorbance was read at 595 nm in a microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). The results are expressed as a percentage of the absorbance present in treated cells compared with control cells.

Clonogenic assay

Cell survival was measured using the colony formation assay. Briefly, 900 cells were seeded in 35-mm plates and incubated for 10 days, after which colonies were stained with a mixture of 6.0% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) and 0.5% crystal violet (Sigma-Aldrich) and then rinsed with water. Surviving fractions were normalized against the plating efficiency of non-transfected cells.

Cell cycle analysis

A total of 1×10^6 cells were lysed with 300 μ L of a hypotonic solution containing 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and 50 μ g/mL propidium iodide (Life Technologies). The cells were incubated at 4°C for 2 h and analyzed in a Guava EasyCyte 6L flow cytometer (Millipore, Billerica, MA, USA). Data were analyzed using FlowJo software (version 7.2.5).

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm Standard Deviation (SD) and compared using Tukey's test among groups after one-way ANOVA.

Results

The structure of human SETD4 is related to that of human SETD3

We predict that SETD4 is located at 21q22.13, which transcribes an mRNA of 3001 bp, corresponding to a 44-kDa protein containing 440 amino acids. The encoded protein has a SET domain at its N-terminus (59-273) and a Rubis-sub-bind domain at its C-terminus (307-425) (Figure 1A). The SET domain is a characteristic motif of enzymes that catalyze the addition of methyl groups to specific lysine residues in histone or non-histone proteins [5,8]. The Rubis-sub-bind domain, also referred to as the Rubisco LSM1 substrate-binding domain, permits the binding of the protein to a substrate, such as the N-terminal tails of histones and other targets [25]. The three-dimensional structure of human SET domain-containing protein 3 (PDB ID: 3SMT chain A, at 2.04 Å resolution) was used as a template for homology modeling. Our human SETD4 model was deposited in the Protein Model DataBase (PMDb) with the identification number PM0078503 (<http://mi.caspar.it/PMDB/>) (Figure 1B). SETD4 exhibited high stereochemical quality (92.8% of residues in the allowed regions of the Ramachandran plot) and a high probability to represent a native-like conformation (ProSa Z-score 8.07). Despite the low identity of the residues (24%), the secondary structure profiles of both proteins were highly similar and

the only structure discrepancy was found in the loop regions. The overlap of the template structure and our model are shown in Figure 1C.

The SET domain has a unique structural fold and differs from other classes of protein methyltransferases that also use the cofactor S-Adenosyl-L-Methionine (SAM) as the methyl donor cofactor. The proper positioning of SAM in the structure of SET proteins is critical to their catalysis [26]. Figure 1D shows 13 protein residues interacting with SAM, which are also conserved in our SETD4 model. The residues Asn236, His237 and Tyr272 (using SETD4 residue numbering) are invariant among the SET proteins and are in the correct position to play catalytic roles [26]. Consistent with the catalytic importance of these residues, mutation of any of these residues in SET proteins (in DIM-5 or SET7/9) dramatically reduces catalytic activity [26,27].

Overall, the molecular model obtained is highly informative because it includes alignment optimization, loop refinement, secondary structure predictions and SAM positioning.

SETD4 expression is elevated in ER-negative breast cancer

Quantitative PCR analysis was used to examine SETD4 mRNA expression in a panel of cells, including the non-tumorigenic line HCC-1954-BL and several breast cancer cells. As shown in Figure 2A, the expression of SETD4 was elevated in the HCC-1954, SKBR-3, MDA-MB 231 and MDA-MB 436 cell lines compared with the control HCC-1954-BL cell line, a lymphoblast cell line isolated from the same individual from who the HCC-1954 breast cancer cells were isolated ($p < 0.001$). A similar profile was observed when the relative expression of SETD4 was normalized to normal breast cells (Figure 2B). The MDA-MB 231 cells showed high levels of SETD4, while the MCF-7 cells did not show altered expression compared to the control ($p < 0.001$). To confirm this data, SETD4 protein expression was evaluated in normal cells and breast cancer cells by western blot analysis (Figure 2C). The MCF-7, MGSO-3 and MDA-MB 231 cells revealed high expression of the SETD4 protein, whereas the MCF-7 cells showed reduced expression. The microarray analysis data for the MCF-7 and MGSO-3 cells showed that SETD4 is up-regulated in these primary cell lines compared to normal cells (non-cancerous) (Table 2). Cell lines classified as ER-positive have been observed to show reduced expression of SETD4 (MCF-7 and CAMA-1). In contrast, cell lines with high expression of this protein are ER-negative (HCC-1954, MDA-MB 231

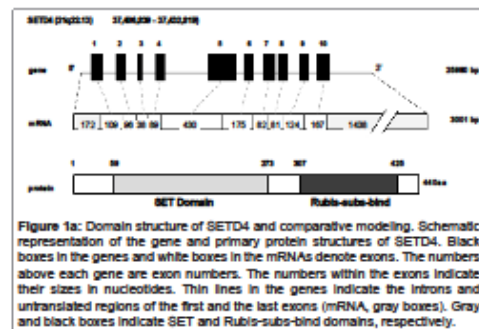


Figure 1a: Domain structure of SETD4 and comparative modeling. Schematic representation of the gene and primary protein structures of SETD4. Black boxes in the genes and white boxes in the mRNAs denote exons. The numbers above each gene are exon numbers. The numbers within the exons indicate their sizes in nucleotides. Thin lines in the genes indicate the introns and untranslated regions of the first and the last exons (mRNA, gray boxes). Gray and black boxes indicate SET and Rubis-sub-bind domains, respectively.

and MDA-MB 436) [28] as well as the primary cell lines MACL-1 and MGSO-3 [29]. To assess this correlation, we detected SETD4 protein expression in breast cancer tissues. Total extracts from six paired breast cancer tissues (T) and their corresponding non-tumorous tissues (N) were used in western blotting analyses (Table 1). In Figure 2D, tumors that were classified based on receptor markers showed similar SETD4 expression profiles. Data normalization revealed high expression of SETD4 in triple-negative tumors and no change in samples positive for ER, PR and HER2 ($p < 0.001$) (Figure 2E). Our preliminary data suggest a negative correlation between the overexpression of SETD4 and expression of the ER and more studies are necessary to validate this observation. Two different commercially available antibodies that we used to immunoblot SETD4 did not work for immunohistochemical staining.

SETD4 is localized in the nucleus and cytosol

Confocal immunofluorescence was performed to directly visualize the subcellular localization of SETD4 in MDA-MB-231 cells. Serial optical sections were collected for three-dimensional reconstruction. We observed a fine, wide and meshwork-like staining pattern of SETD4 in the cytoplasm and a punctate pattern of SETD4 in the nucleus (Figure 3A). To confirm these data, cell fractionation was performed



Figure 1b: 3D structure of the SETD4 protein showed the presence of the cofactor SAM (green) inside the structure. This model was deposited in the Protein Model Data Base (PMDB).

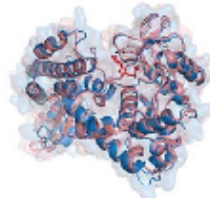


Figure 1c: Superposition of template and model structures reveals high similarity between SETD3 and SETD4. SAM is shown in red.

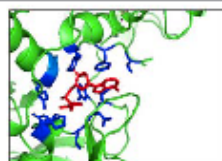


Figure 1d: Detailed view of the region of SETD4 that interacts with SAM. Conserved amino acid residues are shown in blue, and SAM is shown in red.

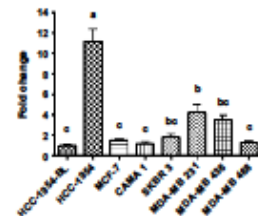


Figure 2a: SETD4 is overexpressed in ER-negative breast cancer. SETD4 mRNA expression was evaluated by qPCR. The SETD4 expression values for the HCC-1954, MCF-7, CAMA-1, SKBR-3, MDA-MB 231, MDA-MB 436 and MDA-MB 468 cells were normalized to that of the HCC-1954-BL control cells.

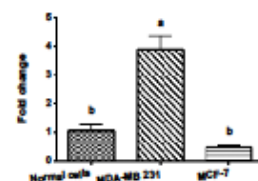


Figure 2b: The expression of SETD4 in MDA-MB 231 and MCF-7 cells was normalized relative to normal, non-cancerous cells. β -actin and RPLS27a were used as endogenous controls.

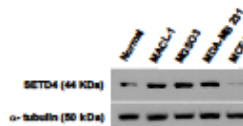


Figure 2c: Immunoblot analysis of total protein extracts of breast cancer cell lines. Densitometric analysis showed that SETD4 is up-regulated in MACL-1, MGSO-3, MDA-MB 231 cells (ER-negative) and down-regulated in MCF-7 cells (ER-positive).

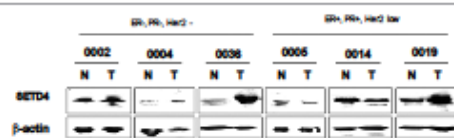


Figure 2d: Immunoblots were performed to quantify the expression of SETD4 in breast cancer tissues.

using MACL-1, MGSO-3 and MDA-MB 231 breast cancer cells, which have elevated SETD4 expression. Immunoblot analysis confirmed that SETD4 appears in both the nuclear and non-nuclear fractions (Figure 3B).

SETD4 plays an essential role in the growth regulation of breast cancer cells

To determine the significance of SETD4 in human carcinogenesis,

we examined whether SETD4 is involved in the growth regulation of cancer cells. After confirming the elevated expression of SETD4 in breast tumors and cell lines, we knocked down SETD4 expression in MDA-MB 231 cells using short-hairpin constructs. To investigate whether the elevated expression of SETD4 plays a crucial role in the proliferation of breast cancer cells, we tested four different shRNA constructs specific for SETD4 (OriGene, Rockville, MD, USA). Clones were established using G418 selection (Figure 4A). SETD4 knockdown significantly suppressed MTT metabolism in breast cancer cells (Figure 4B). Interestingly, suppression of SETD4 drastically reduced the colony formation of MDA-MB-231 breast cancer cells (Figures 4C and 4D). The decrease in proliferation was not due to cell death, as shown by the determination of sub-G1 DNA content (Figure 4E). We next evaluated the detailed cell cycle status of SETD4 knockdown cells and confirmed that the proportion of cancer cells in S phase was significantly decreased (Figure 4F). Concomitantly, the percentage of cancer cells in G1 phase was increased, indicating that SETD4 could be a critical factor in the regulation of the G1-S transition in cancer cells. We next investigated the effect of SETD4 knockdown on the relative expression of cell cycle regulators, such as the G1 phase-specific cyclin D. The SETD4 knockdown cells showed reduced cyclin D1 expression compared with cells transformed with vector. Conversely, the reduction in SETD4 did not affect the expression of cyclins D2 and D3 (Figures 4G and 4H).

Discussion

The human methyltransferase includes 208 known and putative members. To date, 30% of these proteins have been linked to disease

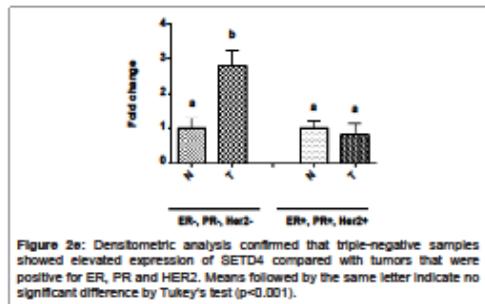


Figure 2: Densitometric analysis confirmed that triple-negative samples showed elevated expression of SETD4 compared with tumors that were positive for ER, PR and HER2. Means followed by the same letter indicate no significant difference by Tukey's test ($p < 0.001$).

Cell line	Fold change	p-value
MACL-1	9.5	4.01×10^{-6}
MGSO-3	3.43	0.025

Table 2: Gene expression level (fold change) of SETD4 in the MACL-1 and MGSO-3 cell lines compared to normal cells (non-cancerous), as assessed by cDNA microarray.

RNA samples from MACL-1, MGSO-3 and normal cells were extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands), following manufacturer's protocol and cleaned from DNase with RQ1 RNase-free DNase (Promega). Double-strand cDNA was synthesized using SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Life Technologies), according to manufacturer's directions and cDNA quality was then evaluated on BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Human Gene Expression 12x135K array chip (Roche NimbleGen Inc., Madison WI, USA) was used to assess gene expression profile with each cell line represented in triplicate. After Cy3 labeling, the cDNA was hybridized to the chip and slides were scanned at 532nm. Internal fluorescence was adjusted and sample tracking control was verified to exclude cross contamination between samples.

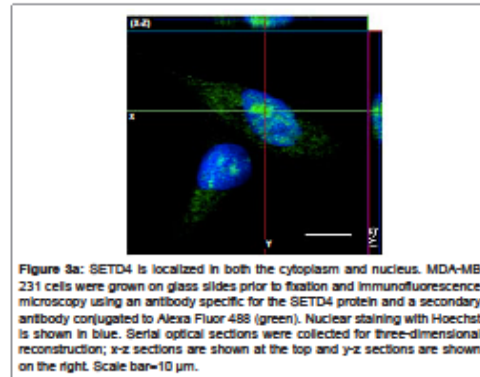


Figure 3a: SETD4 is localized in both the cytoplasm and nucleus. MDA-MB 231 cells were grown on glass slides prior to fixation and immunofluorescence microscopy using an antibody specific for the SETD4 protein and a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (green). Nuclear staining with Hoechst is shown in blue. Serial optical sections were collected for three-dimensional reconstruction; x-z sections are shown at the top and y-z sections are shown on the right. Scale bar=10 μ m.

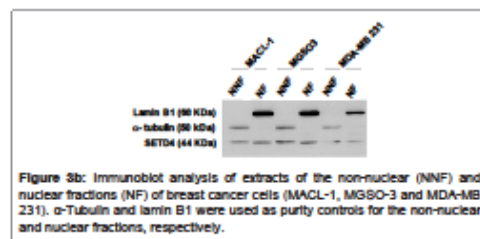


Figure 3b: Immunoblot analysis of extracts of the non-nuclear (NNF) and nuclear fractions (NF) of breast cancer cells (MACL-1, MGSO-3 and MDA-MB 231). α -Tubulin and lamin B1 were used as purity controls for the non-nuclear and nuclear fractions, respectively.

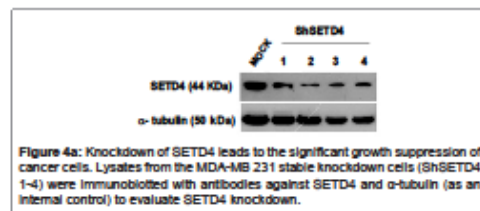


Figure 4a: Knockdown of SETD4 leads to the significant growth suppression of cancer cells. Lysates from the MDA-MB 231 stable knockdown cells (shSETD4 1-4) were immunoblotted with antibodies against SETD4 and α -tubulin (as an internal control) to evaluate SETD4 knockdown.

states, of which 22 SET proteins have been associated with cancer or other diseases in humans or mouse models [8,30]. The present study provides the first characterization of a novel lysine methyltransferase, SETD4, which is related to cancer. Given that there is no X-ray crystal or NMR structures available for SETD4; we developed a protein model by comparative modeling based on the SETD3 structure to understand the structure and function of the SETD4 protein. SETD3, SETD4 and SETD6 are grouped into methyltransferase class VII, which represents classical non-histone SET domain methyltransferases; proteins of this class are most similar to the plant Rubisco methyltransferase [30]. The comparative analysis of the 3D molecular models of SETD4 and SETD3 supports the hypothesis of SETD4 as a functional lysine methyltransferase. However, its specific substrates and modification sites remain to be disclosed.

The cellular fractionation and immunolocalization of SETD4 indicated a wide distribution of the protein in the cytosol and a punctual

localization in the nucleus (Figure 3). The regulatory role of protein methylation is not restricted to the histone code but is also linked to several other cellular processes [7], as this modification occurs in both cytosolic and nuclear proteins. EZH2 protein expression was observed primarily in the nucleus, and its expression was significantly increased in invasive carcinoma and breast cancer metastases [31]. EZH2 in the cytoplasm is involved in the regulation of receptor-induced actin polymerization, indicating a role for lysine methylation in the cytoplasm [32]. SMYD3 has a histone H3K4-specific methyltransferase activity and can methylate the VEGF receptor when localized in the cytosol [9,33]. Thus, like these methyltransferases, it is possible that SETD4 acts on different targets and in different cellular compartments.

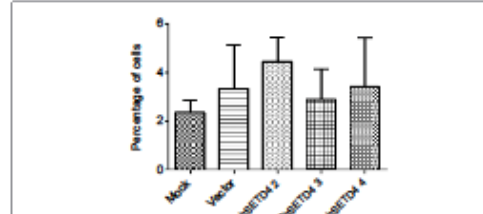


Figure 4e: Flow cytometric analysis of sub-G1 DNA content revealed no significant differences between groups of cells by Tukey's test ($p < 0.001$).

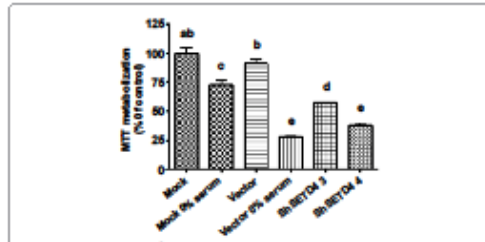


Figure 4b: Effects of SETD4 knockdown on the viability of MDA-MB 231 cells, as measured by the MTT assay. Mock (non-transfected MDA-MB 231 cells), vector (cells transfected with empty vector) and two independent clones (shSETD4 3 and 4) were plated in medium containing FBS for 72 h. Mock and vector cells were also maintained in medium without FBS (0% serum). The results are expressed relative to mock cells. Means followed by the same letter indicate no significant difference by Tukey's test ($p < 0.001$). The results are representative of three independent experiments.

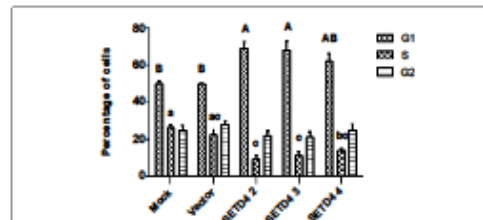


Figure 4f: Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry after staining with propidium iodide. Data from the numerical analysis in which cells were classified by cell cycle status are expressed as percentages. Means followed by the same letter indicate no significant difference by Tukey's test ($p < 0.05$). Uppercase and lowercase letters represent the analysis of G1 and S phase, respectively. The results are expressed as the percentage of events from a total of 20000 events ($n = 3$).

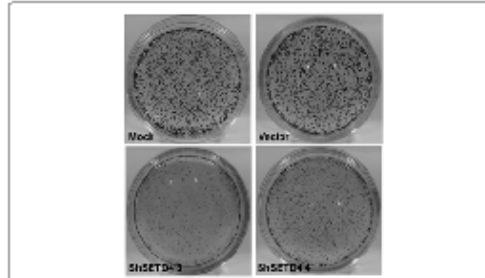


Figure 4c: Colony formation assay of shSETD4 cells. Cells were grown until colonies formed (10 days) and then stained, fixed and counted.

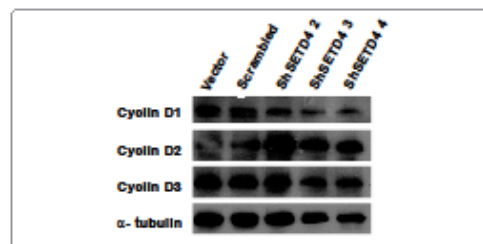


Figure 4g: Immunoblots were performed to quantify the expression of cyclin D1, D2 and D3. α -Tubulin was used as an internal control.

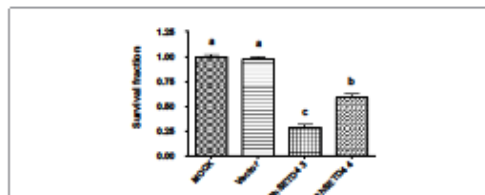


Figure 4d: The mean survival fraction \pm SEM of triplicate wells was normalized to mock cells based on the plating efficiency. Tukey's test ($p < 0.001$).

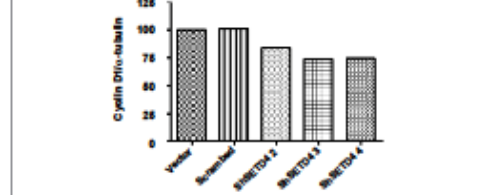


Figure 4h: Densitometric analysis confirmed reduced cyclin D1 expression to approximately 30%.

Similar to our results for SETD4 (Figure 2), EZH2 transcript and protein expression are elevated in breast cancer [31]. EZH2 overexpression occurs mainly in basal-type tumors, which are characterized by a ER-, PR-, and Her-2/neu-negative status as well as low levels of the BRCA1 protein. The down-regulation of EZH2 in aggressive ER-negative breast cancer cells greatly decreases their proliferative capacity and rate of progression through the cell cycle [34].

A major novel finding presented in our study is that SETD4 down-regulation in aggressive ER-negative breast cancer cells greatly decreases their proliferative capacity and rate of progression through the cell cycle. The number of breast cancer samples from patients used in this study was limited and further work will be necessary to validate this observation. Furthermore, we found that SETD4 knockdown caused an arrest at the G1/S transition in the cell cycle via a reduction in the cyclin D1 level. EZH2 knockdown prolongs the doubling time of ER-negative breast cancer cell lines and causes an arrest at the G2/M transition of the cell cycle, with corresponding changes in mitotic Cdc25C, Cdc2 and Cdc2-Tyr15 phosphorylation [34]. In addition, SMYD2 has been shown to play a crucial role in the G1/S transition through the methylation of the RB1 protein, resulting in augmented E2F transcriptional activity and a promotion of cell cycle progression [35]. Although the exact mechanism regarding how SETD4 affects the level of cyclin D1 remains unclear, its involvement in cell cycle regulation adds new insights to breast carcinogenesis.

The correlation between various methyltransferases and breast cancer highlights the importance of this protein family in the progression of this disease. Further work will reinforce the importance of SETD4 as a target for breast cancer therapy and will help elucidate the mechanisms involved in its activity. Our findings reveal the importance of SETD4 in breast carcinogenesis and may contribute to the identification of novel strategies to treat ER-negative breast tumors.

Acknowledgments

This work was supported by the NIH (grant 1R03TW008709); CAPES, FAPEMIG and CNPq. Confocal laser-scanning microscopy was performed at the Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biológicas (CEMEL). The authors received financial support from Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais.

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, et al. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893-2917.
2. Jones PA, Baylín SB (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* 128: 683-692.
3. Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080.
4. Huang Y, Nayak S, Jankowitz R, Davidson NE, Oesterreich S (2011) Epigenetics in breast cancer: what's new? *Breast Cancer Res* 13: 225.
5. Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X (2005) The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol* 6: 227.
6. Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. (2002) Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol* 12: 1052-1058.
7. Zhang X, Wen H, Shi X (2012) Lysine methylation: beyond histones. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 44: 14-27.
8. Albert M, Helin K (2010) Histone methyltransferases in cancer. *Semin Cell Dev Biol* 21: 209-220.

9. Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, et al. (2004) SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol* 6: 731-740.
10. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, et al. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298: 1039-1043.
11. Marchier-Bauer A, Bryant SH (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* 32: W327-331.
12. Finn RD, Tate J, Mistry J, Coghill PC, Sammut SJ, et al. (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 36: D281-288.
13. Eswar N, Eramian D, Webb B, Shen MY, Sali A (2008) Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol* 426: 145-159.
14. Morris AL, MacArthur MW, Hutchinson EG, Thornton JM (1992) Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* 12: 345-364.
15. Wiederstein M, Sippl MJ (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 35: W407-410.
16. Ordog R (2008) PyDeT, a PyMOL plug-in for visualizing geometric concepts around proteins. *Bioinformatics* 24: 346-347.
17. Correa CR, Bertollo CM, Goes AM (2009) Establishment and characterization of MACL-1 and MGO-3 cell lines derived from human primary breast cancer. *Oncol Res* 17: 473-482.
18. Speirs V, White MC, Green AR (1996) Collagenase III: a superior enzyme for complete disaggregation and improved viability of normal and malignant human breast tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32: 72-74.
19. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19: 185-193.
20. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, et al. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249-264.
21. Cui X, Churchill GA (2003) Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol* 4: 210.
22. De Angelis Campos AC, Rodrigues MA, de Andrade C, de Goes AM, Nathanson MH, et al. (2011) Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 412: 341-346.
23. Gomes DA, Rodrigues MA, Leite MF, Gomez MV, Varmal P, et al. (2008) c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J Biol Chem* 283: 4344-4351.
24. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
25. Trievel RC, Flynn EM, Houtz RL, Hurley JH (2003) Mechanism of multiple lysine methylation by the SET domain enzyme Rubisco LSM1. *Nat Struct Biol* 10: 545-552.
26. Marmorstein R (2003) Structure of SET domain proteins: a new twist on histone methylation. *Trends Biochem Sci* 28: 59-62.
27. Zhang X, Tamaru H, Khan SI, Horton JR, Keefe LJ, et al. (2002) Structure of the Neurospora SET domain protein DIM-5, a histone H3 lysine methyltransferase. *Cell* 111: 117-127.
28. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, et al. (2006) A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10: 515-527.
29. Corlita NCR, Kuanze H, Faria JAQA, Selixas CCS, Santos IGO, et al. (2012) Genomic and phenotypic profiles of two Brazilian breast cancer cell lines derived from primary human tumors. *Oncology Reports*. In Press.
30. Petrossian TC, Clarke SG (2011) Uncovering the human methyltransferasome. *Mol Cell Proteomics* 10: M110.

Citation: Arantes Faria JAQ, Resende Corrêa NC, de Andrade C, de Angelis Campos AC, de Almeida RDSS, et al. (2013) SET domain-containing Protein 4 (SETD4) is a Newly Identified Cytosolic and Nuclear Lysine Methyltransferase Involved In Breast Cancer Cell Proliferation. J Cancer Sci Ther 5: 058-065. doi:10.4172/1948-5956.1000185

Page 65 of 6

31. Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, et al. (2003) EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11606-11611.
32. Su IH, Dobenecker MW, Dickinson E, Oser M, Basavara] A, et al. (2005) Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell* 121: 425-436.
33. Kunitzaki M, Hamamoto R, Silva FP, Yamaguchi K, Nagayasu T, et al. (2007) The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3. *Cancer Res* 67: 10759-10765.
34. Gonzalez ME, Li X, Toy K, DuFrie M, Ventura AC, et al. (2009) Downregulation of EZH2 decreases growth of estrogen receptor-negative invasive breast carcinoma and requires BRCA1. *Oncogene* 28: 843-853.
35. Cho HS, Hayami S, Toyokawa G, Maejima K, Yamane Y, et al. (2012) RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation. *Neoplasia* 14: 476-486.

Citation: Arantes Faria JAQ, Resende Corrêa NC, de Andrade C, de Angelis Campos AC, de Almeida RDSS, et al. (2013) SET domain-containing Protein 4 (SETD4) is a Newly Identified Cytosolic and Nuclear Lysine Methyltransferase Involved In Breast Cancer Cell Proliferation. J Cancer Sci Ther 5: 058-065. doi:10.4172/1948-5956.1000185

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 250 Open Access Journals
- 30,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, DOAJ, EBSCO, Index Copernicus and Google Scholar etc
- Sharing Option Social Networking Enabled
- Authors, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at www.editorialmanager.com/concordance/

Genomic and phenotypic profiles of two Brazilian breast cancer cell lines derived from primary human tumors

NATÁSSIA C.R. CORRÊA¹, HELLEN KUASNE², JERUSA A.Q.A. FARIA¹, CIÇA C.S. SEIXAS¹,
IRIA G.D. SANTOS³, FRANCINE B. ABREU⁴, SUELY NONOGAKI⁵, RAFAEL M. ROCHA⁵,
GERLUZA APARECIDA BORGES SILVA³, HELENICE GOBBI⁶, SILVIA R. ROGATTO^{4,7},
ALFREDO M. GOES¹ and DAWIDSON A. GOMES¹

¹Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte;
²Department of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina; ³Department of Morphology,
Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte; ⁴NeoGene Laboratory, CIPE; ⁵Department of Anatomic Pathology,
A.C. Camargo Hospital, São Paulo; ⁶Department of Anatomic Pathology, Federal University of Minas Gerais,
Belo Horizonte; ⁷Department of Urology, School of Medicine, Paulista State University, Botucatu, Brazil

Received September 25, 2012; Accepted November 14, 2012

DOI: 10.3892/or.2013.2284

Abstract. Breast cancer is the most common type of cancer among women worldwide. Research using breast cancer cell lines derived from primary tumors may provide valuable additional knowledge regarding this type of cancer. Therefore, the aim of this study was to investigate the phenotypic profiles of MACL-1 and MGSO-3, the only Brazilian breast cancer cell lines available for comparative studies. We evaluated the presence of hormone receptors, proliferation, differentiation and stem cell markers, using immunohistochemical staining of the primary tumor, cultured cells and xenografts implanted in immunodeficient mice. We also investigated the ability of the cell lines to form colonies and copy number alterations by array comparative genomic hybridization. Histopathological analysis showed that the invasive primary tumor from which the MACL-1 cell line was derived, was a luminal A subtype carcinoma, while the ductal carcinoma *in situ* (DCIS) that gave rise to the MGSO-3 cell line was a HER2 subtype tumor, both showing different proliferation levels. The cell lines and the tumor xenografts in mice preserved their high proliferative potential, but did not maintain the expression of the other markers assessed. This shift in expression may be due to the selection of an 'establishment' phenotype *in vitro*. Whole-genome DNA evaluation showed a large amount of copy number alterations (CNAs) in the two cell lines. These findings render MACL-1 and MGSO-3 the first characterized Brazilian

breast cancer cell lines to be potentially used for comparative research.

Introduction

Breast cancer is a leading cause of death worldwide and represents the primary cause of mortality among women in Brazil (1). Breast tumors are conventionally classified based on prognostic factors, including histological type and grade, proliferation index and angiolymphatic invasion. The St. Gallen Consensus, the American Society of Clinical Oncology (ASCO) and the College of American Pathologists (CAP) also state the evaluation of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) status for the prognosis and recommendation of adjuvant therapy (2-4).

Although well-established as prognostic and diagnostic tools, information provided by classical pathological evaluation still fails to predict, with accuracy, the patient's clinical progression. Thus, the genetic and transcriptional diversity of tumor cells are receiving considerable attention, as they may represent the primary cause of unpredictable tumor behavior and the failure of certain currently used treatments. In their pioneering study, Perou *et al* (5), identified a correlation between histopathological findings and the gene expression profile of various types of breast tumor, correlating classic immunohistochemistry (IHC) and cDNA microarrays. Theirs and subsequent studies (6-8) defined novel molecular subtypes of breast tumors, including luminal A, luminal B, HER2, basal and, more recently, the claudin-low subtype (9).

Subsequently, using an experimental approach similar to that used in previous studies, Kao *et al* (10) applied molecular profile classification to known breast cancer cell lines. Many of the cell lines investigated (MCF-7 or MDA-MB-231) were obtained from metastatic tumors, and are frequently used as breast cancer models. However, metastasis-derived cells have already undergone crucial stages in tumor progression, including the development of invasive capability, cellular

Correspondence to: Professor Dawidson A. Gomes, Biological Sciences Institute, Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Bloco Q4-238, Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
E-mail: dawidson@icb.ufmg.br

Key words: breast cancer, primary tumor, cell line, tumor xenograft, immunohistochemistry, array comparative genomic hybridization

RESEARCH

Open Access

Cytoplasmic-targeted parvalbumin blocks the proliferation of multipotent mesenchymal stromal cells in prophase

Carolina Soares Barros Melo, Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria, Natássia Caroline Resende Corrêa, Carolina de Andrade, Juliana Lott Carvalho, Alfredo M Goes, Michele A Rodrigues and Dawidson Assis Gomes*

Abstract

Introduction: Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) have gained considerable interest because of their potential use in the treatment of a variety of diseases and injuries. Although remarkable advancements have been made in clinical studies, substantial concerns still regard the safety of MSCs. Some evidence suggests that MSCs can spontaneously generate a population of cells with tumorigenic potential. Thus, studying the molecular mechanisms that control the proliferation of MSCs may be a necessary step toward the development of strategies for safe clinical practice. Ca^{2+} is a second messenger that mediates a wide range of cellular responses, including the regulation of cell proliferation, but little is known about its function in MSCs. The aim of this study was to investigate the effects of targeted Ca^{2+} buffering on MSCs proliferation *in vitro*.

Methods: Here, we used an adenoviral (Ad) vector encoding the Ca^{2+} chelator protein parvalbumin (PV) fused to a nuclear exclusion signal (NES) and the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed) to investigate the function of cytoplasmic Ca^{2+} signals on MSC proliferation. Confocal microscopy was used to demonstrate that PV-NES-DsRed was expressed in the cytoplasm. Ca^{2+} signaling was monitored by using Fluo-4-AM. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of cells that were stained with propidium iodide was used as a quantitative measure of cell death. The mitotic index was assessed by immunofluorescence, and the expression of cyclins was examined with Western blot.

Results: Our results show that the Ad-PV-NES-DsRed fusion protein decreased serum-induced Ca^{2+} signaling and blocked the proliferation of rat adipose-derived MSCs (AT-MSCs) in prophase. FACS analysis revealed that Ad-PV-NES-DsRed did not induce cell death in AT-MSCs. Furthermore, Western blot analysis demonstrated that Ad-PV-NES-DsRed reduced extracellular signal-regulated kinase (Erk1/2) phosphorylation and cyclin B1 expression. Buffering cytosolic Ca^{2+} did not alter the expression of cyclins A/D1/D2/D3/E and E2.

Conclusions: Our results show that cytoplasmic Ca^{2+} signals are important for AT-MSCs progression beyond prophase because of their effects on Erk phosphorylation and cyclin B1 expression.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Targeted parvalbumin, Calcium signaling, Proliferation, Cyclins

Introduction

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are nonhematopoietic stromal cells that have generated a great amount of interest in the field of regenerative medicine because of their unique biological properties. These cells give rise to diverse tissues, including bone,

cartilage, tendon, muscle, and adipose tissue [1], and they have been isolated from different sources, such as bone marrow, adipose tissue, peripheral blood, muscle, umbilical blood, placenta, and other sites [2,3]. These cells are relatively easy to obtain and have a remarkable capacity for extensive *in vitro* expansion, which allows them rapidly to reach the cell number required for *in vivo* therapy. In addition to their secretion of multiple bioactive molecules

* Correspondence: dawidson.gomes@gmail.com
Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte-MG ZIP Code: 31270-901, Brazil



2 Indicadores de Cálcio (Ca^{2+})

Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria
Carolina Soares Barros de Melo
Ana Carolina de Angelis Campos
Michele Angela Rodrigues
Dawidson Assis Gomes

O uso de indicadores fluorescentes é uma importante ferramenta para o estudo da dinâmica do Ca^{2+} intracelular, bem como seu papel em processos celulares específicos. Basicamente, eles funcionam com a alteração nas propriedades de fluorescência quando ligados direta ou indiretamente ao Ca^{2+} . Em geral, existem dois grupos de indicadores de Ca^{2+} , um que compreende os fluoróforos quimicamente sintetizados e outro de proteínas fluorescentes.

Diversos tipos de indicadores de Ca^{2+} foram desenvolvidos, cada um com características espectrais e afinidades ao Ca^{2+} particulares, o que possibilita uma ampla aplicação desses sensores. A escolha do indicador apropriado deve ser fundamentada nas suas propriedades primárias. Em especial, a afinidade de ligação ao Ca^{2+} – que pode ser medida pela constante de dissociação (K_d) – é uma característica que deve ser considerada na escolha do indicador, visto que diferentes compartimentos celulares ou processos bioquímicos ocorrem em concentrações distintas desse íon. Além disso, as propriedades espectrais como valores de absorção e emissão de luz, o deslocamento espectral e a variação relativa de fluorescência devem ser considerados no momento da seleção. A observação dessas características espectrais é de extrema importância, por exemplo, em experimentos utilizando múltiplos fluoróforos ou em microscópios que possuem apenas uma fonte de excitação. Assim, a escolha dos indicadores de Ca^{2+} é dependente do tipo de investigação experimental.

INDICADORES DE Ca^{2+} SINTÉTICOS

Os primeiros indicadores dessa classe foram descritos por Roger Tsien e colaboradores em 1985 [1]. Estes indicadores apresentam alterações espectrais após a ligação ao Ca^{2+} . Atualmente, diversas empresas comercializam indicadores sintéticos com as mais diversas propriedades espectrais e de ligação ao Ca^{2+} .