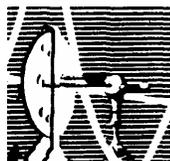


Daniela Salles C. de Oliveira

**Análise Proteômica Diferencial Associada à
Inativação do Gene Fanconi C**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

I. INTRODUÇÃO	3
I. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	7
A) HEMATOLÓGICAS	7
B) ANOMALIAS CONGÊNITAS	8
C) TUMORES	9
II. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	9
III. GENES E PROTEÍNAS FANCONI	11
IV. A VIA FANCONI	15
A) INTERAÇÕES ENTRE A VIA FANCONI E OUTRAS VIAS ENVOLVIDAS NO REPARO DE DNA	16
B) A VIA FANCONI E OS PONTOS DE CHECAGEM DE LESÕES DE DNA	21
C) A VIA FANCONI E O REPARO DE <i>INTERSTRAND CROSS-LINKS</i>	23
V. OUTROS PAPÉIS ATRIBUÍDOS ÀS PROTEÍNAS FANCONI	28
VI. QUESTÕES PENDENTES	31
II. OBJETIVOS	33
III. MATERIAIS E METODOLOGIAS	34
I. CULTURA DE CÉLULAS	34
A) LINHAGENS CELULARES	34
B) TRATAMENTO COM MITOMICINA C	35
II. OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO	35
III. ELETROFORESE BIDIMENSIONAL	35
A) PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	36
B) PRIMEIRA DIMENSÃO - ISOELETROFOCALIZAÇÃO	36
C) SEGUNDA DIMENSÃO – SDS-PAGE	38
D) COLORAÇÃO PELO MÉTODO “COOMASSIE COLOIDAL”	40
E) COLORAÇÃO POR PRATA NÃO DESTRUTIVA	40
F) ANÁLISE DOS MAPAS PROTEÔMICOS	41
IV. ESPECTROMETRIA DE MASSAS	41
A) PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	42
V. REAL TIME PCR	43
A) EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	43
B) PURIFICAÇÃO DO RNA	43
C) DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS	44
D) REAL-TIME PCR: TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)	44
E) REAL-TIME PCR: AVALIAÇÃO DOS AMPLICONS E PCR	45
IV. RESULTADOS	47
I. TESTES DE SOBREVIVÊNCIA CELULAR	47
II. MAPA PROTEÔMICO BIDIMENSIONAL DESCRITIVO DAS CÉLULAS HSC536COR	49
III. ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL ENTRE CÉLULAS HSC536N E HSC536COR	52
IV. REAL-TIME PCR – COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS TRANSCRICIONAIS DE MDC1 ENTRE HSC536COR E HSC536N	64

V. <u>DISCUSSÃO</u>	66
I. <u>PROTEOMA DE REFERÊNCIA DE CÉLULAS HSC536COR</u>	68
II. <u>ANÁLISE PROTEÔMICA DIFERENCIAL ENTRE CÉLULAS HSC536N E HSC536COR</u>	69
III. <u>PROTEINA PDZ/LIM DOMAIN PROTEIN 1</u>	70
IV. <u>A EXPRESSÃO DE MDC1 É ALTERADA EM CÉLULAS FANCC^{-/-}</u>	71
VI. <u>CONCLUSÃO</u>	75
VII. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	76
<u>ANEXO 1</u>	86
<u>ANEXO 2</u>	100

I. INTRODUÇÃO

Anemia de Fanconi é uma desordem que foi descrita pela primeira vez em 1927 pelo pediatra suíço Guido Fanconi (1892–1979) a partir da observação de três irmãos com anemia hipercrômica associada a anisocitose* e poiquilocitose**, e a defeitos congênitos. Primeiramente ele considerou a possibilidade de uma anemia perniciosa familiar, mas essa hipótese foi descartada devido à falta de características típicas de medula óssea na necropsia. Então, em 1927, ele publicou o primeiro trabalho: *Familiare, infantile, perniziosaartige Anämie* (Stevens e Meyer, 2002). Mais de 70 anos após a primeira descrição, a desordem em questão vem sendo desvendada, e tem sido alvo de inúmeras linhas de pesquisa.

Anemia de Fanconi é uma doença genética predominantemente autossômica, recessiva (com exceção do subtipo B, cujo gene encontra-se no cromossomo X), rara, classificada como uma síndrome de instabilidade cromossômica devido à deficiência das células Fanconi nos mecanismos de reparo de DNA. Clinicamente, a anemia de Fanconi é caracterizada por ampla variedade de anomalias congênitas associadas, a elevadíssima propensão à perda de função da medula óssea e elevada incidência de câncer. Essa heterogeneidade da síndrome gerou a procura de causas multi-gênicas que pudessem explicar sua extensa variabilidade clínica (Niedernhofer et al, 2005).

Células Fanconi têm como principal característica fenotípica sua hipersensibilidade a agentes genotóxicos *interstrand cross-link (ICL)*. Agentes *cross-links* são drogas que provocam lesões no DNA ao formarem pontes covalentemente ligadas às suas duas fitas. Conseqüentemente, se não reparadas, as *ICLs* podem gerar efeitos catastróficos para a célula (Noll et al, 2006). Essa hipersensibilidade aos agentes *cross-links*, é explorada como ferramenta em diagnóstico, e permitiu a identificação dos grupos de complementação. Cada grupo de complementação corresponde a pacientes Fanconi com mutações no mesmo gene. (Tischkowitz e Hodgson, 2003).

* Anisocitose: Variações anormais do tamanho de eritrócitos.

**Poiquilocitose: Variações incomuns na forma de eritrócitos.

Até o momento já foram identificados 12 diferentes grupos de complementação: genes *FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *FANCL*, e o recém descrito *FANCM* (**Tabela 1**) (Niedernhofer et al, 2005). Todos esses genes já se encontram clonados, com exceção do gene *FANCI*. O grupo de complementação A apresenta-se em 60 - 70% dos pacientes, os grupos C e G correspondem a 20% dos pacientes, os outros grupos são extremamente raros (**Figura 1**) (Rosselli et al, 2003). Um grande número de mutações vem sendo identificado em cada grupo de complementação, porém ainda não há uma associação entre as mutações e os fenótipos tanto celulares quanto clínicos (Tischkowitz e Hodgson, 2003).

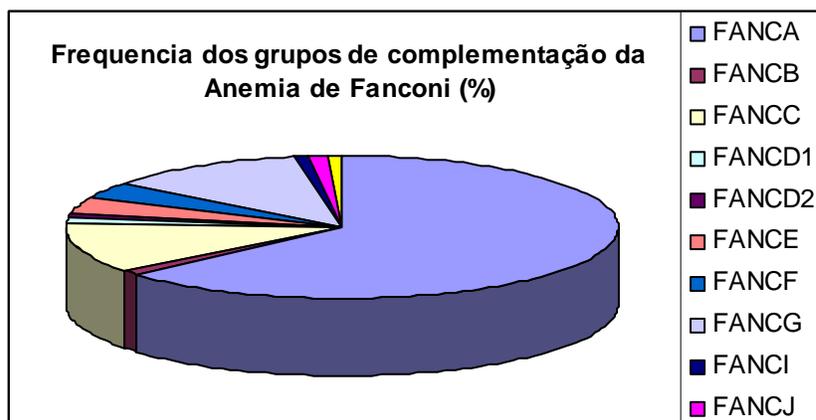


Figura 1. Distribuição das frequências dos grupos de complementação da anemia de Fanconi.

A incidência da Anemia de Fanconi é aproximadamente 3 a 5 casos por milhão e a frequência de heterozigose é de 1 em 300 na Europa e nos Estados Unidos da América (Tischkowitz e Hodgson, 2003).

Apesar de ser uma doença genética rara, esta patologia tem atraído a atenção de muitos pesquisadores, porque defeitos nos genes Fanconi têm sido

encontrados em uma grande variedade de cânceres humanos na população geral (pacientes não - Fanconi) (Taniguchi e D'Andrea, 2006).

Subtipo	Gene	% de pacientes FA*	Localização cromossômica	Proteína (KDa)	Principal função da proteína
A	FANCA	57	16q24.3	163	Complexo FA
B	FANCB	0,3	Xp22.31	95	Complexo FA
C	FANCC	15	9q22.3	63	Complexo FA
D1	FANCD1/BRCA2	4	13q12-13	380	Recrutamento de Rad 51
D2	FANCD2	3	3p25.3	155/162	?
E	FANCE	1	6p21-22	60	Complexo FA
F	FANCF	2	11p15	42	Complexo FA
G	FANCG/XRCC9	9	9q13	68	Complexo FA
I	Não identificado	raro	?	?	?
J	FANCI/ BACH1/ BRIP1	1,6	17q22-q24	130	5'→3' DNA helicase/ ATPase
L	FANCL/ PHF9/POG	0,1	2p16.1	43	Complexo FA, ubiquitina ligase
M	FANCM/Hef (FAAP250)	raro	14q21.3	250	Complexo FA, ATPase/ translocase

Tabela 1. Os doze grupos de complementação e os genes responsáveis pela Anemia de Fanconi

I. Características Clínicas

a) Hematológicas

Os aspectos clínicos hematológicos da Anemia de Fanconi são os mais importantes. Dentre as os aspectos clínicos responsáveis pela alta morbidade e mortalidade dos pacientes estão: anemia aplástica, mielodisplasia e leucemia mielóide aguda.

Em neonatos, o hemograma não apresenta alterações significativas. Mais tarde, surge anemia e trombocitopenia. Entre as idades de 5 a 10 anos, há evolução para uma pancitopenia devido à elevada incidência de apoptose das células hematopoiéticas. As células progenitoras hematopoiéticas que sobrevivem na medula óssea, podem levar ao desenvolvimento da síndrome mielodisplásica (SMD) e leucemia mielóide aguda (LMA) em torno dos 14 anos de idade (Barber et al, 2003; Kutler et al, 2003; Tischkowitz e Dokal, 2004; Niedernhofer et al, 2005).

Um estudo, com o objetivo de calcular o risco de desenvolvimento de anomalias hematológicas, foi feito com 754 pacientes Fanconi. Na faixa etária dos 40 anos, o desenvolvimento de patologias hematológicas (perda de função da medula óssea) foi de 98%, e a incidência de morte em decorrência das mesmas foi de 80%. O risco de pancitopenia na faixa dos 20 anos de idade foi de 84%, aparecimento de anomalias cromossômicas clonais foi de 67% na faixa dos 30 anos, e LMA ou SMD 52% na faixa dos 40 anos. Dentre os pacientes, 38% morreram durante o período da pesquisa (1982 a 2001), sendo a média de idade dos pacientes 13 anos. E a causa de morte, na maioria dos casos, se dá pelas complicações hematológicas. Algumas anomalias cromossômicas são comuns em pacientes Fanconi com SMD/LMA, como monossomia dos cromossomos 5 e 7 (Auerbach e Allen, 1991; Butturini et al, 1994; Grompe e D'Andrea, 2001).

b) Anomalias Congênitas

Os pacientes Fanconi podem apresentar uma grande variedade de características clínicas, ou até mesmo nenhuma (em aproximadamente 30% dos casos). Nesse caso, a anemia de Fanconi só é detectada com o surgimento dos sintomas hematológicos.

Defeitos esqueléticos encontram-se em mais de 70% dos pacientes Fanconi. Dentre eles os mais comuns são hipoplasia radial e dos polegares (Figura 2b), escoliose e anomalias vertebrais. A anemia de Fanconi também está associada a alterações no desenvolvimento tanto pré- quanto pós-natal. Neonatos Fanconi apresentam redução de peso e estatura, sendo que essas características podem ser associadas a disfunções hormonais como hipotireoidismo e resposta anômala ao hormônio de crescimento.

Hiperpigmentação generalizada da pele, manchas *café au lait* e áreas de hipopigmentação (**Figura 2a**) são características comuns que acometem aproximadamente 64% dos pacientes (Kutler et al, 2003).

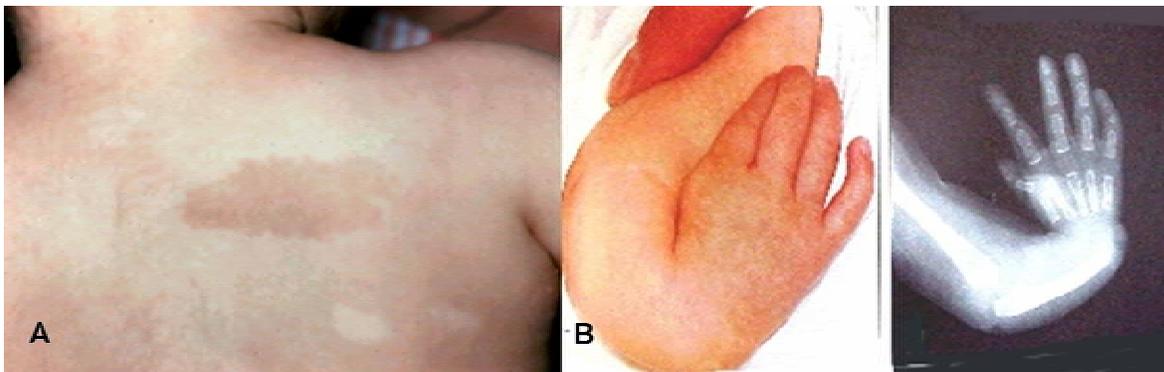


Figura 2. (A) Manchas café-com-leite e regiões de hiperpigmentação, e (B) anomalia radial.

Um terço dos pacientes apresentam anomalias renais que incluem aplasia renal unilateral, hipoplasia renal, ureteres duplos, entre outras. Microftalmia, microcefalia, retardo mental leve, surdez (associada a malformações no desenvolvimento do ouvido externo) também são características comuns.

Outros aspectos clínicos menos comuns são: Anomalias urogenitais femininas e masculinas (subdesenvolvimento dos órgãos genitais, infertilidade, alterações uterinas); gastrointestinais (atresia esofágica, duodenal e jejunal, ânus imperfurado, fistulas traqueo-esofágicas); defeitos cardíacos (defeitos no septo ventricular, estenose pulmonar, estenose aórtica); no sistema nervoso central (hidrocefalia, ausência do *septum pellucidum*, defeitos no tubo neural) (Tischkowitz e Dokal, 2004; Tischkowitz e Hodgson, 2003).

c) Tumores

O desenvolvimento de neoplasias está diretamente associado com a progressão da idade dos pacientes Fanconi. Aqueles que sobrevivem até o início da idade adulta tem aproximadamente 50 vezes mais chances de desenvolver tumores sólidos do que a população em geral (Kutler et al, 2003). Tumores hepáticos e carcinomas de células escamosas do esôfago, orofaringe e vulva são os mais comuns (Tischkowitz e Dokal, 2004; Niedernhofer et al, 2005).

II. Diagnóstico e Tratamento

Devido à natureza heterogênea já descrita, é difícil diagnosticar a anemia de Fanconi apenas pelos aspectos clínicos. Células Fanconi possuem grande instabilidade cromossômica. O tratamento com agentes *cross-links* como Mitomicina C (MMC) ou diepoxibutano (DEB), produzem um número significativamente maior de quebras cromossômicas nas células Fanconi do que em células normais. Esse teste pode ser feito também em células amnióticas, das vilosidades coriônicas e do sangue fetal para diagnóstico pré-natal.

Sendo o reparo de DNA e mecanismos de controle dos pontos de checagem do ciclo celular processos altamente integrados, as células Fanconi também apresentam distúrbios no ciclo celular. Nesse caso, as células Fanconi são inábeis a manter os pontos de checagem G2/M. Assim, através da citometria de fluxo, a progressão do ciclo celular anômala em células Fanconi tratadas com

agentes *cross-link*, pode ser detectada. Esse método tem a vantagem de ser mais rápido com a eficiência equivalente à do teste de quebras cromossômicas.

A determinação do grupo de complementação o qual o paciente Fanconi pertence é de suma importância, pois outras síndromes que também tem como característica a instabilidade cromossômica, como Síndrome de Nijmegen (NBS), geram testes MMC ou DEB positivos. A tipagem é importante também para a administração clínica apropriada e para futuros estudos epidemiológicos. Para a subtipagem são feitos ensaios de fusão celular, ou a recente descrita combinação de ensaios de transferência gênica por retrovírus (e a conseqüente correção do fenótipo) e citometria de fluxo. Nesse método, células derivadas de pacientes são transfectadas com vetores de plasmídios que expressam proteína verde fluorescente (*enhanced green fluorescence protein* - EGFP) fusionadas e cDNAs Fanconi de grupos específicos que, inseridos em sítios de inserção riossomiais internos (*internal ribosomal entry sites* - IRES), dessa forma são expressos em altos níveis. Em seguida, a correção da parada do ciclo celular em G2/M é analisada por citometria de fluxo. Um método variante utiliza transferência gênica por retrovírus mais a análise da monoubiquitinação de FANCD2 por *immunoblotting* (Taniguchi et al, 2006; Shimamura e D'Andrea, 2003; Chandra et al, 2005).

Em pacientes sem sintomas hematológicos no tempo do diagnóstico positivo, é feito um monitoramento anual. Os pacientes que desenvolvem perda de função da medula óssea, inicialmente respondem ao tratamento com andrógenos e fatores de crescimento hematopoiéticos como G-CSF e GM-CSF. Porém, a maioria dos pacientes torna-se refratário a esse tipo de terapia, e o tratamento definitivo disponível é o transplante de células tronco hematopoiéticas.

Os pacientes que superaram os transtornos hematológicos devem focar-se na prevenção e tratamento dos eventuais tumores sólidos. Visto que radioterapia e quimioterapia provocam severos efeitos colaterais, intervenções cirúrgicas devem ser tomadas como prioridade.

A terapia gênica é um método que vem sendo estudado como uma opção de tratamento futuro. As células são retiradas de pacientes e tratadas para a complementação ou seja, correção do fenótipo Fanconi através da transfecção

de genes Fanconi sem mutações, conferindo um fenótipo selvagem. Essas células corrigidas possuem uma vantagem sobre as mutadas. Porém, as células Fanconi progenitoras hematopoiéticas são muito frágeis e crescem pouco *in vitro*, o que torna a transdução retroviral difícil. Assim, essas dificuldades técnicas ainda precisam ser contornadas para uma utilização efetiva da terapia gênica (Tischkowitz e Dokal, 2004).

III. Genes e Proteínas Fanconi

A anemia de Fanconi pode ser dividida em pelo menos 12 grupos de complementação (A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L e M), definidos por estudos de fusão celular (**Tabela 1**) (Taniguchi e D'Andrea, 2006). As proteínas Fanconi interagem com proteínas como ATM, MRE11, BLM, NBS1 e ATR responsáveis por outras síndromes genéticas raras relacionadas com a instabilidade cromossômica como Ataxia Telangiectasia (AT), *AT-like disorder* (ATLD), Síndrome de Bloom, Síndrome de *Nijmegen breakage* (NBS) e Síndrome de Seckel, respectivamente. Esta interação sugere um papel importante das proteínas Fanconi nas vias de regulação de reparo de DNA. A principal alteração celular encontrada em células Fanconi é sua instabilidade cromossômica e a alteração das respostas aos agentes *cross-link*. Outras alterações na biologia celular em células Fanconi incluem o processamento de detoxicação ou de produção de radicais livres; alteração nas respostas celulares ao estresse (oxidativo, replicativo), as citocinas envolvidas na hematopoiese, no desenvolvimento do câncer; e na participação nos pontos de checagem do ciclo celular (Mace et al, 2005).

Em resposta a lesões no DNA ou ao *stress* replicativo, as proteínas FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL e FANCM formam um complexo nuclear – Complexo Fanconi ou *Fanc-core* – requerido para a monoubiquitinação de uma outra proteína Fanconi – FANCD2.

A monoubiquitinação de FANCD2 é necessária para sua translocação à cromatina, e a formação de *foci* nucleares em sítios de reparo de

lesões no DNA. Nesses sítios, FANCD2 colocaliza com fatores envolvidos no reparo mediado por recombinação homologa de quebras duplas de DNA (*double strand breaks* - DBSs) (Hussain et al, 2004). Mutações em uma das proteínas do *Fanc-core* resulta na perda de capacidade de formação do complexo e diminuição da expressão dos seus componentes (Grompe e D'Andrea, 2001).

As proteínas que compõem o complexo Fanconi FANCA, FANCB, FANCC, FANCG, FANCL, estão distribuídas igualmente entre citoplasma e núcleo. Enquanto FANCE e FANCF são predominantemente nucleares. Durante as fases G1/S e S do ciclo celular ou diante da necessidade de corrigir lesões espontâneas ou problemas de replicação do DNA, FANCA, FANCB, FANCC, FANCG e FANCL são recrutadas para o núcleo onde se juntam a FANCE e FANCF (Mace et al, 2005).

FANCA e FANCG são duas fosfoproteínas que interagem fortemente entre si. Essa interação é crítica para aumentar os níveis de expressão de ambas, assim como suas meia-vidas. A interação ótima entre o heterodímero FANCA/FANG requer a ligação de FANCB, FANCC e FANCF, mas é independente de FANCD1, FANCD2 e FANCE. Não foram observadas interações

A ubiquitinação de moléculas biológicas pode ter muitas funções, desde a degradação protéica via proteossomos até a regulação de diversas vias, incluindo o reparo de DNA. A ubiquitinação é feita através de uma cascata que envolve três enzimas: E1, que ativa a ubiquitina através da hidrólise de ATP e depois a transfere através de uma ligação tioéster para a segunda enzima – E2, formando um conjugado ubiquitina-E2. A E3 ubiquitina-ligase media a transferência da ubiquitina para o substrato específico (Gurtan et al, 2006).

Há muitas evidências que sugerem fortemente que o complexo Fanconi funcionaria como E3 ligase para FANCD2. Assim, o modelo sugere que FANCL, via repetições WD-40 ligar-se-ia ao *Fanc-core* e os domínios PHD recrutariam uma proteína ainda não identificada para a ubiquitinação de FANCD2 (Gurtan et al, 2006; Taniguchi e D'Andrea, 2006).

O mais recente componente do *Fanc-core* identificado é FANCM. FANCM possui sete domínios helicase específicos e um domínio endonuclease (Taniguchi e D'Andrea, 2006). Tem atividade ATPásica estimulada por DNA de fita simples (ssDNA) e de fita dupla (dsDNA) (Chandra et al, 2005). Assim, FANCM parece ter pelo menos, três importante funções: um papel estrutural que permite a associação do *Fanc-core*, pois na ausência de FANCM, a localização e estabilidade das proteínas Fanconi no núcleo estão comprometidas. FANCM pode funcionar como um “motor” que transloca o complexo Fanconi ao longo do DNA, permitindo assim localizar as lesões no DNA. E, sendo FANCM hiperfosforilada em resposta a lesões no DNA, foi sugerido seu papel como um transdutor de sinal através do qual a atividade do complexo é regulada (Meetei et al, 2005).

Uma nona subunidade, a *FA-associated protein 100* – FAAP100 – foi identificada como componente do *Fanc-core*, mas ainda não foram descritos pacientes com essa proteína mutante (Meetei et al, 2003a).

Apesar de não estar totalmente esclarecida, existem alguns modelos que procuram descrever a associação das proteínas no complexo Fanconi. Os mais recentes descrevem que os subcomplexos FANCA+FANCG e FANCB+FANCL, formados no citoplasma, são recrutados para o núcleo, em resposta a presença de *ICLs* ou durante a fase S, independentemente. No núcleo,

os subcomplexos se associariam. FANCE e FANCC ligam-se diretamente no núcleo e logo depois se juntariam ao complexo em formação FANCA+FANCB+FANCG+FANCL. Por fim, FANCF se ligaria ao complexo para estabilizar as interações (Léveillé et al, 2006).

Após a entrada na fase S, o *Fanc-core* pode ligar-se à cromatina em um mecanismo dependente da replicação e independente da ocorrência de lesões; e é possível que essa ligação seja dependente de FANCM, através de seu domínio helicase. Ao encontrar um *ICL*, tanto o *Fanc-core* quanto FANCD2 são fosforilados pelas cinases ATM ou ATR e em seguida FANCL promove a monoubiquitinação de FANCD2. FANCD2 modificada permanece na cromatina, possivelmente através da interação com um receptor de ubiquitina e interagindo funcionalmente com outras proteínas envolvidas no reparo. Após a saída da fase S do ciclo, FANCG é fosforilada, possivelmente por cinases do ciclo celular, resultando no desligamento do *Fanc-core* a cromatina.

Muitas evidências também sugerem modificações nas proteínas FANCA e FANCG: FANCA é fosforilada de forma dependente da formação do *Fanc-core* (Yamashita et al, 1998) e possui sítios de fosforilação estimulados por MMC (Thomashevski et al, 2004). A fosforilação de FANCG na serina-7 mostrou-se necessária para a correção da resistência a MMC em células *FancG* (Qiao et al, 2004).

No núcleo, o complexo Fanconi existe em pelo menos dois diferentes *pools*: solúvel e ligado à cromatina. Como determinado por fracionamento bioquímico, o tratamento com MMC aumenta os níveis dos componentes do *Fanc-core* ligados à cromatina, assim como durante o ponto de checagem de fase S. Além disso, estudos feitos com proteínas Fanconi marcadas por fluorescência demonstraram que FANCA, FANCC e FANCG formam *foci* nucleares entre as fases G1 e S nas fibras cromatínicas durante a fase S, e desaparecendo durante a mitose (Mi et al, 2005).

Matsushita descreveu recentemente novas funções do complexo Fanconi, além da ubiquitinação de FANCD2, foi demonstrado que FANCC, FANG

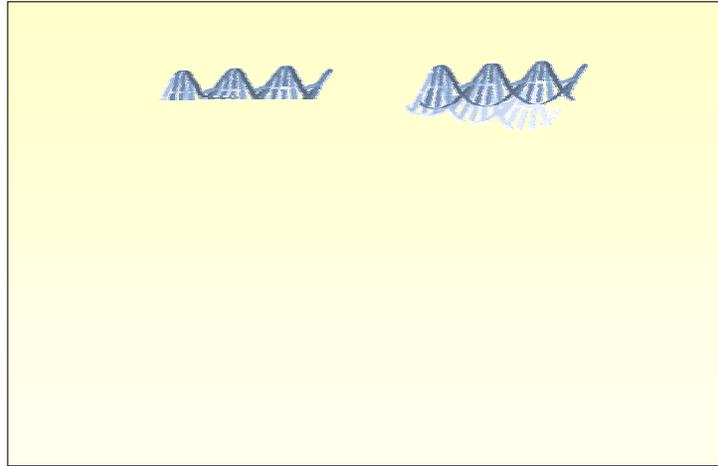
e FANCL são essenciais para o direcionamento e ligação de FANCD2 na cromatina e sua função apropriada no reparo do DNA.

Células deficientes em FANCI têm capacidade normal de formar o complexo Fanconi, porém não são capazes de ubiquitinar FANCD2. A função de FANCI ainda não está definida, mas é considerada como um fator necessário para a ubiquitinação de FANCD2. Assim como FANCI, FANCJ (ou BACH1/BRIP1) - uma ATPase DNA dependente/helicase 5'→3' não faz parte do *Fanc-core*, e também não é necessária para a monoubiquitinação de FANCD2 (Levitus et al, 2005; Litman et al, 2005). FANCJ interage fisicamente com os domínios BRCT de BRCA1 e co-localizando no final da fase S do ciclo celular. FANCD1/BRCA2 também não é necessária para a formação do *Fanc-core* nem a ativação de FANCD2. Assim, é possível que FANCJ e FANCD1/BRCA2 tenham funções à jusante da monoubiquitinação de FANCD2 na via Fanconi (Cantor et al, 2001; Litman et al, 2005).

Apesar dos extensos avanços na elucidação da “via Fanconi”, as vias que ativam a formação do complexo, as funções específicas das proteínas Fanconi no complexo assim como as interações estruturais entre estas proteínas, ainda não foram totalmente compreendidas.

IV. A via Fanconi

As respostas a lesões no DNA envolvem um mecanismo de transdução de sinal que parte de moléculas sensoras, que reconhecem as lesões, e por sua vez ativam uma cascata de sinalização que leva a ativação das moléculas efetoras do reparo (**Figura 3**).



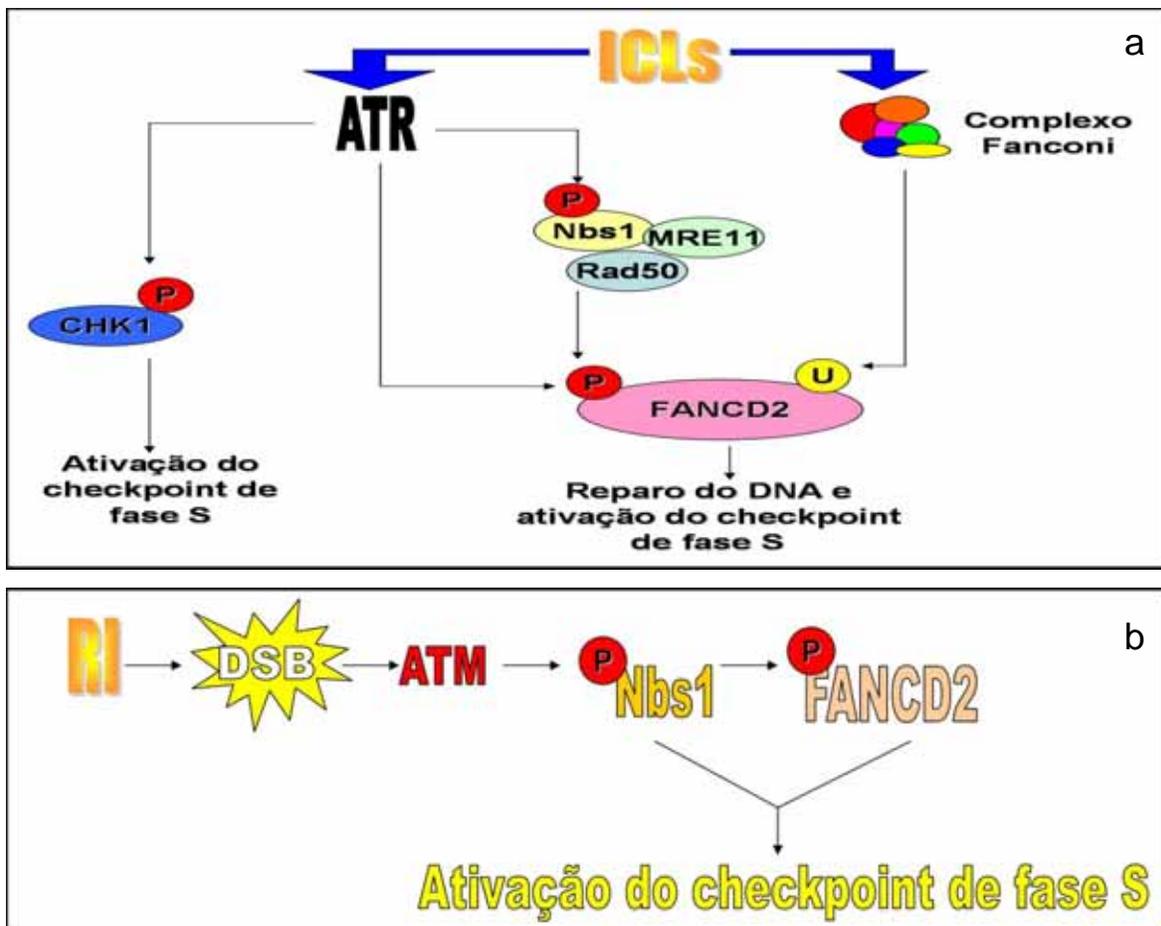


Figura 4. Representação esquemática das vias de sinalização desencadeadas em resposta a lesões no DNA induzidas por ICLs (a) e radiação ionizante (b). (a) Interrupções nas forquilhas de replicação causadas por ICLs levam à formação do complexo Fanconi e ativa ATR, que por sua vez fosforila vários substratos, como Chk1 e FANCD2, que levam a ativação do ponto de checagem de fase S e do reparo de DNA (b) Em resposta a quebras duplas de DNA (DSBs) causadas por RI, ATM fosforila Nbs1 e FANCD2, resultando na ativação do ponto de checagem de fase S. [P - fosfato, U - ubiquitina].

Foram propostos pelo menos três mecanismos para a ativação de ATM e ATR: ativação direta através da interação com o DNA lesado; ativação indireta através de interação com proteínas de reparo de DNA; ou a combinação de ambos (Yang et al,2004).

ATM é considerado o regulador primário das respostas à presença de *DSBs* formadas em resposta à radiação ionizante. Já ATR, parece ser ativado por *ssDNA* resultantes de forquilhas de replicação interrompidas, radiação ultravioleta (UV) e hipóxia (Koundrioukoff et al, 2004). ATR, presente na forquilha de replicação, é ativado quando esta encontra uma lesão que provoque parada de seu andamento (Stiff et al, 2005), como *ICLs*. Porém, como *ICLs* também levam a formação de *DSBs*, estas podem ser também prontamente reconhecidas por ATM (Pichierri et al, 2004).

ATR é necessária para a monoubiquitinação eficiente de FANCD2, através da fosforilação desta proteína, e sua focalização nuclear. Já ATM também fosforila FANCD2, mas em resposta a radiação ionizante, porém células ATM-deficientes são proficientes na monoubiquitinação de FANCD2 e na formação de seus *foci* nucleares (Taniguchi e D'Andrea, 2002). São três os possíveis mecanismos do controle da monoubiquitinação de FANCD2, via ATR. ATR pode fosforilar diretamente FANCD2 e levar a um aumento de sua forma ubiquitinada, ATR pode fosforilar componentes do complexo Fanconi, enriquecendo sua atividade ubiquitina ligase. A recente descoberta que FANCM seja fosforilada por indução de lesões no DNA vem reforçar essa hipótese. Além disso, FANCA e FANCG são fosfoproteínas, porém as cinases responsáveis e as conseqüências para a monoubiquitinação de FANCD2 ainda são desconhecidos. Outra possibilidade é que substratos conhecidos de ATR como BRCA1 e Chk1 mediem a regulação da monoubiquitinação de FANCD2. Mas, sabendo-se que FANCD2 é um substrato direto de ATM, e que ATM e ATR compartilham alguns substratos, especula-se que FANCD2 também seja alvo direto de ATR (Andreassen et al, 2004).

O complexo MRN [composto pelas proteínas Mre11 (nuclease), Rad 50 (ATPase) e Nbs1 (mediador de *checkpoint*), em humanos] possui um papel importante no reparo de lesões no DNA, sendo peça chave na resposta a *DSBs*, estando envolvido em virtualmente todos os aspectos do metabolismo do DNA, incluindo a detecção e processamento de *DSBs*, recombinação homóloga e meiose, manutenção de telômeros e respostas de ponto de checagem de fase S

de ciclo celular ativadas por *DSBs* (Assenmacher e Hopfner, 2004). Além disso, interage com BRCA1, implicando na sua possível participação na recombinação homóloga, e preenchendo muitos critérios de um sensor de lesões de DNA (Nakanishi et al, 2002).

Mutações no gene *Mre11* são responsáveis pela desordem *A-T like* (ATLD), e células deficientes em *Mre11* ou *Nbs1* possuem outras características em comum com células *A-T* como radiosensibilidade e defeitos nos pontos de checagem, assim como as células Fanconi (Kurz e Less-Miller, 2004). Muitos trabalhos já descreveram o complexo MRN como um ativador a montante de ATM em vias de reparo de lesões de DNA (Carson et al, 2003).

A proteína cinase ATM que atua ativando diversas vias incluindo pontos de checagem do ciclo celular, reparo de DNA ou apoptose é ativada por *Mre11*, possivelmente junto com outros fatores de promoção de ponto de checagem como a proteína MDC1 (Lou et al, 2006). Um dos substratos de ATM (*NBS1* - componente do complexo MRN), é necessário para a fosforilação de outros substratos de ATM como histona H2AX, SMC1 e FANCD2. Além disso, a fosforilação da serina 343 de *Nbs1* mediada por ATM ocorre nos sítios de *DSBs*, sugerindo que são proteínas que se co-localizam em sítios de lesão no DNA (Stiff et al, 2005). *MRE11* também atua diretamente na forquilha de replicação e se liga a cromátides irmãs nascentes durante a fase S (Assenmacher et al, 2004).

A proteína *Nbs1* funciona na interseção de duas vias independentes: em resposta a radiação ionizante, ATM fosforila *Nbs1* na serina 343, resultando na ativação do ponto de checagem de fase S. Já em resposta ao tratamento com Mitomicina C, *Nbs1* associa-se em foci nucleares com *Mre11*-Rad50 e FANCD2 (Nakanishi et al, 2002).

Recentemente foi descrito que *NBS1* é necessária para promoção dos eventos de fosforilação ATR-dependentes como a fosforilação de FANCD2, promoção do ponto de checagem G2/M e recuperação de forquilhas de replicação interrompidas (Stiff et al, 2005).

A helicase da classe RecC, BLM também parece interagir funcionalmente com as proteínas Fanconi (Pichierri et al, 2004). BLM faz parte do

complexo BRAFT (*Fanccore*+BLM+RPA+topoIII α +BRCA1) (Taniguchi e D'Andrea, 2006), no qual o componente chave, BRCA1, é conhecido como parceiro funcional de FANCD2, sendo necessário para focalização nuclear e sendo importante observar que BRCA1 interage com outras proteínas Fanconi (Pichierri et al, 2004). Além disso, é sabido que BRCA1 é necessária para ativação de certos genes de reparo e compõe outros complexos envolvidos com o reparo de DNA, como o BASC (*BRCA1-associated genome surveillance complex*) da qual também fazem parte ATM, Complexo MRN, proteínas do reparo de *mismatch* (MSH2/6 e MLH2) e helicase BS (Khanna e Jackson, 2001).

A presença do *Fanc-core* intacto é necessária para a fosforilação de BLM em resposta a *ICLs* e para sua focalização em *foci* nucleares. Além disso, BLM se co-focaliza com FANCD2 ubiquitinada, e a fosforilação de BLM é necessária para a associação do complexo MRN em resposta ao bloqueio da progressão da forquilha de replicação. Ambos os processos ocorrendo à jusante do complexo nuclear Fanconi (Pichierri et al, 2004).

Em resposta a lesões por *cross-link* FANCD2 é monoubiquitinada pelo *Fanc-core* na lisina 561 (Wang e D'Andrea, 2004), sendo translocada para regiões de reparo de lesões de DNA onde se associa fortemente com a cromatina. Já foi demonstrado que mesmo sem essas modificações pós transcricionais, FANCD2 tem a capacidade de ligar-se a DNA, especialmente em estruturas como junções *Holliday* e extremidades do DNA (Park et al, 2005). Ainda que não se saiba como a monoubiquitinação e a fosforilação regulam essa atividade de FANCD2, esta é consistente com seu papel no reparo de *DSBs*. O número de *foci* de FANCD2 por núcleo, assim como a frequência de células com formações de *foci* FANCD2 aumentam dramaticamente em resposta ao tratamento com agentes *cross-link* ou radiação ionizante. Em células contendo mutação em um dos componentes do complexo Fanconi, FANCD2 mantém-se difuso, mesmo na presença de lesões no DNA.

FANCD2, FANCD1/BRCA2 e RAD51 cofocalizam-se nas mesmas frações de cromatina, tanto em células expostas a RI quanto a agentes *cross-link*.

BRCA2 por sua vez interage diretamente com a proteína RAD51, modulando sua atividade (Hussain et al, 2004; Wang e D'Andrea, 2004).

FANCD1/BRCA2 e RAD51 são essenciais para a recombinação homóloga. Os domínios BRC de FANCD1/BRCA2 ligam-se diretamente a RAD51. Esta, por sua vez é uma enzima de recombinação que se liga a DNAs fita simples formando um filamento nucleoproteico essencial para os mecanismos de recombinação. A formação do filamento nucleoproteico permite que RAD51 ligada a DNA fita simples “invada” e promova o pareamento com as bases homologas em dupla-fita, iniciando o intercambio de informação entre as cromátides irmãs. RAD 51 também interage com fatores de replicação como PCNA e RPA, e com o complexo BLM – topo III α . Este último está envolvido na dissolução de junções *Holliday* (uma estrutura intermediária do processo de recombinação homóloga) (Meetei et al, 2003; Wu et al, 2005).

É possível que FANCD2 seja importante para a formação de foci de RAD51 e FANCD1/BRCA2. Entretanto a ocorrência desse fenômeno é controversa (Pichierri et al, 2002; Hussain et al, 2004; Wang e D'Andrea, 2004; Ohashi et al, 2005).

b) A via Fanconi e os pontos de checagem de lesões de DNA

Pontos de checagem são tradicionalmente definidos como cascatas de sinalização molecular que promovem uma interrupção ou uma parada no ciclo celular em resposta a lesões no DNA, e assim a célula dispõe de mais tempo para reparar as lesões.

Recentes evidências mostram os papéis interligados entre a maquinaria molecular dos pontos de checagem e a ativação do reparo de DNA, remodelamento da cromatina, modulação de programas transcricionais e apoptose. Dessa forma, a via Fanconi também se encontra interligada com vias que promovem os pontos de checagem.

ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) é uma cinase que se posiciona bem no início da cascata de sinalização gerada por DSBs induzidas por radiações

ionizantes. Alguns alvos à montante de ATM são proteínas envolvidas na promoção de pontos de checagem e de reparo de DNA, que incluem p53, Mdm2, Chk1, Chk2, Nbs1, SMC1, BRCA1 e FANCD2. Porém, essas proteínas ainda podem ser fosforiladas em células A-T (*ataxia-telangiectasia*). Essa fosforilação independente de ATM é promovida por ATR (*ATM-related protein*). Nota-se, então, que ATM e ATR possuem alguns substratos específicos sobrepostos (Khanna e Jackson, 2001; Kurz e Less-Miller, 2004). Mas, apesar da aparente sobreposição de funções, já foi demonstrado, por exemplo, que a fosforilação de p53 em resposta a radiação ionizante é ATM-dependente, enquanto ATR media a fosforilação de p53 induzida pela radiação ultravioleta (agente causador de interrupção de forquilhas de replicação) (Stiff et al, 2005). Assim, é possível que ATM e ATR atuem paralelamente, com alguns substratos em comum nas vias de reparo de DNA, mas respondam primordialmente a diferentes tipos de lesão (Khanna e Jackson, 2001).

Células deficientes em ATM, ou em algum dos substratos desta enzima citados acima, exibem o fenótipo de síntese de DNA radioresistente porque são deficientes na checagem do ciclo celular em resposta a lesões produzidas por radiações ionizantes.

FANCD2 está envolvida na promoção do ponto de checagem de fase intra-S induzida por radiação ionizante em células normais (Taniguchi e D'Andrea, 2002). Após a exposição a RI, FANCD2 é fosforilada por ATM em diversos sítios. Essa fosforilação também é dependente de NBS1 (Nakanishi et al, 2002) e necessária para o estabelecimento do ponto de checagem de fase intra-S induzido por RI, mas não é necessária para a sobrevivência das células portando lesões de DNA do tipo *cross-link*. Em contraste, a monoubiquitinação de FANCD2 é necessária pra resistência a *ICLs*, mas não para a promoção do ponto de checagem de fase intra-S (Taniguchi e D'Andrea, 2002). Isso demonstra funções independentes de FANCD2, resultantes de duas modificações pós-traducionais.

Células Fanconi não interrompem a síntese de DNA em resposta a *ICLs*, enquanto as células normais param o ciclo. O que significa que células Fanconi também possuem defeitos na ativação do ponto de checagem de fase S

induzido por *ICLs*, da mesma forma que células deficientes em ATM e NBS1. As fosforilações de NBS1 e FANCD2 induzida por *ICLs* são dependentes de ATR, e necessárias para a promoção do ponto de checagem de fase S induzido por lesões no DNA do tipo *cross-link* (Pichierri et al, 2004).

c) A via Fanconi e o reparo de *Interstrand Cross-Links*

Agentes *cross-link* são drogas que causam lesões no DNA através da formação de pontes, ligadas covalentemente, entre as duas fitas de DNA. Essas pontes são conhecidas como *interstrand cross-links* (*ICLs*), uma classe de lesões de DNA extremamente tóxica. Isso se deve ao fato de que, ao ligar as duas fitas de DNA, afeta sua estrutura e processos celulares vitais como replicação e transcrição, o que é extremamente citotóxico principalmente para células em proliferação. Devido a essa grande citotoxicidade, os agentes *cross-link* são considerados as drogas mais efetivas usadas na quimioterapia. Entre estas drogas encontramos Melfalan, Busulfan, Carmustina, Clorambucil, Cis-platina, Ciclofosfamida, e Mitomicina C (Grompe e D'Andrea, 2001; Rosselli et al, 2005; Niedernhofer et al, 2005).

Assim, o fato das células Fanconi serem extremamente sensíveis a esse tipo de lesão no DNA, aponta para a incapacidade destas células no reparo desse tipo de lesão. Porém, essa sensibilidade também pode ser consequência de anomalias nos mecanismos de controle do ciclo celular, de apoptose e de inativação metabólica dos agentes indutores de *cross-links* (Niedernhofer et al, 2005).

O metabolismo endógeno também pode gerar *ICLs* espontâneas. Como por exemplo, o malondialdeído ou bioproductos da peroxidação de lipídios (via metabólica que ocorre predominantemente no fígado, o que pode explicar a incidência aumentada de tumores no órgão, além de outros problemas relacionados) (Niedernhofer et al, 2005).

Os mecanismos envolvidos no reparo das *ICLs* envolvem etapas clássicas que constituem as vias de reparo de lesões do DNA: reconhecimento das lesões, remoção, e reconstituição da estrutura informativa do DNA. E também as vias de sinalização envolvidas na parada do ciclo celular e apoptose. Porém

esses mecanismos ainda são pouco compreendidos (Niedernhofer et al, 2005; Noll et al, 2006).

Em todas as células, a replicação do DNA é interrompida por lesões do tipo *cross-link* e para a remoção desse tipo de lesão, é necessária a quebra de ambas as fitas de DNA (*DSBs*) (Niedernhofer et al, 2005). Existem dois mecanismos distintos e complementares para o reparo de *DSBs* – Recombinação Homóloga (RH) e *Non-Homologous End – Joining* (NHEJ). Na RH, as extremidades do DNA são modificadas por nucleases na direção 5'→3'. As caudas de fitas simples resultantes desse processo interagem com a dupla hélice de uma outra molécula homóloga. Uma cromátide irmã ou um cromossomo homólogo que sirva como molde para a cópia da informação sem erros. Em contraste, a *NHJE* não requer um molde homólogo e sem lesões, nem homologia entre as extremidades a serem unidas. Há apenas a ligação das duas extremidades. Conseqüentemente, *NHEJ* freqüentemente gera erros e pequenas deleções (Khanna e Jackson , 2001; Noll et al, 2006).

ICLs são fortes indutores de intercambio entre cromátides-irmãs (*Sister-Chromatid Exchange - SCE*). *SCEs* representam a troca recíproca de fitas de DNA entre cromátides irmãs idênticas utilizando-se da maquinaria de recombinação homóloga. O DNA presente na extremidade da cromátide quebrada pareia-se com a outra cromátide-irmã usando-a como molde para a síntese da informação perdida. Esse tipo de *DSBs*, que gera *SCEs*, geralmente ocorre na fase S do ciclo celular. *DSBs* que resultam em duas extremidades, como as causadas por radiação ionizante, geralmente não induzem a formação de *SCE*. Portanto, tomadas em conjunto, essas *SCEs* surgem entre o reparo por recombinação homóloga de *DSBs* geradas durante a replicação do DNA e o reparo por recombinação homóloga de *cross-links* de DNA.

Além das *SCEs*, em uma pequena fração das células (aproximadamente 5%) tratadas com agentes *cross-links* , observa-se formações cromossômicas radiais. Estruturas radiais são formadas quando cromátides irmãs, contendo quebras, se fundem a diferentes cromossomos erroneamente. A formação de estruturas radiais se dá através de *DSBs* durante a replicação do

DNA. E é possível que elas venham a se formar quando reparo por recombinação homóloga das *DSBs* não ocorrer.

A frequência de formação de *SCEs* em células Fanconi tratadas com agentes *cross-links* é normal. Porém o número de estruturas radiais aumenta dramaticamente. Múltiplas estruturas radiais ocorrem em 30% a 100% nas células Fanconi. E essa característica é usada como critério de diagnóstico para anemia de Fanconi. São esses alguns dos fatos que sugerem que células Fanconi são defeituosas no reparo de *DSBs* induzidas por *ICLs* via recombinação homóloga, e/ou então na promoção de pontos de checagem do ciclo celular, que permitem que a célula promova um reparo efetivo antes de continuar o ciclo.

As células Fanconi, porém, não são totalmente incapacitadas em promover a recombinação homóloga, como demonstrado pela sua capacidade de formação de *SCE* e *DSBs* (Niedernhofer et al, 2005). Rothfuss e Grompe em 2004 sugeriram um modelo onde, durante a fase S, forquilhas de replicação interrompidas por *ICLs* ativam exonucleases como ERCC1/XPF, gerando as *DSBs*, que por sua vez, ativam a via Fanconi/BRCA e logo a monoubiquitinação de FANCD2. Sem a via Fanconi funcional, não há parada do ciclo celular na fase S para o reparo de *ICLs* e células Fanconi prosseguem com a síntese de DNA e com a continuidade do ciclo, mesmo mediante a geração de *DSBs* nos sítios de lesão. A representação esquemática de um modelo especulativo de reparo *cross-links* encontra-se na **figura 5**.

Segundo o modelo, a interrupção da progressão da forquilha de replicação por si só pode desencadear a sinalização para o reparo. A proteína ATR é um provável sensor. A ativação de ATR pela parada da maquinaria de replicação leva a fosforilação da histona H2AX. Isso leva a criação de numerosos sítios de alta afinidade para ligação de proteínas envolvidas no processamento de *DSBs* como RAD51, BRCA2, PCNA, RPA e o próprio complexo Fanconi. Assim, temos o aumento da concentração de proteínas específicas nesses *foci*, acelerando a cascata de reações necessárias para solução do problema.

Para a remoção de *ICLs*, o segmento de DNA atingido deve ser retirado de pelo menos uma das fitas. Há, então, clivagens endonucleásicas tanto

à jusante e a montante da lesão. A consequência dessas clivagens é a geração de *DSBs*. Ainda não se tem conhecimento desses processos de clivagens, mas uma proteína candidata a responsável por isso é a ERCC1-XPF (Niedernhofer et al, 2004). Esta proteína está relacionada com outros sistemas de reparo de DNA como o reparo por excisão de nucleotídeos (NER). A clivagem das fitas de DNA requer primeiramente a abertura da α -hélice próxima à lesão, podendo ser promovida por FANCM. Ainda, a proteína RPA, que se liga a DNA fita simples, também tem seu papel no direcionamento da clivagem específica pela endonuclease ERCC1-XPF.

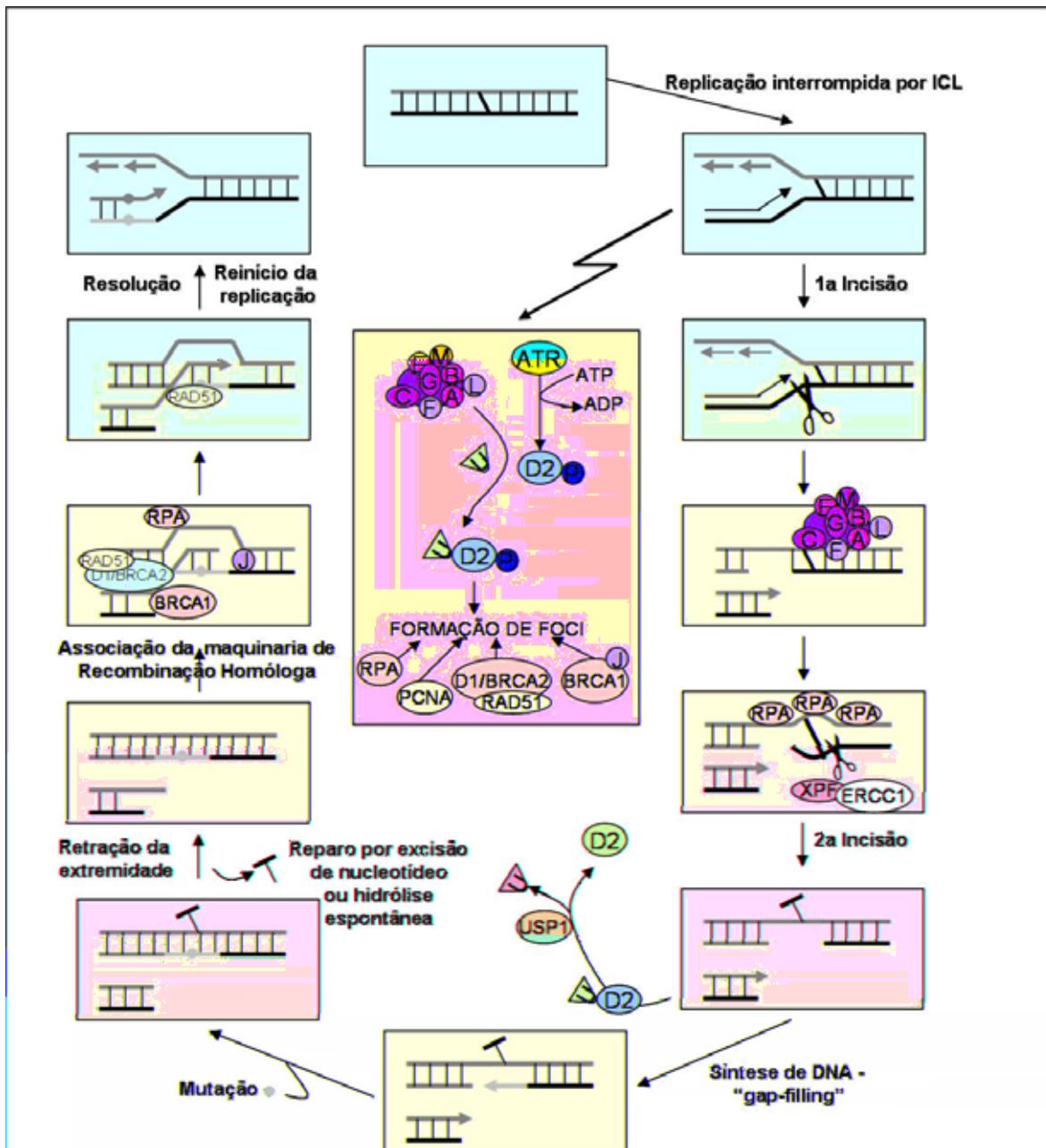


Figura 5: Modelo especulativo da via de reparo de ICLs, destacando o envolvimento da via Fanconi e suas proteínas. (Adaptado de Niedernhofer et al, 2005)

O *gap*, o espaço resultante da deslocação do ICL agora deve ser restaurado, processo esse que provavelmente é feito por uma polimerase *error-prone* especializada "*trans-lesion*" (o que pode vir a gerar mutações). Após a

remoção da *ICL* e a restauração do espaço, o reparo da *DSB* gerada deve ser feito.

A fita de DNA líder, interrompida pela quebra, precisa parear-se com a agora intacta fita complementar. Esse processo requer uma helicase que faça o molde acessível (e no qual *FANCI* é um forte candidato). Mas primeiramente, há uma retração da extremidade quebrada até a reestruturação de uma extremidade 3'-OH que possa parear-se com sua cromátide-irmã. Nesses processos há participação da maquinaria de recombinação homóloga.

A resolução da recombinação permite o restabelecimento da forquilha de replicação. Entre as proteínas envolvidas na conclusão do processo está o complexo BLM-topo III α , que também interage com o *Fanc-core*. (Niedernhofer et al, 2005). Porém o papel preciso das proteínas Fanconi nesse processo ainda é obscuro.

Obviamente, existem muitas lacunas nesse modelo, principalmente em relação à própria participação das proteínas Fanconi. O colapso da forquilha de replicação vem seguido da indução da formação de *DSBs* em razão de regiões *ssDNA* disponíveis para a ação de nucleases. Logo, a maquinaria de recombinação homóloga é recrutada. As proteínas Fanconi não participam da formação das *DSBs* por indução de *ICLs*, mas elas são necessárias para a associação em *foci* nuclear e da fosforilação do complexo MRN e da helicase BLM, ambas componentes importantes da maquinaria de recombinação (Pichierri et al, 2004).

V. Outros papéis atribuídos às proteínas Fanconi

Radicais de oxigênio gerados durante a redução de O₂ podem interagir com as bases do DNA ou com os resíduos de desoxirribose, produzindo bases errôneas ou quebra das fitas. Os radicais de oxigênio também tem a capacidade de oxidar moléculas protéicas e lipídicas, gerando intermediários que podem reagir com o DNA, formando adutos (Marnett, 2000).

Muitas evidências apontam o envolvimento do estresse oxidativo com o fenótipo Fanconi. Essas evidências partiram principalmente da observação

os efeitos da tensão de oxigênio nos níveis de aberrações cromossômicas em linfoblastos Fanconi; e os fibroblastos Fanconi crescem melhor em baixas tensões de oxigênio do que aqueles que são cultivados a 20% de oxigênio (Bogliolo et al, 2002).

A proteína Fanconi C, ao contrário das outras de seu grupo, é uma proteína predominantemente citoplasmática que já se mostrou importante em processos como apoptose, controle do ciclo celular e resposta ao estresse oxidativo. Evidências mostram que FANCC liga-se a várias proteínas citoplasmáticas como *mitotic cyclin-dependent kinase* cdc2 (ciclo celular), as chaperonas GRP94 e HSP70, STAT1 e FAZF (proteínas de sinalização e fatores de transcrição), NADPH:cytochrome P450 reductase (RED) e glutathione S-transferase (metabolismo oxidativo) (Pagano et al, 2005).

Os citocromos P450 fazem parte de uma super família de proteínas que catalisam a oxidação de diversas substâncias tanto endógenas quanto xenobióticas. O metabolismo dependente de P450 requer dois componentes: P450 e RED. Em células Fanconi C a detoxicação microsomal é anômala, indicando o papel da proteína FANCC como um regulador negativo da atividade de RED. Uma atividade elevada de RED leva a geração de espécies reativas de oxigênio, afetando a viabilidade celular (Kruyt et al, 1998).

Estudos recentes também sugeriram a interação entre FANCG e o citocromo P450 2E1 (CYP2E1). CYP2E1 é membro da superfamília P450 e está associada à produção de intermediários reativos de oxigênio e pela bioativação de carcinógenos. Níveis constitutivamente altos de CYP2E1, geraram altos níveis de espécies reativas de oxigênio em uma linhagem de linfoblasto FANCG, enquanto a complementação dessas células com gene FANCG selvagem foi associada à queda dos níveis de CYP2E1. Essas evidências sugerem que a interação de CYP2E1 com FANCG pode alterar o metabolismo oxidativo (Futaki et al, 2002).

O envolvimento das proteínas Fanconi no controle da apoptose pode explicar um dos sintomas clínicos mais críticos da anemia de Fanconi: a deficiência na hematopoiese. A indução/repressão da apoptose é feita através do controle de diversas citocinas possuem um papel importante na maturação de

células progenitoras na medula óssea. Linfoblastos Fanconi entram em apoptose espontaneamente *in vitro* com mais frequência que células normais. Muitas linhas de pesquisa investigaram a indução da apoptose mediada por p53 em resposta a exposição a MMC e radiação ionizante, porém os resultados parecem controversos. Rosselli e colaboradores (1995) observaram uma indução defeituosa de p53, enquanto outros estudos reportaram a indução de p53 normal em células Fanconi (Kruyt et al, 1998).

Anomalias na via Fanconi/BRCA tem sido observada em uma variedade de cânceres humanos, sugerindo seu mecanismo molecular para a sensibilidade à quimioterapia com agentes *cross-links* (Cisplatina, MMC e Maphalan). A **tabela 2** resume os trabalhos recentes que descrevem anomalias nos genes Fanconi em cânceres na população geral (Tanigushi e D'Andrea, 2006).

Células tumorais de ovário são inicialmente sensíveis à cisplatina, mas tornam-se refratárias a esta com o tempo. Em linhagens de câncer de ovário (como a linhagem 2008), a metilação da região promotora do gene FANCF causa a supressão do mesmo, e aumenta a sensibilidade a MMC e cisplatina. FANCF parcialmente desmetilada, restaurou a resistência à cisplatina da linhagem 2008, sugerindo que a reativação da via Fanconi/BRCA é um mecanismo de aquisição de resistência. Em câncer cervical, a metilação da FANCF é freqüente (30% dos casos), especialmente em pacientes com menos de 45 anos que mostram uma freqüência ainda maior de FANCF metilada, o que sugere que a metilação de FANCF pode ter um papel associado à iniciação ou progressão do câncer cervical em pacientes mais jovens (Tanigichi e D'Andrea ,2003).

Anomalias no gene FANCA foram observadas em um grupo de leucemia mielóide agudas (AML). Mutações *missence* em FANCA foram encontradas em 7,6% dos pacientes adultos AML, apesar da relevância funcional ainda ser desconhecida (Condie et al, 2002). Mutações herdadas ou somáticas dos genes FANCC e FANCG estão presentes em um grupo de cânceres de pâncreas. Já foram identificados dois tipos de mutações germinativas em FANCC estão associadas com a perda de heterozigose em um grupo de casos de câncer

pancreático em jovens. Isso sugere que mutações hereditárias em FANCC podem predispor ao câncer pancreático (van der Heijden et al, 2004).

VI. Questões Pendentes

Questões críticas ainda rondam o entendimento da via Fanconi/BRCA. Apesar da monoubiquitinação de FANCD2 seja considerada um dos principais eventos promovidos pela via, pouco se sabe sobre os eventos à jusante dessa modificação pos-traducional.

O papel primário da via Fanconi/BRCA está relacionado com a resposta a lesões de DNA, porém o papel das recentemente descritas FANCM e FANCI, proteínas que possuem domínios de ligação ao DNA, também é desconhecido. Também seria de suma importância à identificação de FANCI e de novas proteínas relacionadas com a via.

Finalmente, a descrição do papel da via FA/BRCA, de seus componentes e de suas respectivas funções, é necessária para um melhor entendimento das vias que promovem a manutenção da estabilidade genômica, como também para a aplicação em tratamentos de câncer na população geral. Além disso, pesquisas já demonstraram a relação da via FA/BRCA não apenas com a anemia de Fanconi diretamente, mas com outras doenças humanas mais prevalentes como a anemia aplástica e câncer.

II. OBJETIVOS

GERAIS:

Identificação de novas proteínas relacionadas à via Fanconi

ESPECÍFICOS:

- Descrição do mapa proteômico bidimensional da linhagem celular de linfoblastos B - HSC536COR
- Comparação de expressão diferencial de células Fanconi (HSC536N) e células Fanconi corrigidas (HSC536COR) em resposta ao tratamento a MMC.

III. MATERIAIS E METODOLOGIAS

I. Cultura de Células

a) Linhagens Celulares

Duas linhagens celulares linfoblastóides provenientes de um mesmo paciente com anemia de Fanconi do grupo de complementação C transformadas por EBV, foram utilizadas nos experimentos:

HSC536COR – Células HSC536 corrigidas por complementação gênica através da transfecção de um vetor contendo o gene *fancc* selvagem e células HSC536N, transfectadas com o mesmo vetor que, entretanto, não continha o gene *fancc*, deixando esta linhagem com as mesmas características fenotípicas das células Fanconi. Essas duas linhagens são, portanto, isogênicas entre si, permitindo a comparação da expressão gênica diferencial relacionada apenas à inativação da proteína FANCC.

Ambas linhagens foram gentilmente cedidas pelo Doutor Filippo Rosselli do Institut Gustave Roussy do Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS, França.

As linhagens foram estocadas em nitrogênio líquido (-196° C) em alíquotas de 10⁶ células/mL em solução composta de 90% de Soro fetal bovino (Cultilab®) e 10% Dimetil sulfóxido (DMSO).

Antes de cada experimento, as alíquotas de células foram descongeladas e cultivadas em meio RPMI1640 (Cultilab®), suplementado com 12% (v/v) de soro fetal bovino (Cultilab®), 1% de antibióticos penicilina e estreptomicina (Invitrogen®) e 200µg/mL de Geneticin® (Invitrogen®). As culturas foram mantidas em estufa regulada a 37° C e 5% CO₂.

b) Tratamento com Mitomicina C

Culturas, mantidas na concentração de 300.000 células/mL, foram tratadas com de Mitomicina C (Sigma-Aldrich®) na concentração de 100ng/mL durante 60 minutos a 37° C e 5% CO₂. Após esse tempo, as células foram transferidas para um novo meio de cultura, sem Mitomicina C e re-incubadas a 37° C e 5% CO₂ durante o tempo desejado. Foram feitos extratos protéicos de células não tratadas e após 12, 24 e 48 horas de tratamento com Mitomicina C.

A contagem de células viáveis era feita através de coloração das lâminas com azul de tripan, que cora especificamente células mortas.

II. Obtenção do extrato protéico

Para obtenção do extrato protéico total das células em cultura foram feitos os seguintes procedimentos: primeiramente as células (aproximadamente 10⁸) foram submetidas à centrifugação durante 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em PBS, sendo esta lavagem com PBS repetida por mais duas vezes. Ao final da lavagem, o PBS foi descartado e as células ressuspensas em 1mL de tampão de lise [Tris-HCl pH 7.5 50mM, NaCl 150mM, β-Glicerolfosfato 10mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, 4% (p/v) NP-40, NaF 50mM]. A lise foi conduzida a 4° C durante 30 minutos e, ao final, o lisado celular foi centrifugado a 4° C, 12000 rpm durante 30 minutos, sendo o sobrenadante recuperado e as proteínas quantificadas pelo método de Bradford e o extrato protéico total conservado a -20° C. O sobrenadante, contendo o extrato protéico total, foi quantificado pelo método de Bradford e conservado a -20° C.

III. Eletroforese Bidimensional

Os extratos protéicos obtidos após a lise das células foram submetidos a dois processos consecutivos de separação com base nas propriedades diferentes das proteínas. Primeiramente as proteínas foram

separadas por isoeletrofocalização em gel de poliacrilamida que forma um gradiente de pH, migrando até seus respectivos pontos isoelétricos. Em seguida, as proteínas foram submetidas a uma eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e separadas de acordo com suas respectivas massas moleculares.

a) Preparação das amostras

Os extratos protéicos foram purificados com auxílio do produto designado como *2D-Clean up kit* (Amersham – GE Healthcare ®), segundo as orientações do fabricante.

Os precipitados protéicos resultantes da purificação com *2D-Clean up kit*, foram solubilizados de novo em 200 μ L de tampão de amostra/hidratação [Uréia 8M, 2% (p/v) NP-40, 2% (v/v) Tampão IPG pH 4 – pH 7 ou pH 6 - pH 11 (Amersham – GE Healthcare ®), DDT 15mM, 0,002% (p/v) azul de bromofenol].

b) Primeira Dimensão - Isoeletrofocalização

A isoeletrofocalização é um método eletroforético que separa proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI). As proteínas são moléculas anfotéricas, que carregam tanto cargas, positivas, negativas ou neutras, dependendo do pH do meio. A carga de uma proteína é resultante da soma de suas cargas positivas e negativas. O ponto isoelétrico é aquele onde a soma dessas cargas é igual a zero. Assim, em um gradiente de pH, sob a influencia de um campo elétrico, a proteína move-se até o ponto onde sua carga se iguala a zero.

A isoeletrofocalização é feita em tiras de *IPG (Immobilized pH gradient)* (Amersham – GE Healthcare ®) de matriz de poliacrilamida, contendo gradientes de pH variando de pH 4 a pH 7 e pH 6 a pH 11, pelo sistema Multiphor™ II Electrophoresis Unit com o Kit Immobiline DryStrip .

As tiras *IPG* de 11 cm, de intervalo de pH entre pH 4 a pH 7, foram re-hidratadas por 16 horas com 200 μ L de tampão de amostra/hidratação [Uréia 8M, 2% (p/v) NP-40, 2% (v/v) Tampão IPG pH 4 – pH 7 (Amersham – GE

Healthcare ®), DDT 15mM, 0,002% (p/v) azul de bromofenol], contendo as amostras protéicas já solubilizadas. Nestes casos, as amostras foram aplicadas diretamente nas tiras. O programa utilizado para isoeletrofocalização das proteínas, encontra-se descrito na **tabela 3**.

Fase	Voltagem (V) (modo Gradiente)	Potência (W)	Tempo(min)	Volts-Hora
1	300	5	1'	1
2	300	5	360'	1800
3	3500	5	300'	9500
4	3500	5	330'	19250
Total			991'	30550

Condições de migração: 0,5 mA por tira *IPG* a 20° C

Tabela 3. Programa de isoeletrofocalização para strips de pH4 – pH7 em aparelho Multiphor II e fonte EPS 3501 XL, Amersham – GE Healthcare®

As tiras de 11 cm de intervalo de pH entre pH 6 e pH 11, foram re-hidratadas com 200µL de tampão de hidratação [Uréia 8M, 2% (p/v) NP-40, 2% (v/v) Tampão *IPG* pH 6 - pH 11 (Amersham – GE Healthcare ®), 0,002% (p/v) azul de bromofenol, solução DeStreak® 12% (v/v) (Amersham – GE Healthcare ®)], durante 16 horas. Nesse caso, as amostras foram introduzidas através do método *cup-loading*. O tampão de hidratação (100µL), contendo as proteínas solubilizadas (numa concentração de 100µg/µL) foi aplicado nas tiras através de pequenos copos durante a isoeletrofocalização. O programa utilizado encontra-se indicado na **tabela 4**.

Fase	Voltagem (V) (modo Gradiente)	Potência (W)	Tempo (min)
1	150	5	1'
2	150	5	60'
3	300	5	60'
4	300	5	300'
5	3500	5	300'
6	3500	5	330'
Total			1051'

Condições de migração: 0,5 mA por tira a 20° C.

Tabela 4. Programa de isoeletrofocalização para strips de pH6 – pH11 em aparelho Multiphor II e fonte EPS 3501 XL, Amersham – GE Healthcare®

c) Segunda Dimensão – SDS-PAGE

Após o término da isoeletrofocalização, as tiras *IPG* foram equilibradas em tampão SDS [Tris-HCl pH 8.8 50 mM, uréia 6M, 30% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 0,002% (p/v) azul de bromofenol] em duas etapas, como se segue: primeiramente, as tiras foram imersas em tampão de equilíbrio 1, contendo DTT 17 mM durante 15 minutos. Após esse tempo, o tampão 1 foi substituído por tampão de equilíbrio 2, contendo Iodoacetoamida 260mM, por mais 15 minutos. Após este procedimento, as tiras estavam prontas para serem submetidas à segunda dimensão SDS-PAGE. A qual foi conduzida de duas maneiras; através do sistema Multiphor® II Electrophoresis Unit e o sistema Hoefer SE 600.

O sistema Multiphor® II Electrophoresis Unit é um sistema horizontal no qual foram utilizados géis ExcelGel (Amersham – GE Healthcare ®) 180X250mm de gradiente de poliacrilamida de 12%-14%.

Em cada ExcelGel® podem ser resolvidas duas tiras *IPG* por corrida. As tiras foram colocadas em contato com a extremidade do gel, de modo que as proteínas focalizadas fossem transferidas para o gel e separadas por peso molecular. Também foram colocados em contato com as extremidades do

ExcelGel® os *Anodic SDS Buffer Strip*® e *Cathode Buffer Strip*®, que são os tampões de corrida. O programa utilizado encontra-se indicado na **tabela 5**.

Fase	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potencia (W)	Tempo
1	200	20	20	40'
2	800	40	40	160'

Temperatura de migração: 15 °C

Tabela 5. Programa para separação de proteínas por peso molecular em gel de poliacrilamida ExcelGel®. Aparelho Multiphor II e fonte EPS 3501 XL, Amersham – GE Healthcare®

O sistema Hoefer SE 600, é um sistema vertical que resolve géis de poliacrilamida de gradiente 10%-15% de 140X150mm. Cada gel foi feito com 24mL de solução de poliacrilamida, sendo esta composta de 12 mL de solução leve [4,1mL de Solução de poliacrilamida (30% (p/v) acrilamida, 0,8% (p/v) N,N' – metilenobisacrilamida), 3,1mL de Solução Tris – HCl pH 8,8 1,5M, 125µL de solução SDS 10% (p/v), 42µL de solução de persulfato de amônio 10% (p/v), 4,2µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina) e 5 mL de água destilada] além de 12 mL de solução pesada [7,5 ml de Solução de poliacrilamida (30% (p/v) acrilamida, 0,8% (p/v) N,N' – metilenobisacrilamida), 3,1mL de Solução Tris – HCl pH 8,8 1,5M, 125µL de solução SDS 10% (p/v), 40µL de solução de persulfato de amônio 10% (p/v), 4,0µL de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina), 2 mL de água destilada e 1,8g de Sacarose]. As duas soluções (leve e pesada) foram misturadas com auxílio de um *Gradient Maker* (dispositivo composto de tubos cilíndricos ligados que promovem a formação de um gradiente de concentração de acrilamida). Após a polimerização do gel, as tiras *IPG*, já equilibradas, foram colocadas na extremidade superior de cada gel e seladas com solução de agarose 5% (p/v), sendo utilizado como tampão de corrida: Tris-Glicina 2 vezes (Tris 0,05M, Glicina 0,4M, 0,2% (p/v) SDS, pH 8,3). A migração das proteínas foi feita sob corrente constante de 25 mA, durante aproximadamente 5 horas.

d) Coloração pelo método “Coomassie Coloidal”

O método de coloração com coomassie coloidal permite a visualização de alterações da expressão, compatíveis com a intensidade de coloração. Para o emprego desta metodologia, os géis foram fixados em solução 30% (v/v) Etanol e 3% (v/v) Ácido fosfórico, durante 30 minutos sob leve agitação, imediatamente após a eletroforese. Após esse tempo, a solução foi substituída por outra nova, e permaneceu por mais 30 minutos. Após a fixação, os géis foram lavados em solução 3% (v/v) de ácido fosfórico por duas vezes, durante 20 minutos cada lavagem.

Em seguida, os géis foram equilibrados durante 30 minutos em 300mL solução 3%(v/v) ácido fosfórico, 18% (v/v) etanol e 15% (p/v) sulfato de amônio. Transcorrido esse tempo, foi adicionado ao gel em solução 0,3g de Coomassie Brilliant Blue G-250. Os géis ficaram sob estas condições durante aproximadamente 24 horas.

e) Coloração por prata não destrutiva

Para fixação dos géis, foi usada solução 50% (v/v) Metanol / 5% (v/v) Ácido acético, durante 60 minutos. A solução de fixação foi descartada e os géis foram lavados em solução 50% (v/v) Metanol. Em seguida, os géis foram sensibilizados em 0,02%(p/v) Tiosulfato de Sódio durante 2 minutos, e lavados por duas vezes em água MilleQ® durante 1 minuto, cada. Depois, foi colocada solução 0,1%(p/v) de Nitrato de prata durante 40 minutos a 4° C, em local escuro. Os géis foram lavados por mais duas vezes em água MilleQ® por 1 minuto cada. Finalmente, a revelação das proteínas por coloração por prata foi obtida em solução 2% (p/v) Carbonato de Sódio e 0,04% (v/v) de Formalina, mantidos sob leve agitação até que o grau de coloração adequado fosse atingido. A reação foi interrompida com 5%(v/v) de ácido acético e os géis foram mantidos em solução 1% (v/v) ácido acético a 4°C.

f) Análise dos Mapas Proteômicos

Após a eletroforese bidimensional, os géis foram escaneados e digitalizados com auxílio do aparelho ImageScanner® II e do programa LabScan® (Amersham – GE Healthcare), sendo analisados no programa ImageMaster 2D Platinum (Amersham – GE Healthcare).

IV. Espectrometria de Massas

A análise de proteomas pode ser encarada como uma metodologia que visa elucidar a informação contida no genoma em termos de estrutura, função e controle dos processos e vias biológicas. Isso se dá através da análise sistemática de proteínas presentes numa célula ou num tecido. E a espectrometria de massas é atualmente a mais importante ferramenta dos estudos proteômicos.

A impressão digital de peptídeos (*Peptide mass fingerprinting*) é baseada no fato de que a obtenção acurada da massa de um grupo de peptídeos derivados da proteólise específica para a seqüência de uma determinada proteína, é altamente efetiva em sua identificação. Proteínas com diferentes seqüências de aminoácidos formarão, após tratamento com uma protease específica, grupos de peptídeos de massas diferentes que darão origem a *fingerprints* de massas de uma proteína específica. Assim, uma pesquisa em banco de dados pode ser feita, utilizando as massas obtidas pelo *peptide mass fingerprinting*, para identificação da proteína.

A determinação das impressões digitais dos peptídeos analisados neste trabalho foi obtida por análise em MALDI - TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption-ionization – Time of Flight*) de amostras de digestões por tripsina de proteínas previamente separadas por eletroforese bidimensional. Uma matriz orgânica é misturada às amostras em uma placa. A matriz absorve a energia do Laser, causando a ionização dos peptídeos. A razão m/z dos íons é medida pelo tempo de vôo dos peptídeos ionizados num campo magnético até um detector.

a) Preparação das amostras

Os *spots* resultantes da eletroforese bidimensional foram retirados, cortados em pequenos fragmentos e descorados com 100 μ L de solução 40%(v/v) acetonitrila, bicarbonato de amônio 25mM durante 30 minutos. Após esse tempo, as amostras com solução descorante foram submetidas ao banho sonicador durante 5 minutos. A solução descorante foi descartada e substituída por uma nova, e o processo acima foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, os fragmentos de géis já descorados foram secos em Speed-Vac (Eppendorf) durante 10 minutos. Os géis foram, então, desidratados e, em seguida, foi adicionado 100% de Acetonitrila por 5 minutos. A acetonitrila foi removida e os géis foram secos em Speed-Vac por 10 minutos. Para digestão trípica, aos géis desidratados foram colocados 7 μ L em solução de tripsina Sequenase Grade Modified Trypsin, Porcine – Promega® (20ng/ μ L em solução de 50mM de bicarbonato de amônio), seguido de incubação a 4^o C durante 30 minutos para que a tripsina penetrasse nos fragmentos de gel. Após a re-hidratação com a solução de tripsina, foram adicionados 20 μ L de solução bicarbonato de Amônio 50mM e as amostras sofreram digestão durante 20 horas a 37°C.

A solução de tripsina foi retirada e transferida para um novo tubo. Para extração dos peptídeos digeridos nos géis, foi colocado 50 μ L da solução 50% (v/v) Acetonitrila / 5% (v/v) ácido trifluoroacético (TFA) durante uma hora sob leve agitação. O sobrenadante foi transferido para o tubo novo contendo a solução de tripsina retirada primeiramente, tendo sido adicionada mais uma alíquota da solução 50%ACN/5%TFA por mais uma hora. O sobrenadante foi novamente removido, e os dois extratos foram combinados. Os extratos foram submetidos à secagem total no Speed-Vac por aproximadamente uma hora.

As amostras de peptídeos desidratadas foram reconstituídas pela adição de 3 μ L de solução 50% (v/v) Acetonitrila, 0,1% (v/v) TFA até dissolução dos peptídeos e, em seguida, foram adicionados mais 3 μ L de solução 0,1% (v/v) TFA. Finalmente, 0,5 μ L de solução 0,1% TFA. Os e foram recoido tr, 0,1% nal.n8s pepom(ntmistFApo

As amostras foram analisadas em MALDI-TOF-TOF 4700 (Applied Biosystems). Os resultados de *fingerprint* e de MS/MS foram identificados utilizando o programa MASCOT e o Banco de Dados Humano IPI (International Protein Index)

V. Real Time PCR

a) Extração de RNA total

Aproximadamente 10^6 células HSC536COR e HSC536N controle ou 48 horas após tratamento com MMC, foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min, ressuspensas em PBS 1X e novamente centrifugadas nas mesmas condições da primeira centrifugação, sendo o PBS descartado. O RNA dessas células foi extraído com TRizol de acordo com as instruções do fabricante através de fluxo e refluxo continuado, em seguida, os homogeneizados foram incubados por 5 min a 25°C, transferidos para tubos 1,5 mL e centrifugados a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C.

Após transferir os sobrenadantes para um novo tubo, a este foi adicionado 0,2 mL de Clorofórmio e os tubos incubados por 5 min a 27°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C, sendo a fase aquosa de cada extração transferida para tubos novos, aos quais foram adicionados 0,5 mL de Isopropanol. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 27°C, centrifugadas durante 10 minutos, 12.000 x g a 4°C sendo os precipitados de RNA lavados com Etanol gelado 75% e diluídos em água previamente tratada com DEPC. Depois da lavagem, os precipitados foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. Por fim, os precipitados de RNA foram dissolvidos em 50µL de H₂O/ DEPC e estocados a -70°C até o uso.

b) Purificação do RNA

Para eliminar as possíveis contaminações com DNA, os RNAs obtidos foram submetidos à reação de digestão de DNAase seguindo protocolo da RQ1 RNase-free DNase (Promega). Em seguida, o RNA proveniente desta reação foi purificado com kit RNeasy (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante.

c) Desenho dos oligonucleotídeos

Os oligos foram desenhados de acordo com instruções contidas no manual do *Power SYBR[®] Green PCR Master Mix and RT-PCR* (Applied Biosystems), com auxílio da ferramenta disponível *on-line* na página da IDT, USA (www.idt.org). As seqüências dos mRNAs foram obtidas no banco de dados do genoma humano (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide).

A especificidade dos oligos foram determinadas previamente *in silico* diante de sua homologia a dados de mRNA humano através da ferramenta BLAST/HumanGenome (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/humangenome) através de buscas de baixa expectativa (*expect: 10* e *no-filter*). Os melhores oligos foram determinados quando possuíam homologia (*Hits*) exclusivamente com seus alvos. Os iniciadores escolhidos geraram amplicons de 128pb e estão indicados na **tabela 6**.

<u>Alvo</u>	<u>Seqüência 5'-3'</u>	<u>Tamanho</u>	<u>Temp. (°C)</u>
MDC1 fow.	ACCTGAGAACTCCAACCTACCCT	22pb	57,2
MDC1 rev.	GGTCCCACCCATGTTCCAG	19pb	58,2

Tabela 6. Seqüências de *primers* (oligonucleotídeos) utilizados para a amplificação do gene MDC1

d) Real-Time PCR: transcrição reversa (RT)

Após extração e purificação todos os RNAs, controles e tratados, foram quantificados (Biophotometer – Ependorf[®]). Cada reação de RT-PCR foi constituída incubando 1µg de RNA, com 1µL de Mistura de dNTPs (250µM de cada, Invitrogen[®]), 1µL de OligodT18 (500µg/mL, IDT) em um volume final de 12µL durante 65°C por 5 minutos, seguido de incubação no gelo por pelo menos 5 min. Posteriormente, foi adicionado 4µL de 5X RT-*buffer*, 2µL DTT (0,1M), 1µL de Inibidor de RNase (40U/µL, Invitrogen) e 1µL de MMLV RT (200U/µL,

Invitrogen), incubando por 37°C durante 50 min. Os cDNAs foram diluídos para 3 ng/μL com base na adição inicial de 1μg em um total 20μL de volume final de reação e divididos em alíquotas e armazenados a -70°C até uso. A reação foi inativada a 70°C durante 15 minutos.

e) Real-Time PCR: avaliação dos amplicons e PCR

Antes da análise dos *amplicons* com *SYBR[®]Green* (Applied Biosystems), os cDNAs foram amplificados por PCR e resolvidos em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídio. As reações foram constituídas com 1x PCR¹ buffer (20mM Tris-HCl pH 8,4, 50mM KCl), 1,5mM de MgCl₂, 2mM de mistura de dNTPs (Invitrogen), 2μM oligo senso (do gene em questão), 2μM oligo antisenso (do gene em questão), 1 Unidade de *Taq DNA polymerase* (Invitrogen), 1μL cDNA obtido por RT em um volume final de 25μL. Estas reações foram processadas no termociclador (Eppendorf®) programado para incubação inicial 94°C por 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, após esta ciclagem, uma incubação a 72°C durante 2 minutos.

Antes das reações definitivas para verificação nas diferenças da expressão, foram realizadas testes, onde não apenas foi possível determinar condições ideais de PCR, mas também a especificidade *in vitro* dos alvos amplificados pelos oligos abordado nas análises. A amplificação de um produto específico foi apurado através da análise da Curva de *Melting*, pelo programa Opticon Monitor 2.03.

Para análise da expressão gênica diferencial em PCR Tempo-Real foram realizadas reações para curva padrão, dos genes analisados, variando a massa de cDNA em 15ng, 3ng, 600pg, 120pg, 24pg e 4,8pg, em 20μL de reação que também possuía 0,2μM de cada oligo específicos e 1X *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Além disso, foram realizadas reações com 1ng de cDNA seguindo, conservando o volume e as concentrações de oligos e

Power SYBR Green PCR Master Mix previamente citadas. Essas reações foram realizadas em quadruplicatas para cada condição experimental.

As reações para análise em *Real-Time* PCR foram submetidas à incubação inicial no termociclador com 50°C durante 2min; 95°C por 10min, 45 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min.

IV. RESULTADOS

I. Testes de sobrevivência celular

Neste trabalho foi utilizado um par de células isogênicas provenientes de um mesmo doador com anemia de Fanconi do grupo de complementação C. As células HSC536COR foram corrigidas através da expressão ectópica da proteína FANCC enquanto as células HSC536N conservam as mesmas características fenotípicas das células Fanconi.

A **figura 6** mostra a curva de sobrevivência a diferentes concentrações de mitomicina C das linhagens utilizadas. Como pode ser observado, a partir de baixas concentrações de MMC (50 ng/mL) já se observa uma grande diferença de viabilidade entre as células HSC536COR e HSC536N. As células Fanconi (HSC536N) tiveram uma queda de sua viabilidade próxima de 70% quando tratadas com 50 ng/mL de MMC e cerca de 90% quando tratadas com altas concentrações (300 ng/mL) de MMC. Enquanto as células corrigidas (HSC536COR) mostraram uma queda de viabilidade próxima a 20% quando tratadas com 50 ng/mL de MMC e 50% quando tratadas com 300 ng/mL de MMC. Assim, a curva de sobrevivência das células HSC536COR é compatível com curvas células linfoblastóides normais imortalizadas, como demonstrado em estudos anteriores (Pichierri et al, 2002; Pichierri et al, 2004). Esse resultado demonstra as diferenças da viabilidade celular e resistência ao tratamento MMC entre as linhagens Fanconi (HSC536N) e corrigidas (HSC536COR) confirmando o fenótipo diferencial entre as linhagens celulares estudadas e o papel da via Fanconi na promoção da resistência celular a *ICLs*.

Já a **figura 7** mostra a progressão do crescimento celular de HSC536N e HSC536COR tratadas com 100ng/mL de MMC em função do tempo. As células Fanconi (HSC536N) mostraram um decréscimo em sua concentração a partir de 24 horas após o tratamento com MMC, sendo a concentração celular a partir de 72 horas próxima a $0,5 \times 10^5$ células/mL. As células HSC536COR mostraram uma curva continuamente crescente, atingindo uma concentração de $1,2 \times 10^6$ células/mL. A partir da observação destes resultados, foram escolhidos os

melhores tempos pós-tratamento para a obtenção dos extratos protéicos para as análises posteriores. No caso, o tempo máximo pós-tratamento de 48 horas foi escolhido, pois ainda havia uma concentração das células HSC536N suficiente para uma extração de proteínas em concentração satisfatória.

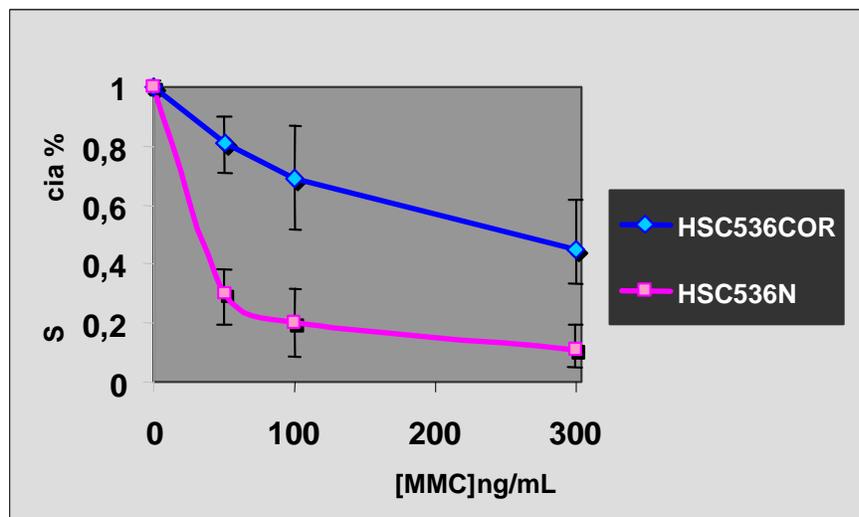


Figura 6. Ensaio de sensibilidade a Mitomicina C (MMC). Os linfoblastos Fanconi (HSC536N) e controle (HSC536COR) foram tratados durante 1 hora com diferentes concentrações de mitomicina C. Após o tratamento o meio com MMC foi descartado e as células foram incubadas por 72 horas com meio fresco a 37 °C e 5% CO₂, para posterior processamento e análise com azul de tripan.



Figura 7. Ensaio de crescimento celular em resposta a Mitomicina C (MMC). Os linfoblastos Fanconi (HSC536N) e controle (HSC536COR) foram tratados durante 1 hora com 100ng/mL de mitomicina C. A abundância e sobrevivência celular foi medida através de processamento com azul de tripan.

Hypothetical protein LOC25900 isoform 3	Eukaryotic translation initiation factor 4B
PDZ and LIM domain protein 1	Ezrin-radixin-moesin binding phosphoprotein 50
Cytochrome c oxidase subunit VIb isoform 1	Stress-induced-phosphoprotein 1
SLC27A4 protein	HLA class I histocompatibility antigen, B-14 alpha chain Precursor
Similar to F-box only protein 9 isoform 3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1
Hypothetical protein FLJ23429	HLA class I histocompatibility antigen, B-42 alpha chain Precursor
Splice Isoform 2 of DEAD-box protein 4	UBA/UBX 33.3 kDa protein
Alpha-enolase	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Protein disulfide-isomerase A3 precursor
Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	Hsc70-interacting protein
Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	Splice Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
Triosephosphate isomerase 1 variant	Adhesion-regulating molecule 1 precursor
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor
Peroxiredoxin 1	Splice Isoform 2 of Ubiquilin-1
Nucleoside diphosphate kinase B	Rho GDP-dissociation inhibitor 2
Peroxiredoxin 5, mitochondrial precursor	Lymphocyte-specific protein 1
Splicing Isoform 2 of Mediator of DNA Damage Checkpoint Protin 1	Tetratricopeptide repeat protein 1
Involucrin	ATP- synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex,subunit d isoform a
Splice Isoform Long of Splicing factor, praline - and glutamine-rich	Splice Isoform 2 of Nucleophosmin
Profilin-1	39S ribosomal protein L12, mitochondrial precursor
Stress-70 protein, mitochondrial precursor	PACAP protein
DUTP pyrophosphatase isoform 3	Tropomyosin 4
HLA class I histocompatibility antigen, A-1 alpha chain Precursor	Tropomyosin alpha 3 chain (Tropomyosin 3) (Tropomyosin gamma). Splice isoform 2
Calponin-3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5
F-actin capping protein alpha-1 subunit	Ran-specific GTPase-activating protein
Hypothetical protein	Stathmin
Prohibitin	DUTP pyrophosphatase isoform 3
Ras-GTPase-activating protein binding protein 1	Nucleoside diphosphate kinase A
Inorganic pyrophosphatase	Prefoldin subunit 5
Nuclear protein Hcc-1	14 kDa phosphohistidine phosphatase
Splice Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
6-phosphogluconolactonase	Transcription factor BTF3 homolog 4
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	PREDICTED: similar to SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2
Proteasome activator complex subunit 1	Actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like
Splice Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	Tubulin-specific chaperone A
Hypothetical protein	Prefoldin subunit 2
GrpE protein homolog 1, mitochondrial precursor	Galectin-1
Splice Isoform 4 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	40S ribosomal protein S12
DJ-1 protein	40S ribosomal protein S2
Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	Fatty acid-binding protein, epidermal
Splice Isoform 2 of Triosephosphate isomerase	
Splice Isoform Short of Proteasome subunit alpha type 1	

Tabela 7. Proteínas componentes do mapa bidimensional da linhagem HSC536COR identificadas por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF).

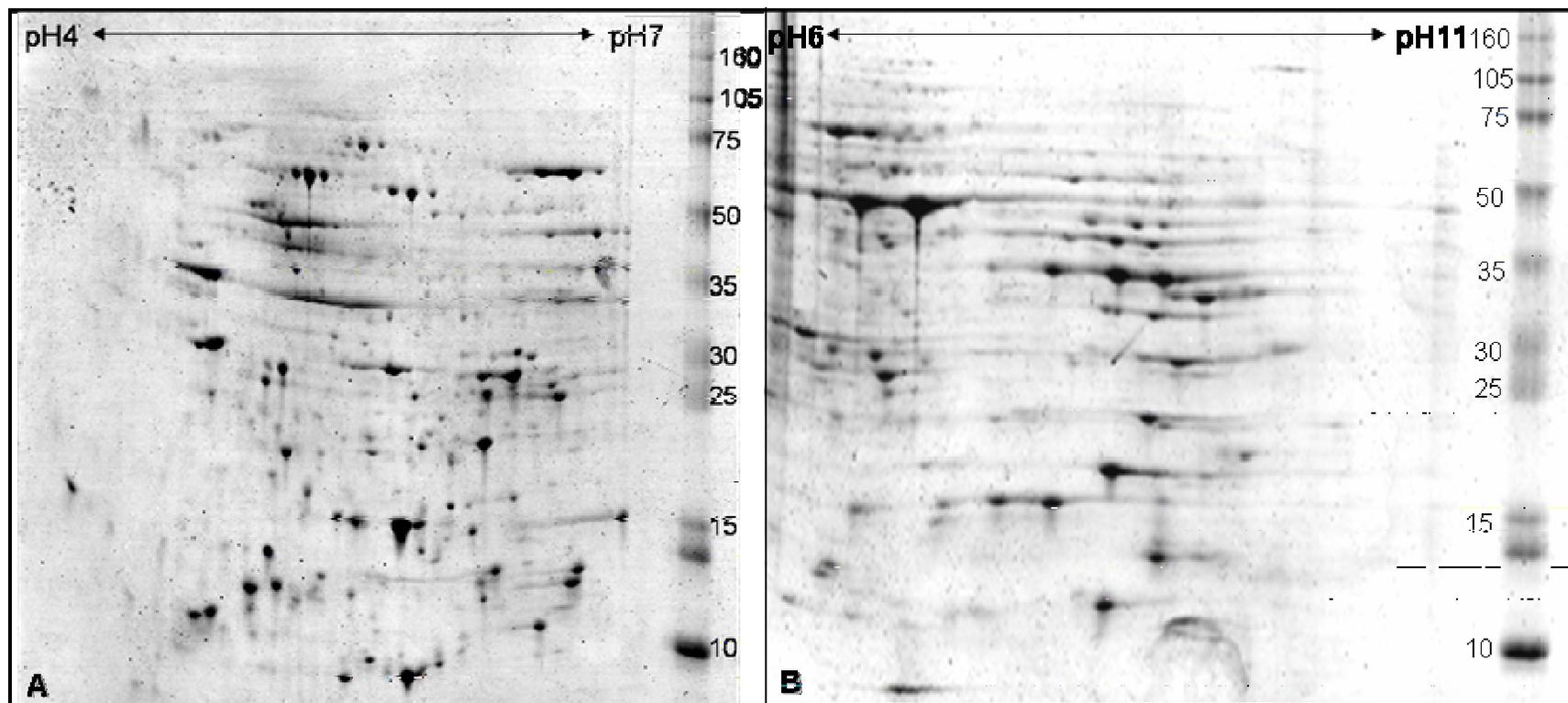


Figura 8. Mapa Proteômico Bidimensional das Células HSC536COR. Géis 2D obtidos a partir de extratos de células HSC536COR sem tratamento, resolvidos entre os intervalos de pH de pH4 a pH7 (A); e entre pH6 a pH11(B).

III. Análise proteômica diferencial entre células HSC536N e HSC536COR

Para a investigação de proteínas diferencialmente expressas em células HSC536COR e HSC536N em resposta ao tratamento com Mitomicina C, os extratos protéicos foram obtidos a partir de células controle ou tratadas com 100 ng/mL de MMC nas condições indicadas no item I de Materiais e Metodologias. Os mapas bidimensionais obtidos podem ser visualizados nas **figuras 9a** (extratos protéicos de células sem tratamento), **9b** (extratos obtidos após 24 horas de tratamento) e **9c** (extratos obtidos após 48 horas tratamento).

Foram observadas sete proteínas diferencialmente expressas, destas foram identificadas seis: Splice Isoform 2 of Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1, Involucrina, Hypothetical protein LOC25900 isoform 3, três isoformas da proteína PDZ/LIM domain protein 1. Com exceção da proteína involucrina, as proteínas se encontravam presentes, ou com expressão significativamente maior, apenas nas células HSC536COR

A análise por densitometria dos *spots* observados na **Figura 10** mostra que a expressão da proteína em questão varia em função do tratamento com MMC sendo, em todos os casos, mais expressa em células HSC536COR do que em células HSC536N. Como pode ser observado na **Figura 10**, a análise comparativa, com base na ocorrência da proteína observada e sua abundância relativa, sugere que esta teve seu acúmulo aumentado cerca de 7 e 2,5, respectivamente 48 e 24 horas após tratamento com 100 ng/mL de MMC. Além disso, a expressão basal da proteína em destaque, é cerca de uma vez e meia maior nas células corrigidas (HSC536COR) em comparação com as células Fanconi (HSC536N). O *spot* correspondente à proteína com expressão significativamente diferente entre as células HSC536COR e HSC536N, observado nas **Figuras 9 e 10** foi recuperado do gel e analisado por espectrometria de massa, sendo o espectro obtido compatível com uma proteína estrutural conhecida como Splice Isoform 2 of Mediator of DNA Damage Checkpoint protein 1 – SI2 MDC1 (Número de acesso: IPI Human Database: IPI00470805).

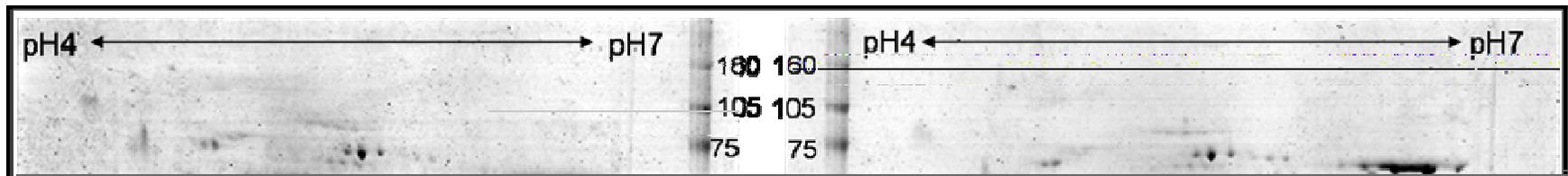


Figura 9 A

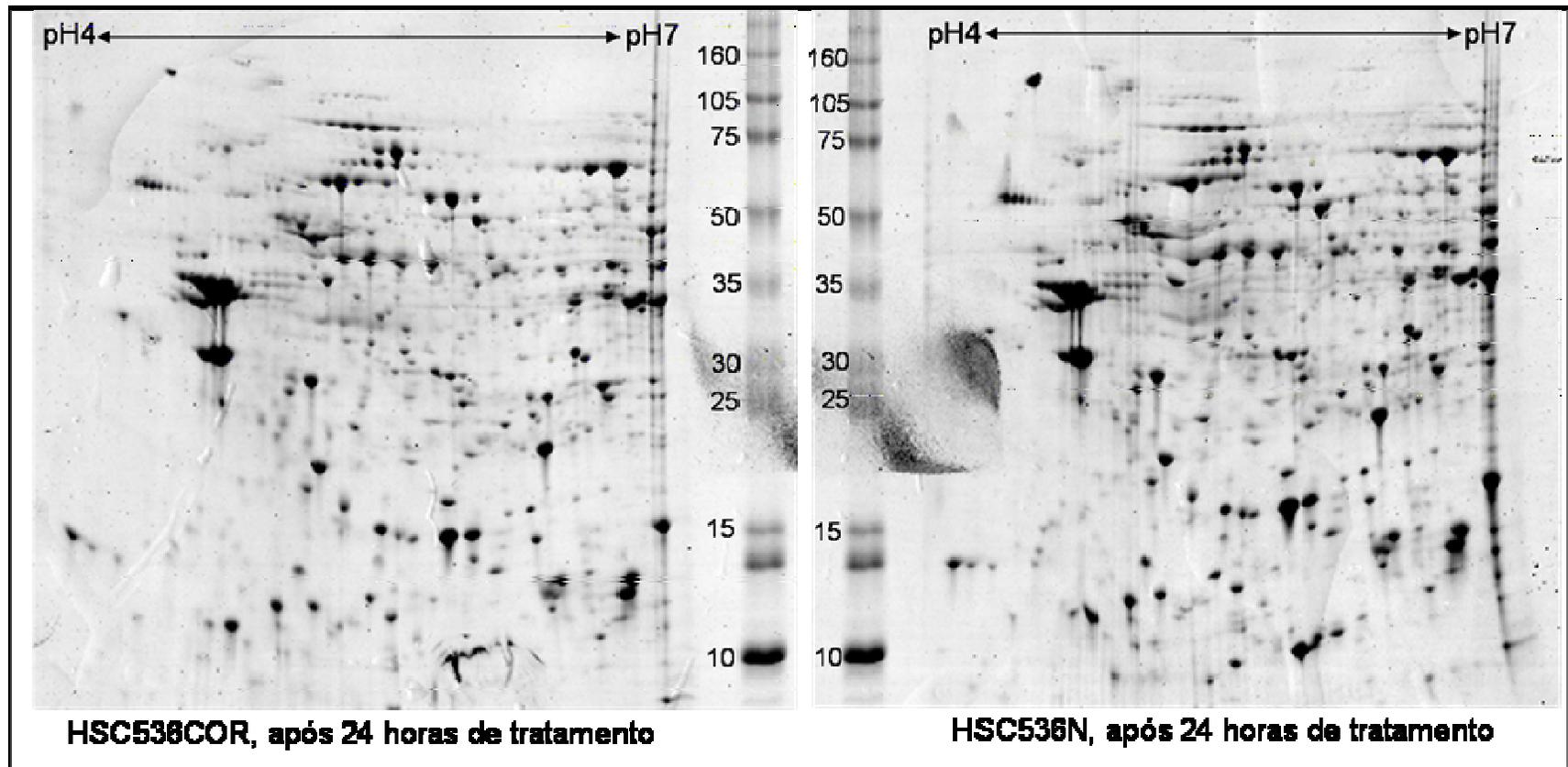


Figura 9 B

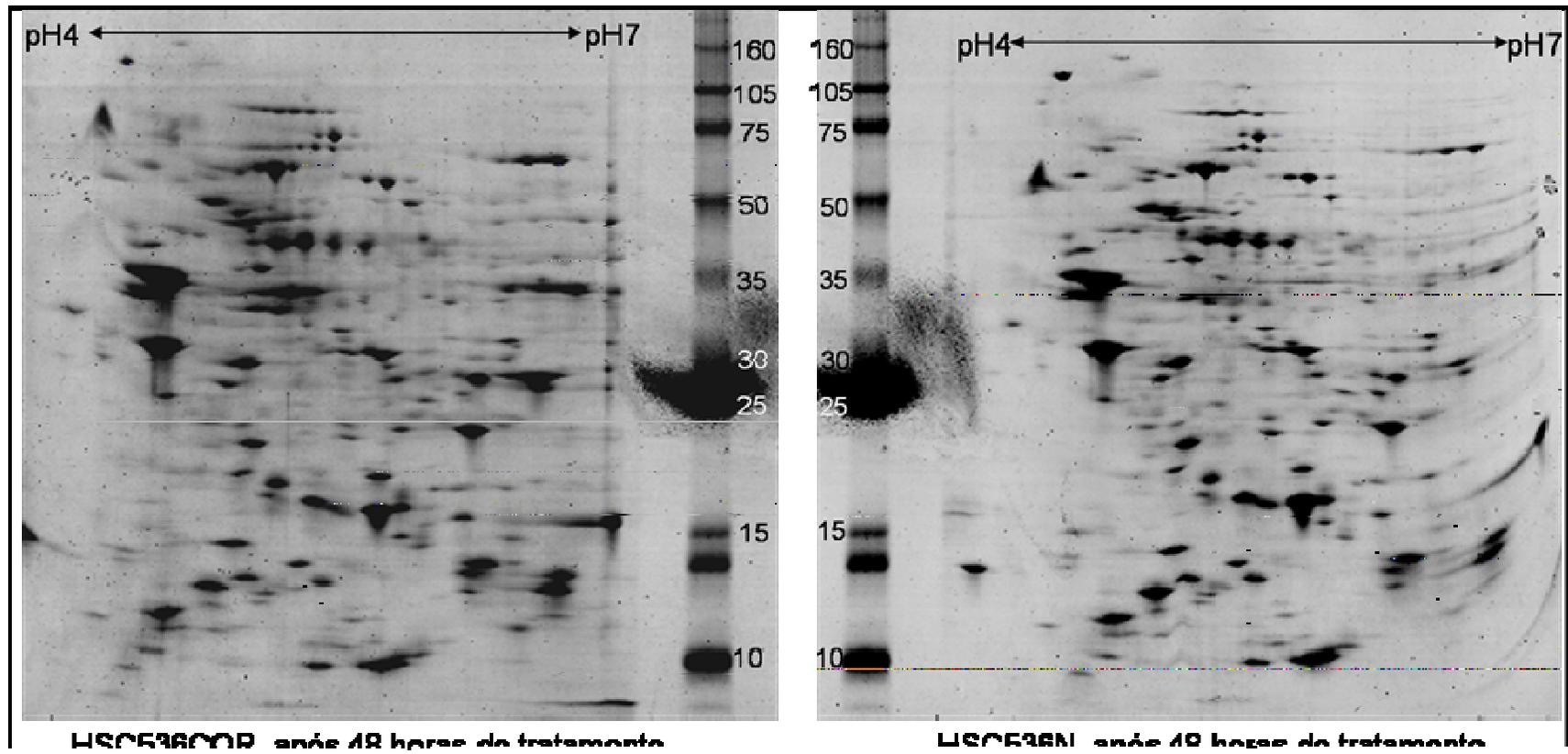


Figura 9 C

Figura 9. Mapas bidimensionais utilizados para a análise de expressão protéica diferencial associada à inativação do gene *fancc* e em função de tratamento com MMC. (A) Sem tratamento (B) 24 horas após tratamento e (C) 48 horas após o tratamento.

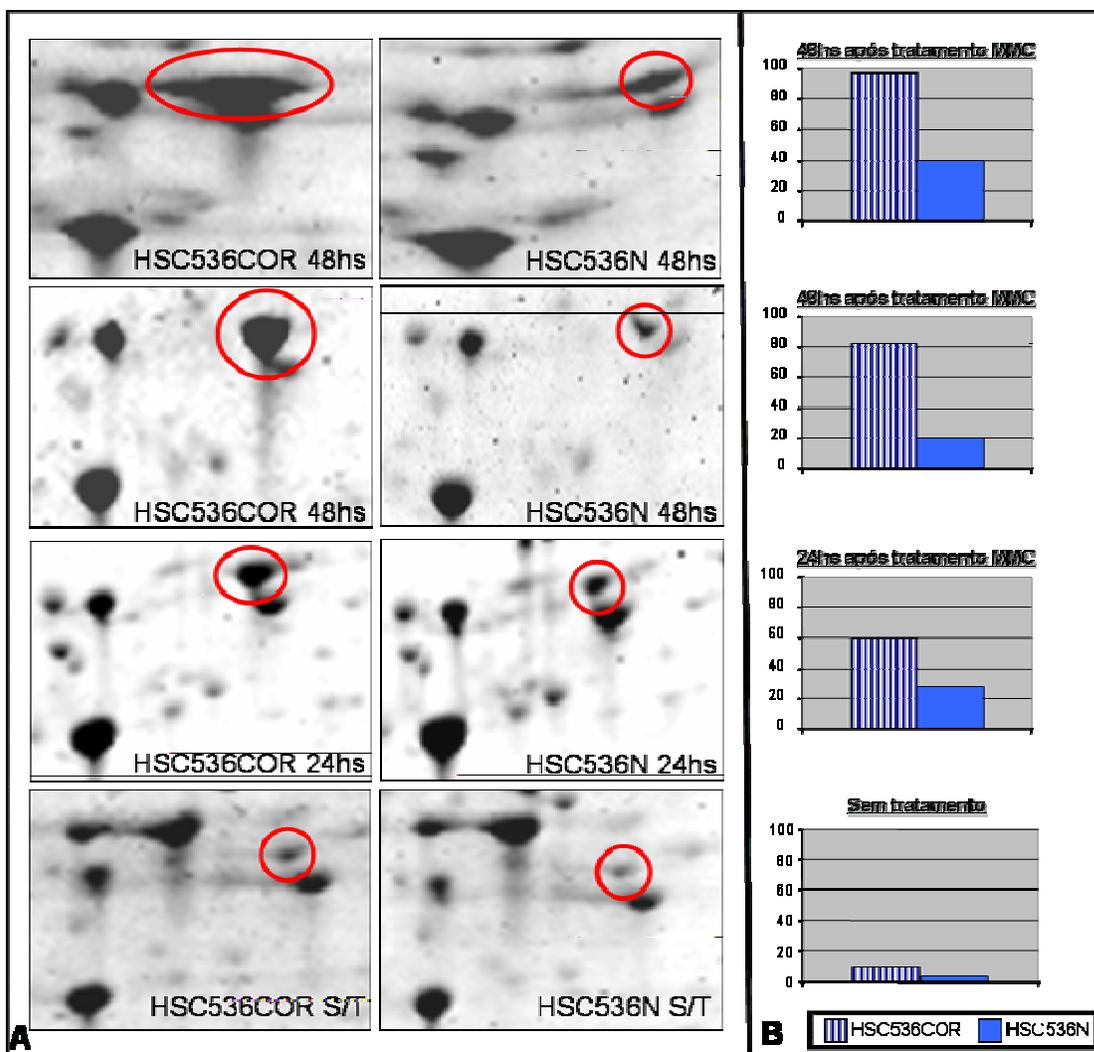


Figura 10. Expressão diferencial de SI2 - MDC1 modulada pela inativação de *fanc*. Células HSC536COR e HSC536N foram tratadas durante 1h com 100 ng/mL de MMC e processadas para análise em eletroforese bidimensional 48 ou 24 horas após o tratamento. Após a eletroforese os géis foram corados pela técnica de *coomassie blue* coloidal. (A) Os *spots* correspondentes à proteína identificada pela técnica de MALDI-ToF como SI2 - MDC1 encontram-se em destaque. A expressão basal de MDC1 em células sem tratamento também pode ser observada e a expressão após 48 horas de tratamento encontra-se em duplicata. (B) Os *spots* foram quantificados por densitometria mostrada no histograma, realizada com auxílio do programa *Image Quant – Molecular Dynamics®*.

Como pode ser observado na **figura 10** há um aumento progressivo de expressão da proteína MDC1 nas células HSC356COR. Isso sugere que a proteína FANCC e/ou a via Fanconi pode estar relacionada com a regulação da expressão de MDC1 ou na manutenção de sua estabilidade.

A segunda proteína identificada foi a Involucrina (Número de Acesso: UniProtKB/Swiss-Prot entry P0747) (**Figura 11**). Esta proteína mostrou seu nível de expressão constitutivamente mais elevado em células HSC536N quando comparados seus níveis de expressão em células HSC536COR. Nesse caso, a expressão diferencial de Involucrina mostrou-se independente do tratamento com MMC (**Figura 11**). A involucrina é uma proteína estrutural que tem sido caracterizada, principalmente, como marcador de diferenciação de queratinócitos do epitélio e componente do *cornified envelop*. (Eckert, 2004)

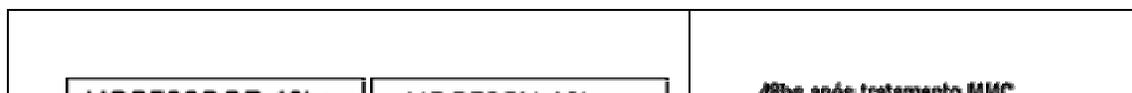


Figura 11. Expressão diferencial da proteína Involucrina. Células HSC536COR e HSC536N foram tratadas como previamente descrito. Após a eletroforese os géis foram corados pela técnica de *coomassie blue* coloidal. (A) Os *spots* correspondentes à proteína identificada pela técnica de MALDI-ToF como Involucrina encontram-se em destaque, estando em duplicata os géis correspondentes aos extratos obtidos após 48 horas tratamento com MMC duplicata. A expressão de Involucrina está sempre aumentada nas células HSC536N, independente do tratamento com MMC. (B) Os *spots* foram quantificados por densitometria mostrada no histograma, realizada com auxílio do programa *Image Quant – Molecular Dynamics®*.

Ainda foram encontradas cinco proteínas diferencialmente expressas encontradas nos mapas bidimensionais dos extratos protéicos de HSC536COR e HSC536N, 48hs após o tratamento com MMC. Estas proteínas estavam ausentes nos mapas protéicos obtidos sem tratamento ou 24 horas após desafio com MMC. As proteínas em destaque (**Figuras 12 e 13**) mostraram elevada expressão em células HSC536COR em resposta ao tratamento com MMC. Essas diferenças de expressão, medidas pela densitometria dos *spots*, são tão significativas que podem ser consideradas casos de Ausência/Presença de expressão dessas proteínas. As proteínas, submetidas à identificação por espectrometria de massas, possuem identidade de Hypothetical protein LOC25900 isoform 3 (**Figura 12A**) (Número de acesso: IPI Human Database: IPI00550316), uma proteína hipotética; e três proteínas identificadas como PDZ/LIM domain protein 1 (Número de acesso: IPI Human Database: IPI00010414) (**Figura 12B**). Tendo sido identificadas as três proteínas com a mesma identidade, apesar de estarem em faixas de pH diferentes, porém próximas, é possível que sejam isoformas da mesma proteína ou que estas tenham sofrido algum tipo de modificação pós – traducional que tenha alterado sua distribuição de cargas elétricas e logo seu ponto isoelétrico. PDZ/LIM domain protein 1 é uma proteína adaptadora envolvida com diversas vias de sinalização incluindo aquelas que envolvem a polaridade e migração celular, e ativação de vias mitogênicas.

Não foi possível obter a identificação da 5ª proteína, porém, como pode ser observado na **figura 13**, ela também está modulada positivamente em células HSC536COR, apresentando uma expressão elevada após 48 horas de tratamento, enquanto em células HSC536N sua expressão não é perceptível.

Assim sendo, como já observado para IS2 – MDC1, é provável que a modulação da expressão dessas proteínas (**Figuras 12 e 13**) seja dependente do funcionamento da via FA/BRCA em resposta ao tratamento com MMC, principalmente em eventos mais tardios (em torno de 48 horas pós-tratamento).

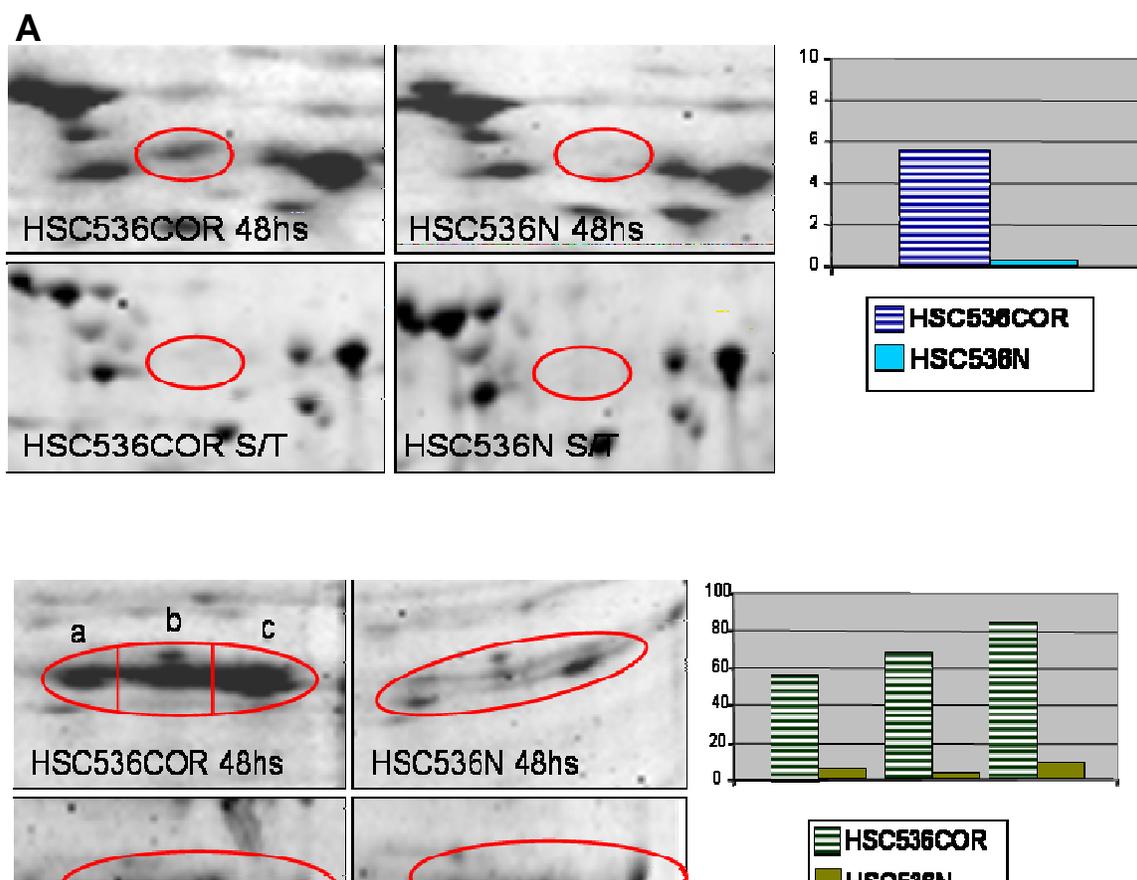


Figura 12. Proteínas diferencialmente expressas após 48 horas de tratamento com MMC entre células HSC536COR e HSC536N. As proteínas em destaque apresentam-se positivamente reguladas em células HSC536COR e ausentes ou negativamente reguladas em células HSC536N em resposta ao tratamento com MMC. (A) Hypothetical protein LOC25900 isoform 3; (B) PDZ/LIM domain protein 1. Os gráficos indicam a densitometria relativa dos *spots* em tempo de 48 horas, medida através do programa *Image Quant – Molecular Dynamics*®.

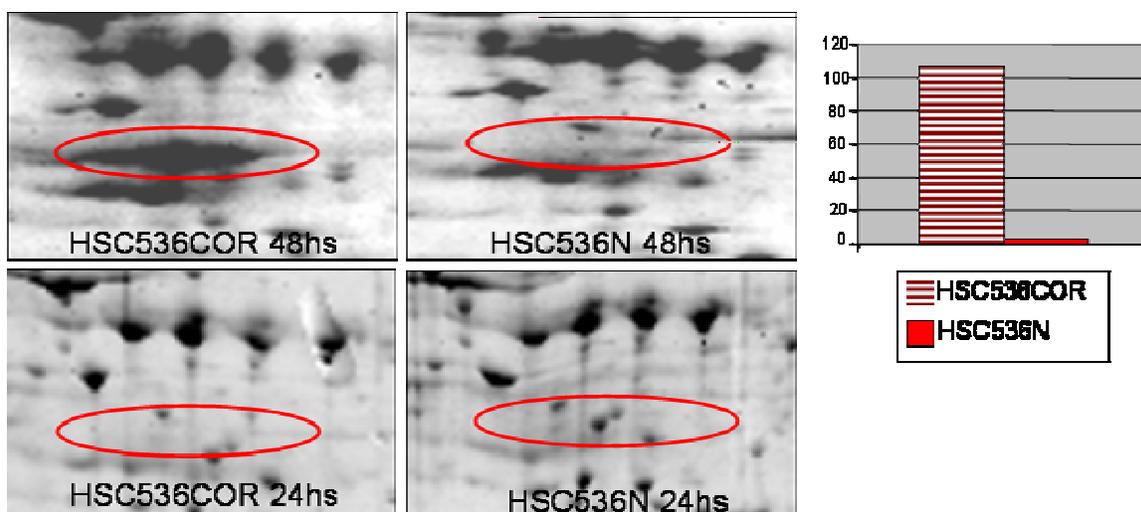


Figura 13. Proteína diferencialmente expressa após 48 horas de tratamento com MMC entre células HSC536COR e HSC536N. A proteína em destaque apresenta-se positivamente regulada em células HSC536COR e ausentes ou negativamente reguladas em células HSC536N em resposta ao tratamento com MMC. O gráfico indica a densitometria relativa do *spot* em tempo de 48 horas medida através do programa *Image Quant – Molecular Dynamics®*.

A **Figura 14** resume os resultados obtidos com eletroforese bidimensional das proteínas resolvidas em gel de poliacrilamida com gradiente 10%- 15% e entre a faixa de pH de pH6 e pH11. Devido a maior sensibilidade da coloração com prata, essa metodologia foi inicialmente empregada, pois possibilita a visualização de um maior número de *spots*. Neste caso, empregamos extratos protéicos obtidos a partir de células HSC536COR (proficientes na ativação da via Fanconi) e de células HSC536N (portando mutação deletéria no gene *fanc*) tratadas ou não com mitomicina C como indicado em Materiais e Metodologias (**item I**).

Como pôde ser observado através da análise pelo programa ImageMaster 2D Platinum (Amersham – GE Healthcare), não foram encontrados proteínas diferencialmente expressas nestes experimentos. As possíveis alterações observadas podem ser atribuídas a artefatos de técnica.

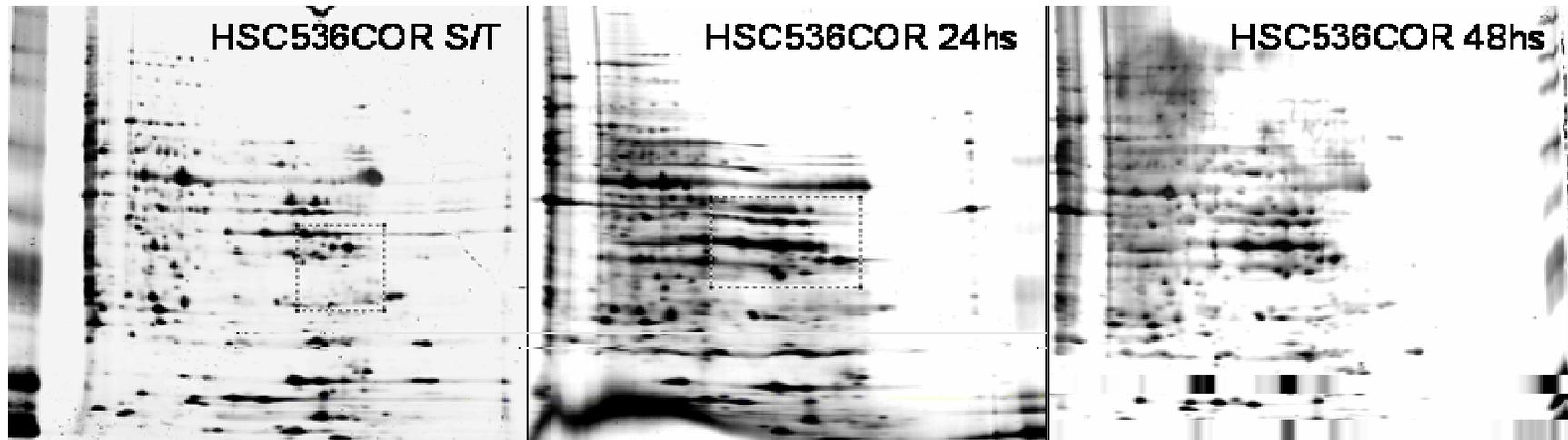


Figura 14. Géis bidimensionais de intervalo de pH entre pH6 a pH11, resolvidos em gel de poliacrilamida de gradiente 10% a 15%, corados com prata.

IV. *Real-Time PCR* – Comparação dos níveis transcricionais de MDC1 entre HSC536COR e HSC536N

Após verificarmos que a proteína MDC1 encontra-se diferencialmente expressa entre as células proficientes (HSC536COR) e deficientes (HSC536N) na via Fanconi tratadas com agente *crosslink* MMC, decidimos analisar os níveis de expressão do transcrito do gene *mdc1* entre as mesmas células. Isto foi feito através da técnica de PCR em tempo real.

A análise em tempo real utilizando o corante fluorescente *SYBR*[®] *Green* requer que os oligos sejam específicos a seus alvos, o que pode ser determinado tanto através de análises *in silico*, verificando homologia através do programa BLAST, quanto através da curva de *Melting* que pode ser obtida ao fim da reação de PCR em tempo real pelo programa utilizado na análise da reação. Por meio do BLAST, todos os oligos utilizados neste experimento apresentavam homologia específica com *mdc1*. Além disso, os gráficos das curvas de *Melting* mostraram picos únicos respectivamente para os amplicons de *mdc1* e beta-actina (anexo 2).

A partir da análise por PCR em tempo real, foi comparada a expressão do transcrito do gene *mdc1* em células HSC536COR e HSC536N. Os RNAs totais foram obtidos a partir de células do grupo controle (sem tratamento) ou 24 e 48 horas após tratamento com MMC. O gráfico resultante deste experimento encontra-se na **Figura 15**, onde se observa significativa inibição da expressão dos transcritos *mdc1* em células HSC536N de 2 a 3,5 vezes em relação à expressão destes mensageiros em células HSC536COR após 24 e 48 horas de tratamento, respectivamente. A inibição da expressão de *mdc1* em HSC536N após 48 de tratamento chega próximo a 70% quando comparado com a expressão em células HSC536COR sem tratamento. Enquanto que as células HSC536COR apresentam um decréscimo pouco significativo da expressão de *mdc1*, de acordo com a progressão do tratamento.

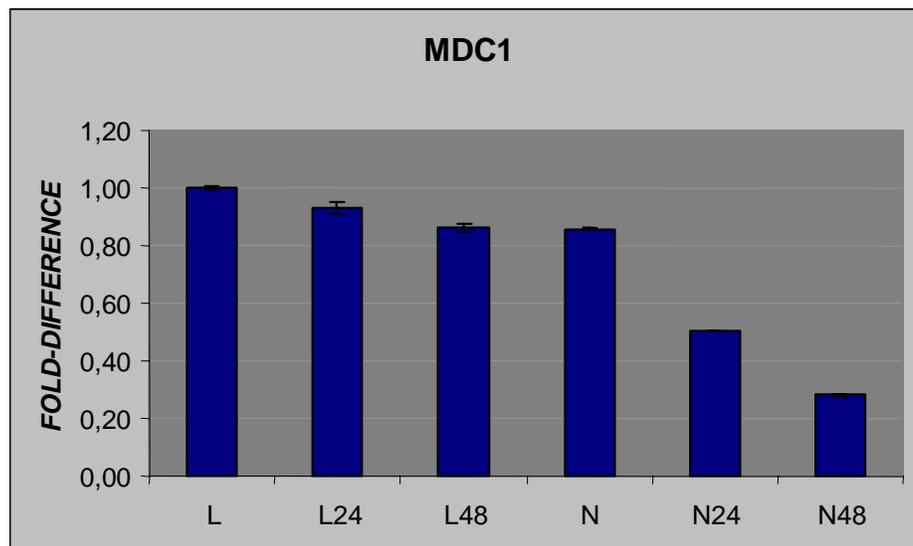


Figura 15. Padrão de expressão do gene MDC1 obtido por análise de PCR em tempo Real. Avaliação da diferença na expressão (*fold-difference*) do gene *MDC1* entre as linhagens HSC536COR (L); HSC536COR após 24 (L24) e 48 (L48) de tratamento com MMC; HSC536N (N); HSC536N após 24 (N24) e 48 (N48) de tratamento com MMC. Os níveis de expressão de *mdc1* em células HSC536N encontram-se significativamente menores quando comparados aos níveis apresentados pelas células HSC536COR.

V. DISCUSSÃO

Em virtude da importância da via FA/BRCA na manutenção da estabilidade genômica e na tumorigênese, a anemia de Fanconi tornou-se um dos modelos usados para o estudo do câncer. Apesar do rápido progresso obtido nos últimos anos no entendimento desta via bioquímica, muitas questões ainda permanecem sem resposta.

Existem vários relatos na literatura mostrando que as proteínas Fanconi participam diretamente de duas vias independentes, porém interligadas: reparo de lesões de DNA do tipo *cross-link* ou *ICLs* (Grompe, 2001; Niedernhofer, 2005; Noll, 2006) e ativação do ponto de checagem de fase S (Pichierrri et al, 2004b; Fei et al, 2005). Porém, ainda permanecem lacunas essenciais para o entendimento desses processos. No que diz respeito às proteínas sensoras responsáveis pela identificação das *ICLs*, espectro de substratos e funções do complexo Fanconi, sobre as funções das proteínas Fanconi independentes da formação do complexo, novos alvos de interação entre as proteínas Fanconi e a continuidade da via à jusante de FANCD2, apenas para citar alguns exemplos.

Um dos maiores obstáculos para a realização de estudos de expressão gênica diferencial é, sem dúvida alguma, o *background* genético inerente a um tipo particular de célula, tecido ou indivíduo. O modelo de estudo adotado neste trabalho elimina completamente a possibilidade deste tipo de interferência, tendo em vista que, as análises das diferenças na expressão gênica são feitas entre células isogênicas, diferindo apenas na presença da proteína FANCC selvagem e, conseqüentemente, na capacidade de ativação da via FA/BRCA em diferentes situações.

O estudo de proteomas inclui a separação de proteínas por eletroforese bidimensional (2D) com possibilidade de identificação das proteínas selecionadas por espectrometria de massas. A separação de proteínas por eletroforeses em 2D é uma excelente estratégia para visualizar centenas de proteínas em um único gel. Esta técnica permite também a visualização das diferenças em nível de proteínas expressas em condições contrastantes e

identificação das proteínas superexpressas ou reprimidas nessas diferentes condições. Portanto, a análise proteômica se apresenta como uma importante estratégia para o estudo de vias bioquímicas tão complexas quanto a via Fanconi/BRCA.

Apesar da significativa diferença fenotípica de sobrevivência entre as células Fanconi e Fanconi corrigidas, não foi possível observar maiores diferenças nos mapas protéicos entre ambas. Isso pode ser explicado pelas limitações da metodologia de eletroforese bidimensional. A técnica pode resolver apenas 30 a 40% das proteínas presentes numa linhagem celular ou tecido. A resolução de proteínas altamente hidrofóbicas, de pontos isoelétricos extremos (menores que pH 3 e maiores que pH 10), ou proteínas menos abundantes, fica comprometida (Görg et al, 2000).

No presente trabalho foram usadas metodologias proteômicas na tentativa de identificar alterações no padrão de expressão de proteínas como consequência da inativação da via Fanconi/BRCA. Através da comparação de mapas proteômicos obtidos a partir de células isogênicas: HSC536N (Fanconi C) e HSC536COR (controle corrigida através da expressão ectópica de um gene *fancc* selvagem), foi possível obter o proteoma diferencial entre células com o mesmo *background* genético, diferindo apenas no funcionamento da via Fanconi.

A escolha do estudo do grupo de complementação C foi beneficiada pela multi-funcionalidade da proteína FANCC. Com efeito, a proteína FANCC é encontrada no núcleo, onde participa do reparo de lesões de DNA ao formar o complexo Fanconi, porém é predominantemente citoplasmática. Neste compartimento, FANCC interage com diversas proteínas como CDC2 (Kupfer et al, 1997), a chaperona GRP24 (Hoshino et al, 1998), NADPH citocromo redutase (Kruyt et al, 1998) e Signal Transducer Activator of Transcription – STAT1 (Pang et al, 2000), o que sugere a participação de FANCC no controle do ciclo celular, na regulação do metabolismo oxidativo e no processo de transdução de sinais de sobrevivência. (Pang et al, 2001). Portanto, o estudo proteômico de células Fanconi C abre um leque maior de possibilidades de compreensão das relações de FANCC com proteínas de diversas vias diferentes.

Para obtenção do proteoma de referência das células HSC536COR, foram feitos géis bidimensionais corados pela metodologia de prata não-destrutiva, que possui uma sensibilidade aproximadamente 10 vezes maior do que a coloração por *coomassie blue* coloidal sendo, além disso, compatível com análises de espectrometria de massas. Não obstante, a análise por espectrometria de massa é significativamente menos sensível (10 a 15 vezes menor) se comparada com coloração por *coomassie blue* coloidal (Shevchenko et al, 1996).

Desta forma, foi possível verificar um maior número de spots, apesar dessa metodologia não permitir uma análise quantitativa de expressão entre os mesmo, devido à saturação dos sinais (**Figura 16**). Com esta técnica, não foi possível visualizar proteínas diferencialmente expressas.

Através da técnica de *coomassie blue* foi possível obter proteomas de boa qualidade através dos quais as diferenças no perfil proteômico das células em estudo puderam ser observadas e, as proteínas escolhidas analisadas pela técnica de MALDI-ToF.

I. Proteoma de Referência de células HSC536COR

O termo proteoma é definido como o conjunto total de proteínas, expressas pelo genoma, em uma determinada linhagem celular ou tipo de tecido. Proteômica, conjunto de métodos de investigação de proteomas, nos confere informações suplementares e mais abrangentes e diversas do que a genômica. A proteômica comparativa é considerada uma das ferramentas mais fortes para o estudo de mecanismos de processos biológicos e patogênicos.

Linhagens linfoblastóides transformadas por vírus Epstein-Barr são amplamente utilizadas em diversas linhas de pesquisa no mundo. Assim como as linhagens linfoblastóides B HSC536, que são utilizadas como modelo de estudo para decifração das vias de reparo de DNA e controle do ciclo celular.

A eletroforese bidimensional de células evidenciou grande homogeneidade do perfil protéico de células HSC536COR. Os géis de referência apresentaram 343 spots no total entre os intervalos de pH4 a pH11. Destes 102 foram identificados. A partir dessas análises observamos que 70% das proteínas

encontravam-se expressas entre a faixa de pH5 a pH7 e, entre uma faixa de peso molecular entre 25KDa a 75KDa. A descrição do mapa bidimensional da linhagem HSC536 podendo servir de referência para a detecção de outros eventuais fatores de patogenicidade associados a esta via ainda não encontrados.

II. Análise proteômica diferencial entre células HSC536N e HSC536COR

As **figuras 11a, 11b e 11c** representam os perfis de proteínas de células HSC536N e HSC536COR. As proteínas apresentam massa molecular aparente variando aproximadamente de 10 KDa a 250 KDa. As proteínas de faixa de peso molecular entre 25 KDa a 75KDa são as mais abundantes e mais numerosas, representando aproximadamente 70% respectivamente, do total de proteínas.

A análise discriminante com base na ocorrência de proteínas e sua abundância relativa nos mostraram sete *spots* diferencialmente expressos. Entre estas seis apresentaram suas expressões aumentadas nas células HSC536COR. O sétimo *spot* (**Figura 13**) mostrou-se em até duas vezes mais expresso em HSC536N, independente do tratamento. Assim, essa última proteína identificada como Involucrina que é uma proteína que vem sendo muito estudada e caracterizada como um marcador de diferenciação de queratinócitos. A involucrina apresenta-se em forma livre citoplasmática nos primeiros estágios de diferenciação de queratinócitos, em células de estratificação mais próxima da lâmina basal do epitélio. Já nos últimos estágios, a involucrina forma cross-links com outras proteínas de membrana e lipídios para a formação de um envelope (cornified envelop) insolúvel acima da membrana plasmática (Eckert et al, 2004). Mas, recentemente, a involucrina foi designada também como um marcador de hipóxia em algumas linhagens de carcinomas escamosos. A proteína em questão tem sua expressão aumentada em condições de hipóxia, assim como seus fatores de transcrição como c-jun/AP-1 que são diretamente regulados pela hipóxia (Chou et al, 2004).

Células Fanconi têm uma sensibilidade exarcebada à radiação ionizante em situações de hipóxia, quando comparadas às células normais e essa hipersensibilidade se deve aos defeitos no recrutamento da maquinaria de recombinação homóloga (Sprong et al, 2006). Com bases em dados da literatura, a proteína involucrina se expressa apenas em epitélio, não havendo registros da expressão desta proteína em células linfoblastóides. Desta forma, podemos especular que esta proteína se expressa em nosso sistema como consequência de anomalias que ocorreram durante o desenvolvimento embrionário do paciente Fanconi do grupo C que forneceu as células HSC536. O gene que codifica a involucrina estaria desregulado nos linfoblastos deste indivíduo.

As **figuras 14A e 14B** mostram duas proteínas que tiveram sua expressão aumentada em virtude do tratamento com MMC e sua expressão pode ser visualizada a partir de 48 horas de tratamento. Na figura **14A** está a proteína identificada como uma proteína hipotética Hypothetical protein LOC25900 isoform 3. E na figura **14B** está a proteína PDZ/LIM domain protein 1. A **figura 15** mostra a única proteína observada diferencialmente expressa dos mapas bidimensionais representativos dos extratos celulares obtidos após 48 horas de tratamento com MMC que não pôde ser identificada.

III. Proteína PDZ/LIM domain protein 1

Os dominós PDZ e LIM são motivos de interação proteína/proteína encontrados em associação a várias proteínas do citoesqueleto. Foi sugerido que essas proteínas atuariam como adaptadoras entre quinases e o citoesqueleto. Isso foi baseado em linhas de pesquisa que indicam que proteínas PDZ/LIM associam de um lado, pelo domínio PDZ com o citoesqueleto, e por outro, se associam a quinases por via domínio LIM. Assim, O domínio PDZ media uma associação estável de PDZ/LIM domain protein 1 com as formas não musculares da alfa-actina (alfa-actina 1 e alfa-actina 4). PDZ/LIM domain protein 1 está localizada nas *actin stress fibers* em células não-musculares. *Actin stress fibers* forma uma organela dinâmica importante nos processos que envolvem a forma da célula, a polaridade e a migração celular. Essas funções são mediadas por

filamentos de actina em resposta a diversas, e ainda desconhecidas, vias de transdução de sinal. Uma dessas vias envolve a proteína LIM-quinase, que atua à jusante das proteínas Rac e Rho (Vallén et al, 2000). Por sua vez, as proteínas Rac e Rho têm como funções já descritas como reguladoras da actina do citoesqueleto e reguladoras da produção de superóxido através de ligações diretas com uma NADPH dependent oxidase. LIM-kinases são quinases serina/treonina que regulam a dinâmica da actina através da fosforilação de uma proteína despolimerizadora de actina, a cofilina (Goyal et al, 2006). Além disso, outros estudos mostraram que as LIM-kinases também têm funções nucleares. Entre essas funções nucleares podemos destacar os efeitos da LIM-kinase nuclear na expressão da ciclina D1, assim regulando a duração da fase G1 do ciclo celular. A via Rho-Rho kinase controla a expressão da ciclina D1, prevenindo assim a indução precoce da fase G1 (Roovers et al, 2003).

Assim como podemos observar, segundo os dados da literatura, PDZ/LIM domain protein 1 funciona como uma proteína adaptadora que atua em diversas vias incluindo vias mitogênicas e de regulação de proteínas que participam da regulação do ciclo celular. E sua *downregulation* em células Fanconi tratadas com agentes genotóxicos pode também representar uma desregulação nas vias relacionadas a ela.

IV. A expressão de MDC1 é alterada em células FANCC^{-/-}

A análise protéica comparativa entre células HSC536N e HSC536COR sugere que mutações deletérias no gene *fancc* alteram os processos pelos quais os fatores nucleares, citoplasmáticos ou intercelulares influem sobre o controle diferencial da ação gênica em níveis transcricionais e traducionais da proteína MDC1.

Em resposta ao tratamento com MMC o acúmulo desta proteína aumenta de aproximadamente 2,5 vezes, após 24 horas, e de sete vezes, 48 horas após incubação com a droga em células proficientes na FA/BRCA (HSC536COR), enquanto nas células incapazes de ativar esta via bioquímica o acúmulo de MDC1 permanece inalterada, sugerindo que a expressão do gene que

codifica esta proteína é severamente reduzida na ausência da via FA/BRCA funcional. Além disso, os transcritos do gene *mdc1* em células Fanconi C (HSC536N) encontram-se em concentração até 3,5 vezes menor do que em células Fanconi “corrigidas” (HSC536COR) (**Figura 17**). Portanto, MDC1 está, provavelmente de alguma forma ainda desconhecida, sob influência da via Fanconi em resposta a lesões no DNA induzidas por MMC.

A proteína MDC1 - *Mediator of DNA Damage Checkpoint Protein 1* é considerada o mais novo membro da superfamília de proteínas de pontos de checagem conhecidas como “mediadoras”. Nesse grupo também estão BRCA1, 53BP1, CHK2, NBS1. Essas são proteínas que possuem motivos BRCT, envolvidos na transdução de sinais de lesão de DNA às vias promotoras de pontos de checagem através das cinases ATM e ATR (Canman et al, 2003).

Em resposta a *DSBs* ou *ICLs*, muitas proteínas como BRCA1, 53BP1 e o complexo MRN rapidamente colocalizam-se nos sítios de lesão. Esses sítios são marcados pela fosforilação da histona H2AX, evento estabelecido como o primeiro marcador detectável de *DSBs* (Rogakou et al, 1999). H2AX fosforilada é o sinal que leva a retenção de fatores de respostas à lesão nos sítios de *DSBs*. Alternativamente, H2AX modula a estrutura da cromatina, facilitando a concentração de proteínas de pontos de checagem. (Fernandez-Capetillo et al, 2002).

MDC1 é uma das primeiras proteínas a se focalizarem nos sítios de lesão, participando da promoção ou amplificação da fosforilação de H2AX através da mediação da interação entre H2AX com uma proteína cinase à montante desta via, provavelmente ATM, reportada como a principal cinase de H2AX (Bruma et al, 2001).

Estudos feitos em células *MDC1^{-/-}* mostraram que a focalização de ATM nos sítios de lesão é falha. Assim, MDC1 parece regular a acumulação de ATM nos locais de lesão e intermediar uma eventual interação entre ATM e H2AX (Lou et al, 2006).

A via regulada por ATM também é conhecida como via de ponto de checagem de fase intra-S. Muitos componentes dessa via foram descobertos

devido a mutações nos seus genes que causam síndromes de instabilidade genômica e compartilham uma mesma característica: hipersensibilidade a agentes genotóxicos, como agentes *crosslink* e radiação ionizante. São eles BRCA1, 53BP1, FANCD2 e SMC1 (Canman et al, 2003).

Assim como com ATM, MDC1 também interage com ATR. MDC1, juntamente com proteína 53PB1, é necessária para o recrutamento de ATR nos sítios de lesão e, apesar de ATM e ATR compartilharem diversos substratos, ATR é responsável pela fosforilação de Rad17 e CHK1 em resposta a estresse genotóxico. Em células onde MDC1 é silenciada, a fosforilação de Rad17 e CHK1 por ATR é abolida (Peng e Chen, 2005).

Além da participação nos eventos iniciais de reparo de *DSBs*, MDC1 também pode ter papel diretamente relacionado à recombinação homóloga. As principais evidências que sugerem o papel de MDC1 neste processo são:

- O transcrito MDC1 é abundante em células de testículo – podendo estar relacionado com o *crossing-over*, meiose e logo, recombinação (Xu e Stern, 2003).
- MDC1 forma complexos com CHK2 e BRCA1, proteína sabidamente envolvida na recombinação homóloga.
- MDC1 possui domínios em comum com proteínas já conhecidas, envolvidas no reparo – são os domínios BRCT e FHA, módulos funcionais de interação proteína-proteína.
- A superexpressão de MDC1 aumenta a frequência de recombinação homóloga.
- MDC1 interage com a proteína RAD51, afetando diretamente a formação de *foci* nucleares.(Zhang et al, 2005).

Além disso, MDC1 tem sido relacionada com a detecção e sinalização de lesões de DNA, principalmente de *DSBs* e promoção de pontos de checagem de fase S (Lou et al, 2006). Portanto, esta proteína pode ser considerada, como um dos fatores de patogenicidade essenciais para o controle da estabilidade do genoma.

Existem relatos na literatura mostrando que, tanto as células FA^{-/-} quanto às células MDC1^{-/-}, apresentam características em comum como instabilidade genética, elevada incidência de quebras cromossômicas induzidas por radiação ionizante e ciclo celular anômalo, reparo de lesões de DNA (Lou et al, 2006).

Portanto, no que diz respeito à expressão de MDC1 em células deficientes na via FA/BRCA, o resultado encontrado neste trabalho é consistente com os relatos da literatura, apontando na direção de um suposto envolvimento de MDC1 com esta via. É relevante destacar que este é o primeiro resultado que permite relacionar MDC1 com a via Fanconi/BRCA já que não existe na literatura nenhum trabalho relacionando explicitamente estes dois fatores. É importante ressaltar que experimentos adicionais, como western blot, PCR em tempo real e clonagem do gene que codifica MDC1 são necessários para melhor compreensão do papel desta proteína na via Fanconi.

VI. CONCLUSÃO

- Foi feita a descrição do mapa bidimensional da linhagem de linfoblastos B HSC536COR
- Foram encontradas 7 proteínas que estão diferencialmente expressas entre as linhagens celulares HSC536COR e HSC536N quando tratadas com agente genotóxico MMC. Destas proteínas, 6 foram identificadas por espectrometria de massas: splice isoform 2 of mediator of DNA damage checkpoint protein 1, Involucrina, três isoformas da proteína PDZ/LIM domain protein 1 e a proteína hipotética LOC25900 isoform 3.
- Entre as proteínas identificadas destaca-se a isoforma 2 MDC1, *downregulated* em células Fanconi (HSC536N), que, assim como as proteínas Fanconi, participa diretamente de vias envolvidas com reparo de DNA e promoção do pontos de checagem. O que sugere que as funções da via Fanconi e da proteína MDC1 podem estar integradas.
- A proteína involucrina encontra-se diferencialmente expressa entre as linhagens celulares HSC536COR e HSC536N independente do tratamento com MMC.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Andreassen P.R., D'Andrea A.D. e Taniguchi T.. 2004. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes & Development* 18: 1985-1963
2. Anderson L. 1991. Two-Dimensional Electrophoresis - Operation of the ISO-DALT System, second edition, Large Biology Press, Rockville, MD
3. Assenmacher N. e Hopfner K.P. 2004. MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 113: 157-166
4. Auerbach AD e Allen RG. 1991. Leukemia and preleukemia in Fanconi Anemia patients. A review of the literature and report of the international Fanconi Anemia Registry. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 51: 1-12
5. Barber L.M., McGrath H.E., Meyer S., Will A.M., Birch J.M., Eden O.B. e Taylor G.M.. 2003. Constitutional sequence variation in the Fanconi Anemia group C (FANCC) gene in childhood acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology* 121: 57-62
6. Bogliolo M., Cabré O., Callén E., Castillo V., Creus A., Marcos R. e Surrallés J.. 2002. The Fanconi anaemia genome stability and tumor suppressor network. *Mutagenesis* 17 (6): 529-538
7. Bradford M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *Anal. Biochem.* 72:248-254.
8. Bruma S., Chen B.P., Murphy M., Kurimasa A. e Chen D.J.. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of Biological Chemistry* 276:42462:42467
9. Butturini A., Gale R.P., Verlander P.C., Adler-Brecher B., Gillio A.P e Auerbach A.D.. 1994. Hematologic abnormalities in Fanconi Anemia: an international Fanconi Anemia Registry Study. *Blood* 84: 1650-1655
10. Canman C.E..2003. Checkpoint Mediators: Relaying signals from DNA Strand Breaks. *Current Biology* 13: 488-490

11. Cantor S.B., Bell D.W., Ganesan S., Kass E.M., Drapkin R., Grossman S., Wahrer D.C., Sgroi D.C., Lane W.S., Haber D.A. e Livingston D.M.. 2001. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 105: 149-160
12. Carson C.T., Schwartz R.A., Stracker T.H., Lilley C.E., Lee D.V., Weitzman M.D.. 2003. The Mre11 complex is required for ATM activation and the G(2)/M checkpoint. *The EMBO Journal* 22: 6610-6620
13. Chandra S., Levrán O., Jurickova I., Maas C., Kapur R., Schindler D., Henry R., Milton K., Batish S.D., Cancelas J.A., Hanenberg H., Auerbach A.D. e Williams D.A.. 2005. A rapid method for Retrovirus-mediated identification of complementation Groups in Fanconi Anemia Patients. *Molecular Therapy* 12 (5):976-984
14. Chou S.C., Azuma Y., Varia M.A. e Raleigh J.A. 2004. Evidence that involucrin, a marker of differentiation, is oxygen regulated in human squamous cell carcinomas. *British Journal of Cancer* 90: 728-735
15. Condie A., Powles R.L. e Hudson C.D.. 2002. Analysis of the Fanconi anemia complementation group A gene in acute myeloid leukaemia. *Leukemia Lymphoma* 43: 1849-1853
16. Eckert R.L., Crish J.F., Efimova T., Dashti S.R., Deucher A., Bone F., Adhikary G., Huang G., Gopalakrishnan R. e Balasubramanian S. 2004. Regulation of Involucrin gene expression. *Journal of Investigative Dermatology* 123: 13-22
17. Fei P., Yin J. e Wang W. 2005. New advances in the DNA damage response network of Fanconi Anemia and BRCA proteins. *Cell Cycle* 1(4):80-86
18. Fernandez-Capetillo O., Chen H.T., Celeste A., Ward I., Romanieko P.J., Naka K., Xia Z., Camerini-Otero R.D. e Motoyama N.. 2002. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX e 53BP1. *Nature Cell biology* 4: 993-997
19. Futaki M., Igarashi T., Watanabe S., Kajigaya S., Tatsuguchi A., Wang J. e Liu J.M.. 2002. The FANCG Fanconi anemia protein interage com CYP2E1:

- a possible role in protection against oxidative DNA damage. *Carcinogenesis* 23: 67-72
20. Garcia-Higuera I., Kuang Y., Denham J., D'Andrea A.D.. 2000 .The fanconi anemia proteins FANCA and FANCG stabilize each other and promote the nuclear accumulation of the Fanconi anemia complex. *Blood* 96 (9): 3224-30.
21. Görg A., Obermeier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R. e Weiss W.. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21: 1037-1053
22. Goyal P., Pandey D. e Siess W. 2006 Phosphorylation-Dependent regulation of unique nuclear and nucleolar localization signals of LIM-KINASE 2 in endothelial cells. *JBC Papers in Press*. Published on July 4, 2006
23. Grompe M. e D'Andrea A.D. 2001. Fanconi Anemia and DNA repair. *Human Molecular Genetics* 10 (20): 2253-2259
24. Gurtan A.M., Stuckert P. e D'andrea A.D. 2006. The WD-40 repeats of FANCL are required for Fanconi Anemia core complex assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(16):10896-905
25. Hoshino T., Wang J. e Devetten M.P..1998. Molecular chaperone GRP94 binds to the Fanconi anemia group C protein and regulates its intracellular expression. *Blood* 91:4379-4386
26. Hussain S., Wilson J.B., Medhurst A.L., Hejna J., Witt E., Ananth S., Davies A., Masson, J.Y., Moses R., West S.C., de Winter J.P., Ashworth A., Jones N.J. e Mathew C.G.. 2004. Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Human molecular Genetics* 13(12): 1241-1248
27. Khanna KK. e Jackson SP. 2001. DNA double-strand breaks: signaling repair and the cancer connection. *Nature Genetics*. 27: 247:254
28. Koundrioukoff S., Polo S. e Almouzni G. 2004. Interplay between chromatin and cell cycle checkpoints in the context of ATR/ATM-dependent checkpoints. *DNA Repair* 3: 969-978

29. Kruyt F.A., Hoshino T., Liu J.M., Joseph P., Jaiswal A.K., Youssoufian H.. 1998. Abnormal microsomal detoxification implicated in Fanconi anemia group C by interaction of the FAC protein with NADPH cytochrome P450 reductase. *Blood* 92:3050-3056
30. Kupfer G.M., Yamashita T., Naf D., Suliman A., Asano S., D'Andrea A.D.. 1997. The Fanconi anemia polypeptide, FAC, binds to the cyclin-dependent kinase, cdc2. *Blood* 90:1047-1054
31. Kurz E.U. e Less-Miller SP. 2004. DNA damage-induced activation of ATR and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair* 3 (2004):889-900
32. Kutler DL., Singh B., Satagopan J., Batish S.D., Berwick M., Giampietro P.F., Hanenberg H. e Auerbach A.D.. 2003. A 20 year perspective on International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*, 101 (4):1249-1256.
33. Léveillé F. Ferrer M., Medhurst A.L., Laghmani E.H., Rooimans M.A., Bier P., Steltenpool J., Titus T.A., Postletwait J.H., Hoatin M.E., Joene H., de Winter J.P. 2006. The nuclear accumulation of the Fanconi anemia protein FANCE depends on FANCC. *DNA Repair* 5(5):556-565.
34. Levitus M., Waisfisz Q., Godthelp B.C., de Vries Y., Hussain S., Wiegant W.W., Elgahlbzouri-Maghrani E., Steltenpool J., Rooimans M.A., Pals G., Arwert F., Mathew C.G., Zdzienicka M.Z., Hiom K., de Winter J.P. e Joenje H. 2005. the DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nature Genetics* 37(9): 934-935
35. Litman R., Peng M., Jin Z., Zhang F., Zhang J., Powell S., Andreassen P.R. e Cantor S.B. 2005. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be Fanconi Anemia gene product FANCI. *Cancer Cell*, September 2005 8(3): 255-265
36. Lou Z., Minter-Dykhouse K., Fanco S., Gostissa M., Rivera M.A., Celeste A., Manis J.P., van Deursen J., Nussenzweig A., Paull T.T., Alt F.W. e Chen J.. 2006. MDC1 Maintains Genomic Stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Molecular Cell* 21: 187-200
37. Macé G., Bogliolo M., Guervilly J.H., du Villard J.A.D e Rosselli F.. 2005. 3R coordination by Fanconi Anemia proteins. *Biochimie* 87(7): 647-658

38. Matsushita N., Kitao H., Ishiai M., Okawa K., Ohta T., Yu D.S., McHugh P.J., Hickson I.D., Venkataranan A.R., Kurumizaka H. e Takata M.. 2005. A FANCD2-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair. *Molecular Cell* 19, 841-847
39. Marnett L. J.. 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21: 361-370
40. Meetei A.R., de Winter J.P., Medhurst A.L., Wallisch M., Waisfisz Q., van de Vrugt H.J., Oostra A.B., Yan Z., Ling C., Bishop C.E., Hoatlin M.E., Joenje H. e Wang W. 2003a. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nature Genetics* 35(2):165-70.
41. Meetei A.R., Medhurst A.L., Ling C., Xue Y., Singh T.R., Bier P., Steltenpool J., Stone S., Dokal I., Mathew C.G., Hoatlin M., Joenje H., de Winter J.P., e Wang W.. 2005. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi Anemia complementation group M. *Nature Genetics* 9 (37): 958-963
42. Meetei A.R., Sechi S., Wallisch M., Yang D., Young M.K., Joenje H., Hoatlin M.E. e Wang W. 2003. A multiprotein nuclear complex connects Fanconi Anemia and Bloom syndrome. *Molecular and Cellular Biology* 23 (10): 3417-3426
43. Mi J. e Kupfer G.M.. 2005. The Fanconi anemia core complex associates with chromatin during S phase. *Blood*. 105 (2) : 759-766.
44. Mosedale G., Niedzwiedz W., Alpi A., Perrina F., Pereira-Leal J.B., Johnson M., Langevin F. e Patel K.J.. 2005. The vertebrate Hef homolog is a component of the Fanconi Anemia tumor-suppressor pathway. *Nature Structural & Molecular Biology*. 12 (9):763-771
45. Nakanishi N., Taniguchi T., Ranganathan V., New H.V., Moreau L.A., Stevens R.F. e Meyer S. 2002. Historical Review - Fanconi and Glanzmann: the men and their works. *British Journal of Haematology*, 119: 901 – 904
46. Niedernhofer L.J., Lalai A.S. e Hoeijmakers J.H.J. 2005. Fanconi Anemia (Cross)linked to DNA repair. *Cell* 123: 1191-1198

47. Niedernhofer L.J., Odjik H., Budzowska M., van Drunen E., Maas A., Theil A.F., de Wit J., Jaspers N.G., Beverloo H.B., Hoeijmakers J.H. e Kanaar R. 2004. The structure-specific endonuclease ERCC1-XPF is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double strand breaks. *Molecular and Cellular Biology*, 24:5776-5787
48. Noll D.M., McGregor T. e Miller P.S.. 2006. Formation and repair of Interstrand Cross-links in DNA. *Chemical Reviews* 106 (2): 277-301
49. Ohashi A., Zdzienicka M.Z., Chen J. e Couch F.J.. 2005. Fanconi Anemia Complementation Group D2 (FANCD2) functions independently of BRCA2- and Rad-51 associated Homologous Recombination in response to DNA damage. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (15): 14877-14883
50. Otsuki T., Nagashima T., Komatsu N., Kirito K. Furukawa Y., Kabayashi S. Liu J.M. e Ozawa K. 2002. Phosphorylation of Fanconi Anemia protein, FANCA, is regulated by Akt Kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291(3): 628-634
51. Pagano G., Degan P., d'Ischia M., Kelly F.J., Nobili B., Pallardó F.V., Youssoufian H. e Zatterale A..2005. Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype. *European Journal of Haematology* 75: 93-100
52. Pang Q., Christianson, Keeble W., Diaz J., Faulkner G.R., Reifsteck C., Olson C. e Bagby G.C. 2001. The Fanconi anemia complementation group C gene product: structural evidence of multifunctionality. *Blood* 98 (5):1392-1401
53. Pang Q., Fagerlie S. e Christianson T.A.. 2000. The Fanconi anemia protein FANCC binds to and facilitates the activation of STAT1 by IFN- γ and hematopoietic growth factors. *Molecular Cellular Biology* 20:4724-4735
54. Park W.H., Margossian S., Horwitz A.A., Simons A.M., D'Andrea A.D., e Parvin J.D.. 2005. Direct DNA binding activity of the Fanconi Anemia D2 Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (25): 23593-23598
55. Park S.J., Ciccone S. L.M., Beck B.D., Hwang B., Freie B., Clapp D.W. e Lee S.H.. 2004. Oxidative stress/Damage induces multimerization and

- interaction of Fanconi anemia proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 279(29): 30053-30059
56. Peng A. e Chen P.L..2005. NFB1/MDC1 mediates ATR-dependent DNA damage response. *Cancer Research* 65(4):1158-1163
57. Pichierri P., Auerbeck D. e Rosselli F.. 2002. DNA cross-link-dependent RAD50/MRE11/NBS1 subnuclear assembly requires the Fanconi anemia C protein. *Human Molecular Genetics* 11(21): 2531-2546
58. Pichierri P., Franchitto A. e Rosselli F. 2004a. BLM and the FANCD1 proteins collaborate in a common pathway in response to stalled replication forks. *The EMBO Journal* 23(15):3154-3163
59. Pichierri P. e Rosselli F. 2004b. Fanconi anemia proteins and the S phase checkpoint. *Cell cycle* 3(6):698-700
60. Pichierri P. e Rosselli F. 2004c. The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 e ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *The EMBO journal* 23 (5): 1178-1187
61. Qiao F., Mi J., Wilson J.B., Zhi G., Bucheimer N.R., Jones N.J. e Kupfer G.M.. 2004. Phosphorylation of fanconi anemia (FA) complementation group G protein, FANCG, at serine 7 is important for function of the FA pathway. *Journal of Biological Chemistry* 279(44):46035-46045.
62. Richert S., Luche S., Chevallet M., Van Dorsselaer A., Leize-Wagner E. e Rabilloud T. 2004. About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics* 4 (4): 909-16
63. Roovers K., Klein E.A., Castagnino P. e Assoian R.K. 2003. Nuclear translocation of LIM kinase mediates Rho-Rho kinase regulation of cyclin D1 expression. *Developmental cell* 5(2):273-84
64. Rosselli F., Ridet A., Soussi T., Duchaud E., Alapetite C. e Moustacchi E.. 1995. p53-dependent pathway of radio-induced apoptosis is altered in Fanconi anemia. *Oncogene* 10: 9-17
65. Rosselli F., Briot D. e Pichierri P. 2003. The Fanconi anemia pathway and the DNA interstrand cross-links repair. *Biochimie* 85: 1175-1184

66. Rothfuss A. e Grompe M. 2004. Repair kinetics of genomic interstrand DNA cross-links: Evidence for DNA double-strand break-dependent activation of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Molecular and cellular biology* 24(1): 123-134
67. Saadatzadeh M.R., Bijangi-Vishehsaraei K., Hong P., Bergman H. e Haneline L.S.. 2004. Oxidant hypersensitivity of Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on a redox-regulated Apoptotic pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 279(16):16805-16812
68. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O e Mann M.. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* Mar 1;68(5):850-8.
69. Shimamura A. e D'Andrea A.D. 2003. Subtyping of Fanconi anemia patients: implications for clinical management. *Blood* 102 (9): 3459
70. Shivij M.K.K e Venkitaraman A.R. 2004. DNA recombination, chromosomal stability and carcinogenesis: insights into the role of BRCA2. *DNA Repair* 3: 835-843
71. Sprong D., Jassen H.L., Vens C. e Begg A.C. 2006. Resistance of Hypoxic cells to ionizing radiation is influenced by homologous recombination status. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 64 (2): 562-572
72. Stevens R.F., Meyer S. 2002. Historical Review: Fanconi and Glanzmann: The men and their works. *British Journal of Haematology*, 2002, 119, 901–904
73. Stiff T., Reis C., Alderton G.K., Woodbine L., O'Driscoll M. e Jeggo P.A.. 2005. Nbs1 is required for ATR-dependent phosphorylation events. *The EMBO Journal* 24: 199-208
74. Stotsky M., Mathew C.G., Kastan M.B., Weaver D.T. e D'Andrea A.D.. 2002. Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response. *Nature Cell Biology* 4: 913 – 920
75. Taniguchi T. e D'Andrea A.D.. 2002 The Fanconi anemia protein, FANCE, promotes the nuclear accumulation of FANCC. *Blood* 100 (7): 2457-2462

-
76. Taniguchi T. e D'Andrea AD. 2006. The Molecular Pathogenesis of Fanconi Anemia: Recent Progress. *Blood* 107(11):4223-33
 77. Taniguchi T., Garcia-Higuera I., Xu B., Andreassen P.R., Gregory R.C., Kim S.T., Lane W.S., Kastan M.B. e D'Andrea A.D..2002. Convergence of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia pathways *Cell* 109: 459-472
 78. Taniguchi T., Tischkowitz M. e Ameziane N.. 2003. Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nature Medicine* 9: 568-574
 79. Tischkowitz M. e Dokal I. 2004. Fanconi Anemia and leukemia - clinical and molecular aspects. *British Journal of Haematology*, 126: 176-191
 80. Tischkowitz M.D. e Hodgson S.V. 2003. Fanconi Anemia. *Journal of Medical Genetics* 40: 1-10
 81. Thomashevski A., High A.A., Drozd M., Shabanowitz J., Hunt D.F., Grant P.A., Kupfer G.M.. 2004 The Fanconi anemia core complex forms four complexes of different sizes in different subcellular compartments. *Journal of Biological Chemistry* 279 (25): 26201-26209.
 82. Vallenius T., Luukko K. e Mäkelä T.P. 2000. CLP-36 PDZ-LIM Protein Associates with Nonmuscle α -Actinin-1 and α -Actinin-4. *Journal of Biological Chemistry* 275(15) - 11100-11105
 83. Van den Bosch M., Bree R.T. e Lowdes N.F.. 2003. The MNR complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO reports* 4(9):844-849
 84. Van der Heijden M.S., Brody J.R. e Gallameier E..2004. Functional defects in Fanconi anemia pathway in pancreatic cancer cells. *American Journal of Pathology* 165:651-657
 85. Wang X.Z., Andreassen P.R. e D'Andrea A.D.. 2004a. Functional Interaction of Monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in Chromatin. *Molecular and Cellular Biology* 24 (13):5850-5862
 86. Wang X.Z. e D'Andrea A.D. 2004b. The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair* 3: 1063-1069

87. Wu L., Lung Chan K., Ralf C., Bernstein D.A., Garcia P.L., Bohr V.A., Vindigni A., Janscak P., Keck J.L. e Hickson I.D.. 2005. The HRDC domain of BLM is required for the dissolution of double Holliday junctions. *The EMBO Journal* 24: 2679-2687
88. Xu X .e Stern D.F..2003. NFB1/KIAA0170 is a chromatin-associated protein involved in DNA damage signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 278(10): 8795-8803
89. Yamashita T., Kupfer G.M., Naf D., Suliman A., Joenje H., Asano S. e D'Andrea A.D.. 1998. The Fanconi anemia pathway requires FAA phosphorylation and FAA/FAC nuclear accumulation. *PNAS* 95(22):13085-90.
90. Yang J., Xu Z.P., Huang Y., Hamrick H.E., Duerksen-Hueghe P.J. e Yu Y.N.. 2004. ATM and ATR: Sensing DNA damage. *World Journal of Gastroenterology* 10(2):155-160
91. Zhang J., Ma Z., Treszezamsky A. e Powel S.N.. 2005. MDC1 interacts with RAD51 and facilitates homologous recombination. *Nature Structural & Molecular Biology* 12(10): 902-909

ANEXO 1**Lista das proteínas do componentes mapa protéico de linfoblastos HSC536:****Fatty acid-binding protein, epidermal**

Massa: 15366 **Score:** 203 **pl:** 6.84
Sequence Coverage: 41% **# Acesso:** IPI00007797

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
61 - 71	1271.43	1270.42	1270.59	-0.16	0	K.TTQFSCCTLGEK.F
72 - 80	1025.32	1024.32	1024.45	-0.13	0	K.FEETTADGR.K
81 - 102	2561.97	2560.96	2561.20	-0.23	1	R.KTQTVCNFTDGALVQHQEWDGK.E
82 - 102	2433.87	2432.86	2433.10	-0.24	0	K.TQTVCNFTDGALVQHQEWDGK.E
115 - 128	1710.60	1709.59	1709.79	-0.20	0	K.LVVECVMMNVTCR.I

40S ribosomal protein S2

Massa: 14905 **Score:** 125 **pl:** 6.81
Sequence Coverage: 26% **# Acesso:** IPI00414922

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
46 - 63	2150.68	2149.68	2149.96	-0.28	0	R.QAHLCVLASNCDEPMYVK.L Oxid.(M)
85 - 93	1061.38	1060.37	1060.54	-0.16	0	K.LGEWVGLCK.I
122 - 129	1042.35	1041.34	1041.50	-0.16	0	K.DVIEEYFK.C

40S ribosomal protein S12

Massa: 14728 **Score:** 61 **pl:** 6.36
Sequence Coverage: 12% **# Acesso:** IPI00013917

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
84 - 92	1061.38	1060.37	1060.54	-0.16	0	K.LGEWVGLCK.I
121 - 128	1042.35	1041.34	1041.50	-0.16	0	K.DVIEEYFK.C

Galectin-1

Massa: 14917 **Score:** 206 **pl:** 5.34
Sequence Coverage: 34% **# Acesso:** IPI00219219

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
37 - 48	1486.47	1485.46	1485.68	-0.22	0	K.DSNNLCLHFNPR.F
64 - 73	1076.31	1075.30	1075.47	-0.17	0	K.DGGAWGTEQR.E
100 - 107	968.32	967.31	967.47	-0.15	0	K.LPDGYEFK.F
112 - 127	1800.60	1799.59	1799.84	-0.25	0	R.LNLEAINYMAADGDFK.I

Prefoldin subunit 2

Massa: 16695 **Score:** 105 **pl:** 6.20
Sequence Coverage: 12% **# Acesso:** IPI00006052

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
19 - 32	1418.53	1417.52	1417.73	-0.21	0	K.GAVSAEQVIAGFNR.L
114 - 119	807.27	806.27	806.39	-0.13	0	K.ELNEFR.E

Tubulin-specific chaperone A

Massa: 12773 **Score:** 142 **pl:** 5.25
Sequence Coverage: 24% **# Acesso:** IPI00217236

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
69 - 79	1347.53	1346.52	1346.73	-0.21	1	R.RLEAAYLDLQR.I
70 - 79	1191.45	1190.44	1190.63	-0.19	0	R.LEAAYLDLQR.I
80 - 94	1851.62	1850.61	1850.88	-0.27	1	R.ILENEKDLEEAEYK.E

Actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like

Massa: 16931 Score: 258 pl: 6.15
 Sequence Coverage: 45% #Acesso: IPI00414554

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
12 - 22	1379.43	1378.42	1378.64	-0.22	1	R.RVDIDEFDENK.F
13 - 22	1223.34	1222.34	1222.54	-0.20	0	R.VDIDEFDENK.F
23 - 49	2782.99	2781.99	2782.29	-0.31	0	K.FVDEQEEAAAAAAEPGPDPSEVDGLLR.Q
90 - 102	1461.49	1460.49	1460.71	-0.23	0	K.SSEIEQAVQSLDR.N
115 - 133	2199.81	2198.80	2199.10	-0.29	0	K.GFEKPTENS SAVLLQWHEK.A

PREDICTED: similar to SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2

Massa: 18200 Score: 68 pl: 5.93
 Sequence Coverage: 7% # Acesso: IPI00140827

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
87 - 98	1234.44	1233.43	1233.64	-0.21	0	K.VAGQDGSVVQFK.I

Transcription factor BTF3 homolog 4

Massa: 17260 Score: 60 pl: 5.95
 Sequence Coverage: 12% # Acesso: IPI00412792

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
62 - 73	1356.45	1355.44	1355.65	-0.21	0	K.DDGTVIHFNNPK.V
116 - 122	860.32	859.31	859.46	-0.14	0	K.LAEQFPR.Q

Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N

Massa: 17184 Score: 53 pl: 6.13
 Sequence Coverage: 21% # Acesso: IPI00003949

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
15 - 24	1036.61	1035.60	1035.63	-0.03	0	R.LLAEPVPGIK.A
54 - 68	1763.64	1762.63	1762.89	-0.25	0	K.LELFLPEEYPMAAPK.V
95 - 102	970.39	969.38	969.54	-0.16	0	K.WSPALQIR.T

14 kDa phosphohistidine phosphatase

Massa: 13995 Score: 112 pl: 5.65
 Sequence Coverage: 18% # Acesso: IPI00299977

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
49 - 59	1410.40	1409.40	1409.63	-0.23	0	K.WAEYHADIYDK.V
67 - 78	1368.29	1367.28	1367.50	-0.22	0	K.QGCDCECLGGGR.I

Prefoldin subunit 5

Massa: 17374 Score: 55 pl: 5.93
 Sequence Coverage: 9% # de Acesso: IPI00015361

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
139 - 153	1484.62	1483.61	1483.84	-0.22	0	K.IQQLTALGAAQATAK.A

Nucleoside diphosphate kinase A

Massa: 17309 Score: 286 pl: 5.83
 Sequence Coverage: 38% # Acesso: IPI00012048

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
7 - 18	1344.56	1343.55	1343.76	-0.20	0	R.TFIAIKPDGVQR.G
40 - 49	1181.40	1180.39	1180.58	-0.19	0	K.FMQASEDLLK.E
40 - 49	1197.39	1196.38	1196.57	-0.19	0	K.FMQASEDLLK.E

57 - 66	1149.47	1148.46	1148.63	-0.17	0	K.DRPFFAGLVK.Y
89 - 105	1785.67	1784.66	1784.91	-0.25	0	R.VMLGETNPADSKPGTIR.G
89 - 105	1801.66	1800.65	1800.90	-0.25	0	R.VMLGETNPADSKPGTIR.G
106 - 114	1051.33	1050.32	1050.49	-0.17	0	R.GDFCIQVGR.N

DUTP pyrophosphatase isoform 3

Massa: 15500 Score: 375 pl: 6.13

Sequence Coverage: 60% # Acesso: IPI00619934

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
22 - 40	2183.76	2182.76	2182.98	-0.22	0	R.AAGYDLYSAYDYTIPMEK.A
45 - 58	1550.57	1549.56	1549.76	-0.19	0	K.TDIQIALPSGCYGR.V
69 - 83	1705.61	1704.61	1704.81	-0.21	0	K.HFIDVGAGVIDEDYR.G
84 - 95	1250.52	1249.51	1249.68	-0.17	0	R.GNVGVVLFNFGK.E
106 - 113	1002.41	1001.40	1001.53	-0.13	0	R.IAQLICER.I
114 - 130	2066.77	2065.76	2065.98	-0.23	0	R.IFYPEIEEVQALDDTER.G

Stathmin

Massa: 17161 Score: 228 pl: 5.77

Sequence Coverage: 29% # Acesso: IPI00479997

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
14 - 26	1388.57	1387.56	1387.75	-0.18	0	R.ASGQAFELILSPR.S
27 - 40	1541.62	1540.61	1540.81	-0.20	1	R.SKESVPEFPLSPPK.K
29 - 40	1326.51	1325.51	1325.69	-0.18	0	K.ESVPEFPLSPPK.K
43 - 51	1074.41	1073.40	1073.56	-0.16	0	K.DLSLEEIQK.K
52 - 59	945.37	944.37	944.49	-0.13	1	K.KLEAAEER.R

Ran-specific GTPase-activating protein

Massa: 23467 Score: 237 pl: 5.19

Sequence Coverage: 29% # Acesso: IPI00414127

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
40 - 50	1381.48	1380.47	1380.63	-0.16	0	K.TLEEDEEELFK.M
58 - 68	1335.46	1334.45	1334.61	-0.16	0	R.FASENDLPEWK.E
98 - 118	2449.96	2448.96	2449.12	-0.16	0	K.ICANHYYITPMMELKPNAGSDR.A
142 - 150	1034.40	1033.39	1033.52	-0.13	0	R.FLNAENAQK.F
153 - 159	969.33	968.32	968.44	-0.12	1	K.TKFEECR.K

Actin-related protein 2/3 complex subunit 5

Massa: 16236 Score: 172 pl: 5.47

Sequence Coverage: 24% # Acesso: IPI00550234

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
23 - 46	2552.72	2551.71	2552.02	-0.31	0	K.FVDEEDGGDQGAGPDEGEVDSCLR.Q
131 - 142	1070.48	1069.47	1069.62	-0.15	0	K.ALAAGGVGSIVR.V

Tropomyosin alpha 3 chain (Tropomyosin 3) (Tropomyosin gamma). Splice isoform 2

Massa: 29243 Score: 340 pl: 4.75

Sequence Coverage: 25% # Acesso: IPI00218319

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
13 - 27	1770.70	1769.69	1769.89	-0.20	1	R.KIQVLQQQADDAEER.A
14 - 27	1642.60	1641.60	1641.80	-0.20	0	K.IQVLQQQADDAEER.A
43 - 54	1316.48	1315.48	1315.64	-0.16	0	R.EQAEAEVASLNR.R
56 - 65	1243.50	1242.49	1242.65	-0.16	0	R.IQLVEEELDR.A
117 - 124	940.33	939.32	939.44	-0.12	0	K.HIAEEADR.K
125 - 131	894.36	893.35	893.46	-0.11	1	R.KYEEVAR.K
132 - 142	1284.59	1283.59	1283.74	-0.16	1	R.KLVIIEGDLER.T

Tropomyosin 4

Massa: 28619 **Score:** 154 **pl:**4.67
Sequence Coverage: 14% **# Acesso:**IPI00010779

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
13 - 27	1742.65	1741.64	1741.86	-0.22	1	R.KIQALQQQAEDAEDR.A
14 - 27	1614.56	1613.56	1613.76	-0.21	0	K.IQALQQQAEDAEDR.A
56 - 65	1243.48	1242.47	1242.65	-0.18	0	R.IQLVEEELDR.A
132 - 142	1298.59	1297.58	1297.76	-0.18	1	R.KLVILEGELER.A
133 - 142	1170.51	1169.50	1169.67	-0.17	0	K.LVILEGELER.A

PACAP protein

Massa: 21023 **Score:** 124 **pl:** 5.37
Sequence Coverage: 22% **# Acesso:** IPI00102821

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
55 - 66	1438.50	1437.50	1437.71	-0.21	0	R.AVAYQMWQNLAK.A
98 - 105	1037.33	1036.32	1036.47	-0.15	0	R.NWQDYGVR.E
142 - 163	2650.89	2649.88	2650.19	-0.30	0	R.TCLHYLGEFGEDQIYEAHQQGR.G

39S ribosomal protein L12, mitochondrial precursor

Massa: 21563 **Score:** 73 **pl:** 9.04
Sequence Coverage: 6% **# Acesso :** IPI00005537

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
151 - 162	1360.55	1359.55	1359.75	-0.20	0	K.NYIQGINLVQAK.K

Splice Isoform 2 of Nucleophosmin

Massa: 29617 **Score:** 138 **pl:** 4.47
Sequence Coverage: 25% **# Acesso:** IPI00220740

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
33 - 45	1568.51	1567.50	1567.72	-0.22	0	K.VDNDENEHQLSLR.T
55 - 73	2144.76	2143.75	2144.01	-0.26	0	K.DELHIVEAEAMNYEGSPIK.V
81 - 101	2242.95	2241.95	2242.20	-0.26	0	K.MSVQPTVSLGGFEITPPVLR.L
249 - 262	1819.58	1818.57	1818.84	-0.26	0	R.MTDQEAIQDLWQWR.K

ATP- synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d isoform a

Massa: 18537 **Score:** 223 **pl:** 5.21
Sequence Coverage: 34% **# Acesso:** IPI00220487

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
33 - 41	1093.37	1092.36	1092.52	-0.16	0	K.SWNETLTSR.L
64 - 72	993.34	992.33	992.48	-0.15	0	K.AGLVDDFEK.K
86 - 99	1624.55	1623.54	1623.76	-0.22	1	K.YTAQVDAEEKEDVK.S
112 - 121	1313.44	1312.43	1312.62	-0.19	1	R.IVEYEKEMEK.M
149 - 161	1684.62	1683.62	1683.84	-0.22	1	K.KYPYWPHQPIENL.

Tetratricopeptide repeat protein 1

Massa: 33961 **Score:** 128 **pl:** 4.78
Sequence Coverage: 21% **# Acesso:** IPI00016912

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
129 - 141	1504.50	1503.50	1503.68	-0.19	1	K.KGDYIEAESSYSR.A
130 - 141	1376.42	1375.41	1375.59	-0.18	0	K.GDYIEAESSYSR.A
155 - 161	836.35	835.34	835.46	-0.11	0	R.SILFSNR.A
181 - 190	1174.50	1173.50	1173.65	-0.15	0	K.AIQLNPSYIR.A
214 - 226	1493.61	1492.61	1492.80	-0.19	1	K.SILEKDPSIHQAR.E
273 - 292	2241.77	2240.76	2241.00	-0.24	0	K.QDSSTGYSINQVQNPNNR

Lymphocyte-specific protein 1**Massa:** 37397 **Score:** 329 **pl:** 4.69**Sequence Coverage:** 27% **# Acesso:** IPI00013260

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
43 - 60	1974.74	1973.73	1973.96	-0.22	0	R.QLQAQDEEGGGHVPERPK.Q
92 - 110	2064.70	2063.69	2063.91	-0.21	0	R.QQHEGAQQALDSGEPQCR.S
143 - 169	2864.06	2863.06	2863.24	-0.18	0	K.EGPGPEDTVQDNLGAAGAEQEEHQK.C
227 - 243	2021.77	2020.76	2020.99	-0.23	0	K.IDQWLEQYTQAIETAGR.T
267 - 279	1404.50	1403.49	1403.67	-0.17	0	R.WETGEVQAQSAAK.T

Rho GDP-dissociation inhibitor 2**Massa:** 23031 **Score:** 37 **pl:** 5.10**Sequence Coverage:** 3% **# Acesso:** IPI00003817

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
125 - 131	966.35	965.34	965.47	-0.13	0	K.YVQHTYR.T

Splice Isoform 2 of Ubiquilin-1**Massa:** 59183 **Score:** 69 **pl:** 5.01**Sequence Coverage:** 5% **# Acesso:** IPI00071180

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
46 - 62	1995.73	1994.72	1994.96	-0.24	1	K.EKEEFAVPENSSVQQFK.E
258 - 273	1674.66	1673.65	1673.87	-0.22	0	R.ALSNLESIPGGYNALR.R

60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor**Massa:** 61187 **Score:** 372 **pl:** 5.70**Sequence Coverage:** 16% **# Acesso:** IPI00472102

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
61 - 72	1344.54	1343.53	1343.71	-0.18	0	R.TVIEQSWGSPK.V
97 - 121	2559.94	2558.94	2559.24	-0.31	0	K.LVQDVANNTNEEAGDGTATVTLAR.S
237 - 249	1601.54	1600.54	1600.74	-0.21	0	K.CEFQDAYVLLSEK.K
250 - 268	2046.91	2045.91	2046.16	-0.25	1	K.KISSIQSIVPALEIANAHR.K
251 - 268	1918.83	1917.82	1918.06	-0.24	0	K.ISSIQSIVPALEIANAHR.K
302 - 309	833.27	832.26	832.38	-0.12	0	K.APGFGDNR.K
430 - 446	1684.69	1683.68	1683.90	-0.22	0	R.AAVEEGIVLGGGCALLR.C

Adhesion-regulating molecule 1 precursor**Massa:** 42412 **Score:** 47 **pl:** 4.96**Sequence Coverage:** 3% **# Acesso:** IPI00033030

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
22 - 27	826.33	825.32	825.44	-0.12	0	K.YLVEFR.A
105 - 113	1241.43	1240.42	1240.60	-0.18	0	R.LFFWMQEPK.T

Splice Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K**Massa:** 51230 **Score:** 92 **pl:** 5.39**Sequence Coverage:** 13% **# Acesso:** IPI00216049

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
22 - 35	1751.59	1750.58	1750.79	-0.21	1	K.RPAEDMEEEEQAFKR.S
70 - 86	1780.58	1779.57	1779.79	-0.22	0	R.TDYNASVSPDSSGPER.I
140 - 148	1098.30	1097.29	1097.44	-0.15	0	K.GSDFDCELR.L
180 - 191	1549.45	1548.44	1548.64	-0.21	0	K.LFQECCPHSTDR.V
306 - 316	1194.53	1193.53	1193.69	-0.17	0	R.NLPLPPPPPPR.G

Hsc70-interacting protein

Massa: 41477 **Score:** 100 **pl:** 5.18
Sequence Coverage: 13% **# Acesso:** IPI00032826

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
119 - 132	1470.58	1469.57	1469.77	-0.20	0	K.VAAIEALNDGELQK.A
133 - 142	1106.44	1105.44	1105.60	-0.17	0	K.AIDLFTDAIK.L
174 - 186	1445.53	1444.53	1444.72	-0.19	0	R.AIEINPDSAQPYK.W
211 - 222	1386.41	1385.41	1385.60	-0.20	0	K.LDYDEDASAMLK.

Protein disulfide-isomerase A3 precursor

Massa: 57146 **Score:** 327 **pl:** 5.98
Sequence Coverage: 15% **# Acesso:** IPI00025252

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
259 - 271	1619.56	1618.56	1618.78	-0.22	0	K.DLLIAYYDVDYEK.N
336 - 344	1172.37	1171.37	1171.53	-0.17	0	K.FVMQEEFSR.D
336 - 344	1188.37	1187.36	1187.53	-0.17	0	K.FVMQEEFSR.D
352 - 362	1359.46	1358.46	1358.65	-0.19	0	R.FLQDYFDGNLK.R
380 - 395	1832.66	1831.65	1831.90	-0.24	0	K.VVVAENFDEIVNNENK.D
434 - 448	1680.53	1679.52	1679.75	-0.22	0	K.MDATANDVSPYEV.R.G
449 - 460	1341.49	1340.48	1340.68	-0.19	0	R.GFPTIYFSPANK.K

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F

Massa: 45985 **Score:** 283 **pl:** 5.38
Sequence Coverage: 19% **# Acesso:** IPI00003881

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
53 - 68	1709.56	1708.55	1708.78	-0.23	0	R.QSGEAFVELGSEDDVK.M
99 - 114	1630.50	1629.49	1629.71	-0.22	0	K.HSGPNSADSANDGFVR.L
300 - 316	1996.72	1995.72	1995.97	-0.25	0	K.ATENDIYNFFSPLNPVR.V
317 - 326	1092.42	1091.41	1091.57	-0.16	0	R.VHIEIGPDGR.V
327 - 347	2207.76	2206.75	2207.01	-0.25	0	R.VTGEADVEFATHEEAVAAMSK.D

UBA/UBX 33.3 kDa protein

Massa: 33419 **Score:** 248 **pl:** 5.23
Sequence Coverage: 32% **# Acesso:** IPI00027378

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
63 - 91	2845.96	2844.96	2845.28	-0.33	0	R.EPTSSEQGGLEGSG SAAGEGKPALSEEER.Q
179 - 209	3083.22	3082.22	3082.54	-0.32	1	K.YGGSVGSQPPPVA PEPGVPSSPSQEPPTKR.E
220 - 231	1335.50	1334.50	1334.68	-0.19	0	R.LPDGTSLTQTFR.A
241 - 247	929.38	928.37	928.51	-0.14	0	R.LYVELHR.G
248 - 266	1955.73	1954.72	1954.97	-0.25	0	R.GEELGGQDPVQLLSGFPR.R

HLA class I histocompatibility antigen, B-42 alpha chain Precursor

Massa: 40650 **Score:** 528 **pl:** 5.55
Sequence Coverage: 31% **# Acesso:** IPI00472676

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
46 - 59	1645.60	1644.59	1644.81	-0.23	0	R.FISVGYVDDTQFVR.F
73 - 86	1775.56	1774.55	1774.80	-0.24	0	R.APWIEQEGPEYWDR.N
146 - 155	1221.43	1220.42	1220.60	-0.18	0	K.DYIALNEDLR.S
156 - 169	1519.54	1518.53	1518.74	-0.21	0	R.SWTAADTAAQITQR.K
182 - 193	1496.51	1495.50	1495.71	-0.21	0	R.AYLEGTCVEWLR.R
211 - 226	1850.68	1849.68	1849.92	-0.24	0	K.THVTHHPISDHEATLR.C
244 - 263	2231.73	2230.73	2230.99	-0.27	0	R.DGEDQTQDTELVETRPAGDR.T
268 - 280	1427.52	1426.51	1426.72	-0.21	0	K.WAAVVVPSGEEQR.Y

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1

Massa: 49484 Score: 447 pI: 5.89
 Sequence Coverage: 23% # Acesso: IPI00013881

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
17 - 29	1504.48	1503.48	1503.68	-0.20	0	R.GLPWSCSADEVQR.F
50 - 68	2106.72	2105.71	2105.98	-0.26	0	R.EGRPSGEAFVELESEDEVK.L
99 - 114	1684.54	1683.54	1683.76	-0.22	0	K.HTGPNSPDTANDGFVR.L
151 - 167	1841.66	1840.65	1840.88	-0.24	0	R.STGEAFVQFASQEIAEK.A
263 - 275	1601.43	1600.43	1600.64	-0.21	0	R.DLNYCFSGMSDHR.Y
263 - 275	1617.43	1616.42	1616.63	-0.21	0	R.DLNYCFSGMSDHR.Y
300 - 316	1996.72	1995.72	1995.97	-0.25	0	R.ATENDIYNFFSPLNPVR.V
317 - 326	1092.42	1091.42	1091.57	-0.16	0	R.VHIEIGPDGR.V

HLA class I histocompatibility antigen, B-14 alpha chain Precursor

Massa: 40675 Score: 246 pI: 5.56
 Sequence Coverage: 30% # Acesso: IPI00472130

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
46 - 59	1645.57	1644.57	1644.81	-0.25	0	R.FISVGYVDDTQFVR.F
73 - 86	1775.53	1774.53	1774.80	-0.27	0	R.APWIEQEGPEYWR.N
146 - 169	2652.91	2651.90	2652.27	-0.36	0	K.DYIALNEDLSSWTAADTAAQITQR.K
182 - 193	1496.49	1495.49	1495.71	-0.23	0	R.AYLEGTCVEWLR.R
211 - 226	1850.65	1849.64	1849.92	-0.28	0	K.THVTHHPISDHEATLR.C
268 - 280	1427.51	1426.50	1426.72	-0.22	0	K.WAAVVVPSGEEQR.Y
281 - 297	2048.77	2047.76	2048.06	-0.30	0	R.YTCHVQHEGLPKPLTLR.W

Stress-induced-phosphoprotein 1

Massa: 63227 Score: 206 pI: 6.40
 Sequence Coverage: 11% # Acesso: IPI00013894

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
33 - 44	1464.55	1463.54	1463.73	-0.19	0	K.LDPHNHVLYSNR.S
79 - 87	1004.42	1003.41	1003.55	-0.14	0	K.AAALEFLNR.F
154 - 160	900.39	899.38	899.51	-0.12	0	R.ELIEQLR.N
352 - 364	1488.61	1487.60	1487.79	-0.19	0	R.LAYINPDALALEEK.N
416 - 429	1781.60	1780.59	1780.80	-0.21	0	K.DCEECIQLEPTFIK.G
463 - 470	909.28	908.27	908.40	-0.13	0	K.EAADGYQR.C

Ezrin-radixin-moesin binding phosphoprotein 50

Massa: 38999 Score: 42 pI: 5.55
 Sequence Coverage: 7% # Acesso: IPI00003527

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
112 - 137	2587.91	2586.90	2587.19	-0.29	0	R.AQEAPGQAEPAAAAEVQGAGNENEPR.E

Eukaryotic translation initiation factor 4B

Massa: 69240 Score: 54 pI: 5.49
 Sequence Coverage: 4% # Acesso: IPI00012079

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
201 - 214	1607.60	1606.59	1606.74	-0.15	0	R.ARPATDSFDDYPPR.R
512 - 524	1294.51	1293.50	1293.63	-0.13	0	K.VAPAQPSEEGPGR.K

Splice Isoform Short of Proteasome subunit alpha type 1

Massa: 29822 Score: 239 pI: 6.15
 Sequence Coverage: 22% # Acesso: IPI00016832

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
4 - 18	1778.58	1777.57	1777.80	-0.23	0	R.NQYDNDVTWSPQGR.I
19 - 30	1447.52	1446.52	1446.72	-0.20	0	R.IHQIEYAMEAVK.Q

97 - 107	1332.56	1331.55	1331.73	-0.18	0	R.FVFDRPLPVS.R.L
116 - 122	843.35	842.34	842.46	-0.12	0	K.TQIPTQR.Y
175 - 189	1912.60	1911.59	1911.82	-0.23	0	R.HMSEFMECNLNELVK.H

Splice Isoform 2 of Triosephosphate isomerase

Massa: 27320 **Score:** 496 **pl:** 8.50
Sequence Coverage: 33% **#Acesso:** IPI00451401

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
5 - 13	1082.42	1081.41	1081.57	-0.16	1	R.KFFVGGNWK.M
6 - 13	954.34	953.33	953.48	-0.14	0	K.FFVGGNWK.M
33 - 52	2191.80	2190.79	2191.06	-0.27	0	K.VPADTEVVCAPPTAYIDFAR.Q
59 - 68	1137.41	1136.40	1136.56	-0.16	0	K.IAVAAQNCYK.V
85 - 98	1586.53	1585.52	1585.73	-0.21	0	K.DCGATWVVLGHSER.R
99 - 112	1614.61	1613.61	1613.82	-0.21	1	R.RHVFGESEDELIGQK.V
100 - 112	1458.52	1457.52	1457.71	-0.20	0	R.HVFGESDELIGQK.V
160 - 174	1602.67	1601.67	1601.88	-0.22	0	K.VVLAYEPVWAIGTGK.T

Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor

Massa: 29032 **Score:** 192 **pl:** 6.77
Sequence Coverage: 21% **#Acesso:** IPI00024911

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
60 - 69	1247.39	1246.38	1246.55	-0.17	0	K.FDTQYPYGEK.Q
113 - 122	1320.49	1319.49	1319.65	-0.17	0	K.ESYPVFYLF.R.D
123 - 137	1608.56	1607.55	1607.75	-0.20	0	R.DGDFENVPYTGAVK.V
198 - 204	937.35	936.34	936.47	-0.13	0	K.WAEQYLK.I
209 - 223	1708.57	1707.56	1707.78	-0.22	0	K.ILDQGEDFPASEMTR.I
209 - 223	1724.57	1723.56	1723.77	-0.21	0	K.ILDQGEDFPASEMTR.I

DJ-1 protein

Massa: 20050 **Score:** 191 **pl:** 6.33
Sequence Coverage: 29% **#Acesso:** IPI00298547

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
13 - 27	1675.57	1674.56	1674.80	-0.23	0	K.GAEEMETVIPVDVMR.R
13 - 27	1691.57	1690.57	1690.79	-0.22	0	K.GAEEMETVIPVDVMR.R
13 - 27	1707.57	1706.56	1706.79	-0.23	0	K.GAEEMETVIPVDVMR.R
49 - 63	1659.61	1658.60	1658.82	-0.22	1	R.DVVICPDASLEDAKK.E
64 - 89	2584.04	2583.04	2583.32	-0.28	0	K.EGPYDVVVLPGGNLGAQNLSAASK.E

Splice Isoform 4 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B

Massa: 31328 **Score:** 265 **pl:** 9.35
Sequence Coverage: 24% **#Acesso:** IPI00106509

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
70 - 81	1327.45	1326.44	1326.63	-0.19	0	K.MFVGGLSWDTSK.K
70 - 81	1343.44	1342.43	1342.62	-0.19	0	K.MFVGGLSWDTSK.K
91 - 100	1167.40	1166.39	1166.56	-0.18	0	K.FGEVVDCTIK.M
110 - 117	928.39	927.38	927.52	-0.14	0	R.GFGFILFK.D
171 - 189	2229.74	2228.74	2229.02	-0.28	0	R.EYFGEFGEIEAIELPMDPK.L
195 - 202	958.39	957.39	957.53	-0.15	0	R.GFVFITFK.E
232 - 244	1499.48	1498.47	1498.68	-0.21	0	K.EVYQQQQYGSGGR.G

GrpE protein homolog 1, mitochondrial precursor

Massa: 24492 **Score:** 176 **pl:** 8.24
Sequence Coverage: 23% **#Acesso:** IPI00029557

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
81 - 89	1002.40	1001.39	1001.51	-0.13	0	R.ALADTENLR.Q
139 - 153	1764.69	1763.69	1763.91	-0.23	0	K.NLYEGLVMTEVQIQK.V

139 - 153	1780.71	1779.70	1779.91	-0.21	0	K.NLYEGLVMTEVQIQK.V
170 - 186	2015.72	2014.71	2014.94	-0.23	0	K.FDPYEHEALFHTPVVEGK.E
205 - 215	1152.60	1151.59	1151.74	-0.15	0	R.TLRPALVGVVK.E

Hypothetical protein

Massa: 27318 **Score:** 63 **pl:** 6.06
Sequence Coverage: 5% **#Acesso:** IPI00014197

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
238 - 251	1675.66	1674.65	1674.86	-0.21	0	K.LQLDNQYAVLENQK.S

Splice Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3

Massa: 36960 **Score:** 109 **pl:** 6.37
Sequence Coverage: 19% **#Acesso:** IPI00013877

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
56 - 67	1271.47	1270.46	1270.62	-0.16	0	R.STGEAFVQFASK.E
85 - 90	840.36	839.35	839.45	-0.10	0	R.YIEIFR.S
139 - 169	3278.91	3277.90	3278.20	-0.30	0	R.GGDGYDGGYGGFDDY GGYNNYGYGNDGFDDR.M
206 - 222	1918.76	1917.75	1917.96	-0.21	0	R.ATENDIANFFSPLNPIR.V

Proteasome activator complex subunit 1

Massa: 28876 **Score:** 208 **pl:** 5.78
Sequence Coverage: 24% **# Acesso:** IPI00030154

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
25 - 35	1268.51	1267.50	1267.64	-0.15	0	K.TENLLGSYFPK.K
36 - 45	1163.52	1162.52	1162.66	-0.14	1	K.KISELDAFLK.E
110 - 116	840.47	839.46	839.56	-0.10	0	K.IVLLQR.L
142 - 155	1519.57	1518.57	1518.73	-0.16	0	R.IEDGNNFGVAVQEK.V
191 - 198	971.35	970.35	970.46	-0.11	0	K.QPHVGDYR.Q
199 - 210	1501.56	1500.55	1500.72	-0.17	0	R.QLVHELDEAEYR.D

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Massa: 36070 **Score:** 114 **pl:** 8.58
Sequence Coverage: 10% **# Acesso:** IPI00219018

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
118 - 138	2244.87	2243.87	2244.09	-0.23	0	R.VIISAPSADAPMFVMGVNHEK.Y
309 - 322	1763.61	1762.60	1762.80	-0.20	0	K.LISWYDNEFGYSNR.V

6-phosphogluconolactonase

Massa: 27815 **Score:** 304 **pl:** 5.70
Sequence Coverage: 25% **#Acesso:** IPI00029997

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
57 - 72	1490.69	1489.68	1489.83	-0.15	0	R.ELPAAVAPAGPASLAR.W
73 - 81	1183.39	1182.39	1182.51	-0.13	0	R.WTLGFCDER.L
82 - 96	1767.70	1766.70	1766.86	-0.17	0	R.LVPFDHAESTYGLYR.T
171 - 185	1601.74	1600.74	1600.89	-0.16	0	K.IVAPISDSPKPPQQR.V

Splice Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3

Massa: 35273 **Score:** 55 **pl:** 6.36
Sequence Coverage: 12% **# Acesso:** IPI00216492

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
130 - 154	2744.81	2743.81	2744.03	-0.22	0	R.GSYGGFDDYGGYNNYGYGNDGFDDR.M

191 - 207 1918.77 1917.77 1917.96 -0.19 0 R.ATENDIANFFSPLNPIR.V

Nuclear protein Hcc-1

Massa: 23582 Score: 181 pl: 6.13
Sequence Coverage: 23% # Acesso: IPI00014938

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
92 - 101	1173.48	1172.48	1172.60	-0.13	0	K.ITSEIPQTER.M
109 - 118	1119.47	1118.47	1118.60	-0.13	0	R.FNVPVSLESK.K
156 - 165	1079.47	1078.46	1078.58	-0.12	0	R.FGLNVSSISR.K
180 - 198	1871.71	1870.71	1870.88	-0.17	0	R.FGIVTSSAGTGTTEDTEAK.K

Inorganic pyrophosphatase

Massa: 33095 Score: 117 pl: 5.54
Sequence Coverage: 25% # Acesso: IPI00015018

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
10 - 18	1053.44	1052.44	1052.53	-0.09	0	R.AAPFSLEYR.V
26 - 41	1863.79	1862.79	1862.92	-0.13	0	K.GQYISPFHDIPIYADK.D
80 - 88	1114.49	1113.48	1113.59	-0.11	0	R.YVANLFPYK.G
156 - 177	2444.06	2443.05	2443.20	-0.14	1	K.VIAINVDDPDAANYNDINDVKR.L
193 - 211	2229.93	2228.93	2229.07	-0.15	1	R.YKVPDGKPENEFANAEFK.D
195 - 211	1938.80	1937.79	1937.92	-0.13	0	K.VPDGKPENEFANAEFK.D

Ras-GTPase-activating protein binding protein 1

Massa: 52189 Score: 155 pl: 5.36
Sequence Coverage: 17% # Acesso: IPI00012442

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
124 - 132	1210.48	1209.47	1209.59	-0.12	0	K.FYVHNDIFR.Y
258 - 276	1878.90	1877.89	1878.07	-0.18	0	K.NLPPSGAVPVTGIPPHVVK.V
277 - 299	2609.18	2608.18	2608.38	-0.21	0	K.VPASQRPESKPEQIPPQRPQR.D
336 - 353	2082.86	2081.85	2082.03	-0.18	0	R.HPDSHQLFIGNLPHEVDK.S
358 - 370	1573.61	1572.61	1572.76	-0.15	0	K.DFFQSYGNVVELR.I

Prohibitin

Massa: 29843 Score: 63 pl: 5.57
Sequence Coverage: 13% # Acesso: IPI00017334

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
106 - 117	1444.51	1443.51	1443.65	-0.15	0	R.IFTSIGEDYDER.V
134 - 143	1149.47	1148.46	1148.58	-0.12	0	R.FDAGELITQR.E
240 - 253	1606.68	1605.67	1605.84	-0.16	1	R.KLEAAEDIAYQLSR.S

Hypothetical protein

Massa: 33570 Score: 63 pl: 5.40
Sequence Coverage: 14% # Acesso: IPI00007102

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
6 - 12	861.39	860.39	860.49	-0.11	0	R.ALHFVFK.V
82 - 101	2051.81	2050.80	2051.01	-0.21	0	K.LGNDFMGITLASSQAVSNAR.K
82 - 101	2067.81	2066.80	2067.01	-0.20	0	K.LGNDFMGITLASSQAVSNAR.K
125 - 130	840.33	839.33	839.43	-0.10	0	K.FYLNQR.S
191 - 201	1057.40	1056.39	1056.51	-0.12	0	K.GGVDHAAAFGR.I

F-actin capping protein alpha-1 subunit

Massa: 33073 Score: 138 pl: 5.45
Sequence Coverage: 26% # Acesso: IPI00005969

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
20 - 37	2088.79	2087.78	2088.01	-0.22	0	K.FITHAPPGEFNEVFNDVR.L
67 - 86	2244.85	2243.84	2244.07	-0.22	0	K.IEGYEDQVLITEHGDGNSR.F
147 - 166	2313.92	2312.92	2313.14	-0.23	0	K.TIDGQQTIACIESHQFQPK.N
194 - 210	2028.80	2027.79	2028.01	-0.21	0	K.IQVHYEDGNVQLVSHK.D

Calponin-3

Massa: 36562 Score: 42 pI: 5.69
 Sequence Coverage: 9% # Acesso: IPI00216682

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
24 - 33	1275.41	1274.40	1274.55	-0.15	0	K.YDHQAEEDLR.N
193 - 212	2315.88	2314.87	2315.08	-0.21	0	K.MQTDKPFQTTISLQMGTK.N

HLA class I histocompatibility antigen, A-1 alpha chain Precursor

Massa: 41105 Score: 376 pI: 6.08
 Sequence Coverage: 26% # Acesso: IPI00026569

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
46 - 59	1629.63	1628.62	1628.82	-0.20	0	R.FIAVGYVDDTQFVR.F
73 - 89	2133.71	2132.70	2132.94	-0.24	0	R.APWIEQEGPEYWDQETR.N
139 - 155	1998.70	1997.70	1997.93	-0.24	1	R.QDAYDGKDYIALNEDLR.S
146 - 155	1221.46	1220.45	1220.60	-0.15	0	K.DYIALNEDLR.S
171 - 180	1196.44	1195.43	1195.57	-0.14	0	K.WEAVHAAEQR.R
244 - 267	2636.92	2635.91	2636.18	-0.27	0	R.DGEDQTQDTELVEVTRPAGDGTQK.W
268 - 280	1427.55	1426.54	1426.72	-0.18	0	K.WAAVVVPSGEEQR.Y

DUTP pyrophosphatase isoform 3

Massa: 15500 Score: 75 pI: 6.13
 Sequence Coverage: 22% # Acesso: IPI00619934

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
69 - 83	1705.66	1704.66	1704.81	-0.15	0	K.HFIDVGAGVIDEDYR.G
114 - 130	2066.83	2065.82	2065.98	-0.16	0	R.IFYPEIEEVQALDDTER.G

Stress-70 protein, mitochondrial precursor

Massa: 73920 Score: 223 pI: 5.87
 Sequence Coverage: 11% # Acesso: IPI00007765

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
188 - 202	1694.69	1693.68	1693.84	-0.16	0	K.NAVITVPAYFNDSQR.Q
207 - 218	1242.55	1241.54	1241.67	-0.13	0	K.DAGQISGLNVLR.V
349 - 360	1361.61	1360.60	1360.74	-0.14	0	R.AQFEGIVTDLIR.R
378 - 391	1446.61	1445.61	1445.75	-0.15	0	K.SDIGEVILVGGMTR.M
378 - 391	1462.61	1461.61	1461.75	-0.14	0	K.SDIGEVILVGGMTR.M
395 - 405	1290.55	1289.54	1289.67	-0.13	0	K.VQQTQVQDLFGR.A
499 - 513	1592.80	1591.79	1591.94	-0.16	0	K.LLGQFTLIGIPPAPR.G

Profilin-1

Massa: 15085 Score: 61 pI: 8.48
 Sequence Coverage: 26% # Acesso: IPI00216691

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
75 - 88	1625.60	1624.59	1624.74	-0.15	0	R.DSLLQDGEFSMDLR.T
75 - 88	1641.60	1640.59	1640.74	-0.15	0	R.DSLLQDGEFSMDLR.T
91 - 104	1379.58	1378.57	1378.71	-0.14	0	K.STGGAPTFNVTVT.K
127 - 135	1182.38	1181.37	1181.50	-0.13	0	K.CYEMASHLR.R

Splice Isoform Long of Splicing factor, praline -and glutamine-rich

Massa: 76216 Score: 54 pl: 9.45
 Sequence Coverage: 1% #Acesso: IPI00010740

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
480 - 493	1762.66	1761.65	1761.77	-0.12	0	R.FAQHGTFEYEYSQR.W

Involucrin

Massa: 68541 Score: 189 pl: 4.62
 Sequence Coverage: 19% # Acesso: IPI00011692

Start-End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
150 - 164	1790.70	1789.69	1789.92	-0.23	0	K.EQLLELPEQQEGHLK.H
265 - 284	2374.87	2373.87	2374.12	-0.25	0	K.HLEHQEGQLEVPEEQMGQLK.Y
325 - 344	2392.90	2391.89	2392.15	-0.26	0	K.HLEQQEGQLEEQLEEQQLK.H
405 - 418	1721.63	1720.63	1720.85	-0.22	0	K.HLVQQEGQLEQQR.Q
442 - 461	2299.93	2298.92	2299.16	-0.23	0	K.HLEQQQGQLEVPEQQVGPKN
538 - 562	2629.14	2628.13	2628.39	-0.26	0	K.GQLEQPVFAPAPGQVQDIQPALPTK.G

Splicing Isoform 2 of Mediator of DNA Damage Checkpoint Protin 1

Massa: 222666 Score: 49 pl: 6.8
 Sequence Coverage: 8% #Acesso: IPI00291929

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
84-92	1090.47	1089.46	1089.44	0.02	0	R.DAEEDMPQR

Peroxiredoxin 5, mitochondrial precursor

Massa: 22298 Score: 47 pl: 8.85
 Sequence Coverage: 7% #Acesso: IPI00024915

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
160 - 176	1906.82	1905.81	1905.97	-0.15	0	K.ETDLLLDDSLVSIFGNR.R

Nucleoside diphosphate kinase B

Massa: 17401 Score: 63 pl: 8.52
 Sequence Coverage: 38% #Acesso: IPI00026260

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
7 - 18	1344.74	1343.74	1343.76	-0.02	0	R.TFIAIKPDGVQR.G
57 - 66	1175.64	1174.63	1174.65	-0.02	0	K.DRPFPPGLVK.Y
89 - 105	1801.88	1800.87	1800.90	-0.03	0	R.VMLGETNPADSKPGTIR.G Oxidation (M)
106 - 114	1051.49	1050.48	1050.49	-0.01	0	R.GDFCIQVGR.N
115 - 124	1069.55	1068.54	1068.56	-0.02	0	R.NIIHGSDSVK.S

Peroxiredoxin 1

Massa: 22324 Score: 44 pl: 8.27
 Sequence Coverage: 10% #Acesso: IPI00000874

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
8 - 16	980.45	979.44	979.52	-0.08	0	K.IGHPAPNFK.A
141 - 151	1211.59	1210.58	1210.67	-0.09	0	R.QITVNDLPVGR.S

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A

Massa: 18229 Score: 65 pl: 7.68
 Sequence Coverage: 19% #Acesso: IPI00419585

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
2 - 19	1945.80	1944.80	1944.99	-0.20	0	M.VNPTVFFDIAVDGEPLGR.V
56 - 69	1598.58	1597.57	1597.74	-0.17	0	R.IIPGFMCQGGDFTR.H
56 - 69	1614.58	1613.57	1613.73	-0.16	0	R.IIPGFMCQGGDFTR.H Oxidation (M)

Triosephosphate isomerase 1 variant

Massa: 26981 Score: 148 pI: 6.90
 Sequence Coverage: 24% # Acesso: IPI00465028

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
34 - 53	2191.87	2190.87	2191.06	-0.20	0	K.VPADTEVVCPPTAYIDFAR.Q
101 - 113	1458.58	1457.57	1457.71	-0.14	0	R.HVFGESDELIGQK.V
220 - 248	3029.32	3028.31	3028.58	-0.27	0	K.ELASQPDVDGFLVGGASLKPEFVDIINAK.Q

Voltage-dependent anion-selective channel protein 1

Massa: 30737 Score: 82 pI: 8.63
 Sequence Coverage: 27% # Acesso: IPI00216308

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
63 - 73	1374.62	1373.61	1373.65	-0.04	0	R.WTEYGLTFTEK.W
96 - 108	1400.63	1399.62	1399.66	-0.04	0	K.LTFDSSFSPNTGK.K
120 - 138	2175.94	2174.93	2174.97	-0.04	0	R.EHINLGCDMDFDIAGPSIR.G Oxidation (M)
174 - 196	2600.12	2599.11	2599.18	-0.07	0	K.TDEFQLHTNVNDGTEFGGSIYQK.V
224 - 235	1414.58	1413.57	1413.62	-0.05	0	K.YQIDPDACFSAK.V

Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor

Massa: 35965 Score: 40 pI: 8.92
 Sequence Coverage: 15% # Acesso: IPI00291006

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
79 - 91	1489.61	1488.61	1488.73	-0.12	0	K.GYLGPEQLPDCLK.G
92 - 104	1338.61	1337.60	1337.71	-0.11	0	K.GCDVVVIPAGVPR.K
166 - 176	1233.62	1232.61	1232.71	-0.10	0	K.IFGVTTLDIR.A
216 - 229	1560.68	1559.68	1559.79	-0.12	0	K.VDFPQDQLTALTGR.I

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Massa: 36070 Score: 55 pI: 8.58
 Sequence Coverage: 15% # Acesso: IPI00219018

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
162 - 185	2611.13	2610.12	2610.35	-0.23	0	K.VIHDNFGIVEGLMTTVHAITATQK.T Oxi.(M)
234 - 247	1530.65	1529.64	1529.79	-0.14	0	R.VPTANVSVVDLTCR.L
309 - 322	1763.64	1762.64	1762.80	-0.16	0	K.LISWYDNEFGYSNR.V

Alpha-enolase

Massa: 47350 Score: 83 pI: 6.99
 Sequence Coverage: 11% # Acesso: IPI00465248

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
32 - 49	1804.97	1803.96	1803.94	0.02	0	R.AAVPSGASTGIYEALR.D
162 - 178	1924.02	1923.02	1922.97	0.04	0	K.LAMQEFMILPVGAANFR.E Oxidation (M)
239 - 252	1540.80	1539.80	1539.78	0.02	0	K.VVIGMDVAASEFFR.S
239 - 252	1556.80	1555.79	1555.77	0.02	0	K.VVIGMDVAASEFFR.S Oxidation (M)

Splice Isoform 2 of DEAD-box protein 4

Massa: 76571 Score: 36 pI: 5.33
 Sequence Coverage: 11% # Acesso: IPI00456933

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
26 - 50	2706.22	2705.21	2705.09	0.12	1	R.YSGENDNFNRTPASSEMDGSPR.R Oxi.(M)
342 - 353	1475.78	1474.77	1474.81	-0.05	1	R.ELVNQIYLEARK.F
439 - 456	2211.14	2210.14	2210.08	0.06	1	K.EQRQTLMFSAFPPEIQR.L
503 - 516	1638.91	1637.90	1637.81	0.10	1	R.NIGDERTMVFVETK.K

544 - 553 1220.73 1219.72 1219.59 0.12 1 R.EREQALGDFR.F

Hypothetical protein FLJ23429

Massa: 21855 Score: 37 pI: 9.64

Sequence Coverage: 22% #Acesso: IPI00017951

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
66 - 89	2705.95	2704.95	2705.26	-0.31	1	K.ATNTHSCMVHAKATNTHSCIIHAK.V Oxi(M)
126 - 137	1338.61	1337.60	1337.65	-0.05	0	K.ATNTHSCIVHAK.A
170 - 176	905.60	904.59	904.50	0.09	1	R.VHQRTHK.T

Similar to F-box only protein 9 isoform 3: F-box protein Fbx9

Massa: 25904 Score: 44 pI: 9.46

Sequence Coverage: 14% #Acesso: IPI00639860

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
64 - 85	2367.10	2366.10	2366.22	-0.12	1	K.RAGPLPCPLVSPQNSASQVFNK.Y
65 - 85	2211.02	2210.02	2210.12	-0.10	0	R.AGPLPCPLVSPQNSASQVFNK.Y
144 - 151	1077.13	1076.12	1076.54	-0.42	0	R.EMFLERPR.V

SLC27A4 protein

Massa: 26226 Score: 43 pI: 5.60

Sequence Coverage: 15% #Acesso: IPI00101335

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
80 - 97	2211.03	2210.03	2210.10	-0.07	0	R.YLVSDVLMDELGYLYFR.D Oxidation (M)
80 - 99	2466.17	2465.16	2465.23	-0.07	1	R.YLVSDVLMDELGYLYFRDR.T
106 - 122	1892.77	1891.76	1891.93	-0.17	1	R.WKGENVSTTEVEGTLR.L

Cytochrome c oxidase subunit VIb isoform 1

Massa: 10283 Score: 38 pI: 6.78

Sequence Coverage: 36% #Acesso: IPI00216085

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
20 - 27	1004.41	1003.40	1003.48	-0.08	0	R.FPNQNR.N
28 - 38	1552.60	1551.59	1551.67	-0.08	0	R.NCWQNYLDFHR.C
47 - 58	1469.57	1468.56	1468.64	-0.08	0	K.GGDISVCEWYQR.V

PDZ and LIM domain protein 1

Massa: 36374 Score: 72 pI: 6.55

Sequence Coverage: 11% #Acesso: IPI00010414

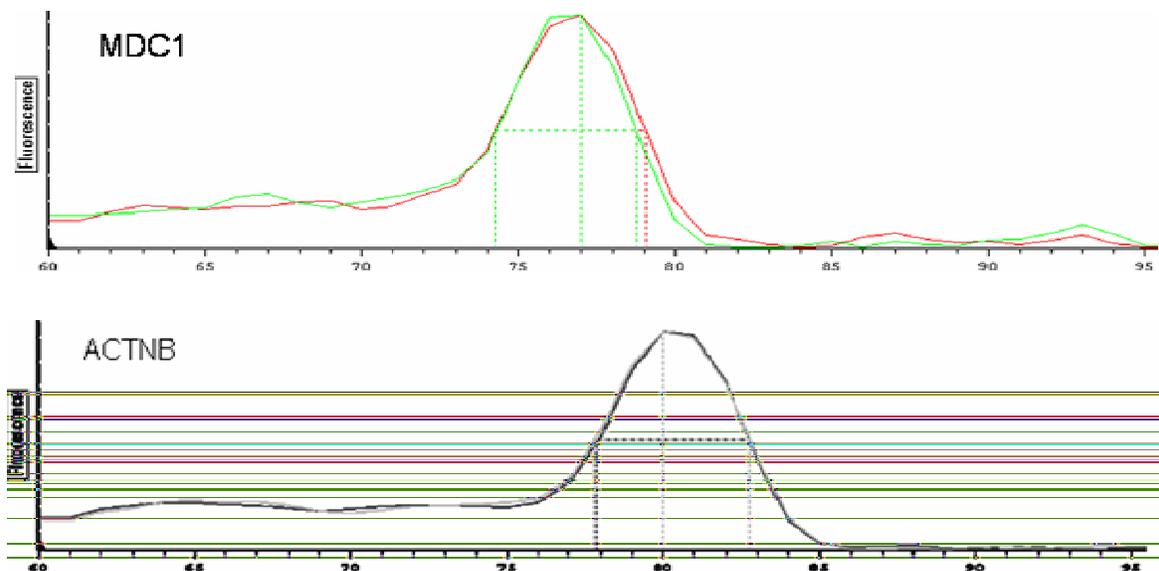
Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
22 - 31	1175.46	1174.45	1174.60	-0.15	0	K.DFEQPLAISR.V
296 - 308	1671.56	1670.55	1670.74	-0.19	0	K.GHFFVEDQIYCEK.H
314 - 328	1661.70	1660.69	1660.87	-0.18	0	R.VTPPEGYEVTVFPK.-

Hypothetical protein LOC25900 isoform 3

Massa: 22947 Score: 38 pI: 4.3

Sequence Coverage: 22% #Acesso: IPI00550316

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
98 - 107	1179.57	1178.56	1178.65	-0.10	1	K.VIKDTESLFK.T
112 - 128	1993.93	1992.93	1992.99	-0.06	0	K.EYQETIDQIELELATAK.N
129 - 145	2226.07	2225.06	2224.89	0.16	1	K.NDMNRHLHEYMEMCSMK.R
134 - 146	1799.91	1798.91	1798.73	0.18	1	R.HLHEYMEMCSMKR.G 3 Oxidation (M)

ANEXO 2**Curva de *Melting* para genes alvos em Real-time PCR**

Anexo 2. Resultado da curva de *Melting* para genes alvos. Imagem resultado da detecção de fluorescência em relação ao produto amplificado quando utilizados oligos para genes alvos *ACTNB* e *MDC1*. A fluorescência foi detectada em intervalos de 1°C, começando com 60°C até 95°C. Os picos únicos mostram que os oligos elaborados para o *Real Time PCR* são específicos para seus respectivos genes alvos.

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Análise Proteômica Diferencial Associada à Inativação do
Gene Fanconi C
Daniela Salles Cesar de Oliveira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Biofísica – programa de Biologia Molecular e Estrutural, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

ORIENTADOR: Januário Bispo Cabral Neto

Rio de Janeiro
2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Daniela Salles Cesar de

Análise Proteômica Diferencial Associada à Inativação do Gene Fanconi C /Daniela Salles Cesar de Oliveira. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro – IBCCF

x 98f.

Orientador: Januário Bispo Cabral Neto

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Biofísica – programa de Biologia Molecular e Estrutural, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006

AGRADECIMENTOS:

Ao orientador, Professor Januário Bispo Cabral Neto
A Unidade Genômica e a Rede proteômica do Rio de Janeiro
A minha família
Aos amigos
A todos que contribuíram direta e indiretamente para a execução desse trabalho
Ao Erick

**“é melhor ter um desvio de septo do que um desvio de caráter” – Rodrigo
Aguar
*in memoriam***

RESUMO

Anemia de Fanconi (FA) é uma doença genética predominantemente

ABSTRACT

Fanconi Anemia is a rare recessive genetic disease predominantly autosomic. Fanconi cells have, as major phenotypic characteristics, hypersensitivity to genotoxic agents interstrand cross-link (ICLs) and inefficiency to promote the phase-S checkpoints induced by ionizing radiation. With the objective of understanding more about the molecular signaling pathways involved with DNA repair of lesions induced by cross-link agents and the genome's stability mechanisms mediated by the FA/BRCA pathways, we looked forward the identification of proteins possibly-related to these pathways, through description of a proteomic map and the analysis of differentially expressed proteins of two isogenic cell lines: HSC536N – B lymphoblasts mutated in *fancc* gene, thus, no functional FANCC protein; HSC536COR – the same B lymphoblasts transfected with wild-type *fancc* gene, thus, cells are corrected to a wild-type phenotype. These cells were treated, or not, with genotoxic agent, MMC. Proteins extracted, in different treatment status, were resolved by bidimensional electrophoresis, and identified by mass spectrometry (MALDI-ToF). We found seven differentially expressed proteins: splice isoform 2 of mediator of DNA damage checkpoint protein 1, Involucrina, three isoforms of PDZ/LIM domain protein 1, hypothetical protein LOC25900 isoform 3 and one that remains to be identified. We described also 102 proteins (81 diffe

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius
% - por cento
2D - Bidimensional
ACN – Acetonitrila
cm -centímetros
DEB - Diepoxibutano
DEPC - Dietil Pirocarbonato
dNTP - desorribonucleotídeo trifosfatado
DSB – Double Strand Breaks
DTT - Ditiotreitól
EBV -Epstein-Barr virus
EDTA – Ethylene Diamine TetrAcetic acid
EGTA - Ethylene glycol tetraacetic acid
g - grama
ICL – Interstrand Cross-Link
IPG - Immobilized pH gradient (Gradiente de pH imobilizado)
IPI - International Protein Index
LMA – Leucemia Mielóide Aguda
M - molar
mA - mili amperes
MALDI – TOF - Matrix Assisted Laser Desroption-ionization – Time of Flight
mg – mili grama
mL – mili litro
mm - milímetros
mM – mili molar
MMC – Mitomicina C
MS – Mass spectrometry
ng – nano grama
NER – Nucleothide excision repair
NHEJ - Non-Homologous End – Joning
NP-40 - Nonidet P-40
PAGE - SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis
pb - pares de bases
PBS - Phosphate Buffered Saline
PCR - polymerase chain reaction
pH – potencial hidrogeniônico
pg - pico grama
p/v – peso/volume
RI – Radiação ionizante
RH – Recombinação homóloga
RT - Reverse Transcription
rpm - Rotações por minuto
ssDNA – single strand DNA (DNA em fita única)
SCE - Sister-Chromatid Exchange
SDS - Sódio dodecil Sulfato

SMD – Síndrome Mielodisplásica
TEMED - N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
TFA – Ácido trifluoro acético
UV - Ultravioleta
V - Volts
v/v - volume/volume
W - Watts
μL – micro litro
μM – micro molar
μg – micro gramas

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)