

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal



**O papel da trimetilação da histona H3 na
transcrição**

Ana Cláudia Bernardino Raposo

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2011

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal



**O papel da trimetilação da histona H3 na
transcrição**

Ana Cláudia Bernardino Raposo

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Trabalho de projecto orientado por Doutor Sérgio Fernandes de Almeida
e Professor Doutor Júlio Duarte

2011

Agradecimentos

Ao meu orientador, Doutor Sérgio de Almeida por ter aceite a responsabilidade científica deste trabalho e pela ajuda e amizade sempre prestadas ao longo do ano.

Ao Professor Doutor Júlio Duarte pela sua disponibilidade e pelo esclarecimento de dúvidas relativas à tese.

À Professora Doutora Maria do Carmo Fonseca por me ter dado a oportunidade de realizar este trabalho no seu laboratório.

À minha colega e amiga Sílvia Carvalho pelo auxílio prestado em todos os momentos ao longo do ano e principalmente pelo apoio, amizade e companhia sempre concedidos.

À minha colega e amiga Marisa Cabrita pela sua amizade e capacidade de me ajudar nos momentos mais difíceis.

Ao meu colega e amigo Sérgio Marinho pela ajuda na aprendizagem e compreensão de algumas metodologias a serem utilizadas durante esta tese.

À minha colega Noélia Custódio pela ajuda na revisão desta dissertação.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais e irmão pela confiança depositada em mim e pelo amor concedido que me ajudou a enfrentar esta etapa importante da minha vida.

Em geral, a todos os que de alguma forma estiveram envolvidos neste projecto.

Resumo

Os nucleossomas, unidades básicas da cromatina, formados por um octâmero de histonas em associação com um fragmento de DNA, possuem um papel de extrema importância na regulação de processos biológicos que requerem o acesso ao DNA. Estas estruturas controlam eventos chave durante processos tão distintos como a transcrição, replicação e reparação do DNA. As histonas constituintes dos nucleossomas podem sofrer modificações pós-traducionais, entre as quais se salienta neste estudo a trimetilação da lisina 36 da histona H3 (H3K36me3). Esta modificação está presente nas regiões intragénicas de genes activamente transcritos, sendo a sua presença mais significativa na extremidade 3' e também nos exões relativamente aos intrões. Tais propriedades demonstram uma relação entre a H3K36me3 e a transcrição, embora o seu papel ainda não seja claro. Neste estudo utilizaram-se metodologias bioquímicas tais como imunoprecipitação da cromatina, *western blot* e digestão com nucleases para investigar qual o papel exacto desta marca na transcrição em células humanas. Os resultados demonstraram que células com níveis diminuídos de H3K36me3 têm iniciação de transcrição em regiões intragénicas distintas do promotor, o que sugere uma alteração da conformação da cromatina que permite uma maior acessibilidade ao DNA. De facto, experiências adicionais mostraram que perante uma depleção de H3K36me3 a densidade de nucleossomas presentes ao longo dos genes diminui. Por último, verificou-se que a presença desta modificação na histona H3 é necessária para o recrutamento da Spt16, uma proteína envolvida na remontagem dos nucleossomas após a passagem da RNA Polimerase II (RNAPII) na transcrição. Em conjunto, os resultados permitem desenhar um modelo em que a H3K36me3 exerce uma função determinante na manutenção da cromatina numa conformação capaz de suprimir a iniciação da transcrição em regiões intragénicas. Esta função envolve o recrutamento da Spt16 que promove a remontagem dos dímeros H2A-H2B que haviam sido perdidos durante a passagem da RNAPII.

Palavras-chave: Cromatina; Nucleossomas; H3K36me3; Transcrição; Spt16.

Abstract

Nucleosomes are the basic units of chromatin and consist of a histone octamer in association with a DNA segment. Nucleosomes have an important role in regulating biological processes that require DNA access. These structures influence key events during transcription, replication and DNA repair. Histones present in nucleosomes can have a number of different post-translational modifications. Herein we focus on a specific histone methylation: trimethylation of lysine 36 of histone H3 (H3K36me3). This histone modification is present on intragenic regions of active genes and its levels rise towards the 3' end of active genes. This modification is also more abundant over exons relative to introns. These properties disclose a link between H3K36me3 and transcription, although the precise role of this mark is not yet understood. Using a biochemical approach, which includes techniques such as chromatin immunoprecipitation, western blot and nuclease digestion assays I aimed at evaluating the role of H3K36me3 during transcription in human cells. The results of these experiments revealed that decreased H3K36me3 levels correlate with increased transcription initiation on intragenic regions. Additional data suggested that this histone mark impacts on chromatin structure promoting a more compact and less accessible conformation. In support of this hypothesis, nuclease digestion assays revealed a decreased density of nucleosomes along the genes in the absence of H3K36me3. Finally, we verified that the presence of this histone mark shepherds Spt16 recruitment to the transcriptional units after RNAPII passage. Spt16 then promotes the deposition of histone H2A-H2B dimers onto the DNA to reassemble a complete nucleosome and maintain the chromatin integrity. Together, these data allow us to envisage a model in which H3K36me3 suppresses transcription initiation on intragenic regions by signaling the recruitment of Spt16 and the reassembly of histone H2A-H2B ejected during RNAPII elongation.

Keywords: Chromatin; Nucleosomes; H3K36me3; Transcription; Spt16.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Nucleossomas e arranjo da cromatina	1
1.2 Modificações pós-traducionais das histonas	1
1.3 A modificação H3K36me3	2
1.4 Função dos complexos remodeladores da cromatina, HATs e HDACs durante a transcrição	3
1.4.1 Complexos remodeladores da cromatina	3
1.4.2 Mobilidade dos nucleossomas	3
1.4.3 Acetiltransferases e desacetilases de histonas	3
1.5 Relação entre <i>chaperones</i> e modificações de histonas durante a transcrição	4
1.5.1 Asf1	5
1.5.2 FACT e Nap1	5
1.5.3 Spt6	6
2. Objectivos	7
3. Materiais e Métodos	8
3.1 Cultura de células HeLa	8
3.2 Anticorpos	8
3.3 RNA de interferência e transfecção	8
3.4 Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)	8
3.5 <i>Western blot</i>	9
3.6 Ensaio com nuclease microcócica (MNase)	9
3.7 Electroforese em gel de agarose	9
3.8 Extracção de RNA, síntese de cDNA e análise por qRT-PCR	9
4. Resultados	11
4.1 A trimetilação da histona H3, mediada por SETD2, não afecta os níveis de acetilação das histonas	11
4.2 A H3K36me3 suprime a iniciação da transcrição em regiões intragénicas	13
4.3 A H3K36me3 altera a densidade de nucleossomas ao longo dos genes	15
4.4 A H3K36me3 é necessária para a manutenção dos níveis intragénicos de histona H2B, mas não de histona H3 durante a transcrição	17
4.5 A H3K36me3 promove o recrutamento de Spt16	18
5. Conclusão	19
6. Referências	21
Anexo 1	25
Anexo 2	26

1. Introdução

1.1 Nucleossomas e arranjo da cromatina

As células eucarióticas possuem a sua informação genética em moléculas de DNA que podem ter cerca de 1 metro de comprimento [1]. Esse DNA está compactado no núcleo através do auxílio de proteínas, as histonas, sendo o complexo DNA-proteínas designado por cromatina [1]. As histonas são pequenas proteínas, carregadas positivamente, denominadas H1, H2A, H2B, H3 e H4. O DNA tem carga negativa (devido à presença de grupos fosfato) e, devido a este facto, as histonas ligam-se fortemente ao DNA [1].

Os nucleossomas representam o primeiro nível de organização da cromatina e são constituídos por duas cópias de cada uma das histonas (excepto H1), agregando-se numa estrutura octamérica com cerca de 146-147 pares de bases de DNA a envolver o octâmero [1]. Os nucleossomas estão separados por uma sequência de DNA com tamanho variável à qual está associada a histona H1. O nucleossoma representa uma estrutura de extrema importância permitindo o empacotamento eficiente do DNA dentro do núcleo das células eucarióticas.

Processos como a transcrição e a replicação necessitam que as duas cadeias da molécula de DNA se separem, para permitir o acesso das RNA e DNA Polimerases ao DNA [2]. No entanto, a presença de nucleossomas e a compactação da cromatina são uma barreira para estas enzimas [2]. Por isso, é importante que a cromatina esteja relaxada e que as histonas sejam removidas transientemente para permitir a transcrição e a replicação. Existem dois mecanismos que tornam a cromatina mais acessível: as modificações pós-traducionais (PTMs) das histonas; e a deslocação temporária das histonas por complexos remodeladores da cromatina, que permitem o acesso das Polimerases e outras enzimas ao DNA [2].

1.2 Modificações pós-traducionais das histonas

As modificações das histonas modulam a sua interacção com o DNA, determinando a estabilidade e o posicionamento dos nucleossomas e a facilidade com que estes podem ser evitados de modo a garantir, por exemplo, a transcrição [3].

As histonas são caracterizadas pela presença de um domínio globular conservado formado pela região C-terminal. A cauda N-terminal é mais flexível e capaz de interagir directamente com o DNA e diferentes proteínas [2], estando sujeita a PTMs, tais como acetilação, metilação, ubiquitinação e fosforilação [1]. Estas modificações por si só ou

colectivamente participam activamente na regulação do acesso de elementos reguladores ao DNA durante a replicação, reparação do DNA, transcrição e segregação cromossómica [4].

1.3 A modificação H3K36me3

Para além da acetilação e ubiquitinação, as lisinas das histonas podem sofrer três tipos de metilação: mono, di e trimetilação, sendo que cada estado de metilação resulta em diferentes consequências biológicas [5]. Recentemente, tem-se verificado um crescente interesse na trimetilação da lisina 36 da histona H3 (H3K36me3), uma vez que esta modificação está implicada na regulação da expressão genética [5].

A enzima responsável pela modificação H3K36me3, designa-se SETD2 (também conhecida como HYPB, HSPC069 e KMT3A) [6]. A SETD2 é uma metiltransferase que se liga ao domínio C-terminal (CTD) da RNA Polimerase II (RNAPII), fosforilado nas serinas 2 e 5 e, por esta razão, a presença da marca H3K36me3 encontra-se associada à transcrição pela RNAPII [7, 8]. A modificação H3K36me3 está presente em regiões codificantes de genes activamente transcritos, sendo particularmente abundante na extremidade 3' destes genes e nos exões [9].

Estudos realizados em *Drosophila* revelaram a existência de uma relação entre a modificação H3K36me3 e a acetilação da lisina 16 da histona H4 (H4K16Ac) [10]. Esses estudos sugerem que H3K36me3 regula os níveis de acetilação da histona H4 em genes activamente transcritos, verificando-se que quando existem elevados níveis da H3K36me3, os níveis de H4K16Ac baixam [10]. Da mesma forma, estudos com *Saccharomyces cerevisiae* concluíram que a Rpd3S (uma desacetilase de histonas) reconhece e liga-se à H3K36me3 promovendo a desacetilação das histonas após a transcrição [11, 12, 13]. Em levedura, a relação entre H3K36me3 e a desacetilação é necessária para suprimir o início da transcrição intragénica (transcrição que tem início em regiões do gene distintas do local de iniciação de transcrição padrão) [11, 12, 13].

Os níveis das modificações das histonas são controlados por um balanço entre enzimas que catalizam a adição e a remoção de uma determinada modificação. Apesar desta noção ser verdadeira para muitas modificações, só recentemente se descobriu uma enzima capaz de remover grupos metilo de resíduos metilo-lisina [14]. Estudos de Klose *et al.* [14] concluíram que a JMJD2A representa uma desmetilase de histonas com a capacidade para remover grupos metilo de H3K9me3 e H3K36me3 [14]. Deste modo, é de esperar que a H3K36me3 seja uma modificação com um carácter transiente que obedecerá à dinâmica da RNAPII, estando presente nas regiões intragénicas durante a transcrição e

sendo removida após o seu término. Estudos recentes do laboratório de acolhimento comprovaram esta hipótese [9].

1.4 Função dos complexos remodeladores da cromatina, HATs e HDACs durante a transcrição

1.4.1 Complexos remodeladores da cromatina

Os reguladores da cromatina são complexos proteicos que utilizam a hidrólise do ATP para alterar as interações entre as histonas e o DNA [3, 15, 16, 17]. Estes complexos possuem bromodomínios, cromodomínios e *Plant Homeodomains* que reconhecem modificações específicas das histonas [18]. As consequências da remodelação da cromatina incluem a quebra de ligação transiente entre a extremidade do DNA e o nucleossoma, ou a deslocação dos nucleossomas para outras posições, sendo que ambas alteram a acessibilidade dos factores de transcrição ao DNA [3].

1.4.2 Mobilidade dos nucleossomas

Para que a RNAPII avance, os nucleossomas devem permitir um certo grau de mobilidade ou acessibilidade [15]. Essa mobilidade é conseguida quando determinados resíduos de histonas são modificados, interferindo com os contactos entre as histonas e o DNA, aumentando a mobilidade dos nucleossomas e consequentemente permitindo a sua deslocação [15]. Os nucleossomas podem voltar a um estado menos móvel após a remoção das modificações, com o auxílio dos complexos remodeladores da cromatina. Há, no entanto, um intenso debate acerca do mecanismo exacto pelo qual os nucleossomas permitem a passagem da RNAPII. Uma das hipóteses é que as histonas que formam os nucleossomas se separam permitindo a transcrição, enquanto que outros autores defendem que os nucleossomas deslizam ao longo dos genes durante a transcrição. Embora se justifique uma maior clarificação deste processo, a hipótese que defende a remoção transiente das histonas que formam o nucleossoma tem conseguido reunir algum consenso na área [19].

1.4.3 Acetiltransferases e desacetilases de histonas

A actividade das acetiltransferases de histonas (HATs) e desacetilases de histonas (HDACs) durante a transcrição fornece uma potencial explicação para a regulação da

acessibilidade do DNA à RNAPII e para a mobilidade dos nucleossomas [18]. Os complexos de HAT são recrutados através da interação com a RNAPII para promover a acetilação dos nucleossomas, localizados a jusante desta, permitindo a sua passagem [18]. Após a passagem da RNAPII, os nucleossomas são novamente montados, em consequência da desacetilação das histonas pelas HDACs. O recrutamento das desacetilases de histonas é feito por complexos remodeladores da cromatina que expõem o núcleo das histonas a estas enzimas [15]. Deste modo, as regiões codificantes de genes activamente transcritos estão protegidas da iniciação da transcrição intragénica e de danos no DNA que ficaria acessível [18].

1.5 Relação entre *chaperones* e modificações de histonas durante a transcrição

O primeiro passo na transcrição de um gene é a associação da maquinaria de transcrição ao promotor [19]. No contexto da cromatina, a elongação da RNAPII ao longo de um determinado gene é possível uma vez que os nucleossomas podem ser remodelados a partir de factores que a eles se associam. De entre estes salientam-se os complexos remodeladores da cromatina dependentes de ATP e os *chaperones* de histonas (CHs). Estudos recentes tornaram claro que os CHs têm um papel importante na activação ou repressão da transcrição e inibição da transcrição intragénica [20]. Os CHs estão directamente envolvidos na modulação das modificações epigenéticas que estão associadas à transcrição [20].

Durante a iniciação da transcrição, os CHs cooperam com os complexos remodeladores da cromatina e com enzimas capazes de modificar histonas para alterar ou remover nucleossomas dos promotores, possibilitando a formação dos complexos de pré-iniciação e para possibilitar o progresso da RNAPII ao longo dos genes [19]. Os nucleossomas localizados a jusante da RNAPII são modificados com a ajuda de diferentes CHs, incluindo FACT (*Facilitates Chromatin Transcription*), Nap1 (*Nucleosome Assembly Protein 1*), Asf1 e Spt6. Posteriormente, os mesmos CHs permitem que os nucleossomas sejam novamente montados após a passagem da RNAPII e promovem a remoção das PTMs [19]. No entanto, não está ainda elucidado se os nucleossomas montados após a passagem da RNAPII são constituídos pelas mesmas histonas que formavam o nucleossoma antes da sua passagem.

1.5.1 Asf1

Estudos anteriores concluíram que o *chaperone* do complexo de histonas H3-H4, Asf1, é importante na remodelação e indução dos genes PHO5 e PHO8 de levedura [21, 22]. Estas observações sugerem a importância deste *chaperone* na regulação da transcrição, tendo sido recentemente demonstrada uma relação directa entre a iniciação da transcrição e Asf1. Foi descoberto que Asf1 é directamente recrutado para os promotores de genes activamente transcritos [23], onde tem um papel importante na dinâmica da histona H3 presente nos nucleossomas [24].

Por outro lado, Asf1 está relacionado com a modulação da acetilação da H3K56. Estudos anteriores demonstraram que a acetilação de H3K56 aumenta durante a transcrição, sendo dependente de Asf1 e Rtt109 (uma acetiltransferase). A acetilação desta lisina da histona H3 dependente de Asf1 possibilita a deslocação dos nucleossomas nos promotores de vários genes [24, 25].

Avanços recentes para compreender a dinâmica das histonas indicam que os nucleossomas dos promotores activos são muito dinâmicos e que a deslocação e nova montagem dos nucleossomas são muito rápidas nestes locais [19]. Estas observações indicam a coexistência de montagem e deslocação de nucleossomas nos mesmos promotores. Assim, o papel de Asf1 na activação da transcrição tem duas fases: durante a iniciação da transcrição, Asf1 pode actuar promovendo a deslocação dos nucleossomas para permitir a ligação do complexo de iniciação de transcrição aos promotores; mais tarde, Asf1 pode promover a acetilação da H3K56, tornando os nucleossomas menos estáveis, sendo mais fácil a sua deslocação, à medida que a RNAPII avança, efectuando depois a nova montagem dos nucleossomas [26]. Estudos recentes, em levedura verificaram a existência de complexos Asf1-Set2, sugerindo que o *chaperone* Asf1 facilita o recrutamento de Set2 para promover a trimetilação de H3K36. Este resultado sugere uma possível implicação da H3K36me3 no processo de modulação da acessibilidade dos nucleossomas durante a transcrição [27].

1.5.2 FACT e Nap1

Os CHs das histonas H2A e H2B também participam no controlo da transcrição e modificações da cromatina. O complexo FACT é formado pelas subunidades Spt16 e SSRP1, tendo como função facilitar a transcrição direccionando a desmontagem dos nucleossomas durante a transcrição de diferentes genes [28]. Diversos estudos têm sido feitos na tentativa de desvendar o papel exacto deste *chaperone*, sendo que estudos

realizados em levedura sugerem que yFACT (designação deste *chaperone* em levedura) é capaz de remontar histonas H3-H4 que tinham sido ejetadas para permitir a passagem da RNAPII [29]. Por outro lado, outros estudos revelaram que yFACT permite o acesso da RNAPII ao DNA sem que se verifique a ejeção das histonas H2A-H2B [30]. Estudos em células humanas revelaram ainda que FACT tem a capacidade de dissociar dímeros H2A-H2B do octamero de histonas promovendo também a deposição das histonas no DNA [31]. Existe assim, um intenso debate acerca do papel deste *chaperone*, sendo necessário investigar de que forma este *chaperone* é recrutado para a cromatina e qual a sua função.

Estudos de proteómica demonstraram que yFACT interage com outro *chaperone* de H2A-H2B designado Nap1 [32]. Nap1 regula a transcrição em vários organismos incluindo levedura, plantas e mosca da fruta [33, 34, 35]. Enquanto o mecanismo da função de FACT não está ainda bem definido, estudos em *S. pombe* demonstraram que Nap1 associa-se aos promotores e colabora com os complexos remodeladores da cromatina para remover os nucleossomas dos locais de iniciação da transcrição [35, 36]. Este complexo desmonta parcialmente os nucleossomas quando adicionado ao sistema da transcrição observando-se que FACT tem a capacidade de dissociar dímeros H2A-H2B do octâmero de histonas.

1.5.3 Spt6

Tal como FACT, o *chaperone* Spt6 tem um papel importante na remodelação da estrutura da cromatina durante a transcrição. Mutações em Spt6 e na subunidade Spt16 de FACT levam à iniciação da transcrição intragénica, em levedura [37]. Estes dados sugerem um modelo em que FACT e Spt6 colaboram na desmontagem dos nucleossomas em frente à RNAPII durante a transcrição e depositam-nos novamente atrás da RNAPII (após a sua passagem), restaurando a estrutura da cromatina [3].

Em levedura, o Spt6 tem uma função importante na deposição da di e trimetilação de H3K36 pela Set2 (SETD2 em humanos), sendo que a forma como o Spt6 modula a metilação de H3K36 não está ainda definida [38, 39]. Em humanos, o complexo dimérico formado por Spt6 e a proteína lws1 controla a interacção da metiltransferase SETD2 com o domínio CTD fosforilado na serina 2 da RNAPII, regulando a concentração da enzima nos locais com transcrição activa [38]. Uma diminuição da proteína lws1 leva à perda da metilação de H3K36 e ao aumento da acetilação das histonas nas regiões transcritas [38].

As questões “se” e “como” a H3K36me3 recruta a Spt6 e qual o papel desta modificação de histona na montagem dos nucleossomas após a passagem pela RNAPII, estão ainda em aberto.

2. Objectivos

Os principais objectivos desta tese são averiguar quais as principais funções da H3K36me3 durante a transcrição, assim como tentar elucidar alguns dos mecanismos envolvidos na regulação da acessibilidade do DNA dos nucleossomas, em particular o desvendar do papel desempenhado por esta modificação neste processo.

3. Materiais e Métodos

3.1 Cultura de células HeLa

As células HeLa cresceram em monocamada em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 5% de penicilina-estreptomicina.

3.2 Anticorpos

Foram utilizados os seguintes anticorpos: anticorpos policlonais de coelho anti-RNAPII (N20 Sc-899; Santa Cruz Biotechnology); anti-histona H3 (ab1791; Abcam); anti-H3K36me3 (ab9050; Abcam); anti-H3K9+K14+K18+K23+K27Ac (ab47915; Abcam); anti-CBP80 (Sc-48803; Santa Cruz Biotechnology); anti-Spt6 (ab49066; Abcam); anti-Spt16 (Sc-28734; Santa Cruz Biotechnology); anti-H2B (ab1790; Abcam).

3.3 RNA de interferência e transfecção

Para reduzir os níveis de SETD2, por RNA de interferência (RNAi), usaram-se dupletos de siRNA (*small interfering RNA*) com uma concentração de 10 μ M. Utilizou-se a sequência do gene da luciferase (GL2) como controlo inespecífico, tendo sido realizadas duas transfecções para cada experiência. Realizaram-se transfecções reversas em que as células foram plaqueadas e transfectadas simultaneamente. A transfecção com siRNA foi realizada usando Lipofectamine RNAiMax Reagent (Invitrogen) como agente de transfecção, de acordo com o protocolo do fabricante, e OptiMEM (Invitrogen). As células foram novamente transfectadas com os mesmos siRNA, 24h após a primeira transfecção e colhidas no dia seguinte. As sequências dos siRNAs usados encontram-se no Anexo 1.

3.4 Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

O ChIP foi realizado como descrito em de Almeida, SF *et al.* [40]. Resumidamente, os extractos celulares obtidos após *crosslink* com 1% formaldeído foram sonicados no Sanyo Soniprep 150, 5 vezes durante 20 segundos, com uma amplitude de 10 micron, originando fragmentos de DNA com 200-400 pares de bases. Os fragmentos de DNA *crosslinked* com proteínas foram imunoprecipitados com anticorpos policlonais de coelho: anti-H3 total; anti-H3K36me3; anti-RNAPII; anti-CBP80; anti-H2B, e *beads* de sefarose com proteína A (Sigma). Após a incubação com os anticorpos específicos e *beads*, o DNA das amostras imunoprecipitadas foi extraído com Chelex 100 (BioRad) como descrito [40]. O DNA do *input* foi purificado por extracção fenólica e precipitação em etanol e o DNA imunoprecipitado e o *input* analisados por PCR em tempo real (qRT-PCR). A análise por

PCR quantitativo (qRT-PCR) do DNA imunoprecipitado foi realizada pelo sistema 7000 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), usando SYBR Green (Applied Biosystems). A ocupação relativa da proteína imunoprecipitada foi estimada a partir da fórmula: $2^{(Ct_{Input} - Ct_{IP})}$, em que *Ct Input* e *Ct IP* correspondem ao número de ciclos de amplificação obtidos por PCR quantitativo em tempo-real (qRT-PCR) de experiências feitas em duplicado com amostras de DNA do *input* e das imunoprecipitações específicas, respectivamente. As sequências dos *primers* utilizados encontram-se no Anexo 2.

3.5 Western blot

Os lisados celulares foram preparados como descrito [40]. Em resumo, foi utilizada uma percentagem de 12% na preparação do gel, sendo, posteriormente, a transferência realizada usando tampão de transferência (193 mM Glicina, 24 mM Trizma Base, 20% Metanol). Após a incubação com os anticorpos primários anti-H3 Total, anti-H3K36me3, anti-H3Ac, anti-H2B e anti-Spt16, procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário anti-coelho (BioRad) e à detecção usando um substrato luminescente (Amersham).

3.6 Ensaio com nuclease microcócica (MNase)

A experiência foi realizada como descrito no protocolo publicado na revista *Nature Methods* [41]. Em resumo, as células foram colhidas por tripsinização. Após extração, os núcleos foram digeridos com 1 unidade de Nuclease Microcócica (MNase) durante 0; 1; 2,5; 5; 10 ou 20 minutos a 28°C. Para terminar a reacção de digestão adicionou-se MNase *stop buffer* (100 mM EDTA, 10 mM EGTA pH 7.5). Utilizou-se fenol/clorofórmio para a extração do DNA adicionando-se depois RNase A (10 mg/ml) para digestão total do RNA. No final, foi determinada a concentração do DNA usando o Nanodrop e realizada a quantificação por qRT-PCR usando o Real-Time PCR System 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems). As sequências dos *primers* utilizados encontram-se no Anexo 2.

3.7 Electroforese em gel de agarose

Os fragmentos de DNA digeridos com a MNase foram separados em electroforese em gel de agarose. Para tal utilizou-se 1 µg de DNA e um gel com 1,8% de agarose em TAE (2M Trizma Base; 0.5M EDTA pH 8; 5.7% ácido acético). Os fragmentos foram corados com *Gel Red* e o gel visualizado e fotografado usando um transiluminador (Alphalmager).

3.8 Extração de RNA, síntese de cDNA e análise por qRT-PCR

O RNA total das células foi extraído usando TRIzol® (Invitrogen). O cDNA foi obtido

utilizando o Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche), de acordo com o protocolo do fabricante. Os produtos de PCR foram quantificados por qRT-PCR no Real-Time PCR System 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando SYBR Green master mix (Applied Biosystems). A expressão relativa foi estimada a partir da fórmula: $2^{(Ct \text{ referência} - Ct \text{ amostra})}$, em que Ct referência e Ct da amostra correspondem ao número de ciclos de amplificação obtidos por qRT-PCR de experiências feitas em duplicado com amostras de cDNA do snRNA U6 (referência) e cDNA dos genes de interesse (amostra). As sequências dos *primers* utilizados encontram-se no Anexo 2.

4. Resultados e Discussão

4.1 A trimetilação da lisina 36 da histona H3, mediada por SETD2, não afecta os níveis de acetilação das histonas

A metiltransferase de histonas, designada SETD2, é a responsável pela trimetilação da lisina 36 da histona H3 (H3K36me3), como descrito anteriormente [7, 9]. Para averiguar quais as principais funções da H3K36me3 durante a transcrição, objectivo principal desta tese, foi necessário, proceder-se à utilização de siRNAs específicos para a SETD2, para reduzir os níveis da H3K36me3, sendo esta metodologia utilizada em todos os ensaios experimentais. Transfectaram-se células HeLa com siRNAs específicos para mRNA (RNA mensageiro) de luciferase (GL2), que serviram como controlo e siRNAs específicos para o mRNA de SETD2. Para além disso, trataram-se células com Tricostatina A (TSA), um inibidor das desacetilases de histonas. Por não existir um bom anticorpo para a SETD2, a eficiência do RNAi foi estimada indirectamente através da medição dos níveis da H3K36me3 por *western blot*. Os resultados da Figura 1A mostram que os níveis da H3K36me3 diminuem drasticamente em células em que a SETD2 era reduzida, relativamente a células transfectadas com siRNA contra GL2 (controlo), sendo que os níveis da histona H3 total são idênticos em todas as amostras (Figura 1A). O tratamento com TSA não produz qualquer alteração visível nos níveis da H3K36me3 (Figura 1A), o que sugere que a acetilação das histonas não interfere com a H3K36me3. De modo a quantificar as observações anteriores, os níveis de H3K36me3 foram avaliados por imunoprecipitação de cromatina (ChIP). Para isso usaram-se extractos da cromatina de células HeLa transfectadas com siRNAs específicos de GL2 e SETD2 e tratadas com TSA. A quantificação por qRT-PCR da quantidade de DNA co-imunoprecipitada com anticorpos anti-H3K36me3 revelou que, de acordo com os resultados obtidos no *western blot* da Figura 1A, os níveis da H3K36me3 diminuem em células transfectadas com siRNAs contra SETD2 (Figura 1B), sendo essa diminuição mais significativa nas regiões a jusante do primeiro exão, sendo que perto do promotor e no primeiro exão dos genes analisados não se observaram níveis significativos da H3K36me3. Este resultado é concordante com dados recentemente publicados pelo laboratório de acolhimento que mostram uma depleção da H3K36me3 no primeiro exão e um aumento dos seus níveis ao longo do gene [9]. A distribuição de histona H3 não sofre qualquer alteração em resposta quer à depleção de SETD2, quer ao tratamento com TSA (Figura 1C).

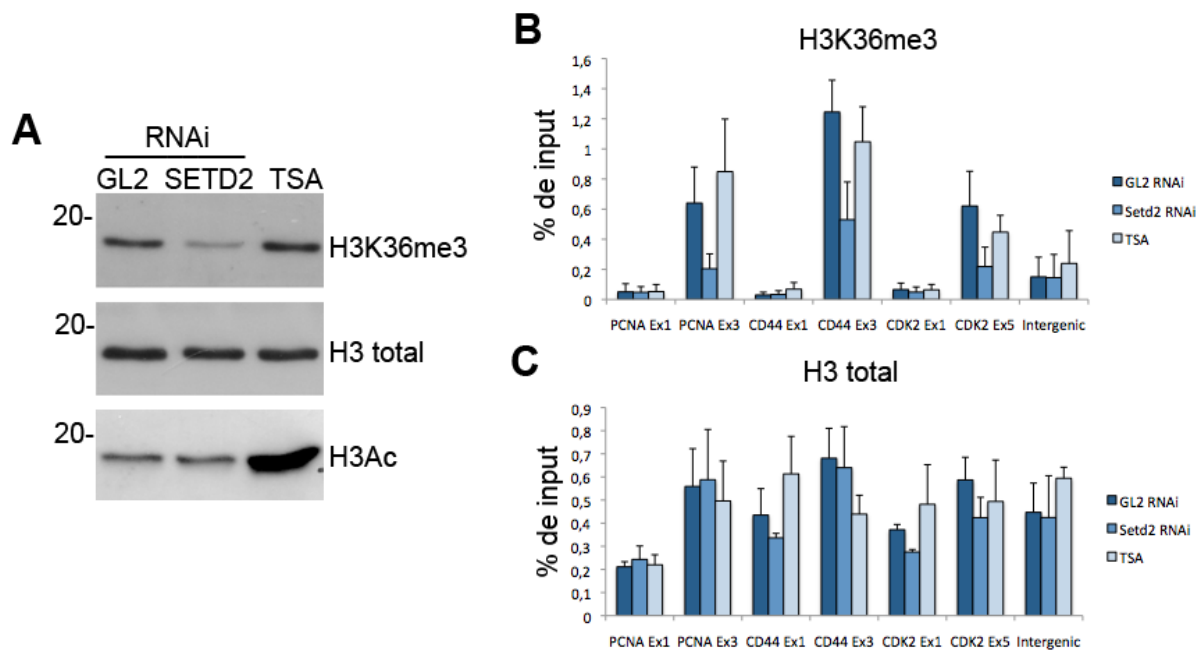


Figura 1. Efeito da H3K36me3 na acetilação da histona H3. **A.** Análise por *western blot* dos lisados totais de células HeLa transfectadas com siRNA específicos de GL2 (luciferase) e SETD2 e tratadas com TSA. As membranas foram incubadas com anticorpos anti-histona H3 total, anti-H3K36me3 e anti-histona H3 acetilada. À esquerda estão mencionados os pesos moleculares em kD. A figura ilustra o resultado de uma experiência de um total de três experiências independentes com resultados similares. **B-C.** Ensaios de ChIP realizados em células HeLa transfectadas com siRNAs específicos de GL2 e SETD2 e células tratadas com TSA para os genes indicados. A quantidade de produto amplificando usando pares de *primers* para os exões 1 e 3 do *PCNA*, exões 1 e 3 do *CD44*, exões 1 e 5 do *CDK2* e para uma região intergênica não transcrita foram quantificados usando qRT-PCR. Os resultados estão representados como porcentagem do DNA total existente na amostra (*input*). Os gráficos representam a média e desvio padrão de pelo menos três experiências independentes.

Estudos anteriores em levedura mostraram que a H3K36me3 favorece a desacetilação de histonas através do recrutamento de um complexo proteico capaz de remover os grupos acetil das caudas das histonas [11, 12, 13]. Para investigar se nas células humanas usadas neste estudo a H3K36me3 teria um efeito semelhante, mediram-se os níveis da histona H3 acetilada em células transfectadas com siRNAs específicos para GL2 ou SETD2. Os resultados obtidos demonstram que a acetilação da histona H3 se mantém inalterada apesar de haver uma diminuição significativa de H3K36me3 nas células transfectadas com siRNAs para SETD2 (Figura 1A). Células tratadas com TSA apresentam níveis de acetilação muito aumentados comparativamente às células não tratadas com este fármaco (Figura 1A), confirmando quer a especificidade do anticorpo quer a eficiência do fármaco [42].

Em conjunto, estas experiências demonstram que com níveis reduzidos de H3K36me3, induzidos pela depleção de SETD2, a acetilação da histona H3 não sofre variações significativas. No entanto, os níveis de acetilação aumentam drasticamente em células tratadas com TSA. Estes dados permitem concluir que em humanos, ao contrário do que acontece em leveduras, a H3K36me3 não está envolvida na desacetilação da histona H3.

4.2 A H3K36me3 suprime a iniciação da transcrição em regiões intragénicas

Para além do papel exercido no recrutamento de desacetilases de histonas [18, 19, 20], estudos anteriores feitos em levedura verificaram que a metiltransferase da H3K36me3 se liga ao CTD da RNAPII o que sugere uma participação activa desta marca de histona na transcrição [7, 8]. Estudos recentes feitos no laboratório de acolhimento revelaram ainda a existência de uma ligação funcional entre a H3K36me3 e o processamento do pré-mRNA [9]. Deste modo, um dos objectivos desta tese consiste em investigar de que forma a H3K36me3 está implicada na transcrição e qual o seu papel neste processo biológico. Evidências experimentais anteriores, realizadas novamente em levedura, revelaram que a H3K36me3 poderá estar envolvida na repressão da iniciação de transcrição em regiões intragénicas a jusante do promotor [11]. Para testar esta mesma possibilidade em células humanas, analisou-se a quantidade de RNA de 3 genes diferentes com *primers* para a região 5' (próxima do promotor) e para a região 3' (próxima do local de poliadenilação). A razão da quantidade dos dois produtos amplificados (RNA 3'/RNA 5') permite deduzir se existem transcritos de RNA cujo início de transcrição não corresponde ao local de iniciação de transcrição canónico. Se assim for, a razão 3'/5' será superior ao que se verificaria se todo o RNA existente na célula fosse transcrito a partir do local de iniciação de transcrição. Assim, isolou-se RNA total de células cujos níveis de H3K36me3 eram normais (RNAi GL2) e em células com níveis reduzidos desta marca de histona (RNAi SETD2). Os resultados destas experiências mostraram que em células transfectadas com siRNAs específicos para SETD2, a razão 3'/5' dos transcritos foi superior a 1 (valor controlo) em todos os genes estudados (Figura 2A). Um resultado semelhante foi obtido em células tratadas com TSA (Figura 2A). Estes resultados sugerem que a quantidade de transcritos com iniciação da transcrição em regiões do gene distintas do local de iniciação de transcrição padrão aumentou em células cujos níveis de SETD2 estão diminuídos, e conseqüentemente também a H3K36me3 (Figura 2A). Como um resultado similar foi obtido quando se força uma conformação mais permissiva da estrutura da cromatina (após a adição de TSA), é razoável levantar-se a hipótese de que a H3K36me3 está envolvida na supressão da

iniciação de transcrição em regiões intragénicas em células humanas por promover a compactação da cromatina.

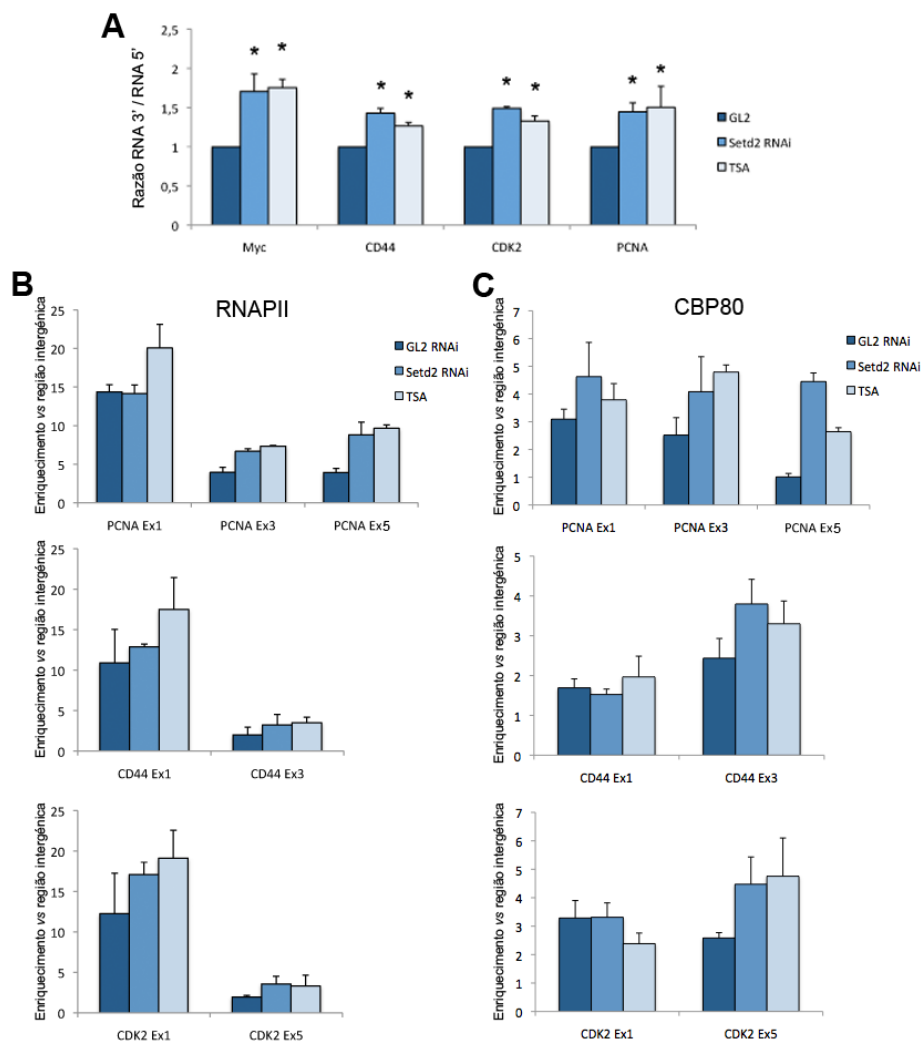


Figura 2. A H3K36me3 previne a iniciação da transcrição em regiões intragénicas. **A.** O RNA foi isolado dos lisados totais de células HeLa transfetadas com siRNAs específicos de GL2 e SETD2 e tratadas com TSA. Os níveis dos produtos de PCR das regiões 3' e 5' dos RNAs analisados foram estimados por qRT-PCR. O gráfico representa a média e desvio padrão de três experiências independentes. Os asteriscos denotam diferenças estatisticamente significativas em relação a células com RNAi para GL2 ($p < 0,05$). **B-C.** Ensaios de ChIP realizados em células HeLa transfetadas com siRNAs específicos de GL2 e SETD2 e células tratadas com TSA para os genes indicados. Os resultados são expressos como enriquecimento em relação aos níveis de RNAPII e CBP80 detectados numa região intergénica não transcrita. Os gráficos representam a média e desvio padrão de três experiências independentes.

De forma a investigar o papel da H3K36me3 na iniciação de transcrição intragénica usando uma metodologia experimental diferente, efectuou-se ChIP com anticorpos para a

RNAPII e para CBP80. A proteína CBP80 (*Cap Binding Protein 80*) designa uma subunidade de um complexo envolvido no *capping* da extremidade 5' dos transcritos de RNA [43]. Ao efectuar-se CHIP com um anticorpo para a CBP80 o transcrito de RNA nascente será co-imunoprecipitado juntamente com a região do DNA em que se encontra. Assim, obter-se-á um mapa da distribuição intragénica do RNA nascente que, obviamente, deverá ser semelhante à distribuição intragénica da RNAPII [43]. Os resultados obtidos demonstram que em células transfectadas com siRNAs específicos do mRNA de SETD2, os níveis de RNAPII envolvidos na transcrição dos genes analisados aumentam em comparação com os níveis desta enzima nos genes de células transfectadas com siRNA controlo (GL2) (Figura 2B), tendo-se obtido diferenças mais significativas a partir do primeiro exão de cada gene estudado. Tais diferenças são provavelmente devidas ao facto dos níveis de H3K36me3 nos primeiros exões serem mais baixos que nas restantes regiões dos genes [9]. Em células tratadas com TSA, os níveis de RNAPII aumentaram relativamente às células tratadas com GL2, tendo valores semelhantes aos verificados após redução dos níveis de SETD2 (Figura 2B). No entanto, nesta condição experimental, verificou-se um aumento da densidade de RNAPII logo a partir do primeiro exão e não apenas nos exões internos. Os resultados de CHIP com o anticorpo anti-CBP80 revelaram que o aumento observado na densidade de RNAPII em células com níveis diminuídos de SETD2 e células tratadas com TSA é acompanhado por um aumento na quantidade de RNA nascente (Figura 2C). Pode-se desta forma concluir que a depleção de H3K36me3 desencadeia a iniciação de transcrição intragénica e que esta é produtiva dando origem a transcritos de RNA.

4.3 A H3K36me3 altera a densidade de nucleossomas ao longo dos genes

Os resultados obtidos demonstram o envolvimento da H3K36me3 na supressão da iniciação de transcrição intragénica. A observação de que o tratamento das células com TSA produz um resultado semelhante levanta a hipótese da H3K36me3 exercer um efeito repressivo na estrutura da cromatina da mesma forma que as desacetilases das histonas. Assim, para testar esta hipótese, foi mapeada a localização dos nucleossomas ao longo dos genes em células cujos níveis de SETD2 eram reduzidos. Para isso, digeriu-se a cromatina com MNase e quantificou-se o DNA resistente a esta digestão. Este DNA é precisamente aquele que está “protegido” pelos nucleossomas. A MNase tem a capacidade de gerar quebras de cadeia dupla no DNA que faz a ligação entre nucleossomas, sendo que a digestão por esta enzima origina fragmentos de DNA com 147 pares de bases (que correspondem ao DNA incluído num único nucleossoma) ou com um tamanho correspondente a um número de pares de bases múltiplo de 147 (correspondentes a dois;

três, ou mais nucleossomas) [44]. Esta distribuição em “escada” dos fragmentos de DNA obtidos após digestão com MNase é visível na Figura 3A. Quantificando o DNA presente numa amostra enriquecida em mononucleossomas é possível obter-se a localização exacta destas estruturas ao longo dos genes. Assim, observou-se que em células com níveis reduzidos de H3K36me3 (SETD2 RNAi) e em células tratadas com TSA, a densidade de nucleossomas é muito inferior ao observado em células controlo (Figura 3B). Mais uma vez, estes dados sugerem que a H3K36me3 desempenha um papel importante na manutenção da estrutura da cromatina, ao que tudo indica, numa conformação compacta que impede o acesso (da RNAPII, por exemplo) ao DNA.

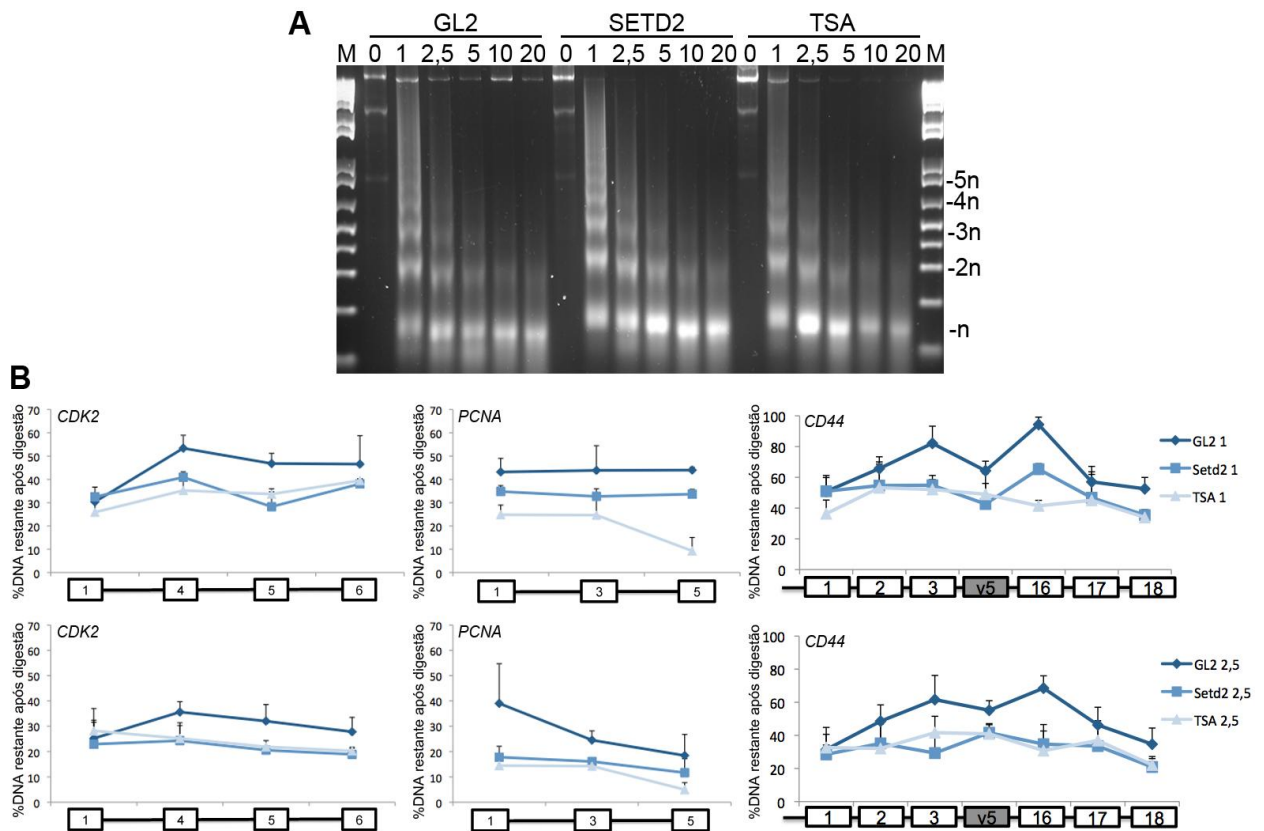


Figura 3. A H3K36me3 altera a densidade de nucleossomas na cromatina. **A.** Ensaio realizado com MNase em células HeLa transfectadas com siRNAs específicos de GL2 e SETD2 e tratadas com TSA. Os núcleos das células foram incubados com 1 unidade de MNase durante 0, 1, 2.5, 5, 10 e 20 minutos a 28°C. À direita do gel mostra-se o número de nucleossomas (1=n; 2=2n; X=Xn). “M” indica as linhas do gel em que se encontra o marcador de pares de bases de DNA. **B.** Os gráficos representam a percentagem de DNA presente na amostra após a digestão com a MNase. Os pares de *primers* usados no qRT-PCR amplificam regiões nos genes *CD44* (exões 1, 2, 3, v5, 16, 17 e 18), *CDK2* (exões 1, 4, 5 e 6) e *PCNA* (exões 1, 3 e 5). As caixas numeradas na legenda do eixo horizontal de cada gráfico representam os exões. Os dados representam a média e desvio padrão de três experiências independentes.

4.4 A H3K36me3 é necessária para a manutenção dos níveis intragênicos de histona H2B, mas não de histona H3, durante a transcrição

Os resultados obtidos nas experiências de digestão do DNA com MNase, mostrando uma menor densidade de nucleossomas quando há depleção de H3K36me3, permitem sugerir duas explicações alternativas: todas as histonas que compõem os nucleossomas estão ausentes do DNA; ou, apenas algumas das histonas constituintes dos nucleossomas estão em falta ficando estes incompletos (permitindo a digestão do DNA pela MNase). Para testar estas hipóteses, os níveis da histona H3 (descrita como formando um complexo com a histona H4 durante a remodelação dos nucleossomas induzida pela RNAPII) e da histona H2B (forma um dímero com a histona H2A aquando da dissociação dos nucleossomas) foram medidos por ChIP. Os resultados demonstraram que os níveis de histona H3 são semelhantes em células transfectadas com siRNAs específicos de GL2 e SETD2 e em células tratadas com TSA (Figura 1A e Figura 1C). Em contraste, os níveis de histona H2B avaliados por ChIP diminuem nos genes de células cuja SETD2 está reduzida e em células tratadas com TSA (Figura 4A). Resultados obtidos por *western blot* mostram que os níveis totais da histona H2B existentes nas células são aproximadamente iguais em todas as condições experimentais (Figura 4B). Assim sendo, as diferenças observadas por ChIP nos níveis da histona H2B nos genes de células com depleção de SETD2 reflectem um efeito específico ao nível da cromatina. Estes resultados sugerem que a H3K36me3 está envolvida na regulação dos níveis de histona H2B, mas não de histona H3, na cromatina durante a transcrição.

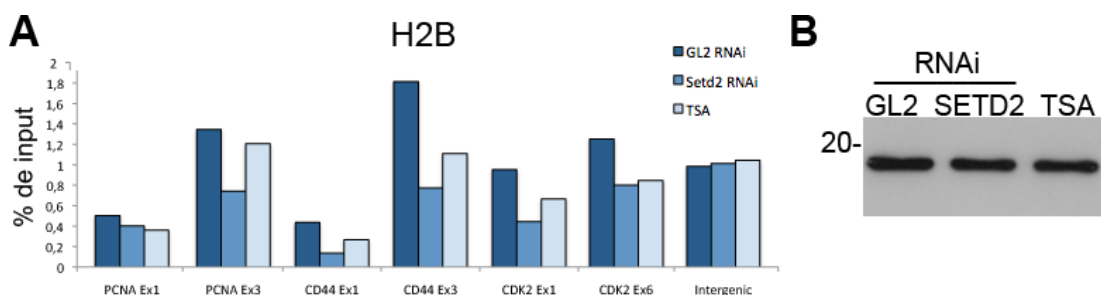


Figura 4. A H3K36me3 é necessária para manter os níveis da histona H2B durante a transcrição. **A.** Ensaio de ChIP realizados em células HeLa transfectadas com siRNAs específicos de GL2 e SETD2 e células tratadas com TSA para os exões dos genes indicados. A quantidade de DNA recolhida em cada imunoprecipitação foi quantificada por qRT-PCR. O resultado é expresso como percentagem do DNA total da amostra inicial (*input*). O gráfico representa a média e desvio padrão de três experiências independentes. **B.** Análise por *western blot* dos lisados totais de células HeLa transfectadas com siRNA de GL2 e SETD2 e tratadas com TSA. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-histona H2B. À esquerda estão mencionados os pesos moleculares em kD. A

figura ilustra o resultado de uma experiência de um total de duas experiências independentes com resultados semelhantes.

4.5 A H3K36me3 promove o recrutamento de Spt16

Estudos anteriores mostraram que os *chaperones* de histonas Spt6 e Spt16 (uma das subunidades de FACT) são essenciais para a ejeção e também para a remontagem dos nucleossomas durante a transcrição [19]. Como se verificou uma redução nos níveis de H2B em células com depleção de SETD2, levantou-se a hipótese de que a H3K36me3 poderia participar no recrutamento de um ou mais *chaperones* de histonas durante a transcrição. Para investigar esta hipótese, mediram-se os níveis de Spt6 e Spt16 na cromatina por ChIP com anticorpos anti-Spt6 e anti-Spt16. Verificou-se que os níveis de Spt6 nos genes analisados são aproximadamente iguais em células transfectadas com siRNA para GL2, em células com depleção de SETD2 e em células tratadas com TSA (Figura 5A). No entanto, os níveis de Spt16 variaram de acordo com as diferentes condições experimentais, sendo que em células cuja SETD2 foi reduzida e em células tratadas com TSA os níveis de Spt16 são menores do que em células controlo (Figura 5B), em todos os genes analisados. Devido ao facto de os níveis totais da Spt16 obtidos por *western blot* (Figura 5C) serem semelhantes em células controlo, com depleção de SETD2 e tratadas com TSA, sendo as diferenças observáveis apenas e só ao nível da cromatina (Figura 5B), estes resultados indicam que a H3K36me3 está envolvida no recrutamento de Spt16, mas não Spt6, para a cromatina. De igual forma, a hiperacetilação das histonas (após tratamento com TSA) também impede o recrutamento de Spt16.

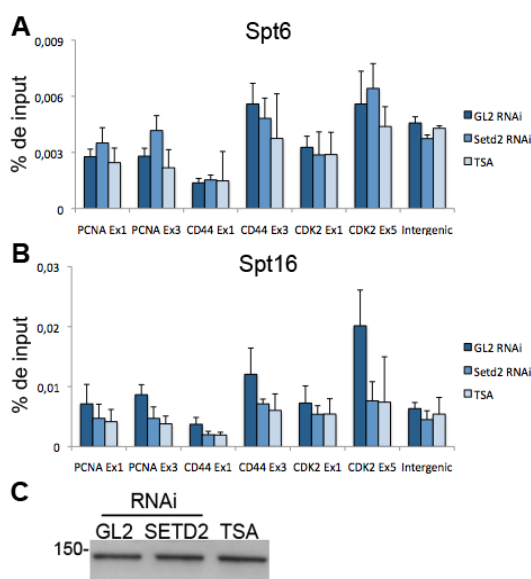


Figura 5. A H3K36me3 promove o recrutamento de Spt16. **A-B.** ChIP com anticorpos para Spt6 e Spt16 em células HeLa transfectadas com siRNAs para GL2 e SETD2 e tratadas com TSA. A quantidade de DNA correspondente a cada uma das regiões é apresentada como percentagem de DNA total (*input*). O gráfico ilustra a média e desvio padrão de três experiências independentes. **C.** Western blot dos lisados totais das células usadas em A e B. As membranas foram incubadas com anticorpo anti-Spt16. À esquerda mostra-se o peso molecular em kD. A figura ilustra uma experiência representativa de um total de três.

5. Conclusão

Durante a transcrição os nucleossomas formam uma barreira que impede a passagem da RNAPII. Para que a transcrição ocorra esta barreira tem de ser evitada. Para isso, com o auxílio de diferentes factores (ver Introdução da tese), a RNAPII promove a ejeção de dímeros de histonas H2A e H2B que fazem parte do nucleossoma [45]. Após a passagem da RNAPII é imperativo que o nucleossoma se reconstitua de novo de modo a manter a integridade da cromatina. Isso implica a associação dos dímeros H2A-H2B que haviam sido ejectados. Neste contexto, a partir dos resultados desta tese, sugere-se um modelo em que os dímeros H2A-H2B são ejectados da cromatina para permitir a passagem da RNAPII, permanecendo os tetrâmeros H3-H4 associados à cromatina (Figura 6). À medida que a RNAPII avança, a SETD2 é recrutada promovendo a trimetilação da H3K36. Esta modificação sinaliza o local de recrutamento da subunidade maior de FACT, Spt16, para promover a remontagem dos dímeros H2A-H2B que tinham sido ejectados impedindo assim o acesso de novas RNAPII à cromatina em locais que não correspondem aos promotores dos genes e suprimindo a iniciação de transcrição nessas regiões (regiões intragénicas). Em células cuja SETD2 foi reduzida, os reduzidos níveis da H3K36me3 impedem o recrutamento de Spt16, não se verificando assim a remontagem dos dímeros H2A-H2B. Neste caso, o DNA fica acessível a RNAPII que iniciam a transcrição a partir de regiões intragénicas. Uma previsão que se pode retirar deste modelo é que mutações ou a depleção de Spt16 poderão causar um fenótipo semelhante ao da perda da H3K36me3. De facto, estudos anteriores mostraram que a deficiência de Spt16 promove o início da transcrição intragénica [46].

A relevância fisiológica desta descoberta é suportada por resultados recentes que identificam o *SETD2* como um gene supressor de tumores com um papel activo no surgimento de cancros da mama e rim (cRCC – Clear cell renal cell carcinoma) [47, 48]. Estudos adicionais irão certamente ajudar a clarificar o papel desta metiltransferase de histonas assim como da H3K36me3 nestas doenças.

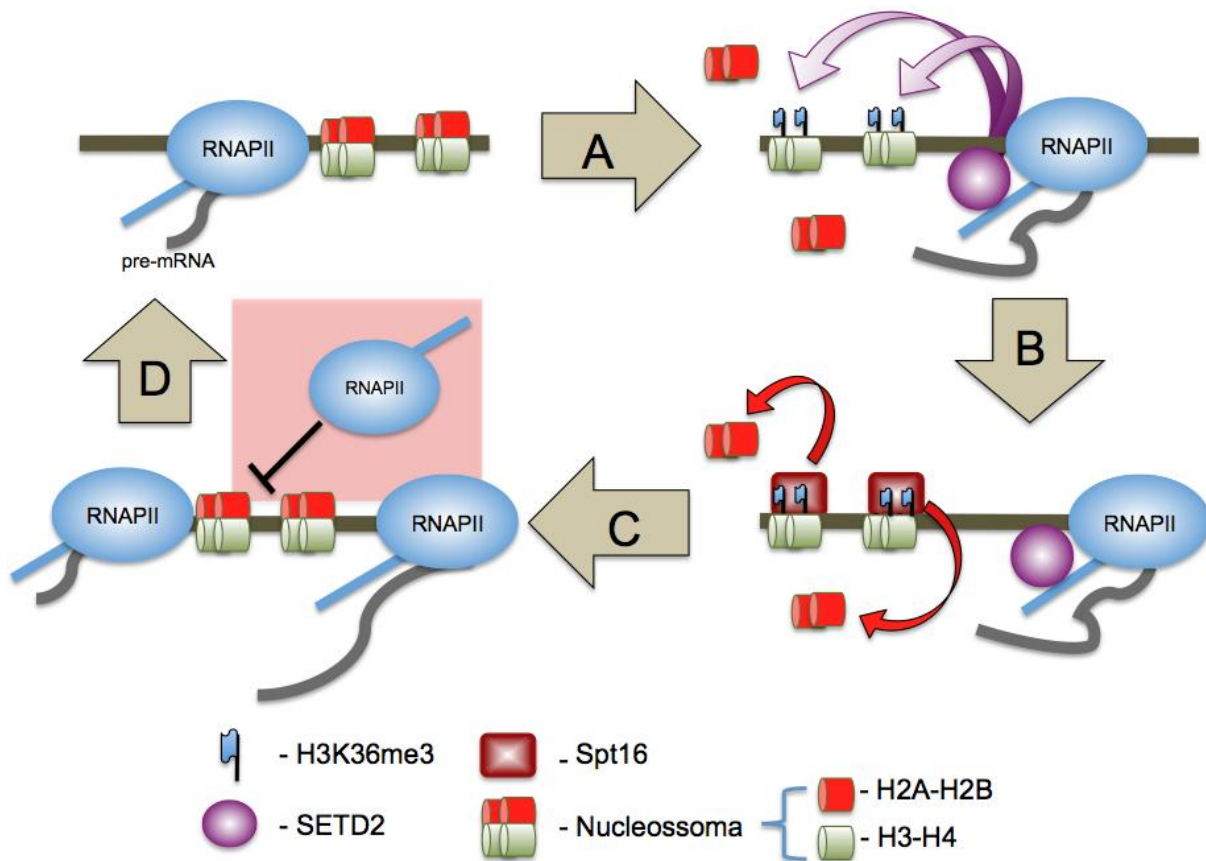


Figura 6. Modelo proposto para o papel da H3K36me3 na remontagem do nucleossoma após a passagem da RNAPII. **A.** Ejeção do nucleossoma com dissociação dos dímeros H2A-H2B; Recrutamento da SETD2 e deposição da modificação H3K36me3. **B.** Recrutamento de Spt16 para a cromatina sinalizado pela H3K36me3 (poderão existir proteínas adicionais a mediar este recrutamento que, por razões de simplificação, não se representam no modelo). Spt16 promove a associação dos dímeros H2A-H2B aos tetrâmeros H3-H4 que persistiram ligados ao DNA. **C.** Os nucleossomas formam-se de novo após a passagem da RNAPII mantendo a integridade da cromatina. A área a sombreado representa a repressão da iniciação de transcrição intragénica exercida pelos nucleossomas. **D.** O ciclo de ejeção/remontagem dos nucleossomas inicia-se novamente com a chegada de uma nova molécula de RNAPII. Ver texto para uma descrição mais detalhada do modelo.

6. Referências

1. Mariño-Ramírez, L., Kann, M., Shoemaker, B., Landsman, D. (2005) Histone structure and nucleosome stability. *Expert Rev. Proteomics* 2 (5) 719-29.
2. Berger, SL. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*. 447(7143):407-12.
3. Li, B., Carey, M., Workman, JL. (2007). The Role of Chromatin during Transcription. *Cell*. 128(4):707-19.
4. Scharf, A., Imhof, A. (2011). Every methyl counts – Epigenetic calculus. *FEBS Lett*. 585(13):2001-7.
5. Sims, RJ. 3rd, Reinberg, D. (2009). Processing the H3K36me3 signature. *Nat. Genet*. 41(3):270-1.
6. Hu, M., Sun, XJ., Zhang, YL., Kuang, Y., Hu, CQ., Wu, WL., Shen, SH., Du, TT., Li, H., He, F., Xiao, HS., Wang, ZG., Liu, TX., Lu, H., Huang, QH., Chen, SJ., Chen, Z. (2010). Histone H3 lysine 36 methyltransferase Hypb/Setd2 is required for embryonic vascular remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107(7):2956-61.
7. Krogan, NJ., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, DP., Beattie, BK., Emili, A., Boone, C., Shilatifard, A., Buratowski, S., Greenblatt, J. (2003). Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell. Biol*. 23(12):4207-18.
8. Li, B., Howe, L., Anderson, S., Yates, JR 3rd., Workman, JL. (2003). The Set2 histone methyltransferase functions through the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA Polymerase II. *J. Biol. Chem*. 278(11):8897-903.
9. Almeida, SF., Grosso, A., Koch, F., Fenouil, R., Carvalho, S., Andrade, J., Levezinho, H., Gut, M., Eick, D., Gut, I., Andrau, JC., Ferrier, P., Carmo-Fonseca, M. (2011). Splicing enhances recruitment of methyltransferase HYPB/Setd2 and methylation of histone H3 lysine 36. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (26 July advance online publication doi:10.1038/nsmb.2123).
10. Bell, O., Wirbelauer, C., Hild, M., Scharf, AN., Schwaiger, M., MacAlpine, DM., Zilbermann, F., van Leeuwen, F., Bell, SP., Imhof, A., Garza, D., Peters, AH., Schübeler, D. (2007). Localized H3K36 methylation states define histone H416 acetylation during transcriptional elongation in *Drosophila*. *EMBO J*. 26(24):4974-84.
11. Carrozza, MJ., Li, B., Florens, L., Sugauma, T., Swanson, SK., Lee, KK., Shia, WJ., Anderson, S., Yates, J., Washburn, MP., Workman, JL. (2005). Histone H3 Methylation by Set2 Directs Deacetylation of Coding Regions by Rpd3S to Suppress Spurious Intragenic Transcription. *Cell*. 123(4):581-92.
12. Joshi, AA., Struhl, K. (2005). Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol. Cell*. 20(6):971-78.
13. Keogh, MC., Kurdistani, SK., Morris, SA., Ahn, SH., Podolny, V., Collins, SR., Schuldiner, M., Chin, K., Punna, T., Thompson, NJ., Boone, C., Emili, A., Weissman, JS., Hughes, TR., Strahl, BD., Grunstein, M., Greenblatt, JF., Buratowski, S., Krogan, NJ. (2005). Cotranscriptional Set2 methylation of histone H3 lysine K36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell*. 123(4):593-605.

14. Klose, R.J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., Zhang, Y. (2006). The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine K36. *Nature*. 442(7100):312-16.
15. Cosgrove, MS., Boeke, JD., Wolberger, C. (2004). Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol. Biol.* 11(11):1037-43.
16. Saha, A., Wittmeyer, J., Cairns, BR. (2006). Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7(6):437-47.
17. Smith, CL., Peterson, CL. (2005) ATP-dependent chromatin remodeling *Curr. Top. Dev. Biol.* 65:115-48.
18. Spain, MM., Govind, CK. (2011). A role for phosphorylated Pol II CTD in modulating transcription coupled histone dynamics. *Transcription*. 2(2):78-81.
19. Avvakumov, N., Nourani, A., Côté, J. (2011). Histone Chaperones: Modulators of Chromatin Marks. *Mol. Cell.* 41(5):502-14.
20. Armstrong, JA. (2007). Negotiating the nucleosome: factors that allow RNA polymerase II to elongate through chromatin. *Biochem Cell Biol.* 85(4):426-34.
21. Adkins, MW., Howar, SR., Tyler, JK. (2004). Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast *PHO5* and *PHO8* genes. *Mol. Cell.* 14(5):657-66.
22. Korber, P., Barbaric, S., Luckenbach, T., Schmid, A., Schermer, UJ., Blaschke, D., Hörz, W. (2006). The histone chaperone Asf1 increases the rate of histone eviction at the yeast *PHO5* and *PHO8* promoters. *J. Biol. Chem.* 281(9):5539-45.
23. Schwabish, MA., Struhl, K. (2006). Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell.* 22(3):415-22.
24. Rufiange, A., Jacques, PE., Bhat, W., Robert, F., and Nourani, A. (2007). Genome-wide replication-independent histone H3 exchange occurs predominantly at promoters and implicates H3 K56 acetylation and Asf1. *Mol. Cell.* 27: 393–405.
25. Xu, F., Zhang, K., and Grunstein, M. (2005). Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast. *Cell.* 121: 375–85.
26. Williams, SK., Truong, D., and Tyler, JK. (2008). Acetylation in the globular core of histone H3 on lysine-56 promotes chromatin disassembly during transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 9000–5.
27. Lin, LJ., Minard, LV., Johnston, GC., Singer, RA., Schultz, MC. (2010). Asf1 Can Promote Trimethylation of H3 K36 by Set2. *Mol. Cell. Biol.* 30(5):1116-29.
28. Ransom, M., Williams, SK., Dechassa, ML., Das, C., Linger, J., Adkins, M., Liu, C., Bartholomew, B., and Tyler, JK. (2009). FACT and the proteasome promote promoter chromatin disassembly and transcriptional initiation. *J. Biol. Chem.* 284: 23461–71
29. Jamai, A., Puglisi, A., Strubin, M. (2009). Histone Chaperone Spt16 Promotes Redeposition of the Original H3-H4 Histones Evicted by Elongating RNA Polymerase. *Mol. Cell.* 35(3):377-83.

30. Xin, H., Takahata, S., Blanksma, M., McCullough, L., Stillman, DJ., Formosa, T. (2009). yFACT Induces Global Accessibility of Nucleosomal DNA without H2A-H2B Displacement. *Mol. Cell.* 35(3):365-76.
31. Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, VA., Orphanides, G., Studitsky, VM., Reinberg, D. (2003). FACT Facilitates Transcription-Dependent Nucleosome Alteration. *Science.* 301(5636):1090-3.
32. Krogan, NJ., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, AP., et al. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 440: 637–43.
33. Liu, Z., Zhu, Y., Gao, J., Yu, F., Dong, A., Shen, WH. (2009). Molecular and reverse genetic characterization of NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN 1(NAP1) genes unravels their function in transcription and nucleotide excision repair in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 59(1):27-38.
34. Moshkin, YM., Kan, TW., Goodfellow, H., Bezstarosti, K., Maeda, RK., Pilyugin, M., Karch, F., Bray, SJ., Demmers, JA., Verrijzer, CP. (2009). Histone chaperones ASF1 and NAP1 differentially modulate removal of active histone marks by LID-RPD3 complexes during NOTCH silencing. *Mol. Cell.* 35(6):782-93.
35. Walfridsson, J., Khorosjutina, O., Matikainen, P., Gustafsson, CM., Ekwall, K. (2007). A genome-wide role for CHD remodeling factors and Nap1 in nucleosome disassembly. *EMBO J.* 26(12):2868-79.
36. Sharma, N., Nyborg, JK. (2008). The coactivators CBP/p300 and the histone chaperone NAP1 promote transcription-independent nucleosome eviction at the HTLV-1 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(23):7959-63.
37. Ivanovska, I., Jacques, PÉ., Rando, OJ., Robert, F., Winston, F. (2011). Control of chromatin structure by Spt6: different consequences in coding and regulatory regions. *Mol. Cell. Biol.* 31(3):531-41.
38. Yoh, SM., Lucas, JS., Jones, KA. (2008). The lws1:Spt6:CTD complex controls cotranscriptional mRNA biosynthesis and HYPB/Setd2-mediated histone H3K36 methylation. *Genes Dev.* 22(24):3422-34.
39. Youdell, ML., Kizer, KO., Kisseleva-Romanova, E., Fuchs, SM., Duro, E., Strahl, BD., Mellor, J. (2008). Roles for Ctk1 and Spt6 in Regulating the Different Methylation States of Histone H3 Lysine 36. *Mol. Cell. Biol.* 28(16):4915-26.
40. de Almeida, SF., García-Sacristán, A., Custódio, N., Carmo-Fonseca, M. (2010). A link between nuclear RNA surveillance, the human exosome and RNA polymerase II transcriptional termination. *Nucleic Acids Res.* 38(22):8015-26.
41. Nature Publishing Group. (2005). Micrococcal Nuclease – Southern blot assay. Vol. 2 No. 9.
42. Kemp, MG., Ghosh, M., Liu, G., Leffak, M. (2005). The histone deacetylase inhibitor trichostatin A alters the pattern of DNA replication origin activity in human cells. *Nucleic Acids Res.* 33(1):325-36.
43. Listerman, I., Sapra, AK., Neugebauer, KM. (2006). Cotranscriptional coupling of splicing factor recruitment and precursor messenger RNA splicing in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(9):815-22.

44. Chung, HR., Dunkel, I., Heise, F., Linke, C., Krobitsch, S., Ehrenhofer-Murray, AE., Sperling, SR., Vingron, M. (2010). The Effect of Micrococcal Nuclease Digestion on Nucleosome Positioning Data. *PLoS One*. 5(12):e15754.
45. Kulaeva, OI., Hsieh, FK., Studitsky, VM. (2010). RNA polymerase complexes cooperate to relieve the nucleosomal barrier and evict histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107(25):11325-30.
46. Myers CN, Berner GB, Holthoff JH, Martinez-Fonts K, Harper JA, Alford S, Taylor MN, Duina AA. Mutant Versions of the *S. cerevisiae* Transcription Elongation Factor Spt16 Define Regions of Spt16 That Functionally Interact with Histone H3. *PLoS One*. 6(6):e20847.
47. Al Sarakbi, W., Sasi, W., Jiang, WG., Roberts, T., Newbold, RF., Mokbel, K. (2009). The mRNA expression of SETD2 in human breast cancer: correlation with clinico-pathological parameters. *BMC Cancer*. 9:290.
48. Duns, G., van den Berg, E., van Duivenbode, I., Osinga, J., Hollema, H., Hofstra, RM., Kok, K. (2010) Histone Methyltransferase Gene *SETD2* Is a Novel Tumor Suppressor Gene in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res*. 70:4287-91.

Anexo 1. Sequência dos siRNAs usados.

Símbolo do gene	Designação do siRNA	Sequência
<i>GL2</i>	GL2-sense	CGUACGCGGAAUACUUCGA
	GL2-antisense	UCGAAGUAUUCGCGUACG
<i>SETD2</i>	SETD2 oligo 1-sense	GCUCCAUCAAAUCGAUUAA
	SETD2 oligo 1-antisense	UUAAUCGAUUUGAUGGAGC
	SETD2 oligo 2-sense	GCAGGACACUAUAUCUAAU
	SETD2 oligo 2-antisense	AUUAGAUUAGUGUCCUGC
	SETD2 oligo 3-sense	GGUGUAACUUAUGCAUUAA
	SETD2 oligo 3-antisense	UUAAUGCAUAAGUUACACC

Anexo 2. Sequência dos *primers* utilizados neste estudo.

Nome do gene	Designação do primer	Sequência do primer
<i>CD44</i>	Exão1_Fw	GAAGAAAGCCAGTGCGTCTC
	Exão1_Rv	TGCTCTGCTGAGGCTGTAAAT
	Exão2_Fw	ATCTCTCGGACGGAGGCCGC
	Exão2_Rv	GGTCGGGTGCTGGTCTCTTACCT
	Exão3_Fw	TAGAAGGGCACGTGGTGATT
	Exão3/Intrão3_Rv	CCAACCTGAAGCATTGAAGC
	Exão5_Fw	GACAGAAATGGCACCCTGCTTATG
	Exão5_Rv	TGTGCTTGTAGAATGTGGGGTCTCT
	Exão16_Fw	GGTGGAGCAAACACAACCTCTGGT
	Exão16_Rv	TGCTGGGACATTCTGAGAAAGCTGC
	Exão17_Fw	GGCATCCCTCTTGGCCTTGGC
	Exão17_Rv	GCCCCAGGACAGCCCCTTA
	Exão18_Fw	CCCCAGATCACCTCACAGGGCAG
	Exão18_Rv	GCTGCCCATGGTGTGGAATTAGC
<i>PCNA</i>	Exão1_Fw	GTTGCAGGCGTAGCAGAGTG
	Exão1_Rv	GGTGGCGGAGTGGCAACAAC
	Exão2_Fw	GCCGAAGATAACGCGGATAC
	Intrão2/Exão3_Rv	GAAACTTTCTCCTGGTCTACC
	Exão5_Fw	GGTTACCATAGAGATGAATGAACCA
	Exão5_Rv	TGACTACCTACAAAACAAGGTTCAAA
<i>CDK2</i>	Exão1_Fw	GTCGGGAACCTCGGTGGGAG
	Exão1_Rv	AGAAGGCGGACCCTGGCTC

<i>CDK2</i>	Exão4_Fw	CTCCAGGGCCTAGCTTTCTG
	Exão4_Rv	GTGTAAGTACGAACAGGGACTC
	Exão5_Fw	CATCTGGAGCCTGGGCTGCA
	Exão5_Rv	TGGGGAGGAGAGGGAGGGGG
	Exão6_Fw	CCCTATTCCCTGGAGATTCTG
	Exão6_Rv	CTCCGTCCATCTTCATCCAG
<i>c-Myc</i>	190_Fw	GCCGCATCCACGAACTTT
	190_Rv	TCCTTGCTCGGGTGTTGTAAG
	4828_Fw	CCTGAGCAATCACCTATGAACTTG
	4828_Rv	CAAGGTTGTGAGGTTGCATTTG
<i>Região Intragénica Humana</i>	Intergenic_Fw	GGCTAATCCTCTATGGGAGTCTGTC
	Intergenic_Rv	CCAGGTGCTCAAGGTCAACATC
<i>snRNA U6</i>	U6_Fw	GCTTCGGCAGCACATATACTA
	U6_Rv	AAATATGGAACGCTTCACGA