



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**IMPORTÂNCIA DAS VARIANTES DAS HISTONAS DA FAMÍLIA
H3 NA REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO**

Trabalho submetido por
Mafalda Castanho Novo Almeida
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

outubro de 2014



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IMPORTÂNCIA DAS VARIANTES DAS HISTONAS DA FAMÍLIA H3 NA REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO

Trabalho submetido por
Mafalda Castanho Novo Almeida
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Isabel Barahona

outubro de 2014

Dedicatória

Ao meu Avô Chico e Avô Domingos que todos os dias me dão força e me iluminam nesta caminhada que é a vida!

Agradecimentos

OBRIGADA aos **Melhores Pais do Mundo!** Deram-me asas para voar permitindo a concretização deste sonho. Tudo o que sou devo a vocês! São o meu exemplo de determinação, luta e glória!

Obrigada **Madrinha e Padrinho!** São os meus segundos pais, partilharam comigo todos os bons e maus momentos destes cinco anos e sei que vos terei sempre junto a mim!

Obrigada à minha **Laurinha** e ao meu **Miglota!** Por serem os meus irmãos de coração! Rimos, brigamos e abraçamos no mesmo segundo! Somos e seremos sempre os três, juntos em todas as derrotas e vitórias!

Obrigada **Avó Sara e Avó Chica!** Por todo o apoio, carinho e força que sempre me transmitiram! Sei que vos tenho sempre ao meu lado!

Obrigada aos grandes amigos que fiz nestes cinco anos! **Andreia, Betcha, Catarina, Duarte, Inês, Laura, Leonor, Maria, Mariana e Rita,** tive a grande sorte de o meu caminho se ter cruzado com o vosso, sem vocês estes anos não tinham sido dos melhores da minha vida e este percurso não se tinha tornado tão maravilhoso! Dê a vida as voltas que der terão sempre um lugar especial no meu coração e na minha história!

Obrigada aos meus amigos! **Carolina, Conguito, Joana e Paulo,** mesmo separados por muitos quilómetros sempre me deram a força necessária nos bons e maus momentos!

Obrigada à Equipa Maravilhosa da **Farmácia Roque!** Não podia ter escolhido um local melhor para começar a aplicar os conhecimentos que aprendi ao longo destes cinco anos!

Obrigada **Professora Isabel Barahona!** O seu apoio foi essencial na concretização deste trabalho.

Resumo

A regulação genética nas células eucariotas é realizada ao nível da cromatina. Assim, várias modificações são necessárias para que os processos celulares possam ocorrer. Nestes processos, as histonas assumem um papel fundamental na compactação das moléculas de ácido desoxirribonucleico e na regulação epigenética.

A substituição de histonas canónicas pelas suas variantes é uma das modificações realizadas a nível da cromatina. A variante H3.3 encontra-se maioritariamente associada a nucleossomas menos estáveis e a regiões de transcrição ativa.

O Herpes Simplex tipo 1 associa-se à H3.3 como mecanismo de regulação para a transcrição do genoma viral. É também cada vez mais frequente que mutações da variante H3.3 estejam associadas a doenças malignas.

Assim, esta monografia tem como objetivo principal tornar visível o estado da arte relativamente ao papel da variante H3.3 na transcrição.

Palavras-chave: cromatina, transcrição, variantes de histonas, H3.3, *Herpes Simplex* Tipo 1, mutações.

Abstract

The genetic regulation of eukaryotes is performed at the chromatin. Therefore, several modifications are necessary in order that the cell processes may occur. In this processes, histones take a essential role in compression of DNA molecules and the epigenetics regulation.

The substitution of canonic histones by their variants is one of the modifications performed in chromatin.

The variant H3.3 is find mainly associated with unstable nucleosomes and to regions of active transcription.

The HSV-1 virus is associated with H3.3 as a regulatory mechanism to transcription of the viral genome. Is also usual that mutation of the H3.3 variant are associated with malignant diseases.

Thus, this dissertation has as main goal to make visible the state of the art respectively to the variant role of H3.3 in transcription.

Keywords: chromatin, transcription, histones variants, H3.3, HSV-1, mutations.

Índice Geral

Dedicatória.....	3
Agradecimentos	5
Resumo	7
Abstract.....	9
Índice Geral	11
Índice de Figuras	13
Índice de Tabelas	15
Lista de Abreviaturas.....	17
1 – Introdução	19
1.1 – Estrutura Geral da Cromatina	19
1.2 – Histonas	25
1.3 - Variantes de Histonas.....	27
1.4 - Transcrição de Genes	30
2 - Desenvolvimento.....	35
2.1 – Variante H3.3 Associada a Genes Ativamente Transcritos.....	35
2.2 – Importância da Variante H3.3 na Transcrição do HSV-1	39
2.2.1 – Infecção por HSV-1.....	39
2.2.2 – Expressão de Genes	40
2.2.3 – Mobilização de H3.1 e H3.3 Durante a Infecção	43
2.3 - Função da Variante H3.3 Durante o Desenvolvimento e Reprodução	47
3 - Conclusão	49
4 - Bibliografia.....	51

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura da Cromatina com o DNA Enrolado à Volta do Octâmero de Histonas.....	19
Figura 2 – Organização da Cromatina com os Diferentes Graus de Condensação que a Compõem.....	20
Figura 3 – Estrutura do Nucleossoma com o DNA Enrolado à Volta do Octâmero de Histonas.....	21
Figura 4 – Esquema Representativo dos Dois Tipos de Cromatina	22
Figura 5 – Modificações Dirigidas às Histonas.....	23
Figura 6 – Modulação da Estabilidade dos Nucleossomas Através de PTM.....	24
Figura 7 – Estrutura Comum das Histonas.....	25
Figura 8 – Diferentes PTM nas Caudas N-terminais das Histonas que Compõem o Octâmero.....	26
Figura 9 – Evolução da H3 nas Várias Espécies e Especialização da sua Função.....	28
Figura 10 – Estrutura Cristalina de Nucleossomas Humanos.....	29
Figura 11 – Exemplos de Remodeladores de Cromatina que se Ligam aos Domínios Específicos de Histonas Modificados.....	30
Figura 12 – Substituição do Dímero H3/H4 Durante a Transcrição.....	34
Figura 13 – Padrão de Deposição da Variante H3.3 nos Locus de Genes Ativos.....	36
Figura 14 – Comparação entre a Variante H3.3 e a Sua Formas Canônicas H3.1 e H3.2.....	37
Figura 15 – Esquema Representativo da Estabilidade Relativa dos Nucleossomas que Contêm Diferentes Variantes de Histonas.....	38
Figura 16 – Os Três Estágios da Infecção por HSV-1.....	39
Figura 17 – Regulação da Expressão de Genes HSV-1.....	41
Figura 18 – Repressão e Ativação do HSV-1 Através da Modulação da Cromatina por PTM.....	42

Figura 19 – Níveis de Incorporação de H3.1 e H3.3 nos Promotores e Genes de transcrição do HSV-1.....	44
Figura 20 – Transcrição dos Genes de HSV-1 em mRNA Despromovido de HIRA.....	45
Figura 21 – Zonas enriquecidas com H3.3 e Complexos que Promovem a Sua Deposição.....	47

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Descrição de Algumas Variantes de Histonas Existente em Células Eucariotas Humanas24

Tabela 2 – Chaperons Envolvidos na (+) ativação ou na (-) remoção de PTM29

Lista de Abreviaturas

- ATP – Trifosfato de Adenosina
- ChIP – Imunoprecipitação de Cromatina
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- HAT – Acetiltransferase de Histonas
- HDAC – Desacetilase de Histonas
- HSV-1 – Vírus Herpes Simplex tipo 1
- M.E.T – Microscópio Electrónico de Transmissão
- MNase – Nuclease Micrococcal
- PTM – Modificações Pós-traducionais de Histonas
- RNA – Ácido Ribonucleico

1 – Introdução

1.1 – Estrutura Geral da Cromatina

As células eucariotas possuem a sua informação genética em moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA), as quais se encontram compactadas no núcleo com o auxílio de proteínas, denominadas histonas, formando a unidade básica e fundamental da cromatina – o nucleossoma (Frouws, Patterton, e Sewell, 2009). Estas unidades repetidas em forma de esferas, consistem em aproximadamente 146 pares de bases de DNA, duplamente enrolados à volta de um octâmero central de histonas (Winter e Amit, 2014), constituído por um tetrâmero de H3-H4 e dois dímeros H2A-H2B (Frouws et al., 2009), tal como pode ser observado na figura 1. A ligar nucleossomas adjacentes encontram-se pequenas sequências de DNA (linker DNA), de tamanho variável, às quais está associada a histona H1 - histona *linker*, ou a sua proteína homóloga H5, que ao interagir com o octâmero central forma fibras condensadas, com capacidade de compactação elevada (Bell, Tiwari, Thomä, e Schübeler, 2011).

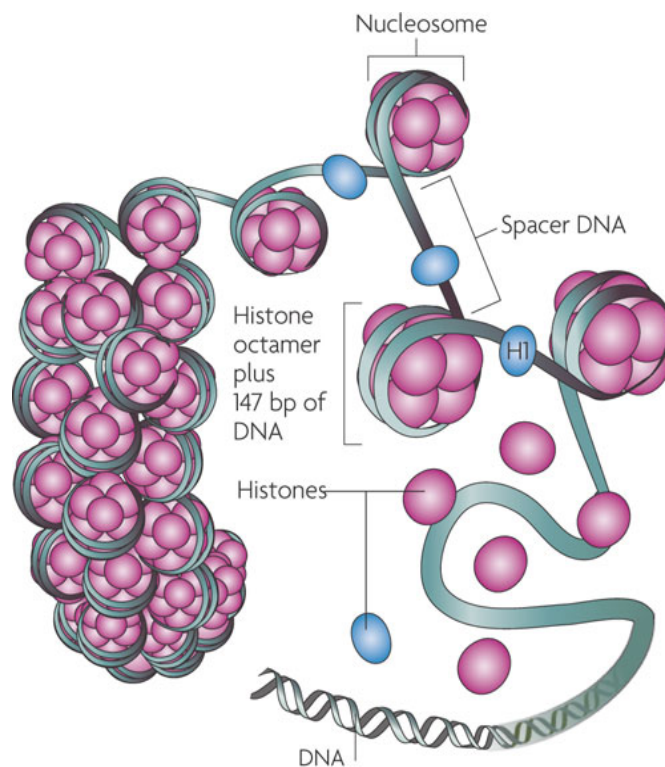


Figura 1 - Estrutura da cromatina com o DNA enrolado à volta do octâmero de histonas (adaptado de: Figueiredo, Cross, e Janzen, 2009)

Dois tipos de fibra podem ser visualizadas ao M.E.T uma com 10 nm de diâmetro com aspecto de “colar de contas”, onde cada “conta” corresponde a um nucleossomas; e uma longa fibra com 30 nm de diâmetro correspondente à concentração de nucleossomas justapostos, com enrolamento helicoidal posterior. Este estado corresponde um nível de compactação 40 vezes superior ao de DNA de cadeia dupla despromovido de qualquer associação com proteínas (Leonardo Mariño-Ramírez, Maricel G Kann, Benjamin A Shoemaker, 2005) . Na figura 2 estão representados os diferentes níveis de organização da cromatina..

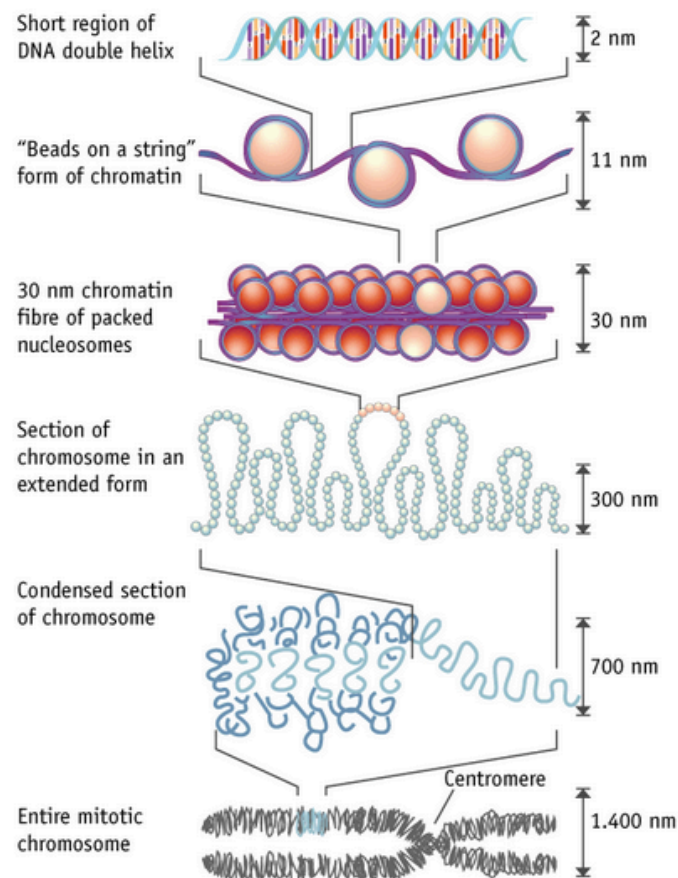


Figura 2 -Organização da cromatina com diferentes graus de condensação que a compõem.
(adaptado de : <http://www.medinfo.net/imi/research-areas/large-scale-genomic-instability/>)

A forte atração entre as cadeias de DNA e as histonas resulta de interações electrostáticas entre as cargas negativas da molécula do DNA e as carga positivas das histonas. Assim, a carga do DNA é neutralizada permitindo a condensação consequente da cromatina (Luger, 2001).

A formação do octâmero ocorre gradualmente, iniciando-se com a deposição do tetrâmero H3/H4 e, posteriormente os dois dímeros H2A/H2B. (Adkins, Carson, English, Ramey, e Tyler, 2007). Na figura 3 pode observar-se o nucleossoma constituído pelo tetrâmero H3/H4 central e os dímeros H2A/H2B encaixados no exterior, junto dos locais de entrada e saída do DNA (Weber e Henikoff, 2014).

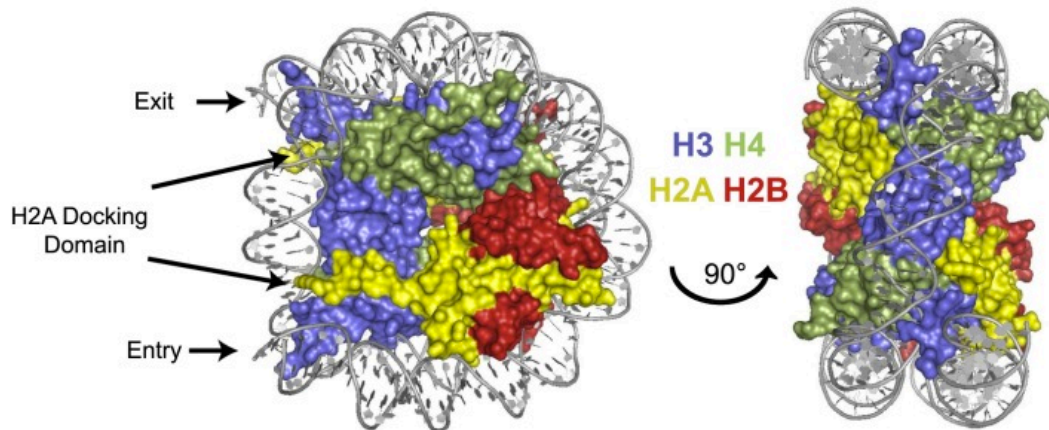


Figura 3 - Estrutura do nucleossoma com o DNA enrolado à volta do octâmero de histonas (adaptado de : Weber e Henikoff, 2014)

A necessidade de compactação da cromatina é bastante evidente, na medida em que o DNA nuclear desenrolado das células humanas tem, aproximadamente, dois metros que está inserido no pequeno espaço disponível no núcleo. Assim, através da compactação, é também possível modular a transcrição através do metabolismo da cromatina, pois a cromatina apresenta uma inacessibilidade estrutural, inativando a maior parte das sequências de DNA. Caso a cromatina se encontre menos empacotada estamos perante uma cromatina ativamente transcrita.

Estudos genéticos realizados em células eucariotas permitiram diferenciar dois tipos de cromatina, figura 4, que se distinguem pelo seu grau de condensação e pelo grau de expressão dos seus genes, e estão intimamente relacionadas com o comportamento dos cromossomas durante a divisão celular. A eucromatina (ou cromatina ativa) representa a zona mais ativa do genoma, onde estão as regiões do DNA com uma hipersensibilidade marcada à DNase estando algumas destas regiões enriquecidas em histonas modificadas. A estrutura mais descondensada da cromatina está de acordo com maior atividade génica destas regiões, alternando regiões com maior e menor densidade de genes. Por outro lado, a heterocromatina corresponde a regiões menos ativas e/ou inativas do genoma tem uma estrutura condensada e mantém o seu

grau de condensação. Encontra-se dividida em heterocromatina facultativa e constitutiva. A heterocromatina facultativa está presente apenas numa das duas moléculas de DNA homólogas, sendo ativa num curto período de tempo. A heterocromatina constitutiva ocorre no par de cromossomas homólogos, e é na maioria das vezes inativa. As seqüências de DNA que a constituem são repetitivas, contem poucos genes e é encontrada em centrómeros e telómeros (Bannister e Kouzarides, 2011; Bell et al., 2011; Mellor, 2006)

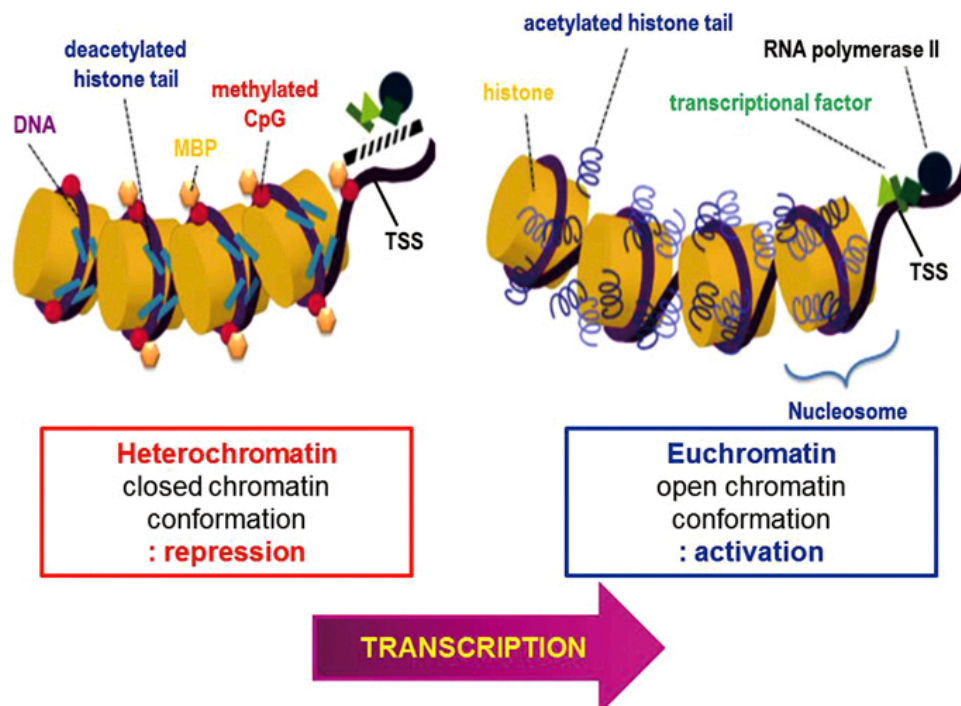


Figura 4 – Esquema representativo dos dois tipos de cromatina (adaptado de: Kim, 2014)

A regulação genética é realizada ao nível da cromatina (Bell et al., 2011), assim o grau de compactação do DNA, a composição e organização dos nucleossomas têm um impacto significativo em processos celulares como: a transcrição, replicação, recombinação e reparação do núcleo (Mellor, 2006).

Nos processos como a transcrição e a replicação é necessário que as duas cadeias da molécula de DNA se separem, para permitir o acesso ao DNA das RNA e DNA polimerases, respetivamente. A estrutura dinâmica da cromatina permite a mobilidade dos nucleossomas, devido a alterações na posição do octâmero central de histonas. É importante que a cromatina esteja relaxada e que os nucleossomas sejam

mobilizados transientemente para que ocorra a transcrição dos genes; essas alterações podem ser introduzidas por meio de: PTM, modificações pós-traducionais das histonas, remodelação da cromatina ou por incorporação de variantes de histonas nos nucleossomas, como está ilustrado na figura 5 (Berger, 2007).

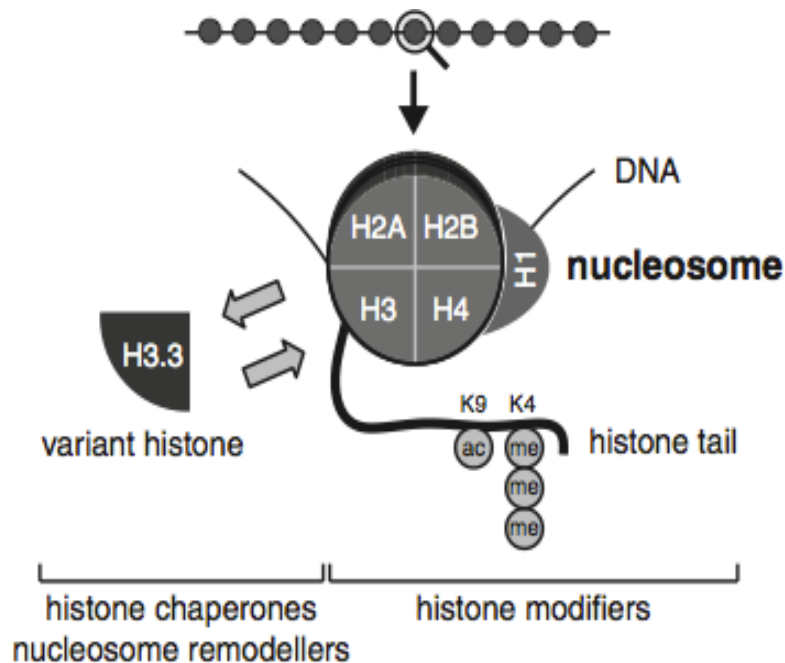


Figura 5 - Modificações dirigidas às histonas. (adaptado de: Nevels, Nitzsche, e Paulus, 2011)

A função destas modificações é influenciar a estrutura global da cromatina através de modificações que influenciam as interações entre o DNA e as histonas; e recrutar proteínas remodeladoras da cromatina (Kouzarides, 2007)

Assim, estas modificações influenciam o grau de enrolamento do DNA e desempenham um papel importante na regulação da atividade gênica - transcrição (Mellor, 2006), pois alteram a estabilidade geral dos nucleossomas (Bell et al., 2011), figura 6.

Todas estas modificações (metilação do DNA, PTM, posição dos nucleossomas, variantes de histonas) representam a informação epigenética da célula necessária ao seu desenvolvimento e proliferação celular. A regulação epigenética é essencial ao desenvolvimento natural das células, ou até mesmo em resposta a estímulos externos (Campbell e Tummino, 2014; Jaenisch e Bird, 2003).

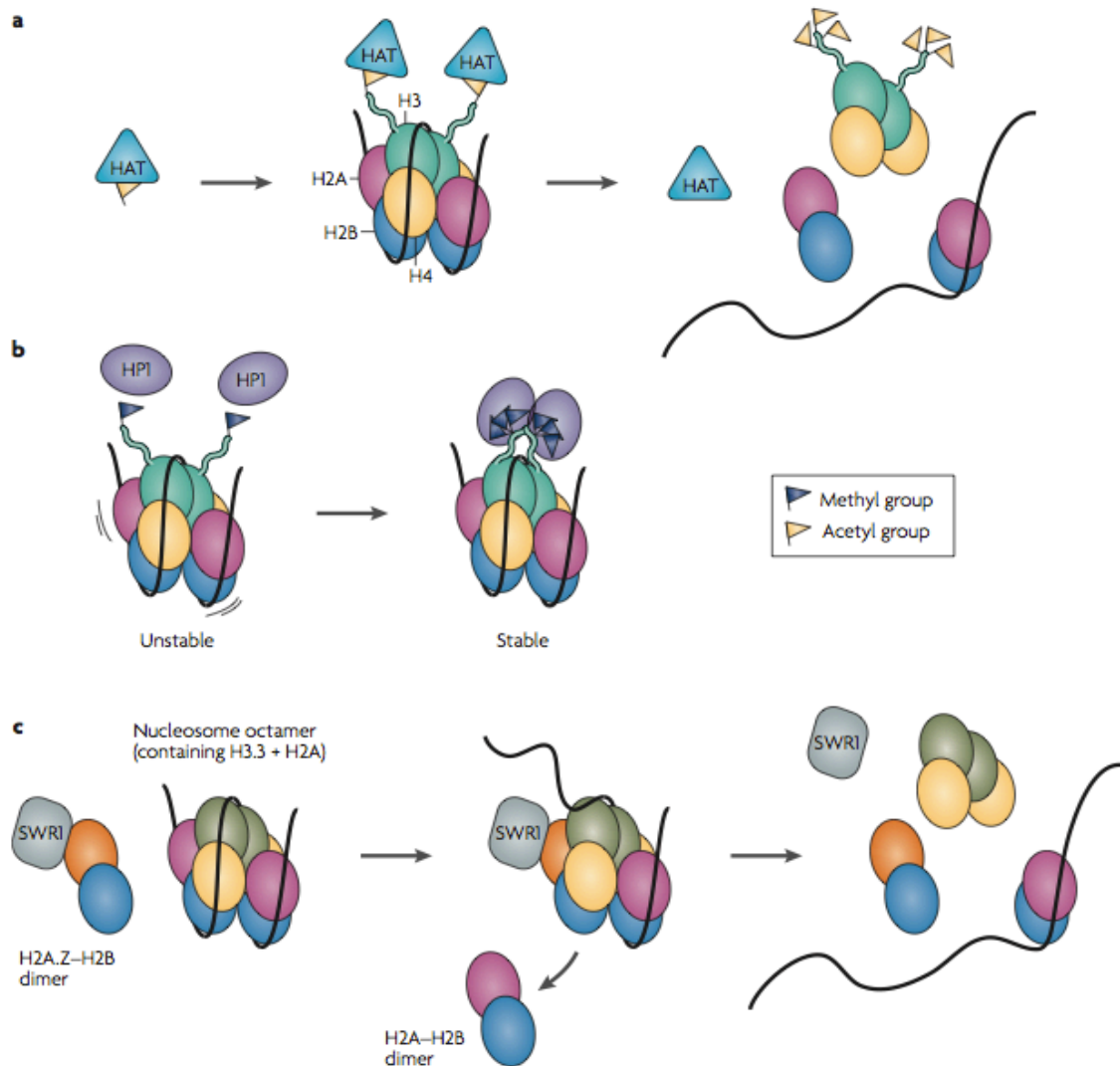


Figura 6 - Modulação da estabilidade dos nucleossomas através de PTM. (a) Modificações nas caudas das histonas. HAT coloca grupos acetil nas caudas das histonas H3, diminuindo as interações destas com outros componentes da cromatina e destabilizando os nucleossomas. (b) Proteínas associadas à cromatina. A HP1 é uma proteína de heterocromatina, que se liga a duas caudas das histonas H3 metiladas (H3K9), unindo duas caudas do mesmo nucleossoma ou de dois nucleossomas próximos. Esta modificação reduz a mobilidade dos nucleossomas. (c) Variantes de histonas. SWR1 medeia a substituição do dímero H2A-H2B pelo dímero H2A.Z-H2B. Nucleossomas que contenham H3.3 tornam-se instáveis após a substituição de H2A por H2A.Z. (adaptado de: Henikoff, 2008)

1.2 – Histonas

A nomenclatura das histonas foi estabelecida, em 1974, no simpósio - “Estrutura e função da cromatina”. Neste simpósio, foi evidenciado que em adição aos cinco grandes tipos de histonas já conhecidas (H1, H2A, H2B, H3 e H4), algumas destas existem em formas variantes, para além de poderem ser marcadas por PTM (Ausió, 2006).

Cada nucleossoma eucariota contém quatro histonas centrais – H2A, H2B, H3 e H4, ligando-se aos nucleossomas adjacentes através da histona H1 (Bhasin, Reinherz, e Reche, 2006).

As histonas, principais componentes proteicos da cromatina (Bhasin et al., 2006), caracterizam-se pela presença de um domínio globular conservado formado pela região C-terminal e uma cauda N-terminal (Ausió, 2006). O comprimento da cauda N-terminal pode ter entre 40 aminoácidos, como é o caso da histona H3, e 15 aminoácidos no caso da H2A (Luger, 2001).

A estrutura interna das histonas consiste em três hélices α unidas por duas pequenas alças, figura 7. As duas hélices mais pequenas, com 10 a 14 aminoácidos, cercam a hélice maior de 28 aminoácidos, hélice central, originando uma abertura superficial. Ao formarem dímeros, a estrutura é estabilizada através do arranjo antiparalelo das duas hélices centrais, de cada uma das histonas (Luger, 2001).

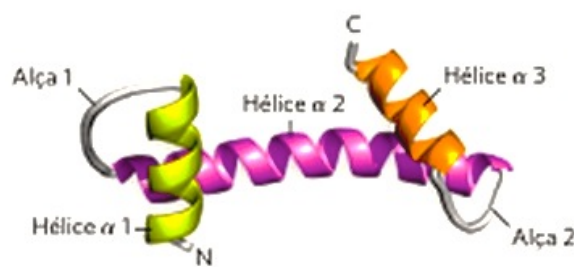


Figura 7 - Estrutura comum das histonas.

De modo geral, são proteínas com massa molecular baixa e com elevado teor de arginina e lisina (Bhasin et al., 2006). A cauda N-terminal é mais flexível e capaz de interagir diretamente com o DNA e com outras proteínas, estando sujeitas a PTM tais como acetilação, metilação, ubiquitação e fosforilação, figura 8. Estas modificações por

si só ou em conjunto participam de forma ativa na maioria dos processos biológicos controlando o acesso de elementos reguladores do DNA durante a replicação, reparação do DNA, transcrição e segregação cromossômica, permitindo alternar o estado ativo e inativo da cromatina (Ausió, 2006; Bannister e Kouzarides, 2011). De entre todas estas PTM a acetilação e a fosforilação têm um papel importante na compactação da cromatina, condensação e segregação cromossômica através de uma mudança na carga das histonas, que se manifesta por alterações nas interações entre o DNA e as histonas (Bannister e Kouzarides, 2011).

Praticamente todas as histonas canônicas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) são produzidas em grandes quantidades durante a fase S do ciclo celular e ligam-se às cadeias de DNA, para formar o nucleossoma,. Assim, as marcas epigenéticas são criadas de modo a assegurar que o genoma celular é conservado em células-filhas (Snyers et al., 2014). A maior parte das histonas são conservadas de um organismo para outro, sendo a H3 e a H4 extremamente conservadas; a H2A e H2B moderadamente conservadas; e a H1 varia consideravelmente nos vários organismos (Bhasin et al., 2006).

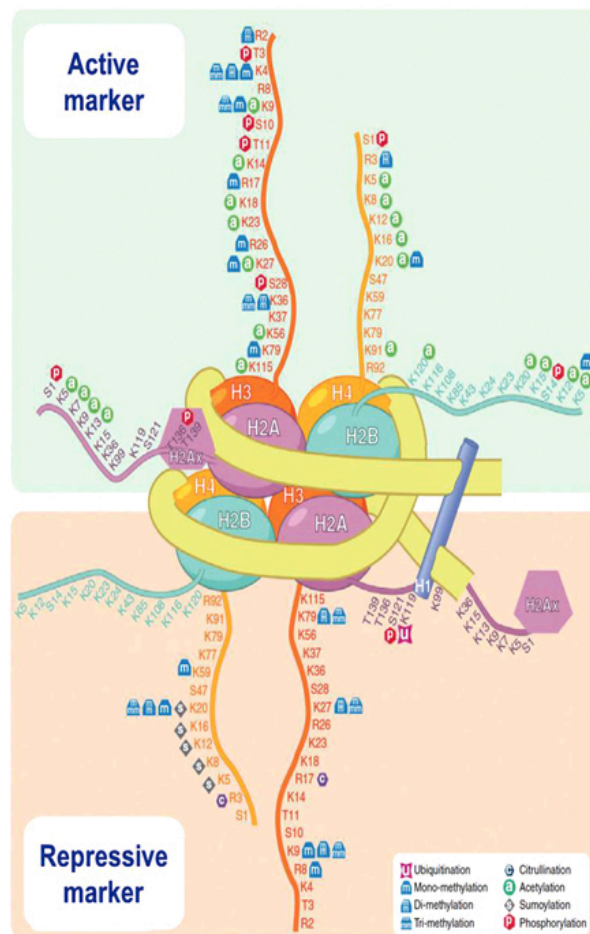


Figura 8 - Diferentes PTM nas caudas N-terminal das histonas que compõe o octâmero (adaptado de: Kim, 2014)

1.3 - Variantes de Histonas

Para além das histonas canónicas, os genes eucariotas humanos também expressam variantes de histonas, como já foi referido anteriormente. Todas as histonas centrais apresentam variantes, à exceção da H4, podendo estas variar apenas em poucos aminoácidos ou em consideráveis modificações em relação à molécula da histona canónica. (Hake e Allis, 2006)

Os genes responsáveis pela expressão das histonas dividem-se em três categorias: replicação-dependentes (DSI), replicação-independentes (DSC) e histonas específicas de tecidos (Hake e Allis, 2006)

As variantes de histonas encontram-se classificadas em homomorfas e heteromorfas. O grupo das variantes homomorfas inclui a H2A.1, H2A.2, H3.1, H3.2 e a H3.3; as histonas variantes deste grupo diferem da sua respetiva forma canónica em poucos aminoácidos. As variantes heteromorfas englobam variantes que tiveram origem em mudanças maiores na molécula da histona canónica; são exemplos a H2A.X, H2A.Z, macroH2A, H2A^{Bbd} e CENP-A (Ausió, 2006). Na tabela 1, estão descritas algumas variantes de histonas humanas.

Tabela 1 – Descrição de algumas variantes de histonas existentes em células eucariotas humanas (adaptado de :Ausió, 2006)

Histonas	Variantes de Histonas	Descrição
H2A	H2A.Z	Inibe a formação de estruturas repressivas na cromatina, criando regiões de fácil acesso, mais compatíveis com a transcrição.
	H2A.X	Está envolvida na reparação do DNA.
	macroH2A	Está envolvida na inativação do cromossoma X.
H3	CENP-A	Substituí a forma canónica H3.1 na cromatina centromérica. É responsável pela formação dos centrómeros; a sua ausência pode levar à perda de cromossomas inteiros e consequentemente à formação de células com número de cromossomas alterados
	H3.3	Associada a genes transcritionalmente ativos.

Durante muito tempo a única função atribuída às histonas era a de enrolar o DNA, no entanto novas funções foram descobertas, fruto de várias investigações neste campo. Assim, verificou-se que as histonas também têm como função a regulação de processos epigenéticos, como a transcrição (Hake e Allis, 2006; Maze, Noh, Soshnev, e Allis, 2014).

A família H3 é a que melhor ilustra este desenvolvimento (Hake e Allis, 2006), figura 9; nas células humanas já foram identificadas oito histonas variantes H3 – H3.1, H3.2, H3.3, H3.3T, H3.5, H3.X, H3.Y e CENP-A (Tachiwana et al., 2011).

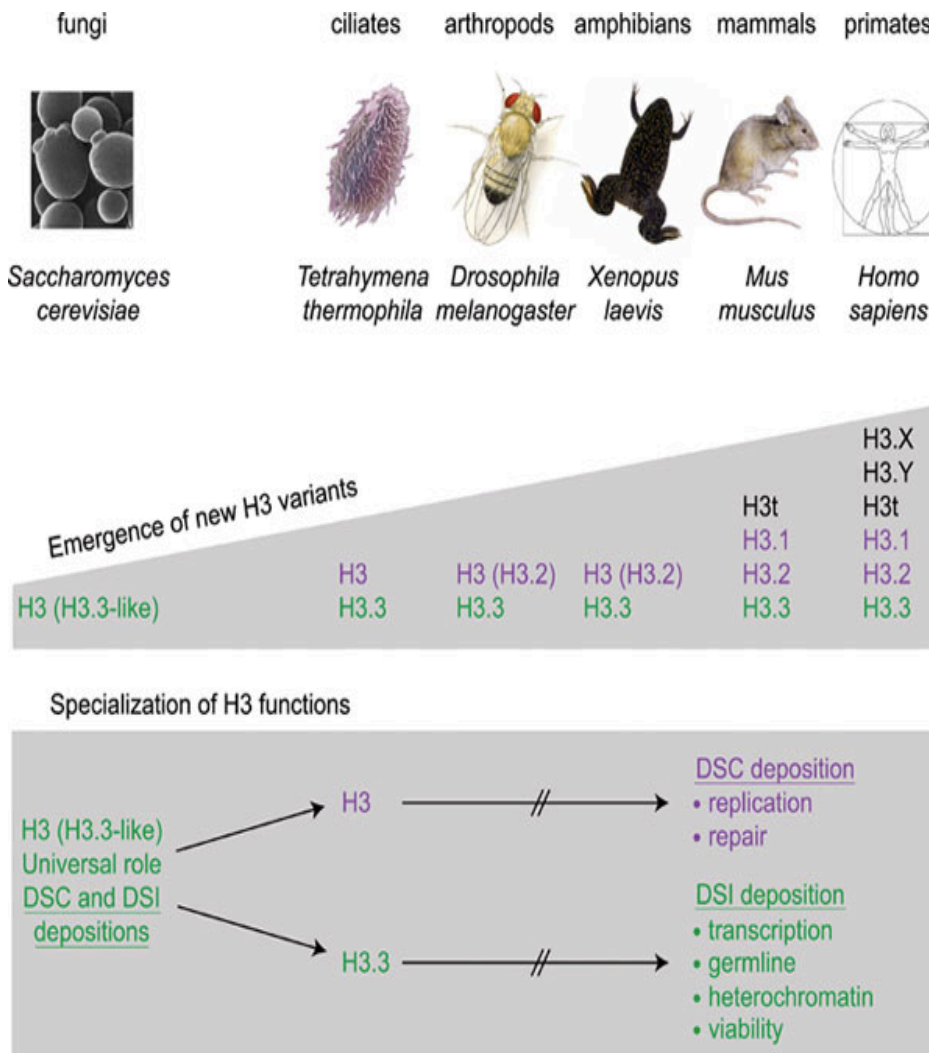


Figura 9 - Evolução da H3 nas várias espécies e especialização da sua função. (adaptado de: Tachiwana et al., 2011).

As histonas da família H3 assumem papéis distintos na organização estrutural da cromatina. Enquanto a H3.1 e H3.2 são expressas apenas durante a fase S do ciclo celular, sendo a sua incorporação na cromatina dependente de replicação, a variante H3.3 apresenta uma incorporação independente de replicação, pois é expressa durante todo o ciclo celular (Tachiwana et al., 2011).

A sua distribuição no genoma é também distinta, a H3.1 encontra-se na heterocromatina constitutiva; a H3.2 na heterocromatina facultativa; e a H3.3 na eucromatina (Hake e Allis, 2006; Snyers et al., 2014). Entre si esta família de histonas difere em poucos aminoácidos. Como pode ser observado na figura 10, a H3.1 e a H3.3 diferem em quatro aminoácidos enquanto que a H3.1 e H3.2 diferem apenas num aminoácido (Tachiwana et al., 2011).

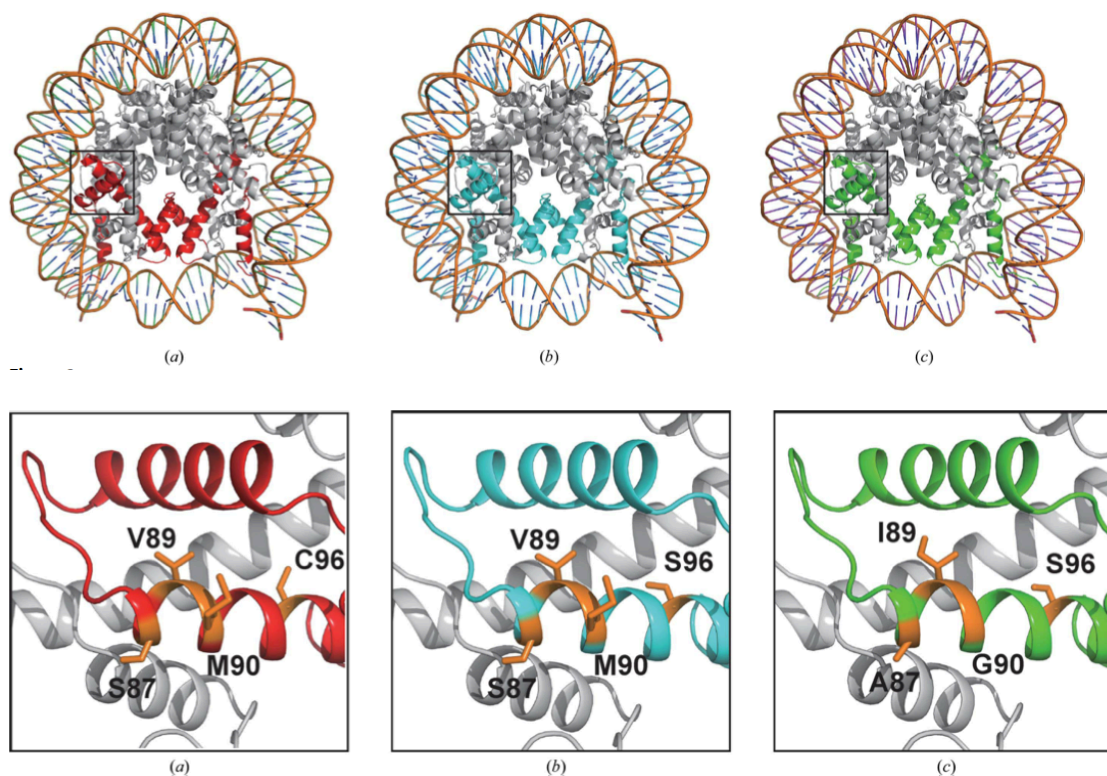


Figura 10 – Estrutura cristalina de nucleossomas humanos. Na parte superior observa-se a estrutura cristalina de nucleossomas com as histonas H3.1 (a), H3.2 (b) e H3.3 (c), as regiões de aminoácidos que variam estão destacadas pelas caixas. Na parte inferior da imagem estão aumentadas as zonas dos nucleossomas, destacadas acima pelas caixas (Tachiwana et al., 2011).

1.4 - Transcrição de Genes

A transcrição nas células eucariotas é um processo altamente regulado por fatores genéticos, assim como por mecanismos epigenéticos (Kim, 2014). O primeiro passo é a associação da maquinaria de transcrição ao promotor que ocorre durante a iniciação da transcrição. A elongação da RNA polimerase II ao longo de um determinado gene é possível, porque os nucleossomas podem ser remodelados a partir de fatores que a eles se associam. De entre estes fatores, salientam-se os complexos remodeladores da cromatina dependentes de ATP e as chaperons específicas das histonas.

Os remodeladores de cromatina são complexos proteicos, presentes na cromatina, que utilizam a hidrólise de ATP para mobilizar e/ou reestruturar nucleossomas. Estes complexos possuem domínios específicos que reconhecem PTM, figura 11. A metilação é reconhecida pelo domínio chromo-like pertencente à família Royal (chromo,tudor,MBT) e por domínios PHD; a acetilação é reconhecida por bromodomínios; e a fosforilação por domínios com proteínas 14-3-3 (Kouzarides, 2007; Saha, Wittmeyer, e Cairns, 2006).

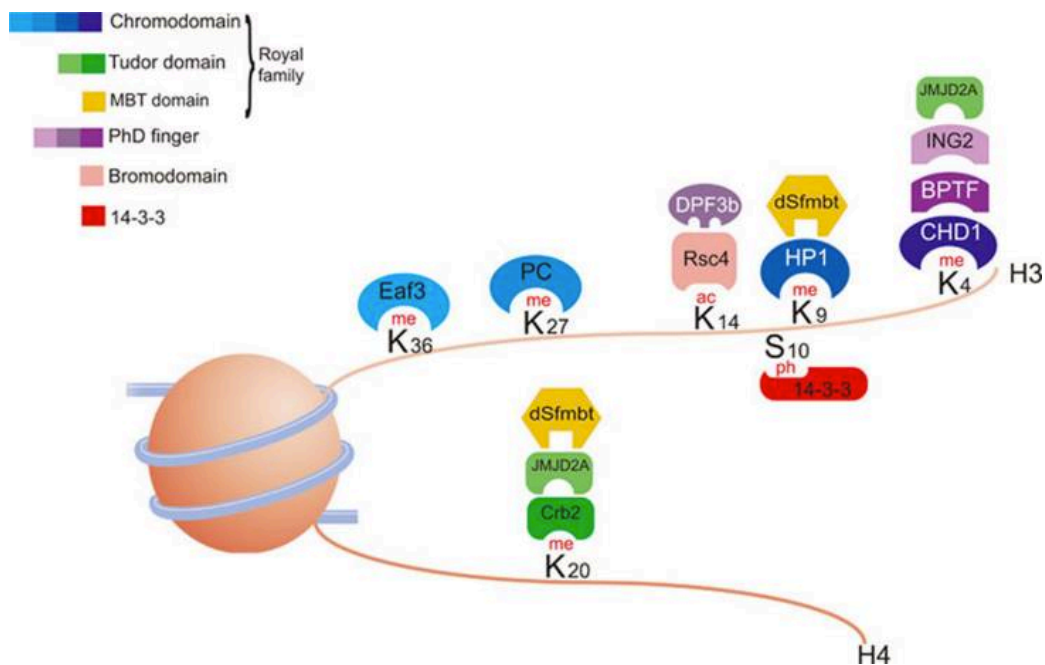


Figura 11 - Exemplos de remodeladores de cromatina que se ligam aos domínios específicos de histonas modificados (adaptado de: Bannister e Kouzarides, 2011)

As chaperons estão direta e indiretamente envolvidas na modulação das modificações associadas à transcrição, mediando as PTM. Acompanham as histonas em todos os processos nas quais estão envolvidas: durante a sua síntese, transporte para o núcleo e medeiam a sua deposição em processos como replicação, reparação e transcrição (Avvakumov, Nourani, e Côté, 2011). Na tabela 2 estão enumeradas as diferentes histonas, as suas respectivas chaperons, mecanismos celulares onde estão envolvidas e as diversas PTM que podem sofrer..

Para que a RNA polimerase II avance, os nucleossomas devem permitir um certo grau de mobilidade ou acessibilidade. Essa mobilidade é conseguida quando determinados resíduos de histonas são modificados, através de PTM, alterando a interação entre as histonas e o DNA. Assim, a mobilidade dos nucleossomas pode aumentar e, conseqüentemente a deslocação da enzima RNA polimerase II é facilitada. Posteriormente, os nucleossomas podem voltar a um estado menos móvel, através da remoção das modificações, com o auxílio dos complexos remodeladores da cromatina (Berger, 2007).

Tabela 2 - Chaperons envolvidas na (+) ativação ou (-) remoção de PTM (adaptado de: Avvakumov et al., 2011)

Histonas	Chaperons	Processo Nuclear	PTMs
H2A-H2B	FACT	Replicação, Reparação Transcrição	(+)H2B K123ub
	Nap 1	Transcrição	(-)
	Chz1	Transcrição	(+)H2B K123ub
H2AX-H2B	FACT	Reparação	(-)H2AX S139 (129) phos
H2AZ-H2B	Nap1	Transcrição	(-)
	Chz1		
H3-H4	Asf1	Replicação	(+)H3 K56ac
		Reparação	(+)H3 K9ac
		Transcrição	(+)H4 K5ac
	CAF-1	Replicação	(+)H4 K12ac
			(+)H3 K36me3
		Reparação	(+)Parental histone PTMs during replication
			(-)H3 K4me3
Vps75	Replicação	(+)H3 K56ac	
		(+)H4 K5/12ac in import	
Rtt106	Replicação	(+)H3 K9ac	
Spt6		(+)H3 K23/27ac	
Nap1	Transcrição	(+)H3 K56ac	
		(+)H3 K36me2/3	
H3.3-H4	HIRA	Transcrição	(-)H3ac
			(-)H3 K4me3
	Daxx		(-)

As consequências da remodelação da cromatina incluem uma quebra transitória da ligação entre a extremidade do DNA e o nucleossoma, ou a deslocação dos nucleossomas para outras posições, sendo que ambas alteram a acessibilidade dos fatores de transcrição ao DNA (Berger, 2007).

Outras proteínas como a HAT e a HDAC são essenciais na remodelação da acessibilidade ao DNA à RNA polimerase II durante a transcrição. A acetilação das histonas pela HAT representa a modificação com maior capacidade para desenrolar a cromatina (Kouzarides, 2007). Através da ligação a cadeias laterais de lisina o HAT troca o grupo E-amino por um grupo acetil. Esta troca promove o enfraquecimento das interações entre o DNA e as histonas, pois as cargas positivas das lisinas são neutralizadas. Contrariamente a HDAC opõem-se aos efeitos da HAT, revertendo a acetilação da lisina. Deste modo, a carga positiva das lisinas são restabelecidas e a interação DNA-histonas é novamente restaurada tornando-se mais forte. O que torna a HDAC proteínas repressoras da transcrição (Bannister e Kouzarides, 2011).

Assim, a atividade das HAT e HDAC é um dos fatores determinantes do estado ativo ou inativo dos genes. Os complexos de HAT são recrutados através da interação com a RNA polimerase II para promover a acetilação dos nucleossomas, localizados a jusante desta, permitindo a sua passagem. Após a passagem da RNA polimerase II, 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. Deste modo, as unidades de transcrição de genes ativamente transcritos ficam protegidas da iniciação da transcrição intragénica. (Avvakumov et al., 2011; Berger, 2007; Kent et al., 2004)

Durante a iniciação da transcrição, as chaperons 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 possibilitando o progresso da RNA polimerase II ao longo dos genes (Avvakumov et al., 2011; Berger, 2007).

Tal como ilustrado na figura 12, a chaperon ASF1 é responsável pela acetilação da histona H3, de modo a que ocorra a deslocação do dímero H3/H4, facilitando assim a sua remoção nos passos de transcrição que se seguem. À medida que a RNA polimerase II avança, as histonas deslocadas são recrutadas pela Spt6 e FACT, enquanto que as chaperons ASF1 e HIRA são responsáveis pela deposição de H3.1 e H3.3 no DNA

recém-sintetizado. Posteriormente, as mesmas chaperons permitem que os nucleossomas a jusante sejam novamente montados após a passagem da RNA polimerase II e, em alguns casos, promovem a remoção das PTM (Avvakumov et al., 2011).

A força de ligação dos dímeros H2A/H2B ao DNA é menor comparativamente à do tetrâmero (Kulaeva, Gaykalova, e Studitsky, 2008), sendo o tetrâmero H3/H4 muito mais estável (Elsaesser, Goldberg, e Allis, 2010).

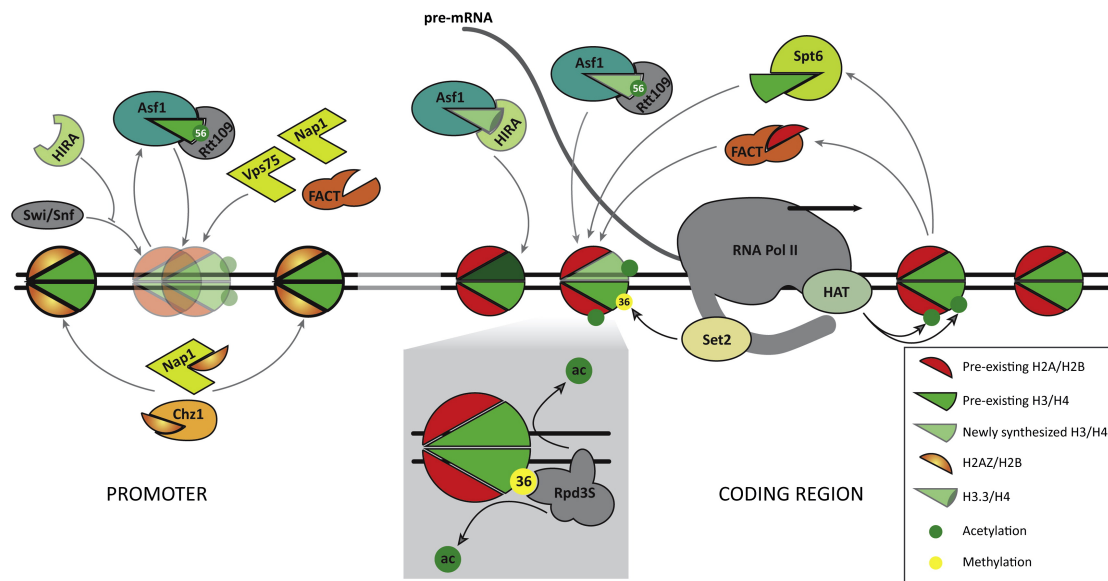


Figura 12 - Substituição do dímero H3/H4 durante a transcrição. chaperon ASF1 é responsável pela acetilação da histona H3, de modo a que ocorra a deslocação do dímero H3/H4, facilitando assim a sua remoção nos passos de transcrição que se seguem. À medida que a RNA polimerase II avança, as histonas deslocadas são recrutadas pela Spt6 e FACT, enquanto que as chaperons ASF1 e HIRA são responsáveis pela deposição de H3.1 e H3.3 no DNA recém-sintetizado. Posteriormente, as mesmas chaperons permitem que os nucleossomas a jusante sejam novamente montados após a passagem da RNA polimerase II e, em alguns casos, promovem a remoção das PTM .(adaptado de: Avvakumov et al., 2011)

2 - Desenvolvimento

2.1 – Variante H3.3 Associada a Genes Ativamente Transcritos

É durante o processo de replicação de DNA que as histonas se ligam para formar cromatina (Elsaesser et al., 2010); A maioria das histonas são produzidas pela célula em grandes quantidades durante a fase S, embora haja algumas variantes que são sintetizadas em qualquer fase do ciclo celular (Adkins et al., 2007). A variabilidade das histonas incorporadas desempenha um papel importante na regulação da transcrição, podendo não só levar à ativação de genes, mas também ao seu silenciamento (Ausió, 2006). A variante H3.3 associada à histona H4 substituem o tetrâmero H3/H4 quando este é perdido, num processo independente de replicação (Weber e Henikoff, 2014).

No caso específico da variante H3.3, muitos têm sido os estudos relativamente ao seu papel na transcrição de genes. Esta variante da histona H3 encontra-se maioritariamente associada a nucleossomas menos estáveis e a regiões de transcrição ativa (Chow et al., 2005). Tal pode ser observado na figura 13, na qual está representado um gráfico, que resultou de uma investigação, cujo objetivo era verificar-se que a variante H3.3 se encontra em maior quantidade em zonas de genes transcritionalmente ativos. Após o ensaio de ChIP, (imunoprecipitação de cromatina) verificou-se que os picos de maior concentração da H3.3 ocorrem nas zonas onde se encontravam os promotores dos genes e também numa zona de recrutamento da RNA polimerase II. Esta investigação permitiu ainda demonstrar que a deposição de H3.3 combinada com a acetilação da cauda amino-terminal da histona H3 e a metilação da cauda amino-terminal da histona H4, forma uma marca persistente em genes ativos para transcrição, mantendo a forma ativa mesmo quando o cromossoma se encontra em metafase ou mesmo quando o gene está localizado numa zona de cromatina inativa (Chow et al., 2005).

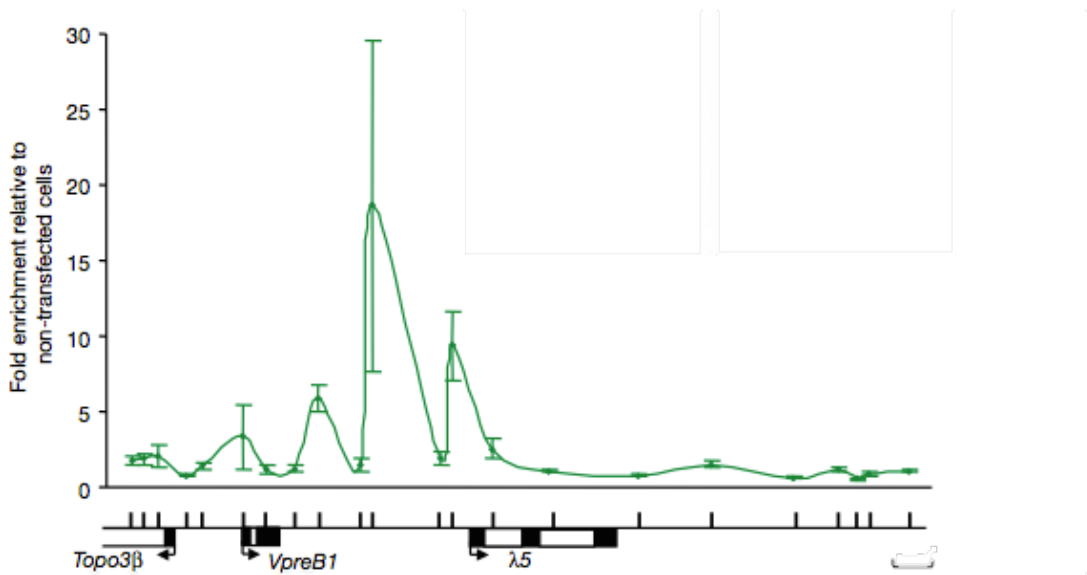


Figura 8 - Padrão de deposição da variante H3.3 nos *locus* de genes ativos. No eixo do x está representado o *locus* contendo os genes ativos VpreB1 e $\lambda 5$ (adaptado de Chow et al., 2005)

Como já referido anteriormente, a variante H3.3 apresenta ligeiras diferenças a nível estrutural da forma canónica H3.1, e os genes que as codificam também se diferenciam em alguns aspetos, figura 14. As formas canónicas das histonas são codificadas por genes repetidos em “tandem”. Estes genes não contém intrões e o cluster HIST1, localizado no cromossoma 6p21, contém seis genes codificantes da histona H1 e 49 genes das histonas centrais, incluindo dez da histona H3. Os mRNAs correspondentes a estes genes não são poliadenilados. O modo como se encontram organizados os genes e a forma de regulação da transcrição destes permite que no início da fase S, ocorra uma grande produção de histonas, garantindo que haja um stock suficiente destas para a sua posterior incorporação na cromatina, durante a replicação (Szenker, Ray-Gallet, e Almouzni, 2011).

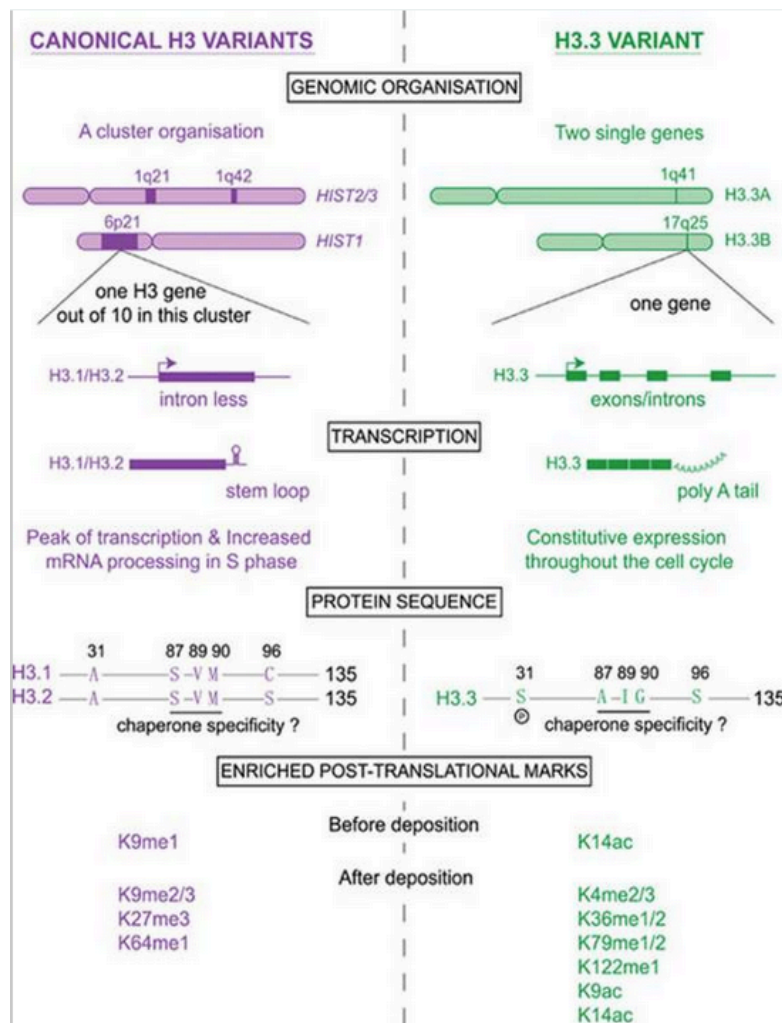


Figura 14 - Comparação entre a variante H3.3 e a sua forma canónica H3.1 e H3.2 ao nível de organização de genes, transcrição, sequência de proteínas e PTM antes e depois da sua incorporação no genoma. (adaptado de : Szenker et al., 2011)

Quanto aos genes da variante H3.3, ao contrário dos genes da forma canónica, podem conter intrões, os mRNA são poliadenilados e são representados apenas por uma cópia ou por várias isoladas ao longo do genoma. Verificou-se que tanto em ratos como em humanos e *Drosophila*, a H3.3 é codificada por dois genes (H3.3A e H3.3B), indicando que é uma proteína altamente conservada, entre diferentes espécies. O dois genes são expressos ao longo de todo o ciclo celular, e por este motivo são classificados como independentes da replicação (Szenker et al., 2011).

A transcrição é facilitada nos nucleossomas que contêm a variante H3.3, pois estes são mais instáveis comparativamente aos que contêm a forma canónica H3.1, figura 15. Assim a energia necessária para mover nucleossomas de genes ativos é menor e as PTM existentes são removidos com maior rapidez (Lin, Conti, e Ramalho-santos, 2013).

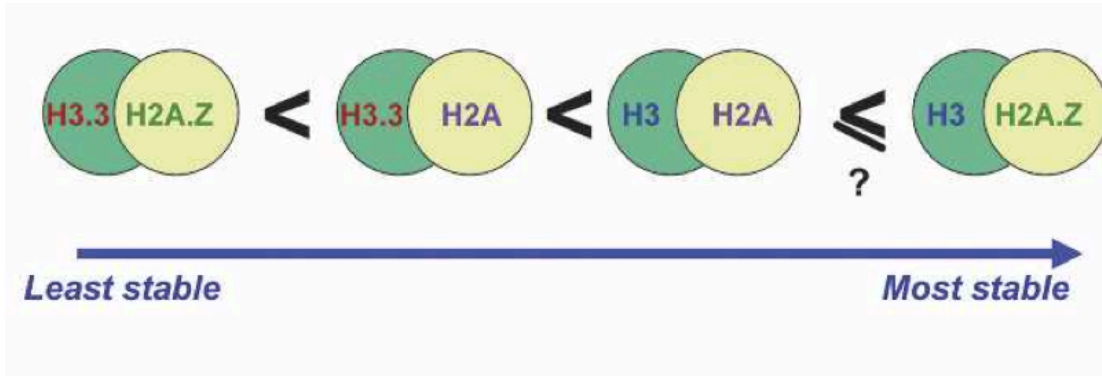


Figura 15 - Esquema representativo da estabilidade relativa dos nucleossomas que contêm diferentes variantes de histonas (adaptado de Placek et al., 2009)

2.2 – Importância da Variante H3.3 na Transcrição do HSV-1

2.2.1 – Infecção por HSV-1

O HSV-1, vírus Herpes Simplex é um α -herpes vírus com dupla cadeia de DNA, infeta uma larga escala de vertebrados e invertebrados, causando infecção lítica na maioria das células epiteliais e infecção latente nas células neuronais do sistema nervoso periférico humano, mais precisamente no nervo trigêmeo. (Bloom, Giordani, e Kwiatkowski, 2010; Conn e Schang, 2013; Oh e Fraser, 2008)

Os sinais clínicos mais comuns da infecção por HSV-1 localizam-se na região orofacial, sob forma de erupções cutâneas com vesículas, conhecidos como o herpes labial e queratite. Estes sinais desaparecem, mas o vírus mantém-se no estado latente dentro das células, voltando ao estado ativo em virtude de estímulos como: exposição prolongada à luz solar, estados febris, *stresses* físico ou emocional, supressão do sistema imunitário e ingestão de certos alimentos ou medicamentos. (Bloom et al., 2010)

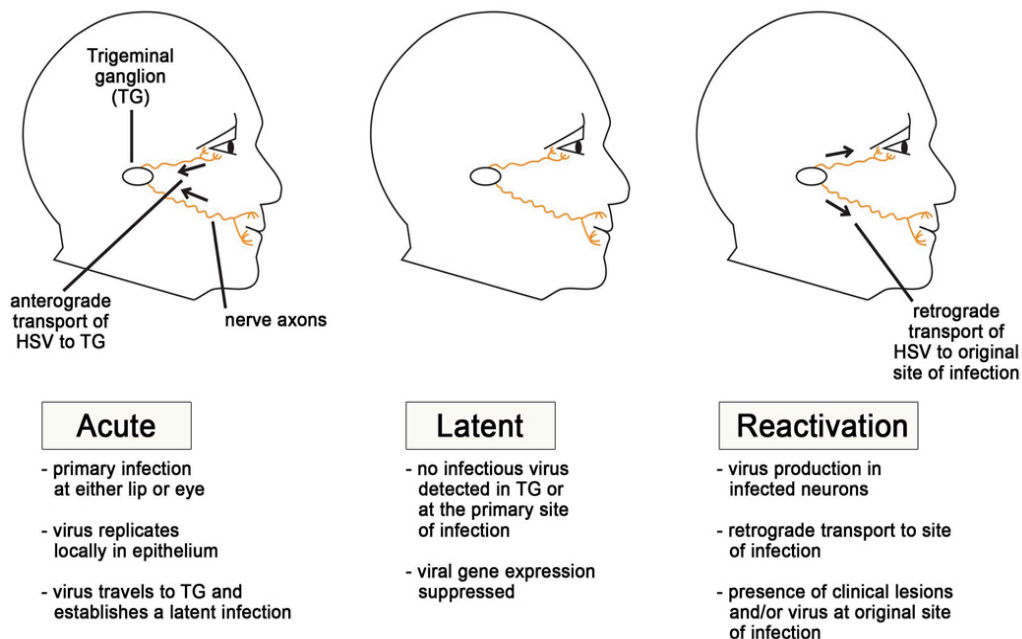


Figura 16 – Os três estágios da infecção por HSV-1. (adaptado de : Bloom et al., 2010)

A transmissão do HSV-1, de indivíduo para indivíduo, ocorre por contato direto com as secreções libertadas pelas vesículas. Conforme representado na figura 16, a

infecção primária consiste na entrada das partículas virais para as células epiteliais da mucosa do hospedeiro onde se vai replicar. De seguida, são transportadas ao longo dos neurónios sensoriais, que inervam o local onde se deu a infecção, até ao gânglio trigémio, onde pode estabelecer latência por toda a vida do hospedeiro. Durante a latência, o vírus não é detetado e a sua replicação está inativa.. A sua reativação surge quando existe um estímulo, ocorrendo o transporte das partículas virais para o local da infecção, através dos axónios, manifestando-se através dos sinais clínicos acima descritos (Bloom et al., 2010).

2.2.2 – Expressão de Genes

Durante a infecção lítica, a expressão dos genes do vírus é controlada epigeneticamente por fatores e co-ativadores de transcrição específicos do vírus e do hospedeiro (Oh e Fraser, 2008). É no núcleo do hospedeiro que o genoma viral é transcrito, replicado e sofre encapsulação (Conn e Schang, 2013). Deste modo, a dinâmica da cromatina é importante nos processos que requerem o acesso ao DNA celular, como é o caso da regulação da expressão dos genes virais.

Geralmente, as células infetadas tentam combater as infecções, promovendo a repressão dos genes infecciosos, através da mobilização de histonas à distância. No entanto, os vírus evoluíram adaptando-se à resposta imune do hospedeiro, utilizando essas mesmas histonas para seu próprio usufruto, na ativação da transcrição dos seus genes (Conn e Schang, 2013).

O genoma do HSV-1 não contém histonas, entra no núcleo celular ligado a moléculas de espermina que, posteriormente são substituídas pelas histonas do hospedeiro (Conn, Hendzel, e Schang, 2013), figura 17. Estudos em que as metodologias de Mnase e ChIP foram utilizadas indicam que o genoma do HSV-1 permanece predominantemente ligado a nucleossomas durante a fase latente e lítica da infecção (Oh e Fraser, 2008). A síntese de histonas é inibida durante a infecção, logo estas são trocadas entre o genoma do hospedeiro e do HSV-1 imediatamente após a infecção (Conn et al., 2013). Apesar de ainda ser desconhecido o significado real desta mobilização de histonas, esta parece proporcionar a fonte de ligação da cromatina viral aos nucleossomas do hospedeiro (Conn et al., 2013), pois as histonas necessárias para a incorporação do HSV-1 estão na cromatina celular.

Dentro da cápside, o genoma do HSV-1 é não-nucleossomal, mas logo após a infecção ele é montado na cromatina. A fase inicial da infecção é bastante dinâmica, envolvendo uma complexa interação entre os fatores reguladores do hospedeiro e do vírus, determinando a progressão da infecção (Jesse H. Arbuckle, 2014).

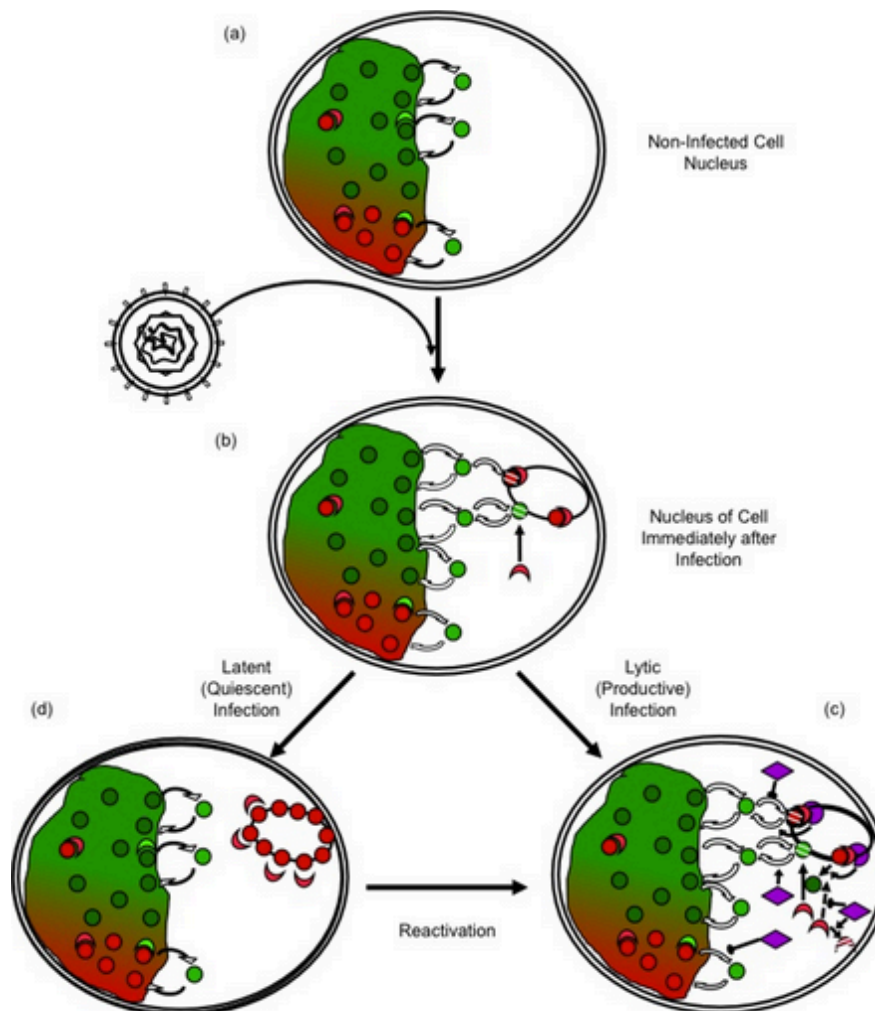


Figura 17 - Regulação da expressão de genes HSV-1. As histonas (círculos verdes e vermelhos) encontram-se no núcleo da célula não infectada. Fisiologicamente, durante a transcrição desvinculam-se da cromatina e ligam-se às suas respectivas chaperons, marcando estados de transcrição ativa (verde) e inativa (vermelho), em diferentes tempos. Enzimas modificadoras de histonas alteram a afinidade das histonas com a cromatina, DNA e outras proteínas. (b) Imediatamente, após a entrada do genoma de HSV-1 na célula, este é montado na heterocromatina (vermelho). (c) Durante a infecção lítica, as proteínas de ativação do HSV-1 (roxo) mobilizam as histonas para o genoma viral, de modo a alterar PTM para o estado ativo e assim são recrutadas as proteínas necessárias para a ativação da transcrição. (d) Após a transcrição dos genes virais e a replicação dos genomas, a infecção torna-se latente, através dos mesmos processos de inativação. A infecção pode assim alterar entre o estado latente e lítico. (adaptado de Conn e Schang, 2013)

Imediatamente após a infecção de uma célula, os nucleossomas que são montados sobre o genoma viral exibem marcas de histonas repressivas, características da heterocromatina (histona H3- lisinas 9 e 27 metiladas) (Jesse H. Arbuckle, 2014).

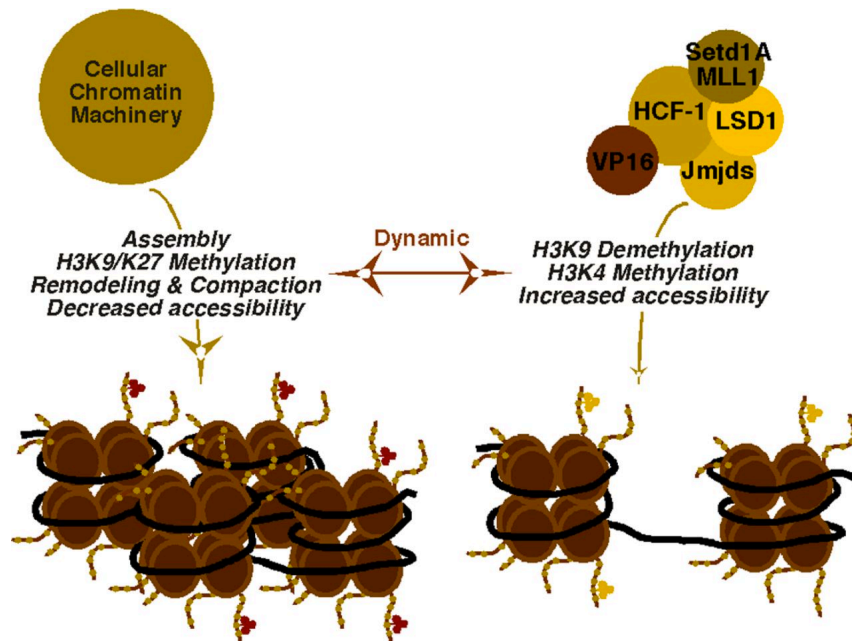


Figura 18 - Repressão e ativação do HSV-1 através da modulação da cromatina por PTM (adaptado de : Jesse H. Arbuckle, 2014)

Esta resposta antiviral, mediada pelas células do hospedeiro, é contornada pelos fatores de transcrição do vírus (VP16) e pelos da própria célula (por exemplo: GABP, SP1, Oct-1), que reconhecem os domínios ‘TAATGARAT’ presentes no promotor imediato (IE) do vírus. Estes fatores recrutam um complexo celular ativador, que contém HCF-1 juntamente com duas dimetilases da histona H3K9 (proteínas LSD1 e JMJD2) e uma metiltransferase da histona H3K9 (Setd1 A ou MLL1), figura 18. Assim, este complexo contém os fatores necessários para remover a marca repressiva H3K9 metilada e instala marcas de ativação H3K4- metilada nos promotores do IE (Jesse H. Arbuckle, 2014).

Após a remoção da marcas repressivas nos genes IE (genes imediatos), duas proteínas codificadas por estes genes , ICP4 e ICP0, vão ativar a transcrição dos genes E (precoces) e L (tardios). Apesar de não estarem totalmente confirmados os mecanismos pelos quais estas proteínas ativam a transcrição, sabe-se que não necessitam de ligação às sequências específicas do DNA. Os principais ativadores da transcrição do HSV-1,

VP16, ICP0 e ICP4 são assim capazes de induzir, indiretamente, modificações na cromatina (Conn e Schang, 2013).

Tal como nas células sãs, também nas células infetadas as modificações na cromatina alteram a estabilidade dos nucleossomas. Uma das modificações que pode ocorrer é a incorporação de variantes de histonas nos nucleossomas, como a H3.3. Apesar de serem ambas mobilizadas durante a infeção, a variante H3.3 é preferencialmente montada na cromatina viral logo após a célula ser infetada, ao passo que a montagem com H3.1 ocorre após o início da replicação do DNA viral (Conn et al., 2013; Conn e Schang, 2013). As chaperons responsáveis pela incorporação fisiológica de H3.3 na cromatina celular são HIRA, hDaxx e DEK, destas três HIRA e hDaxx participam na montagem desta histona variante no genoma viral (Conn e Schang, 2013). Deste modo, a diminuição de HIRA afeta negativamente a transcrição do vírus.

2.2.3 – Mobilização de H3.1 e H3.3 Durante a Infeção

A variante H3.3 está associada a regiões ativamente transcritas do genoma. E, por sua vez, a ativação da transcrição conduz à substituição da H3.1 pela H3.3, levando a uma maior taxa de transcrição dos genes. O padrão de deposição da H3.3 está correlacionado com muitos locais que simultaneamente estão ligados à RNA polimerase II e com PTM das histonas associadas a genes ativos, como a acetilação da H3. Através da troca de H3.1 pela sua variante H3.3, o estado de transcrição da cromatina pode ser alterado, pois a variante H3.3 é enriquecida em PTM correlacionados com cromatina ativa, ao contrário da H3 canónica que esta relacionada com estados de cromatina repressiva. (Conn et al., 2013).

Pela primeira vez, Placek (2008) demonstraram que a incorporação de H3.3 no genoma do HSV-1 resulta numa maior taxa de genes transcritos. Esta investigação baseou-se numa associação diferencial de H3.1 e H3.3 de células HeLa com o genoma de HSV-1. Através do método que utiliza PCR em tempo real verificou-se que H3.3 é adicionada em grandes quantidades ao promotor viral e com bastante rapidez (1h após a infeção) e os seus níveis permanecem constantes ao longo do tempo. Em relação à H3.1, é incorporada em pequenas quantidade no genoma viral, 1 a 3 horas após a infeção, aumentando os seus níveis entre as 6h e 10h, estando esse aumento provavelmente relacionado com o processo de replicação viral. Os níveis de incorporação foram

medidos nos promotores dos genes de HSV-1, como ICP4,tK e VP16, e os resultados obtidos estão representados na figura 19.

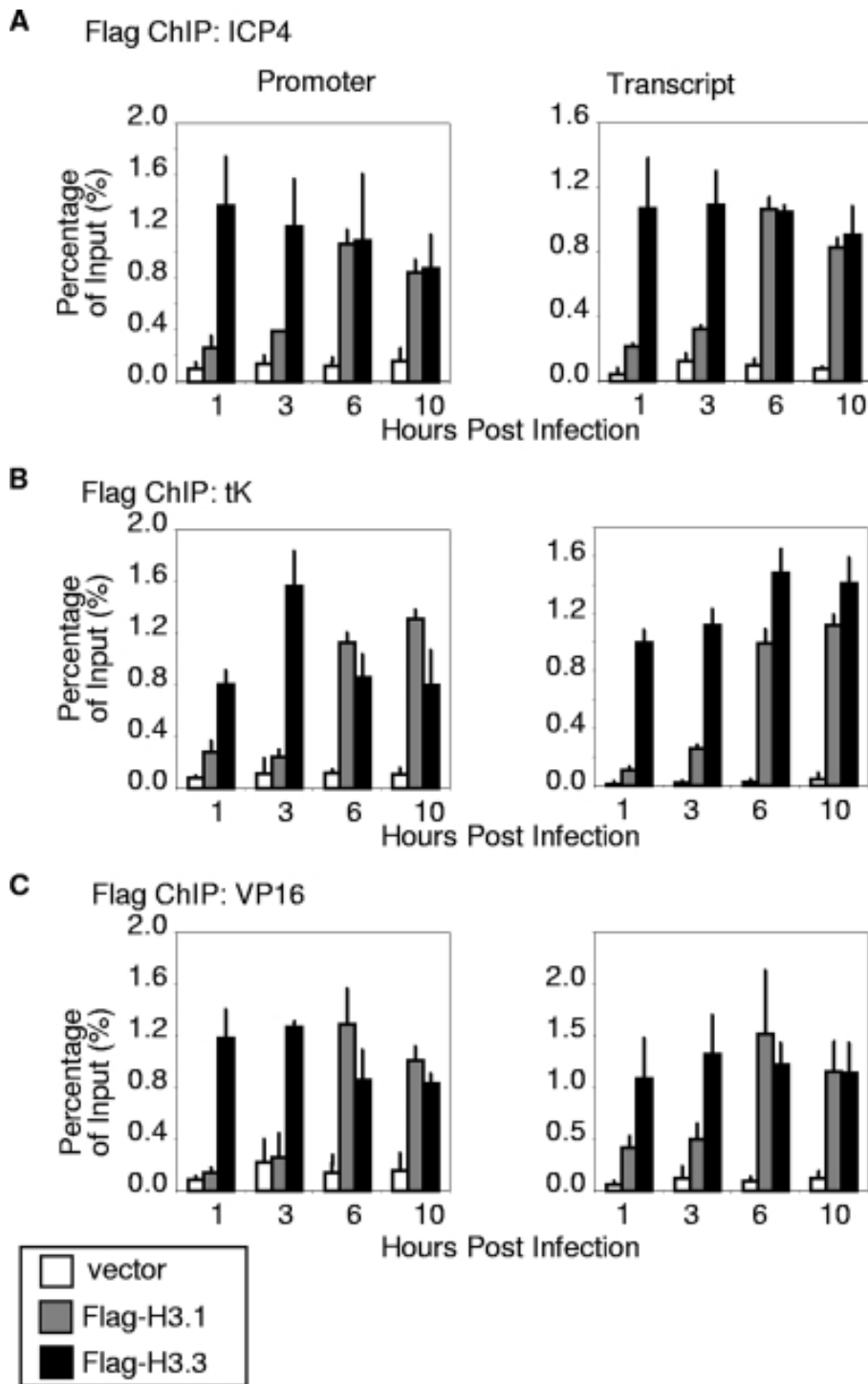


Figura 19- Níveis de incorporação de H3.1 e H3.3 nos promotores e genes de transcrição do HSV-1 (adaptado de :Placek et al., 2009)

Para verificar se a incorporação das diferentes histonas H3 influencia de facto a taxa de transcrição foram feitos ensaios em que se quantificou por PCR a quantidade de RNA resultante da transcrição dos genes virais ICP4,TK,VP16, em células com e sem a chaperon HIRA, responsável pela incorporação de H3.3. Os resultados obtidos (figura 20), revelaram uma diminuição, de duas a quatro vezes na transcrição nos genes analisados nas células sem HIRA. Deste modo, os resultados obtidos comprovam a importância da H3.3 na transcrição dos genes do HSV-1 (Placek et al., 2009)

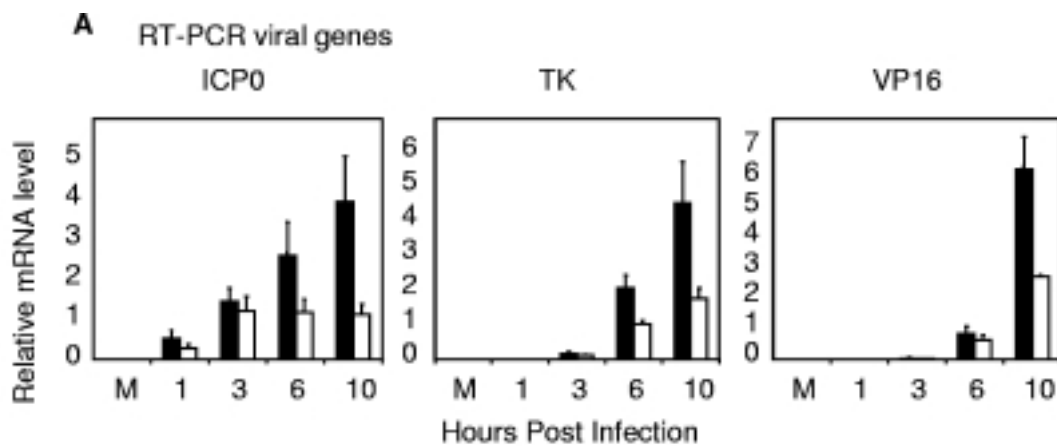


Figura 20 - Transcrição dos genes de HSV-1 em mRNA despromovido de HIRA (adaptado de :Placek et al., 2009)

Placek e a sua equipa (2008) foram assim, os primeiros a demonstrar que o HSV-1 se associa a uma histona variante, H3.3, como mecanismo de regulação para a transcrição do genoma viral.

Estes resultados permitem pensar que uma estratégia para silenciar genomas virais pode passar por diminuir a quantidade de H3.3 disponível para a ligação no genoma viral, já que esta diminuição afeta a descompactação da cromatina e a incorporação do DNA viral na cromatina do hospedeiro (Conn e Schang, 2013).

2.3 - Função da Variante H3.3 Durante o Desenvolvimento e Reprodução

Como já foi referido anteriormente, a variante H3.3 está associada à transcrição ativa de genes. Recentemente, vários estudos concluíram que esta variante também se acumula em *loci* silenciosos de heterocromatina pericêntrica e em telómeros (figura 21). Tal como na cromatina ativa (eucromatina), onde também se observou um enriquecimento de H3.3 em genes ativos,. (Snyers et al., 2014; Szenker et al., 2011).

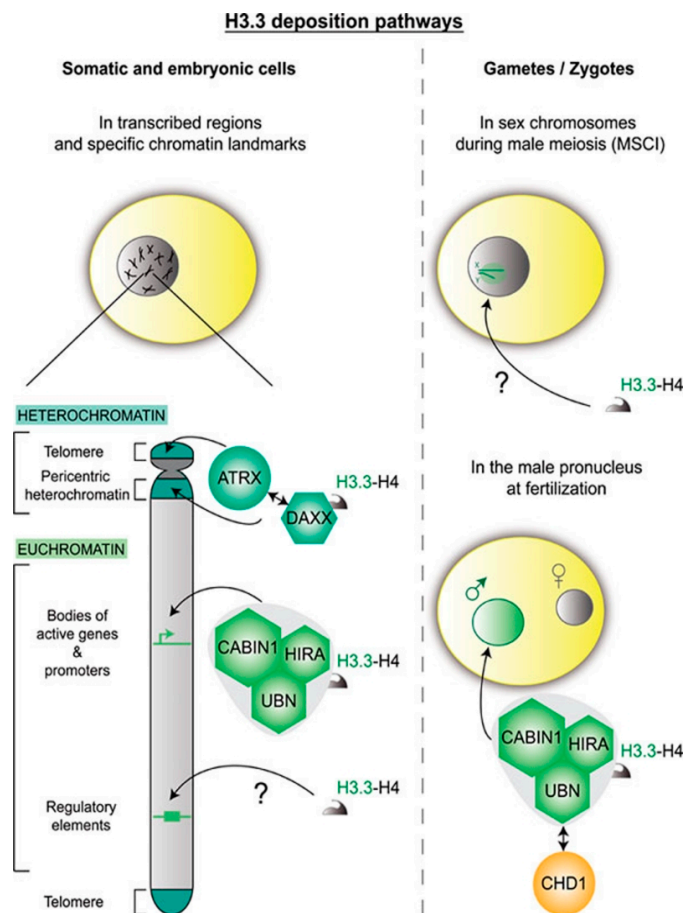


Figura 21 -Zonas enriquecidas com H3.3 e complexos que promovem a sua deposição. Esquerda: Em células somáticas de rato e células embrionárias, zonas específicas da cromatinas estão enriquecidas em H3.3. Na heterocromatina, o complexo DAXX/ATRX coopera na acumulação de H3.3 em zonas pericêntricas e teloméricas. Na eucromatina, o complexo HIRA medeia a acumulação de H3.3 nos promotores dos genes transcritos. DIREITA: Nos gâmetas, os cromossomas sexuais masculinos são enriquecidos em H3.3 durante a meiose. Nos zigotos, a H3.3 é inserida no pró-núcleo masculino, durante a fertilização, através dos complexos HIRA/CHD1. (adaptado de: Szenker et al., 2011)

Enquanto que nas regiões de eucromatina a chaperon responsável pela incorporação da H3.3 é a HIRA, nas regiões de heterocromatina pericêntrica e telomérica esta é mediada pelo complexo DAXX/ATRX (Yuen e Knoepfler, 2013).

Apesar da ligação da H3.3 a zonas ativamente transcritas, muito se tem debatido se esta é um pré-requisito ou uma consequência da transcrição, podendo ser necessária para a manutenção da cromatina em transcrição ou apenas se tratar de um mecanismo geral de substituição em casos de perdas de histonas (Snyers et al., 2014).

Descobertas recentes sugerem que a função da H3.3 não passa apenas por manter a expressão de um gene. Durante a embriogénese a dimetilação do DNA e regulação dinâmica das marcas das histonas são fatores essenciais. A H3.3 é transmitida via vertical, através dos dois genes que a codificam, sendo distribuída durante a oogénese e nas fases de fertilização e clivagem quando ocorre a formação do blastócisto. A expressão de uma forma mutante do gene que codifica a H3.3 provoca anomalias no desenvolvimento do blastócisto (Lin et al., 2013).

Vários estudos já demonstraram que a perda de H3.3 é compatível com a viabilidade, no entanto tornou-se claro que esta variante é necessária durante a embriogénese, estando presente em genes associados ao desenvolvimento. É cada vez mais frequente associar mutações da variante H3.3 a cancros malignos, pois a desregulação da sua incorporação na cromatina está relacionada com mecanismos patogénicos (Snyers et al., 2014).

O glioblastoma pediátrico, representa uma dessas doenças, que resulta de mutações específicas num dos genes que codifica a H3.3. (Bjerke et al., 2013). A mutação ocorre no gene H3F3A, nas regiões de PTMs. A metilação pós-traducional das histonas H3.3 de genes silenciados, e a acetilação no K27 nas caudas de H3.3 presentes em diferentes promotores e potenciadores de transcrição ativa são impedidas devido à troca do aminoácido lisina por metionina na posição 27 das caudas da histona H3.3 causando a mutação K27M (Gielen et al., 2013); ou através da troca de glicina por arginina ou valina, na posição 34 causando a mutação G34R/V (Venneti et al., 2014).

Estas alterações na H3.3 vão fazer com que as modificações associadas ao silenciamento ou ativação dos genes não sejam as corretas interferindo assim no estado de ativação de inúmeros genes associados a este tipo de cancro.

3 - Conclusão

Os estudos de epigenética tem demonstrado, ao longo do anos, muitas evidências de que as modificações nas histonas, que compõem o genoma celular, têm um papel ativo na regulação de processos como a transcrição.

A substituição das histonas canônicas por variantes sujeitas a PTM específicas levou os investigadores a considerar a existência de um “código de histonas”. Este código permite que a expressão dos genes seja controlada e que as características epigenéticas sejam transmitidas e conservadas ao longo de gerações.

A histona H3 tem sido bastante estudada, devido há existência da sua variante H3.3. Esta variante encontra-se integrada preferencialmente em zonas onde os genes estão a ser transcritos .

Após esta revisão bibliográfica foi possível verificar a importância da variante H3.3 na regulação da transcrição dos genes das células normais e também dos genes virais em células infectadas por HSV-1 . Mutações nos genes que codificam a H3.3 estão associados a patologias como é o caso do glioblastoma pediátrico.

4 - Bibliografia

- Adkins, M. W., Carson, J. J., English, C. M., Ramey, C. J., e Tyler, J. K. (2007). The histone chaperone anti-silencing function 1 stimulates the acetylation of newly synthesized histone H3 in S-phase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1334–1340. doi:10.1074/jbc.M608025200
- Ausió, J. (2006). Histone variants-the structure behind the function. *Briefings in Functional Genomics e Proteomics*, 5(3), 228–243. doi:10.1093/bfpgp/ell020
- Avvakumov, N., Nourani, A., e Côté, J. (2011). Histone chaperones: modulators of chromatin marks. *Molecular Cell*, 41(5), 502–514. doi:10.1016/j.molcel.2011.02.013
- Bannister, A. J., e Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381–395. doi:10.1038/cr.2011.22
- Bell, O., Tiwari, V. K., Thomä, N. H., e Schübeler, D. (2011). Determinants and dynamics of genome accessibility. *Nature Reviews. Genetics*, 12(8), 554–564. doi:10.1038/nrg3017
- Berger, S. L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, 447(7143), 407–412. doi:10.1038/nature05915
- Bhasin, M., Reinherz, E. L., e Reche, P. A. (2006). Recognition and Classification of Histones Using. *Journal of Computational Biology*, 13(1), 102–112.
- Bjerke, L., Mackay, A., Nandhabalan, M., Burford, A., Jury, A., Popov, S., ... Jones, C. (2013). Histone H3.3 Mutations Drive Pediatric Glioblastoma through Upregulation of MYCN. *Cancer Discovery*, 512–519. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0426
- Bloom, D. C., Giordani, N. V., e Kwiatkowski, D. L. (2010). Epigenetic regulation of latent HSV-1 gene expression. *Biochim Biophys Acta*, 1799(3-4), 246–256. doi:10.1016/j.bbagr.2009.12.001

- Campbell, R. M., e Tummino, P. J. (2014). Cancer epigenetics drug discovery and development: the challenge of hitting the mark. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(1), 64–69. doi:10.1172/JCI71605.64
- Chow, C.-M., Georgiou, A., Szutorisz, H., Maia e Silva, A., Pombo, A., Barahona, I., ... Dillon, N. (2005). Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Reports*, 6(4), 354–60. doi:10.1038/sj.embor.7400366
- Conn, K. L., Hendzel, M. J., e Schang, L. M. (2013). The differential mobilization of histones H3.1 and H3.3 by herpes simplex virus 1 relates histone dynamics to the assembly of viral chromatin. *PLoS Pathog*, 9(10). doi:10.1371/journal.ppat.1003695
- Conn, K. L., e Schang, L. M. (2013). Chromatin dynamics during lytic infection with herpes simplex virus 1. *Viruses*, 5(7), 1758–1786. doi:10.3390/v5071758
- Elsaesser, S. J., Goldberg, A. D., e Allis, C. D. (2010). New functions for an old variant: no substitute for histone H3.3. *Current Opinion in Genetics e Development*, 20(2), 110–117. doi:10.1016/j.gde.2010.01.003
- Figueiredo, L. M., Cross, G. A. M., e Janzen, C. J. (2009). Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 504–513. doi:10.1038/nrmicro2149
- Frouws, T. D., Patterton, H.-G., e Sewell, B. T. (2009). Histone octamer helical tubes suggest that an internucleosomal four-helix bundle stabilizes the chromatin fiber. *Biophysical Journal*, 96(8), 3363–3371. doi:10.1016/j.bpj.2008.10.075
- Gielen, G. H., Gessi, M., Hammes, J., Kramm, C. M., Waha, A., e Pietsch, T. (2013). H3F3A K27M mutation in pediatric CNS tumors: a marker for diffuse high-grade astrocytomas. *American Journal of Clinical Pathology*, 139(3), 345–349. doi:10.1309/AJCPABOHBC33FVMO

- Hake, S. B., e Allis, C. D. (2006). Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the “H3 barcode hypothesis”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), 6428–6435. doi:10.1073/pnas.0600803103
- Henikoff, S. (2008). Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nature Publishing Group*, 9(1), 15–26. doi:10.1038/nrg2206
- Jaenisch, R., e Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression : how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics Supplement*, 33, 245–254. doi:10.1038/ng1089
- Jansen, A., e Verstrepen, K. J. (2011). Nucleosome Positioning in *Saccharomyces cerevisiae*. *American Society for Microbiology*, 75(2), 301–320. doi:10.1128/MMBR.00046-10
- Jesse H. Arbuckle, T. M. K. (2014). Epigenetic Repression of Herpes Simplex Virus Infection by the Nucleosome Remodeler CHD3. *Journals ASM*, 5(1). doi:10.1128/mBio.01027-13
- Kent, J. R., Zeng, P., Atanasiu, D., Gardner, J., Fraser, N. W., e Berger, S. L. (2004). During Lytic Infection Herpes Simplex Virus Type 1 Is Associated with Histones Bearing Modifications That Correlate with Active Transcription During Lytic Infection Herpes Simplex Virus Type 1 Is Associated with Histones Bearing Modifications That Correlate. *Journal of Virology*, 78(18), 10178–10186. doi:10.1128/JVI.78.18.10178
- Kim, Y. Z. (2014). Altered Histone Modifications in Gliomas. *Brain Tumor Res Treat*, 2(1), 7–21. Disponível em <http://synapse.koreamed.org/DOIX.php?id=10.14791/btrt.2014.2.1.7>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005

- Kulaeva, O. I., Gaykalova, D., e Studitsky, V. M. (2008). Transcription Through Chromatin by RNA polymerase II: Histone Displacement and Exchange. *National Institutes of Health*, 618, 116–129.
- Leonardo Mariño-Ramírez, Maricel G Kann, Benjamin A Shoemaker, and D. L. (2005). Histone structure and nucleosome stability, 2(5), 719–729.
- Lin, C., Conti, M., e Ramalho-santos, M. (2013). Histone variant H3 . 3 maintains a decondensed chromatin state essential for mouse preimplantation development, 140(17), 3624–3634. doi:10.1242/dev.095513
- Luger, K. (2001). Nucleosomes: Structure and Function. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group. Disponível em www.els.net
- Maze, I., Noh, K.-M., Soshnev, A. A., e Allis, C. D. (2014). Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nat Rev Genet*, 15(4), 259–271. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3673>
- Mellor, J. (2006). Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends in Genetics : TIG*, 22(6), 320–329. doi:10.1016/j.tig.2006.03.008
- Nevels, M., Nitzsche, A., e Paulus, C. (2011). How to control an infectious bead string: nucleosome-based regulation and targeting of herpesvirus chromatin. *Reviews in Medical Virology*, 21(3), 154–180. doi:10.1002/rmv.690
- Oh, J., e Fraser, N. W. (2008). Temporal association of the herpes simplex virus genome with histone proteins during a lytic infection. *Journal of Virology*, 82(7), 3530–3537. doi:10.1128/JVI.00586-07
- Placek, B. J., Huang, J., Kent, J. R., Dorsey, J., Rice, L., Fraser, N. W., e Berger, S. L. (2009). The histone variant H3.3 regulates gene expression during lytic infection with herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology*, 83(3), 1416–1421. doi:10.1128/JVI.01276-08
- Saha, A., Wittmeyer, J., e Cairns, B. R. (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(6), 437–347. doi:10.1038/nrm1945

- Snyers, L., Zupkovitz, G., Almeder, M., Fliesser, M., Stoisser, A., Weipoltshammer, K., e Schöfer, C. (2014). Distinct chromatin signature of histone H3 variant H3 . 3 in human cells. *Nucleus*, 5(5), 449–461.
- Szenker, E., Ray-Gallet, D., e Almouzni, G. (2011). The double face of the histone variant H3.3. *Cell Research*, 21(3), 421–434. doi:10.1038/cr.2011.14
- Tachiwana, H., Osakabe, A., Shiga, T., Miya, Y., Kimura, H., Kagawa, W., e Kurumizaka, H. (2011). Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 67(Pt 6), 578–583. doi:10.1107/S0907444911014818
- Venneti, S., Santi, M., Felicella, M. M., Yarilin, D., Phillips, J. J., Sullivan, L. M., ... Judkins, A. R. (2014). A sensitive and specific histopathologic prognostic marker for H3F3A K27M mutant pediatric glioblastomas. *Acta Neuropathologica*, 128, 743–753. doi:10.1007/s00401-014-1338-3
- Weber, C. M., e Henikoff, S. (2014). Histone variants : dynamic punctuation in transcription. *Genes e Development*, 28(7), 672–682. doi:10.1101/gad.238873.114
- Winter, D. R., e Amit, I. (2014). The role of chromatin dynamics in immune cell development. *Immunological Reviews*, 261(1), 9–22. doi:10.1111/imr.12200
- Yuen, B. T. K., e Knoepfler, P. S. (2013). Histone H3.3 Mutations: A Variant Path to Cancer. *Cancer Cell*, 24(5), 567–574. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2013.09.015