



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas
Centro de Ciencias Genómicas

Contribución al estudio proteómico de la acetilación en residuos de lisina y del papel de la desacetilasa SIRT1 en células humanas.

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:
JEOVANIS GIL VALDÉS**

TUTOR PRINCIPAL: DR. SERGIO MANUEL ENCARNACIÓN GUEVARA
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS, NOVIEMBRE DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos formales

Agradezco al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (PDCB-UNAM) por permitirme cursar estudios de doctorado en ciencias biomédicas en esta prestigiosa institución.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para mis estudios doctorales y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrados (PAEP) por su apoyo para la asistencia a congresos.

Agradezco al Tutor principal, Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara por la asesoría, el apoyo, la confianza y soporte total a este proyecto de doctorado y hacia mi persona.

Agradezco al Comité tutor, Dra. Marcela Lizano Soberón y Dr. Alejandro Manuel García Carrancá por la fructífera asesoría brindada durante el desarrollo del proyecto de doctorado.

Agradezco al Centro de Ciencias Genómicas (CCG-UNAM) y sus miembros por aportar la infraestructura, la base y el ambiente científico para desarrollar investigación científica de la más alta calidad.

Muchas Gracias.

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
2. Marco teórico	7
2.1. Acetilación en residuos de lisina.....	7
2.2. Enzimas que controlan la acetilación.....	8
2.2.1. Lisina acetiltransferasas.....	8
2.2.2. Lisina desacetilasas.....	10
2.3. Acetilación en residuos de lisina no mediada por enzimas.....	12
2.4. Proteínas que interactúan con residuos de acetyl-lisina.....	13
2.5. Proteínas blancas de la acetilación en residuos de lisina.....	14
2.5.1. Sitios de acetilación.....	16
2.5.2. Interacción entre acetilación y otras modificaciones postraduccionales.....	17
2.6. Proteómica y acetilómica.....	17
Hipótesis.....	24
3. Objetivos.....	25
4. Materiales y métodos.....	26
4.1. Materiales.....	26
4.2. Síntesis de N-acetoxi-succinimida (NAS).....	26
4.3. Cultivo de células.....	26
4.4. Extracción de ARN y PCR cuantitativa de tiempo real (RT-qPCR).....	27
4.5. Extracción de proteínas.....	27
4.6. Preparación de muestras en Solución (SSP).....	28
4.7. Preparación de muestras en Gel (GSP).....	28
4.8. Preparación de muestras en Filtros (FASP).....	29
4.9. Fraccionamiento de péptidos.....	29
4.10. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	30
4.11. Identificación/cuantificación de péptidos/proteínas y análisis bioinformático.....	30
5. Resultados.....	32
5.1. Estrategia general.....	32
5.2. Desarrollo de la metodología.....	34
5.3. Análisis comparativo entre los métodos de preparación de muestra.....	39
5.4. Identificación y estequiometría de péptidos y proteínas acetiladas.....	42
5.5. Dinámica de la acetilación en residuos de lisina.....	46
5.6. Proteómica cuantitativa y acetilómica.....	50
5.7. Análisis proteómico y acetilómico en células tratadas con un inhibidor de SIRT1.....	52
5.8. La inhibición de SIRT1 promueve la síntesis y procesamiento del pre-ARNr.....	57
6. Discusión.....	64
7. Conclusiones.....	69
8. Recomendaciones.....	71
9. Bibliografía.....	72
10. Anexos.....	77

Resumen

La acetilación en residuos de lisina es una modificación postraducciona que afecta a un gran número de proteínas y rutas biológicas. Estudios recientes indican que la acetilación es fundamentalmente una modificación que se presenta en baja estequiometría. En este trabajo hemos desarrollado una metodología para determinar con alta precisión la estequiometría de la acetilación a nivel de proteoma. Esta estrategia incluye la acetilación química de todos los grupos aminos épsilon en residuos de lisina, que se encuentren libre. La reacción se realiza para incorporar un grupo acetilo marcado con isotopos pesados estables que sea diferenciable de la acetilación endógena, con la composición natural de isotopos. Las proteínas extensivamente acetiladas son tratadas con tripsina y los péptidos generados sometidos a un análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. La diferencia en las intensidades entre las distribuciones isotópicas pesada y ligera de los péptidos que contienen residuos de lisina en el espectro MS, son usadas para calcular el grado de ocupación de la acetilación endógena, con respecto a los residuos que se encontraban libres en la célula.

Durante el desarrollo del método se evaluaron tres procedimientos para preparar las muestras: Preparación de la Muestra Asistido por Filtros, Preparación de la Muestra en Gel y Preparación de la Muestra en Solución (FASP, GSP and SSP por sus siglas en inglés). Durante la reacción de acetilación y digestión con tripsina se incorporaron detergentes. Tres líneas celulares fueron evaluadas en cuanto a la dinámica de acetilación en los residuos de lisina de sus proteínas. Nuestros datos permitieron el análisis conjunto de proteómica cuantitativa y estequiometría de la acetilación. Se identificaron y cuantificaron su grado acetilación aproximadamente 1,500 proteínas en cada línea celular. Se encontró que la acetilación varía su grado de ocupación en presencia de otras modificaciones postraduccionales en residuos cercanos. Se correlacionó la abundancia de la desacetilasa SIRT1 con el grado de acetilación y abundancia de proteínas ribosomales, de la biogénesis de lo ribosomas, del procesamiento del ARNr, entre otras.

Posteriormente, se estudió el papel de SIRT1 en las tres líneas celulares, a través de su inhibición con EX-527 y se aplicó la misma metodología para determinar la dinámica de la acetilación y expresión de las proteínas entre células controles y tratadas. Se confirmó que SIRT1 tiene como blancos y regula negativamente a proteínas de las vías de transcripción y traducción. Adicionalmente, se encontró que SIRT1 regula positivamente varias vías metabólicas.

Abstract

Lysine acetylation is a widespread posttranslational modification (PTM) that targets a large number of biological pathways. Recent studies revealed that lysine acetylation sites mainly exhibit low stoichiometry. Here we developed a methodology to accurately determine lysine acetylation stoichiometry at proteome level. The strategy included an acetylation chemical reaction of free epsilon amino-groups of lysine residues in proteins. This reaction incorporates an acetyl group labeled with heavy stable isotopes, in order to differentiate them from endogenous acetylation. Fully acetylated proteins are subjected to trypsin digestion and generated peptides submitted to LC-MS/MS analysis. The calculation of acetylation occupancy is performed based on isotopic distribution of peptides in the MS spectrum.

We explored three sample preparation procedures during method development: Filter Aided Sample Preparation (FASP), Gel Sample Preparation (GSP) and Solution Sample Preparation (SSP). We incorporated the use of detergents during the chemical acetylation reaction and trypsin digestion. Three human cell lines were evaluated according to the acetylation stoichiometry of lysine residues. Our datasets were useful for label-free quantitative proteomics analysis and we were able to integrate in the same experiment, lysine acetylation stoichiometry and relative protein abundance profiles. We identified and determined the acetylation occupancy in approximately 1,500 proteins from each cell line. Lysine acetylation is highly dynamic; therefore, we determined variations in the acetylation stoichiometry when nearby residues are posttranslationally modified. The stoichiometric analysis, in combination with quantitative proteomics, allowed us to gain a better understanding of the role of this PTM in different cells. We found that higher abundance of the deacetylase SIRT1 correlates with less acetylation occupancy and abundance of ribosomes, as well as proteins involved in ribosome biogenesis, rRNA processing, among others.

We further explored the role of SIRT1, in the three cell lines under study, through its inhibition with EX-527. The same methodology was applied to determine the dynamics in lysine acetylation and protein profiles between control and treated cells with the deacetylase inhibitor. We confirmed the negative role of this deacetylase on transcription and translation pathways. In addition, we found that SIRT1 positively regulates several metabolic pathways.

1. Introducción

Las células de todos los seres vivos transforman sus proteínas con modificaciones postraduccionales (PTMs por sus siglas en inglés). Este mecanismo le permite a las células aumentar el número de especies proteicas sin incrementar el número de secuencias primarias. A través de las PTMs de las proteínas, las células regulan sus funciones y vías metabólicas, además de aumentar la variedad y complejidad de los procesos que realiza. Actualmente se conoce la existencia de más de 200 PTMs que pueden estar presentes en las proteínas. Entre las más ampliamente distribuidas y más comúnmente estudiadas se encuentran la fosforilación, la glicosilación, la ubiquitinación, la metilación, la acetilación entre otros tipos de alquilaciones. Una gran variedad de residuos de aminoácidos son susceptibles de ser modificados postraduccionalmente. Particularmente, el grupo épsilon amino de la cadena lateral de los residuos de lisina es blanco de muchas de estas modificaciones, entre ellas la acetilación. La acetilación de los residuos de lisina fue descubierta hace más de 50 años en las histonas y fue vinculada con la regulación de la transcripción [1].

La acetilación en residuos de lisina es una PTM reversible controlada por dos grupos de enzimas: las lisina acetiltransferasas (KATs por sus siglas en inglés) que transfieren el grupo acetilo proveniente de la acetil-CoA a la cadena lateral de los residuos de lisina en las proteínas; y las lisina desacetilasas (KDACs por sus siglas en inglés) que liberan el grupo amino del grupo acetilo. Estos grupos de enzimas también se les conocen como histona acetiltransferasas e histona desacetilasas por haber sido descritas sus funciones por primera vez para este grupo de proteínas [2]. La familia de las KDACs se dividen en cuatro clases; las clases I, II y IV son dependientes de Zn^{2+} y la clase III, también conocidas como sirtuinas, son dependientes de NAD^+ y además de desacetilasas poseen actividad de mono-ADP-ribosil-transferasa [3–5]. En especial las sirtuinas están involucradas en muchos procesos importantes para las células, por lo que se han visto ligadas a muchos estados fisiológicos y patológicos, tales como la restricción calórica, el envejecimiento y el cáncer [6].

De las siete sirtuinas codificadas en el genoma humano, SIRT1 es la más abundante, la más estudiada y la que tiene mayor similitud con su homólogo sir2 de levadura [7]. La localización sub-celular de SIRT1 es mayormente nuclear y citoplasmática y se ha visto que regula un gran

número de vías en respuesta a factores tanto internos como externos, así como a fases del ciclo celular [8]. SIRT1 se ha visto involucrada en la regulación negativa de la biogénesis de los ribosomas y el procesamiento del ARN ribosomal [9,10]. Adicionalmente, algunas enzimas metabólicas se han identificado como blancos de SIRT1. En cáncer el papel de SIRT1 ha estado relacionado tanto con el desarrollo y progresión tumoral, como con la supresión y retardo [6,7,11]. Las funciones de SIRT1 son mayormente específicas para cada tipo de tumor [12]. SIRT1 se ha encontrado sobre-expresada en varios cánceres tales como de próstata, colon y leucemia mieloide aguda [13–15]. Por otro lado, la oncoproteína Myc es sustrato de SIRT1 y es regulada negativamente afectando la transcripción de sus genes blancos [16].

La acetilación en residuos de lisina se encuentra estrechamente ligada a la regulación de un gran número de vías y procesos biológicos, en todos los compartimientos celulares [17–20]. Esta PTM ha sido más extensamente estudiada en las histonas, donde está relacionada con la activación de la transcripción y remodelación de la cromatina. La acetilación de los extremos de las histonas neutraliza la carga positiva del grupo épsilon amino en las cadenas laterales de estos residuos. Esto altera las interacciones proteína-proteína entre las histonas y con otras proteínas, además de afectar la interacción con las cadenas de ADN cargadas negativamente. Como resultado la cromatina adquiere una conformación más relajada que permite el acceso de la maquinaria de transcripción. Adicionalmente, a través de la acetilación, las histonas interactúan con factores de transcripción, lisina acetiltransferasas y metiltransferasas, entre otras proteínas que contienen bromodominios. Los bromodominios reconocen de forma específica la acetilación y generalmente se encuentran en proteínas que forman parte de complejos multi-proteicos [21]. De forma opuesta la desacetilación de las histonas permite interacciones más fuertes con el ADN, haciendo más compacta la cromatina y dificultando el acceso a la maquinaria de transcripción.

En los últimos años, las fronteras de la acetilación se ha expandido de las histonas y algunos factores transcripcionales, a un gran número de proteínas involucradas en la mayoría de los procesos celulares [17]. Entre las vías y grupos de proteínas que han sido identificadas como blancos de esta modificación, se encuentran reguladores y modificadores de la cromatina, proteínas de reparación del ADN, la biogénesis de los ribosomas, del spliceosoma, la mayoría de las enzimas metabólicas, proteínas ribosomales, del citoesqueleto y fosforilación oxidativa. Muchas proteínas que controlan ésta y otras PTMs también son reguladas por acetilación. Entre

estas podemos encontrar quinasas, fosfatasa, lisina acetiltransferasas y desacetilasas, ubiquitinasa y metiltransferasas. La mayoría de estas proteínas blanco de acetilación están involucradas en el correcto funcionamiento de la célula, de ahí que en la última década esta modificación ha emergido como crucial para la regulación de muchas vías y procesos biológicos. Como consecuencia esta PTM se ha vinculado con varios procesos fisiológicos y patológicos entre los que resalta el envejecimiento y el cáncer [18,22–24]. Varias de las enzimas que regulan la acetilación, las proteínas que interactúan con los blancos y los blancos en cuestión se han reportado como desregulados en cáncer, con implicaciones en el desarrollo de la enfermedad.

La espectrometría de masas es la técnica analítica que nos permite determinar no solo la masa molecular de compuestos sino también inferir su estructura a través de las masas de los fragmentos generados durante el análisis. Actualmente la espectrometría de masas no solo es la técnica de excelencia para identificación y cuantificación de proteínas en estudios de proteómica, sino que es ideal para la identificación de modificaciones postraduccionales, ubicar los sitios blancos y cuantificar sus abundancias. La caracterización de PTMs representa un reto analítico ya que, la mayoría de las modificaciones afectan a pocos residuos, se presentan en baja estequiometría y algunas de estas PTMs provocan baja eficiencia de ionización y espectros de mala calidad, que dificultan su análisis. Adicionalmente, para el análisis de la mayoría de las PTMs, a nivel de proteoma, se requiere de métodos de enriquecimiento específicos para cada PTM.

Particularmente, la acetilación no afecta la calidad del espectro de los iones fragmentos (MS/MS) de los péptidos con esta modificación sin embargo, debido a su baja estequiometría, para un análisis a nivel de proteoma es obligatorio el empleo de un método específico. En 2006 Kim y cols. introdujeron un método basado en el enriquecimiento de péptidos que contengan la modificación para identificar a nivel de proteoma, sitios de acetilación [20]. Con este tipo de estrategia los sitios de acetilación reportados rápidamente se incrementaron hasta más de 35,000 reportados actualmente en el repositorio público PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>).

Las principales limitantes de los métodos basados en enriquecimiento consisten en que, se pierde la información acerca del grado de ocupación de los sitios, el uso de anticuerpos impone un sesgo dado por la especificidad de cada anticuerpo, y se requieren de grandes cantidades de muestra de partida para el paso de enriquecimiento. Recientemente fue publicado un método para determinar

la estequiometría de los sitios de acetilación a nivel de proteoma [25]. El método propone etiquetar todos los residuos de lisina que no han sido modificados endógenamente, con un grupo acetilo marcado con isótopos estables pesados. Esto permite diferenciar y cuantificar el grado de ocupación de la acetilación endógena con respecto a la incorporada artificialmente, a partir del espectro MS, basado en el análisis de la distribución isotópica de cada péptido. Esta estrategia fue aplicada a la estimación de la ocupación por acetilación de los sitios en el proteoma de *E. coli*. Esta misma estrategia fue posteriormente aplicada a células de mamíferos donde se evaluó la dinámica de acetilación tras el empleo de un inhibidor de desacetilasa [26].

2. Marco teórico

2.1. Acetilación en residuos de lisina

La acetilación es una modificación postraduccional que tiene lugar en el grupo épsilon amino de los residuos de lisina en las proteínas y está presente en células de todos los reinos de la vida. Esta PTM neutraliza la carga positiva del grupo épsilon amino a pH fisiológico, por lo que afecta las propiedades del residuo con implicaciones para la función de las proteínas blanco. En células eucariotas la acetilación puede ser transferida a la cadena lateral de la lisina por dos vías, una enzimática por la acción de enzimas acetiltransferasas (Figura 1A) y la otra de forma química (Figura 1B). En ambos casos el agente donador del grupo acetilo es la Acetil Coenzima A, tanto si la reacción es mediada por enzima como si es por vía química. La remoción del grupo acetilo en organismos vivos ocurre exclusivamente por vía enzimática (Figura 1C y 1D).

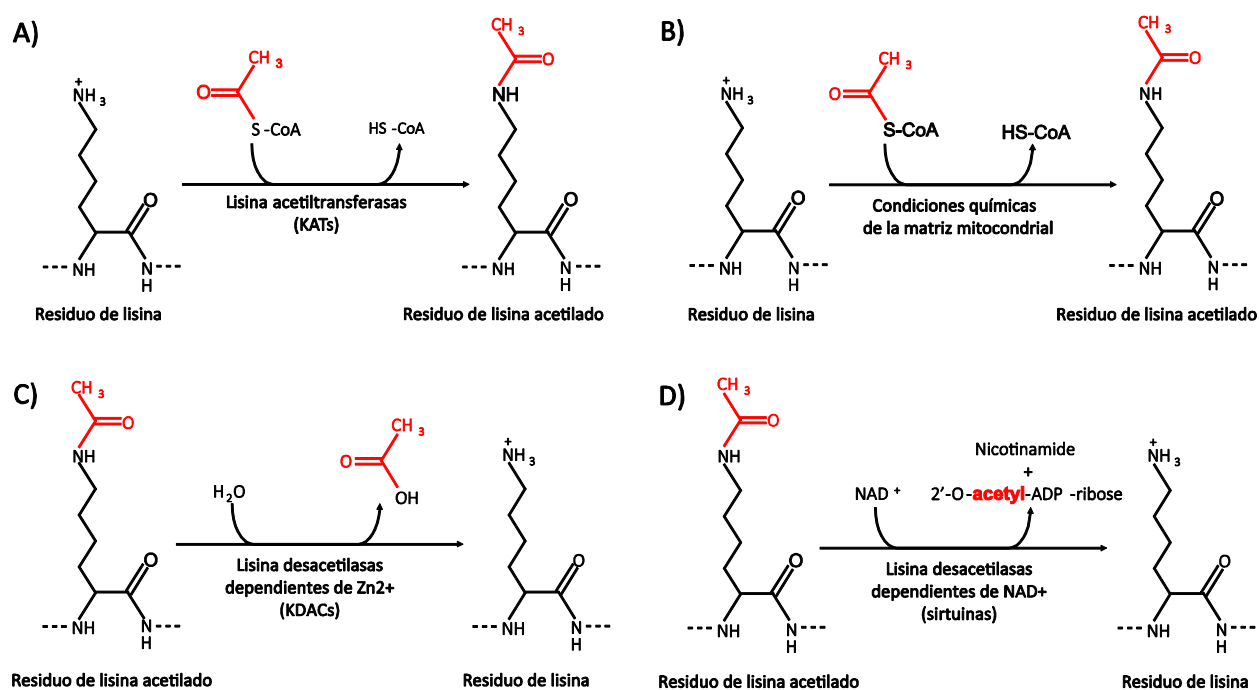


Figura 1. Reacciones de acetilación y desacetilación en el grupo épsilon amino de residuos de lisina. A) reacción de acetilación catalizada por las enzimas lisina acetiltransferasas (KATs). El donador del grupo acetilo es el Acetil-coenzima A (AcCoA). B) reacción de acetilación no mediada por enzimas, favorecida por las condiciones químicas en la matriz mitocondrial (pH 7.9-8.0 y [AcCoA] 0.1-1.5 mM). C) Reacción de desacetilación catalizada por las enzimas lisina desacetilasas dependientes de Zn²⁺. D) Reacción de desacetilación catalizada por sirtuinas o clase III de las KDACS que son dependientes de NAD⁺ y como productos genera el residuo libre de lisina, nicotinamida y 2'-O-acetyl-ADP-ribose.

Los residuos de lisina son blanco de varias modificaciones excluyentes, por lo que en muchos casos compiten por los mismos sitios dentro de las proteínas. Se ha reportado que la acetilación y la ubiquitinación comparten más del 30% de los sitios [27]. La metilación que puede ser desde mono hasta tri-metilación también previene que ocurra la acetilación en los residuos ocupados. Otros grupos alquilo como succinilo, malonilo y crotonilo también pueden ser transferidos a la cadena lateral de los residuos de lisina. Toda esta compleja red de modificaciones que pueden afectar los residuos de lisina permite a la célula tomar una decisión precisa con respecto al destino de la proteína blanco. Teniendo esto en cuenta, la acetilación puede aumentar la estabilidad de la proteína previendo la ubiquitinación y posterior degradación por la vía del proteosoma, puede desencadenar cascadas de señalización a través de su interacción con proteínas que contienen bromodominios u otros dominios de reconocimiento de acetil-lisina, puede afectar la interacción de las histonas con el ADN, entre otras tantas funciones.

2.2. Enzimas que controlan la acetilación

2.2.1. Lisina acetiltransferasas

Actualmente se conoce la existencia de alrededor de 30 lisina acetiltransferasas (KATs), que están agrupadas en tres familias basadas en la homología de sus secuencias. Generalmente las KATs son enzimas que poseen, adicional al dominio acetiltransferasa, varios dominios que median la interacción con otras proteínas. Entre los dominios más comúnmente encontrados en estas enzimas se encuentran los de unión a acetilación y otras PTMs. En su conjunto la presencia de estos dominios le confieren a las KATs la especificidad y diversidad de sustratos requerida para controlar esta modificación en un número cada vez mayor de proteínas [28]. Actualmente el estudio de los miembros de las familias de KATs, sus blancos y sus funciones biológicas es un campo en expansión. Sin embargo, se han visto implicadas en la embriogénesis, el envejecimiento y varias enfermedades entre las que resalta el cáncer, donde se han encontrado vínculos con el desarrollo y progresión de esta enfermedad [29,30].

El primer grupo está relacionado con la familia de proteínas N-acetiltransferasas del control general de la síntesis de aminoácidos (Gcn5 N-acetiltransferasas), cuyos principales miembros son la KAT2A y la KAT2B. Estas acetiltransferasas son muy homologas; sin embargo, son excluyentes en la formación de sus complejos [31]. KAT2A es conocida como GCN5 y se ha encontrado

formando parte de dos grandes complejos involucrados en la modificación de la cromatina, el complejo SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferasa) y el complejo acetiltransferasa que contiene Ada2 (ATAC por sus siglas en inglés) [32]. El otro miembro de esta familia es la acetiltransferasa KAT2B, también conocida como factor asociado a p300/CBP (PCAF por sus siglas en inglés), puede formar parte de complejos parecidos a SAGA y ATAC [33]. Estas enzimas comparten algunos de sus blancos como la K9 de la histona H3, sin embargo ambas tienen otras funciones propias [34].

La segunda familia se conoce como p300/CBP, y está compuesta por dos acetiltransferasas p300 y la proteína de unión a CREB (CBP por sus siglas en inglés). CBP y p300 son proteínas de gran tamaño que presentan muchos dominios de unión con otras proteínas y modificaciones postraduccionales, lo que les permite interactuar con más de 400 proteínas descritas hasta el momento [35]. Ambas proteínas están altamente relacionadas entre ellas y son homólogas, compartiendo un 75% de similitud en sus secuencias. Sin embargo ambas presentan muy poca homología con otras KATs. Estas acetiltransferasas se consideran co-activadores transcripcionales, dado el papel que desempeñan en la acetilación de histonas y otras proteínas nucleares.

La tercera familia de KATs se nombra MYST debido las iniciales de los primeros miembros de este grupo que fueron descritos (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 y Tip60). En humanos la acetiltransferasa más estudiada de esta familia es Tip60, también conocida como KAT5. Tip60 se ha encontrado que juega un papel importante en la regulación de la transcripción y los procesos de reparación de daño al DNA, principalmente en rupturas de doble cadena. Tip60 forma parte de complejo multiproteico de igual nombre, que contiene hasta 16 subunidades diferentes entre las que se encuentran ATPasas y helicasas [36]. Entre los principales blancos de acetilación de Tip60 se encuentra K5 de la histona H2A, K14 de la H3 y K5, 8, 12 y 16 de la histona H4 [37]. Dado su papel en la reparación del daño al DNA la mayoría de los trabajos reportados indican que Tip60 puede actuar como supresor tumoral, en concordancia con que en varios cánceres humanos se ha visto una disminución de los niveles de Tip60, tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína [38,39].

2.2.2. Lisina desacetilasas

En humanos el grupo de enzimas con actividad de desacetilasa en los residuos de lisina está formado por 18 miembros. Las KDACs se clasifican en cuatro clases según su homología con proteínas desacetilasas de levadura. Las clases I, II, y IV son dependientes de Zn^{2+} , mientras que los miembros de la clase III, también conocidas como sirtuinas, requieren de NAD^+ como cofactor [40]. Las correspondientes reacciones de desacetilación se representan en la Figura 1C y 1D. Las KDACs miembros de las clases I, II y IV solo tienen actividad desacetilasa, mientras que las sirtuinas adicionalmente poseen actividad de mono-ADP-ribosiltransferasa [41]. La clase I está compuesta por cuatro miembros (HDAC1, 2, 3 y 8) y muestran alta homología con la proteína RPD3 de levadura. La clase II se divide en dos subgrupos: clase IIa (HDAC4, 5, 7 y 9) y clase IIb (HDAC6 y 10). Ambas subclases son homólogas de la proteína de levadura HDA1. La clase IV está compuesta por un solo miembro la HDAC11 y presenta homología con las otras dos clases de KDACs dependientes de Zn^{2+} [42]. La clase III de KDACs o sirtuinas está compuesta por 7 miembros (SIRT1-7), todos presentan homología con la proteína Sir2 de levadura [6].

De los miembros de la clase I, HDAC1, 2 y 3 se han encontrado formando parte de complejos multi-proteicos, mientras que la HDAC8 hasta el momento no se ha descrito que forme parte de ningún complejo [43]. HDAC1, 2 y 8 se localizan fundamentalmente en el núcleo mientras que HDAC3 posee una señal de exportación nuclear que le permite transportarse entre el núcleo y el citoplasma [44]. Los miembros de la clase IIa están involucrados fundamentalmente en vías de diferenciación y desarrollo. Estas enzimas son tejidos específicas y funcionan como represores transcripcionales en tejidos como cerebro, músculo esquelético, cardiaco y liso, así como en los sistemas vascular e inmune. Esta subclase de enzimas es regulada por fosforilación en los dominios regulatorios ubicados en la región del N-terminal. Particularmente este grupo de enzimas muestran significativamente menos actividad desacetilasa que el resto de las desacetilasas dependientes de Zn^{2+} . La baja actividad de estas enzimas ha sido atribuida a la presencia de un residuo de histidina en lugar de tirosina en el sitio catalítico. Estos descubrimientos nos llevan a pensar que la principal actividad *in vivo* de estas enzimas, no sea la hidrólisis de grupos acetilos. Esto aunado a que la sustitución del residuo de histidina por tirosina incrementa su actividad desacetilasa pero no mejora su capacidad como represor transcripcional [45,46]. HDAC6 y HDAC10 (clase IIb) se localizan fundamentalmente en el citoplasma y en el caso de HDAC10, adicionalmente se puede encontrar

en el núcleo. Estas dos enzimas tienen la particularidad de poseer dos dominios de desacetilasa y en el caso de HDAC6 también tiene un dominio de dedo de zinc en el carboxilo terminal y otro de unión a ubiquitina.

Las sirtuinas en los mamíferos son un grupo de enzimas compuesto por siete elementos (SIRT1-7) que presentan homología con la proteína Sir2 de levadura. Todos sus miembros poseen dos actividades enzimáticas, lisina desacetilasa y mono-ADP-ribosil-transferasa. Estas enzimas se han encontrado relacionadas con un amplio rango de procesos biológicos, donde destacan la regulación de la cromatina, la transcripción de genes, el procesamiento de las moléculas de ARN, la reparación de daños al ADN, la respuesta ante estrés, entre otras muchas vías metabólicas [6]. Todas estas enzimas se localizan de forma diferente en la célula. SIRT1 y SIRT2 se encuentran en el núcleo y en el citoplasma. Particularmente SIRT1 se ubica fundamentalmente en el nucléolo. SIRT3 además de encontrarse en el núcleo tiene fuerte presencia en la mitocondria, donde actúa como la principal desacetilasa de este organelo. SIRT4 y SIRT5 solo se localizan en la mitocondria, sin embargo evidencias sólidas indican que su principal actividad es remover otros grupos alquilo distintos al acetilo [47–49]. SIRT6 y SIRT7 son enzimas nucleares, específicamente nucleolar para el caso de SIRT7 [4]. Todas estas enzimas presentan un dominio conservado de unión a NAD⁺, sin embargo, todas tienen diversas actividades enzimáticas, sustratos y funciones celulares.

SIRT1 es la sirtuina que presenta mayor similitud con su homólogo fundador de este grupo de enzimas, sir2 de levadura, además de ser la más ampliamente estudiada. Esta enzima se expresa en la mayoría de los tejidos en mamíferos y se activa, como otras sirtuinas, bajo restricción calórica. Se han reportado hasta la actualidad muchos sustratos, entre los que se incluyen histonas, factores de transcripción, efectores de la reparación de daño al ADN, y proteínas de señalización, en muchos de estos casos se ha descrito que SIRT1 modula su actividad [50]. Varios estudios coinciden en que el incremento de la actividad de SIRT1 conduce a fenotipos que mimetizan a aquellos asociados a restricción de calorías, que involucran un metabolismo oxidativo, protección contra agentes oxidativos, reducción de la incidencia de cáncer y aumento de la esperanza de vida [51,52]. SIRT1 ha sido vinculada con cáncer en un gran número de trabajos y su papel ha sido descrito tanto como promotor como represor de tumor.

La clasificación de SIRT1 como oncoproteína tiene sus orígenes en que tiene como blanco de desacetilación y reprime la actividad del supresor de tumor p53 [53]. La sobreexpresión de SIRT1 afecta la apoptosis mediada por p53, bajo condiciones de estrés oxidativo y daño al ADN. Por otro lado los timocitos extraídos de ratones que no expresan SIRT1 muestran hipersensibilidad a radiación ionizante [54]. Aunado a esto SIRT1 desacetila y regula negativamente al también supresor de tumor E2F1, que funciona como punto de control hacia la fase S del ciclo celular, pero que además desencadena la apoptosis en respuesta a daño en el ADN u otra señal oncogénica. Estas actividades y algunas otras descritas para SIRT1 explican su función como oncoproteína. No obstante, un número mucho mayor de estudios describen otras funciones para SIRT1, que involucran la inhibición de oncogenes que regulan el ciclo celular, la reparación del ADN y el microambiente tumoral, lo que ubica a SIRT1 como un importante supresor tumoral. Desde el punto de vista del desarrollo del cáncer, SIRT1 a través de su papel como promotor de la reparación de daño al ADN y de la estabilidad genómica protege a la célula de la transformación inicial. Sin embargo, con la inhibición de p53 y promoviendo la supervivencia celular, contribuye a la progresión del cáncer, en aquellos casos que ya hayan adquirido mutaciones [50].

Actualmente se conocen muchos de los blancos de SIRT1; sin embargo, es poco lo que se conoce acerca del grado de ocupación por acetilación de sus sitios blancos. Dado el gran número de vías que son reguladas por esta enzima, resulta imprescindible conducir estudios encaminados a determinar con precisión, no solo las proteínas y sus residuos blancos, sino sobre todo los grados de ocupación por acetilación de los sitios y su implicación para la vía biológica en particular y la célula en general.

2.3. Acetilación en residuos de lisina no mediada por enzimas

La incorporación del grupo acetilo en residuos de lisina no solo ocurre por vía enzimática. Estudios recientes en bacterias han demostrado que la mayoría de la acetilación ocurre por vía no enzimática y que el principal agente alquilante, responsable de donar el grupo acetilo es el acetil-fosfato [55]. En células eucariotas, la molécula de acetil-CoA se ha determinado como responsable de acetilación no enzimática. Los altos niveles de Acetil-CoA (0.1-1.5 mM) y el pH alcalino de la matriz mitocondrial (pH 7.9-8.0), favorecen la reacción de acetilación química. Estas condiciones son suficientes para que ocurra la acetilación no enzimática en residuos de lisina [56]. A través de este mismo mecanismo, otros tio-ésteres derivados de la CoA, como succinil-CoA, malonil-CoA

y glutaril-CoA, que son abundantes en la matriz mitocondrial, también modifican químicamente los residuos de lisina en las proteínas [57].

No todos los residuos de lisina en las proteínas presentes en la matriz mitocondrial muestran la misma reactividad. Se ha encontrado que los residuos más expuestos en las proteínas son más susceptibles de acetilarse por esta vía y que aquellos residuos con interacciones electrostáticas con residuos ácidos cercanos muestran muy baja reactividad [58]. En conjunto, las condiciones químicas favorables para la acetilación en la matriz mitocondrial y las pocas evidencias experimentales que fundamenten la presencia de lisina acetiltransferasas mitocondriales, nos conducen a pensar que la acetilación química es la principal forma de modificar postraduccionalmente las proteínas en este organelo. Fuera de la mitocondria, a la acetilación se le han adjudicado muchos efectos que van desde activación, inhibición, estabilización, o hasta incluso sin efecto medible. Sin embargo, en este organelo la acetilación tiene mayormente un efecto inhibitorio sobre sus proteínas blancos. La mayoría de las enzimas mitocondriales, incluyendo aquellas con funciones claves como las del ciclo de Krebs, la fosforilación oxidativa y las involucradas en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno, son inactivadas por la acetilación [59]. Oponiéndose a este proceso, la enzima mitocondrial SIRT3 es la responsable de revertir la acetilación en la mitocondria, adjudicándosele un efecto protector sobre las funciones de este organelo [60]. De forma similar, SIRT5 que remueve de forma eficiente otros grupos acilos como succinilo, malonilo y glutarilo, tiene un efecto protector sobre las funciones de sus blancos [61].

2.4. Proteínas que interactúan con residuos de acetil-lisina

La acetilación en residuos de lisina no solo altera las propiedades físico-químicas de las proteínas blanco, sino que también abre las puertas hacia la interacción con otras proteínas que reconocen los residuos de lisina acetilados. Específicamente los bromodominios interaccionan de forma específica con los residuos acetil-lisina. Este tipo de dominio fue descubierto en 1992 en la proteína brahma de *Drosophila melanogaster* [62]. En el genoma humano se han encontrado 46 genes que codifican para proteínas que contienen bromodominios, para un total de 61 bromodominios únicos. Todos los bromodominios comparten al menos un 30% de identidad en sus secuencias. Las proteínas que contienen bromodominios tienen diversas funciones, aunque en su mayoría están relacionadas con la biología de la cromatina y la transcripción de genes. Factores de transcripción,

proteínas componentes de los complejos de acetiltransferasas, incluyendo las mismas KATs, enzimas metiltransferasas y otras consideradas remodeladoras de la cromatina, son parte de este grupo de proteínas. La mayoría de estas proteínas son nucleares y en menor medida citoplasmáticas, y generalmente se encuentran formando parte de grandes complejos multiproteicos. En las KATs o proteínas asociadas a estas, los bromodominios contribuyen a la especificidad de los sustratos y proveen el enlace entre la acetilación y las interacciones entre proteínas mediada por esta PTM en la transcripción de genes [63].

Otros dominios se han reportado que interactúan específicamente con determinados residuos acetilados. Un grupo de proteínas conocidas como YEATS por sus miembros fundadores (Yaf9, ENL, AF9, Taf14 y Sas5) se han reportado que poseen un dominio de reconocimiento a la histona H3 cuando se encuentra acetilada en su residuo K9 [64]. Este dominio se ha visto que es conservado en todos los organismos eucariontes, desde levaduras hasta humanos. Todos los miembros de este grupo de proteínas se han encontrado formando parte de complejos como los de lisina acetiltransferasas, reguladores transcripcionales o remodeladores de la cromatina [65]. Los dominios de unión a residuos de metil-lisina en las histonas conocidos como dedos de homodominios de plantas (PHD por sus siglas en inglés) pueden encontrarse dobles en algunas proteínas. Estudios recientes indican que el dominio de dedo de PHD doble de la proteína DPF3b específicamente se une a las histonas H3 y H4 cuando están acetiladas [66]. La variante de empalme de DPF3b, DPF3a que tiene truncado un dominio de PHD, no interactúa con ninguna de estas histonas. Estas proteínas son parte del complejo remodelador de la cromatina BAF y regulan la expresión de determinados genes [67]. La lisina acetiltransferasa KAT6B o MYST4 también posee un dominio de dedo doble de PHD, con capacidad de interactuar con la región del extremo N de la histona H3. Cuando los residuos K9 y K14 se encuentran acetilados en la histona H3, se favorece su interacción con KAT6B [68].

2.5. Proteínas blancos de la acetilación en residuos de lisina

Las histonas fueron el primer grupo de proteínas identificado como blanco de acetilación hace más de 50 años y su función fue relacionada con la regulación de la transcripción [1]. El mecanismo mediante el cual la acetilación en las histonas regula la transcripción ha sido ampliamente estudiado. Los extremos amino y carboxilo de las histonas son los más frecuentemente observados acetilados. Como la acetilación neutraliza la carga positiva que a pH fisiológico tiene el grupo

épsilon amino de la cadena lateral de la lisina, esto afecta la interacción entre las histonas y el ADN. Cuando las histonas no están acetiladas, los residuos de lisina están cargados positivamente y por consiguiente interactúan más fuertemente con el ADN aumentando el nivel de compactación de este y dificultándole el acceso a la maquinaria de transcripción. Por el contrario, cuando estos residuos son acetilados, las cargas positivas que fortalecen la interacción entre histonas y ADN son neutralizadas y esto es asociado con una estructura más relajada que favorece la transcripción. Adicionalmente, estos residuos de lisina acetilados son reconocidos por otras proteínas que contienen bromodominios que llevan al sitio de acetilación un número diverso de factores de transcripción, complejos de lisina acetiltransferasas, entre muchas otras proteínas consideradas activadoras de la transcripción.

Principalmente en la última década la acetilación en los residuos de lisina se ha expandido de las histonas, un pequeño número de factores de transcripción y otras proteínas nucleares, a un número cada vez mayor de proteínas en todos los compartimientos celulares. Adicionalmente, la acetilación ha emergido como una modificación que regula la mayoría de los procesos celulares. Muchos complejos multiproteicos son blancos de esta modificación, entre los que destaca los mismos complejos de lisina acetiltransferasa, que han sido encontrados muy acetilados en muchas de sus subunidades. De forma similar otros complejos remodeladores de la cromatina como SWI/SNF, NURD, INO80, y NURF también se encuentran con frecuencia con muchos sitios de acetilación [18]. La acetilación conserva sus perfiles en diferentes especies para el mismo tipo de células, sin embargo se muestra diferentes entre células del mismo organismo pero de origen distinto. En un estudio reciente este fenómeno quedó ilustrado al comparar el acetiloma de células de hígado humanas y de ratón, con células de leucemia [23]. En hígado la mayoría de las enzimas metabólicas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, el ciclo de la urea, la glucólisis entre otras vías metabólicas se han encontrado acetiladas [24]. Por otro lado en células cancerosas, algunos factores de transcripción como Myc y E2F1, cuya sobreexpresión promueve la progresión del cáncer son estabilizados por la acetilación [69,70].

Muchos factores de transcripción también son regulados por acetilación con diferente efecto. La proteína supresora de tumor p53 es estabilizada por acetilación y su acumulación desencadena una serie de eventos que resultan en la expresión de genes involucrados en la reparación del ADN, arresto del ciclo celular y apoptosis [71]. Sin embargo, la también supresora de tumor PTEN, cuya

activación interrumpe el ciclo celular, específicamente la transición entre la fase G1 y la S, es inhibida por la acetilación [72]. El número de proteínas que están siendo reguladas por acetilación es cada vez mayor y muchas de estas tienen implicaciones para el desarrollo de muchas enfermedades incluyendo el cáncer. Sin embargo, es necesario la conducción de experimentos que conduzcan, no solo a la identificación de los sitios de acetilación, sino que estimen las diferencias de forma cuantitativa entre los niveles de la acetilación y de sus proteínas blancos en el desarrollo de diferentes patologías. Este tipo de estudios desencadenan en la generación de conocimiento más confiable sobre el papel de la acetilación.

2.5.1. Sitios de acetilación

Los sitios de acetilación preferentemente se ubican en regiones con estructuras secundarias ordenadas, ricas en residuos de lisina y con residuos de aminoácidos ácidos alrededor del sitio. No obstante, para algunos compartimientos subcelulares o grupos de proteínas pueden existir motivos de secuencias específicos. Diferentes estudios demostraron que las proteínas nucleares y citoplasmáticas presentan motivos similares, mientras que los motivos de acetilación en proteínas mitocondriales son significativamente diferentes [18,20]. Por otro lado, las histonas tienen su propio motivo preferido que difiere del resto de las proteínas nucleares, con residuos de lisina en las posiciones -4 y +4 con respecto al sitio de acetilación. Para otros grupos de proteínas, entre los que se encuentran factores de transcripción, otras proteínas nucleares, citoplasmáticas, mitocondriales, del aparato de Golgi, del retículo endoplasmático, de la membrana plasmática y extracelulares, se han descrito varias de estas secuencias consenso rodeando los sitios de acetilación [73]. A pesar del gran esfuerzo que representa la identificación confiable de los sitios de acetilación y de la alta calidad de los trabajos que han publicado estos resultados, es necesario analizar esta información con precaución. La inmensa mayoría de los sitios reportados fueron enriquecidos con anticuerpos específicos diseñados para inmunoprecipitar péptidos o proteínas que contengan residuos de lisina acetilados y la especificidad de los anticuerpos puede introducir un sesgo la hora de capturar los péptidos acetilados. Adicionalmente, en muchos casos las identificaciones se realizan en células cancerosas o transformadas que pueden tener mutaciones y/o desregulaciones de algunas de las enzimas que controlan esta modificación.

2.5.2. *Interacción entre acetilación y otras modificaciones postraduccionales*

La acetilación interactúa con otras PTMs y esto permite un nivel adicional de regulación a los procesos celulares. Entre las modificaciones con las que más se ha reportado interacción, es la fosforilación. Las proteínas 14-3-3 interactúan con fosfoproteínas para regular varios procesos celulares como el metabolismo, la transducción de señales, tráfico de proteínas, apoptosis y regulación del ciclo celular [74]. La acetilación en estas proteínas inhibe su capacidad para interactuar con fosfoproteínas. Esto fue validado en un estudio donde se demostró con mutaciones dirigidas, que mimetizan los residuos de lisina con y sin acetilación, que el triple-mutante que simula el residuo acetilado pierde la capacidad de unirse a proteínas fosforiladas [18]. Varias modificaciones postraduccionales compiten por los residuos de lisina. Entre las más comúnmente encontradas en estos residuos son: ubiquitinación, mono-, di- y trimetilación, succinilación, malonilación entre otras acilaciones. La acetilación y la ubiquitinación se estima que comparten más del 30% de los sitios indicando que estas modificaciones interactúan, probablemente en muchos de los casos para regular la estabilidad de la proteína blanco [27]. En el caso particular de la proteína p53 es estabilizada por acetilación en los residuos de lisina de su extremo carboxilo. Lo anterior es posible debido a que la acetilación previene la ubiquitinación y su posterior degradación por la vía del proteosoma. Las interacciones entre la metilación y la acetilación se han estudiado más en las histonas, donde ambas modificaciones intervienen en la regulación de la remodelación de la cromatina.

2.6. Proteómica y acetilómica

La proteómica es la rama de la ciencia que se encarga del estudio de los proteomas, que consisten en el conjunto de proteínas que en determinado momento expresa una célula, tejido u organismo. La herramienta fundamental en proteómica es la espectrometría de masas, mediante la cual es posible determinar no solo la masa de péptidos y proteínas sino que también nos permite inferir información acerca de su secuencia primaria. Desde el descubrimiento de los métodos suaves de ionización en espectrometría de masas, se abrieron las puertas al análisis de macromoléculas no volátiles como péptidos y proteínas. Los métodos suaves de ionización que se emplean en espectrometría de masas aplicada a estudios de proteómica son: Ionización por Electronebulización (ESI por sus siglas en inglés) e Ionización y Desorción por Láser Asistida por

Matriz (MALDI por sus siglas en inglés). En las últimas dos décadas los sistemas de Cromatografía Líquida acoplados a Espectrometría de Masas (LC-MS/MS) con fuente de ionización ESI, han tenido un desarrollo vertiginoso convirtiéndose cada vez más precisos y exactos en las mediciones, a su vez que se han vuelto más rápidos y sensibles. Estas características hacen que la proteómica basada en espectrometría de masas de alta resolución, no solo sea la herramienta ideal para la identificación y cuantificación de péptidos y proteínas, sino también para identificar con exactitud el sitio exacto de sus modificaciones postraduccionales y poder realizar cuantificaciones exactas y relativas de las mismas [75].

El análisis de modificaciones postraduccionales representa un reto para la espectrometría de masas. La mayoría de las PTMs se encuentran ocupando sus sitios blancos en una baja estequiometría, solo unos pocos residuos dentro de una proteína son modificados y algunas de las PTMs no se ionizan bien o generan espectros de sus iones fragmentos de baja calidad. Estas son las principales causas por las cuales para la mayoría de las PTMs se han desarrollado métodos específicos para capturar o enriquecer péptidos y proteínas con la PTM que se desea estudiar. Teniendo en cuenta esto, nuevas ramas de la proteómica han surgido y se han desarrollado. Entre las áreas con mayores avances se encuentra la fosfoproteómica (que estudia la fosforilación de las proteínas) [76], la glicómica (que estudia la glicosilación) [77] y más recientemente la acetilómica (que estudia la acetilación en residuos de lisina en las proteínas) [20].

Particularmente, la acetilación en residuos de lisina es una modificación que generalmente se encuentra en baja estequiometría, por lo que para poder aumentar el número de residuos identificados con la modificación, generalmente es necesario incorporar un paso de enriquecimiento con anticuerpos específicos que reconozcan residuos de acetil-lisina. En la Figura 2 se representa de forma esquemática la estrategia general reportada para la identificación y/o cuantificación relativa de péptidos acetilados. Con esta estrategia se ha logrado la identificación de más de 2,000 proteínas humanas acetiladas [18]. Esta metodología tiene el inconveniente que se requiere de una gran cantidad de material de partida para el paso de inmunoprecipitación de péptidos acetilados. En un estudio comparativo se analizaron muestras con y sin el paso de enriquecimiento, encontrándose que el número de péptidos acetilados identificados fue 60 veces mayor en las muestras enriquecidas que en las que no tenían este paso [18]. Si tomamos en cuenta estos resultados, se requerirían al menos 60 veces más material de partida para estudios de acetilómica empleando un

paso de enriquecimiento, que lo que se necesitaría para un experimento de proteómica sin enriquecimiento. Esto representaría una seria limitación en todos los casos en que exista poca disponibilidad de muestra, como es el caso de muestras de biopsias o determinados fluidos o tejidos en donde se pretenda analizar esta modificación postraducciona. El paso clave en este tipo de estrategia es el paso de enriquecimiento con anticuerpos anti-acetil-lisina. Sin embargo, podemos asociar varias limitaciones directamente al uso de anticuerpos, donde destaca la especificidad de este. La mayoría de los anticuerpos dedicados a este fin muestran baja especificidad, por lo que después del paso de enriquecimiento, solo entre un 3 al 10% de los péptidos identificados se encuentran acetilados. La selectividad de los anticuerpos varía de uno a otro, por lo que diferentes subconjuntos de péptidos acetilados son atrapados y posteriormente identificados, cuando son usados distintos anticuerpos.

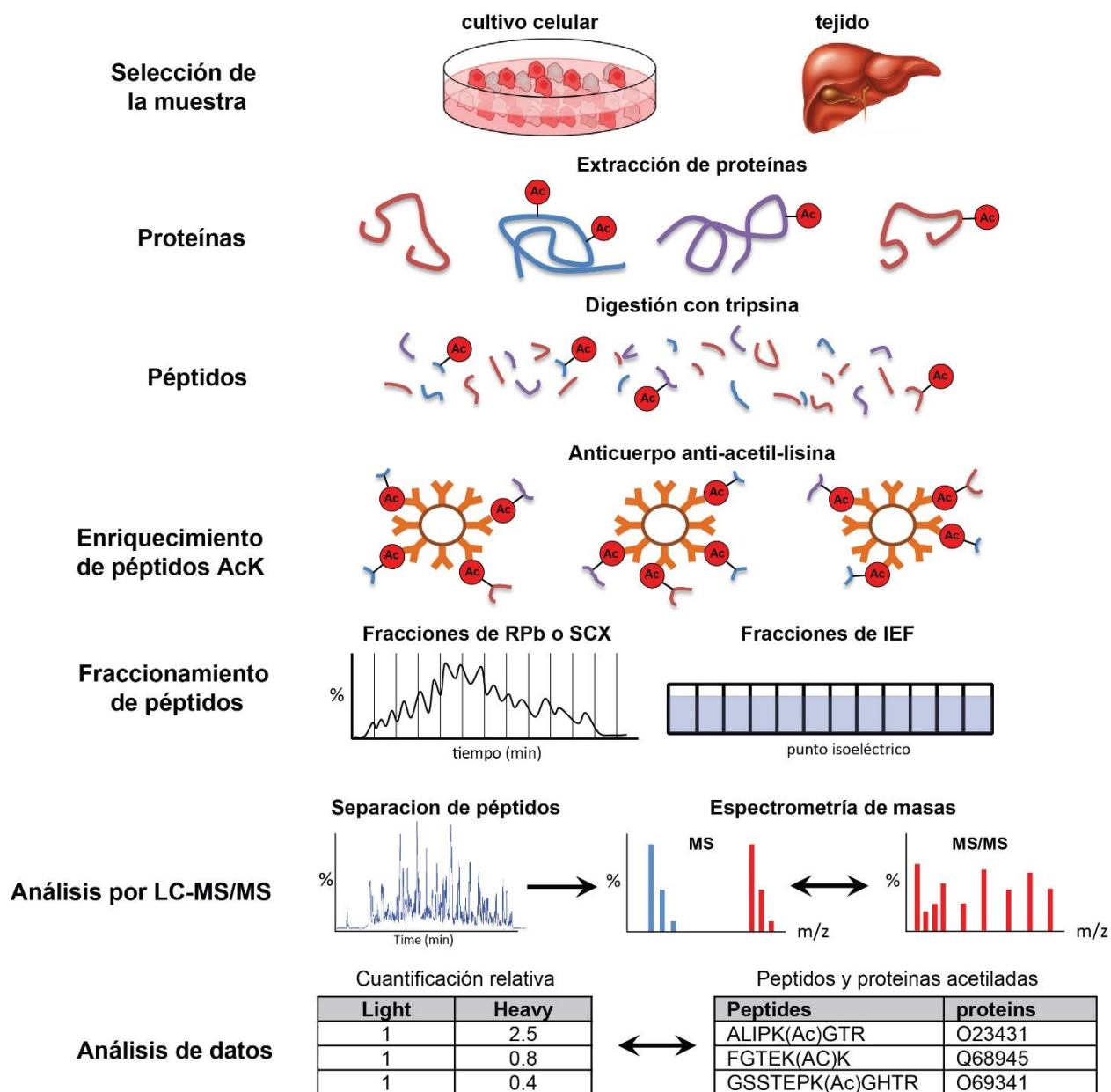


Figura 2. Flujo general de trabajo de proteómica basada en espectrometría de masas para el análisis de péptidos y proteínas acetiladas. Las proteínas son extraídas de células o tejidos y seguidamente son digeridas enzimáticamente y convertidas en péptidos. Los residuos acetilados se encuentran señalados con círculos rojos. Los péptidos que contienen la modificación son inmuprecipitados con anticuerpos específicos anti-acetil-lisina. Los péptidos enriquecidos pueden ser prefraccionados para reducir la complejidad de la muestra, entre los métodos más efectivos y comúnmente usados se encuentran la cromatografía de intercambio iónico y de fase reversa, y la focalización isoelectrica. Seguidamente, cada fracción es analizada por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS/MS). En caso de que más de una condición experimental esté siendo estudiada, las abundancias relativas entre las condiciones se puede determinar a partir del espectro MS o MS/MS según la estrategia cuantitativa empleada. Finalmente, a partir de los espectros MS y MS/MS los péptidos y por consiguiente las proteínas a las que estos pertenecen, son identificadas, cuantificadas y reportadas con algunos de los programas disponibles para este fin.

Empleando métodos basados la inmunoprecipitación de péptidos que contienen residuos de acetil-lisina, seguido del análisis en sistemas de LC-MS/MS de alta resolución, más de 20,000 sitios de acetilación han sido reportados en mamíferos [18,23,78,79]. Adicionalmente, se han aplicado estrategias de proteómica cuantitativa para determinar cambios en la abundancia de péptidos y proteínas con esta modificación. En un estudio reciente se aplicó la metodología de proteómica cuantitativa, basada en el marcaje metabólico con isótopos pesados (SILAC por sus siglas en inglés), en combinación con un método de enriquecimiento de péptidos acetilados, para evaluar la especificidad de 19 inhibidores de las 18 enzimas KDACs reportadas. En varios casos usaron silenciamiento del gen de la KDAC para confirmar la especificidad del inhibidor [80].

Con estas estrategias el número de sitios de acetilación reportados se incrementó y expandió a más de 2,000 proteínas, de todos los compartimientos e involucradas en prácticamente todos los procesos celulares. Sin embargo, la información acerca del grado de ocupación de estos sitios no puede ser abordada con esta metodología. Recientemente se publicó un trabajo donde los autores propusieron un método para determinar el grado de ocupación de los sitios de acetilación, a nivel de proteoma [25]. El método no emplea ningún paso de enriquecimiento con anticuerpos y para determinar la estequiometría de la acetilación, incorporan una reacción química de acetilación con isótopos pesados. La acetilación química y la endógena se comportan químicamente igual, pero se diferencian en sus valores de masas al ser analizados por espectrometría de masas, los péptidos que contengan la modificación. De esta forma la relación entre las intensidades en el espectro de masas (MS) entre ambas distribuciones isotópicas (péptidos con la modificación endógena (ligera) y péptidos con la modificación química (pesada)), es directamente proporcional a la relación entre las abundancias de ambas especies. Este método fue desarrollado y aplicado al estudio de la estequiometría de la acetilación en proteínas totales de *E. coli*. Este trabajo confirmó que la acetilación en residuos de lisina es una modificación, que en la inmensa mayoría de los sitios se presenta con baja estequiometría. Sin embargo, muchos aspectos técnicos fueron descuidados, que de tenerlos en cuenta hubieran resultado en un mayor número de sitios de acetilación identificados y cuantificados.

En un trabajo publicado recientemente, nosotros propusimos lo que consideramos la metodología adecuada para estudiar de forma integral la acetilación en residuos de lisina a nivel de proteoma [5] (Anexo 2). Nuestra propuesta incluye el uso de técnicas de proteómica basadas en

espectrometría de masas de alta resolución y la combinación de tres estrategias diferentes, para evaluar con alto grado de confiabilidad esta PTM en diferentes condiciones experimentales (Figura 3). En la mayoría de los estudios en los que se incluyen proyectos de proteómica, el objetivo es comparar al menos dos condiciones experimentales diferentes. Teniendo en cuenta esto, la primera estrategia consiste en realizar un estudio de proteómica cuantitativa, que permita determinar las abundancias relativas entre las proteínas provenientes de cada muestra. Seguidamente, para una identificación y cuantificación relativa de péptidos acetilados la estrategia consiste en aplicar un método basado en enriquecimiento con anticuerpos anti-acetil-lisina. Sin embargo este método, como ha sido explicado arriba, para lograr mejores resultados en cuanto a número de identificaciones, se requieren de grandes cantidades de material de partida para el paso de enriquecimiento. Finalmente, la incorporación de un análisis de estequiometría de la acetilación, aporta el importante dato acerca de la extensión de la modificación en cada uno de los sitios blancos, en todas las condiciones experimentales. Este tipo de información no es posible obtenerla al emplear métodos de enriquecimiento en péptidos acetilados. Es nuestro criterio que en conjunto, estas estrategias proteómicas pueden ser aplicadas satisfactoriamente a la caracterización profunda de la acetilación en residuos de lisina.

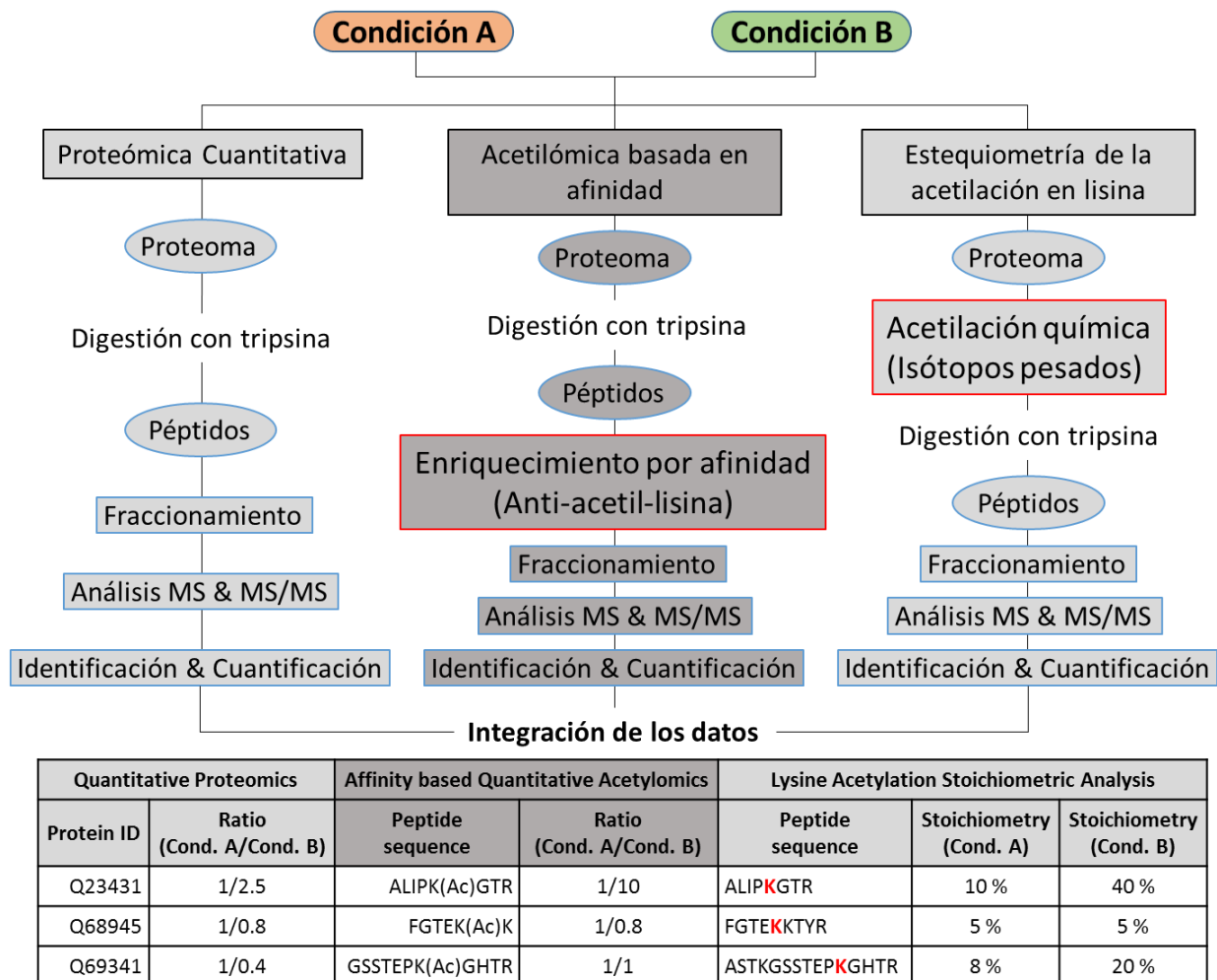


Figura 3. Metodología para la caracterización a profundidad de la acetilación en residuos de lisina de las proteínas. Tres estrategias fueron propuestas para este fin. La primera estrategia (izquierda), consiste en un estudio de proteómica cuantitativa donde puede emplearse cualquiera de los métodos conocidos de proteómica cuantitativa, ya sea los basados en marcaje isotópico como los libre de marcaje. La segunda estrategia (medio), tiene como objetivo la identificación y cuantificación relativa de péptidos acetilados, por lo que requiere de un paso de inmunoprecipitación con anticuerpos específicos anti-acetil-lisina y emplea grandes cantidades de muestra de partida. La tercera estrategia (derecha) consiste en la determinación del grado de ocupación de los sitios de acetilación. El paso clave en este método consiste llevar a cabo una reacción de acetilación, con un reactivo marcado con isótopos estables pesados, a todos los residuos de lisina a nivel de proteínas. La presencia de isótopos pesados va a permitir diferenciar en el espectro de masas MS los péptidos que traen la modificación endógena, de aquellos que fueron modificados químicamente. Los resultados de las tres estrategias son integrados y reportados de forma conjunta, para dar información detallada acerca de la acetilación y las proteínas que poseen la modificación en un proteoma dado.

Hipótesis

Empleando las herramientas de proteómica, basadas en Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas de Alta Resolución, es posible desarrollar una metodología que permita el análisis conjunto de proteómica cuantitativa y estequiometría de la acetilación en residuos de lisina a nivel de proteoma. Dicha metodología puede aplicarse al estudio comparativo entre diferentes proteomas y de su regulación por drogas que modulen la actividad de las enzimas que controlan la acetilación en las células.

3. Objetivos

1. Desarrollar e implementar una metodología que nos permita identificar y determinar el grado de ocupación de los sitios de acetilación en las proteínas, así como cuantificar cambios en los niveles de las proteínas, a nivel de proteoma.
 - 1.1. Diseñar la estrategia, basada en la acetilación con isótopos pesados y análisis por espectrometría de masas, para determinar la estequiometría de la acetilación en los sitios blancos.
 - 1.2. Evaluar tres métodos de preparación de muestra que puedan ser empleados con la metodología propuesta, en tres líneas celulares de origen humano.
 - 1.3. Combinar en el mismo estudio, los análisis de la estequiometría de la acetilación y proteómica cuantitativa libre de marcaje.

2. Estudiar la dinámica de la acetilación y el proteoma con la metodología propuesta, en un sistema complejo, en respuesta a afectaciones en la actividad de una de las enzimas que regulan la acetilación.
 - 2.1. Explorar el papel de la enzima lisina desacetilasa SIRT1 en las células humanas. Tratar las células con un inhibidor específico para SIRT1 (EX-527) y determinar las variaciones a nivel de sitios de acetilación y de proteoma.
 - 2.2. Confirmar los hallazgos encontrados con otra técnica analítica complementaria a la metodología empleada.

4. Materiales y métodos

4.1. Materiales

Todos los reactivos fueron adquiridos de casas comerciales reconocidas internacionalmente y con calidad para análisis bioquímico. Los anhídridos acéticos tanto normal como deuterado, así como el N-hidroxi-succinimida (NHS) y el hexano, necesarios para la síntesis de los N-acetoxi-succinimida (NAS) fueron adquiridos de sigma (USA). Los materiales para cultivo celular, así como el medio RPMI 1640 y el suero fetal bovino fueron obtenidos de Gibco (USA). Las líneas celulares HaCaT y SiHa fueron adquiridas de la ATCC, mientras que CaLo fue donada por el Instituto Nacional de Cancerología.

4.2. Síntesis de N-acetoxi-succinimida (NAS)

Para la síntesis del agente alquilante NAS se toman 2.03 g de NHS y se hacen reaccionar con 5 mL de anhídrido acético normal o deuterado a temperatura ambiente, bajo agitación continua y en atmósfera de nitrógeno durante 16 horas. El exceso de reaccionantes es eliminado mediante lavados con hexano. El NAS-*d*₀ o NAS-*d*₃, ya sea que provenga de la reacción con anhídrido acético normal o deuterado respectivamente (precipitado blanco en ambos casos) es recuperado y secado en SPEED-VAC.

4.3. Cultivo de células

Las líneas celulares seleccionadas para todo el estudio fueron: HaCaT, una línea no cancerosa derivada de queratinocitos, SiHa, una línea proveniente de carcinoma escamoso de cérvix positivo a la infección con HPV 16, y CaLo una línea de carcinoma escamoso de cérvix positivo a HPV 18. Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina, penicilina y estreptomina. El ambiente de cultivo es controlado a una temperatura de 37°C, saturado de humedad y bajo una atmósfera constante de 5% de CO₂. Cuando las células alcanzan una confluencia de entre 70 y 90%, el suero fetal bovino es retirado del medio y las células se cosechan 24 h después. Las células que se someten a tratamiento con EX-527 (6-Chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-Carbazole-1-carboxamide) y sus correspondientes controles, son cultivadas en las mismas condiciones descritas arriba. Una vez que alcanzan la

confluencia, las células se lavan con PBS dos veces y se incuban con medio fresco carente de suero fetal bovino y suplementado con EX-527 1 μ M, EX-527 5 μ M o vehículo por 24 h.

4.4. Extracción de ARN y PCR cuantitativa de tiempo real (RT-qPCR)

Para la extracción de ARN total de las líneas celulares en estudio, primeramente las células se cosechan como se describe en la sección anterior. El botón de células se somete a extracción de ARN empleando el reactivo TRI-Reagent adquirido de Zymo y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN resultante se trata con DNAsa I libre de RNAsa (Thermo Fisher Scientific). Para generar ADNc se emplea el equipo RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit adquirido de Thermo Fisher Scientific y se usan cebadores de hexámeros aleatorios. Para realizar la PCR cuantitativa de tiempo real (RT-qPCR) se emplea la química de SYBR-green (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)) adquirida de Thermo Fisher Scientific. Los niveles de transcriptos se analizan en un sistema de PCR tiempo real ABI 7300 y los valores son normalizados con respecto a los niveles del ARN mensajero de la actina. Las secuencias de los cebadores empleadas para determinar los niveles de ARNm de actina así como del precursor del ARN ribosomal (pre-ARNr) y del 28S ARN ribosomal (28S ARNr) fueron sintetizadas en la unidad de síntesis de nucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias de los cebadores fueron reportadas con anterioridad para medir los niveles de estas moléculas [81].

4.5. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas primeramente las células se cosechan eliminando el medio de cultivo y lavando las células dos veces con PBS e incubándolas con verseno 5 minutos a 37 °C. El botón de células se lava dos veces con PBS frío. La solución de ruptura de las células está compuesta por dodecil-sufato de sodio (SDS) 4%, ditioneitol (DTT) 0.1 M, Tris 0.1 M pH 8.6. Las células se incuban por un minuto en la solución de ruptura y seguidamente se sonicán levemente en hielo, se someten a 20 ciclos de un segundo de sonicación y un segundo de reposo en hielo. Posteriormente la muestra se incubaba a 40 °C por 30 minutos para reducir completamente los puentes bisulfuro en las proteínas. Seguidamente, los residuos de cisteína libres son modificados añadiendo iodoacetamida (IAA) a una concentración final de 0.2 M e incubando la muestra a temperatura ambiente, en la oscuridad por 30 minutos. El contenido proteico y la calidad

de la extracción de proteínas son estimados mediante análisis por SDS-PAGE y tinción con coomassie coloidal. Las imágenes son procesadas con el programa ImageJ.

4.6. Preparación de muestras en Solución (SSP)

Para preparar las muestras en solución, se toma del extracto proteico el equivalente a la cantidad de proteína que se quiere analizar y se precipitan las proteínas adicionándoles nueve volúmenes de etanol frío e incubándolas a -20 °C toda la noche. El precipitado se lava tres veces con etanol al 90%. El precipitado resultante se solubiliza con una solución que contiene SDS 0.5%, desoxicolato de sodio (SDC) 0.5% y bicarbonato de tri-etil-amonio (TEAB) 0.1 M pH 8.0. Una vez disueltas las proteínas se hacen reaccionar sus grupos aminos libres con NAS-*d*₃. La reacción se lleva a cabo en dos pasos consecutivos de adición de un exceso de 100 veces más NAS-*d*₃, disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO), que grupos aminos en la muestra proteica. Cada paso se incuba a temperatura ambiente durante una hora y al finalizar se incuba la muestra en 5% de hidroxilamina durante 20 minutos para revertir las posibles reacciones colaterales de O-acetilaciones en residuos como tirosina, serina y treonina. El exceso de reactivos y detergentes que pueden afectar el tratamiento con tripsina se elimina con un paso de precipitación con etanol como se describió con anterioridad. Las proteínas modificadas se solubilizan en una solución que contiene SDC 0.5%, bicarbonato de amonio (BCA) 50 mM y se les añade tripsina a una proporción de 1:50 (enzima:sustrato). La digestión se incuba a 37 °C durante 16 horas. Al finalizar la reacción el detergente es eliminado mediante una extracción con acetato de etilo bajo condiciones ácidas. A la muestra se le añade igual volumen de acetato de etilo y ácido trifluor acético (TFA por sus siglas en inglés) a una concentración final de 0.5% y se agita vigorosamente. Después de centrifugar la fase orgánica se desecha y se repite el mismo procedimiento una vez más (sin añadir TFA). Finalmente los péptidos se desalan mediante cromatografía de fase reversa (RP por sus siglas en inglés), se secan y almacenan a -80 °C hasta el momento de su análisis por LC-MS/MS.

4.7. Preparación de muestras en Gel (GSP)

El extracto de proteínas se carga en un gel SDS-PAGE y se pone a correr. Cuando las proteínas entran en el gel concentrador se detiene la corrida y se recorta la banda con las proteínas atrapadas. El gel se lava con agua, se deshidrata con acetonitrilo y se rehidrata con una solución que contiene TEAB 0.1 M y un exceso de 100 veces de NAS-*d*₃ con respecto a los grupos amino. La reacción

se incuba a temperatura ambiente por una hora y se repite el procedimiento una vez más. Al finalizar se lava y deshidrata el gel y se trata con hidroxilamina al 5% por 20 minutos. Seguidamente, el gel es nuevamente lavado y deshidratado para rehidratarlo con la solución que contiene BCA 50 mM y tripsina (1:50 enzima:sustrato). La digestión se incuba a 37 °C durante 16 horas. La mezcla de péptidos se extrae en presencia de agua/acetonitrilo/ácido fórmico. Los péptidos se desalan mediante cromatografía de RP, se secan y se almacenan a -80 °C hasta el momento de análisis por LC-MS/MS.

4.8. Preparación de muestras en Filtros (FASP)

El extracto de proteínas se carga en filtros con corte de 10 kDa y se somete a un intercambio de solución con TEAB 0.1 M, SDS 0.5%, SDC 0.5%. Posteriormente se le adiciona NAS-*d*₃ para un exceso de 100 veces con respecto a la cantidad de grupos aminos y se incuba por una hora. Como en los métodos anteriores la reacción se lleva a cabo en dos pasos. Al concluir la reacción la solución se intercambia con una que contenga 5% de hidroxilamina y se incuba por 20 minutos para revertir las reacciones colaterales de O-acetilaciones. Para llevar a cabo la digestión enzimática de las proteínas se intercambia la solución por otra que contenga BCA 50 mM, SDC 0.5% y se le añade tripsina en una proporción de 1:50 (enzima:sustrato). La reacción se incuba a 37 °C por 16 horas y seguidamente los péptidos son colectados por centrifugación. Para eliminar el detergente la mezcla de péptidos se trata de la misma forma que en el método de preparación de muestras en solución.

4.9. Fraccionamiento de péptidos

Las mezclas de péptidos seleccionadas para fraccionar por cromatografía de RP pH básico se disuelven en formiato de amonio 50 mM pH 10 y se cargan en un sistema de ultra-rendimiento de cromatografía líquida (UPLC por sus siglas en inglés) (UPLC ultimate 3000 de la compañía Dionex, USA). Para la cromatografía el sistema UPLC está equipado con una columna de RP (3.9 X 150 mm) de la compañía Waters (USA) y las soluciones para la corrida son las siguientes: A-) formiato de amonio 50 mM en agua pH 10 y B-) formiato de amonio 50 mM en acetonitrilo/agua (60:40) pH 10. La muestra se pasa a la columna a un flujo de 0.8 mL/min en la solución A y se deja desalar durante 10 minutos. El gradiente de elución va de 0 a 80% de la solución B en 50 minutos, de 80 a 100% de B en 5 minutos y se mantiene al 100% de B por otros 5 minutos. Por

cada muestra se colectan 30 fracciones, una cada dos minutos. Finalmente las fracciones se agrupan en 5 fracciones finales, cada una de ellas compuesta por fracciones individuales separadas por 5, como ejemplo la fracción final 1 se compone de las fracciones individuales 1, 6, 11, 16, 21, y 26. Cada fracción final se seca en centrifuga roto- evaporadora, se desala por cromatografía de RP y se vuelve a secar y se almacena a -80 °C hasta el momento de su análisis por LC-MS/MS.

4.10. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

El análisis por LC-MS/MS se realiza en un sistema nano UPLC Dionex Ultimate 3000 RSLC acoplado en línea con un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive de Thermo Fisher Scientific. Las muestras primeramente son atrapadas en una precolumna (Magic AQ C18; 3 μm -200 \AA ; 2 cm x 100 μm ID) y posteriormente separadas en un gradiente de elución de 250 minutos empleando una columna capilar (Nikkyo Technos Co; Magic AQ C18; 3 μm -100 \AA ; 15 cm x 75 μm ID). El flujo de trabajo es de 250 nL/min y las fases móviles se componen de las soluciones: A-) 2% acetonitrilo, 0.1% ácido fórmico en agua y B-) 0.1% ácido fórmico en una mezcla 90:10 (v:v) acetonitrilo:agua. Los péptidos a medida que van saliendo de la cromatografía son analizados en el espectrómetro de masas que opera en modo positivo y con adquisición dependiente de datos (DDA) en un rango de masas completo de 300-2,000 Th. Las 10 señales más intensas con dos más cargas son seleccionadas en el cuadrupolo y fragmentadas con el método HCD a una energía de colisión normalizada (NCE por sus siglas en inglés) del 27%. Los iones precursores se analizan a una resolución de 70,000 (a 200 m/z) y los iones fragmentos se detectan con 17,500 de resolución. La ventana de selección de los precursores es de 2 Th.

Todos los datos derivados de los análisis por espectrometría de masas, generados en este proyecto, fueron depositados en el repositorio del ProteomeXchange Consortium a través de PRIDE [82] y se encuentran públicos para consulta de toda la comunidad con el identificador PXD005903 (<https://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD005903>).

4.11. Identificación/cuantificación de péptidos/proteínas y análisis bioinformático

El análisis de identificación y cuantificación relativa de péptidos y proteínas a partir de los datos generados de las mediciones por LC-MS/MS se realiza con el programa MaxQuant v1.5.3.30. Para

la búsqueda se fijan la enzima de corte como Arg-C y todos los residuos de cisteína como carbamidometil-cisteína. Como modificaciones variables se incluyen los residuos de lisina y el extremo N de las proteínas con acetilación normal (d_0) y pesada (d_3), así como fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina y oxidación en metionina. Las proteínas se identifican con una tasa de descubrimiento falso (FDR por sus siglas en inglés) del 1% empleando la estrategia “target-decoy”, que se incluye en el análisis con el programa MaxQuant. La base de datos de secuencias de proteínas que se usa como referencia es la reportada en el repositorio UniProt para el proteoma humano con identificador UP000005640, liberada el 30 de abril de 2016. El análisis cuantitativo se realiza mediante la estrategia libre de marcaje (label-free), solo son consideradas aquellas proteínas con al menos dos péptidos en la categoría de “razor-unique”, que hayan sido identificados por MS/MS.

Los mismos datos generados del análisis por LC-MS/MS son útiles para determinar la estequiometría de la acetilación en todos los péptidos identificados con residuos de lisina en su secuencia. El programa que se emplea para este análisis es el Pview [25], que calcula la estequiometría de la acetilación basado en el área de la distribución isotópica en el espectro MS de los péptidos identificados. Los parámetros empleados para la identificación con este programa son similares a los que se emplean con el programa MaxQuant y adicionalmente se le incorporan otros parámetros necesarios para el cálculo del grado de ocupación de los sitios de acetilación. Para el cálculo de estequiometría solo se permite una tolerancia de 5 ppm para los picos de las distribuciones isotópica y solo se consideran aquellos péptidos con al menos tres picos en su distribución isotópica.

Los cálculos de índice de GRAVY (del inglés *grand average of hydropathy*) para determinar la hidrofobicidad de péptidos y proteínas se determinan con un programa en-línea (<http://www.gravy-calculator.de/>) desarrollado en la Universidad de Greifswald por el Dr. Stephan Fuchs. Todo el análisis de enriquecimiento de vías y procesos biológicos de los diferentes grupos de proteínas identificadas se realizan con el programa DAVID v6.8, que se encuentra disponible en-línea en el sitio de DAVID Bioinformatics Resources [83]. Las imágenes de western blots se procesan con el programa ImageJ y las gráficas y cálculos estadísticos se obtienen con ayuda del programa GraphPad Prism v7.03.

5. Resultados

5.1. Estrategia general

La acetilación en los residuos de lisina de las proteínas es una modificación postraduccional que en la última década, a raíz de los grandes avances que ha tenido la espectrometría de masas, se ha descubierto que afecta un gran número de proteínas, más allá de las histonas y algunos factores de transcripción. Sin embargo, estudios recientes aportan indicios de que esta PTM, en la gran mayoría de los sitios de acetilación ocurre en muy baja estequiometría. La estequiometría de la acetilación o su grado de ocupación consiste en determinar cuántas o que proporción del total de moléculas de una proteína dada, se encuentran ocupadas por acetilación en un determinado residuo de lisina.

Para determinar de forma experimental el grado de ocupación de los sitios de acetilación, nosotros creemos que una buena estrategia consiste en llevar a cabo una reacción de acetilación que incorpore isótopos pesados y estables, en todos los residuos de lisina. Esta estrategia está soportada por varios criterios; 1- solo los residuos de lisina que tengan en grupo épsilon amino libre o mono-metilado son susceptibles de modificarse por la reacción de acetilación, 2- los residuos acetilados endógenamente no son alterados por la reacción química, 3- la incorporación de isótopos pesados no altera las propiedades físico-químicas de los péptidos con respecto a los acetilados endógenamente con la composición normal de isótopos en la naturaleza, 4- la enzima tripsina que hidroliza el enlace peptídico en el carboxilo de los residuos lisina y arginina, no es capaz de hidrolizar en enlace en residuos de acetyl-lisina, por lo que con la estrategia se generan solo péptidos comprendidos entre residuos de arginina, y 5- en el análisis por espectrometría de masas se ionizan con igual eficiencia los péptidos con ambas modificaciones lo que permite que estimar con precisión la abundancia de la acetilación endógena con respecto a la incorporada químicamente que representa la proporción de moléculas no afectadas por la PTM. En la Figura 4 se muestra de forma esquemática en que consiste la estrategia para determinar la estequiometría de la acetilación.

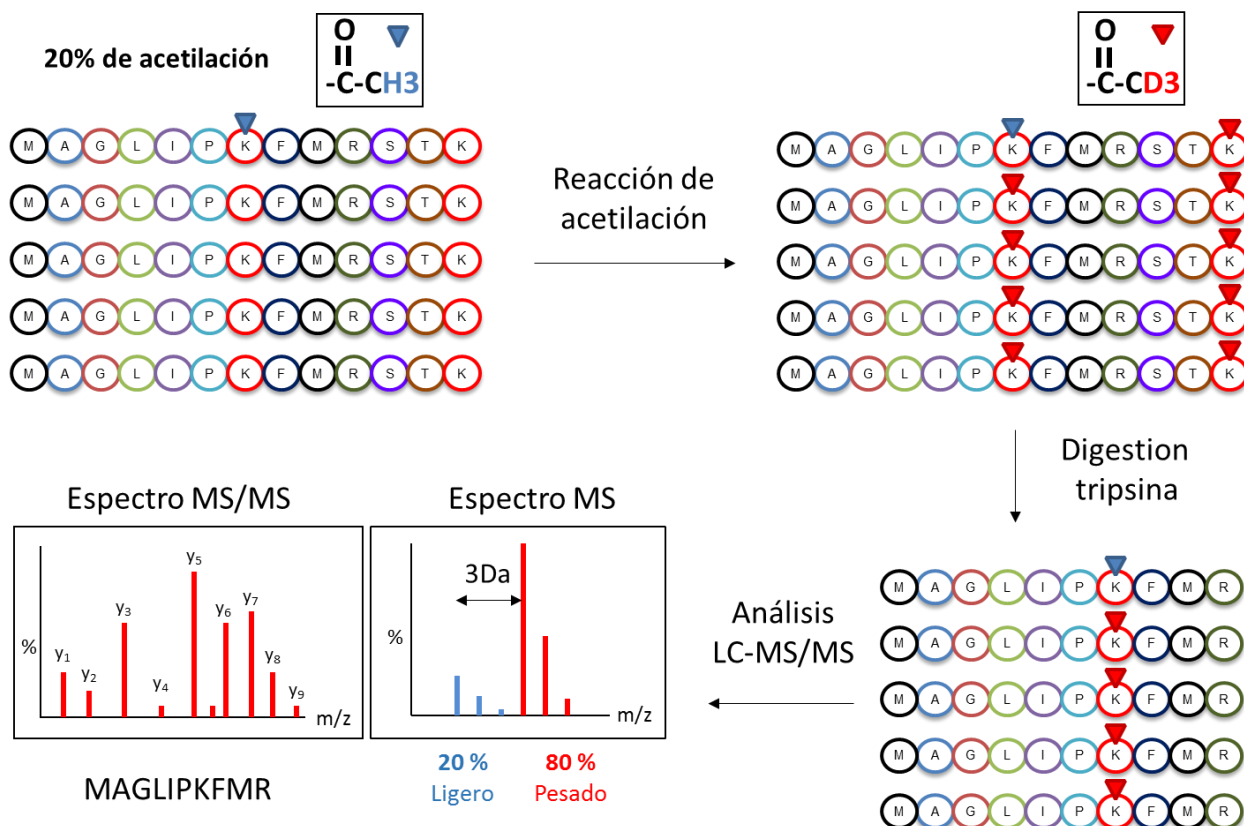


Figura 4. Estrategia general para determinar el grado de ocupación de los sitios de acetilación. Esquemáticamente se muestra que una proteína hipotética tiene un sitio de acetilación ocupado en el 20% de las copias que existen de la proteína. Seguidamente se hacen reaccionar todos los residuos de lisina que no están modificados, con grupo acetilo marcado con isótopos pesados. La digestión con tripsina genera péptidos comprendidos entre residuos de arginina. Los péptidos son analizados por LC-MS/MS, en el espectro MS se observan las distribuciones isotópicas correspondientes a la fracción del péptido con acetilación endógena y la fracción del péptido con acetilación química, y en el espectro MS/MS se determina la secuencia del péptido.

La estrategia general de trabajo en este estudio, se decidió aplicarla al análisis de varias células de origen humano. Brevemente, las proteínas son extraídas y sometidas a una reacción de acetilación química con isótopos pesados incorporados. Una vez modificadas las proteínas, estas son tratadas con tripsina que solo va a hidrolizar el enlace peptídico en residuos de arginina. Finalmente, los péptidos generados son analizados por espectrometría de masas donde para los péptidos con algún grado de acetilación endógena se observa una distribución isotópica compleja en el espectro MS, misma que permite calcular con precisión la estequiometría de la acetilación para cada péptido identificado. Esta estrategia fue propuesta y aplicada al proteoma de *E. coli* [25] y más recientemente al estudio de la acetilación en muestras de histonas en células de mamíferos [26]. Nosotros nos planteamos en este proyecto mejorar algunos aspectos en la metodología que

consideramos incrementarán considerablemente la calidad de los resultados sobre todo al ser aplicada a un proteoma mucho más complejo como es el del humano.

5.2. Desarrollo de la metodología

En el diseño de la metodología tuvimos en cuenta varios aspectos que consideramos críticos para lograr resultados de calidad, que no habían sido abordados en trabajos anteriores. Para evitar pérdidas de proteínas por precipitación, la extracción de proteínas se realizó con un método sencillo pero eficiente que incluye la presencia de alta concentración de SDS y DTT. La presencia de estos compuestos garantiza no solo que se mantengan en solución hasta las proteínas más hidrofóbicas, sino que también se desnaturalizan e inhiben todas las enzimas que puedan alterar la muestra como proteasas, fosfatasas y desacetilasas. La calidad de la extracción de proteínas fue confirmada mediante análisis por SDS-PAGE de las tres líneas celulares que se incluyeron en el estudio.

Para el procesamiento de las muestras se decidió comparar tres de los métodos más comúnmente empleados en proteómica: preparación de muestras con la ayuda de filtros (FASP), preparación de muestras en gel (GSP) y preparación de muestras en solución (SSP). Como agente alquilante se decidió emplear el derivado del NHS, NAS- d_3 en vez del anhídrido acético deuterado, que es el agente alquilante que comúnmente se emplea para la reacción de acetilación de grupos aminos primarios. La decisión parte de nuestro conocimiento previo acerca de las características de la reacción con el anhídrido acético. La reacción es muy violenta a temperatura ambiente, por lo que genera muchas reacciones colaterales en residuos con grupos hidroxilo. El anhídrido acético es un líquido poco estable en soluciones acuosas, como en la que están disueltas las proteínas. Durante la reacción uno de los productos que se genera es ácido acético y su acumulación baja considerablemente el pH de la solución. Como consecuencia la reacción pierde la especificidad por los grupos aminos. Para garantizar el pH durante el tiempo que está transcurriendo la reacción es necesario adicionar grandes cantidades del tampón y/o adicionar hidróxidos como el hidróxido de sodio. Esta adición afecta severamente la estabilidad de las proteínas. Por su parte el NAS- d_3 es un compuesto sólido, más estable en solución acuosa, como producto de la reacción se genera NHS que no modifica el pH del medio y permite emplear soluciones tampones a concentraciones bajas que no afecten la estabilidad de las proteínas. Adicionalmente, la reacción deja mucho menos reacciones colaterales, las cuales pueden ser revertidas tratando la muestra con hidroxilamina.

En el momento de concepción del proyecto no encontramos proveedor del que pudiéramos adquirir el reactivo NAS- d_3 , por lo que se decidió sintetizarlo en el laboratorio y evaluar la calidad del producto antes de proseguir con el desarrollo de la metodología. Como fue descrito en la sección metodológica, los precursores de la síntesis son anhídrido acético deuterado y NHS y los productos NAS- d_3 y ácido acético. Como el NAS- d_3 no es soluble en ácido acético, aparece como precipitado a medida que avanza la reacción. La calidad del producto se evaluó con la proteína modelo citocromo C. En la Figura 5 se observan los espectros MS de la digestión con tripsina de la proteína citocromo C, antes de la reacción (espectro azul) y después de modificarse sus grupos aminos libres con dos reactivos, NAS- d_0 y NAS- d_3 (espectro rojo). La reacción con los reactivos sintetizados fue completa y selectiva para los grupos aminos libres. En las condiciones de reacción no observamos ninguna evidencia de que la reacción haya sido incompleta ni la presencia de modificaciones colaterales en otros residuos. Por lo que concluimos que el reactivo sintetizado estaba apto para ser empleado en la modificación de las proteínas.

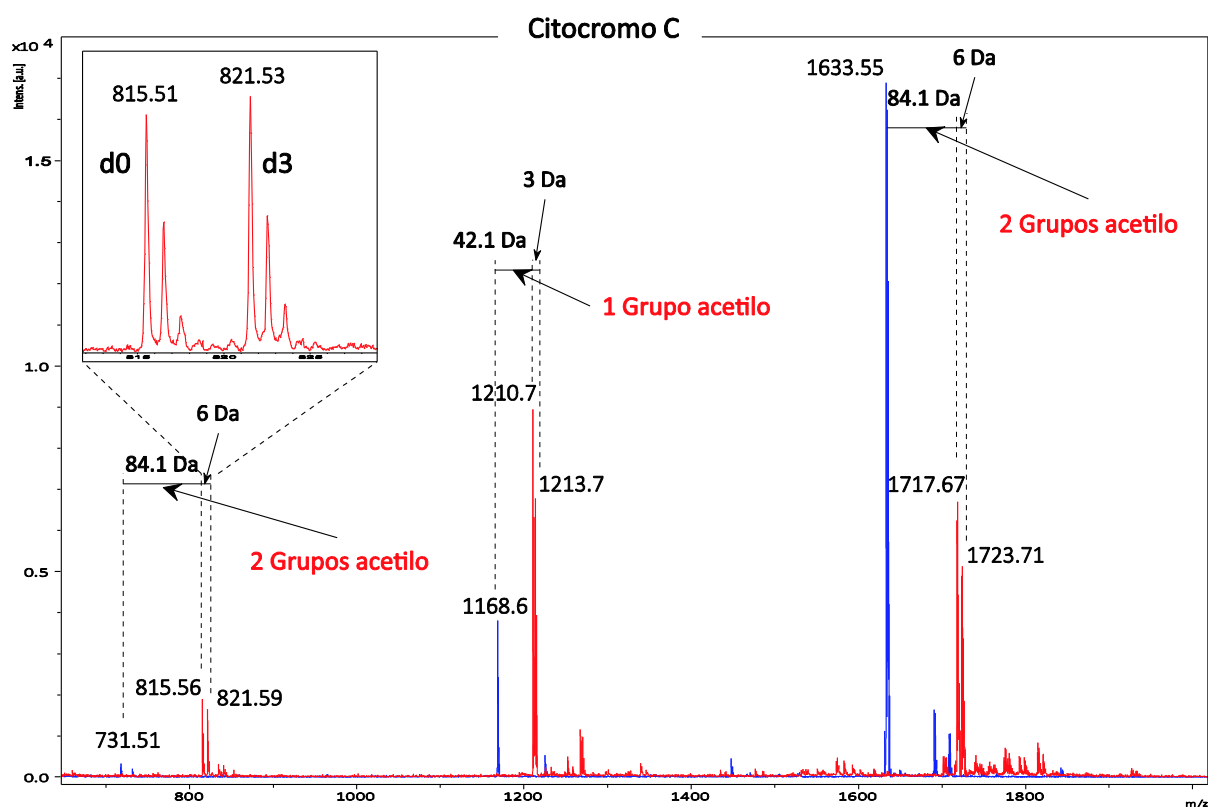


Figura 5. Espectros MALDI-MS de péptidos generados con tripsina de la proteína modelo citocromo C. Espectro azul corresponde a péptidos no modificados químicamente. Espectro rojo corresponde a una mezcla de péptidos acetilados químicamente con NAS- d_0 y NAS- d_3 . La región del espectro aumentada corresponde a una mezcla 1:1 de péptidos acetilados con NAS- d_0 o NAS- d_3 .

La preparación de la muestra con el método FASP fue reportada como método de elección para preparar muestras en estudios de proteómica, porque evita pérdidas en proteínas en pasos de cambio de soluciones necesarios durante el procesamiento de la muestra [84]. En este trabajo nosotros modificamos el método para adaptarlo a los pasos de nuestra estrategia (Figura 6). Brevemente, en un primer paso incluimos un cambio de la solución en que se extrajeron las proteínas por una compatible con la reacción de acetilación. La presencia de dos detergentes (SDS y SDC) garantiza que las proteínas se mantengan en solución, a la vez que no afectan el siguiente paso de acetilación de los grupos aminos libres. La reacción en dos pasos asegura que la totalidad de los grupos aminos libres sean modificados, ya que si la reacción no es completa todo el cálculo de estequiometría estaría comprometido. Seguidamente se intercambia la solución por la que contiene hidroxilamina para eliminar todas las posibles reacciones colaterales. Una vez concluido el tratamiento, la digestión de las proteínas se realiza en presencia de SDC que es un detergente compatible con tripsina [85] y garantiza que las proteínas se mantengan en solución. Finalmente, los péptidos generados son colectados por centrifugación y el detergente eliminado por extracción con acetato de etilo en medio ácido.

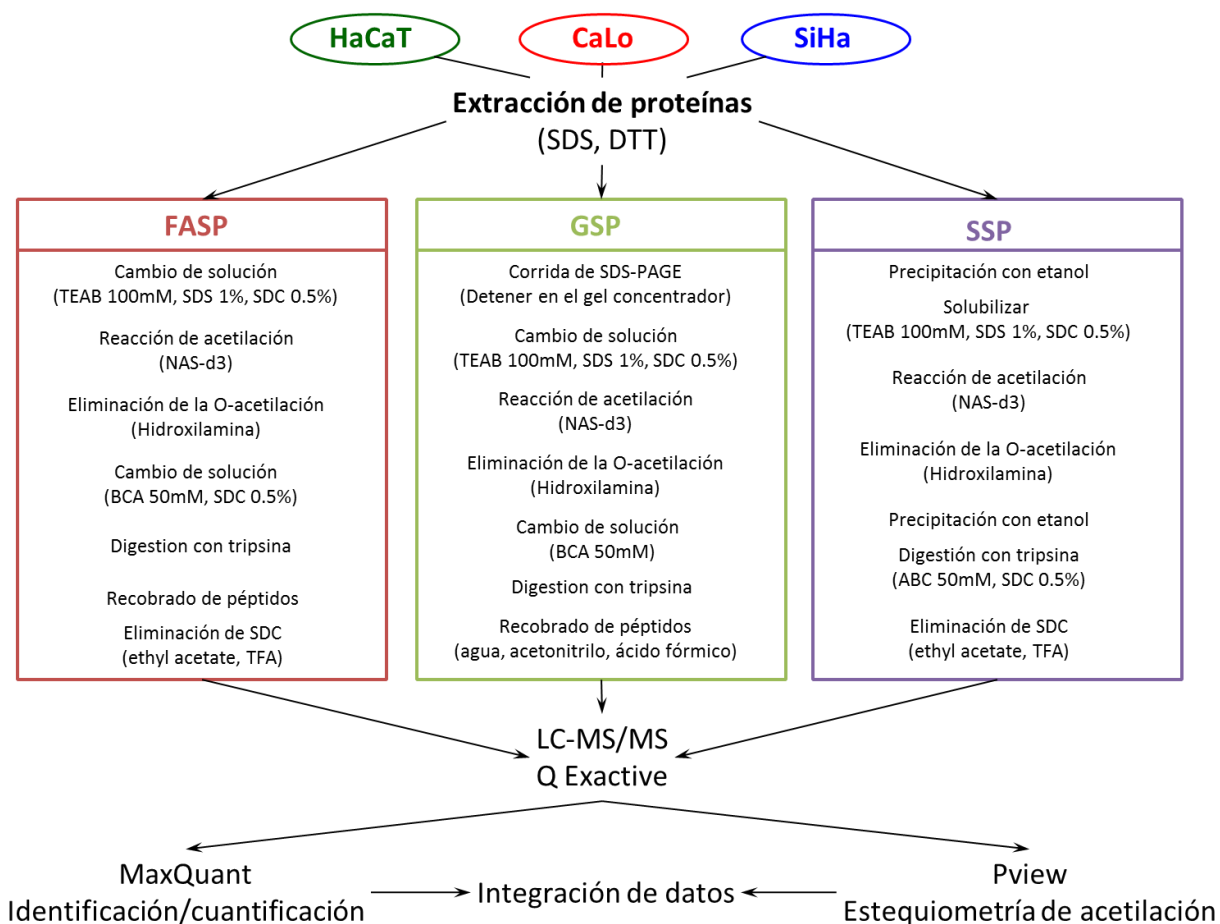


Figura 6. Representación esquemática del flujo de trabajo para estudios de estequiometría de la acetilación a nivel de proteoma, mediante tres estrategias diferentes: FASP (preparación de muestras asistido por filtros), GSP (preparación de muestras en gel) y SSP (preparación de muestras en solución). Todas las estrategias incluyen un paso de acetilación con NAS- d_3 y las modificaciones colaterales se revierten con tratamiento con hidroxilamina. Todas las muestras son analizadas en igualdad de condiciones en un sistema de LC-MS/MS de alta resolución. Los datos obtenidos de todas las estrategias, son analizados con dos programas diferentes (MaxQuant y Pview), para reportar tanto la identificación cuantificación relativa, como los resultados relacionados con la ocupación de los sitios de acetilación.

El segundo método de preparación de muestras que se sometió a evaluación en este proyecto fue el GSP (Figura 6). Con este método las proteínas son atrapadas en un gel de poliacrilamida, lo que permite cambiar de solución fácilmente a las proteínas sin el riesgo de que se pierdan con la solución desechada. Las muestras con este método son cargadas en el gel en la misma solución con la cual fueron extraídas. Una vez las proteínas dentro del gel, se cambia la solución de corrida por la que contiene el agente alquilante NAS- d_3 , como se detalla en la sección experimental. Una vez concluida la reacción y su correspondiente paso de tratamiento con hidroxilamina, las proteínas son digeridas con tripsina. Con este método no es necesario incluir SDC durante la

digestión ya que las proteínas se encuentran suspendidas en el enrejado de poliacrilamida con muy poca capacidad de movilidad. Finalmente, los péptidos como son de menor tamaño, son recuperados del gel mediante extracción con solución de agua/acetonitrilo/ácido fórmico.

La última estrategia de preparación de muestras que evaluamos en este proyecto, SSP consiste en procesar las muestras en un tubo y precipitar las proteínas cada vez que se requiera cambiar la solución (Figura 6). Los pasos de precipitación con frecuencia se tratan de evitar en proteómica por las pérdidas asociadas a la resolubilización de las proteínas en la nueva solución. Sin embargo, esta estrategia no posee los problemas relacionados con el recobrado final de los péptidos inherentes a los otros dos métodos evaluados. Con el método SSP las proteínas son precipitadas con etanol y redisueltas en una solución compatible con la reacción de acetilación de sus residuos de lisina. La incorporación de dos detergentes (SDS y SDC) asegura que las proteínas se vuelvan a disolver con facilidad. La reacción de acetilación, como en los otros dos métodos, se realiza en dos pasos y seguidamente se adiciona hidroxilamina para la reversión de las reacciones colaterales. Nuevamente, el exceso de reactivos y de SDS es eliminado con un paso de precipitación. Para la digestión con tripsina de las proteínas, la muestra se disuelve en presencia de SDC que ayuda a disolver las proteínas y facilita la digestión. Una vez concluida la digestión, el detergente es fácilmente eliminado con acetato de etilo y TFA, manteniéndose los péptidos en la fase acuosa.

Los péptidos generados por las tres estrategias de preparación de muestras son analizados por LC-MS/MS. Debido a la complejidad de la muestra, tratándose de un extracto de proteínas totales, se decidió analizar las muestras en un gradiente de 250 minutos que garantice una buena separación de los péptidos. El espectrómetro de masas empleado en la adquisición de los datos es un equipo de alta resolución que asegura una muy alta relación señal/ruido, imprescindible para el análisis de estequiometría en péptidos acetilados, sobre todo para aquellos que sus residuos identificados acetilados posean muy baja ocupación por esta PTM. Los datos obtenidos del análisis se procesan con dos programas independientes: el MaxQuant para la identificación de péptidos y proteínas y cuantificación libre de marcaje; y el Pview que identifica los péptidos y proteínas y calcula el grado de ocupación de los péptidos que contienen residuos de lisina.

5.3. Análisis comparativo entre los métodos de preparación de muestra

Los métodos fueron evaluados en tres líneas celulares de origen humano: HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados), SiHa (línea celular de cáncer cérvico-uterino positiva a HPV-16) y CaLo (línea celular de cáncer cérvico-uterino positiva a HPV-18). Para cada método aplicado a cada línea celular se realizaron tres réplicas biológicas independientes. La evaluación de los métodos consistió en determinar el número de péptidos y proteínas identificadas y comparar las distribuciones por masas moleculares y por hidrofobicidad de los péptidos y proteínas. Los valores de péptidos y proteínas identificados por método y por línea celular se encuentran resumidos en la tabla 1. En la Figura 7A-B se muestran las distribuciones por valores de masa molecular e hidrofobicidad de los péptidos identificados agrupados por método de preparación de muestra y en la Figura 7C-D las mismas distribuciones para las proteínas.

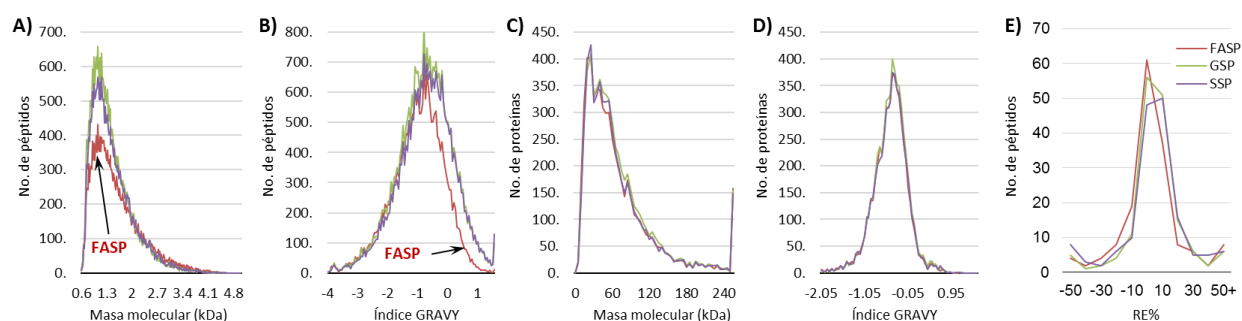


Figura 7. Distribución de péptidos y proteínas identificados para cada método de preparación de muestra de acuerdo a masa molecular e hidrofobicidad. A) y C) Distribución de péptidos y proteínas respectivamente, por masa molecular. B) y D) Péptidos y proteínas respectivamente, distribuidos por hidrofobicidad. E) Distribuciones de los errores relativos (RE%) reportados para los resultados del cálculo de ocupación de la acetilación de los péptidos identificados acetilados con las tres estrategias de preparación de muestras.

A nivel de proteínas identificadas los patrones de ambas distribuciones son muy similares para los tres métodos. Esto indica que al menos a nivel de proteínas ninguno de los métodos le impone un sesgo al análisis. Sin embargo, a nivel de péptidos si observamos diferencias en los patrones de distribución. Por el método FASP se identificaron menos péptidos comparado con los otros métodos y la distribución por valores de masa molecular, indica que no estamos perdiendo los péptidos de mayor tamaño, como podría esperarse teniendo en cuenta que los péptidos se colectan por centrifugación. La gráfica de distribución por hidrofobicidad claramente nos indica que los péptidos más hidrofóbicos son los que presentan problemas para ser analizados mediante el método FASP. Aun cuando este sesgo no tiene consecuencias a nivel de proteínas, seguramente porque

incluso las proteínas más hidrofóbicas producen péptidos hidrofílicos cuando son digeridas con tripsina, esto puede sesgar nuestro estudio de estequiometría de la acetilación. Esta pérdida de péptidos conlleva a la identificación de menos péptidos con residuos de lisina y por consiguiente menos péptidos a los que se les puede determinar su ocupación por acetilación. El número de péptidos y proteínas acetilados identificados en este estudio están resumidos en la tabla 1.

Tabla 1. Número de proteínas y péptidos identificados por cada método en cada línea celular. Número de péptidos con residuos de lisina identificados y número de péptidos y proteínas identificados con sitios acetilados endógenamente.

	HaCaT	CaLo	SiHa	Todas
Proteínas identificadas				
FASP	4896	4537	3910	5800
GSP	4788	4894	5164	6105
SSP	4821	4522	4548	5825
Todos	6180	6116	6071	7196
Péptidos identificados				
FASP	18387	15509	11622	23730
GSP	18807	21582	22486	30815
SSP	22011	18926	19023	28616
Todos	33893	32658	31512	45823
Péptidos con residuos de lisina				
FASP	12066	10194	7425	15406
GSP	11233	12872	13492	18306
SSP	12968	11346	11440	17024
Todos	20291	19660	18803	27527
Péptidos acetilados				
FASP	898	732	437	1608
GSP	939	1059	1171	2359
SSP	1026	905	849	1909
Todos	2378	2304	2110	4557
Proteínas acetiladas				
FASP	685	581	351	1063
GSP	718	803	865	1478
SSP	748	689	655	1223
Todos	1433	1399	1325	2217

En cada método evaluado se partió de igual cantidad de proteínas para la preparación de las muestras, sin embargo, al momento del análisis por LC-MS/MS, para analizar cantidades similares de material se inyectaron cantidades diferentes por método. En las muestras generadas por el

método FASP se inyectó en el sistema de LC-MS/MS el equivalente a 4 μg de proteínas en la muestra de partida. Para el caso de las muestras generadas con el método GSP se inyectó el equivalente a 5 μg . Los mejores recobrados se lograron con el método SSP, donde por cada corrida de LC-MS/MS se inyectaron 2 μg con respecto al contenido proteico de partida. Teniendo en cuenta que a nivel de proteínas identificadas no se observó ningún sesgo en las distribuciones por masas moleculares ni por hidrofobicidad, llegamos a la conclusión de que el paso final para recuperar los péptidos en los métodos FASP y GSP es el más crítico en el rendimiento total de las muestras. En el método FASP resultaron más difíciles de recuperar los péptidos hidrofóbicos, mientras que en el método GSP, donde ningún sesgo para algún grupo particular de péptidos fue observado, todos los péptidos fueron afectados de forma similar. En el caso del método SSP, donde los recobrados fueron mejores, no fue necesario ningún paso de recuperación de los péptidos. En este caso, en la misma solución que se obtuvieron los péptidos se realizó la extracción del detergente SDC, por lo que los péptidos se mantuvieron en la solución acuosa.

A pesar de que algunos de los métodos presentan algunas desventajas, con el análisis conjunto de los tres métodos se identificaron grupos de péptidos y proteínas complementarios. En promedio el número de péptidos identificados por cada método fue de 18,700 para cada línea celular. Sin embargo, el promedio de péptidos identificados por línea celular combinando los tres métodos fue de 32,600. Estos resultados muestran una complementariedad entre los métodos, ya que de forma individual por cada método se identificaron alrededor del 60% de los péptidos que se identificaron con los tres métodos. Estos datos pudieran ser diferentes, con mayor solapamiento, si antes del análisis por LC-MS/MS se incluyera un paso de pre-fraccionamiento de péptidos.

Otro aspecto que consideramos importante a la hora de evaluar los métodos es la variabilidad en el reporte de los valores de estequiometría de la acetilación. Adicionalmente, resulta imprescindible determinar si existe algún sesgo inherente a cada método en la cuantificación de esta modificación. Para este análisis seleccionamos todos los péptidos identificados acetilados por medio de las tres estrategias. Primeramente calculamos el coeficiente de variación (CV%) entre las tres mediciones de la estequiometría para cada péptido y se determinó que la inmensa mayoría de las mediciones para cada péptidos tienen un CV% inferior al 20%, lo que es a nuestro criterio un valor muy aceptable. El CV% nos aporta una idea de la dispersión de los datos; sin embargo, si alguno de los métodos impone una tendencia ya sea hacia valores más altos o más bajos no

podríamos determinarlo con este cálculo. El Error Relativo (RE%) nos aporta una idea clara si alguno de los métodos provoca una subestimación o sobreestimación en el cálculo de la estequiometría de la acetilación. Se calculó el RE% para cada medición de la estequiometría en cada método, asumiendo que el valor absoluto fue el reportado para cada péptido teniendo en cuenta los tres métodos. Adicionalmente, se graficó la distribución de los RE% para cada método (Figura 7E). Las distribuciones de los RE% nos indicaron que ninguno de los métodos altera el valor de la medición de la estequiometría. Por lo que podemos concluir que independientemente de la estrategia de preparación de la muestra que se elija, se pueden obtener resultados similares en cuanto a valores de estequiometría de la acetilación.

5.4. Identificación y estequiometría de péptidos y proteínas acetiladas

Teniendo en cuenta que ninguno de los métodos de preparación de muestra aporta valores particularmente erróneos al cálculo de la estequiometría de la acetilación, combinamos los resultados obtenidos por los tres métodos para reportar la estequiometría de la acetilación de los péptidos en cada célula. La forma de combinar los resultados de los tres métodos se basa en la premisa de que los péptidos con señales más intensas en el espectro MS, sus valores de cuantificación son mejores por tener mayor relación señal/ruido, por tanto deben aportar más al valor de cuantificación final. Adicionalmente, solo reportamos valores de estequiometría de acetilación para aquellos péptidos que fueron identificados con un FDR menor al 1% por dos programas independientes (MaxQuant y Pview). También fueron excluidos del reporte aquellos péptidos con menos de tres picos en las distribuciones isotópicas, tanto de la ligera (acetilación endógena), como de la pesada (acetilación química) y los péptidos con un error en el valor de la señal de la distribución isotópica superior a 5 ppm.

Con estos criterios fuimos capaces de detectar acetilación endógena, al menos en un sitio, en aproximadamente el 25% de las proteínas identificadas en cada línea celular (1,433 en HaCaT, 1,399 en CaLo y 1325 en SiHa). Las proteínas identificadas acetiladas se analizaron con ayuda del programa DAVID, para determinar cómo se distribuyen estas proteínas en los diferentes compartimientos celulares. Como resultado se encontró que dos estructuras celulares se encuentran particularmente enriquecidas en proteínas acetiladas, el ribosoma y el nucléolo (Figura 8). Adicionalmente, se observó que la línea celular SiHa tiene significativamente menos proteínas acetiladas, particularmente en estas dos estructuras celulares. En cada línea celular con las

estrategias empleadas fuimos capaces de identificar alrededor de 1,200 proteínas de membranas y en el análisis se determinó que estas se encuentran entre los blancos más frecuentes de acetilación.

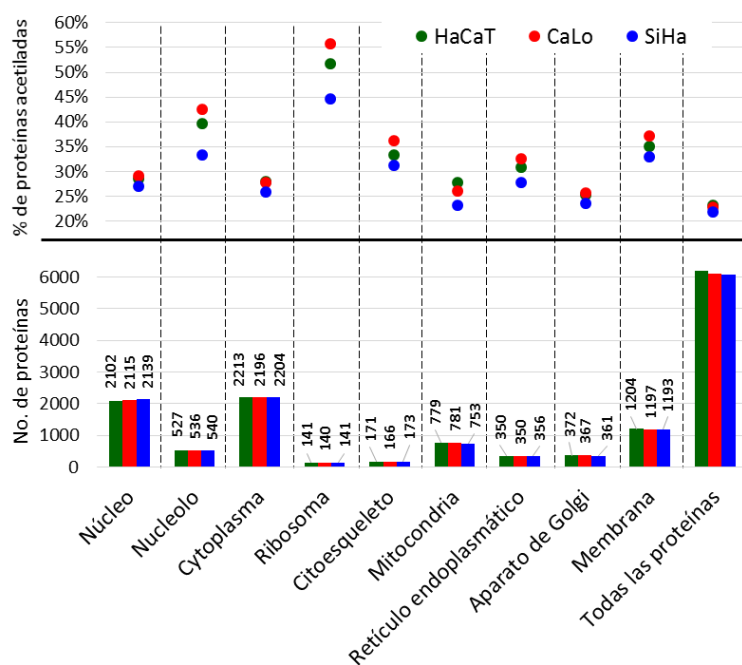


Figura 8. Proteínas identificadas en cada línea celular, distribuidas según su compartimiento celular (abajo) y el porcentaje de estas proteínas que fueron encontradas acetiladas en el estudio (arriba).

Los resultados obtenidos confirman que la acetilación es una modificación postraduccional muy extendida, que afecta muchas proteínas involucradas en un gran número de procesos biológicos y vías, en todos los compartimientos celulares. Mediante un análisis de enriquecimiento de vías biológicas se determinó que la acetilación en residuos de lisina es más frecuente en proteínas involucradas en el metabolismo de carbono y ácidos grasos, y en la biosíntesis de aminoácidos. Más del 40% de las proteínas identificadas que pertenecen a estas vías fueron encontradas acetiladas (Figura 9). Inesperadamente, se encontró que la línea celular SiHa tiene una mayor proporción de proteínas acetiladas en estas vías metabólicas que las otras dos líneas celulares. Entre las vías enriquecidas en proteínas acetiladas también encontramos las vías de transcripción y traducción, con un alto porcentaje de proteínas de las tres líneas celulares en estudio.

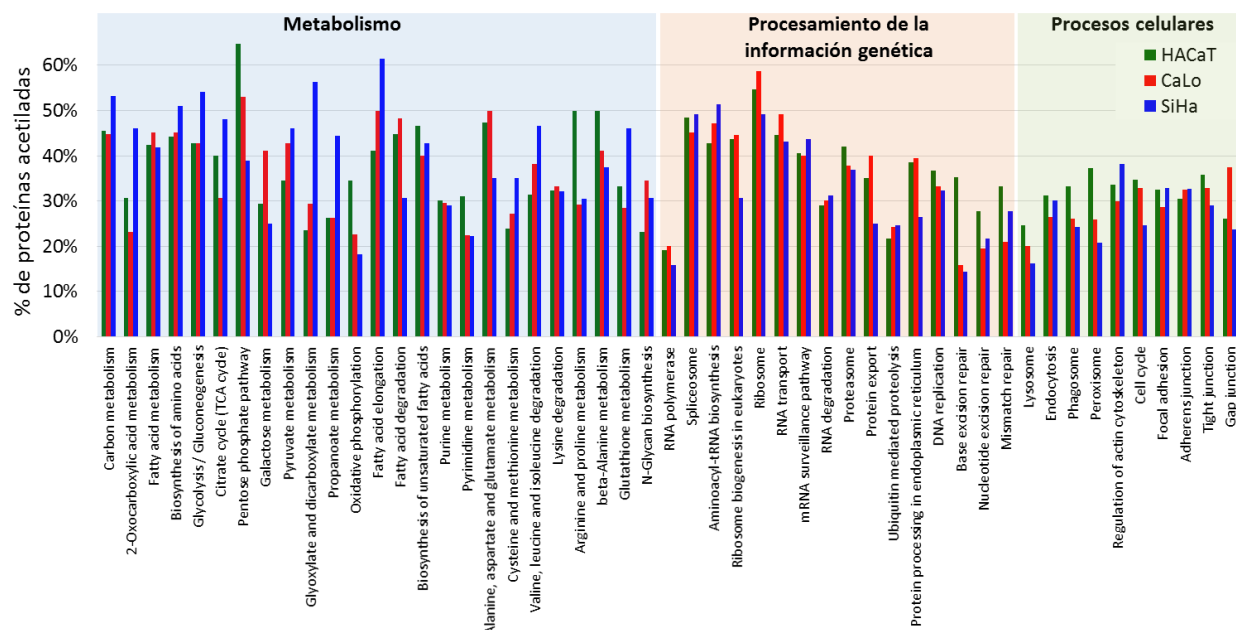


Figura 9. Proteínas acetiladas distribuidas según la vía biológica en la que están involucradas. Las proteínas están representadas como el porcentaje del total de proteínas identificadas para la vía en cada línea celular.

El análisis de estequiometría de la acetilación realizado en este proyecto confirma los indicios de que la acetilación en residuos de lisina es una modificación que en la mayoría de los casos se presenta con un bajo grado de ocupación de sus sitios blancos. Todos los péptidos identificados acetilados se distribuyeron de acuerdo a su grado de ocupación por acetilación en las tres líneas celulares (Figura 10A). Adicionalmente, el mismo análisis se hizo para los péptidos acetilados de las proteínas involucradas en las vías biológicas enriquecidas con estas proteínas (Figura 10B-F). Los resultados globales para las tres líneas celulares muestran gran similitud entre ellas, exponiendo que la mitad de todos péptidos identificados acetilados presentan una estequiometría inferior al 5%. Sin embargo, ciertos grupos de proteínas muestran patrones de estequiometría diferentes. Las proteínas ribosomales, que se encuentran entre los grupos de proteínas con más acetilaciones identificadas, están entre los grupos de proteínas con menor grado de ocupación de sus sitios. Más del 40% de los sitios de acetilación de estas proteínas se encuentran con menos del 1% de ocupación (Figura 10E). Por el contrario, la distribución del grado de ocupación de los sitios de acetilación, en las proteínas del metabolismo de ácidos grasos, así como las de su degradación y biosíntesis, muestra mayor grado de acetilación con respecto a la totalidad de los péptidos acetilados. Para estas proteínas más del 85% de sus sitios identificados tienen una ocupación superior al 1% (Figura 10D).

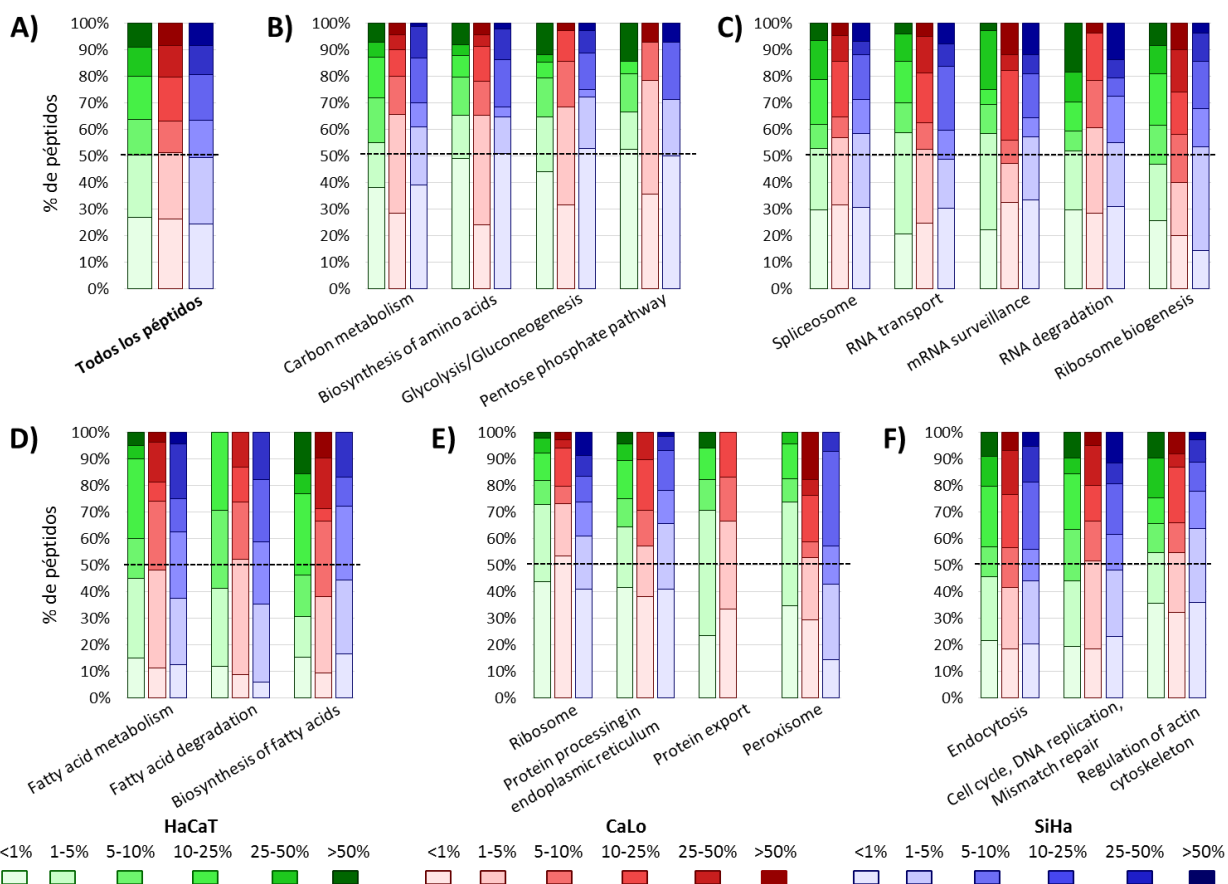


Figura 10. Distribución de péptidos identificados acetilados por grado de ocupación de los sitios de acetilación.

Los gráficos de columna muestran el número de péptidos agrupados en seis cuantiles, que representan el grado de ocupación de los sitios de acetilación. Las columnas van de más claro a más oscuro indicando de menos a más ocupación por acetilación. Los colores de las columnas se corresponden a las líneas celulares: HaCaT (verde), CaLo (rojo) y SiHa (azul). Los seis cuantiles se representan en la leyenda de figura y se corresponden a: péptidos con ocupación menor al 1% (<1%), péptidos con estequiometría de la acetilación entre 1% y 5% (1-5%), entre 5% y 10% (5-10%), entre 10% y 25% (10-25%), entre 25% y 50% (25-50%), y mayor que 50% (>50%). A) El gráfico representa todos los péptidos acetilados identificados en las tres líneas celulares. B-F) Los gráficos se corresponden con el número de péptidos de las proteínas involucradas en las vías biológicas que fueron encontradas enriquecidas con el análisis realizado con la versión en-línea del programa DAVID Bioinformatics.

La distribución de la estequiometría de la acetilación también se ha visto con diferencias entre las proteínas provenientes de diferentes compartimentos celulares. Los péptidos acetilados de las proteínas del aparato de Golgi muestran mayor ocupación en sus sitios que las proteínas del retículo endoplasmático, citoplasmáticas y nucleares. Por otro lado, los péptidos acetilados de las proteínas de membrana se encuentran entre los menos ocupados por esta PTM (Figura 11).

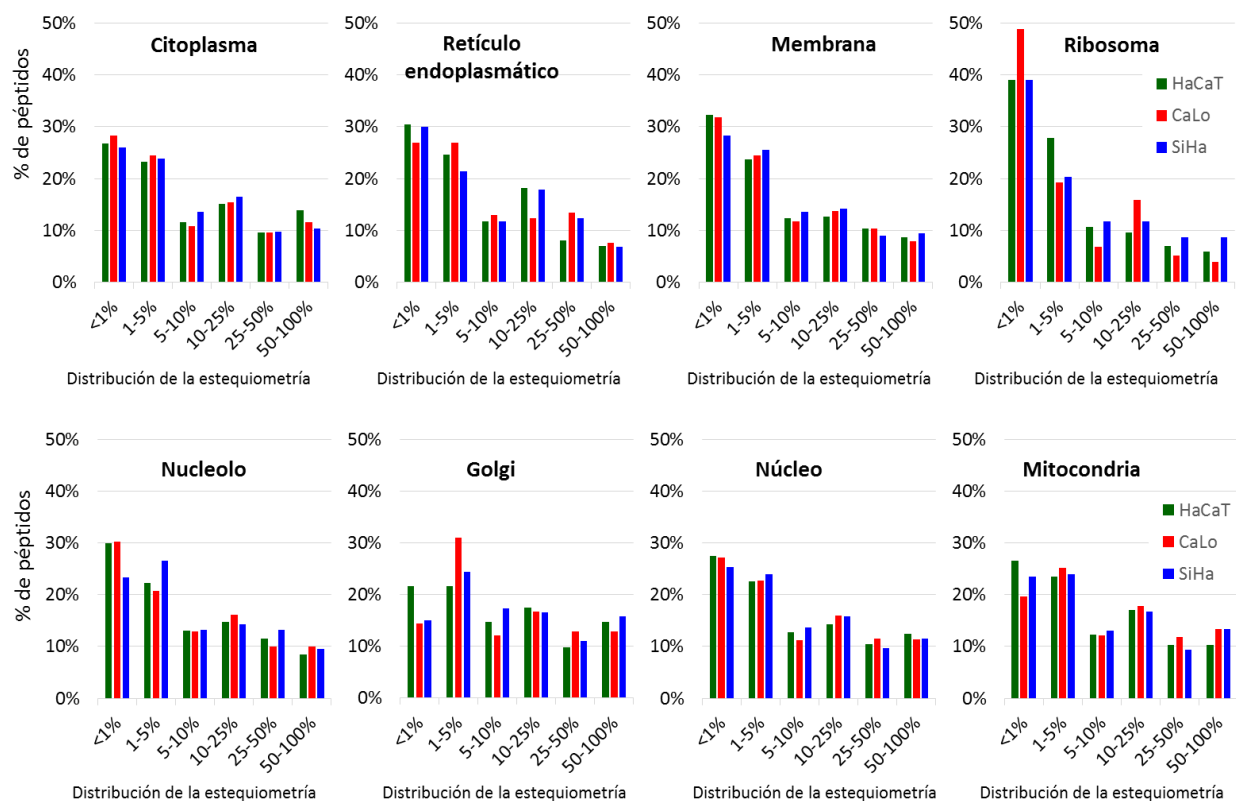


Figura 11. Distribución en cuantiles de los péptidos identificados acetilados de acuerdo al grado de ocupación de sus sitios. Cada gráfico muestra los péptidos de las proteínas según la localización celular de estas. Los seis cuantiles se corresponden a: péptidos con ocupación menor al 1% (<1%), péptidos con estequiometría de la acetilación entre 1% y 5% (1-5%), entre 5% y 10% (5-10%), entre 10% y 25% (10-25%), entre 25% y 50% (25-50%), y mayor que 50% (50-100%).

La estequiometría de la acetilación se comporta diferente para cada sitio incluso dentro de la misma proteína. Un buen ejemplo de esto lo podemos encontrar en las histonas, ampliamente conocidas por ser blancos de esta modificación. En este estudio se encontraron grandes diferencias en cuanto a estequiometría de la acetilación en los sitios reportados para estas proteínas. En las colas ubicadas hacia el extremo N de las histonas H2A, H3 y H4 se encuentran sitios con alto grado de ocupación, entre 5 y 30%. Sin embargo, hacia la región globular en el dominio central de las mismas proteínas, muy pocos residuos fueron encontrados modificados y en todos los casos, la ocupación fue inferior al 1%.

5.5. Dinámica de la acetilación en residuos de lisina

La estequiometría de la acetilación es regulada por la presencia de otras PTMs en residuos cercanos al sitio de acetilación. En este trabajo se encontraron evidencias que la metilación y la fosforilación

alteran la acetilación en al menos los residuos de lisina cercanos. La reacción de acetilación, que se realiza a nivel de proteínas de acuerdo con el diseño experimental, asegura que no solo los grupos aminos libres (aminas primarias) se acetilen completamente, sino que también las aminas secundarias como los residuos de lisina monometilados reaccionen completamente. Sin embargo, no se encontró ninguna evidencia de la coexistencia de estas dos modificaciones en el mismo residuo de forma endógena.

Un buen ejemplo que ilustra la complejidad de las interacciones entre diferentes PTMs, lo encontramos en el péptido $^{10}\text{KSTGGKAPR}^{18}$ de la histona H3. El residuo K10 fue identificado en las tres líneas celulares como no modificado, mono, di, trimetilado y acetilado. El residuo siguiente S11 se encontró sin modificar y fosforilado; y el residuo K15 del mismo péptido sin modificar y acetilado (Figura 12). El análisis estequiométrico de la acetilación en este péptido mostró que el residuo K15 es por mucho más susceptible de modificarse por acetilación que el residuo K10. A su vez el residuo K10 es blanco de metilación. En la fracción del péptido no metilado en el residuo K10, solo una pequeña fracción corresponde a este residuo acetilado endógenamente. El espectro MS/MS de la señal 494.786 Th confirma que el sitio preferido de acetilación es el residuo K15, independientemente de que el residuo K10 sea blanco de metilación (Figura 12 G-H). Del análisis estequiométrico podemos inferir que la mono y dimetilación en el residuo K10 no afecta la acetilación en el residuo K15 al ser comparado con el péptido no metilado. Sin embargo, la trimetilación en K10 si reduce la ocupación de la acetilación en K15 entre un 7 y un 10% (Figura 12F). Por otro lado, la fosforilación en S11 favorece la acetilación en K15, con un incremento de entre 7 y 25% con respecto al péptido no fosforilado. De igual manera la fosforilación en S11 afecta la metilación en K10 y probablemente su acetilación. En presencia de fosforilación en S11 no se detectó ninguna señal correspondiente a metilación o acetilación en el residuo K10 (Figura 12I-J). Estos hallazgos ilustran con claridad la complejidad de la regulación de las funciones de las proteínas a través de las PTMs y sus respectivas interacciones.

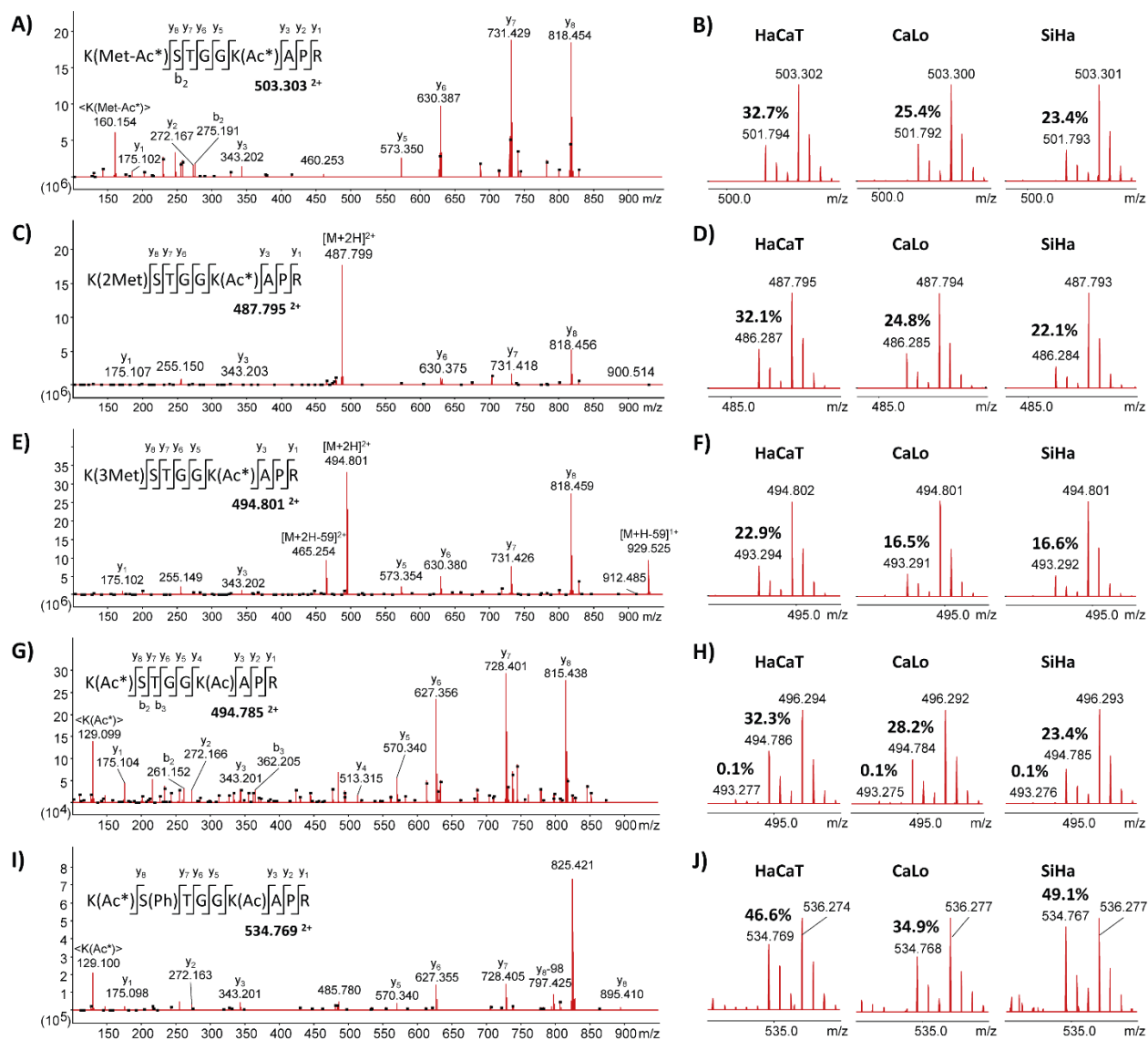


Figura 12. Espectros MS/MS y MS del péptido $^{10}\text{KSTGGKAPR}^{18}$ de la histona H3, identificado en las tres líneas celulares, con varias modificaciones postraduccionales. A), C) y E) Espectros MS/MS representativos del péptido con el residuo K10 mono, di y trimetilado respectivamente. B), D) y F) Espectros MS donde se muestran para las tres líneas celulares, las distribuciones isotópicas del péptido con el residuo K10 mono, di y trimetilado. Los valores reportados corresponden con el grado de acetilación endógena en el residuo K15. En todos los casos se confirmó mediante MS/MS que el residuo K15 se encuentra acetilado. G) Espectro MS/MS representativo del péptido con el residuo K15 acetilado endógenamente. H) Espectro MS del péptido acetilado en las tres líneas celulares. Los valores reportados corresponden con el grado de acetilación endógena en uno y los dos residuos de lisina. I) Espectro MS/MS representativo del péptido con el residuo S11 fosforilado y el residuo K15 acetilado. J) Espectro MS del péptido fosforilado y acetilado, en las tres líneas celulares. Los valores reportados se corresponden con el grado de acetilación endógena en el residuo K15.

Además de otras modificaciones postraduccionales rodeando al sitio de acetilación, pequeños cambios o diferencias en la composición de aminoácidos pueden alterar la estequiometría en sitios de acetilación. Dos de las variantes de la histona H3, H3.1 y H3.3 solo se diferencian en cinco

residuos, la mayoría de ellos se localizan en la región globular de la proteína con relevancia para ubicación específica dentro del genoma [86]. En la región del extremo N estas variantes solo difieren en un residuo en la posición 32. En las variantes canónicas (H3.1/H3.2) el residuo 32 es alanina mientras que en la histona H3.3 este es sustituido por la S32. Los péptidos $^{28}\text{KSAPATGGVKKPHR}^{41}$ de la histona H3.1/H3.2 y $^{28}\text{KSAPSTGGVKKPHR}^{41}$ de la histona H3.3 fueron identificados en las tres líneas celulares. De acuerdo con los resultados del análisis estequiométrico, solo uno de los tres residuos de lisina en su secuencia es blanco de acetilación. En todas las variantes y líneas celulares el grado de acetilación del residuo modificado es menor al 5%. Los residuos K28 y K37 también fueron identificados metilados en ambas variantes de histona (Figura 13).

La dinámica de acetilación se comporta diferente según la variante de histona. Cuando los péptidos no están metilados, el grado de ocupación por acetilación del péptido de la variante H3.3 se encontró 2.5 veces mayor que el mismo péptido de las variantes H3.1/H3.2 (Figura 13A y 13D). En ambos casos cuando el residuo K28 está metilado, no se observa acetilación alguna (Figura 13B y 13E). Este resultado indica que muy probablemente estas dos modificaciones están compitiendo por el mismo residuo. Debido a la baja estequiometría de la acetilación en los péptidos no se pudo confirmar por MS/MS la ubicación exacta del sitio de acetilación. Por otro lado, la metilación en K37 altera de forma diferente la acetilación en ambos péptidos. En el caso de la histona H3.1/H3.2 la ocupación del sitio de acetilación se incrementó al menos 2.5 veces en comparación con el péptido no metilado, mientras que en la variante H3.3 la acetilación disminuyó al menos 1.5 veces (Figura 13C y 13F). La histona H3.3 reemplaza a las variantes canónicas en varias regiones del genoma, generalmente en sitios de inicio y regiones de transcripción de genes activos, en los telómeros y otras regiones regulatorias [87]. Según nuestros resultados, es posible que la sustitución del residuo A32 por S32 en la variante H3.3 sea la responsable del incremento en la acetilación en el residuo K28 y por consiguiente este reemplazo favorezca la transcripción activa de los genes. Adicionalmente, pudiera estar involucrada en la comunicación entre acetilación y metilación en estas moléculas.

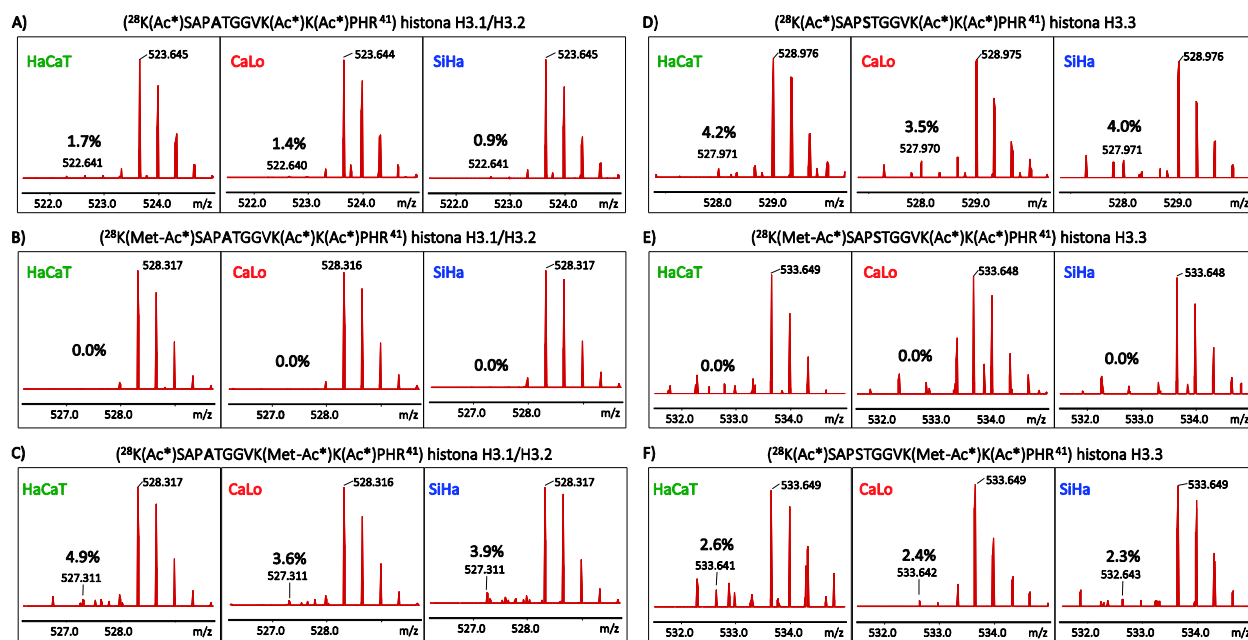


Figura 13. Espectros MS que muestran las distribuciones isotópicas del péptido $^{28}\text{K(SAPATGGVKKPHR}^{41})$ de la histona H3.1/H3.2 y el péptido $^{28}\text{K(SAPSTGGVKKPHR}^{41})$ de la histona H3.3. A) péptido de la histona H3.1/H3.2 acetilado en las tres líneas celulares. Los valores corresponden al grado de acetilación endógena. B) y C) Corresponden al péptido de la histona H3.1/H3.2 con los residuos K28 y K37 metilados respectivamente. D) Péptido de la histona H3.3 acetilado. Los valores corresponden a grado de acetilación endógena calculado. E) y F) Corresponden al péptido de la histona H3.3 con los residuos K28 y K37 metilados respectivamente. Todas las secuencias reportadas aquí fueron confirmadas en su totalidad por MS/MS.

5.6. Proteómica cuantitativa y acetilómica

Los métodos de preparación de muestra GSP y SSP no tuvieron sesgo en la identificación de péptidos ni de proteínas por lo que se decidió usar los datos experimentales provenientes de estos métodos, para análisis de proteómica cuantitativa libre de marcaje comparando las tres líneas celulares. Al analizar las enzimas desacetilasas identificadas en el estudio, se encontró que SIRT1 fue la que más diferencias entre las líneas celulares mostró. SIRT1 tiene niveles más elevados en SiHa que en las otras dos líneas celulares. Estos resultados fueron confirmados por western blot (Figura 14A-B). Teniendo en cuenta este hallazgo, se seleccionaron todas aquellas proteínas con péptidos identificados acetilados en las tres líneas celulares que sus valores de estequiometría de acetilación sean menores en SiHa con respecto a las otras dos líneas celulares. Con estas proteínas se realizó una búsqueda de las vías y procesos biológicos enriquecidos en esta lista de proteínas. Posteriormente, para las vías y procesos enriquecidos se determinaron los perfiles proteómicos de todas las proteínas de cada uno de ellos, incluyendo aquellas que no fueron detectadas acetiladas, con vistas a analizar el efecto de la acetilación sobre la vía o proceso.

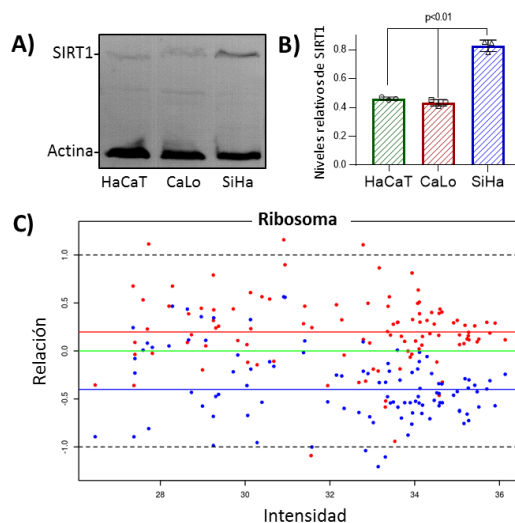


Figura 14. Los niveles de SIRT1 correlacionan negativamente con la abundancia de las proteínas ribosomales. Análisis por western blot confirmó que SIRT1 es significativamente más abundante en SiHa que en HaCaT y CaLo. A) Imagen representativa del análisis por western blot de un extracto de proteínas totales de las tres líneas celulares, usando anticuerpos contra SIRT1 y actina. B) Los niveles de SIRT1 fueron calculados con respecto a los niveles de actina, con ayuda del programa ImageJ, a partir de tres réplicas independientes. Las barras de errores representan la desviación estándar de las mediciones. C) gráfica de R-I para analizar la abundancia relativa de las proteínas ribosomales de CaLo y SiHa con respecto a HaCaT, con datos de proteómica cuantitativa libre de marcaje. Los puntos rojos y azules representan las proteínas de CaLo y SiHa respectivamente. Los valores están dados por la relación de las intensidades $\text{Log}_2(\text{CaLo o SiHa}/\text{HaCaT})$ y las intensidades en HaCaT $\text{Log}_{10}(\text{HaCaT})$. Las líneas horizontales representan las medianas para cada línea celular con respecto a HaCaT (verde: HaCaT, rojo: CaLo y azul: SiHa).

Un total de 215 péptidos correspondientes a 196 proteínas se encontraron con menos acetilación en SiHa que en las otras dos líneas celulares. Entre las vías y procesos biológicos más enriquecidos se encontraron el ribosoma, el spliceosoma, la vía de la glucólisis, el procesamiento del ARNr, la biogénesis de los ribosomas, el transporte de ARN, la reparación del ADN la expresión de genes, la adhesión celular, el procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico, entre otros. Para establecer el vínculo entre la acetilación potencialmente regulada por SIRT1 y el efecto sobre la vía con los posibles blancos, en el análisis cuantitativo de proteómica, se tomaron como referencia los niveles de la línea celular no cancerosa HaCaT. Uno de los grupos con resultados más sobresalientes fue el ribosoma. Para este grupo de proteínas, la gráfica de relación contra intensidad (R-I) (Figura 14C), claramente mostró que estas proteínas se encuentran sub-representadas en SiHa con respecto a HaCaT y CaLo. Esta observación fue más evidente para las proteínas más abundantes de acuerdo a sus valores de intensidad, donde los valores de cuantificación son más confiables. Un análisis estadístico mostró que las medianas para este grupo de proteínas son significativamente diferentes entre las tres líneas celulares. Otras proteínas involucradas en vías

como la biogénesis de los ribosomas y el procesamiento del ARNr tuvieron un comportamiento similar. Estos resultados sugieren que SIRT1 juega un papel de regulador negativo sobre estas vías en particular. Sin embargo, estos resultados no son conclusivos ya que otros factores, no determinados en este estudio, pueden estar influyendo sobre estas vías. Estas dudas pueden ser aclaradas y confirmados estos hallazgos al tratar las células con un inhibidor específico y selectivo para SIRT1. La inhibición selectiva de SIRT1 nos va a proveer de datos que nos ayuden a esclarecer el papel de SIRT1 en la regulación de los sitios de acetilación, las vías y los procesos biológicos descritos como posibles blancos de esta enzima.

5.7. Análisis proteómico y acetilómico en células tratadas con un inhibidor de SIRT1

EX-527 es un inhibidor potente y selectivo para SIRT1 con una CI de 38 nM. Este inhibidor es entre 200-500 veces más selectivo para SIRT1 que para SIRT2 o SIRT3, que son las sirtuinas que muestran mayor homología con SIRT1 [88]. EX-527 no posee efecto inhibitorio sobre la actividad desacetilasa de otros miembros de las clases I, II y IV de las KDACs (HDAC1-11). Para evaluar el efecto a nivel de expresión de proteínas y variación en la estequiometría de los sitios de acetilación, se usaron las tres líneas celulares analizadas con anterioridad (HaCaT, CaLo y SiHa). Las células cultivadas hasta una confluencia de entre 70-90% se trataron con el vehículo (control) o con 1 μ M de EX-527 por 24 h. El tratamiento se realizó por triplicado en el mismo momento y el estudio se realizó por duplicado en días diferentes. Posterior a la inhibición de SIRT1 se procedió al análisis de la estequiometría de la acetilación y proteómica cuantitativa. Todas las muestras se analizaron según el método SSP, en dos experimentos independientes. Para cada experimento las muestras de partida se conformaron de las tres réplicas realizadas en el día y las otras tres réplicas se usaron en el siguiente experimento. Para este estudio a gran escala se realizó un pre-fraccionamiento de los péptidos antes del análisis por LC-MS/MS. En total 5 fracciones fueron analizadas por cada muestra (Figura 15).

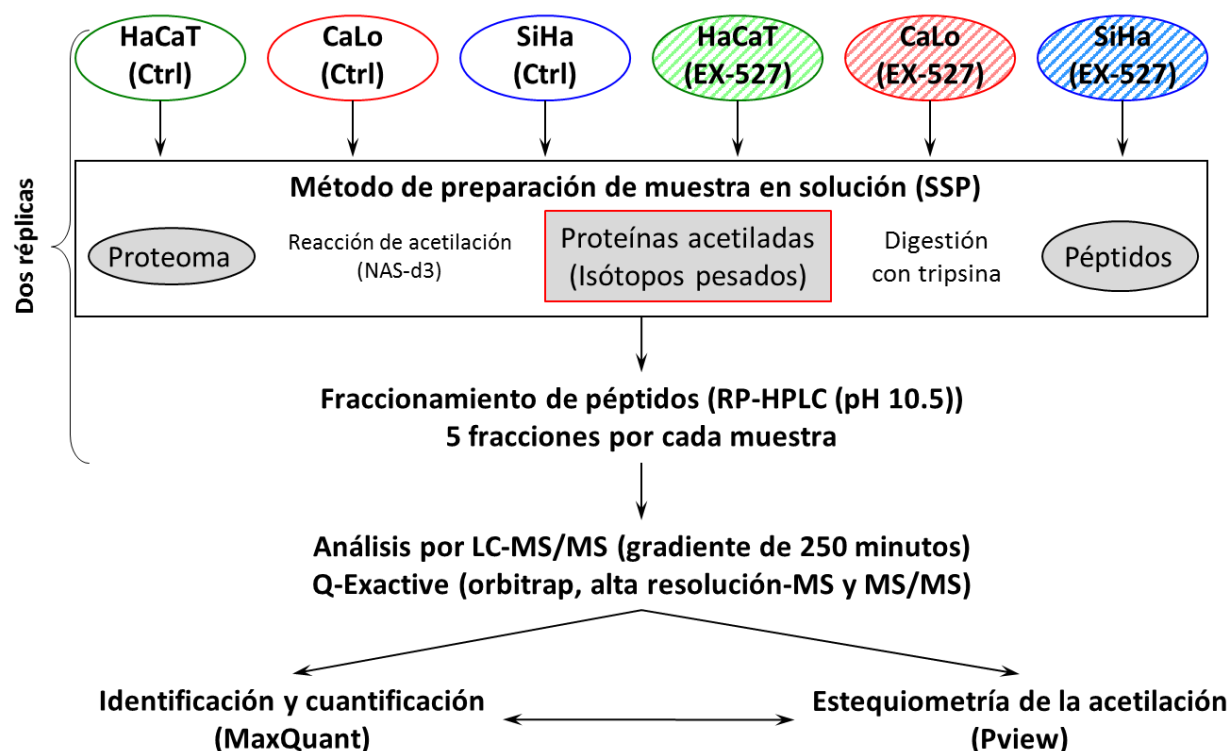


Figura 15. Representación esquemática de la estrategia experimental seguida para analizar la estequiometría de la acetilación y las abundancias relativas de las proteínas en las tres líneas celulares control (Ctrl) y tratadas con el inhibidor selectivo para SIRT1 (EX-527). Las células fueron tratadas con el vehículo (Ctrl) y con EX-527 1 μ M durante 24 h. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo por el método SSP descrito con anterioridad. La mezcla de péptidos fue sometida a un paso de prefraccionamiento del cual se obtuvieron cinco fracciones finales por cada muestra. Cada fracción fue analizada en un sistema de LC-MS/MS de alta resolución con un gradiente de elución de 250 minutos. Los datos generados fueron analizados con la ayuda de dos programas, MaxQuant para la identificación y cuantificación relativa de las proteínas siguiendo la estrategia libre de marcaje y con el programa Pview para identificación y cuantificación de la estequiometría de la acetilación.

El número total de proteínas identificadas por cada línea celular, con la incorporación del prefraccionamiento de péptidos se elevó de aproximadamente 6,120 proteínas sin el paso de fraccionamiento a 9,150 con la incorporación de este paso. Adicionalmente, el número de sitios de acetilación detectados, en comparación con el mismo método de preparación de muestra sin fraccionar, se incrementó un 60%. Sin embargo, la complementariedad que aporta el uso de métodos diferentes de preparación de muestras es muy alta y como consecuencia el número de sitios de acetilación no se incrementó con el paso de pre-fraccionamiento, si se compara con la suma de los tres métodos de preparación de muestra.

La inhibición de SIRT1 con EX-527 no afectó el crecimiento normal de las células durante las 24 h de tratamiento, con respecto a las células tratadas con el vehículo. El análisis de la estequiometría

de la acetilación se realizó en las tres líneas celulares, en las dos condiciones experimentales evaluadas. Los resultados mostraron que en la línea celular HaCaT se detectaron 1,500 péptidos acetilados en el control y 1,911 en el tratado, en CaLo fueron 1,696 péptidos en el control y 1,588 en las células tratadas, mientras que para SiHa los péptidos acetilados identificados fueron 1,639 y 1,510 en el control y tratamiento respectivamente. Todos los péptidos detectados acetilados fueron distribuidos en cuantiles por rangos de valores de ocupación de los sitios de acetilación. Los rangos de valores seleccionados fueron los mismos empleados en el estudio anterior y las distribuciones para cada línea celular de péptidos provenientes de las muestras control y tratadas se muestran en la Figura 16. En la línea celular HaCaT a pesar que el número de péptidos acetilados fue mayor, las distribuciones fueron similares. Sin embargo, en las líneas celulares cancerosas encontramos que, en ambos casos, el número de péptidos acetilados fue menor en las muestras tratadas con EX-527 que en las muestras control, aunque las distribuciones muestran un ligero corrimiento hacia mayor ocupación de los sitios de acetilación. Sorprendentemente, encontramos varios sitios de acetilación, que con la inhibición de SIRT1 disminuyen su acetilación. En un estudio reciente realizaron la misma observación tras la inhibición de todas las clases de KDACs con 19 inhibidores diferentes [80].

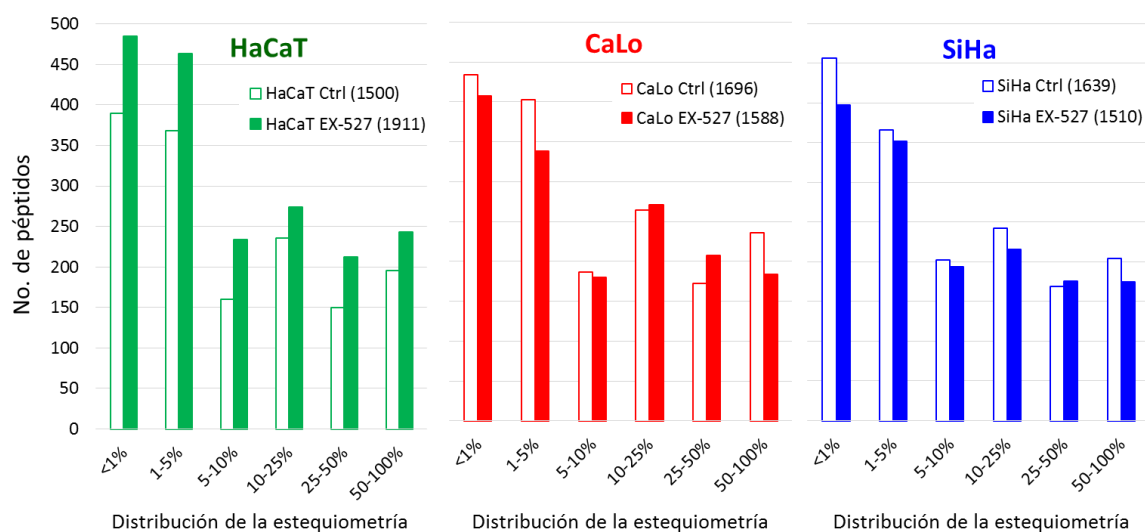


Figura 16. Distribución en cuantiles de los péptidos identificados acetilados de acuerdo al grado de ocupación de sus sitios. Cada gráfico muestra los péptidos identificados en cada línea celular en las dos condiciones experimentales evaluadas en el estudio. Las columnas con relleno vacío corresponden a las células control (Ctrl) y las columnas con relleno sólido corresponden a las células tratadas con el inhibidor de SIRT1 (EX-527). Los seis cuantiles se corresponden a: péptidos con ocupación menor al 1% (<1%), péptidos con estequiometría de la acetilación entre 1% y 5% (1-5%), entre 5% y 10% (5-10%), entre 10% y 25% (10-25%), entre 25% y 50% (25-50%), y mayor que 50% (50-100%).

Analizando de conjunto los resultados de las tres líneas celulares en estudio, identificamos 57 proteínas con sitios de acetilación que consistentemente aumentaron su estequiometría con el tratamiento con EX-527 (Material suplementario, Tabla S6, Figuras S5-S12). Del análisis de enriquecimiento de vías quedó confirmado que la mayoría de estas proteínas están relacionadas con el procesamiento del ARNr, el empalme del ARNm, el inicio de la traducción y las proteínas ribosomales, la adhesión celular y la co-traducción de proteínas dirigidas a la membrana dependiente de SRP. Todas estas vías o procesos fueron encontrados enriquecidos en el grupo de proteínas, que en el estudio anterior (líneas celulares no tratadas) fueron encontradas con menor ocupación de los sitios de acetilación en la línea celular SiHa (que sobre-expresa SIRT1 con respecto a HaCaT y CaLo). Estos resultados confirman que SIRT1 regula estos procesos a través de su actividad desacetilasa.

Para profundizar en la comprensión del papel de SIRT1, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional con aquellas proteínas de las tres líneas celulares, con péptidos que aumentaron más de 5% la ocupación en sus sitios de acetilación, tras el tratamiento con el inhibidor de SIRT1 (Material suplementario, Tabla S7). A pesar de que más del 30% de las proteínas de vías metabólicas fueron identificadas acetiladas, muy pocas tuvieron un incremento superior al 5% en las células tratadas con EX-527 (Figura 17). El mayor número de proteínas con sitios de acetilación que se incrementan con el tratamiento, están relacionadas con las vías de transcripción y traducción. Entre las líneas celulares observamos diferencias en sus respuestas ante el tratamiento con el inhibidor de SIRT1. En SiHa las proteínas metabólicas están entre las que más aumentan su acetilación, en CaLo la respuesta fue más evidente en las vías relacionadas con el procesamiento de la información genética, mientras que en HaCaT el incremento en los sitios de acetilación superior al 5% fue más significativo en proteínas involucradas en procesos celulares como endocitosis, regulación del citoesqueleto de actina y el fagosoma.

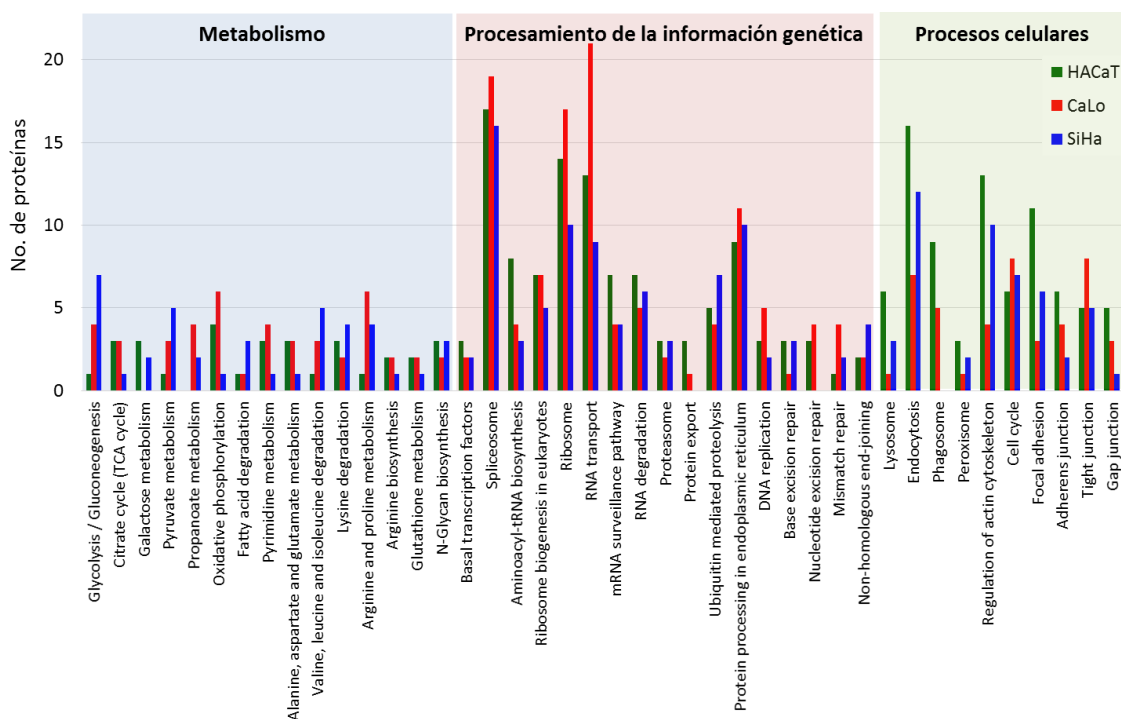


Figura 17. Número de proteínas con al menos un sitio de acetilación que incrementó su estequiometría de la acetilación más de 5% con el tratamiento con EX-527 en cada línea celular. Las proteínas están distribuidas de acuerdo a su vía biológica. El análisis de enriquecimiento fue realizado con la versión en-línea del programa DAVID Bioinformatics.

Los mismos datos provenientes de LC-MS/MS fueron usados para análisis de proteómica cuantitativa, comparando cada línea celular entre controles y tratadas con EX-527. Los resultados de perfiles de expresión de las proteínas nos permitieron determinar hasta qué punto la inhibición de SIRT1 afecta la regulación de los niveles de sus proteínas blanco y sus vías biológicas (Material suplementario, Tabla S8). En este análisis solo se incluyeron las proteínas que tuvieron respuesta similar, en cuanto a perfiles de expresión, en las tres líneas celulares y se agruparon en dos grupos: las que se observan disminuidas en las tres líneas celulares tratadas con respecto a su control y aquellas que aumentan en las células tratadas con respecto su control. Cada grupo fue sometido a un análisis de enriquecimiento de vías y procesos biológicos. Los resultados confirmaron que SIRT1 desacetila y regula negativamente vías relacionadas con el procesamiento del ARNr, la biogénesis de los ribosomas, el spliceosoma, los ribosomas, la replicación y reparación del ADN, la división celular entre otros (Figura 18A). Por el contrario, encontramos que SIRT1 regula positivamente varias vías metabólicas, el procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático, la organización del citoesqueleto y procesos como la endocitosis y el lisosoma (Figura 18B).

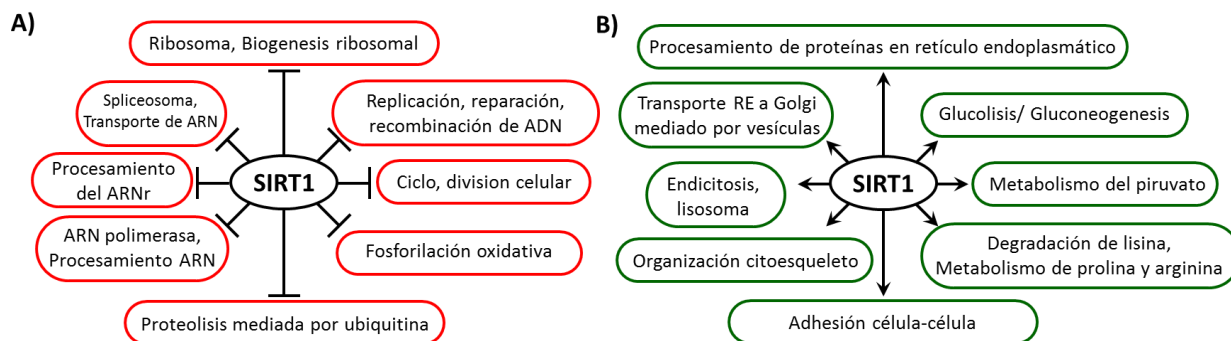


Figura 18. Vías y procesos biológicos regulados por SIRT1. A) Vías y procesos enriquecidos en proteínas que incrementaron sus niveles en todas las células tratadas con el inhibidor de SIRT1, por consiguiente reguladas negativamente por SIRT1. B) Vías y procesos enriquecidos en proteínas que disminuyeron sus niveles en todas las células tratadas con EX-527, por consiguiente reguladas positivamente por SIRT1. Los análisis de enriquecimiento se realizaron con la versión en-línea del programa DAVID Bioinformatics.

5.8. La inhibición de SIRT1 promueve la síntesis y procesamiento del pre-ARNr

De conjunto los resultados de proteómica cuantitativa y estequiometría de la acetilación en las tres líneas celulares en estudio, brindaron suficientes evidencias relacionadas con el papel de regulador maestro negativo que juega SIRT1 sobre la biogénesis de los ribosomas, desde la etapa inicial de la síntesis del pre-ARNr. Para darle solidez a estos hallazgos se decidió confirmar con otra metodología, que verdaderamente los niveles del precursor del ARNr y su producto final son regulados por SIRT1. Se decidió medir los niveles de pre-ARNr y 28S ARN por la técnica de PCR cuantitativa de tiempo real (RT-qPCR) en las tres líneas celulares en estudio. Las células fueron tratadas con el vehículo (Control) y con dos dosis crecientes del inhibidor de SIRT1 EX-527, 1 μM y 5 μM . Los resultados muestran que los niveles de pre-ARNr se incrementan significativamente en las tres líneas celulares tras la inhibición de SIRT1, mostrando una dependencia con la dosis del inhibidor EX-527 empleada (Figura 19A). Los niveles del producto 28S ARNr también mostraron un aumento de sus niveles con dependencia de la dosis de EX-527, los cuales resultaron significativos en las líneas celulares HaCaT y SiHa (Figura 19B). Estos resultados guardan relación con los niveles de SIRT1 en cada línea celular. En CaLo, que en condiciones normales de crecimiento tiene niveles de SIRT1 ligeramente inferiores a HaCaT, el aumento de los niveles de pre-ARNr a la dosis más alta de tratamiento fue de tres veces, mientras que en HaCaT fue de cinco veces. Sin embargo, para SiHa el aumento del pre-ARNr a la dosis mayor fue de más de 20 veces. A nivel del producto final 28S ARNr, el aumento fue menor que

para su precursor, lo que sugiere que la actividad de SIRT1 mayormente está relacionada con los pasos iniciales de la biogénesis de los ribosomas.

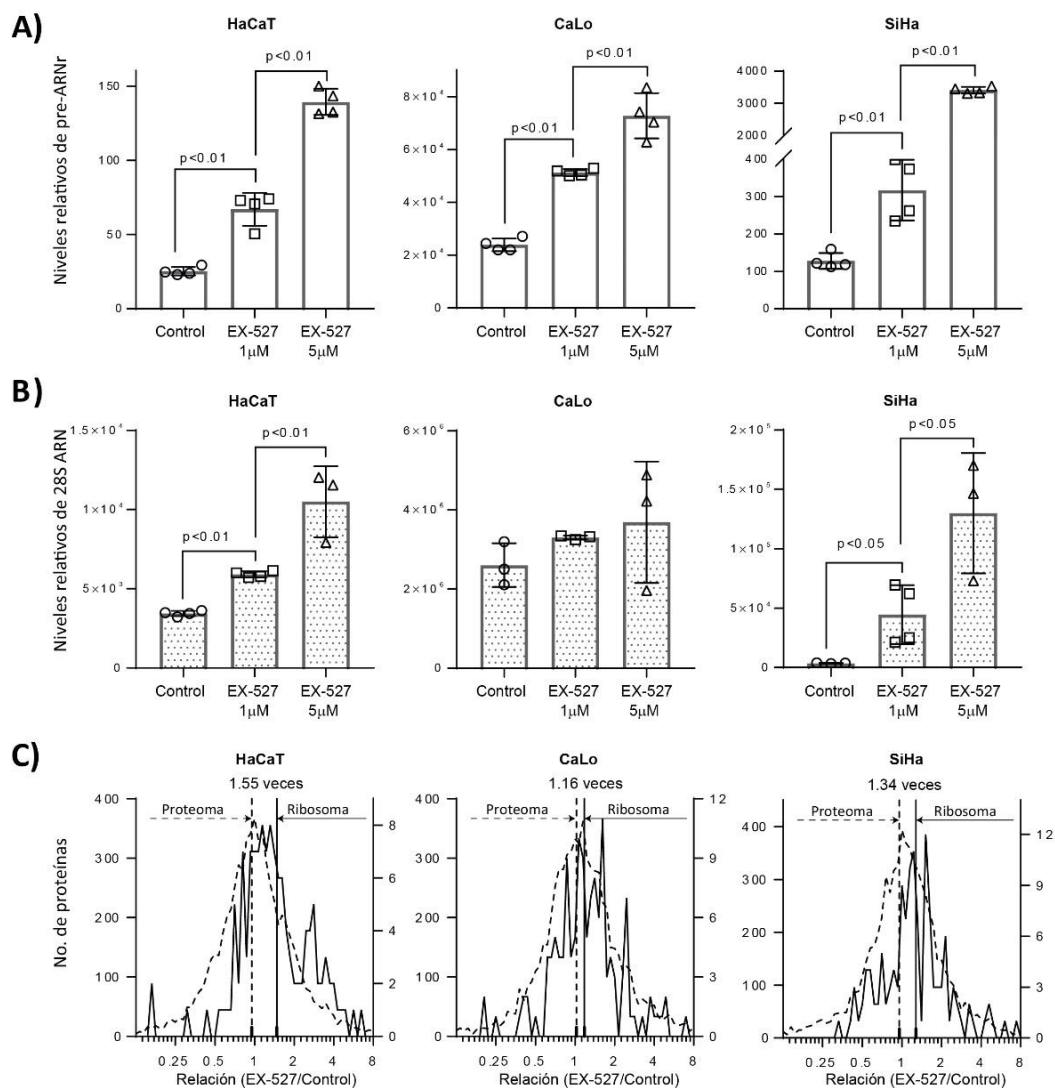


Figura 19. La inhibición química de SIRT1 por tratamiento con EX-527 incrementa los niveles de pre-ARNr y del producto maduro 28S ARNr con una dependencia de la dosis. HaCaT, CaLo y SiHa fueron tratadas con el vehículo, 1 μM y 5 μM de EX-527 por 24 horas. A) Niveles de pre-ARNr y B) Niveles de 28S ARNr determinado por RT-qPCR con respecto a los niveles de ARNm de actina. Las barras de errores representan la desviación estándar de las mediciones. C) Los niveles de los componentes proteicos del ribosoma fueron analizados como la relación entre las intensidades de las células tratadas con 1 μM con respecto a las células no tratadas. Las relaciones se distribuyeron en una escala Log2. Las proteínas ribosomales están representadas con líneas continuas y con líneas discontinuas se representaron todas las proteínas cuantificadas en el estudio. Las medias de las relaciones se muestran como líneas verticales.

Los resultados del análisis por proteómica cuantitativa realizado, que fue comparando la dosis de 1 μ M de EX-527 con el control, están en total acuerdo con las mediciones por RT-qPCR del pre y el 28S ARNr. Las proteínas ribosomales mostraron en promedio un aumento en su expresión en las células tratadas con EX-527 con respecto al control. En la Figura 19C se representan las distribuciones de las relaciones entre las intensidades de las proteínas ribosomales y de todas las proteínas en las células tratadas con respecto a los controles. Las medias de las relaciones de las proteínas ribosomales mostraron un corrimiento hacia las células tratadas en comparación con las medias de las relaciones de todas las proteínas. En este sentido, la línea celular CaLo, que el aumento en sus niveles de 28S ARNr en las células tratadas no fue significativo en ninguna de las dosis, también mostró el menor de los aumentos en la abundancia de las proteínas ribosomales.

Los resultados obtenidos directamente vinculan a SIRT1 con la regulación de la síntesis del pre-ARNr y su procesamiento. En la Figura 20 se representa de forma esquemática el proceso de síntesis del pre-ARNr, donde se etiquetaron todos los elementos que se encontraron sobre-regulados en las células tratadas con EX-527. En las condiciones evaluadas en este estudio, no se encontró que SIRT1 regulara la expresión o los sitios de acetilación del factor de transcripción nucleolar 1 (UBTF), que reconoce el promotor del gen que codifica para el ARNr. Igualmente, no se encontraron cambios en los niveles del factor terminador de la transcripción 1 (TTF-1) ni del factor liberador del transcrito y la polimerasa I (PTRF), ambos responsables de la liberación de la polimerasa I y el pre-ARNr. Sin embargo, elementos del complejo SL1, responsable del reclutamiento de la Pol I hacia el sitio de los promotores, se encontraron sobre-expresados en células tratadas. La mayoría de los miembros específicos del complejo de la Pol I, incluida la subunidad catalítica POLR1A, se encontraron sobre-reguladas en las tres líneas celulares. El factor de inicio de la transcripción específico para la ARN polimerasa I RRN3, necesario para la activación de la Pol I y su interacción con el complejo SL1 en los sitios de inicio de la transcripción, se encontró sobre-regulado en las tres líneas celulares tratadas. Finalmente como consecuencia de la sobre-regulación de la mayoría de los elementos proteicos responsables de la síntesis del pre-ARNr, esta molécula aumenta su expresión en células tratadas con EX-527.

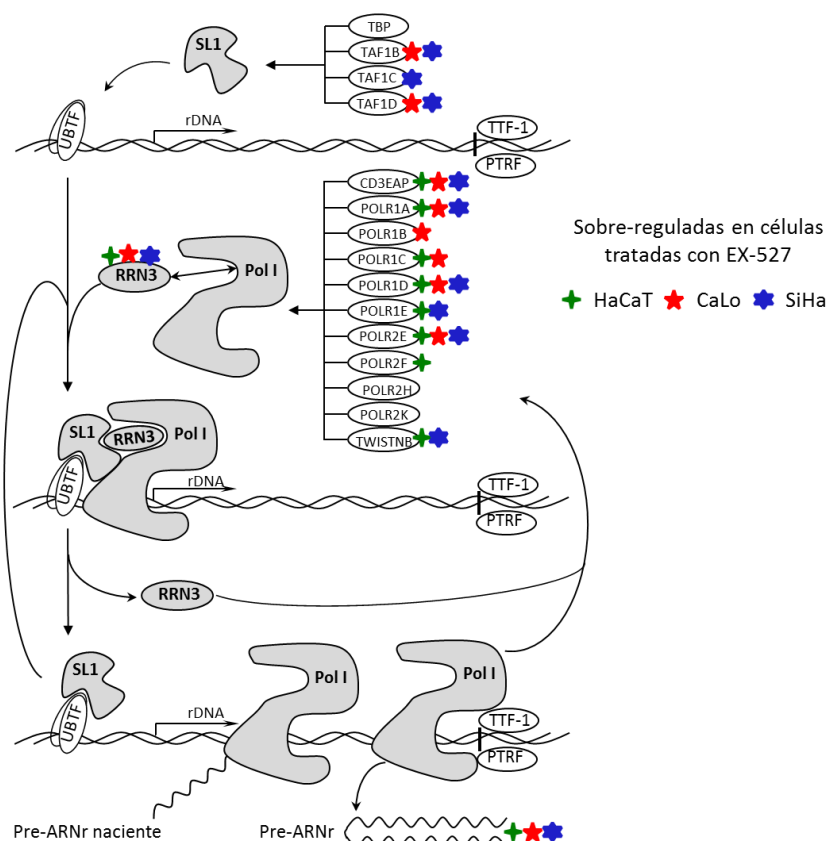


Figura 20. Representación esquemática de la síntesis del pre-ARNr y las proteínas involucradas en el proceso. La inhibición de SIRT1 incrementa los niveles de las proteínas relacionadas con la síntesis del pre-ARNr. Varios componentes del complejo SL1 necesarios para la formación del complejo de pre-iniciación se encontraron sobre-regulados en CaLo y SiHa. La mayoría de los componentes específicos del complejo de la polimerasa I se encontraron sobre-regulados en las tres líneas celulares estudiadas. La proteína RRN3 imprescindible para la activación de la polimerasa I y para su interacción con el complejo SL1 en el sitio de inicio de la transcripción también se encontró sobre-regulada en las células tratadas con EX-527.

Varias proteínas involucradas en el procesamiento del pre-ARNr para producir las moléculas de ARNr maduras, se encontraron sobre-reguladas y/o aumentada la ocupación de sus sitios de acetilación. En la Tabla 2 están resumidas las proteínas separadas por el paso específico donde actúan dentro del procesamiento del pre-ARNr y para cada proteína se muestra sus niveles relativos en cada línea celular tratada con respecto al control. Los resultados de proteómica cuantitativa mostraron que el procesamiento del pre-ARNr en CaLo se afecta menos que en las otras líneas celulares en respuesta al tratamiento con EX-527. Estos resultados están en total acuerdo con los observados de la medición de los niveles del 28S ARNr y las proteínas ribosomales. No obstante, algunas proteínas involucradas en diferentes pasos del procesamiento del ARNr, se encontraron sobre-reguladas en las tres líneas celulares tratadas. De igual manera, para dos de estas proteínas, se encontró que aumentaron su acetilación en las tres líneas celulares.

Tabla 2. Niveles relativos de proteínas involucradas en la regulación del procesamiento del pre-ARNr, en las células tratadas con EX-527 con respecto al control. Los valores reportados se corresponden con la relación de las intensidades para cada proteína, entre las células tratadas y control (EX-527/CTRL), para las tres líneas celulares.

ACC	Gen	Nombres de las proteínas	Péptidos únicos	Peso Mol. kDa	Valor Q	Score	(EX527/CTRL)		
							HaCaT	CaLo	SiHa
Procesamiento del 47S pre-ARNr para producir 45S pre-ARNr									
Q9H8H0	NOL11	Nucleolar protein 11	2	81.123	0	96.59	2.11	1.19	2.74
Q9Y5J1	UTP18	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog	9	62.003	0	75.95	0.91	1.14	5.03
Procesamiento del 45S pre-ARNr para producir 30S y 32S pre-ARNrs									
Q9NW13	RBM28	RNA-binding protein 28	15	85.737	0	212.16	1.16	0.95	1.25
Q01780	EXOSC10	Exosome component 10	21	100.83	0	180.36	1.85	1.36	1.41
Q9UGY1	NOL12	Nucleolar protein 12	14	24.663	0	40.817	1.52	1.28	1.47
P56182	RRP1	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog A	22	52.839	0	223.67	1.26	1.16	2.17
Q14684	RRP1B	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	18	82.175	0	157.89	1.51	1.57	2.08
Q14137	BOP1	Ribosome biogenesis protein BOP1	22	83.629	0	116.56	1.68	1.47	1.70
Q9H0D6	XRN2	5-3 exoribonuclease 2	28	108.58	0	288.2	1.31	0.64	1.11
Q9Y2R4	DDX52	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52	11	67.497	0	30.176	1.85	1.55	2.10
Procesamiento del 30S pre-ARNr para producir 21S pre-ARNr									
P42677	RPS27	40S ribosomal protein S27	3	9.461	0	130.44	0.66	1.27	1.03
P15880	RPS2	40S ribosomal protein S2	8	31.324	0	157.79	9.53	1.01	1.25
P62847	RPS24	40S ribosomal protein S24	17	15.423	0	126.66	0.69	1.34	1.16
Q9H8H0	NOL11	Nucleolar protein 11	2	81.123	0	96.59	2.11	1.19	2.74
P62081	RPS7	40S ribosomal protein S7	11	21.312	0	117.54	1.51	1.56	4.02
Q9Y324	FCF1	rRNA-processing protein FCF1 homolog	13	23.369	0	35.869	1.86	3.88	5.03
P62249	RPS16	40S ribosomal protein S16	14	16.445	0	323.31	1.18	1.51	1.56
P62277	RPS13	40S ribosomal protein S13	10	17.222	0	46.946	3.30	2.36	3.09
P61247	RPS3A	40S ribosomal protein S3a	11	23.747	0	323.31	0.94	1.56	1.14
P46782	RPS5	40S ribosomal protein S5	8	25.333	0	118.21	1.77	2.45	2.34
P62857	RPS28	40S ribosomal protein S28	5	7.8409	0	193.73	0.77	0.84	1.08
P62244	RPS15A	40S ribosomal protein S15a	8	14.839	0	309.07	1.45	1.58	0.70
P62241	RPS8	40S ribosomal protein S8	19	24.205	0	323.31	0.67	1.35	1.03
P62280	RPS11	40S ribosomal protein S11	11	18.431	0	121.11	2.67	0.88	2.12
Q81Y81	FTSJ3	pre-rRNA processing protein FTSJ3	30	96.557	0	196.05	1.80	1.19	1.57
P62753	RPS6	40S ribosomal protein S6	16	28.68	0	323.31	1.11	0.76	1.02
Procesamiento del 21S pre-ARNr para producir 18SE pre-ARNr									
Q9NQ4	EXOSC5	Exosome complex component RRP46	5	25.249	0	13.818	2.27	2.89	1.07
P42285	SKIV2L2	Superkiller viralicidic activity 2-like 2	19	117.8	0	230.06	0.96	1.06	1.15
Q01780	EXOSC10	Exosome component 10	21	100.83	0	180.36	1.85	1.36	1.41
Procesamiento del 18SE pre-ARNr en las partículas de pre-40S									
O43709	WBSCR22	Probable 18S rRNA (guanine-N(7))-methyltransferase	5	31.88	0	30.62	2.20	0.99	2.36
Procesamiento del 32S pre-ARNr para producir 12S pre-ARNr y 28S ARNr									
Q9BVP2	GNL3	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	16	61.992	0	165	1.83	0.84	1.63
Q9NVN8	GNL3L	Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein	10	65.572	0	20.152	4.54	0.76	12.52
Q99848	EBNA1BP2	Probable rRNA-processing protein EBP2	23	40.684	0	279.31	1.04	1.08	1.46
Q9NR30	DDX21	Nucleolar RNA helicase 2	17	87.343	0	323.31	1.84	0.68	3.49
O00541	PES1	Pescadillo homolog	31	66.077	0	284.25	2.68	0.91	2.50
Q9Y4W2	LAS1L	Ribosomal biogenesis protein LAS1L	18	81.242	0	57.623	2.03	1.02	1.28
Q5SY16	NOL9	Polynucleotide 5-hydroxyl-kinase NOL9	12	79.322	0	110.49	2.11	1.47	0.75
Procesamiento del 12S pre-ARNr para producir 5.8S ARNr									
P42285	SKIV2L2	Superkiller viralicidic activity 2-like 2	19	117.8	0	230.06	0.96	1.06	1.15
Q9Y2L1	DIS3	Exosome complex exonuclease RRP44	20	109	0	115.25	0.63	0.73	0.51
Q99547	MPHOSPH6	M-phase phosphoprotein 6	5	19.024	0.0004	3.9044	1.29	2.56	1.55
Q01780	EXOSC10	Exosome component 10	21	100.83	0	180.36	1.85	1.36	1.41

El péptido $^{512}\text{GSPTGGAQLLKR}^{523}$ de la proteína homóloga B de la proteína 1 del procesamiento del ARNr (RRP1B) fue encontrado acetilado en el residuo K522 en las tres líneas celulares tratadas (HaCaT 36.3%, CaLo 38.4% y SiHa 22.4% de ocupación del sitio), mientras que en el control no se detectó ningún grado de acetilación endógena (Figura 21). Estos resultados sugieren que este sitio es blanco de desacetilación mediada por SIRT1. Aunado a esto los niveles proteicos de RRP1B se encontraron aumentados en las tres líneas celulares tratadas con el inhibidor de SIRT1 (Tabla 2). Por otro lado, en esta misma proteína se identificó el péptido $^{16}\text{LASSEKGR}^{24}$ correspondiente a la región del extremo N de la proteína. Este péptido se detectó acetilado en el residuo K21 en las tres líneas celulares no tratadas (Control) (HaCaT 2.8%, CaLo 3.8% y SiHa 1.8% de ocupación del sitio). Sin embargo, en las células tratadas con el inhibidor de SIRT1, este sitio de acetilación no mostró ninguna evidencia de acetilación endógena. Este hallazgo nos abre las puertas hacia un nuevo nivel de regulación del procesamiento del ARNr mediada por SIRT1, donde pudiera estar regulando la actividad de lisina acetiltransferasas y/o otras desacetilasas. Esto pudiera explicar pérdidas en la acetilación de un sitio tras la inhibición de la desacetilasa SIRT1.

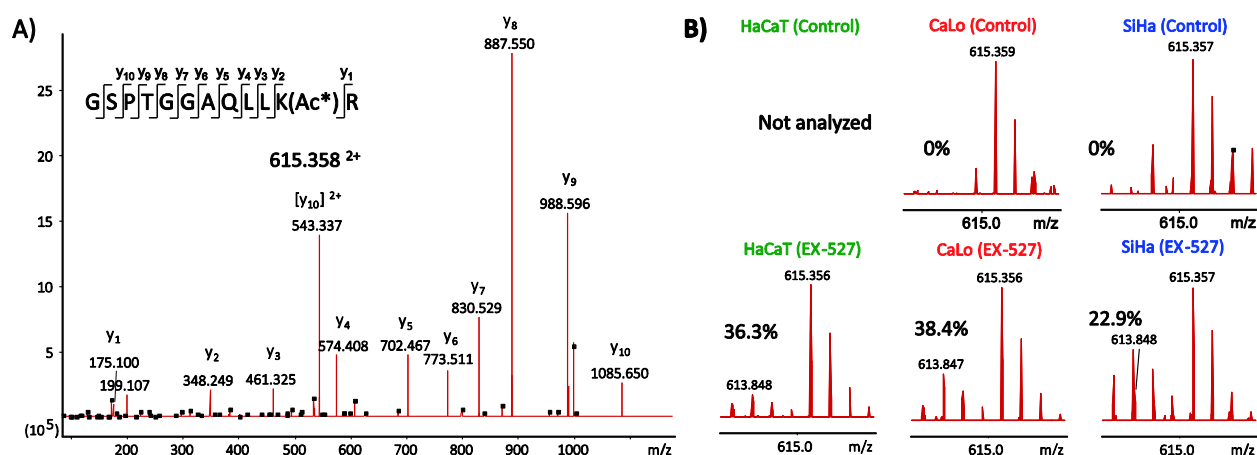


Figura 21. Espectros MS/MS y MS del péptido $^{512}\text{GSPTGGAQLLKR}^{523}$ de la proteína 1 homólogo B del procesamiento de ARN ribosomal (RRP1B), identificada en los tres tipos de células estudiadas. A) Espectro MS/MS representativo del péptido. (Ac*) se corresponde con el grupo acetilo marcado con isótopos pesados, incorporado durante la reacción de acetilación. B) Espectro MS mostrando las distribuciones isotópicas de los péptidos acetilado químicamente con NAS- d_3 y con la acetilación endógena. Los valores reportados se corresponden con el grado de acetilación endógena en el residuo K522, calculado con el programa Pview. En HaCaT control ninguna señal correspondiente al péptido fue seleccionada para obtener su espectro MS/MS.

La proteína probable helicasa de ARN DDX52 dependiente de ATP (DDX52) también se encontró sobre-regulada en todas las células tratadas con EX-527 (Tabla 2). De esta proteína se identificó el péptido $^{124}\text{ESKLTSGKLENLR}^{136}$, que contiene dos residuos de lisina (K126 y K131). Este péptido fue encontrado acetilado en sus dos residuos de lisina (HaCaT 7.7%, CaLo 13.7% y SiHa 7.5% de ocupación del sitio) en las tres líneas celulares tratadas, mientras que en las células no tratadas no se encontró evidencia de acetilación endógena en estos sitios (Figura 22). Estos resultados sugieren que ambos sitios son sustratos de desacetilación de SIRT1 y la proteína es regulada negativamente por esta sirtuina.

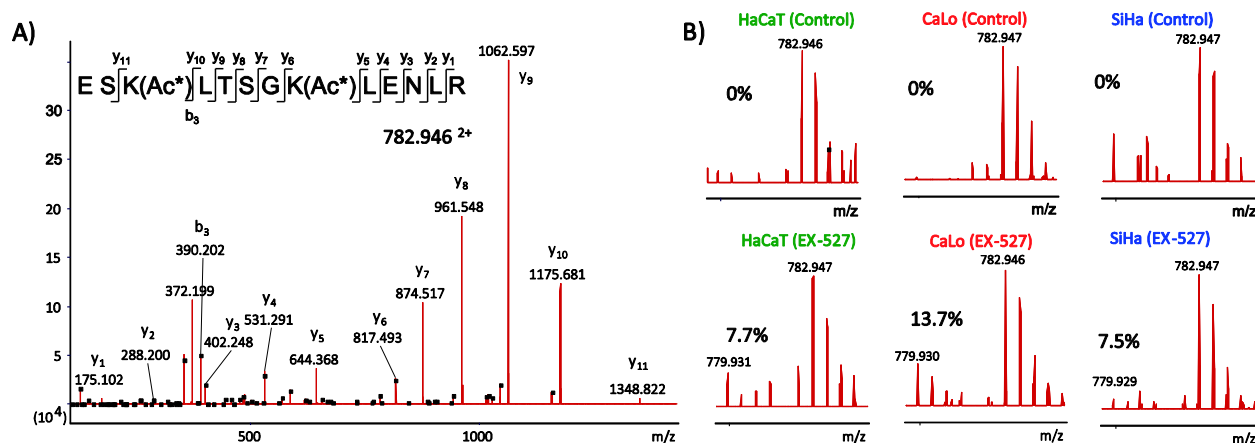


Figura 22. Espectros MS/MS y MS del péptido $^{124}\text{ESKLTSGKLENLR}^{136}$ de la proteína probable helicasa de ARN DDX52 dependiente de ATP (DDX52), identificada en los tres tipos de células estudiadas. A) Espectro MS/MS representativo del péptido. (Ac*) se corresponde con el grupo acilo marcado con isótopos pesados, incorporado durante la reacción de acetilación. B) Espectro MS mostrando las distribuciones isotópicas de los péptidos acetilado químicamente con NAS- d_3 y con la acetilación endógena. Los valores reportados se corresponden con el grado de acetilación endógena en ambos residuos de lisina K126 y K131, calculado con el programa Pview.

6. Discusión

Para análisis a gran escala de estequiometría de la acetilación, nosotros visualizamos dos retos fundamentales relacionados con el procesamiento de las muestras: el primero involucra la reacción de acetilación, necesaria para el marcaje con isótopos pesados de aquellos residuos de lisina no modificados endógenamente; y el segundo está relacionado con la solubilización de las proteínas completamente acetiladas, cuya hidrofobicidad aumenta producto de la modificación de sus residuos de lisina. Para la reacción de acetilación, se reemplazó el reactivo convencional anhídrido acético con un derivado del NHS el NAS- d_3 , que aporta varias ventajas. El NAS- d_3 es un reactivo sólido, más estable y menos reactivo. En estudios anteriores nosotros optimizamos las reacciones de los residuos de lisina con varios agentes alquilantes, tanto a nivel de proteínas como a nivel de péptidos, con vistas a ser empleadas en estudios de proteómica [89–91]. La reacción con anhídrido acético genera como producto ácido acético que baja considerablemente el pH de la solución alterando drásticamente la especificidad de la reacción por los grupos aminos. Como consecuencia, es necesario hacer la reacción con anhídrido acético en presencia de soluciones tampones básicas más fuertes que afectan la estabilidad de las proteínas, para mantener el pH durante la reacción. Adicionalmente, debido a la alta reactividad del anhídrido acético se pueden generar reacciones colaterales en residuos como tirosina, serina y treonina. La reacción con NAS- d_3 genera como producto NHS, que es un reactivo que no afecta el pH de la solución, lo que permite que se puedan emplear soluciones tampones como el TEAB, a menor concentración. Este reactivo ha sido usado con éxito anteriormente en estudios de proteómica cuantitativa [92]. En este estudio la reacción de acetilación se realiza a nivel de proteínas, lo que implica que la mayoría de las proteínas aumentan considerablemente su hidrofobicidad, resultando en problemas de solubilidad de estas y por consiguiente dificultades en el análisis posterior.

Para abordar el problema de solubilización de las proteínas, exploramos el uso de diferentes estrategias de preparación de muestras. Un punto muy importante, fue la incorporación de detergentes en diferentes pasos del procesamiento de las muestras para garantizar que en todo momento la mayor cantidad de proteínas se mantengan en solución, al menos en los métodos SSP y FASP. En este estudio comparamos tres de los métodos más empleados en proteómica: FASP, GSP and SSP. Las tres estrategias fueron evaluadas teniendo en cuenta la hidrofobicidad y tamaño de las proteínas y péptidos identificados. El método FASP mostró un importante sesgo a nivel de

péptidos, con problemas para analizar péptidos con alta hidrofobicidad, comparado con las otras dos estrategias. Sin embargo, con los tres métodos se obtuvieron resultados complementarios a la hora de identificar péptidos acetilados.

Otro punto que consideramos muy valioso de nuestro estudio es que pudimos combinar dos tipos de análisis diferentes: estequiometría de la acetilación en residuos de lisina y proteómica cuantitativa libre de marcaje, ambos a partir de los mismos datos de LC-MS/MS generados. En primer lugar para el análisis de estequiometría de acetilación se partió en todo momento de iguales cantidad de material para cada muestra sometida al análisis, seguidamente todas muestras fueron procesadas igual y analizadas en igualdad de condiciones. Todos estos son requisitos para poder hacer un análisis de proteómica cuantitativa. El estudio de estequiometría de acetilación no afecta el de proteómica cuantitativa con los mismos datos. Para poder realizar esta afirmación nos basamos en lo siguiente: 1- aproximadamente la mitad de los péptidos identificados para cada muestra no contienen residuos de lisina, 2- solo el 10% de los péptidos con residuos de lisina mostraron algún grado de acetilación endógena y 3- la mitad de los péptidos identificados acetilados resultaron con un grado de ocupación por acetilación inferior al 5%. De acuerdo con estos argumentos, más del 95% de los péptidos identificados no muestran ninguna variación en sus distribuciones isotópicas, se comportan como péptidos no marcados y por consiguiente son completamente válidos para usarse en un análisis de proteómica cuantitativa libre de marcaje. Por tanto, nuestros datos de estequiometría de acetilación nos permitieron realizar un análisis comparativo entre las tres líneas celulares sometidas al estudio así como de evaluar su respuesta ante el tratamiento con EX-527.

Los resultados de la estequiometría arrojaron que la acetilación en residuos de lisina es una PTM altamente dinámica y que depende en gran medida de la composición aminoacídica que rodea al sitio de acetilación. En este trabajo encontramos que cambios de solo un residuo pueden alterar la estequiometría de la acetilación, lo que resulta particularmente verdadero para las variantes de histonas, donde estas pequeñas variaciones conllevan a variaciones en la ocupación por acetilación en residuos de las regiones del extremo amino de estas proteínas. La metilación no solo compete con la acetilación por los residuos de lisina sino que también puede afectar la acetilación en residuos cercanos. Adicionalmente, la fosforilación en residuos cercanos a los sitios de acetilación también puede alterar su ocupación, no solo por acetilación sino también por metilación. De

conjunto, nuestros resultados muestran que existe un alto grado de complejidad en la interacción entre las diferentes PTMs dentro de una misma proteína. En un estudio anterior de acetilómica en células de ratón, los autores reportaron y aportaron elementos acerca de esta compleja interacción entre PTMs [8].

En este trabajo integramos los resultados de proteómica cuantitativa y estequiometría de la acetilación en tres líneas celulares diferentes y encontramos que la enzima SIRT1 se encuentra sobre-regulada en más de dos veces en SiHa con respecto a HaCaT y CaLo. Por lo que hipotetizamos que al menos algunas de las proteínas que mostraron menos acetilación en SiHa son blancos de SIRT1 y como consecuencia sus vías biológicas pudieran ser reguladas por esta enzima. El análisis funcional del grupo de proteínas con menos acetilación en SiHa mostró un enriquecimiento en proteínas ribosomales, de la biogénesis de los ribosomas, del procesamiento del ARNr y la glucólisis entre otras. Por otro lado la proteómica cuantitativa confirmó que estos grupos de proteínas muestran diferencias entre las líneas celulares. En conjunto estos resultados sugieren que la acetilación regula estas vías y que SIRT1 a través de su actividad como desacetilasa controla los niveles de acetilación en los sitios encontrados de estas proteínas y aporta regulación a sus vías biológicas.

Para abundar en el esclarecimiento del papel de SIRT1, se trataron las células con un inhibidor específico para SIRT1, EX-527. Mediante este experimento, se confirmó que SIRT1 regula los niveles de acetilación de varias proteínas de los ribosomas y su biogénesis y el procesamiento del ARNr. De hecho, SIRT1 actúa como regulador maestro negativo de estas vías. En todas las líneas celulares, tanto el blanco específico identificado, así como la mayoría de los miembros de estas vías aumentaron sus niveles en respuesta al tratamiento de inhibición de SIRT1. Reportes anteriores también aportaron evidencias que sugieren que SIRT1 juega un papel en la represión de la biogénesis de los ribosomas [9,10]. Adicionalmente, nuestros datos muestran evidencias en tres líneas celulares diferentes que SIRT1 está relacionada con la regulación negativa de varias vías biológicas, la mayoría de las cuales tienen lugar en el núcleo de las células específicamente en el nucléolo. De los experimentos de proteómica, asumimos que SIRT1 actúa como represor de la síntesis y procesamiento del pre-ARNr. Para confirmar estos hallazgos, directamente medimos los niveles del pre-ARNr y del 28S ARNr en células control y tratadas con el inhibidor de SIRT1. Como esperábamos, los niveles del pre-ARNr aumentaron significativamente con la inhibición de

SIRT1, demostrando el papel de esta enzima en este proceso. En menor medida, el papel de SIRT1 sobre el procesamiento del pre-ARNr para producir las moléculas de ARNr maduras, fue validado con los niveles del 28S ARNr. En varios pasos del procesamiento del pre-ARNr encontramos proteínas sobre-reguladas en las células tratadas. Dos de ellas, RRP1B y DDX52, ambas directamente relacionadas con la transformación del 45S pre-ARNr hacia las moléculas de 30S y 32S pre-ARNrs, fueron encontradas como posibles blancos directos de SIRT1. En las tres líneas celulares en estudio ambas proteínas incrementaron su grado de acetilación en al menos un sitio.

Nuestros datos adicionalmente aportaron evidencias de que SIRT1 regula positivamente varias vías metabólicas, la organización del citoesqueleto y el procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático. Estas vías fundamentalmente ocurren fuera del núcleo. Todos los resultados discutidos aquí solo se corresponden al papel de SIRT1 que encontramos conservado en las tres líneas celulares sometidas al estudio. Sin embargo, de acuerdo a los resultados SIRT1 se encuentra diferencialmente expresada en las líneas celulares y encontramos que algunas funciones particulares para cada línea celular pueden ser descritas. Como ejemplo, encontramos que en SiHa SIRT1 parece tener un efecto más marcado sobre las proteínas metabólicas que en las otras dos líneas celulares. En los casos en se encontraron diferencias en la respuesta de las células ante la inhibición de SIRT1, consideramos que es necesario una validación adicional para reportar evidencias confiables acerca del papel de SIRT1 en determinado tipo de célula.

Con la integración de los resultados de proteómica cuantitativa y de estequiometría de la acetilación a nivel de proteoma, fuimos capaces de explorar los sitios de acetilación, la dinámica de su ocupación y las variaciones a nivel de proteoma en varias condiciones experimentales, sin el sesgo que imponen los métodos basados en enriquecimiento por afinidad de residuos acetilados. Con esta estrategia, se compararon tres líneas celulares y se analizaron sus respuestas ante la inhibición de SIRT1. Más de 1,500 péptidos fueron identificados y cuantificado sus grados de ocupación en cada línea celular y condición experimental evaluada. Uniendo estos resultados, en este estudio se reportaron y publicaron más de 5,000 péptidos acetilados en proteínas de células humanas. Este estudio comprende adicionalmente, el mayor conjunto de datos de estequiometría de acetilación en residuos de lisina, que haya sido publicado hasta la fecha, a nivel de proteoma. Finalmente, los procedimientos presentados en este trabajo, pueden ser aplicados al estudio integral del papel de la acetilación y su regulación en cualquier sistema biológico. Adicionalmente,

quedó demostrado que varios métodos de preparación de muestras pueden ser usados y explorarse otros, dependiendo de las condiciones y experiencias de cada laboratorio.

7. Conclusiones

La acetilación en residuos de lisina de las proteínas es una modificación postraduccional que ocurre en las células de todos los organismos vivos. Adicionalmente, se puede llevar a cabo a través de una reacción química no mediada por ningún mecanismo celular. Teniendo en cuenta esto, en este trabajo se desarrolló e implementó una metodología para identificar y determinar la estequiometría de la acetilación en residuos de lisina, basada en la acetilación química de los residuos de lisina no modificados endógenamente, con un reactivo marcado con isótopos pesados. El grado de acetilación endógena se determina con el análisis por espectrometría de masas.

Durante el desarrollo de la metodología se evaluaron tres métodos de preparación de muestra: FASP, GSP y SSP. Los tres métodos demostraron que se pueden emplear con la estrategia para determinar la estequiometría de la acetilación. Con FASP se incorporó un sesgo en el análisis de los péptidos con mayor hidrofobicidad. Sin embargo, los resultados en cuanto a sitios de acetilación identificados mostraron complementariedad y alta reproducibilidad en la determinación de la estequiometría de la acetilación en aquellos péptidos identificados con los tres métodos.

Tres líneas celulares de origen humano (HaCaT, CaLo y SiHa) fueron sometidas al estudio comparativo en cuanto a la estequiometría de la acetilación y proteómica cuantitativa libre de marcaje. Se encontró que SiHa expresa mayor cantidad de SIRT1 comparado con HaCaT y CaLo. Esto se relacionó con menor grado de acetilación y menor abundancia de proteínas relacionadas con la biogénesis de los ribosomas.

Las tres líneas celulares fueron tratadas con EX-527 que inhibe selectivamente a SIRT1. SIRT1 tiene como blancos y regula negativamente la síntesis y procesamiento del pre-ARNr, en los tres tipos de células evaluadas. Por el contrario SIRT1 regula positivamente varias vías metabólicas, la organización del citoesqueleto y el procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático.

De conjunto en el estudio se identificaron y cuantificaron más de 5,000 sitios de acetilación en proteínas humanas, lo que representa el reporte del mayor conjunto de datos de estequiometría de acetilación publicados hasta el momento. Adicionalmente, con el mismo conjunto de datos se

identificaron y cuantificaron sus abundancias relativas de más de 9,000 proteínas en cada línea celular sometida al estudio.

8. Recomendaciones

Los resultados presentados en este estudio sobre el papel de SIRT1, son los encontrados que coinciden en tres tipos de células diferentes. Se recomienda explorar a profundidad el papel de esta enzima sobre vías biológicas y proteínas que fueron encontradas solo en una o dos de las líneas celulares estudiadas.

La metodología desarrollada tiene potencialidad de poder ser empleada en cualquier sistema biológico. Por lo que se recomienda aplicar la misma metodología al estudio de otros proteomas o al esclarecimiento del papel y blancos de otras enzimas que regulan la acetilación.

La acetilación interactúa con otras modificaciones postraduccionales, ya sea que compitan por el mismo sitio o se encuentren en residuos cercanos. Se recomienda explorar como afectaciones a otras modificaciones postraduccionales alteran el grado de acetilación en sus sitios.

9. Bibliografía

1. Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **51** (5), 786–794.
2. Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science (80-.)*, **293** (5532), 1074–1080.
3. de Ruijter, A.J.M., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A.B.P. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.*, **370** (Pt 3), 737–49.
4. Seto, E., and Yoshida, M. (2014) Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **6** (4).
5. Gil, J., Ramírez-Torres, A., and Encarnación-Guevara, S. (2017) Lysine acetylation and cancer: A proteomics perspective. *J. Proteomics*, **150**, 297–309.
6. Bosch-Presegué, L., and Vaquero, A. (2011) The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer*, **2** (6), 648–62.
7. Simmons, G.E., Pruitt, W.M., and Pruitt, K. (2015) Diverse roles of SIRT1 in cancer biology and lipid metabolism. *Int. J. Mol. Sci.*, **16** (1), 950–965.
8. Chen, Y., Zhao, W., Yang, J.S., Cheng, Z., Luo, H., Lu, Z., Tan, M., Gu, W., and Zhao, Y. (2012) Quantitative acetylome analysis reveals the roles of SIRT1 in regulating diverse substrates and cellular pathways. *Mol. Cell. Proteomics*, **11** (10), 1048–62.
9. Voit, R., Seiler, J., and Grummt, I. (2015) Cooperative Action of Cdk1/cyclin B and SIRT1 Is Required for Mitotic Repression of rRNA Synthesis. *PLoS Genet.*, **11** (5), 1–17.
10. Murayama, A., Ohmori, K., Fujimura, A., Minami, H., Yasuzawa-Tanaka, K., Kuroda, T., Oie, S., Daitoku, H., Okuwaki, M., Nagata, K., Fukamizu, A., Kimura, K., Shimizu, T., and Yanagisawa, J. (2008) Epigenetic Control of rDNA Loci in Response to Intracellular Energy Status. *Cell*, **133** (4), 627–639.
11. Fang, Y., Michael, B., and Nicholl, M.B. (2013) A Dual Role for Sirtuin 1 in Tumorigenesis. *Curr Pharm Des*, 2634–2636.
12. Lin, Z., and Fang, D. (2013) The Roles of SIRT1 in Cancer. *Genes Cancer*, **4** (3–4), 97–104.
13. Bradbury, C. a, Khanim, F.L., Hayden, R., Bunce, C.M., White, D. a, Drayson, M.T., Craddock, C., and Turner, B.M. (2005) Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*, **19** (10), 1751–1759.
14. Huffman, D.M., Grizzle, W.E., Bamman, M.M., Kim, J.S., Eltoum, I.A., Elgavish, A., and Nagy, T.R. (2007) SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Res.*, **67** (14), 6612–6618.
15. Stümel, W., Peh, B.K., Tan, Y.C., Nayagam, V.M., Wang, X., Salto-Tellez, M., Ni, B.H., Entzeroth, M., and Wood, J. (2007) Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnol. J.*, **2** (11), 1360–1368.
16. Yuan, J., Minter-Dykhouse, K., and Lou, Z. (2009) A c-Myc-SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation. *J. Cell Biol.*, **185** (2), 203–11.
17. Norris, K.L., Lee, J.-Y., and Yao, T.-P. (2009) Acetylation goes global: the emergence of acetylation biology. *Sci. Signal.*, **2** (97), pe76.
18. Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J. V, and Mann, M. (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, **325** (5942), 834–840.
19. Close, P., Creppe, C., Gillard, M., Ladang, A., Chapelle, J.P., Nguyen, L., and Chariot, A. (2010) The emerging role of lysine acetylation of non-nuclear proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, **67** (8), 1255–1264.
20. Kim, S.C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N. V., White, M., Yang, X.J., and Zhao, Y. (2006) Substrate and Functional Diversity of Lysine Acetylation Revealed by a Proteomics Survey. *Mol. Cell*, **23** (4), 607–618.
21. Filippakopoulos, P., and Knapp, S. (2014) Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **13** (5), 337–356.
22. Wang, Q., Zhang, Y., Yang, C., Xiong, H., Lin, Y., Yao, J., Li, H., Xie, L., Zhao, W., Yao, Y., Ning, Z.-B., Zeng, R., Xiong, Y., Guan, K.-L., Zhao, S., and Zhao, G.-P. (2010) Acetylation of Metabolic Enzymes Coordinates Carbon Source Utilization and Metabolic Flux. *Science (80-.)*, **327** (5968), 1004–1007.

23. Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S.M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., Xiong, Y., and Guan, K.-L. (2010) Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*, **327** (5968), 1000–1004.
24. Choudhary, C., Weinert, B.T., Nishida, Y., Verdin, E., and Mann, M. (2014) The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15** (8), 536–550.
25. Baeza, J., Dowell, J.A., Smallegan, M.J., Fan, J., Amador-Noguez, D., Khan, Z., and Denu, J.M. (2014) Stoichiometry of site-specific lysine acetylation in an entire proteome. *J. Biol. Chem.*, **289** (31), 21326–21338.
26. Zhou, T., Chung, Y.H., Chen, J., and Chen, Y. (2016) Site-Specific Identification of Lysine Acetylation Stoichiometries in Mammalian Cells. *J. Proteome Res.*, **15** (3), 1103–1113.
27. Wagner, S. a., Beli, P., Weinert, B.T., Nielsen, M.L., Cox, J., Mann, M., and Choudhary, C. (2011) A Proteome-wide, Quantitative Survey of In Vivo Ubiquitylation Sites Reveals Widespread Regulatory Roles. *Mol. Cell. Proteomics*, **10** (10), M111.013284.
28. Farria, A., Li, W., and Dent, S. (2015) KATs in cancer: functions and therapies. *Oncogene*, **34** (October 2014), 4901–4913.
29. Bhoumik, A., and Ronai, Z. (2008) ATF2: A transcription factor that elicits oncogenic or tumor suppressor activities. *Cell Cycle*, **7** (15), 2341–2345.
30. Shah, M., Bhoumik, A., Goel, V., Dewing, A., Breitwieser, W., Kluger, H., Krajewski, S., Krajewska, M., DeHart, J., Lau, E., Kallenberg, D.M., Jeong, H., Eroshkin, A., Bennett, D.C., Chin, L., Bosenberg, M., Jones, N., and Ronai, Z.A. (2010) A role for ATF2 in regulating MITF and melanoma development. *PLoS Genet.*, **6** (12), 1–21.
31. Nagy, Z., Riss, A., Fujiiyama, S., Krebs, A., Orpinell, M., Jansen, P., Cohen, A., Stunnenberg, H.G., Kato, S., and Tora, L. (2010) The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes. *Cell. Mol. Life Sci.*, **67** (4), 611–628.
32. Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*, **84** (6), 843–851.
33. Yang, X.J., Ogryzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996) A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, **382**, 319–324.
34. Nagy, Z., and Tora, L. (2007) Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene*, **26** (37), 5341–5357.
35. Bedford, D.C., Kasper, L.H., Fukuyama, T., and Brindle, P.K. (2010) Target gene context influences the transcriptional requirement for the KAT3 family of CBP and p300 histone acetyltransferases. *Epigenetics*, **5** (1), 9–15.
36. Ikura, T., Ogryzko, V. V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., and Nakatani, Y. (2000) Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. *Cell*, **102** (4), 463–473.
37. Kimura, A., and Horikoshi, M. (1998) Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones in vitro. *Genes to Cells*, **3** (12), 789–800.
38. Zhao, H., Jin, S., and Gewirtz, A.M. (2012) The histone acetyltransferase TIP60 interacts with c-Myb and inactivates its transcriptional activity in human leukemia. *J. Biol. Chem.*, **287** (2), 925–934.
39. Chevillard-briet, M., Quaranta, M., Grézy, A., Mattera, L., Courilleau, C., Philippe, M., Mercier, P., Corpet, D., Lough, J., Ueda, T., Fukunaga, R., Trouche, D., and Escaffit, F. (2014) Interplay between chromatin-modifying enzymes controls colon cancer progression through Wnt signaling. *Hum. Mol. Genet.*, **23** (8), 2120–2131.
40. Haberland, M., Montgomery, R.L., and Olson, E.N. (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.*, **10** (1), 32–42.
41. Barneda-Zahonero, B., and Parra, M. (2012) Histone deacetylases and cancer. *Mol. Oncol.*, **6** (6), 579–589.
42. Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F., and Atadja, P. (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.*, **277** (28), 25748–25755.
43. Yang, X.-J., and Seto, E. (2008) The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9** (3), 206–218.

44. Moser, M.A., Hagelkruys, A., and Seiser, C. (2014) Transcription and beyond: The role of mammalian class I lysine deacetylases. *Chromosoma*, **123** (1–2), 67–78.
45. Lahm, A., Paolini, C., Pallaoro, M., Nardi, M.C., Jones, P., Neddermann, P., Sambucini, S., Bottomley, M.J., Lo Surdo, P., Carfi, A., Koch, U., De Francesco, R., Steinkühler, C., and Gallinari, P. (2007) Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104** (44), 17335–40.
46. Di Giorgio, E., Gagliostro, E., and Brancolini, C. (2015) Selective class IIa HDAC inhibitors: Myth or reality. *Cell. Mol. Life Sci.*, **72** (1), 73–86.
47. Park, J., Chen, Y., Tishkoff, D.X., Peng, C., Tan, M., Dai, L., Xie, Z., Zhang, Y., Zwaans, B.M.M., Skinner, M.E., Lombard, D.B., and Zhao, Y. (2013) SIRT5-Mediated Lysine Desuccinylation Impacts Diverse Metabolic Pathways. *Mol. Cell*, **50** (6), 919–930.
48. Laurent, G., German, N.J., Saha, A.K., de Boer, V.C.J., Davies, M., Koves, T.R., Dephoure, N., Fischer, F., Boanca, G., Vaitheesvaran, B., Lovitch, S.B., Sharpe, A.H., Kurland, I.J., Steegborn, C., Gygi, S.P., Muoio, D.M., Ruderman, N.B., and Haigis, M.C. (2013) SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Mol. Cell*, **50** (5), 686–698.
49. Fernandez-Marcos, P.J., and Serrano, M. (2013) Sirt4: The glutamine gatekeeper. *Cancer Cell*, **23** (4), 427–428.
50. Chalkiadaki, A., and Guarente, L. (2015) The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **15** (10), 608–624.
51. Feige, J.N., Lagouge, M., Canto, C., Strehle, A., Houten, S.M., Milne, J.C., Lambert, P.D., Matak, C., Elliott, P.J., and Auwerx, J. (2008) Specific SIRT1 Activation Mimics Low Energy Levels and Protects against Diet-Induced Metabolic Disorders by Enhancing Fat Oxidation. *Cell Metab.*, **8** (5), 347–358.
52. Herranz, D., Muñoz-Martin, M., Cañamero, M., Mulero, F., Martinez-Pastor, B., Fernandez-Capetillo, O., and Serrano, M. (2010) Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat. Commun.*, **1** (1), 1–8.
53. Vaziri, H., Dessain, S.K., Eaton, E.N., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L., and Weinberg, R.A. (2001) hSIR2/SIRT1 functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, **107** (2), 149–159.
54. Cheng, H.-L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J.P., Gu, Y., Patel, P., Bronson, R., Appella, E., Alt, F.W., and Chua, K.F. (2003) Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100** (19), 10794–10799.
55. Weinert, B., Iesmantavicius, V., Wagner, S., Schölz, C., Gummesson, B., Beli, P., Nyström, T., and Choudhary, C. (2013) Acetyl-Phosphate is a critical determinant of Lysine Acetylation in E.coli. *Mol. Cell*, **51** (2), 265–272.
56. Wagner, G.R., and Payne, R.M. (2013) Widespread and enzyme-independent N{epsilon}-acetylation and N{epsilon}-succinylation in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. *J Biol Chem*.
57. Simic, Z., Weiwad, M., Schierhorn, A., Steegborn, C., and Schutkowski, M. (2015) The ε-Amino Group of Protein Lysine Residues Is Highly Susceptible to Nonenzymatic Acylation by Several Physiological Acyl-CoA Thioesters. *ChemBioChem*, **16** (16), 2337–2347.
58. Baeza, J., Smallegan, M.J., and Denu, J.M. (2015) Site-specific reactivity of nonenzymatic lysine acetylation. *ACS Chem. Biol.*, **10** (1), 122–128.
59. Ghanta, S., Grossmann, R.E., and Brenner, C. (2013) Mitochondrial protein acetylation as a cell-intrinsic, evolutionary driver of fat storage: chemical and metabolic logic of acetyl-lysine modifications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **48** (6), 561–74.
60. Weinert, B.T., Moustafa, T., Iesmantavicius, V., Zechner, R., and Choudhary, C. (2015) Analysis of acetylation stoichiometry suggests that SIRT3 repairs nonenzymatic acetylation lesions. *EMBO J.*, **34** (21), e201591271.
61. Du, J., Zhou, Y., Su, X., Yu, J.J., Khan, S., Jiang, H., Kim, J., Woo, J., Kim, J.H., Choi, B.H., He, B., Chen, W., Zhang, S., Cerione, R.A., Auwerx, J., Hao, Q., and Lin, H. (2011) Sirt5 Is a NAD-Dependent Protein Lysine Demalonylase and Desuccinylase. *Science* (80-.), **334** (6057), 806–809.
62. Tamkun, J.W., Deuring, R., Scott, M.P., Kissinger, M., Pattatucci, a M., Kaufman, T.C., and Kennison, J. a (1992) brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional

- activator SNF2/SWI2. *Cell*, **68** (3), 561–572.
63. Sanchez, R., and Zhou, M.-M. (2009) The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **12** (5), 659–665.
64. Li, Y., Wen, H., Xi, Y., Tanaka, K., Wang, H., Peng, D., Ren, Y., Jin, Q., Dent, S.Y.R., Li, W., Li, H., and Shi, X. (2014) AF9 YEATS domain links histone acetylation to DOT1L-mediated H3K79 methylation. *Cell*, **159** (3), 558–571.
65. Schulze, J.M., Wang, A.Y., and Kobor, M.S. (2009) YEATS domain proteins: a diverse family with many links to chromatin modification and transcription. *Biochem. Cell Biol.*, **87**, 65–75.
66. Lange, M., Kaynak, B., Forster, U.B., Tönjes, M., Fischer, J.J., Grimm, C., Schlesinger, J., Just, S., Dunkel, I., Krueger, T., Mebus, S., Lehrach, H., Lurz, R., Gobom, J., Rottbauer, W., Abdelilah-Seyfried, S., and Sperling, S. (2008) Regulation of muscle development by DPF3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex. *Genes Dev.*, **22** (17), 2370–2384.
67. Zeng, L., Zhang, Q., Li, S., Plotnikov, A.N., Walsh, M.J., and Zhou, M.M. (2010) Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPF3b. *Nature*, **466** (7303), 258–262.
68. Ali, M., Yan, K., Lalonde, M.E., Degerny, C., Rothbart, S.B., Strahl, B.D., Côté, J., Yang, X.J., and Kutateladze, T.G. (2012) Tandem PHD fingers of MORF/MOZ acetyltransferases display selectivity for acetylated histone H3 and are required for the association with chromatin. *J. Mol. Biol.*, **424** (5), 328–338.
69. Patel, J.H., Du, Y., Ard, P.G., Phillips, C., Carella, B., Chen, C.-J., Rakowski, C., Chatterjee, C., Lieberman, P.M., Lane, W.S., Blobel, G.A., and McMahon, S.B. (2004) The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol. Cell Biol.*, **24** (24), 10826–34.
70. Martínez-Balbás, M. a, Bauer, U.M., Nielsen, S.J., Brehm, a, and Kouzarides, T. (2000) Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J.*, **19** (4), 662–671.
71. Li, M., Luo, J., Brooks, C.L., and Gu, W. (2002) Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J. Biol. Chem.*, **277** (52), 50607–50611.
72. Okumura, K., Mendoza, M., Bachoo, R.M., DePinho, R.A., Cavenee, W.K., and Furnari, F.B. (2006) PCAF modulates PTEN activity. *J. Biol. Chem.*, **281** (36), 26562–26568.
73. Lundby, A., Lage, K., Weinert, B.T., Bekker-Jensen, D.B., Secher, A., Skovgaard, T., Kelstrup, C.D., Dmytriiev, A., Choudhary, C., Lundby, C., and Olsen, J. V. (2012) Proteomic Analysis of Lysine Acetylation Sites in Rat Tissues Reveals Organ Specificity and Subcellular Patterns. *Cell Rep.*, **2** (2), 419–431.
74. Morrison, D.K. (2009) The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol.*, **19** (1), 16–23.
75. Paradela, A., and Albar, J.P. (2008) Advances in the analysis of protein phosphorylation. *J. Proteome Res.*, **7** (5), 1809–1818.
76. Grimsrud, P.A., Swaney, D.L., Wenger, C.D., Beauchene, N.A., and Coon, J.J. (2010) Phosphoproteomics for the masses. *ACS Chem. Biol.*, **5** (1), 105–119.
77. Zielinska, D.F., Gnad, F., Wi??niewski, J.R., and Mann, M. (2010) Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints. *Cell*, **141** (5), 897–907.
78. Yu, H., Diao, H., Wang, C., Lin, Y., Yu, F., Lu, H., Xu, W., Li, Z., Shi, H., Zhao, S., Zhou, Y., and Zhang, Y. (2015) Acetylproteomic analysis reveals functional implications of lysine acetylation in human sperm. *Mol. Cell. Proteomics*, mcp.M114.041384.
79. Svinkina, T., Gu, H., Silva, J.C., Mertins, P., Qiao, J., Fereshetian, S., Jaffe, J.D., Kuhn, E., Udeshi, N.D., and Carr, S.A. (2015) Deep, quantitative coverage of the lysine acetylome using novel anti-acetyl-lysine antibodies and an optimized proteomic workflow. *Mol. Cell. Proteomics*, **14** (9), 2429–40.
80. Schölz, C., Weinert, B.T., Wagner, S.A., Beli, P., Miyake, Y., Qi, J., Jensen, L.J., Streicher, W., McCarthy, A.R., Westwood, N.J., Lain, S., Cox, J., Matthias, P., Mann, M., Bradner, J.E., and Choudhary, C. (2015) Acetylation site specificities of lysine deacetylase inhibitors in human cells. *Nat. Biotechnol.*, **33** (4), 415–23.
81. Ali, S. a., Dobson, J.R., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, a. J., Zaidi, S.K., and Stein, G.S. (2012) A RUNX2-HDAC1 co-repressor complex regulates rRNA gene expression by modulating UBF acetylation. *J. Cell Sci.*, **125** (11), 2732–2739.
82. Vizcaíno, J.A., Csordas, A., Del-Toro, N., Dianes, J.A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T., Xu, Q.W., Wang, R., and Hermjakob, H. (2016) 2016 update of the PRIDE database

- and its related tools. *Nucleic Acids Res.*, **44** (D1), D447–D456.
83. Huang, D.W., Lempicki, R. a, and Sherman, B.T. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.*, **4** (1), 44–57.
 84. Wisniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M., and Wi, J.R. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods*, **6** (5), 377–362.
 85. Lin, Y., Zhou, J., Bi, D., Chen, P., Wang, X., and Liang, S. (2008) Sodium-deoxycholate-assisted tryptic digestion and identification of proteolytically resistant proteins. *Anal. Biochem.*, **377** (2), 259–266.
 86. Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004) Histone H3.1 and H3.3 Complexes Mediate Nucleosome Assembly Pathways Dependent or Independent of DNA Synthesis. *Cell*, **116** (1), 51–61.
 87. Zink, L.M., and Hake, S.B. (2016) Histone variants: Nuclear function and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **37**, 82–89.
 88. Gertz, M., Fischer, F., Nguyen, G.T.T., Lakshminarasimhan, M., Schutkowski, M., Weyand, M., and Steegborn, C. (2013) Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110** (30), E2772–81.
 89. Betancourt, L., Gil, J., Besada, V., González, L.J., Fernández-De-Cossio, J., García, L., Pajón, R., Sanchez, A., Alvarez, F., and Padrón, G. (2005) SCAPE: A new tool for the selective CApture of PEptides in protein identification. *J. Proteome Res.*, **4** (2), 491–496.
 90. Gil, J., Betancourt, L.H., Sardiñas, G., Yero, D., Niebla, O., Delgado, M., García, D., Pajón, R., Sánchez, A., González, L.J., Padrón, G., Campa, C., Sotolongo, F., Barberá, R., Guillén, G., Herrera, L., and Besada, V. (2009) Proteomic study via a non-gel based approach of meningococcal outer membrane vesicle vaccine obtained from strain CU385: A road map for discovering new antigens. *Hum. Vaccin.*, **5** (5).
 91. Sanchez, A., Ramos, Y., Solano, Y., Gonzalez, L.J., Besada, V., Betancourt, L., Gil, J., Alvarez, F., Rodriguez, M., Perez, L., Pujol, M., and Padron, G. (2007) Double acylation for identification of amino-terminal peptides of proteins isolated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21** (14), 2237–2244.
 92. Chakraborty, A., and Regnier, F.E. (2002) Global internal standard technology for comparative proteomics. *J. Chromatogr. A*, **949** (1–2), 173–184.

10. Anexos

Anexo 1. Artículo publicado en el Journal of Biological Chemistry (JBC) con los principales resultados del proyecto de doctorado, titulado “**Lysine acetylation stoichiometry and proteomics analyses reveal pathways regulated by sirtuin 1 in human cells**”. Las tablas y figuras que se mencionan como material suplementario de este documento de tesis fueron publicadas como parte de este artículo y se encuentran disponibles en el sitio web de la revista (<http://www.jbc.org/cgi/content/full/M117.784546/DC1>).



Lysine acetylation stoichiometry and proteomics analyses reveal pathways regulated by sirtuin 1 in human cells

Received for publication, March 3, 2017, and in revised form, September 1, 2017. Published, Papers in Press, September 11, 2017, DOI 10.1074/jbc.M117.784546

Jeovanis Gil^{†§1}, Alberto Ramírez-Torres[‡], Diego Chiappe[¶], Juan Luna-Peñaloza[‡], Francis C. Fernandez-Reyes^{||}, Bolivar Arcos-Encarnación[‡], Sandra Contreras[‡], and Sergio Encarnación-Guevara^{‡2}

From the [†]Programa de Genómica Funcional de Procarriotes and [§]Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Centro de Ciencias Genómicas-Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad s/n, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos CP 62210, México, [¶]Proteomics Core Facility, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, 1015 Lausanne, Switzerland, and ^{||}Centro de Investigación en Ciencia-Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos CP 62210, México

Edited by John M. Denu

Lysine acetylation is a widespread posttranslational modification affecting many biological pathways. Recent studies indicate that acetylated lysine residues mainly exhibit low acetylation occupancy, but challenges in sample preparation and analysis make it difficult to confidently assign these numbers, limiting understanding of their biological significance. Here, we tested three common sample preparation methods to determine their suitability for assessing acetylation stoichiometry in three human cell lines, identifying the acetylation occupancy in more than 1,300 proteins from each cell line. The stoichiometric analysis in combination with quantitative proteomics also enabled us to explore their functional roles. We found that higher abundance of the deacetylase sirtuin 1 (SIRT1) correlated with lower acetylation occupancy and lower levels of ribosomal proteins, including those involved in ribosome biogenesis and rRNA processing. Treatment with the SIRT1 inhibitor EX-527 confirmed SIRT1's role in the regulation of pre-rRNA synthesis and processing. Specifically, proteins involved in pre-rRNA transcription, including subunits of the polymerase I and SL1 complexes and the RNA polymerase I-specific transcription initiation factor RRN3, were up-regulated after SIRT1 inhibition. Moreover, many protein effectors and regulators of pre-rRNA processing needed for rRNA maturation were also up-regulated after EX-527 treatment with the outcome that pre-rRNA and 28S rRNA levels also increased. More generally, we found that SIRT1 inhibition down-regulates metabolic pathways, including glycolysis and pyruvate metabolism. Together, these results provide the largest data set thus far of lysine acetylation stoichiometry (available via ProteomeXchange with identifier PXD005903) and set the stage

for further biological investigations of this central posttranslational modification.

Cells of all kingdoms use the posttranslational modifications (PTMs)³ of proteins to regulate biological pathways and processes and to increase the complexity and variety of functions of their protein targets without increasing the number of primary protein sequences. Many PTMs have been described, and the implications for their targets and pathways are the main goal of an increasing number of scientific reports. Reversible protein phosphorylation is the most widely studied PTM so far; it targets proteins that are involved in the vast majority of biological processes (1, 2). Lysine acetylation is also a reversible and widespread PTM that was discovered in histones more than 5 decades ago (3). It is currently known to be involved in the regulation of a large number of biological pathways with targets in all cellular compartments (4–7). Among the most representative pathways and groups of proteins that have been identified with this PTM, beyond the group of histones, are chromatin regulators and modifying proteins, DNA repair, DNA replication, spliceosome, ribosome biogenesis in the nucleus, most of the metabolic enzymes, ribosomal and cytoskeleton proteins in the cytoplasm, and the oxidative phosphorylation and the tricarboxylic acid cycle in the mitochondrion. In addition, many proteins involved in the posttranslational modification of proteins such as kinases, lysine acetyltransferases, deacetylases, and ubiquitin conjugation proteins are also targeted by lysine acetylation.

Lysine acetylation is a highly dynamic PTM that is controlled by two groups of enzymes: lysine acetyltransferases and lysine deacetylases (KDACs). However, in the mitochondria, where no lysine acetyltransferase has yet been described, strong evidence indicates that lysine acetylation occurs non-enzymatically, favored by the mitochondrial matrix conditions of a high

This work was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) Grant 220790 and Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica Grants IN-206113 and IN-213216. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

This article contains supplemental Figs. S1–S13 and Tables S1–S8.

The mass spectrometric raw data and spectral libraries associated with this manuscript are available from ProteomeXchange with the accession number PXD005903.

¹This work was submitted to fulfill the requirements for a doctorate of philosophy at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Recipient of CONACyT Fellowship 343827.

²To whom correspondence should be addressed. Tel.: 52-777-3291899; E-mail: encarnac@ccg.unam.mx.

³The abbreviations used are: PTM, posttranslational modification; SIRT1, sirtuin 1; KDAC, lysine deacetylase; NAS, *N*-acetoxy succinimide; SDC, sodium deoxycholate; FASP, filter-aided sample preparation; GSP, gel sample preparation; SSP, solution sample preparation; FDR, false discovery rate; RT-qPCR, real-time quantitative PCR; Pol, polymerase; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; TEAB, triethylammonium bicarbonate; HPV, human papillomavirus; ABC, ammonium bicarbonate; UPLC, ultraperformance LC; Th, thomsons.

Acetylomics and proteomics dynamics in human cells

concentration of acetyl-CoA (0.1–1.5 mM) and a pH of 7.9–8.0 (8). KDACs are further divided into two major groups: the Zn²⁺-dependent members of KDAC classes I, II, and IV and KDAC class III or sirtuins, which are NAD⁺-dependent and exhibit a mono-ADP-ribosyltransferase activity, in addition to deacetylase (9–11). Particularly, sirtuins are involved in the regulation of several important processes and therefore have been linked to physiologic and pathologic states, including aging and cancer (12). Of the seven sirtuins reported in humans, SIRT1 is the most abundant and closely related to its yeast homolog, Sir2 (13). This protein is mostly nuclear and cytoplasmic and has been found to regulate many pathways in response to several physiological stresses or cell cycle phases (14). In cancer, SIRT1 has been linked to both tumor progression and tumor repression, and its functions are largely tumor-specific (15).

Lysine acetylation is largely a low-stoichiometric PTM, and for its large-scale identification using mass spectrometry-based proteomics, specific target approaches based on anti-acetyl-lysine antibodies are required (7). With this strategy, the number of identified acetylation sites in human cells rapidly increased to several thousand in the last decade. However, important limitations are associated with this strategy, including lack of information related to site occupancy; a bias in site identification, which is linked to the use of antibodies; and the amount of starting sample needed for the enrichment step (11). Recently, a method based on the chemical acetylation of untargeted lysine residues, carrying heavy stable isotopes to estimate the relative occupancy of endogenous acetylation, was reported and applied to the *Escherichia coli* proteome (16). The method uses the MS precursor intensities to estimate the relative lysine acetylation occupancy *versus* the untargeted residues that were chemically acetylated with heavy isotopes prior to the generation of peptides by trypsin digestion. The same strategy was applied to the stoichiometric analysis of mammalian cells to analyze the dynamics of acetylation stoichiometries after treatment with a deacetylase inhibitor (17).

Here, we combined three of the most widely used methods for sample preparation in proteomics with large-scale lysine acetylation stoichiometry determination based on the chemical acetylation of proteins with stable heavy isotopes in human cells. Our strategy incorporated an efficient acetylation reaction with *N*-acetoxy succinimide-*d*₃ (NAS-*d*₃) and protein digestion with trypsin in the presence of sodium deoxycholate (SDC) to avoid degradation and losses due to protein precipitation. The integration of lysine acetylation stoichiometric analysis with quantitative proteomics allowed us to establish a functional link between lysine acetylation occupancy and the abundance of targeted proteins, pathway partners, and deacetylases in three human cell lines. In addition, we studied the dynamics of acetylation stoichiometry and the consequences of the inhibition of the deacetylase SIRT1 at the proteome level.

Results

Method development

For lysine acetylation stoichiometry analysis at the proteome level, several steps are mandatory. In the first step, the proteins subjected to the study must be obtained. Next, all lysine resi-

dues of proteins will be chemically acetylated with heavy isotopes to differentiate them from endogenous acetylation (natural composition of isotopes). Once the lysine residues of all proteins are fully acetylated, the proteins are digested with trypsin. Because trypsin cannot hydrolyze the peptide bond when acetyl-lysine is present, the generated peptides will be delimited by arginine residues. Finally, in the MS analysis, those peptides with some degree of endogenous acetylation occupancy at lysine residues will be seen as complex isotopic distributions. If the three hydrogens of the chemically incorporated acetyl group are replaced with deuterium, then in the MS spectrum the isotopic distribution of chemically acetylated lysine-containing peptides will be shifted three daltons relative to the endogenously acetylated peptide. Therefore, by analyzing the isotopic distribution, it is possible to determine the lysine acetylation stoichiometry compared with the endogenous untargeted lysine residues (chemically acetylated with heavy isotopes).

We combined an optimized method for lysine acetylation stoichiometry analysis with three of the most widely used procedures for sample preparation in proteomics: filter-aided sample preparation (FASP), gel sample preparation (GSP), and solution sample preparation (SSP). Briefly, we used a simple and highly efficient total protein extraction protocol, described under “Experimental procedures,” that relies on the incorporation of high concentrations of sodium dodecyl sulfate (SDS) (4%) and DTT (0.1 M). Equal amounts of proteins were submitted to the selected sample preparation procedure (Fig. 1). For the chemical derivatization of lysine residues, we used NAS-*d*₃ instead of deuterated acetic anhydride because NAS-*d*₃ is a significantly more efficient alkylating reagent, and a gentler buffer can be utilized during the acetylation reaction. Although the acetylation reaction with NAS-*d*₃ leads to fewer collateral reactions in residues such as tyrosine, threonine, and serine, we included a hydroxylamine treatment to revert *O*-acetylation modifications completely. To avoid the precipitation of proteins after chemical acetylation, we introduced two detergents, SDS and SDC, during the reaction step and SDC during trypsin digestion. It is well known that trypsin works satisfactorily in high concentrations of SDC (18). SDC was easily removed by ethyl acetate extraction under acidic conditions. Finally, samples were submitted to a high-resolution LC-MS/MS system. Protein identification and quantification were performed with MaxQuant software, and the lysine acetylation stoichiometric analysis was achieved with Pview software.

Comparison of sample preparation methods

Three different cell lines were used to evaluate the three sample preparation procedures: HaCaT (non-cancerous immortalized human keratinocyte), SiHa (HPV-16-positive cervical cancer cell line), and CaLo (HPV-18-positive cervical cancer cell line). Three independent biological replicates were performed. Methods were evaluated according to the number of peptides and proteins identified as well as their mass and hydrophobicity distributions. To determine the potential advantages or potentialities of analyzed sample preparation methods, we performed a molecular mass and hydrophobicity distribution of identified peptides (Fig. 2, *A* and *B*) and proteins (Fig. 2, *C* and *D*). Despite

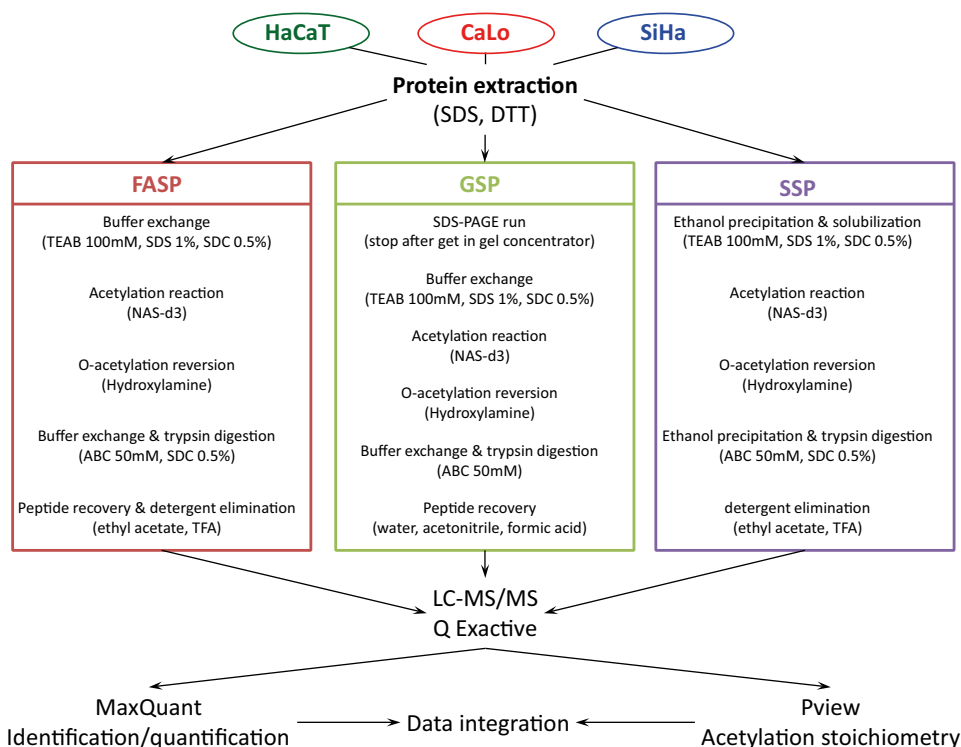


Figure 1. Schematic representation of the workflow to perform lysine acetylation stoichiometric analysis following the three sample preparation procedures, FASP, GSP, and SSP. In all strategies, untargeted lysine residues are chemically acetylated with the deuterated derivative of NHS (NAS- d_3), and side reactions are reverted by treating proteins with hydroxylamine. To avoid unwanted protein precipitation in FASP and SSP, trypsin digestion was performed in the presence of SDC. Peptide mixtures were analyzed in a high-resolution LC-MS/MS system. Data analysis was performed by means of MaxQuant and Pview software.

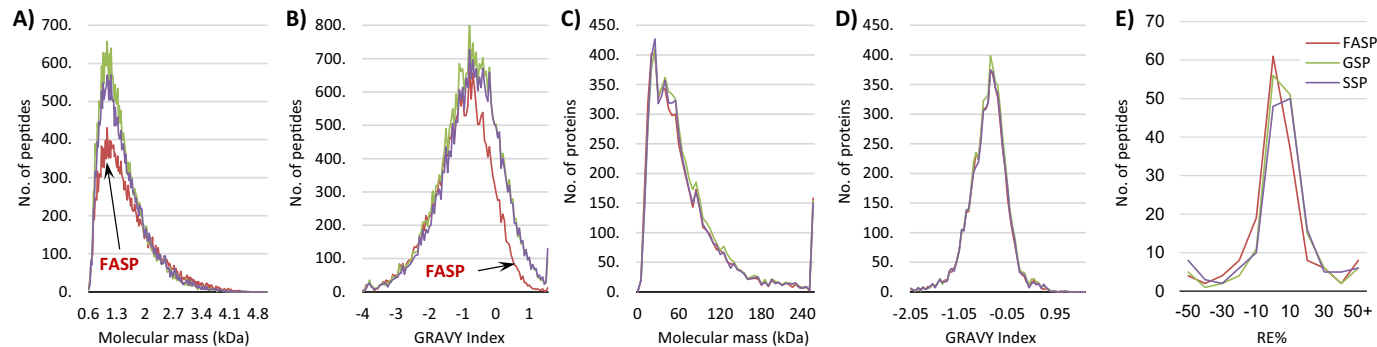


Figure 2. Distribution of identified peptides and proteins for each sample preparation method according to molecular mass and hydrophobicity. A and B, peptide distribution according to molecular mass (A) and hydrophobicity (B). C and D, protein distribution according to molecular mass (C) and hydrophobicity (D). E, relative error (RE) distributions for reported acetylation stoichiometry results of acetylated peptides identified using the three sample preparation methods. GRAVY, grand average of hydrophathy.

the distributions of molecular masses and hydrophobicity having highly similar patterns at the protein level without any important bias, we found that at peptide level we missed certain kinds of peptides using the FASP method. The molecular mass distribution of peptides discarded the idea that large peptides generated from the trypsin digestion of proteins that were fully acetylated at their lysine residues would be lost. The distribution of identified peptides with a molecular mass above 2 kDa was highly similar for the three methods. In contrast, the distribution of identified peptides according to their grand average of hydrophathy index indicated a bias for hydrophobic peptides in the FASP method. Although this bias did not have a substantial effect on the distribution at the protein level, probably because even the most hydrophobic proteins can generate hydrophilic

peptides after trypsin digestion, for our purpose of lysine acetylation stoichiometry analysis it represents lower identification and quantification of their occupancy by acetylation of lysine-containing peptides. The number of peptides and proteins, their corresponding lysine content, and the number of identified acetylation sites are summarized in Table 1.

Although equal amounts of proteins were used to evaluate the three methods, to analyze similar quantities of peptides in the LC-MS/MS system, the amount of injected material was different for each method. In the case of the FASP method, an amount equivalent to 4 μg of the starting material was used for each LC-MS/MS run. In the GSP method, an amount equivalent to 5 μg was used. The best overall recoveries were achieved in SSP where we used an amount equivalent to 2 μg of the

Table 1
Identified proteins, peptides, lysine-containing peptides, acetylated peptides, and proteins by cells using different sample preparation methods

	HaCaT	CaLo	SiHa	All cells
Identified proteins				
FASP	4,896	4,537	3,910	5,800
GSP	4,788	4,894	5,164	6,105
SSP	4,821	4,522	4,548	5,825
All methods	6,180	6,116	6,071	7,196
Identified Peptides				
FASP	18,387	15,509	11,622	23,730
GSP	18,807	21,582	22,486	30,815
SSP	22,011	18,926	19,023	28,616
All methods	33,893	32,658	31,512	45,823
Lysine-containing peptides				
FASP	12,066	10,194	7,425	15,406
GSP	11,233	12,872	13,492	18,306
SSP	12,968	11,346	11,440	17,024
All methods	20,291	19,660	18,803	27,527
Acetylated peptides				
FASP	898	732	437	1,608
GSP	939	1,059	1,171	2,359
SSP	1,026	905	849	1,909
All methods	2,378	2,304	2,110	4,557
Acetylated proteins				
FASP	685	581	351	1,063
GSP	718	803	865	1,478
SSP	748	689	655	1,223
All methods	1,433	1,399	1,325	2,217

starting sample. As no important differences were observed in the distribution of proteins based on their molecular mass or their hydrophobicity, we believe that the final peptide recovery steps in the FASP and GSP methods are the most critical for the overall recovery of the samples. In the case of the FASP method, peptides with higher hydrophobicity are more difficult to recover. However, in the GSP method, no bias was observed for any particular group of peptides as all peptides were affected similarly. For the SSP method, there is no need to perform a peptide recovery step as the final step to eliminate the detergent (Fig. 1, right) is carried out by ethyl acetate extraction under acidic conditions, and the peptides remain in the aqueous solution.

Although some methods have disadvantages, we identified complementary sets of peptide and proteins. For example, the average number of peptides identified by individual methods for each cell was 18,700, and the average number of peptides identified for each cell line combining the three methods was 32,600. These results show a complementarity between methods as one single method can identify about 60% of the peptides that can be identified using all three methods. However, if a peptide prefractionation step is included before LC-MS/MS analysis, more overlap between methods could be observed. Conversely, we analyzed the consistency of the reported stoichiometric results between different methods. For those acetylated peptides identified in the three sample preparation methods, we report the coefficient of variation and the relative errors between methods (supplemental Table S1). The relative error distributions for each method showed high similarity (Fig. 2E), indicating that the sample preparation method is not associated with the labeling efficiency and that similar acetylation stoichiometry results can be obtained with different methods.

Lysine acetylation analysis

For the lysine acetylation stoichiometric analysis, we used the Pview software package that was recently validated and used to analyze the lysine acetylation stoichiometry in bacterial proteins (16). We combined the results achieved with the three sample preparation methods to report the acetylation stoichiometry of peptides for each cell line (supplemental Table S1). Additionally, we only report the acetylation occupancy for those peptides that were identified with an FDR lower than 1% by two independent search engines (MaxQuant and Pview), an isotopic distribution tolerance of less than 5 ppm, and at least three signals observed for both isotopic distributions endogenously (light) and chemically (heavy) acetylated. Approximately 25% of all identified proteins in each cell line had some degree of acetylation on lysine residues (1,433 in HaCaT, 1,399 in CaLo, and 1,325 in SiHa). The distribution of acetylated proteins according to their cellular compartment showed that two cellular structures were particularly enriched in proteins affected by this PTM, the ribosome and the nucleolus (Fig. 3A). We also noticed that SiHa cells are particularly less enriched in acetylated proteins for these two cellular structures. In addition, ~1,200 membrane proteins were identified in each cell line, and it was found that this group of proteins is among the most enriched groups in acetylated proteins.

As reported previously, lysine acetylation is a widespread PTM, targeting proteins involved in a large set of biological processes and pathways from all cellular compartments (4). The functional enrichment analysis revealed that acetylation is more frequently observed in proteins that are involved in carbon and fatty acid metabolism as well as in amino acid biosynthesis, targeting more than 40% of the proteins identified for these pathways (Fig. 3B and supplemental Table S2). Unexpectedly, we found that more proteins involved in these pathways are acetylated in SiHa cells. In addition, large proportions of acetylated proteins were also found in proteins involved in transcription and translation pathways of the three cell lines analyzed.

Our stoichiometric analysis confirmed that lysine acetylation is a low-stoichiometry PTM as reported previously for other cells (17, 19). The global distributions of peptides according to their acetylation occupancy in the three cell lines showed high similarity, revealing that half of the acetylated peptides displayed stoichiometries lower than 5% (Fig. 3C). However, the acetylation stoichiometry distributions for certain groups of proteins, involved in different pathways, show different stoichiometry patterns. Ribosomal proteins are among the groups of proteins with more acetylated elements identified (between 50–60% of identified proteins). Particularly, most of the acetylation sites of this group of proteins show lower occupancy than the average. More than 40% of ribosomal protein acetylation sites are less than 1% occupied by this PTM (Fig. 3G). Conversely, acetylation sites of proteins involved in fatty acid metabolism, degradation, and biosynthesis show greater acetylation stoichiometry. For these proteins, more than 85% of their identified acetylated peptides show more than 1% occupation (Fig. 3F). Besides, we observed differences in the stoichiometry distribution of peptides when analyzing proteins from different

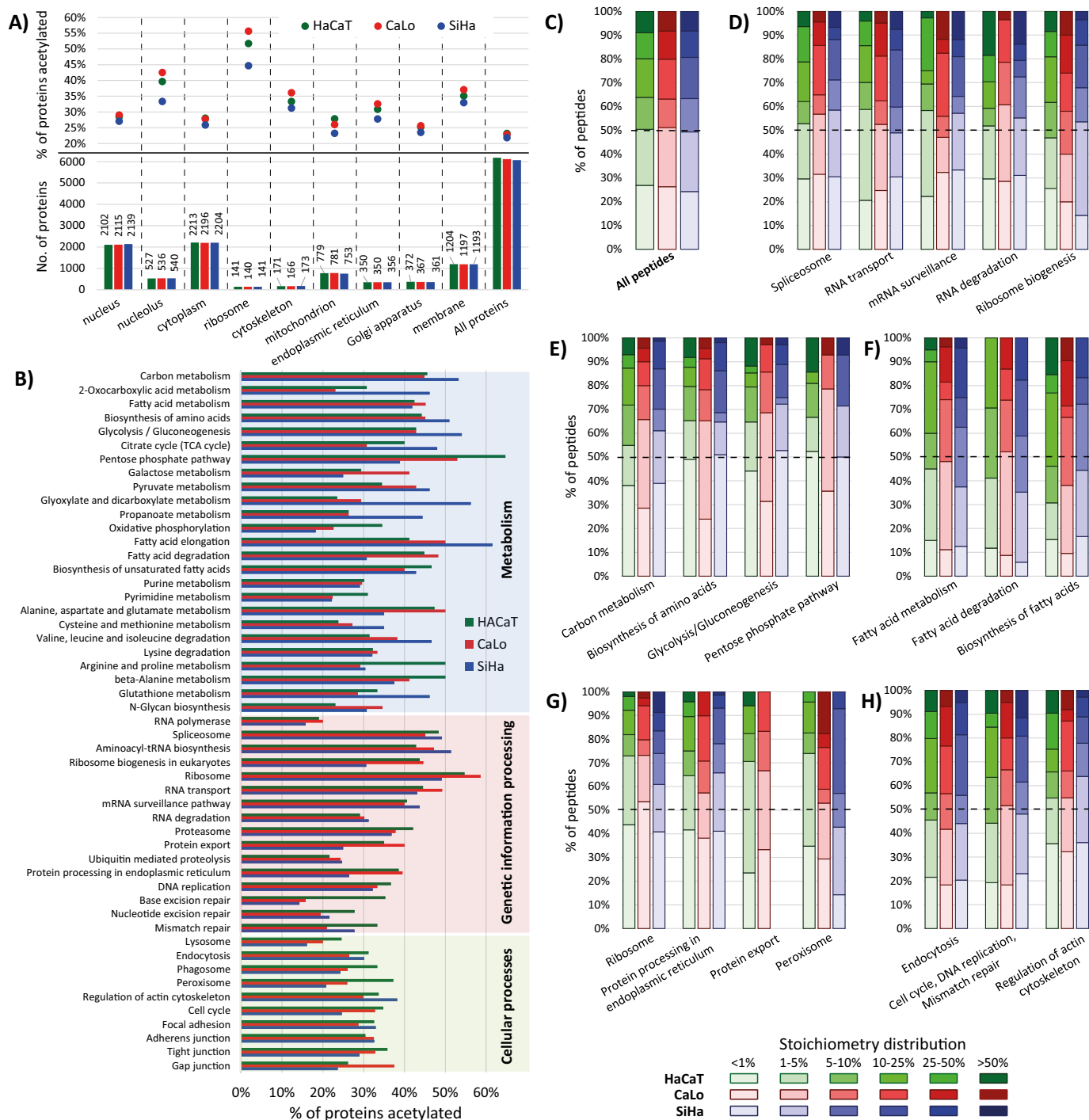


Figure 3. A, proteins identified for each cell line, distributed according to their cellular compartment (bottom) and the percentage of these proteins that were found acetylated (top). B, acetylated proteins distributed according to their biological pathway. Proteins are represented as the percentage of all proteins identified for the pathway in each cell line. C–H, the stacked column charts show the number of peptides grouped in the six quantiles. The columns go from *clear* to *darker* indicating less to more occupation of the acetylation sites. The color of the columns represents the cell line: HaCaT, CaLo, and SiHa cells are represented in green, red, and blue, respectively. The six quantiles corresponding to the acetylation occupancy of peptides were: peptides with less than 1% of acetylation occupancy (<1%); peptides with acetylation stoichiometry between 1 and 5% (1–5%), 5 and 10% (5–10%), 10 and 25% (10–25%), and 25 and 50% (25–50%); and peptides with more than 50% of site occupation (>50%). C, the chart represents all acetylated peptides in the three cell lines. D–H, the charts correspond to the number of peptides from proteins involved in the enriched biological pathways using the online version of DAVID bioinformatics software. TCA, tricarboxylic acid.

cellular compartments. Acetylated peptides from Golgi apparatus proteins show higher acetylation occupancy than endoplasmic reticulum, cytoplasmic, and nuclear proteins. Moreover, acetylation sites of membrane proteins are among the less occupied by this PTM. The distributions of acetylation occu-

pancy of several groups of proteins are presented in [supplemental Fig. S1](#).

The acetylation stoichiometry varies for different sites in the same proteins. Histones form a well known group of proteins targeted by acetylation. However, we found large differences in

Acetylomics and proteomics dynamics in human cells

the stoichiometry of acetylation for the reported acetylation sites. In fact, the N-terminal tails of H2A, H3, and H4 contain lysine residues highly susceptible to acetylation with stoichiometries ranging from 5 to 30%. However, in their globular central domains, very few residues were acetylated, and in all cases, the acetylation occupancy was below 1%.

Acetylation stoichiometry dynamics

Acetylation cross-talks with other PTMs in residues near the acetylation site. We found evidence that methylation and phosphorylation can alter the acetylation status in at least nearby lysine residues. With our experiment design, it was confirmed that monomethylated lysine residues can be fully acetylated with the chemical reaction performed. However, we found no evidence of the coexistence of these PTMs endogenously. The peptide ¹⁰KSTGGKAPR¹⁸ from histone H3 illustrates the complexity of the interactions between different PTMs. The Lys¹⁰ residue was identified in the three cell lines under study as unmodified, mono-, di-, trimethylated, and acetylated; the Ser¹¹ residue was found unmodified and phosphorylated; and the Lys¹⁵ residue was detected unmodified and acetylated (Fig. 4). The lysine acetylation stoichiometric analysis revealed that the Lys¹⁵ residue is largely more susceptible to acetylation than the Lys¹⁰ residue, which is a target for methylation. In the fraction corresponding to the non-methylated Lys¹⁰ residue, only a tiny fraction was detected with both lysine residues acetylated. The MS/MS spectrum of the signal 494.786 Th confirms that Lys¹⁵ is the preferred acetylation site even in the absence of methylation in the Lys¹⁰ residue (Fig. 4, G and H). For this peptide, we noticed that mono- and dimethylation in Lys¹⁰ did not affect the acetylation occupancy in Lys¹⁵ compared with the non-methylated Lys¹⁰. However, the presence of trimethylated Lys¹⁰ resulted in a decrease of 7–10% in the acetylation occupancy of the Lys¹⁵ residue (Fig. 4F). Conversely, phosphorylation in Ser¹¹ favors the occurrence of acetylation in Lys¹⁵, increasing its occupancy 7–25% relative to non-phosphorylated peptide (Fig. 4, I and J). Also, we were unable to detect the co-occurrence of methylation or acetylation in Lys¹⁰ and phosphorylated Ser¹¹. These findings clearly illustrate the complexity of the regulation of protein functions by means of PTMs and their cross-talk.

Not only do PTMs surrounding the acetylation site alter its occupancy, but small differences in the amino acid composition can also lead to variations in the stoichiometry of acetylation sites. Two variants of histone H3, H3.1 and H3.3, only differ in five residues, most of which are located in the globular region with relevance for their specific deposition in the genome (20). The N-terminal tails of these variants differ by a single amino acid at position 32. Ala³² from the canonical histone H3.1/H3.2 is substituted by Ser³² in histone H3.3. The peptides ²⁸KSAPATGGVKKPHR⁴¹ from histone H3.1/H3.2 and ²⁸KSAPSTGGVKKPHR⁴¹ from histone H3.3 were both identified in the three cell lines. According to our stoichiometric analysis, only one of the three lysine residues in both peptides was the target for acetylation, and its degree of occupancy in all cells and variants of peptides was below 5%. Besides, Lys²⁸ and Lys³⁷ residues were methylated in both histone variants. For the peptide corresponding to histones H3.1/

H3.2, the acetylation dynamics differ from the peptide in histone H3.3. In the non-methylated peptides, the acetylation occupancy of the peptide from histone H3.3 was at least 2.5-fold greater than that from histone H3.1/H3.2. In both peptides, when the Lys²⁸ residue was methylated, no acetylation was detected, indicating that both PTMs are probably competing for the same residue. We were unable to confirm by MS/MS the exact acetylation site due to the low stoichiometry of this PTM in these peptides. Unexpectedly, the presence of methylation in the Lys³⁷ residue results in different outcomes in both peptides. For histone H3.1/H3.2, the acetylation occupancy of the peptide increases at least 2.5-fold compared with the non-methylated peptide, whereas for histone H3.3 the stoichiometry decreases at least 1.5-fold (supplemental Fig. S2). Histone H3.3 replaces the canonical H3.1/H3.2 in several regions of the genome, generally in the start sites and the transcribing regions of active genes, in the telomeres and other regulatory regions (21). According to our results, it is possible that the substitution of residue Ala³² for Ser³² in histone H3.3 could be responsible for the increase in the stoichiometry of acetylation of residue Lys²⁸, and therefore this substitution may favor the active transcription of genes. In addition, this substitution could also be involved in the cross-talk between both acetylation and methylation in these peptides.

For histone H2A variants, several amino acid substitutions are located in the N-terminal tails (from Ac-Ser² to Arg¹⁸) relative to the canonical variant. We identified and determined the acetylation stoichiometry of the two generated peptides and their variants after trypsin digestion (as described under “Experimental Procedures”). The determination of acetylation stoichiometry of the peptide ⁵GKQGGKAR¹² from the canonical H2A and two other variants (⁵GKTGGKAR¹² from H2AX and ⁵GKQGGKVR¹² from H2AJ) uncovered slight but measurable differences. The peptide from histone H2AJ had higher acetylation occupancy than the canonical and H2AX variants. The role of histone H2AJ, as well as the conditions in which it normally replaces the canonical variant from nucleosomes, is unknown. In contrast, histone H2AX has been more extensively studied and found to have an important role in the cellular response to stress and DNA breakage. The two variants of the second peptide from the N-terminal tail of H2A histones (¹³AKAKSR¹⁸ from H2AC, H2AJ, and H2AX and ¹³AKAKTR¹⁸ from H2AB) displayed very low stoichiometry, below 0.20% for both peptide variants, in the three cell types.

Quantitative proteomics and acetylomics

To globally analyze our data, we performed a quantitative label-free proteomics analysis comparing the three cell types. For this analysis, we used the experimental data from the GSP and SSP methods, and we compared the protein profiles of the three cell types under study (supplemental Table S3). To connect quantitative proteomics and lysine acetylation stoichiometry, we first analyzed the relative abundance of the deacetylases identified by two or more unique peptides in the three cell types. According to our results, SIRT1 was the deacetylase with the greatest variation between cell types. SiHa contains ~2-fold the amount of SIRT1 compared with HaCaT and CaLo cells. These results were confirmed by Western blot analysis

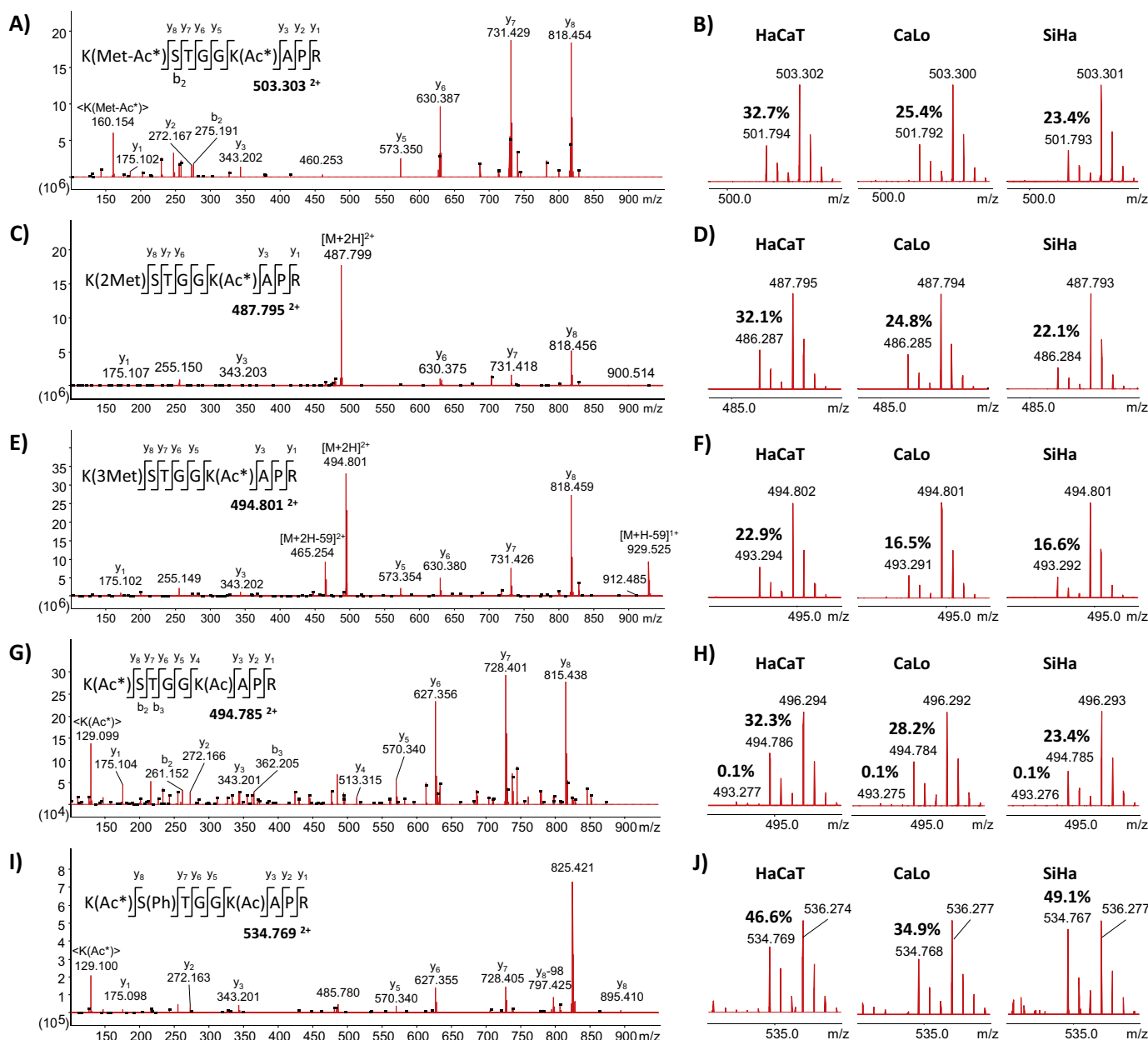


Figure 4. MS/MS and MS spectra of the peptide $^{10}\text{KSTGGKAPR}^{18}$ from histone H3 identified in the three cell lines under study with several PTMs in three of the residues. Lys 10 was mono-, di-, and trimethylated and acetylated; Ser 11 was phosphorylated; and Lys 15 was acetylated. Representative MS/MS spectra of the peptide with mono-, di-, and trimethylated Lys 10 are illustrated in A, C, and E, respectively. B, D, and F correspond to survey scans showing the isotopic distribution of the peptide mono-, di-, and trimethylated in Lys 10 in the three cell lines. The reported values correspond to the degree of endogenous acetylation in the Lys 15 residue, confirmed by MS/MS of the signals 501.794, 486.287, and 493.294 Th, respectively. G, representative MS/MS spectrum of the double-charge signal 494.785 Th corresponding to the peptide with Lys 15 residue endogenously acetylated. H, survey scans showing the isotopic distribution of the peptide fully acetylated in the three cell lines. The reported values correspond to the degree of endogenous acetylation in one and both lysine residues. I, representative MS/MS spectrum of the double-charge signal 534.769 Th corresponding to the peptide with the Ser 11 residue phosphorylated and the Lys 15 residue endogenously acetylated. J, survey scans showing the isotopic distribution of the acetylated peptide with phosphorylated Ser 11 in the three cell lines. The reported values correspond to the degree of endogenous acetylation in the Lys 15 residue.

(Fig. 5). Taking into account these findings, we selected the proteins that contain all the peptides for which we determined their acetylation stoichiometry in the three cell types and that showed less acetylation occupancy in SiHa cells compared with HaCaT and CaLo. We searched these proteins for significant enrichments in biological pathways and processes. In addition, we used the quantitative proteomics data to determine the protein profiles of the enriched groups of proteins.

A total of 215 peptides corresponding to 196 proteins had less acetylation occupancy in SiHa than in the other two cell

lines (supplemental Table S4). Among the most enriched biological pathways and processes, we found proteins from the spliceosome, ribosome, glycolysis pathway, rRNA processing, ribosome biogenesis, RNA transport, DNA repair, gene expression, cell–cell adhesion, and protein processing in the endoplasmic reticulum among others. To establish a link between acetylation occupancy and the regulation of the biological pathways, we analyzed the protein abundance profiles of identified proteins in each enriched biological pathway, including those identified proteins where no acetylation was detected.

Acetylomics and proteomics dynamics in human cells

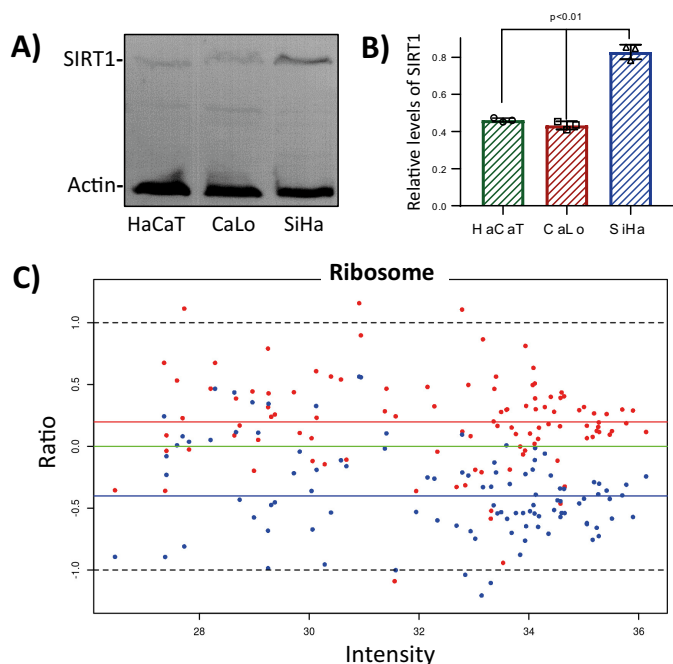


Figure 5. SIRT1 levels negatively correlate with the abundance of ribosomal proteins. Immunoblotting analysis confirmed that SIRT1 is significantly more abundant in SiHa cells than in CaLo and HaCaT cells. *A*, representative image of immunoblotting analysis of total protein extraction, from the three cell lines under study, using SIRT1 and actin antibodies. 10 μ g of total protein extract for each cell line were separated by 12% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. SIRT1 antibody was used at 1:1,000 dilution, and actin was used at 1:5,000 dilution. *B*, the levels of SIRT1 were calculated relative to actin with ImageJ software using three independent replicates. Error bars represent S.D. *C*, ratio-intensity plot to analyze the relative abundance of proteins from ribosomes of CaLo and SiHa relative to HaCaT cells from the label-free quantitative proteomics analysis. Red and blue dots represent CaLo and SiHa proteins, respectively, characterized by the ratio of intensities, $\log_2(\text{CaLo or SiHa}/\text{HaCaT})$, and their intensities in HaCaT cells, $\log_{10}(\text{HaCaT})$. Colored horizontal lines represent the medians for each cell line data set relative to HaCaT (green, HaCaT; red, CaLo; and blue, SiHa).

For this analysis, we used the protein levels from the non-cancerous HaCaT cells as reference to relatively measure the abundance of the proteins in CaLo and SiHa cells. One of the groups subjected to this study was the ribosome. For this group of proteins, the ratio-intensity plot clearly showed that these proteins are underrepresented in SiHa cells compared with CaLo and HaCaT cells. This observation was more evident for the most abundant proteins for which the reported quantification values are more trustworthy (Fig. 5C). Statistical analysis showed that the medians for this group of proteins are significantly different between the three cell lines (supplemental Fig. S3). Proteins involved in ribosome biogenesis and rRNA processing were also underrepresented in SiHa cells, suggesting that SIRT1 might play a negative role in these processes.

Acetylomics and proteomics analyses in cells treated with a SIRT1 inhibitor

EX-527 is a potent and selective inhibitor of SIRT1 with an IC_{50} of 38 nM. EX-527 is between 200- and 500-fold more selective for SIRT1 than for SIRT2 and SIRT3, the more closely related sirtuins (22). This inhibitor does not inhibit members of KDAC classes I, II, and IV (Zn^{2+} -dependent histone deacetylases 1–11). We treated the three cell types (HaCaT, CaLo, and

SiHa) with vehicle (control) or 1 μ M EX-527 for 24 h. Inhibition of SIRT1 followed by integral analysis of lysine acetylation stoichiometry and quantitative proteomics will help to clarify the role of SIRT1 in controlling the acetylation of the previously identified biological pathways and processes. For this analysis, samples were prepared according to the SSP method. To increase the confidence and coverage of the study, we performed two independent replicates of the experiment, and a peptide prefractionation step, based on reverse-phase chromatography at high pH, was incorporated before LC-MS/MS.

The number of identified proteins in each cell type significantly increased with the incorporation of the peptide fractionation step from 6,120 identified proteins per cell type without peptide fractionation (Table 1) to 9,150 identified proteins after peptide fractionation. The number of identified acetylation sites was increased ~60% compared with the previous results using SSP without peptide fractionation (supplemental Table S5). As we noticed previously, the complementarity between sample preparation methods is high, and we did not identify more acetylation sites in the current analysis than we did with the combined results of the three methods.

The inhibition of SIRT1 with EX-527 did not affect normal cell growth during the 24 h of treatment compared with untreated cells in any of the three cell lines. After acetylation stoichiometric analysis, we noticed that the number of identified acetylation sites in the non-cancerous HaCaT cells increased from 1,500 peptides in the untreated cells to 1,911 in EX-527-treated cells. However, the distribution in quantiles did not show a global increase in acetylation occupancy (supplemental Fig. S4). In cancer cells treated with the SIRT1 inhibitor, we identified fewer acetylated peptides from 1,696 and 1,639 peptides in untreated CaLo and SiHa to 1,588 and 1,510, respectively, after SIRT1 inhibition. However, in both cancerous cell lines, a slight increase in global acetylation occupancy was observed in the acetylation stoichiometry distribution after treatment (supplemental Fig. S4). Surprisingly, we found several peptides that indeed showed decreased acetylation occupancy when SIRT1 was inhibited. This observation was also noticed previously in a large-scale lysine acetylation analysis when 19 different deacetylase inhibitors were used to inhibit all KDAC classes (23).

We identified 57 proteins with sites that consistently showed increased lysine acetylation occupancy in the three cell lines after treatment with the SIRT1 inhibitor (supplemental Table S6 and Figs. S5–S12). Functional enrichment analysis confirmed that most of these proteins are involved in rRNA processing, mRNA splicing and spliceosome, translational initiation and ribosomal proteins, cell–cell adhesion, and signal recognition particle-dependent cotranslational protein targeting to the membrane. All these pathways or processes were previously found to be enriched in the group of proteins with lower acetylation occupancy in untreated SiHa compared with CaLo and HaCaT cells, confirming that SIRT1 regulates these processes through its deacetylase activity.

To gain a better understanding of the role of SIRT1, we performed a functional enrichment analysis with the proteins from

the three cell lines that showed increased acetylation occupancy by more than 5% after treatment with the SIRT1 inhibitor EX-527 (supplemental Table S7). Although more than 30% of proteins involved in metabolic pathways were acetylated, very few of them showed at least a 5% increase in acetylation after SIRT1 inhibition (Fig. 6A). The largest number of proteins that showed increased acetylation after EX-527 treatment is involved in transcription and translation pathways. We also observed differences between the cell lines in response to the treatment. In SiHa cells, more proteins involved in metabolism had increased acetylation stoichiometry compared with the other cell lines. In CaLo cells treated with EX-527, more proteins from the pathways of genetic information processing showed increased acetylation occupancy compared with other cell lines. Finally, in the HaCaT cell line, the treatment increased the acetylation occupancy by at least 5% in more proteins involved in cellular processes such as endocytosis, regulation of the actin cytoskeleton, and phagosome compared with SiHa and CaLo cell lines (Fig. 6A).

In addition, we used the quantitative proteomics data to determine to what extent the inhibition of the deacetylase activity of SIRT1 influences the regulation of the protein profile of its targets and their pathways (supplemental Table S8). For this analysis, we selected two groups of proteins, those that decreased in abundance after SIRT1 inhibition in the three cell types and those that were up-regulated in the three cell types during SIRT1 inhibition. For both groups, we searched for significant protein enrichments in cellular pathways and processes. Our results revealed that SIRT1 targets and negatively regulates pathways and processes, including rRNA processing, ribosome biogenesis, the spliceosome, the ribosome, DNA replication and repair, and cell division among others (Fig. 6B). In contrast, we discovered a positive regulation of SIRT1 in several metabolic pathways, in protein processing in the endoplasmic reticulum, in cytoskeleton organization, and in cellular processes such as endocytosis and lysosome (Fig. 6C).

SIRT1 inhibition promotes the synthesis and processing of the pre-rRNA

The quantitative proteomics and lysine acetylation stoichiometry analyses in our three cell lines provided evidence supporting a repressive effect of SIRT1 over the biogenesis of ribosomes, starting from the synthesis of pre-rRNA. To confirm these findings, we treated our cells with vehicle (control), 1 μM EX-527, or 5 μM EX-527. We measured by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) the levels of pre-rRNA and the mature 28S rRNA. Our results reveal that the levels of pre-rRNA significantly increase in the three cell lines after SIRT1 inhibition in a dose-dependent manner (Fig. 7A). The measurement of the mature 28S rRNA also shows an increase in its levels after EX-527 treatment that was significant in HaCaT and SiHa cells (Fig. 7B). These results can be linked to the levels of SIRT1 in each cell line. SIRT1 levels in CaLo cells were slightly lower than in HaCaT cells, and the increase in pre-rRNA levels at the highest dose was 3-fold for CaLo cells and 5-fold for HaCaT cells. For SiHa cells, which significantly express higher levels of

SIRT1 than HaCaT and CaLo cells, the increase in pre-rRNA levels was more than 20-fold. The increases in the mature 28S rRNA were lower than the increases in its precursor, indicating that SIRT1 activity is mostly linked to the initial steps of ribosomal biogenesis. The quantitative proteomics experiments comparing 1 μM EX-527-treated with untreated cells are in full agreement with these results. In Fig. 7C, the distributions of ratios of intensities of ribosomal and all identified proteins in treated *versus* control cells are represented. The means of ribosomal protein ratios were shifted toward cells where SIRT1 was inhibited compared with the means of all protein ratios. The CaLo cell line, which exhibited the lowest increase in 28S rRNA, was also found to have the lowest increase in the abundance of ribosomal proteins.

Our results directly link SIRT1 to the regulation of the synthesis of pre-rRNA and its processing. In the schematic representation of the pre-rRNA synthesis process in Fig. 7D, the protein elements that were discovered to be up-regulated during SIRT1 inhibition are highlighted. SIRT1 does not affect the expression of nucleolar transcription factor 1 (UBTF) that recognizes the rRNA gene promoter, and in our experimental conditions, we were unable to detect any variation in the acetylation levels of their lysine residues. Similarly, we did not detect changes in the transcription terminator factor 1 (TTF-1) and polymerase I and transcript release factor (PTRF) responsible for releasing polymerase I (Pol I) and the pre-rRNA. Conversely, elements of the SL1 complex responsible for the recruitment of Pol I to the promoters were up-regulated after SIRT1 inhibition. In addition, most of the protein components specific for Pol I complex, including the catalytic subunit POLR1A, were up-regulated in the three cell lines. The RNA polymerase I-specific transcription initiation factor RRN3, which is required to activate Pol I and for the interaction with the SL1 complex at transcription initiation sites, was also overexpressed in the three cell lines treated with EX-527. As a consequence of the up-regulation of the Pol I components and its activator, pre-rRNA was overexpressed.

Several proteins involved in pre-rRNA processing to yield the mature rRNA molecules were up-regulated and/or showed increased acetylation site occupancy. Table 2 summarizes the ratios of abundance levels of several proteins involved in the regulation of pre-rRNA processing. The quantitative proteomics analysis revealed that the pre-rRNA processing pathway in CaLo cells is less affected by SIRT1 inhibition than that in HaCaT and SiHa cells. These results were confirmed by the determination of mature 28S rRNA and ribosomal protein levels (Fig. 7, B and C). We found proteins involved in different steps of rRNA processing that were consistently up-regulated in the three cell lines. In addition, two proteins showed increased acetylation occupancy after SIRT1 inhibition in all cells.

The peptide ⁵¹²GSPTGGAQLLKR⁵²³ from ribosomal RNA-processing protein 1 homolog B (RRP1B) was acetylated in the Lys⁵²² residue in the three cell lines treated with EX-527 (HaCaT, 36.3%; CaLo, 38.4%; and SiHa, 22.4% site occupation), whereas in control cells no endogenous acetylation was detected (supplemental Fig. S9). This residue can be a potential SIRT1 target. Besides, the RRP1B protein levels were up-regu-

Acetylomics and proteomics dynamics in human cells

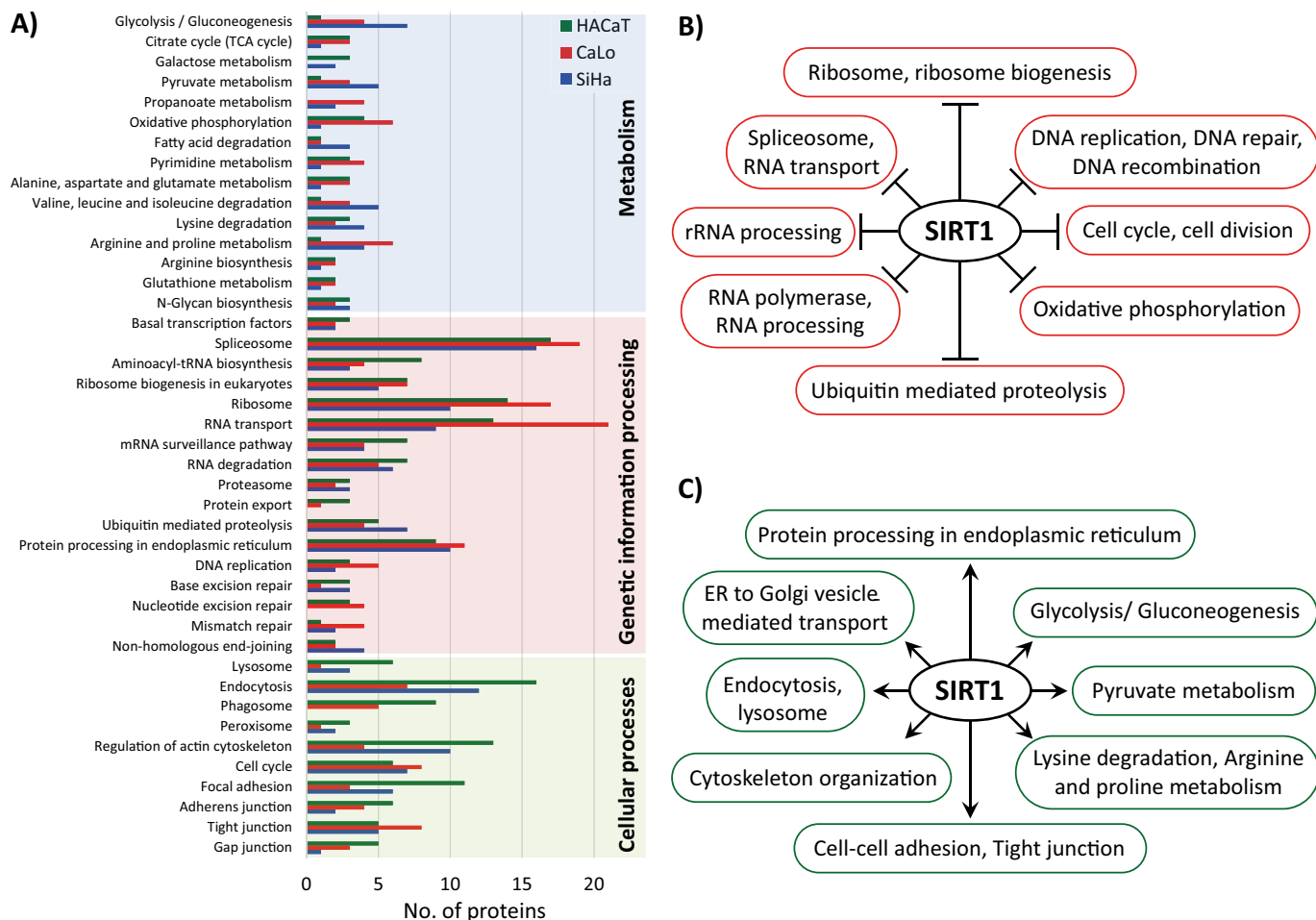


Figure 6. A, number of proteins with sites that showed an increase in acetylation occupancy greater than 5% after EX-527 treatment in each cell line, distributed according to their biological pathway. B, biological pathways and processes enriched in proteins that showed increased abundance after SIRT1 inhibition in the three cell types analyzed and therefore are negatively regulated by SIRT1. C, biological pathways and processes enriched in proteins that showed decreased abundance after SIRT1 inhibition in the three cell types analyzed and therefore are positively regulated by SIRT1. All enrichment analyses were performed with the online version of the DAVID bioinformatics software. TCA, tricarboxylic acid; ER, endoplasmic reticulum.

lated in the three cell lines treated with the SIRT1 inhibitor (Table 2). Interestingly, the peptide $^{16}\text{LASSEKGI}R^{24}$ from the N terminus of RRP1B was acetylated in the Lys 21 residue in the three untreated cell lines (HaCaT, 2.8%; CaLo, 3.8%; and SiHa, 1.8% site occupation). However, in cells treated with the SIRT1 inhibitor, the Lys 21 residue showed no traces of endogenous acetylation in any of the analyzed cells. This finding points to a new level of regulation of rRNA processing that involves SIRT1 regulation of the activity of lysine acetyltransferases and/or other lysine deacetylases that needs further attention. Another potential target of SIRT1 deacetylase activity is the probable ATP-dependent RNA helicase DDX52 required to process the 45S pre-rRNA molecule (Table 2). Treatment with EX-527 resulted in the up-regulation of this protein in the three cell lines. We identified the peptide $^{124}\text{ESKLTSGKLENL}R^{136}$ with two potential acetylation sites that were both acetylated in treated cells, whereas in control cells no acetylation was detected in those sites (supplemental Fig. S11).

Discussion

For large-scale lysine acetylation stoichiometry analyses, we visualized two major challenges during sample processing. The

first is related to the acetylation reaction, which is necessary for the labeling with heavy isotopes of untargeted lysine residues. The second involves the solubilization of fully acetylated proteins, which are known to show an increase in hydrophobicity after modification. For the acetylation reaction, we replaced the conventional acetic anhydride with the *N*-hydroxysuccinimide (NHS) derivate NAS- d_3 , which is a more stable and gentler reagent. In previous works, we optimized the reactions for several alkylating reagents in solution and in gel to completely modify lysine residues at the peptide and protein levels and applied them to proteomics studies (24–26).⁴ As we synthesized the NAS- d_3 reagent starting from acetic anhydride- d_6 and NHS, we used cytochrome *c* to verify the quality of the reagent and the efficiency of labeling (supplemental Fig. S13). The reaction with acetic anhydride generates acetic acid that lowers the pH. As a consequence, stronger basic buffers that can affect the stability of proteins are needed to maintain basic pH during the reaction. In addition, due to the high reactivity, acetic anhydride treatment can generate side reactions in residues such as

⁴ Y. Ramos, Y. Cruz-García, A. Sanchez, J. Gil, L. J. Gonzalez, and V. Besada, unpublished results.

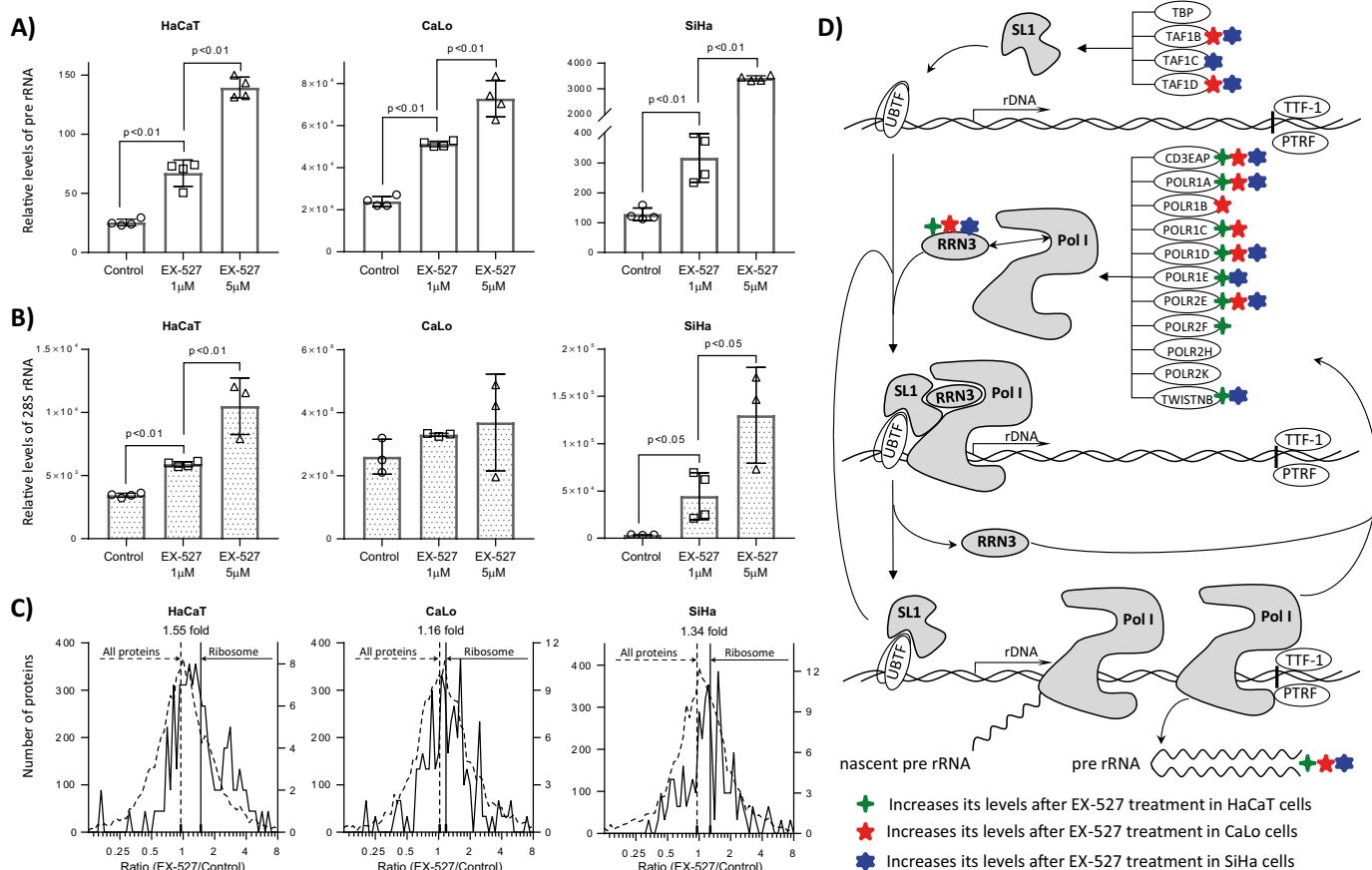


Figure 7. The chemical inhibition of SIRT1 by treating cells with EX-527 increases the levels of pre-rRNA and the mature 28S rRNA in a dose-dependent manner. HaCaT, CaLo, and SiHa cells were treated with vehicle, 1 μM EX-527, and 5 μM EX-527 for 24 h, and the level of pre-rRNA (A) and 28S rRNA (B) were estimated by RT-qPCR relative to actin mRNA levels. Error bars represent S.D. C, the levels of the proteic components of the ribosomes were analyzed as the ratio of the protein intensities between cells treated with 1 μM EX-527 and control. The ratio of protein intensities was distributed on a log₂ scale. Ribosomal proteins are represented in *continuous lines*, and all quantified proteins are shown in *discontinuous lines*. The means of all ratios are presented as *continuous vertical lines* for ribosomal proteins and *discontinuous lines* for all proteins. D, schematic representation of the synthesis of pre-rRNA and proteins involved in this process. SIRT1 inhibition increases the levels of proteins involved in the synthesis of pre-rRNA. Elements of SL1 complex required for the formation of the preinitiation complex were up-regulated in CaLo and SiHa cells. Most of the components specific for the Pol I complex as well as the protein RRN3 required for the activation of Pol I and for the interaction with SL1 complex at the transcription start site were up-regulated in the three cell lines analyzed. *UBTF*, nucleolar transcription factor 1; *TTF-1*, transcription terminator factor 1; *PTRF*, polymerase I and transcript release factor; *TBP*, TATA-binding protein; *TWISTNB*, TWIST neighbor.

tyrosine, threonine, and serine. The acetylation reaction with NAS- d_3 generates NHS, which does not lower the pH, allowing the use of gentle buffers such as TEAB at a lower concentration. This reagent has been successfully used for quantitative proteomics and for lysine acetylation stoichiometric analysis (17, 27). As the acetylation reaction occurs at the protein level, which can significantly increase the hydrophobicity of proteins, we explored the use of different methods for sample preparation. We included detergents during the acetylation reaction and during trypsin digestion to avoid unwanted protein precipitation. We compared three of the most widely used methods for sample preparation in proteomics. FASP, GSP, and SSP were evaluated by comparing the peptide and protein distributions based on their hydrophobicity and molecular mass. The FASP method displayed an important bias in the analysis of hydrophobic peptides in comparison with the other two methods. Although the SSP method exhibited the best overall recoveries, we obtained complementary sets of identified acetyl-lysine peptides with the three sample preparation methods.

Our LC-MS/MS data set was also useful for quantitative label-free proteomics analysis between cell types and for comparing untreated *versus* SIRT1 inhibitor-treated cells. All samples from cell lines or experimental conditions were subjected to the same procedure of chemical acetylation with NAS- d_3 and trypsin digestion. In addition, about half of the identified peptides do not contain lysine residues, and only 10% of the lysine-containing peptides had some degree of endogenous normal acetylation occupancy. However, half of the peptides determined to be acetylated presented a stoichiometry of less than 5%. According to our data, more than 95% of the identified peptides did not show variation in their isotopic distributions, behaving as non-labeled, and therefore can be useful for quantitative label-free analysis.

Our stoichiometric analysis revealed that lysine acetylation is a highly dynamic PTM and that it largely depends on the amino acid composition surrounding the acetylation site. Changes in one residue can alter the stoichiometry of acetylation; this is particularly true for histone variants

Table 2

Relative levels of proteins involved in the regulation of rRNA processing in cells treated with the SIRT1 inhibitor EX-527 relative to control

The reported values correspond to the ratio of intensities for each protein between treated and control cells (EX-527/CTRL) for the three cell lines under study.

Accession number	Gene	Protein names	Unique peptides	Molecular mass (kDa)	Q-value	Score	EX-527/CTRL		
							HaCaT	CaLo	SiHa
47S pre-rRNA processing to yield 45S pre-rRNA									
Q9H8H0	<i>NOL11</i>	Nucleolar protein 11	2	81.123	0	96.59	2.11	1.19	2.74
Q9Y5J1	<i>UTP18</i>	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog	9	62.003	0	75.95	0.91	1.14	5.03
45S pre-rRNA processing to yield 30S and 32S pre-RNAs									
Q9NW13	<i>RBM28</i>	RNA-binding protein 28	15	85.737	0	212.16	1.16	0.95	1.25
Q01780	<i>EXOSC10</i>	Exosome component 10	21	100.83	0	180.36	1.85	1.36	1.41
Q9UGY1	<i>NOL12</i>	Nucleolar protein 12	14	24.663	0	40.817	1.52	1.28	1.47
P56182	<i>RRP1</i>	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog A	22	52.839	0	223.67	1.26	1.16	2.17
Q14684	<i>RRP1B</i>	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	18	82.175	0	157.89	1.51	1.57	2.08
Q14137	<i>BOP1</i>	Ribosome biogenesis protein BOP1	22	83.629	0	116.56	1.68	1.47	1.70
Q9H0D6	<i>XRN2</i>	5'-3' Exoribonuclease 2	28	108.58	0	288.2	1.31	0.64	1.11
Q9Y2R4	<i>DDX52</i>	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52	11	67.497	0	30.176	1.85	1.55	2.10
30S pre-rRNA processing to yield 21S pre-rRNA									
P42677	<i>RPS27</i>	40S ribosomal protein S27	3	9.461	0	130.44	0.66	1.27	1.03
P15880	<i>RPS2</i>	40S ribosomal protein S2	8	31.324	0	157.79	9.53	1.01	1.25
P62847	<i>RPS24</i>	40S ribosomal protein S24	17	15.423	0	126.66	0.69	1.34	1.16
Q9H8H0	<i>NOL11</i>	Nucleolar protein 11	2	81.123	0	96.59	2.11	1.19	2.74
P62081	<i>RPS7</i>	40S ribosomal protein S7	11	21.312	0	117.54	1.51	1.56	4.02
Q9Y324	<i>FCF1</i>	rRNA-processing protein FCF1 homolog	13	23.369	0	35.869	1.86	3.88	5.03
P62249	<i>RPS16</i>	40S ribosomal protein S16	14	16.445	0	323.31	1.18	1.51	1.56
P62277	<i>RPS13</i>	40S ribosomal protein S13	10	17.222	0	46.946	3.30	2.36	3.09
P61247	<i>RPS3A</i>	40S ribosomal protein S3a	11	23.747	0	323.31	0.94	1.56	1.14
P46782	<i>RPS5</i>	40S ribosomal protein S5	8	25.333	0	118.21	1.77	2.45	2.34
P62857	<i>RPS28</i>	40S ribosomal protein S28	5	7.8409	0	193.73	0.77	0.84	1.08
P62244	<i>RPS15A</i>	40S ribosomal protein S15a	8	14.839	0	309.07	1.45	1.58	0.70
P62241	<i>RPS8</i>	40S ribosomal protein S8	19	24.205	0	323.31	0.67	1.35	1.03
P62280	<i>RPS11</i>	40S ribosomal protein S11	11	18.431	0	121.11	2.67	0.88	2.12
Q81Y81	<i>FTSJ3</i>	Pre-rRNA processing protein FTSJ3	30	96.557	0	196.05	1.80	1.19	1.57
P62753	<i>RPS6</i>	40S ribosomal protein S6	16	28.68	0	323.31	1.11	0.76	1.02
21S pre-rRNA processing to yield 18S pre-rRNA									
Q9NQ14	<i>EXOSC5</i>	Exosome complex component RRP46	5	25.249	0	13.818	2.27	2.89	1.07
P42285	<i>SKIV2L2</i>	Superkiller viralicidic activity 2-like 2	19	117.8	0	230.06	0.96	1.06	1.15
Q01780	<i>EXOSC10</i>	Exosome component 10	21	100.83	0	180.36	1.85	1.36	1.41
18S pre-rRNA processing in pre-40S particles									
O43709	<i>WBSCR22</i>	Probable 18S rRNA (guanine-N ⁷)-methyltransferase	5	31.88	0	30.62	2.20	0.99	2.36
32S pre-rRNA processing to yield 12S pre-rRNA and 28S rRNA									
Q9BVP2	<i>GNL3</i>	Guanine nucleotide-binding protein-like 3	16	61.992	0	165	1.83	0.84	1.63
Q9NVN8	<i>GNL3L</i>	Guanine nucleotide-binding protein-like 3-like protein	10	65.572	0	20.152	4.54	0.76	12.52
Q99848	<i>EBNA1BP2</i>	Probable rRNA-processing protein EBP2	23	40.684	0	279.31	1.04	1.08	1.46
Q9NR30	<i>DDX21</i>	Nucleolar RNA helicase 2	17	87.343	0	323.31	1.84	0.68	3.49
O00541	<i>PES1</i>	Pescadillo homolog	31	66.077	0	284.25	2.68	0.91	2.50
Q9Y4W2	<i>LAS1L</i>	Ribosomal biogenesis protein LAS1L	18	81.242	0	57.623	2.03	1.02	1.28
Q5SY16	<i>NOL9</i>	Polynucleotide 5-hydroxyl kinase NOL9	12	79.322	0	110.49	2.11	1.47	0.75
12S pre-rRNA processing to yield 5.8S rRNA									
P42285	<i>SKIV2L2</i>	Superkiller viralicidic activity 2-like 2	19	117.8	0	230.06	0.96	1.06	1.15
Q9Y2L1	<i>DIS3</i>	Exosome complex exonuclease RRP44	20	109	0	115.25	0.63	0.73	0.51
Q99547	<i>MPHOSPH6</i>	M-phase phosphoprotein 6	5	19.024	0.0004	3.9044	1.29	2.56	1.55
Q01780	<i>EXOSC10</i>	Exosome component 10	21	100.83	0	180.36	1.85	1.36	1.41

where single-residue exchange led to variations in the acetylation occupancy of their N-terminal tails. In addition, methylation not only competes with acetylation for the same residues but also can alter the acetylation occupancy in nearby lysine residues. Phosphorylation in residues near the acetylation site can also alter its occupancy, not only for acetylation but also for methylation. Our results show the high degree of complexity of cross-talk between PTMs in a specific protein target. Similar observations were reported previously when Chen *et al.* (14) performed a quantitative acetylome analysis in mouse cells.

We integrated the quantitative proteomics and acetylation stoichiometry analyses in three cell types. We found that,

among the group of deacetylase enzymes, SIRT1 was up-regulated more than 2-fold in SiHa cells compared with HaCaT and CaLo cells. We expected that at least some of the proteins that show low acetylation stoichiometry in SiHa cells could be targets of SIRT1, and therefore their pathways could be regulated by this enzyme. The functional analysis of the group of proteins with less acetylation occupancy in SiHa cells revealed a significant enrichment in ribosomal proteins, ribosome biogenesis, rRNA processing, and glycolysis among others. The proteomics analysis confirmed that these groups of proteins indeed showed differences between cell types. These results indicate that acetylation regulates these pathways and that SIRT1 is probably involved in controlling the acetylation status

of these proteins and therefore involved in the regulation of their pathways.

To clarify the role of SIRT1, we treated cells with the SIRT1 inhibitor EX-527. With this analysis, we confirmed that SIRT1 regulates the acetylation status of several proteins involved in ribosome biogenesis and rRNA processing and ribosomal proteins. In fact, SIRT1 acts as a negative regulator of these pathways because in all cases both the direct identified targets and most of the members of these pathways had increased protein levels after SIRT1 inhibition. Previous reports also provided evidence indicating that SIRT1 plays a role in the repression of ribosomal biogenesis and rRNA processing (28, 29). In addition, our data provide evidence in three different human cell lines that SIRT1 is involved in the negative regulation of several pathways, most of which occur in the nuclear compartment, specifically in the nucleolus. From the proteomics experiments, we assumed that SIRT1 acts as a repressor of the synthesis of pre-rRNA and its processing. To confirm this finding, we measured the levels of pre-rRNA and 28S rRNA in untreated cells and after treatment with a SIRT1 inhibitor. As expected, the levels of pre-rRNA were significantly increased after SIRT1 inhibition, confirming the role of this deacetylase in the process. To a lesser extent, the role of SIRT1 in the processing of pre-rRNA to yield the mature rRNA molecules was also validated by the level of 28S rRNA. Several proteins in different steps of rRNA processing were up-regulated in the three cell lines. Two of them, RRP1B and DDX52, both involved in 45S pre-rRNA processing to yield 30S and 32S pre-RNAs, were also potential direct targets of SIRT1. In the three cell lines, both proteins had increased acetylation occupancy in at least one site.

In contrast, we found that SIRT1 positively regulates several metabolic pathways, cytoskeleton organization, and protein processing in the endoplasmic reticulum, which are mostly non-nuclear pathways. These results correspond to the functions of SIRT1 that were consistently conserved in the three cell lines analyzed. However, as we observed, SIRT1 is differentially expressed in these cell lines, and particular functions for each cell type can be described. For example, in SiHa cells, SIRT1 seems to have a more profound effect on metabolic proteins. In the cases where we found differences between cell lines, further validation is required to obtain more confident evidence about the role of SIRT1 in specific cell types.

With the integration of quantitative proteomics and large-scale lysine acetylation stoichiometry, we explored lysine acetylation sites, their stoichiometry dynamics, and the variations at the proteome level in several experimental conditions without the bias of specific target approaches. In fact, the same data set was useful for both quantitative label-free proteomics and lysine acetylation stoichiometry analyses. With this strategy, we compared three cell lines and analyzed their response to inhibition of the deacetylase SIRT1. More than 1,500 acetylated peptides were identified, and their acetylation occupancy was determined in each cell line and experimental condition. Altogether, we report the acetylation occupancy of more than 5,000 acetylated peptides in proteins from human cells. This study represents the largest data set published so far for a stoichiometric analysis at the proteome level. Finally, the procedures

presented here can be applied to study integrally the role of acetylation and its enzymatic control in any biological system. In addition, several sample preparation methods can be used or explored, depending on the conditions and experiences of each laboratory.

Experimental procedures

Cell culture and protein extraction

Non-cancerous HaCaT and cervical cancer cell lines SiHa (HPV-16-positive) and CaLo (HPV-18-positive) were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin and maintained in a saturated-humidity atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C. At 70–90% confluence, fetal bovine serum was removed from the medium, and cells were harvested 24 h later. For cells treated with EX-527 (6-chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*-carbazole-1-carboxamide) and their corresponding untreated controls, 70–90% confluent cells, grown in the same conditions described above, were washed two times with PBS. Cells were incubated with fresh medium lacking fetal bovine serum and supplemented with 1 μM EX-527, 5 μM EX-527, or vehicle for 24 h.

For cell harvest, the culture medium was removed, and cells were washed two times with PBS and incubated 5 min with Versene solution at 37 °C. Collected cells were washed with cold PBS. Cells were lysed in 4% SDS, 0.1 M DTT, 0.1 M Tris, pH 8.6. Cells were incubated for 1 min in lysis buffer and briefly sonicated on ice (20 pulses, 1 s each). Samples were incubated for 30 min at 40 °C to reduce disulfide bridges completely. Free cysteine residues were modified with iodoacetamide for 30 min at room temperature in darkness. Protein content was estimated based on SDS-PAGE and blue silver staining of samples, aided by ImageJ software.

RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA from HaCaT, CaLo, and SiHa cells was extracted using TRI Reagent from Zymo Research and treated with DNase I (RNase-free; Thermo Fisher Scientific). To generate cDNA, we used the RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit from Thermo Fisher Scientific using random hexamer primers. For RT-qPCR, SYBR Green chemistry (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×) from Thermo Fisher Scientific) was used. Transcripts levels were analyzed in an ABI 7300 Real Time PCR System and were normalized using actin mRNA levels as a control. The primer sequences used in this project were previously reported to determine the levels of pre-rRNA and 28S rRNA (30).

Synthesis of NAS-*d*₃

The synthesis of NAS-*d*₃ reagent was performed as described previously (27, 31). Briefly, NHS was incubated with acetic anhydride-*d*₆ for 16 h under continuous stirring at room temperature. The white residue (NAS-*d*₃) was washed with hexane to eliminate excess reactants and vacuum-dried. NAS-*d*₃ can also be acquired from Sigma-Aldrich (633259).

In-solution sample preparation

Proteins were precipitated with 9 volumes of cold ethanol overnight at -20°C . The pellet was washed three times with 90% ethanol solution. The precipitate was solubilized with 0.5% SDS, 0.5% SDC, 0.1 M TEAB, pH 8.0. The chemical acetylation reaction of the unmodified lysine residues was performed in two consecutive additions of a 100-fold molar excess of NAS- d_3 in DMSO and incubated at room temperature for 1 h, respectively. After the reaction was completed, *O*-acetylation was reverted by incubating the sample with 5% hydroxylamine for 20 min. An ethanol precipitation step, as described previously, was performed, and the sample was solubilized in 50 mM ABC, 0.5% SDC. Trypsin was added to a ratio of 1:50 (enzyme:substrate), and the sample was incubated for 16 h at 37°C . SDC was removed by ethyl acetate extraction under acidic conditions (1 volume of ethyl acetate was added to the sample and acidified with 0.5% TFA). After vigorous vortexing and centrifugation, the organic phase was discarded. An additional step of ethyl acetate extraction without TFA was performed. Finally, the mixture of peptides was desalted with reverse-phase chromatography, dried, and stored at -80°C until LC-MS/MS analysis.

In-gel sample preparation

Proteins were loaded on an SDS-polyacrylamide gel. When proteins entered the concentrator gel, the run was stopped, and the slice was cut. The gel was washed with water, dehydrated with acetonitrile, rehydrated with a solution of 0.1 M TEAB containing a 100-fold molar excess of NAS- d_3 , and incubated for 1 h at room temperature. This step was repeated once, and after washing the gel the *O*-acetylation was reverted by incubating the gel with 5% hydroxylamine for 20 min. After washing and dehydrating, the gel slice was rehydrated with 50 mM ABC and trypsin (1:50 enzyme:substrate) and then incubated at 37°C for 16 h. The peptide mixture was extracted in the presence of water/acetonitrile/formic acid. Finally, peptides were desalted, dried, and stored at -80°C until LC-MS/MS analysis.

In-filter-aided sample preparation

The protein sample was loaded onto a 10-kDa-cutoff filter; subjected to buffer exchange with 0.1 M TEAB, 0.5% SDS, 0.5% SDC; and incubated with a 100-fold molar excess of the lysine acetylation chemical reagent NAS- d_3 for 1 h. A second addition of the acetylating reagent was included, and then the sample was incubated for another hour. *O*-Acetylation was reverted by exchanging the buffer with a solution containing 5% hydroxylamine and incubating the sample for 20 min. For protein digestion, the buffer was exchanged with 50 mM ABC, 0.5% SDC, and trypsin was added to a ratio of 1:50 (enzyme:substrate). The reaction was incubated for 16 h at 37°C , and the mixture of peptides was collected by centrifugation. SDC elimination and the preparation of the sample for LC-MS/MS analysis were performed as described previously for the solution sample preparation method.

Peptide prefractionation

The mixtures of peptides were subjected to reverse-phase chromatography at high pH on a reverse-phase column (4.9×150 mm) from Waters by means of an UltiMate 3000 UPLC system from Dionex. The buffer system was composed of buffer A (50 mM ammonium formate in water, pH 10) and buffer B (50 mM ammonium formate in acetonitrile/water (60:40), pH 10). Samples were loaded onto the column at a flow rate of 0.8 ml/min in buffer A and desalted for 10 min. The elution gradient was from 0 to 80% buffer B in 50 min, from 80 to 100% in 5 min, and kept at 100% of buffer B for another 5 min. 30 sample fractions were collected every 2 min. Finally, fractions were pooled together in five final fractions, each of them composed of fractions separated by 5; for example, the final fraction 1 was composed by fractions 1, 6, 11, 16, 21, and 26. Each final fraction was dried using a SpeedVac, desalted, dried, and stored at -80°C until LC-MS/MS analysis.

LC-MS/MS and data analysis

LC-MS/MS analysis was performed at the Proteomics Core Facility, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne in Switzerland. Peptides were resuspended in initial chromatographic conditions and separated on a Dionex Ultimate 3000 RSLCnano UPLC system in line-coupled to a Q-Exactive high-resolution mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific). Samples were first trapped on a home-made precolumn (Magic AQ C_{18} ; $3\ \mu\text{m}$, $200\ \text{\AA}$, $2\ \text{cm} \times 100\text{-}\mu\text{m}$ inner diameter) and then separated following a 250-min elution gradient using a capillary column at 250 nl/min (Nikkyo Technos Co.; Magic AQ C_{18} ; $3\ \mu\text{m}$, $100\ \text{\AA}$, $15\ \text{cm} \times 75\text{-}\mu\text{m}$ inner diameter). The mobile phases were as follows: A, 2% acetonitrile, 0.1% formic acid in water and B, 90:10 (v/v) acetonitrile:water, 0.1% formic acid. The mass spectrometer was operated in positive data-dependent acquisition mode, and the full MS range was from 300 to 2,000 m/z . The 10 most intense ions were isolated in the quadrupole and fragmented under high-energy collisional dissociation with a normalized collision energy of 27%. Precursor ions were measured at a resolution of 70,000 (at 200 m/z), and the fragments were measured at 17,500. Only ions with charge states of 2 and higher were fragmented with an isolation window of 2 Th. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (32) partner repository with the data set identifier PXD005903.

Protein identification and label-free quantification were performed using MaxQuant v1.5.3.30 (33) setting Arg-C as the digestion enzyme and carbamidomethylcysteine as a fixed modification. Lysine and N-terminal protein acetylation (normal (d_0) and heavy (d_3)) were included as variable modifications as well as phosphorylation (Ser/Thr/Tyr) and oxidation (Met). Proteins were identified with an FDR of 1% based on the target-decoy strategy provided by MaxQuant. The database used for protein identification was the human reference proteome UP000005640 from the UniProt repository downloaded on April 30, 2016. For label-free quantification, we considered proteins with at least two razor-

unique peptides identified by MS/MS. For lysine acetylation stoichiometric analysis, we used Pview software (16), which calculates the stoichiometry of lysine acetylation based on the isotopic distribution of identified peptides in the MS spectrum. For the stoichiometry calculation, we allowed a 5-ppm tolerance for peaks in the isotopic distribution, and for MS/MS identification the tolerance was fixed to 15 ppm with an FDR of 1%. The grand average of hydropathy index of identified peptides and proteins was calculated online (<http://www.gravy-calculator.de/>)⁵ by the program developed by Dr. Stephan Fuchs from the University of Greifswald. The functional enrichments of the identified proteins were performed online on the site of DAVID Bioinformatics Resources v6.8 (34).

Author contributions—J. G. designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript. A. R.-T., J. L.-P., B. A.-E., and S. C. performed experiments. D. C. performed mass spectrometry analysis. F. C. F.-R. performed bioinformatics analysis. S. E.-G. analyzed results, designed experiments, and conceived the study. All authors approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments—We thank Dr. Marcela Lizano and Dr. Alejandro García Carrancá for helpful discussion during project development. We also thank Dr. Zia Khan from the Center for Bioinformatics and Computational Biology of the University of Maryland, for kindly providing the Pview software, the parameter file, and example data and for the stoichiometric analysis.

References

- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., and Mann, M. (2006) Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635–648
- Linding, R., Jensen, L. J., Ostheimer, G. J., van Vugt, M. A., Jørgensen, C., Miron, I. M., Diella, F., Colwill, K., Taylor, L., Elder, K., Metalnikov, P., Nguyen, V., Pasculescu, A., Jin, J., Park, J. G., *et al.* (2007) Systematic discovery of *in vivo* phosphorylation networks. *Cell* **129**, 1415–1426
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., and Mirsky, A. E. (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **51**, 786–794
- Norris, K. L., Lee, J.-Y., and Yao, T.-P. (2009) Acetylation goes global: the emergence of acetylation biology. *Sci. Signal.* **2**, pe76
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnäd, F., Nielsen, M. L., Rehman, M., Walther, T. C., Olsen, J. V., and Mann, M. (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**, 834–840
- Close, P., Creppe, C., Gillard, M., Ladang, A., Chapelle, J. P., Nguyen, L., and Chariot, A. (2010) The emerging role of lysine acetylation of non-nuclear proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 1255–1264
- Kim, S. C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N. V., White, M., Yang, X. J., and Zhao, Y. (2006) Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol. Cell* **23**, 607–618
- Wagner, G. R., and Payne, R. M. (2013) Widespread and enzyme-independent *N*^ε-acetylation and *N*^ε-succinylation in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* **288**, 29036–29045
- de Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A. B. (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.* **370**, 737–749
- Seto, E., and Yoshida, M. (2014) Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a018713
- Gil, J., Ramírez-Torres, A., and Encarnación-Guevara, S. (2017) Lysine acetylation and cancer: a proteomics perspective. *J. Proteomics* **150**, 297–309
- Bosch-Presegué, L., and Vaquero, A. (2011) The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer* **2**, 648–662
- Simmons, G. E., Jr., Pruitt, W. M., and Pruitt, K. (2015) Diverse roles of SIRT1 in cancer biology and lipid metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 950–965
- Chen, Y., Zhao, W., Yang, J. S., Cheng, Z., Luo, H., Lu, Z., Tan, M., Gu, W., and Zhao, Y. (2012) Quantitative acetylome analysis reveals the roles of SIRT1 in regulating diverse substrates and cellular pathways. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, 1048–1062
- Lin, Z., and Fang, D. (2013) The roles of SIRT1 in cancer. *Genes Cancer* **4**, 97–104
- Baeza, J., Dowell, J. A., Smallegan, M. J., Fan, J., Amador-Noguez, D., Khan, Z., and Denu, J. M. (2014) Stoichiometry of site-specific lysine acetylation in an entire proteome. *J. Biol. Chem.* **289**, 21326–21338
- Zhou, T., Chung, Y. H., Chen, J., and Chen, Y. (2016) Site-specific identification of lysine acetylation stoichiometries in mammalian cells. *J. Proteome Res.* **15**, 1103–1113
- Lin, Y., Zhou, J., Bi, D., Chen, P., Wang, X., and Liang, S. (2008) Sodium-deoxycholate-assisted tryptic digestion and identification of proteolytically resistant proteins. *Anal. Biochem.* **377**, 259–266
- Weinert, B. T., Moustafa, T., Iesmantavicius, V., Zechner, R., and Choudhary, C. (2015) Analysis of acetylation stoichiometry suggests that SIRT3 repairs nonenzymatic acetylation lesions. *EMBO J.* **34**, 2620–2632
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G., and Nakatani, Y. (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**, 51–61
- Zink, L. M., and Hake, S. B. (2016) Histone variants: nuclear function and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **37**, 82–89
- Gertz, M., Fischer, F., Nguyen, G. T., Lakshminarasimhan, M., Schutkowski, M., Weyand, M., and Steegborn, C. (2013) Ex-527 inhibits sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, E2772–E2781
- Schölz, C., Weinert, B. T., Wagner, S. A., Beli, P., Miyake, Y., Qi, J., Jensen, L. J., Streicher, W., McCarthy, A. R., Westwood, N. J., Lain, S., Cox, J., Matthias, P., Mann, M., Bradner, J. E., *et al.* (2015) Acetylation site specificities of lysine deacetylase inhibitors in human cells. *Nat. Biotechnol.* **33**, 415–423
- Betancourt, L., Gil, J., Besada, V., González, L. J., Fernández-de-Cossio, J., García, L., Pajón, R., Sanchez, A., Alvarez, F., and Padrón, G. (2005) SCAPE: a new tool for the selective CAPture of PEptides in protein identification. *J. Proteome Res.* **4**, 491–496
- Gil, J., Betancourt, L. Z., Sardiñas, G., Yero, D., Niebla, O., Delgado, M., García, D., Pajón, R., Sánchez, A., González, L. J., Padrón, G., Campa, C., Sotolongo, F., Barberó, R., Guillén, G., *et al.* (2009) Proteomic study via a non-gel based approach of meningococcal outer membrane vesicle vaccine obtained from strain CU385: a road map for discovering new antigens. *Hum. Vaccin.* **5**, 347–356
- Sanchez, A., Ramos, Y., Solano, Y., Gonzalez, L. J., Besada, V., Betancourt, L., Gil, J., Alvarez, F., Rodriguez, M., Perez, L., Pujol, M., and Padron, G. (2007) Double acylation for identification of amino-terminal peptides of proteins isolated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 2237–2244
- Chakraborty, A., and Regnier, F. E. (2002) Global internal standard technology for comparative proteomics. *J. Chromatogr. A* **949**, 173–184
- Voit, R., Seiler, J., and Grummt, I. (2015) Cooperative action of Cdk1/cyclin B and SIRT1 is required for mitotic repression of rRNA synthesis. *PLoS Genet.* **11**, e1005246
- Murayama, A., Ohmori, K., Fujimura, A., Minami, H., Yasuzawa-Tanaka, K., Kuroda, T., Oie, S., Daitoku, H., Okuwaki, M., Nagata, K., Fukamizu, A., Kimura, K., Shimizu, T., and Yanagisawa, J. (2008) Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell* **133**, 627–639
- Ali, M., Yan, K., Lalonde, M. E., Degerny, C., Rothbart, S. B., Strahl, B. D., Côté, J., Yang, X. J., and Kutateladze, T. G. (2012) Tandem PHD fingers of MORF/

⁵ Please note that the JBC is not responsible for the long-term archiving and maintenance of this site or any other third party-hosted site.

Acetylomics and proteomics dynamics in human cells

- MOZ acetyltransferases display selectivity for acetylated histone H3 and are required for the association with chromatin. *J. Mol. Biol.* **424**, 328–338
31. Ji, J., Chakraborty, A., Geng, M., Zhang, X., Amini, A., Bina, M., and Reginier, F. (2000) Strategy for qualitative and quantitative analysis in proteomics based on signature peptides. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **745**, 197–210
 32. Vizcaíno, J. A., Csordas, A., del-Toro, N., Dienes, J. A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T., Xu, Q. W., Wang, R., and Hermjakob, H. (2016) 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* **44**, D447–D456
 33. Tyanova, S., Temu, T., and Cox, J. (2016) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat. Protoc.* **11**, 2301–2319
 34. Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57

Title: Lysine acetylation stoichiometry and proteomics analyses reveal pathways regulated by sirtuin 1 in human cells.

Authors: Jeovanis Gil, Alberto Ramírez-Torres, Diego Chiappe, Juan Luna-Peñaloza, Francis C. Fernandez-Reyes, Bolivar Arcos-Encarnación, Sandra Contreras, Sergio Encarnación-Guevara.

Supplemental tables:

Table S1. List of proteins and peptides identified acetylated in the cell lines HaCaT, CaLo and SiHa. The degree of acetylation occupancy was determined for the number of acetylation sites in the peptides. Coefficient of variation (CV%) and relative errors (RE%) for those acetylated peptides identified/quantified using the three sample preparation methods.

Table S2. Pathway enrichment analyses performed with the online version of DAVID Bioinformatics software of the acetylated proteins identified in the three cell lines under study. Data are presented for each cell lines in different sheets.

Table S3. List of proteins identified with at least two razor-unique peptides by MS/MS that were used for label-free quantification of the cell lines HaCaT, CaLo and SiHa. The ratios of LFQ intensities between cells is provided.

Table S4. List of proteins and peptides that were found with less acetylation occupancy in SiHa cells in comparison with HaCaT and CaLo cells.

Table S5. List of proteins and peptides that their acetylation stoichiometry was calculated (included those with no endogenous acetylation detected), for each of the six experimental conditions, the three cell lines (HaCaT, CaLo and SiHa) untreated and treated with the SIRT1 inhibitor EX-527. Data are presented for each condition in different sheets.

Table S6. List of proteins and peptides that increased their acetylation occupancy in the three cell lines (HaCaT, CaLo and SiHa) after treatment with the SIRT1 inhibitor EX-527. The degree of acetylation for each condition was expressed in percentage of occupancy of at least one acetylation site.

Table S7. List of peptides and proteins for each cell line that increased their acetylation occupancy by at least 5% after 24h treatment with the SIRT1 inhibitor EX-527. The LFQ intensities for each protein as well as the ratios of LFQ intensities between cells is provided. Data are presented for each cell lines in different sheets.

Table S8. List of proteins identified with at least two razor-unique peptides by MS/MS that were used for label-free quantification of the cell lines HaCaT, CaLo and SiHa, untreated and treated with the SIRT1 inhibitor EX-527. The ratio of LFQ intensities between conditions is provided.

Supplemental figures:

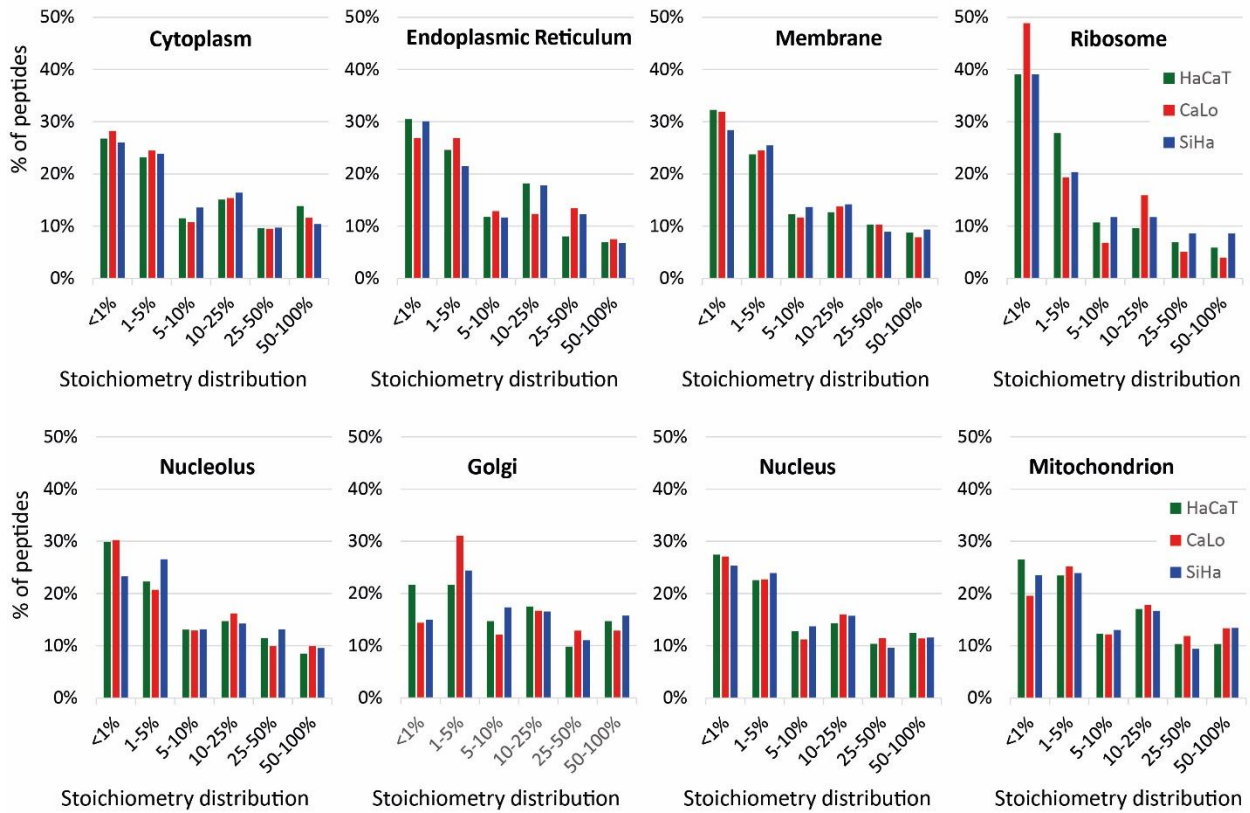


Figure S1. Distribution of peptides according to their acetylation stoichiometry. Each graph correspond to peptides from proteins of the represented cellular component or structure. All acetylated peptides were scattered in six quantiles corresponding to their acetylation occupancy, <1% corresponded to peptides with less than 1% of acetylation occupancy, 1-5%, 5-10%, 10-25% and 25-50% corresponded to peptide with a acetylation stoichiometry between the two values and 50-100% corresponded to peptides with acetylation occupancy from 50% to fully acetylated.

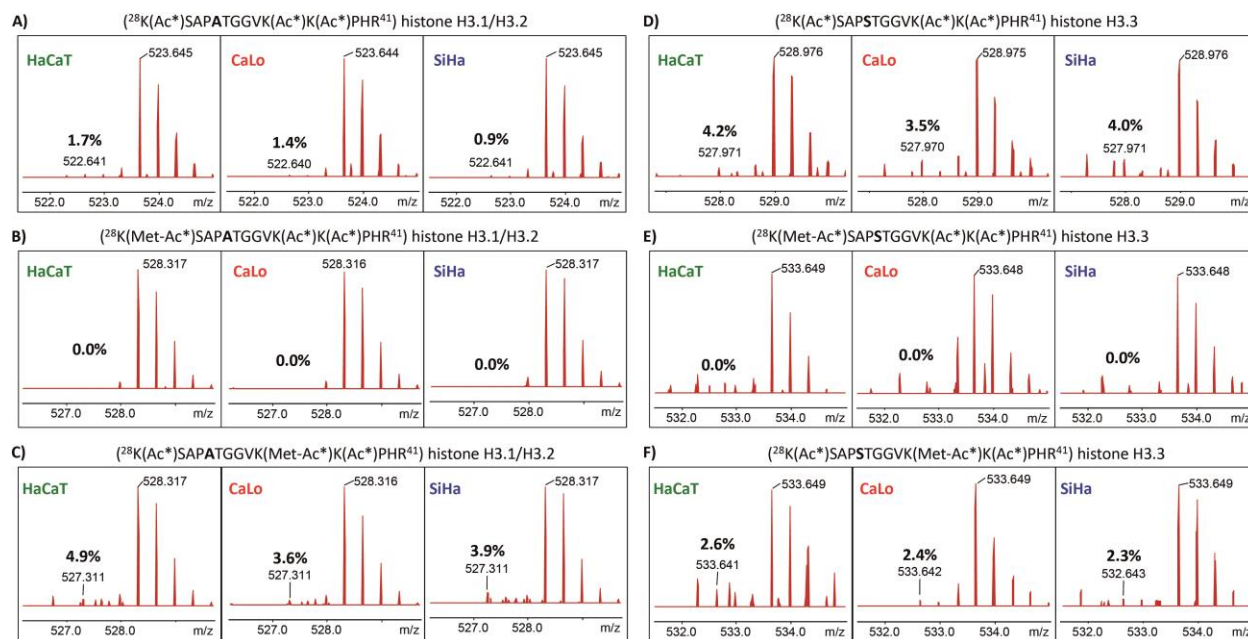


Figure S2. Survey scans showing the isotopic distributions of the peptide $^{28}\text{KSAPATGGVKKPHR}^{41}$ from histone H3.1/H3.2 and the peptide $^{28}\text{KSAPSTGGVKKPHR}^{41}$ from histone H3.3. A) Peptide from histone H3.1/H3.2 fully acetylated in the three cell lines, the values correspond to the degree of endogenous acetylation. B) and C) correspond to the peptide from histone H3.1/H3.2 with the residues K28 and K37 mono-methylated respectively. D) Peptide from histone H3.3 with their three lysine residues fully acetylated. The values correspond to the percentage of endogenous acetylation. E) and F) correspond to the peptide from histone H3.3 with the residues K28 and K37 mono-methylated respectively. All sequences were confirmed by MS/MS analysis.

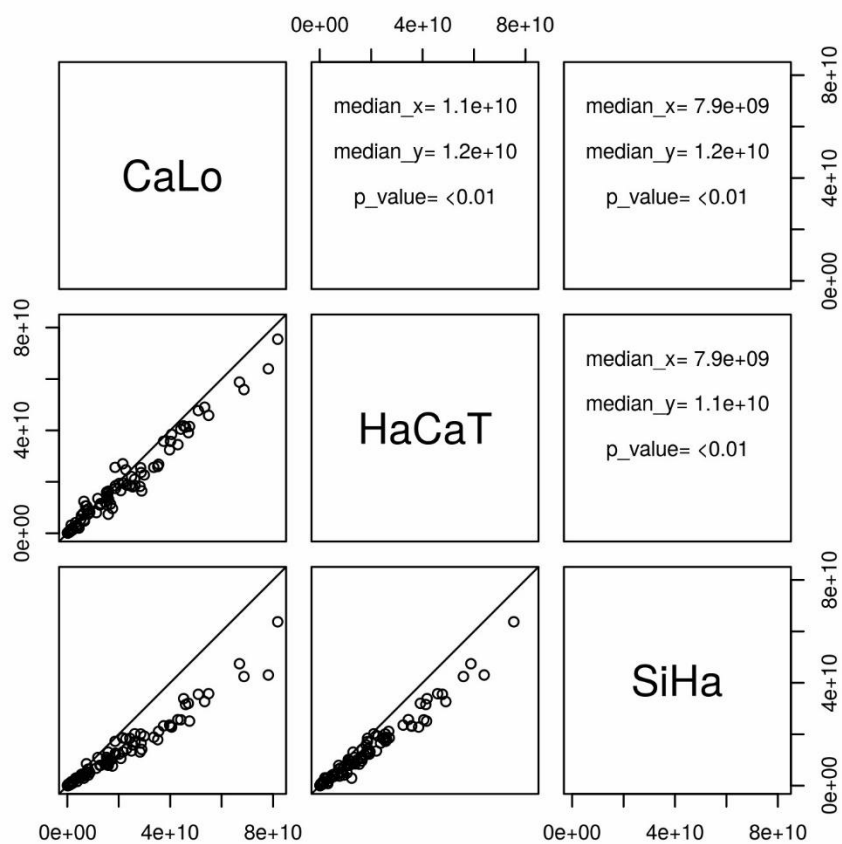


Figure S3. Statistical analysis to determine if the differences between the medians of the abundances of ribosomal proteins are significantly different between the three cell lines (HacaT, CaLo and SiHa). Each cycle correspond to the plot of the LFQ intensity of a ribosomal protein in two cells. The analysis determined with a p value <0.01 that the medians are different between the three cell lines.

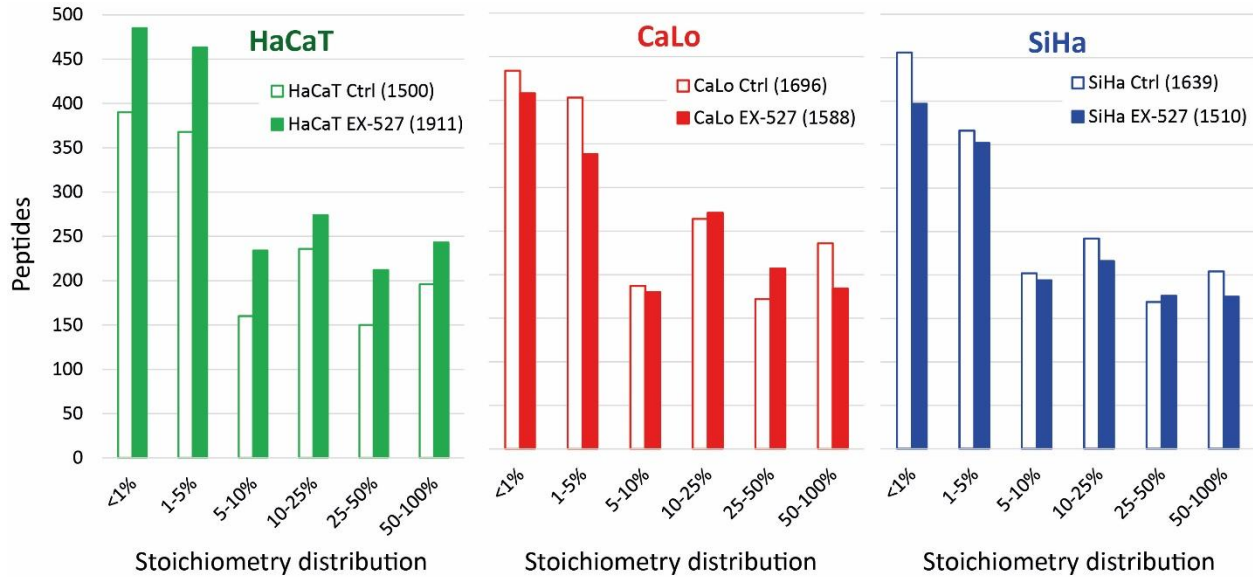


Figure S4. Distribution of peptides according to their acetylation stoichiometry. Each graph correspond to peptides from proteins of the represented cell line, filled bars correspond to the distribution of acetylation stoichiometry in cells treated with the SIRT1 inhibitor EX-527. All acetylated peptides were scattered in six quantiles corresponding to their acetylation occupancy, <1% corresponded to peptides with less than 1% of acetylation occupancy, 1-5%, 5-10%, 10-25% and 25-50% corresponded to peptide with a acetylation stoichiometry between the two values and 50-100% corresponded to peptides with acetylation occupancy from 50% to fully acetylated.

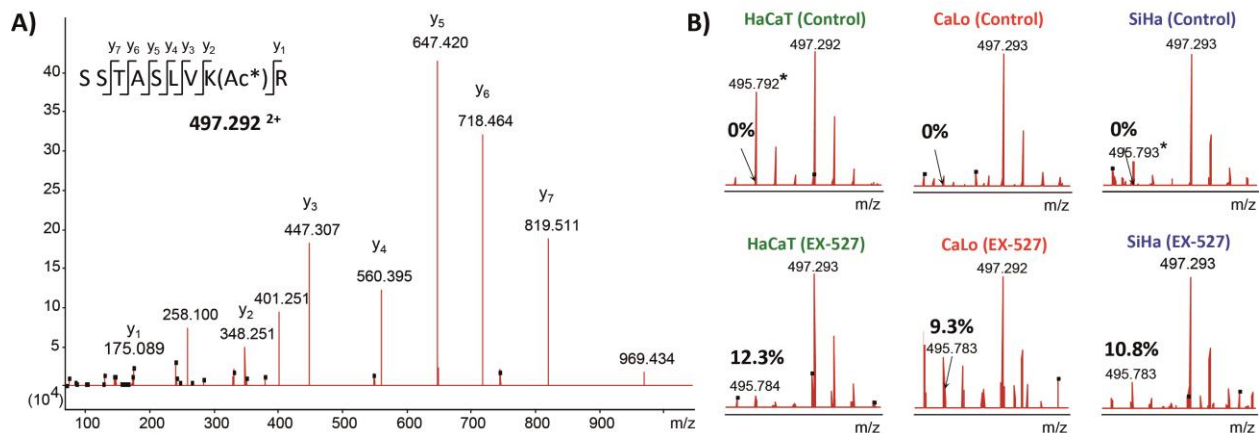


Figure S5. MS/MS and MS spectra of the peptide $^{560}\text{SSTASLVKR}^{568}$ from WD repeat-containing protein 46 (WDR46), identified in the three cell lines under study. A) Representative MS/MS spectrum of the peptide. (Ac*) represents the heavy acetyl group incorporated during acetylation reaction. B) Survey scans showing the isotopic distributions of the peptide chemically acetylated with NAS-d3 and with endogenous acetylation. The values reported correspond to the degree of endogenous acetylation in K567 calculated with Pview software for each experimental condition.

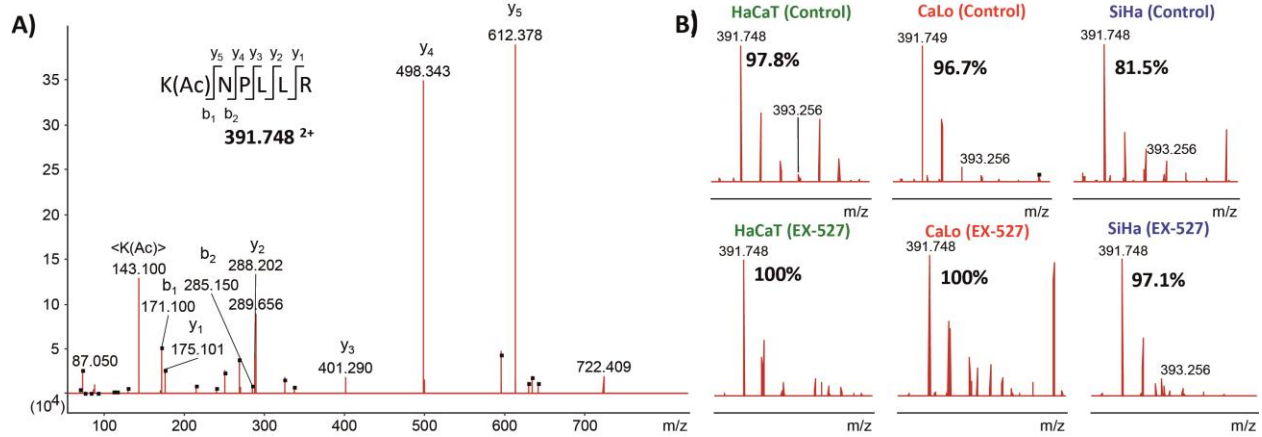


Figure S6. MS/MS and MS spectra of the peptide $^{173}\text{KNPLLR}^{178}$ from Histone deacetylase 7 (HDAC7), identified in the three cell lines under study. A) Representative MS/MS spectrum of the peptide. (Ac) represents the endogenous acetyl group. B) Survey scans showing the isotopic distributions of the peptide chemically acetylated with NAS-d3 and with endogenous acetylation. The values reported correspond to the degree of endogenous acetylation in K173 calculated with Pview software for each experimental condition.

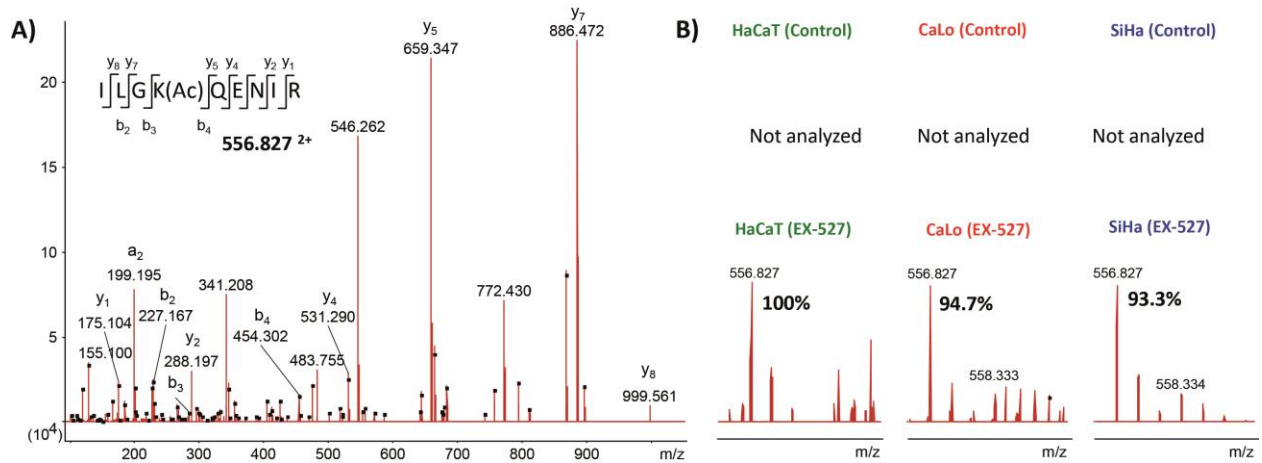


Figure S7. MS/MS and MS spectra of the peptide $^{391}\text{ILGKQENIR}^{399}$ from Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein 1 (PPWD1), identified in the three cell lines under study. A) Representative MS/MS spectrum of the peptide. (Ac) represents the endogenous acetyl group. B) Survey scans showing the isotopic distributions of the peptide chemically acetylated with NAS-d3 and with endogenous acetylation. The values reported correspond to the degree of endogenous acetylation in K394 calculated with Pview software for each experimental condition. In untreated cells no signal corresponding to this peptide was selected for MS/MS analysis.

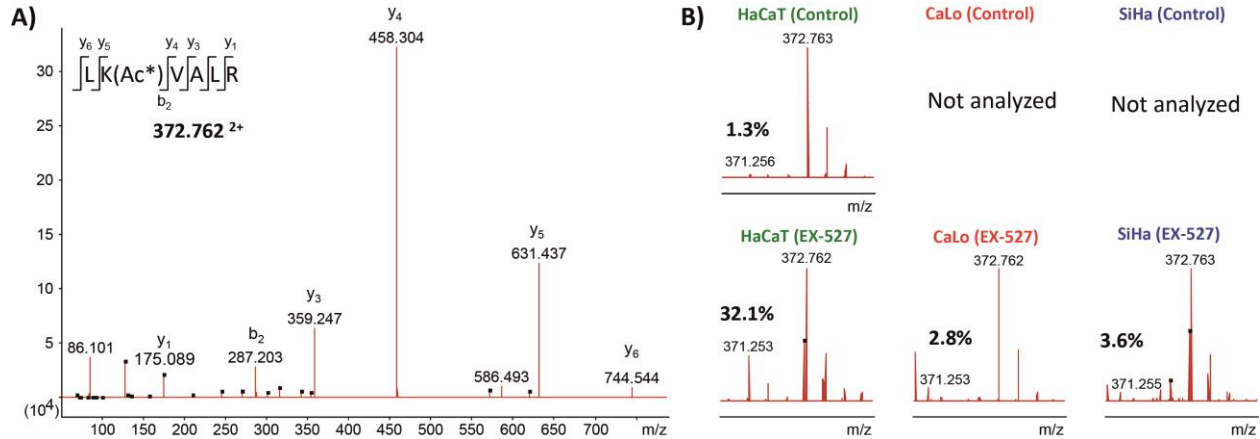


Figure S8. MS/MS and MS spectra of the peptide ³⁷⁰LKVALR³⁷⁵ from E3 ubiquitin-protein ligase BRE1B (RNF40), identified in the three cell lines under study. A) Representative MS/MS spectrum of the peptide. (Ac*) represents the heavy acetyl group incorporated during acetylation reaction. B) Survey scans showing the isotopic distributions of the peptide chemically acetylated with NAS-d3 and with endogenous acetylation. The values reported correspond to the degree of endogenous acetylation in K371 calculated with Pview software for each experimental condition. In untreated CaLo and SiHa cells no signal corresponding to this peptide was selected for MS/MS analysis.

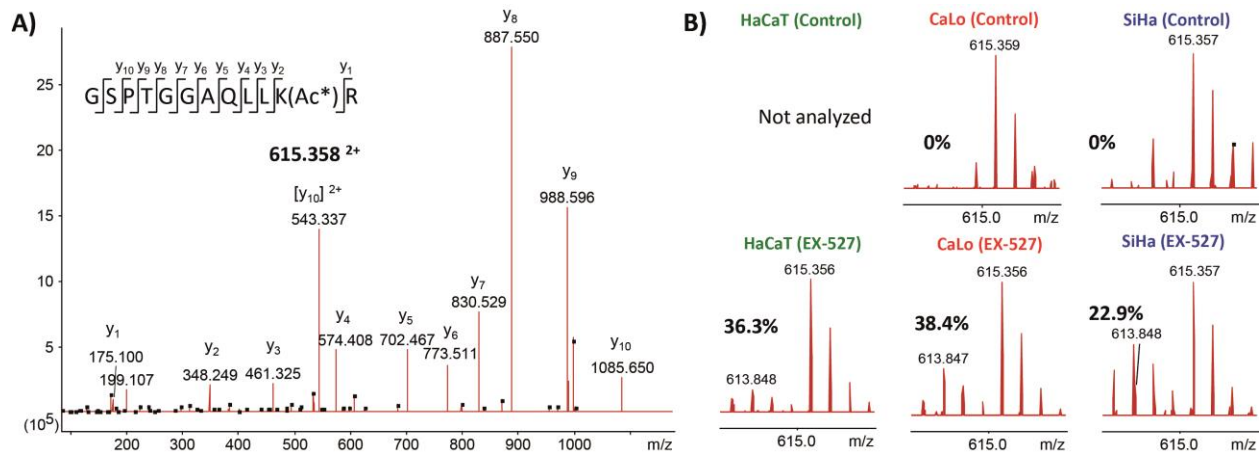


Figure S9. MS/MS and MS spectra of the peptide ⁵¹²GSPTGGAQLLKR⁵²³ from Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B (RRP1B), identified in the three cell lines under study. A) Representative MS/MS spectrum of the peptide. (Ac*) represents the heavy acetyl group incorporated during acetylation reaction. B) Survey scans showing the isotopic distributions of the peptide chemically acetylated with NAS-d3 and with endogenous acetylation. The values reported correspond to the degree of endogenous acetylation in K522 calculated with Pview software for each experimental condition. In untreated HaCaT cells no signal corresponding to this peptide was selected for MS/MS analysis.

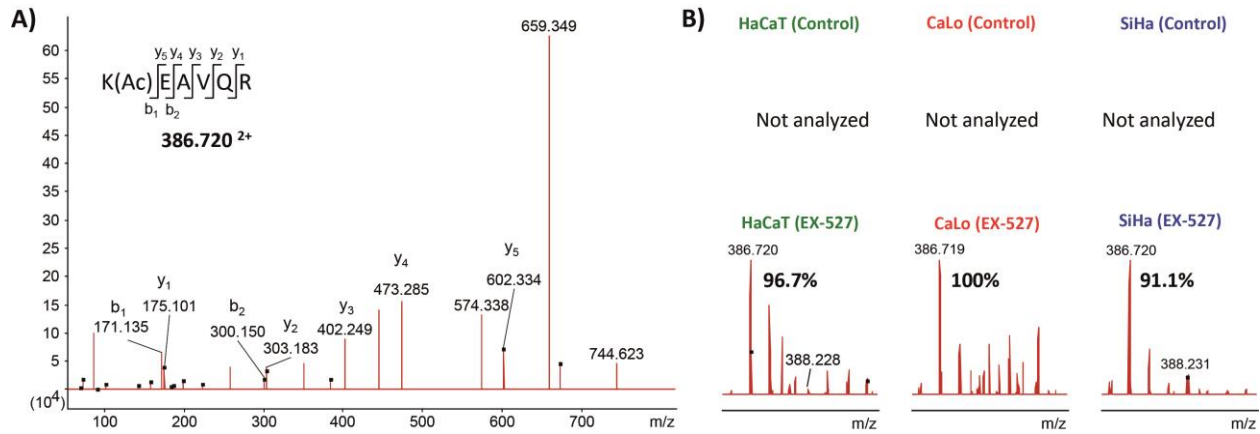


Figure S10. MS/MS and MS spectra of the peptide $^{123}\text{KEAVQR}^{128}$ from Nuclear receptor subfamily 2 group F member 6 (NR2F6), identified in the three cell lines under study. A) Representative MS/MS spectrum of the peptide. (Ac) represents the endogenous acetyl group. B) Survey scans showing the isotopic distributions of the peptide chemically acetylated with NAS-d3 and with endogenous acetylation. The values reported correspond to the degree of endogenous acetylation in K123 calculated with Pview software for each experimental condition. In untreated cells no signal corresponding to this peptide was selected for MS/MS analysis.

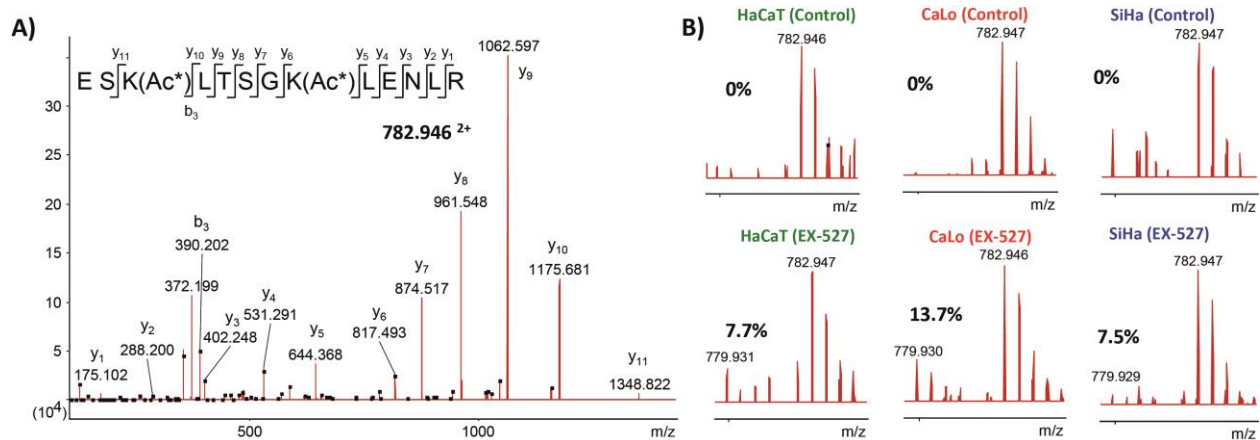


Figure S11. MS/MS and MS spectra of the peptide $^{124}\text{ESKLTSGKLENLR}^{136}$ from Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52 (DDX52), identified in the three cell lines under study. A) Representative MS/MS spectrum of the peptide. (Ac*) represents the heavy acetyl group incorporated during acetylation reaction. B) Survey scans showing the isotopic distributions of the peptide chemically acetylated with NAS-d3 and with endogenous acetylation. The values reported correspond to the degree of endogenous acetylation in both K residues (K126 and K131) calculated with Pview software for each experimental condition.

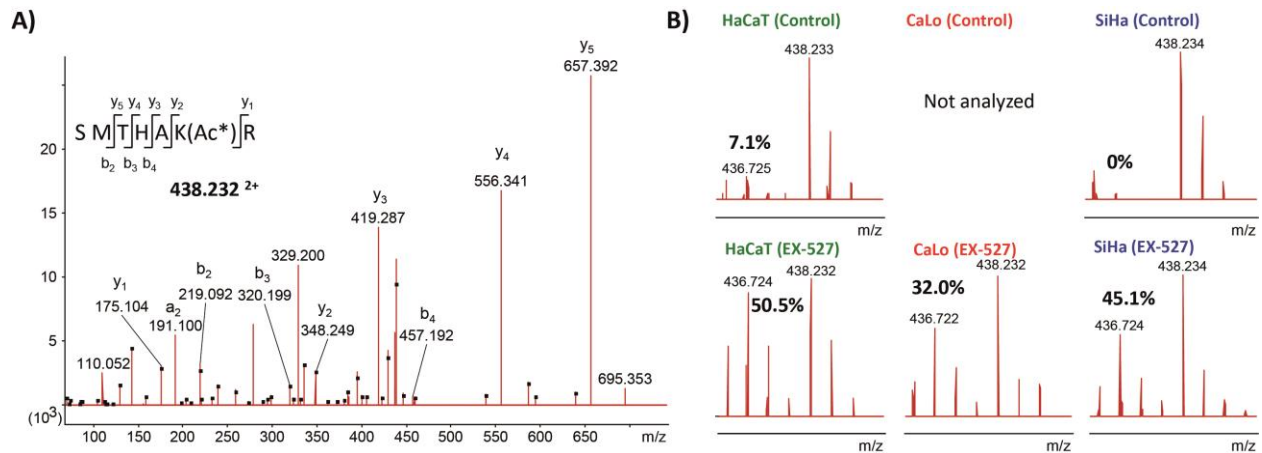


Figure S12. MS/MS and MS spectra of the peptide $^{33}\text{SMTHAKR}^{39}$ from Anillin (ANLN), identified in the three cell lines under study. A) Representative MS/MS spectrum of the peptide. (Ac*) represents the heavy acetyl group incorporated during acetylation reaction. B) Survey scans showing the isotopic distributions of the peptide chemically acetylated with NAS-d3 and with endogenous acetylation. The values reported correspond to the degree of endogenous acetylation in K38 calculated with Pview software for each experimental condition. In untreated CaLo cells no signal corresponding to this peptide was selected for MS/MS analysis.

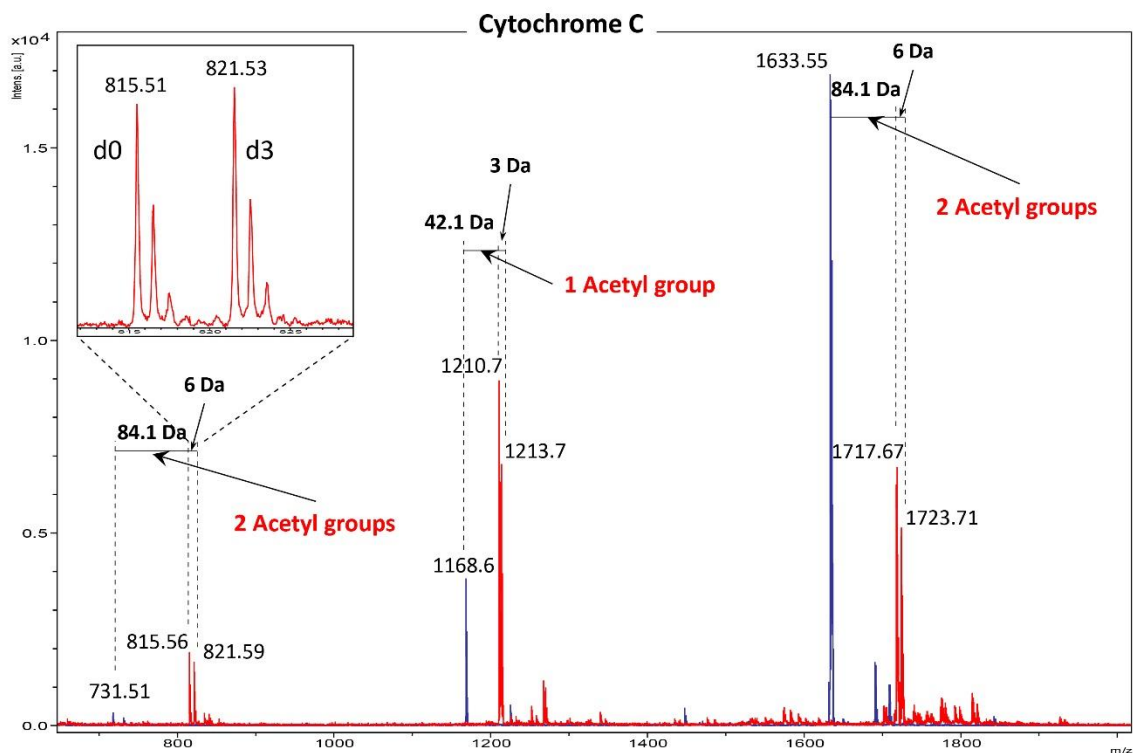


Figure S13. MALDI-MS spectra from tryptic peptides from the model protein cytochrome C. Blue spectrum correspond to unmodified peptides, red spectrum correspond to a mixture of peptides with lysine residues chemically modified with NAS-d0 or NAS-d3. The zoomed spectrum correspond to a mixture 1:1 of acetylated peptides with NAS-d0 or NAS-d3.

Lysine acetylation stoichiometry and proteomics analyses reveal pathways regulated by sirtuin 1 in human cells

Jeovanis Gil, Alberto Ramírez-Torres, Diego Chiappe, Juan Luna-Peñaloza, Francis C. Fernandez-Reyes, Bolivar Arcos-Encarnación, Sandra Contreras and Sergio Encarnación-Guevara

J. Biol. Chem. 2017, 292:18129-18144.

doi: 10.1074/jbc.M117.784546 originally published online September 11, 2017

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M117.784546](https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784546)

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

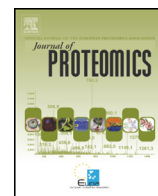
Supplemental material:

<http://www.jbc.org/content/suppl/2017/09/11/M117.784546.DC1>

This article cites 34 references, 9 of which can be accessed free at

<http://www.jbc.org/content/292/44/18129.full.html#ref-list-1>

Anexo 2. Artículo de revisión publicado en el Journal of Proteomics con una descripción del estado del arte en cuanto a acetilación en residuos de lisina y su regulación, con particular énfasis en el papel de la acetilación en cáncer. Adicionalmente se propuso lo que consideramos una metodología adecuada para el análisis integral de la acetilación, que es uno de los objetivos del proyecto de doctorado. El artículo se titula “**Lysine acetylation and cancer: A proteomics perspective**”.



Review

Lysine acetylation and cancer: A proteomics perspective



Jeovanis Gil *, Alberto Ramírez-Torres, Sergio Encarnación-Guevara *

Programa de Genómica Funcional de Procariontes, Centro de Ciencias Genómicas-UNAM, Av. Universidad s/n, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos CP 62210, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2016

Received in revised form 7 October 2016

Accepted 9 October 2016

Available online 13 October 2016

Keywords:

Lysine acetylation

Lysine acetyltransferases

Lysine deacetylases

Bromodomains

Cancer

Proteomics

Stoichiometry

ABSTRACT

Lysine acetylation is a reversible modification controlled by two groups of enzymes: lysine acetyltransferases (KATs) and lysine deacetylases (KDACs). Acetylated lysine residues are recognized by bromodomains, a family of evolutionarily conserved domains. The use of high-resolution mass spectrometry-based proteomics, in combination with the enrichment of acetylated peptides through immunoprecipitation with anti-acetyl-lysine antibodies, has expanded the number of acetylated proteins from histones and a few nuclear proteins to more than 2000 human proteins. Because acetylation targets almost all cellular processes, this modification has been associated with cancer. Several KATs, KDACs and bromodomain-containing proteins have been linked to cancer development. Many small molecules targeting some of these proteins have been or are being tested as potential cancer therapies. The stoichiometry of lysine acetylation has not been explored in cancer, representing a promising field in which to increase our knowledge of how this modification is affected in cancer. In this review, we will focus on the strategies that can be used to go deeper in the characterization of the protein lysine acetylation emphasizing in cancer research.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	298
2. Writers, erasers and readers of lysine acetylation	299
2.1. Lysine acetyltransferases (KATs)	299
2.2. Lysine deacetylases (KDACs)	299
2.3. Bromodomains	299
2.4. Other lysine acetylation reader domains	300
3. Regulation of lysine acetylation enzymes	300
3.1. Regulation of KATs	300
3.2. Regulation of KDAC	300
4. Proteomic analysis of lysine acetylation	300
4.1. Targets of lysine acetylation	302
4.2. Lysine acetylation and other PTMs	302
5. Nonenzymatic lysine acetylation	302
5.1. Nonenzymatic lysine acetylation regulation	303
6. Lysine acetylation in the context of cancer	303
6.1. KATs in cancer	303
6.2. KDACs in cancer	304
6.3. Acetyl-lysine readers in cancer	305
7. Perspectives	305
Author contributions	307
Acknowledgment	307
References	307

* Corresponding authors.

E-mail addresses: jeovanis@ccg.unam.mx (J. Gil), encarnac@ccg.unam.mx (S. Encarnación-Guevara).

1. Introduction

One of the major mechanisms that cells use to increase the number of protein species and their corresponding diversity of functions is the post-translational modification (PTM) of proteins. Many different PTMs have been described, with implications for the functionality of their protein targets. Among the most widely distributed PTMs, phosphorylation has been the most studied and has been implicated in the regulation of almost all cellular processes [1]. To a lesser extent other PTMs such as glycosylation, acylation and ubiquitination, are also being studied and their roles are being elucidated. Acetylation at the epsilon amino group of lysine residues, was first discovered as a PTM of histones more than 50 years ago [2].

Histone acetylation has been extensively studied since its discovery, and its role has been associated with chromatin remodeling and transcription activation. Acetylation of histones neutralize the positive charge of lysine residues affecting the protein-protein interaction between histones and with the negatively charged DNA backbone, leading to a more relaxed chromatin. In addition, lysine acetylation marks are recognized by bromodomain-containing proteins, such as transcription factors, lysine acetyltransferases and methyltransferases, conducting to transcription activation. Conversely, histone deacetylation allows a tighter interaction with DNA leading to more condensed chromatin that prevents access to the transcription machinery [3,4]. In the last 30 years, lysine acetylation has expanded from histones to a large and increasing number of proteins involved in almost all cellular processes [5].

Lysine acetylation is a reversible PTM typically controlled by the following two groups of enzymes: lysine acetyltransferases (KATs), formerly called histone acetyltransferases (HATs) because they were first discovered for this group of proteins, and lysine deacetylases (KDACs), also referred to as histone deacetylases (HDACs). However, in the mitochondrial matrix where specific acetyltransferase remains elusive, there is strong evidence that lysine acetylation can occur nonenzymatically (Fig. 1B) [6]. The enzymatic acetylation process involves the transference of an acetyl group from acetyl-coenzyme A (AcCoA) to the epsilon amino group in the side chain of lysine residues (Fig. 1A). Conversely,

the deacetylation process is achieved by KDACs which use Zn^{2+} as a co-factor (Fig. 1C) or by sirtuins, a specific group of NAD^+ dependent KDACs (Fig. 1D). The incorporation of the acetyl group neutralizes the positive charge of this residue, changes the structure of the amino acid and also blocks other modifications that could occur at the same residue. A group of domains named the bromodomains specifically recognize acetyllysine residues [7]. Among the bromodomain-containing proteins, several chromatin remodeling proteins, transcription factors and KATs can be observed.

Mass spectrometry-based proteomics methods are ideal for identifying PTMs and for pin-pointing the exact site of the modification on the protein and determining the relative or, in certain cases the absolute quantification of the modification. A proteomic method to globally characterize lysine acetylation was introduced by Kim et al. in 2006 [8]. The method included an affinity step with an anti-acetyl-lysine antibody to enrich the sample in acetyllysine-containing peptides. With almost 400 lysine acetylation sites in 195 proteins, this study revealed for the first time that greater than 20% of mitochondrial proteins as well as other nuclear and cytosolic proteins, beyond the group of histones and transcription factors, can be acetylated. With the introduction of peptide fractionation steps and high resolution mass spectrometry [9], the number of acetylation sites was rapidly expanded to greater than 35,000 sites, reported to date in public repositories such as PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org>).

Protein lysine acetylation is involved in several processes that maintain the proper functioning of cells, including transcriptional regulation and metabolic functions. Therefore, acetylation of lysine residues has emerged as a crucial PTM for a wide range of cellular processes and is involved in aging and the development of several diseases, including cancer [9–12]. Some of the proteins involved in controlling this modification and their targets are deregulated in cancers, with implications for tumor development. An increasing number of KAT, KDAC and bromodomain inhibitors are being tested as potential anti-cancer therapies. In this review, we will highlight the implications of the deregulation of lysine acetylation and their controlling enzymes in cancer as well as the proteomics tools for an in depth characterization of this PTM.

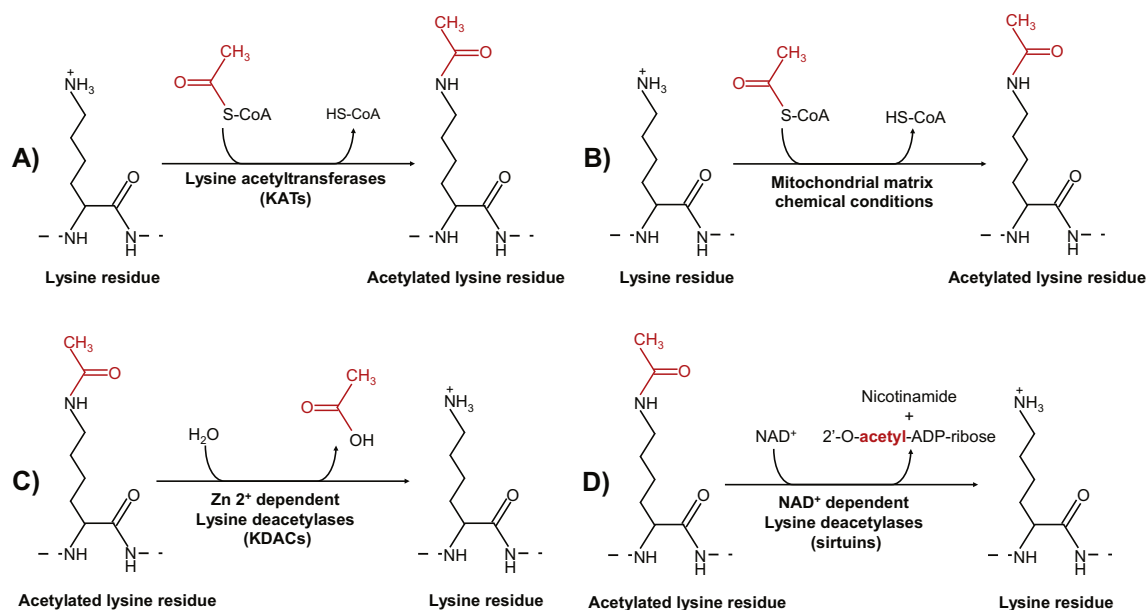


Fig. 1. The acetylation/deacetylation events on the epsilon amino group of lysine residues. A) Acetylation reaction catalyzed by lysine acetyltransferases (KATs). The acetyl group is provided by acetyl-coenzyme A. B) Nonenzymatic acetylation of lysine residues under physiological conditions in the mitochondrial matrix (pH 7.9–8.0 and [AcCoA] 0.1–1.5 mM). C) Deacetylation reaction of acetyl-lysine residues catalyzed by Zn^{2+} -dependent lysine deacetylases (KDACs). D) Deacetylation reaction catalyzed by sirtuins, a group of NAD^+ dependent KDACs producing deacetylated lysine, nicotinamide and 2'-O-acetyl-ADP-ribose.

2. Writers, erasers and readers of lysine acetylation

2.1. Lysine acetyltransferases (KATs)

KATs are a group of enzymes that catalyze the transfer of the acetyl group from acetyl-coenzyme A to the epsilon amino group of the side chains of lysine residues. KATs are composed of three families based on sequence similarities. The first group is the Gcn5-related N-acetyltransferase family (GNAT), including KAT2A and KAT2B. These two acetyltransferases are highly homologous and are mutually exclusive in their complexes [13]. KAT2A, also known as GCN5, has been found as part of two large complexes involved in chromatin modification, Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase (SAGA) and Ada2-containing (ATAC) complexes [14]. In addition, KAT2B, or acetyltransferase p300/CBP-associated factor (PCAF) has been found as part of a SAGA-like or ATAC complexes. Both enzymes share certain redundant functions, such as the acetylation of histone H3 at the K9 residue; nevertheless, they also have their own distinct functions [15].

The second family is the p300/CREB-binding protein (CBP), and the third is the MYST family (monocytic leukemia zinc finger protein (MOZ), Ybf2/Sas3, Sas2 and Tip60). CBP and p300 acetyltransferases are highly related proteins that share 75% sequence similarity; nonetheless, they share little sequence homology with the other KATs. CBP/p300 are large multi-domain proteins that interact with more than 400 different cellular proteins [16]. These acetyltransferases are considered transcriptional coactivators because of their roles in the acetylation of histones and several nuclear proteins. KAT5 or Tip60 is the most studied KAT of the MYST family, which plays an important role not only in the regulation of transcription but also in the process of DNA damage repair, particularly in DNA double-strand breaks (DSB). To mediate the interaction with other proteins and substrates, KATs also possess other domains in addition to the catalytic domain, including bromodomains and other modification recognition domains. Although the biological functions and substrates of these enzymes remain uncharacterized, various KATs have been implicated in cancer development [17].

2.2. Lysine deacetylases (KDACs)

Human KDACs are a group of 18 enzymes that remove the acetyl group from the epsilon amino in the side chain of lysine residues. KDACs were classified in four classes based on their homology with yeast proteins. Classes I, II and IV are Zn²⁺ dependent, while sirtuins or class III KDACs require NAD⁺ as cofactor [18]. The corresponding deacetylation reactions are represented in Fig. 1 (C and D). Although class I, II and IV KDACs exclusively demonstrate deacetylase activity, sirtuins in addition to lysine deacetylase, also exhibit mono-ADP-ribosyltransferase activity [19]. KDACs class I is composed by four members (HDAC1, 2, 3 and 8), and they show high similarity with the yeast protein RPD3. HDAC1, 2 and 3 have been described as components of multi-protein complexes, whereas HDAC8 has not been found to be part of any multi-protein complex [20]. HDAC1, 2 and 8 are usually located in the nucleus, whereas HDAC3 also has a nuclear export signal and can shuttle between the nucleus and cytoplasm [21].

Class II KDACs are further divided into Class IIa (HDAC4, 5, 7, 9) and class IIb (HDAC6 and 10). Both subclasses are closely related to yeast HDAC1. Class IIa KDACs have found to be mainly involved in differentiation and development, and these enzymes are tissue specific. Class IIa proteins function as transcriptional repressors in the brain, bone, skeletal, cardiac, and smooth muscles, as well as in the immune and vascular systems. Class IIa members are tightly regulated by serine phosphorylation in the regulatory domain located at the N-terminal region. Class IIa KDACs show significantly less deacetylase activity than class I, IIb and IV. The low deacetylase activity was attributed to the presence of a histidine residue instead of tyrosine in the catalytic site. This finding suggests that hydrolyzing the acetyl group from the side chain of lysine

residues might not be the main *in vivo* function of class IIa KDACs. In addition, the substitution of the histidine residue by tyrosine increases the deacetylase activity however, the transcriptional repressor activity is not improved [22,23]. The two members of class IIb deacetylases (HDAC6 and HDAC10) are mainly found in the cytoplasm or in both the cytoplasm and nucleus in the case of HDAC10. Both members contain two deacetylase domains; however, HDAC6 additionally possesses a carboxy-terminal zinc finger and a specific domain for binding ubiquitin. The unique member of class IV KDACs is HDAC11, a mostly nuclear protein homologous of both class I and class II KDACs [24].

Sirtuins represent class III KDACs, they are composed of seven elements (SIRT1 to 7), and all of them are homologous to yeast Sir2. A remarkable feature of these proteins is that they possess two enzymatic activities, mono-ADP-ribosyltransferase and lysine deacylase, and they are involved in a wide range of biological processes, including chromatin regulation, DNA repair, and response to stress, among others [25]. Another interesting characteristic of sirtuins is their localization. SIRT1 and SIRT2 are found in the nucleus and cytoplasm. SIRT3 is located in the nucleus and mitochondria. SIRT4 and SIRT5 are exclusively located in the mitochondria. SIRT6 is only found in the nucleus, and SIRT7 is located in the nucleolus [26]. Due to the large number of biological functions in which sirtuins are involved, they were associated with several diseases including diabetes, neurological diseases and cancer.

2.3. Bromodomains

Acetylation of lysine residues in a given protein not only changes its physicochemical properties but also provides the opportunity to interact with proteins that recognize acetylated residues. Bromodomains recognize acetylated lysine residues, and were first discovered in 1992 in the *brahma* gene from *Drosophila melanogaster* [7]. The human genome encodes 46 bromodomain-containing proteins, with a total of 61 unique individual bromodomains. All human bromodomains share a similar sequence length and have at least 30% sequence identity. Bromodomain-containing proteins represent a wide variety of functionality in chromatin biology and gene transcription. Various transcription factors, KATs and KAT-associated proteins, methyltransferases and chromatin remodelers, among others (Fig. 2), are part of the group of bromodomain-containing proteins. Bromodomain-containing proteins are mostly nuclear and cytoplasmic and are usually part of large multiprotein complexes, supporting the recruitment of specific complexes to their action site.

A particular group of bromodomain proteins are known as bromodomain and extra-terminal (BET), these proteins share a common domain architecture, two N-terminal bromodomains and an extra-terminal domain. In humans four BET proteins have been identified: BRD2, BRD3, BRD4, and the testis-specific protein BRDT. BET proteins play an important role in the assembly of a productive transcriptional activation complex through the recruitment of the p-TEFb complex (CDK9 and cyclin T1) to RNA polymerase II, which is required for transcriptional elongation [27]. Various genetic rearrangements have been reported for bromodomain proteins. In the case of the BRD4 gene, a member of the BET proteins, rearrangements have been associated with highly aggressive cancers [28].

In KATs and KAT-associated proteins such as KAT2A, KAT2B, CBP/p300 and bromodomain-containing protein 9 (BRD9), bromodomains contribute to substrate recruitment and specificity involving histones and non-histone proteins, providing a functional link between lysine acetylation and acetylation-mediated protein-protein interactions in chromatin-mediated gene transcription [29]. In addition, double bromodomains are seen in many proteins, including TAF1/TAF1L and the TFIID 250-kDa subunit of the transcription initiation complex. Some bromodomain proteins act as chromatin remodelers; this group includes SMARCC2 (also known as BRM, SNF2/SWI2) and SMARCC4 (BRG1).

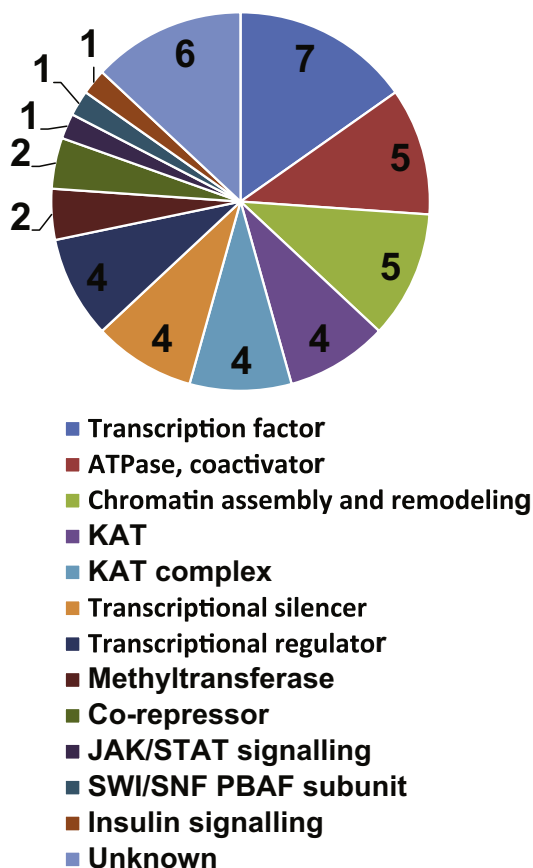


Fig. 2. Distribution by function of the bromodomain containing proteins. The number of bromodomain proteins within each specific activity is represented by numbers.

2.4. Other lysine acetylation reader domains

Recently, Li et al. reported that YEATS (Yaf9, ENL, AF9, Taf14 and Sas5) domains recognize specific lysine acetylation marks. Specifically, it was discovered that the YEATS domain of AF9 from several species, all bind acetylated histone H3K9Ac [30]. All YEATS domain containing members are found as part of KATs, chromatin-remodeling or transcription regulation complexes. YEATS is an evolutionary conserved domain from yeast to humans and all the protein members contain only a single YEATS domain [31]. Plant homeodomain (PHD) fingers have been described to specifically bind methylation marks in histones, as previously demonstrated [32]. In addition, a double PHD finger in the DPF3b protein binds acetylated histones H3 and H4 [33]. DPF3a is a splicing variant of DPF3b, with a truncated PHD finger and is unable to bind histone H3 or H4. DPF3 is part of the BAF chromatin remodeling complex and provides a regulation level to the transcription of certain genes [34]. MYST4 or KAT6B, a member of the MYST group of acetyltransferases, also possesses a double PHD finger with the ability to interact with the N-terminal of histone H3. Actually, acetylated lysine residues K9 and K14 from histone H3 enhance the interaction with KAT6B [35].

3. Regulation of lysine acetylation enzymes

3.1. Regulation of KATs

The importance of lysine acetylation in the regulation of most cellular functions is becoming increasingly clear. KATs are generally large multi-domain proteins with several modes of regulation. As KATs are mainly found as part of large multiprotein complexes, protein-protein interactions modulate not only the acetyltransferase activity but also

their substrate specificity. Auto-acetylation has been described as a common regulation mechanism of KATs. p300 and PCAF auto-acetylation in various lysine residues have been linked to activation, increased catalytic activity and stability [36]. Consequently, KDACs oppose this mechanism of self-acetylation; therefore, they contribute to the regulation of KATs.

3.2. Regulation of KDAC

Like many other groups of enzymes, the activities of KDACs are highly regulated in various ways. Protein-protein interactions and PTMs are among the most studied mechanisms of KDAC regulation. Some KDACs are common components of multiprotein complexes and generally exhibit low enzymatic activity when isolated. HDAC1 and HDAC2 co-exist in at least three different complexes (sin3, NuRD and CoREST), and the correct incorporation of the elements of these complexes and the presence of cofactors are required for the formation of enzymatically active complexes [26,37]. The interaction of HDAC3 with SMRT/NCOR stimulates the KDAC enzymatic activity of this protein, and mutant SMRT/NCOR, which does not bind HDAC3, cannot activate HDAC3 [38]. SIRT1 represents another KDAC modulated by the interaction with several proteins. The protein deleted in breast cancer 1 (DBC1) has been observed to negatively regulate the enzymatic activity of SIRT1, leading to an increase in p53 acetylation and stabilization [39]. By contrast, SIRT1 is positively regulated by the interaction with the active regulator of SIRT1 (AROS), resulting in the augmentation of p53 deacetylation, thereby inhibiting p53 transcriptional activity [40].

KDACs are targets of several PTMs, including acetylation, phosphorylation and ubiquitination among others. To date, phosphorylation has been the most studied PTM that affects the functionality of KDACs. HDAC1 and HDAC2 phosphorylation by cAMP-dependent kinase PKA and protein kinase CK2 are essential for the enzymatic activity and correct formation of complexes [41,42]. Kinases such as CK2, DNA-PKcs and GSK-3 β phosphorylate HDAC3 to enhance its activity [43,44]. By contrast, the phosphorylation of HDAC8 by PKA inhibits the enzymatic activity of this KDAC [45]. SIRT1 is a well-known phosphoprotein with at least 13 sites of phosphorylation [46]. The phosphorylation of SIRT1 may increase its enzymatic activity, stability and nuclear localization as described by Nasrin et al. in 2009 [47]. CK2, JNK1, JNK2, Cdk1, AMPK, PKA and probably other kinases phosphorylate SIRT1. Other KDACs have been found to be phosphorylated with implications regarding their functionality [26].

4. Proteomic analysis of lysine acetylation

Since the discovery of soft ionization methods in mass spectrometry, the characterization of non-volatile large macromolecules, such as peptides and proteins, has been possible. In the last two decades, the liquid chromatography and mass spectrometry systems have been significantly improved, becoming increasingly more precise, accurate, fast and sensitive. Therefore, mass spectrometry-based proteomics contribute substantially not only to the characterization of proteins but also to the identification and quantification of their PTMs. The analysis of PTMs represents a challenge since most of them are present in low stoichiometry, few residues in the target protein contain the modification and some of the PTMs produce signal suppression or low-quality MS/MS spectra. For most PTMs, specific targeting approaches are essential to increase the coverage of the proteomic analysis. Among the most advanced areas are phosphoproteomics (targeting protein phosphorylation) [48], glycomics (targeting protein glycosylation) [49] and more recently acetylomics (targeting lysine protein acetylation) [8].

A general workflow to perform mass spectrometry based identification/relative quantitation of acetylated peptides has been previously reported and is summarized in Fig. 3. It is important to consider various critical aspects during this procedure to obtain more comprehensive results. Lysine acetylation is a PTM that generally presents in low

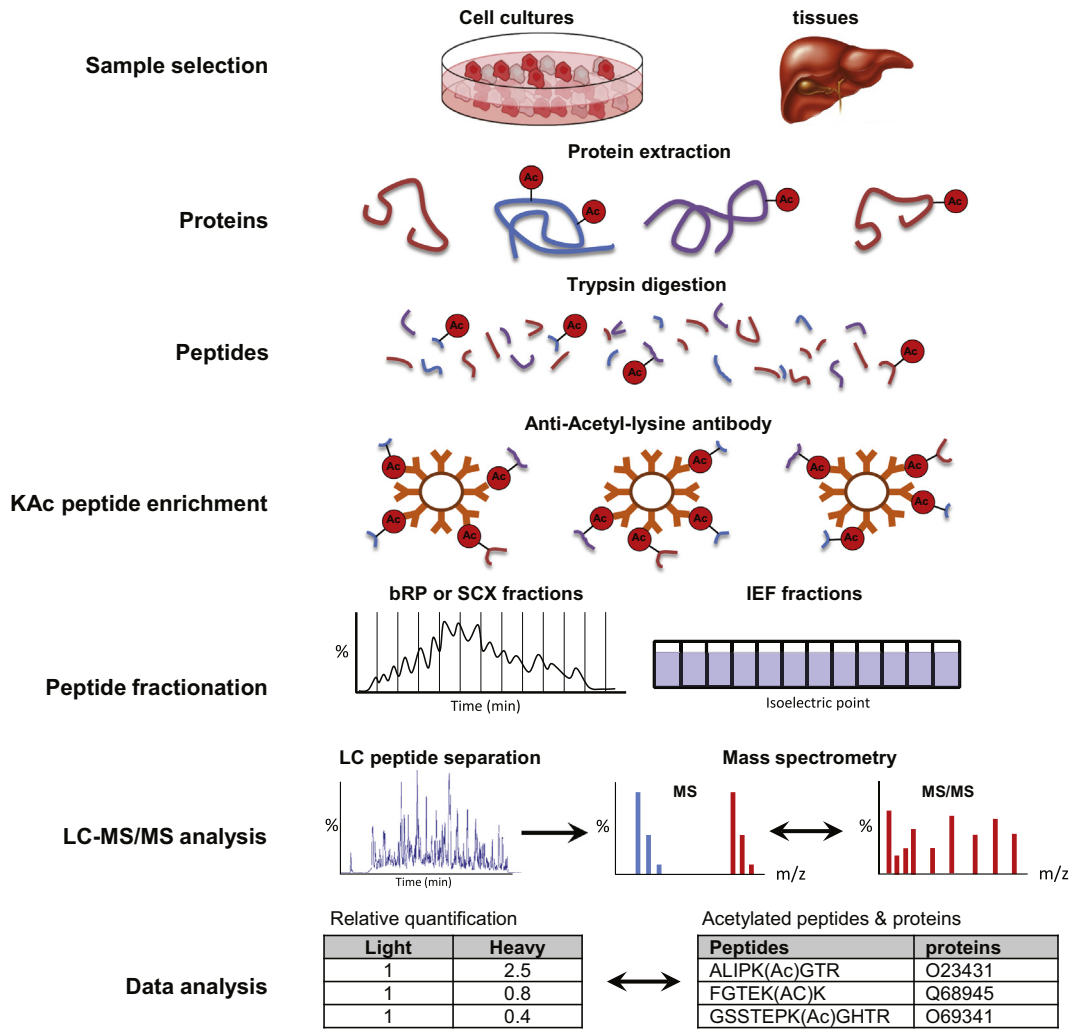


Fig. 3. General workflow for the mass spectrometry based proteomics analysis of acetylated peptides and proteins. Proteins are extracted from cells or tissues and digested into peptides typically using trypsin. Only a small subset of generated peptides is acetylated (red circles). To reduce the sample complexity to improve the chances of identifying acetylation, an enrichment of acetylated peptides is performed by immunoaffinity purification with immobilized pan-acetyl-lysine antibodies that selectively bind to acetylated peptides. Once enriched, the sample complexity can be further reduced by peptide fractionation methods, such as reversed-phase (RP) chromatography at high pH, strong cation exchange (SCX) chromatography or isoelectric focusing (IEF). Each fraction is then analyzed by nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using RP chromatography under acidic conditions. Eluted peptides undergo electrospray ionization, and peptide ions are transferred into the mass spectrometer, which measures the mass-to-charge (m/z) ratio of intact peptide ions (MS spectra). The relative abundance of acetylated peptides can be performed when two or more experimental conditions are being analyzed. Selected peptide ions are fragmented and their daughter ion spectra (MS/MS spectra) are recorded. MS and MS/MS spectra are then computationally processed to deduce peptide sequences, including the presence and location of post-translational modification (PTMs) and to quantify the abundance of peptides and proteins. (Adapted from reference [12])

stoichiometry, only a few residues are targets for acetylation in a protein, and not all proteins are indeed acetylated. These features were highlighted by Choudhary et al. when they compared results from two different proteomic experiments; one experiment lacked affinity enrichment of acetylated peptides and the other experiment incubated the peptide mixture with an anti-acetyl-lysine antibody. The number of acetylation sites identified was 60-fold reduced in the experiment without affinity enrichment [9]. Taking into account these results, large amounts of starting materials are needed, at least 60-fold higher than for a proteomic experiment without any enrichment step. In cancer research this could represent a limitation, at least if the samples to be analyzed are tissues or biopsies. On the other hand, the use of an affinity enrichment step is the gold standard. To date, according to our knowledge the use of antibodies (monoclonal or polyclonal) is the method of choice to capture acetylated peptides. However, several limitations are associated with the use of anti-acetyl-lysine antibodies, one being specificity. Most of the commercially available antibodies have low specificity. After the enrichment step, only 3 to 10% of identified

peptides are indeed acetylated. The selectivity of anti-acetyl-lysine antibodies vary from one to another, and different subsets of acetylated sites are captured when distinct antibodies are used. To analyze lysine acetylation, at a deeper level, the use of at least two different anti-acetyl-lysine antibodies is recommended whenever possible. In a recent work, seven monoclonal anti-acetyl-lysine antibodies were used as a single reagent to perform an enrichment in acetylated peptides [50]. This, in addition to optimized experimental procedures, such as the amount of antibody and off-line peptide fractionation before LC-MS/MS analysis, yield in the identification of more than 10,000 acetyl-lysine containing peptides, with a specificity of approximately 40%. Selecting the correct amount of antibody is critical to increase yields and specificity. The use of low amounts of antibody generally results in an increase in the identification of acetylated peptides vs. non-acetylated peptides. However, using extremely low amount of antibody in the enrichment step will affect the reproducibility of the experiment, as noted by Svinikina et al. [50]. Although the complexity of the sample is significantly reduced after the enrichment of acetylated peptides, it is highly

recommended to perform a peptide fractionation step before LC-MS/MS analysis to increase coverage of the lysine acetylation sites.

Another important aspect is the validation of acetylated peptides identification. Lysine residues generate immonium ions at 101 Th and its corresponding loss of ammonia and rearrangement at 84 Th during fragmentation under CID or HCD. In the case of acetylated lysine residues, the m/z of the immonium ion is 143.1179 Th and its cyclic rearrangement at 126.0913 Th. Trelle and Jensen evaluated the features of these ions, including their specificity, sensitivity and intensity, in tandem mass (MS/MS) spectra from a set of peptides to use them as an additional validation criterion for the identification of acetylated peptides [51]. The m/z signal at 126 Th was highly specific for the presence of acetylated lysine residues (98%) however, the signal was only observed in 71.5% of acetyl-lysine containing peptides. The 143 Th signal was less specific and sensitive mainly because several combinations of amino acids may form fragment ions at the same m/z . Nevertheless, they created a useful validation scheme for the correct assignment of acetylated lysine residues in peptides, based on these features. An additional validation criterion for the identification of acetylated peptides can be used when stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) based quantitative proteomics is performed. With SILAC, the number of arginine and lysine residues is known, providing an additional level of confidence in the identification process.

Using proteomic methods based on the immunoprecipitation of acetylated lysine-containing peptides to enrich acetylated peptides, followed by high-resolution mass spectrometry as described in Fig. 3, greater than 20,000 acetylation sites have been reported in mammals during the last 6 years [9,11,50,52]. In addition, approaches, such as SILAC or the chemical isotope modification of peptides (iTRAQ and TMT), have been used to detect global acetylation changes after treatment with KDAC inhibitors (KDACIs). A recent study applied the quantitative MS SILAC method to evaluate the specificity of 19 different KDACIs targeting the 18 reported human KDACs at the level of the acetylation sites in HeLa cells. Genetic KDAC-knockout cells were used to confirm the specificities of various promising KDACIs [53].

4.1. Targets of lysine acetylation

Acetylation targets large multiprotein complexes; nuclear KAT complexes have been found to be highly acetylated themselves in multiple subunits, demonstrating that the acetylation of KATs and their complexes is a common feature. Several chromatin-remodeling complexes (SWI/SNF, NURD, INO80, and NURF) were also observed to be highly acetylated [9]. A large number of proteins in the nucleus, mitochondria and cytoplasm controlling important cellular processes are targeted by acetylation. Metabolic proteins, transcription factors and receptors, in addition to scaffolding proteins and histones are regulated by acetylation.

Acetylation patterns are conserved across different species for the same types of cells but are significantly different from one cellular type to another in the same species. This fact was highlighted by Zhao et al. who compared their human liver lysine acetylation dataset with previous reports, one performed with mouse liver and the other with leukemia cells [11]. In the liver, a larger number of metabolic enzymes involved in pathways such as fatty acid metabolism, the citrate cycle, the urea cycle and the metabolism of amino groups, glycogen metabolism and glycolysis/gluconeogenesis were found to be acetylated, emphasizing the importance of acetylation for cellular metabolism [12]. On the other hand, transcription factors such as Myc and E2F1, whose overexpression promotes the progression of cancer, are stabilized by acetylation [54,55]. Tumor suppressor protein p53 is also stabilized by acetylation, however, the accumulation of p53 results in the expression of genes involved in DNA repair, cell cycle arrest and/or apoptosis [56]. By contrast, the tumor suppressor PTEN (phosphatase and tensin homolog), whose activation interrupts the cell cycle transition from phase G1 to phase S, is negatively regulated by acetylation [57]. An increasing

number of proteins are being regulated by acetylation, with implications for cancer formation and progression; however, more efforts in quantitative proteomics, particularly focusing on the analysis of acetylation, are needed to clarify the differences and similarities between different cancers and normal tissues.

Lysine acetylation sites are preferentially located in regions with ordered secondary structures, rich in lysines, with acidic residues surrounding the site. However, some sequence motifs are specific to distinct cellular compartment or group of proteins. Kim et al. [8] and later Choudhary et al. [9] found that nuclear and cytoplasmic acetylation motifs are similar but have differences from mitochondrial motifs. Histones have their own preferred sequence motif differing from other nuclear proteins with lysine residues in the positions -4 and $+4$. Several other specific motifs have been described for transcription factors, other nuclear, cytoplasmic, mitochondrial, ER/Golgi, plasma membrane and extra cellular acetylation sites [58]. This information needs to be analyzed with caution because important biases might be introduced by the specificity of the antibody used to enrich acetylated peptides or the dysregulation of some KATs or KDACs.

4.2. Lysine acetylation and other PTMs

Acetylation crosstalks with other PTMs to provide an additional level of regulation for cellular processes. 14-3-3 proteins interact with phosphoproteins to regulate processes such as metabolism, protein trafficking, signal transduction, apoptosis and cell cycle regulation [59]. In 2009, Choudhary et al. demonstrated that the acetylation of 14-3-3 proteins impairs their binding capacity to phosphopeptides. Four lysine residues, acetylated *in vivo*, were mutated to mimic the acetylated lysine with glutamine or to prevent acetylation with arginine. This experiment validated the crosstalk between acetylation and phosphorylation because the triple-acetylation mutant lost the ability to interact with phosphopeptides [9]. Lysine residues can be targeted by other excluding PTMs such as ubiquitination methylation and other acylations. In the case of acetylation and ubiquitination both share at least 30% of their target sites, indicating that this crosstalk between these PTMs could be a mechanism to regulate protein stability [60]. The tumor suppressor factor p53 is stabilized by acetylation in the C-terminus lysine residues, by preventing ubiquitination and further degradation of the protein. Although p53 is mutated in approximately 50% of all human cancers, in the particular case of cervical cancer, this factor can be found without mutations. Nonetheless, in this cancer, p53 is targeted by a complex of E6 protein from the high-risk human papilloma virus (HR-HPV) and its human interacting protein, the E3 ubiquitin ligase E6AP [61]. The E6-E6AP complex targets p53 for ubiquitination and degradation. Lysine acetylation could prevent such an event, and can potentially be used as a therapy for cervical cancer.

5. Nonenzymatic lysine acetylation

Solid evidence supports that nonenzymatic acetylation occurs under physiological conditions. In bacteria where acetyl phosphate is the main acetyl donor, the majority of protein lysine acetylation occurs nonenzymatically. In a recent study where bacterial proteins were incubated with acetyl phosphate, protein acetylation was found at almost all sites identified *in vivo*. In addition, genetic manipulations affecting the metabolism of acetyl phosphate altered acetylation levels globally and the acetylation sites correlate with the *in vitro* experiment [62]. On the other hand, in eukaryotic cells, acetyl-CoA is responsible for nonenzymatic acetylation. In addition to high levels of acetyl-CoA (acetyl-CoA concentration 0.1–1.5 mM), the alkaline pH of mitochondrial matrix (pH 7.9–8.0) makes nonenzymatic acetylation favorable. Wagner and Payne demonstrated that these chemical conditions are sufficient to cause nonenzymatic acetylation [6]. In addition, other nonenzymatic acetylation by means of physiological acyl-CoA thioesters, such as succinylation, malonylation and glutarylation, are also frequently in

the mitochondrial matrix [63]. Less is known about chemical acetylation outside the mitochondria. However, a recent *in vitro* study suggested that cytosolic and nuclear proteins could also be nonenzymatically acetylated, as several of the identified acetylation sites have been seen previously *in vivo* [64].

The specificity and the reactivity of nonenzymatic acetylation have been recently explored for mitochondrial and non-mitochondrial proteins. Baeza et al. studied the reactivity of 90 acetylation sites within 8 proteins. They found acetylation reactivities ranging over 3 orders of magnitude. The most reactive lysine residues protruded away from the surface of the protein, whereas sites exhibiting low reactivity tend to form an electrostatic interaction with acidic neighboring residues. Their results with two proteins (ACAT1 and GDH) suggest that the reactivity of lysine residues is influenced by the proximity of basic and acidic residues in the three-dimensional (3D) structure. Very close glutamic or aspartic acid residues (3.4–4 Å), engaged in strong salt bridges with lysine, result in low reactivity, whereas increased reactivity is observed if the acidic residues appear at a distance of 5 to 7 Å. In addition, acetylation sites with basic residues at a distance of 6 to 7 Å tend to be more reactive [65]. Future studies should aim to determine if whether these patterns are conserved during *in vivo* nonenzymatic acetylation in mitochondrial proteins.

The favorable conditions for nonenzymatic acetylation in the mitochondrial matrix and the apparent lack of mitochondrial acetyltransferase suggest that chemical acetylation could be the major mechanism of protein acetylation in this organelle. Whereas the acetylation of proteins can be activating, inhibiting, stabilizing or even without measurable effect outside the mitochondria, acetylation in the mitochondria is predominantly inhibitory. Most of the mitochondrial enzymes are inactivated by acetylation, thus representing a wide range of key mitochondrial functions that are affected by acetylation, including fuel oxidation, energy generation, and detoxification of reactive oxygen species [66]. In a recent review, Wagner and Hirschev proposed that chemical acetylation and acylation are forms of carbon stress, where the accumulation of several reactive acyl-CoA metabolites directly modifies and negatively alters protein function, disrupting the homeostasis of the cell [67]. Opposing this process, SIRT3 is responsible for reverting nonenzymatic acetylation [68]. In addition, SIRT5 efficiently removes the succinyl, malonyl and glutaryl groups on target proteins [69]. From this point of view, SIRT3 as SIRT5 mediated deacetylation or deacylation have protective effects for mitochondrial and cellular functions.

5.1. Nonenzymatic lysine acetylation regulation

Although further studies should aim to establish the extent of chemical acetylation under different physiological or pathological conditions, some recent studies suggested that, under basal conditions, nonenzymatic acetylation is maintained at a very low stoichiometry in the mitochondria. Recent large-scale lysine acetylation studies have revealed that only approximately 20% of nonenzymatic acetylation sites are targeted by SIRT3. From the functional point of view, among the sites that are not targets of SIRT3, there are sites at which acetylation does not alter the activity of the protein and those that irreversibly inhibit the targeted enzyme. A structural analysis of these sites was accomplished by Hebert et al., who classified mitochondrial acetylation sites in three groups according to their response to caloric restriction and the loss of SIRT3 [70]. The first group includes acetylation sites affected by caloric restriction that are targets of SIRT3. These sites predominantly contain basic residues near the acetylated residue. These sites are the ideal targets of SIRT3 and are also highly susceptible to nonenzymatic acetylation. The second group comprises nonenzymatic acetylation sites that are not targets of SIRT3. Predominantly, these sites are surrounded by hydrophobic or uncharged residues, making them inaccessible to SIRT3. The third group corresponds to the least reactive acetylation sites. These lysine residues are predominantly surrounded by

acidic residues in the position -1 and $+1$. As mentioned above, the proximity of the lysine residue (less than 4 Å) to the acidic residues affects the reactivity of the site and they are poor SIRT3 substrates [70].

Less is known about the role of nonenzymatic acetylation in cancer. An increase in acetylation has an inhibitory effect on mitochondrial enzymes, such as superoxide dismutase (SOD2) and isocitrate dehydrogenase (IDH2), favoring the accumulation of reactive oxygen species (ROS). As a consequence, HIF1 α is stabilized, and its target genes are expressed, promoting the Warburg effect [71]. SIRT3 opposes this metabolic reprogramming by deacetylating these enzymes, among others. In this sense, SIRT3 is a tumor suppressor that regulates the production of ROS and stability of HIF1 α . Studies examining the presence of SIRT3 in human cancers have confirmed that at least one copy of the SIRT3 gene is deleted in 20% of all human cancers and 40% of breast and ovarian cancers. In addition, the reduced expression or no detectable levels of SIRT3 have been observed by immunohistochemistry in a large panel of breast cancer tissues [71,72]. These findings suggest that targeting nonenzymatic acetylation could be an important niche for future therapies in the treatment of cancer.

6. Lysine acetylation in the context of cancer

Lysine acetylation contributes to the regulation of almost all cellular processes; therefore, is not surprising that the deregulation of its controlling enzymes or reader domain containing proteins has been linked to several diseases including cancer. There is a large and increasing number of studies reporting aberrant expressions, translocations, mutations of a particular lysine acetylation regulator, or a group of them in cancer. Therefore, interest in the use of inhibitors of KATs, KDACs or acetyl-lysine readers, to treat cancers is increasing. However, the outcome of inhibiting one of these proteins it is not obvious; depending on the context, some of them act as tumor promoters or tumor suppressors. The classification of these proteins according to their role in cancer largely depends on their particular targets. A list with various elements of KATs and KDACs and their targets that have been associated with cancer development or progression is summarized in Table 1.

6.1. KATs in cancer

A large number of transcription factors are targets of at least one KAT, this is the case of Myc, which is encoded by one of the most overexpressed genes in cancer. Myc is stabilized by KAT2A through acetylation at K323 [54]. In addition, KAT2A is recruited by Myc to pol III templates, where acetylation of histone H3 is significantly increased, promoting the transcription of Myc target genes [73]. Similar mechanisms involve KAT2A and other transcription factors such as E2F1 or tumor-promoting proteins such as Pygopus homolog 2 (Pygo2), resulting in the expression of their target genes, most of which stimulate cell proliferation and tumor growth [74,75]. Myc is also target of other KATs such as KAT2B, p300 and Tip60 with similar outcomes as described for KAT2A. The complex Myc-p300, in cooperation with DOT1L (disruptor of telomeric silencing-1-like) enhances the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells in breast cancer by activating EMT-transcription factors [76]. Considering these facts, it is a highly promising strategy targeting these enzymes or at least preventing their interaction with these oncoproteins.

On the other hand, acetylation of the tumor suppressor p53 by several KATs also increases its stability and DNA binding or prevents its proteasomal degradation. For example, KAT2B acetylates tumor suppressor p53 at the K320 residue, increasing the DNA binding to its target genes [77]. CBP/p300 acetylates p53 carboxy-terminus, preventing its proteasomal degradation and enhancing the transcription of p53 target genes [56]. Acetylation at the K120 residue, in the DNA binding domain of p53, by Tip60 and MOF (KAT8) plays an important role in the cell-cycle arrest/apoptosis decision. When acetylated (K120), p53 induces the transcription of apoptotic genes BAX and PUMA; however, no

Table 1
Summary of some relevant links between enzymes controlling acetylation and their targets in the context of cancer.

Target	Enzyme	Function	Reference
c-MYC	KAT2A, KAT2B, Tip60, p300	Stabilize c-MYC, promoting acetylation of histone H3K9 allowing access of pol III to transcript c-MYC target genes	[54,73,76]
p53	KAT2B, CBP/p300	Stabilize p53, preventing polyubiquitination and its proteasomal degradation	[77,56]
p53	Tip60, MOF	Induce the transcription of apoptotic genes BAX and PUMA	[78,79]
beta-catenin	KAT2B	Stabilizes beta-catenin	[81]
ATM	Tip60	Activates ATM and DNA repair	[82]
a-tubulin, cortactin	HDAC6	Regulates cell migration, chemotaxis and angiogenesis	[101,102]
Hsp90	HDAC6	In prostate cancer cells activates Hsp90, stabilizing androgen receptor and promoting the expression of its target genes	[103]
FOXO1	SIRT1	Promotes its nuclear translocation and transcription of its target genes	[25]
c-MYC	SIRT1	Negative regulates c-MYC target genes	[113]
p53	SIRT1	Promotes its proteasomal degradation	[133]
RelA/p65	SIRT1	Inhibits NFkB function	[132]
SOD2, IDH2	SIRT3	Negative regulates the production of ROS and stability of HIF1a	[71,72]

significant differences in the expression p21 or Mdm2, involved in cell-cycle arrest, were observed when K120 acetylation is impaired or in K120R mutant [78,79]. In at least 50% of cancers, p53 is mutated; however, in cervical cancer where p53 remains wild type, viral oncoprotein E6 from HR-HPV abrogates p53 function not only through its interaction with E6AP to ubiquitinate p53 but also by targeting CBP/p300, preventing the acetylation of p53 [80].

The Wnt signaling pathway is activated in many cancers, leading to the stabilization and nuclear translocation of beta-catenin. Acetyltransferase KAT2B was found to acetylates and stabilizes beta-catenin in colon cancer cells [81]. The acetyltransferase Tip60 acetylates and activates the kinase ATM after DNA breakage. This is a critical step for the recruitment to the damaged DNA of a large number of proteins involved in DNA reparation [82]. In this sense, Tip60 plays an important role preserving the integrity of DNA and preventing the accumulation of mutations that could promote or induce tumorigenesis. However, in tumor cells with this repair pathway operating, it would be interesting to assess whether Tip60 inhibitors may synergize with DNA-damaging therapies.

As KATs are multi-domain proteins with several modes of regulation, the development of potential inhibitors can take advantage of this fact. Most of the KATs contain bromodomains, and KAT function is modulated by blocking these domains. Furthermore, KATs are typically part of multiprotein complexes, the activity and substrate specificity is affected in the absence of their specific associations [13]. Therefore, molecules interfering with the KAT complex assembly and inhibiting the interaction of KATs with other components, indeed alter KATs function. KATs are regulated by PTMs and acetylation may enhance the enzymatic activity of KATs, which is the case with p300, PCAF and MYST1 [83–85]. AcCoA provides the acetyl group and also stabilizes some KATs [86]. Some KAT inhibitors block the association between AcCoA and KATs [87–89]. The problem with this class of inhibitors is that they may affect other AcCoA-interacting proteins. Finally, the catalytic sites of KATs are potential targets for the development of inhibitors. This approach was recently utilized to identify p300 inhibitors *via* high-throughput screening [90]. A detailed list of KAT inhibitors targeting the three KAT families with potential anti-cancer effects was summarized in a recent review [17].

6.2. KDACs in cancer

Deacetylation of histones tails by KDACs has been linked to the repression of gene transcription. The positive charge of the epsilon amino groups of lysine residues interact more strongly with the DNA, leading to a more condensed chromatin. There is a large and increasing number of studies relating KDACs to the development and progression of cancer [19]. Here we will highlight some of the most relevant links between KDACs and cancer.

Aberrant expressions of all members of class I KDACs have been reported in large numbers of cancers. HDAC1 and 2 are highly expressed in bladder cancer and their inhibition by the use of specific inhibitors or downregulation with siRNAs, both inhibit cell proliferation, representing promising targets in the treatment of cancers that overexpress these enzymes [91]. HDAC1, 2 and 3 are overexpressed in various cancers, however a correlation with patient survival or prognosis is not clear [92–94]. HDAC8 was found to increase the stability of the oncoprotein Notch1 by a mechanism independent of direct deacetylation, preventing its proteasomal degradation. The inhibition of HDAC8 suppresses breast cancer stem cell properties through the downregulation of Notch1 [95].

Class IIa KDACs have been recently linked to cancer development. However, the expression of certain of these KDACs was found to be cancer-type dependent. HDAC4 has been found to be more highly expressed in breast cancer samples compared with renal, bladder and colorectal cancers [96]. HDAC5 and HDAC9 have been reported to be up-regulated in high-risk medulloblastoma patients, linking the expression of these proteins with poor survival [97]. HDAC7 has been reported to be overrepresented in the cytoplasm of pancreatic cancer cells in patients [98]. By contrast, Skov et al. reported that HDAC7 is significantly downregulated in myeloproliferative neoplasms [99]. Additionally, HDAC9 was found to be downregulated in glioblastoma compared with low-grade astrocytoma and normal brain [100].

HDAC6 plays an important role in cell migration, chemotaxis and angiogenesis through the regulation of acetylation status of α -tubulin and cortactin, with relevance in cancer metastasis and various viral infections [101,102]. The chaperone Hsp90 is also target of HDAC6 and its deacetylation lead to Hsp90 activation. In prostate cancer, activated Hsp90 stabilizes androgen receptor and therefore, promotes the transcription of their target genes to induce the development of prostate cancer cells. Inhibiting HDAC6 deacetylase activity could be an effective therapy for treating prostate cancer, even against those cancers resistant to chemical or surgical castration [103]. HDAC10 downregulation was found to be correlated with poor prognosis in patients with non-small cell lung carcinoma [104]. By contrast, in patients with neuroblastoma, low levels of HDAC10 correlated with good prognosis. In addition, HDAC10 was found to promote cell survival by increasing the autophagy flux after treatment with doxorubicin. Therefore, the inhibition of HDAC10 increases the sensitivity to doxorubicin in drug-resistant tumors [105]. In cervical cancer patients, lower expression of HDAC10 was associated with metastasis in lymph nodes. It was found that HDAC10 downregulates the expression of the matrix metalloproteinases MM2 and MM9 by the deacetylation of histones H3 and H4 in their promoting regions, therefore, affecting cell migration and invasion [106].

The downregulation of HDAC11 in cancer cells induces apoptosis; however, in non-transformed cells, no significant metabolic changes

were observed. This finding suggests that potential molecules inhibiting HDAC11 could be used with relative low toxicity, to treat carcinomas [107]. HDAC11 is a transcriptional repressor of interleukin 10 (IL-10) in antigen-presenting cells by binding to the distal region of the IL-10 promoter. This finding suggests that targeting HDAC11 could be used to modulate the immune response with potential applications in the immunotherapy of cancer [108]. In Hodgkin's lymphoma (HL) cells, HDAC11 negatively regulates the expression of Interleukin 13 and 17 (IL-13 & IL-17), as well as tumor necrosis factor alpha (TNF α), providing a new niche for the use of KDAC inhibitors in the immunotherapy of cancer [109].

In cancer, sirtuins are involved in both tumor suppressor and tumor promoter roles; even for the same sirtuin evidences of both roles have been reported. This fact is particularly true for SIRT1, the most studied of the human sirtuins and the most closely related to its yeast homologous Sir2. SIRT1 has been linked to tumor development and cancer progression since it was found to be overexpressed in various cancers, such as prostate cancer and acute myeloid leukemia (AML), and increased cytoplasmic localization in colorectal carcinoma [110–112]. SIRT1, through the interaction and deacetylation of FOXO1, increases its nuclear translocation, leading to the transcription of its target genes involved in stress resistance and cancer cells progression [25]. On the other hand, SIRT1 has been linked to tumor suppression through the deacetylation of the oncoprotein Myc, leading to the negative regulation of the transcription of its target genes [113]. A large number of studies linking SIRT1 with cancer suppression or promotion have been reported and many of the most relevant have been summarized in recent reviews [25,114,115].

SIRT2 is downregulated in gliomas and gastric carcinomas [116], and in melanomas it possesses a mutation in the catalytic domain that eliminates its enzymatic activity [117], these facts suggest that SIRT2 may act as a tumor suppressor. SIRT3 has also been proposed as a tumor suppressor due to its role in reducing ROS. SIRT3 has been described as the main mitochondrial deacetylase, whereas the acetylation of mitochondrial enzymes is largely inhibitory, representing a linkage of SIRT3 with the preservation of mitochondrial function [68]. Less is known about the role of SIRT5, 6 and 7 in the development or progression of cancer.

Because many KDACs are indeed deregulated in cancer, the idea of using KDACs in cancer treatment is gaining strength. Currently, KDACs are divided into four groups based on their structure: hydroxamates, short-chain fatty acids, benzamides and cyclic peptides. Sirtuin inhibitors can be divided into two groups: those interacting with the NAD⁺ binding site and those interacting with the acetyl lysine-binding site [26]. A few KDACs have been approved thus far for the treatment of cancer: SAHA (Vorinostat) in 2006 [118] and FK228 (Istodax) in 2009 [119] for the treatment of cutaneous T cell lymphoma (CTCL), Chidamide for pancreatic cancer [120] and LBH-589 (Farydak) for treating multiple myeloma in 2015 [121]. Certain compounds among the list of KDACs such as Trichostatin A (TSA) and SAHA, are pan-KDACs that block class I, II, and IV KDACs with a wide variation among the different KDACs. By contrast, FK228 cannot block HDAC6. The development of highly specific KDAC inhibitors represents a huge challenge due to the homology in the active site structures and catalytic mechanisms of KDACs. In addition, only 18 KDACs are responsible for regulating the acetylation status of an increasing number of acetylation sites in more than 2000 proteins in humans. Future strategies should be directed at blocking the interaction between a KDAC and a specific set of target proteins, rather than blocking the enzyme.

6.3. Acetyl-lysine readers in cancer

Several bromodomain proteins have been found to be overexpressed in cancer and also have been linked to patient survival. ATPase family AAA domain-containing protein 2 (ATAD2) was observed to be upregulated in 70% of breast tumors, and higher levels were

correlated with the tumor histological grade, poor overall survival and disease recurrence [122]. The data published so far regarding TRIM24, an E3-ubiquitin ligase, suggest that this protein plays an important role in tumorigenesis because of its function as an estrogen receptor (ER) activator, which promotes tumor cell proliferation. The tumor suppressor protein p53 is also target of TRIM24, affecting its stability. In breast cancer, TRIM24 is overexpressed and is negatively correlated with patient survival [123]. The bromodomain proteins BRD2 and BRD4 have also been associated with onco-viruses such as HPV and Epstein-Barr, providing access to chromatin to anchor their genomes to the host chromosome and mediate viral persistence [124,125].

Despite the large sequence variation, all bromodomains share a conserved structure. All of them have a conserved asparagine residue in a central hydrophobic pocket where acetylated lysine residues are accommodated [126]. In the case of BETs, all of them bind two acetylated lysine residues in a single bromodomain [127]. The hydrophobic central pocket of bromodomains in which the acetylated lysine residue is accommodated, represents an attractive target in developing inhibitors that prevent protein-protein interactions. In fact, most bromodomains exhibit good scores of druggability as discussed by Filippakopoulos and Knapp in 2014 [4]. To date, a large number of bromodomain inhibitors have been discovered with the potential to be used in the treatment of several diseases. In particular, the inhibitors targeting BET in the BRD4-NUT fused protein have the potential to treat cancers with this genetic rearrangement, as is the case of competitive inhibitors of acetylated lysine residues that provoke tumor suppression and increase survival in xenograft mice [128]. To date, bromodomain inhibitors, as well as KAT and KDAC inhibitors, have been directed at blocking the bromodomain or the enzyme, which can lead to undesirable effects. More specific inhibitors targeting the acetylated-lysine site of a particular relevant protein or small group that prevent the interaction with the corresponding bromodomain-interacting protein or with the modifying enzyme may lead to fewer off-target effects.

Three of the four YEATS domain-containing proteins in human GAS41, ENL and AF9 are associated with cancer. GAS41 (glioma amplified sequence 41) is a part of TIP60 and SRCAP complexes, likely providing the connection between the YEATS domain and acetylated proteins. The GAS41 gene is amplified in 23% of glioblastomas and in 80% of grade I astrocytomas [129]. On the other hand, ENL and AF9 are commonly fused to the MLL protein in spontaneous acute leukemias. Thirty percent of all observed MLL fusions correspond to YEATS domain containing proteins (25% are AF9-MLL fusions and 5% are ENL-MLL fusions) [130]. As the acetyl-lysine recognition mechanism described for the AF9 YEATS domain differs from that of bromodomains [30], the YEATS domain can be screened to identify molecules capable of inhibiting its interaction with acetylated proteins without affecting the bromodomain-acetylated protein interaction.

7. Perspectives

To date, approximately 30 KATs “writers” and 18 KDACs “erasers” have been identified in the human proteome, along with 46 bromodomain-containing proteins “readers”. These small groups of proteins regulate the acetylation of approximately 20,000 sites described in human cells. Although numerous inhibitors targeting these protein groups are being tested for human cancer treatment, the large number of substrates that can be affected by the inhibition of one of these enzymes or acetyl-lysine interacting proteins may lead to unpredictable effects. Future research must focus on the development of molecules that prevent or preserve the acetylation event on the substrate side rather than the inhibition of the enzyme. With this approach, a reduced set of acetyl-proteins would be targeted, leading to a more specific effect and in theory less toxicity. Random peptide libraries expressed in phages could be used to screen specific acetylation sites to identify compounds capable of preventing interactions with the modifying enzymes (KATs or KDACs) or the “readers”.

Recent improvements in the sensitivity, mass accuracy and mass resolution of mass analyzer instruments have represented key elements in the characterization of lysine acetylation. In addition, acetyl-lysine-containing peptides fragment in a manner highly similar to unmodified peptides in CID/HCD, representing an advance over other PTMs, such as phosphorylation or glycosylation. Because of the low stoichiometry of acetylated peptides and the highly complex mixture of peptides generated during protein digestion, a comprehensive analysis of acetylated peptides requires targeted peptide-based enrichment, typically immunoprecipitation with anti-acetyl-lysine antibodies. In addition, to increase the coverage of acetylated peptides and proteins, more than one specific antibody should be used. This approach can be successfully applied to the identification and relative quantification of acetylation sites, but information regarding the stoichiometry or absolute abundance of the acetylation sites is missing. Recently, a new method to analyze the stoichiometry of acetylated lysine residues based on the comparative proteomic analysis of endogenous normal (light) acetylation versus the chemically labeled (heavy) acetylation of the counterpart non-acetylated residue was developed and applied to the stoichiometric analysis of lysine acetylation in *E. coli* [131]. This method can only account for lysine acetylation, and other lysine modifications cannot be considered. The stoichiometric analysis for acetylation is only reported with respect to the unmodified site. In cancer research, for most of the reported acetylated proteins, the information related to the stoichiometry of acetylation is missing. In addition, many of these experiments were performed overexpressing the target or the enzyme, which can lead to an aberrant acetylation pattern.

In our opinion, high-resolution mass spectrometry-based proteomics can be used to significantly increase our knowledge of acetylation

and its possible implications in cancer. A combination of three different proteomic approaches, as represented in Fig. 4, will provide a comprehensive characterization of this PTM in different experimental conditions. When at least two experimental conditions are evaluated, a quantitative proteomics analysis is required to determine the relative abundance of protein expression. For the identification and also relative quantification of acetylated peptides, an affinity-based quantitative acetyl-proteomics method should be used. However, in an effort to identify more acetylated lysine residues, large amounts of starting materials, required for the enrichment step, are used. As consequences, acetylation sites with extremely low stoichiometry, which could not have biological relevance, can indeed be identified. In order to clarify these data, a lysine acetylation stoichiometric analysis will be highly valuable, as it will provide information related to extent of this modification in each target site for every experimental condition evaluated. Together, these approaches can be successfully applied to achieve a more comprehensive characterization of acetylation in cancer.

A quantitative proteomic analysis will provide information regarding protein expression in cancers, warranting particular interest the groups of proteins that regulate lysine acetylation. Several elements of these groups are deregulated in different cancers, as described above. A further comparative proteomic analysis of the acetylated peptides and proteins will provide information related to the acetylation sites and their relative abundance between the experimental conditions. The combined proteomic analyses of protein expression and the relative abundance of acetylated sites will help to differentiate specific changes in the acetylation status from changes in protein expression. Finally, the stoichiometric analysis will enrich our knowledge of the extent of acetylation for each site in different experimental conditions. In addition,

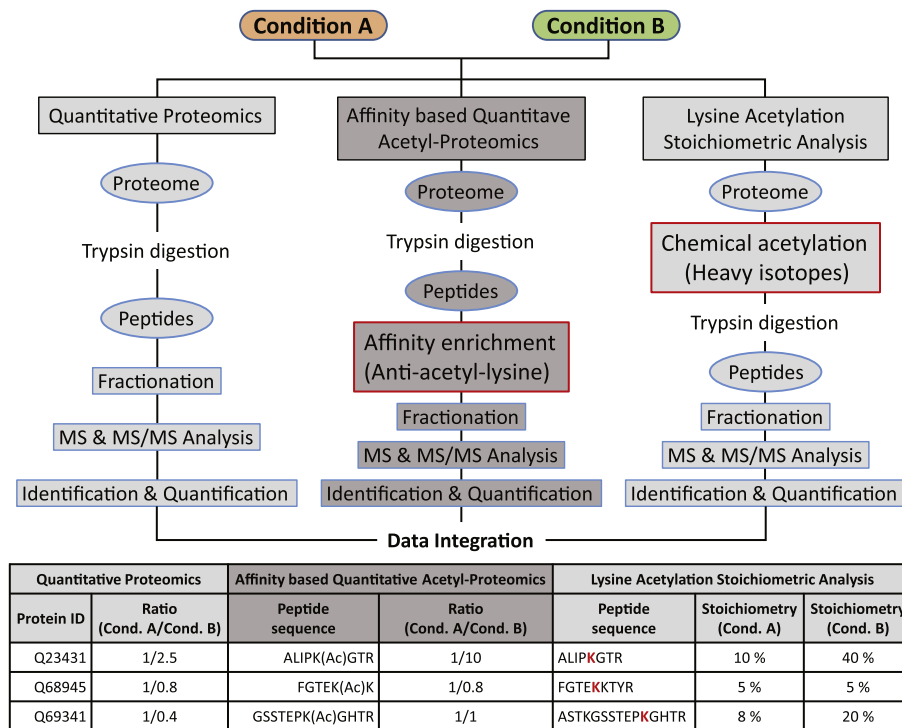


Fig. 4. General workflow for the in depth characterization of protein lysine acetylation. Three complementary approaches provide information about differences in protein expression between experimental conditions, relative differences in acetylated peptides and the stoichiometric analysis for specific acetylation sites in each sample. The first approach involves a Quantitative Proteomics analysis. Any of the known labeling strategies can be applied as well as the label free approaches, depending on the sample particularities. The main goal of this experiment is the determination of the protein expression profiles between the samples. The second approach (Affinity-based Quantitative Acetyl-proteomics) is focused on acetylated peptides. Similar to the first method, several quantitative strategies can be used. The enrichment in acetylated peptides via immunoprecipitation with anti-acetyl-lysine antibody is a crucial step. In addition, large amounts of starting material are needed for this experiment. The identification and relative quantification of acetylated peptides between samples is the outcome of this experiment. The third method is the Lysine Acetylation Stoichiometric Analysis. Individual samples are analyzed to estimate the stoichiometry of acetylation for each lysine residues. The chemical acetylation step incorporating an acetyl group labeled with heavy isotopes assures that all lysine residues are acetylated. The corresponding mass shift between endogenous (light) acetylation and chemical (heavy) acetylation, allows for the analysis of the isotopic distribution to determine the extent of endogenous acetylation in lysine residues. Finally, the degree of acetylation for independent peptides is reported.

specific inhibitors of certain regulators of acetylation can be used to identify their possible substrates and to evaluate their global effect. We believe that the application of proteomic techniques can provide highly valuable information to increase our current knowledge of acetylation in cancer.

Author contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Acknowledgment

The authors would like to thank the anonymous reviewers for their valuable comments and suggestions to improve the quality of the review. **This work was supported by the grants of the Mexican National Council for Science and Technology (CONACyT) (220790 to Sergio Encarnación-Guevara, 343827 to Jeovanis Gil and 255711 to Alberto Ramírez-Torres).** Jeovanis Gil is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This work was also supported by the research grant DGAPA-PAPIIT (IN213216). We thank Dr. Yvonne Rosenstreich for her critical reading of the manuscript.

References

- [1] J.V. Olsen, M. Vermeulen, A. Santamaria, C. Kumar, M.L. Miller, L.J. Jensen, F. Gnäd, J. Cox, T.S. Jensen, E.A. Nigg, S. Brunak, M. Mann, Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis, *Sci. Signal.* 3 (2010), ra3.
- [2] V.G. Allfrey, R. Faulkner, A.E. Mirsky, Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51 (1964) 786–794.
- [3] T. Jenuwein, C.D. Allis, Translating the histone code, *Science* 293 (2001) 1074–1080 (80-).
- [4] P. Filippakopoulos, S. Knapp, Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 337–356.
- [5] K.L. Norris, J.Y. Lee, T.P. Yao, Acetylation goes global: the emergence of acetylation biology, *Sci. Signal.* 2 (2009), pe76.
- [6] G.R. Wagner, R.M. Payne, Widespread and enzyme-independent N(epsilon)-acetylation and N(epsilon)-succinylation in the chemical conditions of the mitochondrial matrix, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 29036–29045.
- [7] J.W. Tamkun, R. Deuring, M.P. Scott, M. Kissinger, A.M. Pattatucci, T.C. Kaufman, J.A. Kennison, Brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2, *Cell* 68 (1992) 561–572.
- [8] S.C. Kim, R. Sprung, Y. Chen, Y. Xu, H. Ball, J. Pei, T. Cheng, Y. Kho, H. Xiao, L. Xiao, N.V. Grishin, M. White, X.J. Yang, Y. Zhao, Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey, *Mol. Cell* 23 (2006) 607–618.
- [9] C. Choudhary, C. Kumar, F. Gnäd, M.L. Nielsen, M. Rehman, T.C. Walther, J.V. Olsen, M. Mann, Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions, *Science* 325 (2009) 834–840.
- [10] Q. Wang, Y. Zhang, C. Yang, H. Xiong, Y. Lin, J. Yao, H. Li, L. Xie, W. Zhao, Y. Yao, Z.B. Ning, R. Zeng, Y. Xiong, K.L. Guan, S. Zhao, G.P. Zhao, Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux, *Science* 327 (2010) 1004–1007 (80-).
- [11] S. Zhao, W. Xu, W. Jiang, W. Yu, Y. Lin, T. Zhang, J. Yao, L. Zhou, Y. Zeng, H. Li, Y. Li, J. Shi, W. An, S.M. Hancock, F. He, L. Qin, J. Chin, P. Yang, X. Chen, Q. Lei, Y. Xiong, K.L. Guan, Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation, *Science* 327 (2010) 1000–1004.
- [12] C. Choudhary, B.T. Weinert, Y. Nishida, E. Verdin, M. Mann, The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 536–550.
- [13] Z. Nagy, A. Riss, S. Fujiyama, A. Krebs, M. Orpinelli, P. Jansen, A. Cohen, H.G. Stunnenberg, S. Kato, L. Torá, The metazoan ATAC and SAGA coactivator HAT complexes regulate different sets of inducible target genes, *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (2010) 611–628.
- [14] J.E. Brownell, J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D.G. Edmondson, S.Y. Roth, C.D. Allis, Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation, *Cell* 84 (1996) 843–851.
- [15] Z. Nagy, L. Torá, Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation, *Oncogene* 26 (2007) 5341–5357.
- [16] D.C. Bedford, L.H. Kasper, T. Fukuyama, P.K. Brindle, Target gene context influences the transcriptional requirement for the KAT3 family of CBP and p300 histone acetyltransferases, *Epigenetics* 5 (2010) 9–15.
- [17] A. Farria, W. Li, S.Y.R. Dent, KATs in cancer: functions and therapies, *Oncogene* 34 (2015) 4901–4913.
- [18] M. Haberland, R.L. Montgomery, E.N. Olson, The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy, *Nat. Rev. Genet.* 10 (2009) 32–42.
- [19] B. Barneda-Zahonero, M. Parra, Histone deacetylases and cancer, *Mol. Oncol.* 6 (2012) 579–589.
- [20] X.J. Yang, E. Seto, The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 206–218.
- [21] M.A. Moser, A. Hagelkruys, C. Seiser, Transcription and beyond: the role of mammalian class I lysine deacetylases, *Chromosoma* 123 (2014) 67–78.
- [22] A. Lahm, C. Paolini, M. Pallaoro, M.C. Nardi, P. Jones, P. Neddermann, S. Sambucini, M.J. Bottomley, P. Lo Surdo, A. Carfi, U. Koch, R. De Francesco, C. Steinkühler, P. Gallinari, Unraveling the hidden catalytic activity of vertebrate class IIa histone deacetylases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 17335–17340.
- [23] E. Di Giorgio, E. Gagliostro, C. Brancolini, Selective class IIa HDAC inhibitors: myth or reality, *Cell. Mol. Life Sci.* 72 (2015) 73–86.
- [24] L. Gao, M.A. Cueto, F. Asselbergs, P. Atadja, Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 25748–25755.
- [25] L. Bosch-Presegué, A. Vaquero, The dual role of sirtuins in cancer, *Genes Cancer* 2 (2011) 648–662.
- [26] E. Seto, M. Yoshida, Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6 (2014) a018713.
- [27] C.M. Chiang, Brd4 engagement from chromatin targeting to transcriptional regulation: selective contact with acetylated histone H3 and H4, *F1000, Biol. Reprod.* 1 (2009) 98.
- [28] C.A. French, I. Miyoshi, J.C. Aster, I. Kubonishi, T.G. Kroll, P. Dal Cin, S.O. Vargas, A.R. Perez-Atayde, J.A. Fletcher, BRD4 bromodomain gene rearrangement in aggressive carcinoma with translocation t(15;19), *Am. J. Pathol.* 159 (2001) 1987–1992.
- [29] R. Sanchez, M.M. Zhou, The role of human bromodomains in chromatin biology and gene transcription, *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 12 (2009) 659–665.
- [30] Y. Li, H. Wen, Y. Xi, K. Tanaka, H. Wang, D. Peng, Y. Ren, Q. Jin, S.Y.R. Dent, W. Li, H. Li, X. Shi, AF9 YEATS domain links histone acetylation to DOT1L-mediated H3K79 methylation, *Cell* 159 (2014) 558–571.
- [31] J.M. Schulze, A.Y. Wang, M.S. Kobor, YEATS domain proteins: a diverse family with many links to chromatin modification and transcription, *Biochem. Cell Biol.* 87 (2009) 65–75.
- [32] M. Vermeulen, K.W. Mulder, S. Denissov, W.W.M.P. Pijnappel, F.M.A. van Schaik, R.A. Varier, M.P.A. Baltissen, H.G. Stunnenberg, M. Mann, H.T.M. Timmers, Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4, *Cell* 131 (2007) 58–69.
- [33] M. Lange, B. Kaynak, U.B. Forster, M. Tönjes, J.J. Fischer, C. Grimm, J. Schlesinger, S. Just, I. Dunkel, T. Krueger, S. Mebus, H. Lehrach, R. Lurz, J. Gobom, W. Rottbauer, S. Abdelilah-Seyfried, S. Sperling, Regulation of muscle development by DPFC3, a novel histone acetylation and methylation reader of the BAF chromatin remodeling complex, *Genes Dev.* 22 (2008) 2370–2384.
- [34] L. Zeng, Q. Zhang, S. Li, A.N. Plotnikov, M.J. Walsh, M. Zhou, Mechanism and regulation of acetylated histone binding by the tandem PHD finger of DPFC3b, *Nature* 466 (2010) 258–262.
- [35] M. Ali, K. Yan, M.E. Lalonde, C. Degerny, S.B. Rothbart, B.D. Strahl, J. Côté, X.J. Yang, T.G. Kutateladze, Tandem PHD fingers of MORF/MOZ acetyltransferases display selectivity for acetylated histone H3 and are required for the association with chromatin, *J. Mol. Biol.* 424 (2012) 328–338.
- [36] C.E. McCullough, R. Marmorstein, Molecular basis for histone acetyltransferase regulation by binding partners, associated domains, and autoacetylation, *ACS Chem. Biol.* 11 (2016) 632–642.
- [37] D.E. Ayer, Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs, *Trends Cell Biol.* 9 (1999) 193–198.
- [38] Y.D. Wen, V. Perissi, L.M. Staszewski, W.M. Yang, A. Krones, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, E. Seto, The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 7202–7207.
- [39] W. Zhao, J.P. Kruse, Y. Tang, S.Y. Jung, J. Qin, W. Gu, Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1, *Nature* 451 (2008) 587–590.
- [40] E.J. Kim, J.H. Kho, M.R. Kang, S.J. Um, Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity, *Mol. Cell* 28 (2007) 277–290.
- [41] M.K.H. Pflum, J.K. Tong, W.S. Lane, S.L. Schreiber, Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47733–47741.
- [42] S.C. Tsai, E. Seto, Regulation of histone deacetylase 2 by protein kinase CK2, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 31826–31833.
- [43] X. Zhang, Y. Ozawa, H. Lee, Y. Der Wen, T.H. Tan, B.E. Wadzinski, E. Seto, Histone deacetylase 3 (HDAC3) activity is regulated by interaction with protein serine/threonine phosphatase 4, *Genes Dev.* 19 (2005) 827–839.
- [44] F.H. Bardai, S.R. D'Mello, Selective toxicity by HDAC3 in neurons: regulation by Akt and GSK3beta, *J. Neurosci.* 31 (2011) 1746–1751.
- [45] H. Lee, N. Rezaei-Zadeh, E. Seto, Negative regulation of histone deacetylase 8 activity by cyclic AMP-dependent protein kinase A, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 765–773.
- [46] T. Sasaki, B. Maier, K.D. Koclega, M. Chruszcz, W. Gluba, P.T. Stukenberg, W. Minor, H. Scrbble, Phosphorylation regulates SIRT1 function, *PLoS One* 3 (2008), e4020.
- [47] N. Nasrin, V.K. Kaushik, E. Fortier, D. Wall, K.J. Pearson, R. de Cabo, L. Bordone, JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity, *PLoS One* 4 (2009), e8414.
- [48] P.A. Grimsrud, D.L. Swaney, C.D. Wenger, N.A. Beauchene, J.J. Coon, Phosphoproteomics for the masses, *ACS Chem. Biol.* 5 (2010) 105–119.
- [49] D.F. Zielinska, F. Gnäd, J.R. Wiśniewski, M. Mann, Precision mapping of an in vivo N-glycoproteome reveals rigid topological and sequence constraints, *Cell* 141 (2010) 897–907.

- [50] T. Svinikina, H. Gu, J.C. Silva, P. Mertins, J. Qiao, S. Fereshetian, J.D. Jaffe, E. Kuhn, N.D. Udeshi, S.A. Carr, Deep, quantitative coverage of the lysine acetylome using novel anti-acetyl-lysine antibodies and an optimized proteomic workflow, *Mol. Cell. Proteomics* 14 (2015) 2429–2440.
- [51] M.B. Trelle, O.N. Jensen, Utility of immonium ions for assignment of ϵ -N-acetyllysine-containing peptides by tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3422–3430.
- [52] H. Yu, H. Diao, C. Wang, Y. Lin, F. Yu, H. Lu, W. Xu, Z. Li, H. Shi, S. Zhao, Y. Zhou, Y. Zhang, Acetylproteomic analysis reveals functional implications of lysine acetylation in human sperm, *Mol. Cell. Proteomics* (2015) (mcp.M114.01384).
- [53] C. Scholz, B.T. Weinert, S.A. Wagner, P. Beli, Y. Miyake, J. Qi, L.J. Jensen, W. Streicher, A.R. McCarthy, N.J. Westwood, S. Lain, J. Cox, P. Matthias, M. Mann, J.E. Bradner, C. Choudhary, Acetylation site specificities of lysine deacetylase inhibitors in human cells, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 415–423.
- [54] J.H. Patel, Y. Du, P.G. Ard, C. Phillips, B. Carella, C.J. Chen, C. Rakowski, C. Chatterjee, P.M. Lieberman, W.S. Lane, G.A. Blobel, S.B. McMahon, The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 10826–10834.
- [55] M.A. Martínez-Balbás, U.M. Bauer, S.J. Nielsen, A. Brehm, T. Kouzarides, et al., *EMBO J.* 19 (2000) 662–671.
- [56] M. Li, J. Luo, C.L. Brooks, W. Gu, Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 50607–50611.
- [57] K. Okumura, M. Mendoza, R.M. Bachoo, R.A. DePinho, W.K. Cavenee, F.B. Furnari, PCAF modulates PTEN activity, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 26562–26568.
- [58] A. Lundby, K. Lage, B.T. Weinert, D.B. Bekker-Jensen, A. Secher, T. Skovgaard, C.D. Kelstrup, A. Dmytriiev, C. Choudhary, C. Lundby, J.V. Olsen, Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns, *Cell Rep.* 2 (2012) 419–431.
- [59] D.K. Morrison, The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development, *Trends Cell Biol.* 19 (2009) 16–23.
- [60] S.A. Wagner, P. Beli, B.T. Weinert, M.L. Nielsen, J. Cox, M. Mann, C. Choudhary, A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles, *Mol. Cell. Proteomics* 10 (2011) (M111.013284).
- [61] S. Hietanen, S. Lain, E. Krausz, C. Blattner, D.P. Lane, Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 8501–8506.
- [62] B. Weinert, V. Iesmantavicius, S. Wagner, C. Schölz, B. Gummeson, P. Beli, T. Nyström, C. Choudhary, Acetyl-phosphate is a critical determinant of lysine acetylation in *E. coli*, *Mol. Cell* 51 (2013) 265–272.
- [63] Z. Simic, M. Weiwad, A. Schierhorn, C. Steegborn, M. Schutkowski, The ϵ -amino group of protein lysine residues is highly susceptible to nonenzymatic acylation by several physiological acyl-CoA thioesters, *ChemBiochem* 16 (2015) 2337–2347.
- [64] A.S. Olia, K. Barker, C.E. McCullough, H.Y. Tang, D.W. Speicher, J. Qiu, J. Labaer, R. Marmorstein, Nonenzymatic protein acetylation detected by NAPPA protein arrays, *ACS Chem. Biol.* 10 (2015) 2034–2047.
- [65] J. Baeza, M.J. Smallegan, J.M. Denu, Site-specific reactivity of nonenzymatic lysine acetylation, *ACS Chem. Biol.* 10 (2015) 122–128.
- [66] S. Ghanta, R.E. Grossmann, C. Brenner, Mitochondrial protein acetylation as a cell-intrinsic, evolutionary driver of fat storage: chemical and metabolic logic of acetyl-lysine modifications, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48 (2014) 561–574.
- [67] G. Wagner, M.D. Hirschev, Nonenzymatic protein acylation as a carbon stress regulated by sirtuin deacylases, *Mol. Cell* 54 (2014) 5–16.
- [68] B.T. Weinert, T. Moustafa, V. Iesmantavicius, R. Zechner, C. Choudhary, Analysis of acetylation stoichiometry suggests that SIRT3 repairs nonenzymatic acetylation lesions, *EMBO J.* 34 (2015), e201591271.
- [69] J. Du, Y. Zhou, X. Su, J.J. Yu, S. Khan, H. Jiang, J. Kim, J. Woo, J.H. Kim, B.H. Choi, B. He, W. Chen, S. Zhang, R.A. Cerione, J. Auwerx, Q. Hao, H. Lin, Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demethylase and desuccinylase, *Science* 334 (2011) 806–809 (80-).
- [70] A.S. Hebert, K.E. Dittenhafer-Reed, W. Yu, D.J. Bailey, E.S. Selen, M.D. Boersma, J.J. Carson, M. Tonelli, A.J. Balloon, A.J. Higbee, M.S. Westphall, D.J. Pagliarini, T.A. Prolla, F. Assadi-Porter, S. Roy, J.M. Denu, J.J. Coon, Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome, *Mol. Cell* 49 (2013) 186–199.
- [71] L.W.S. Finley, A. Carracedo, J. Lee, A. Souza, A. Egia, J. Zhang, J. Teruya-Feldstein, P.I. Moreira, S.M. Cardoso, C.B. Clish, P.P. Pandolfi, M.C. Haigis, SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1 α destabilization, *Cancer Cell* 19 (2011) 416–428.
- [72] H.S. Kim, K. Patel, K. Muldoon-Jacobs, K.S. Bisht, N. Aykin-Burns, J.D. Pennington, R. van der Meer, P. Nguyen, J. Savage, K.M. Owens, A. Vassilopoulos, O. Ozden, S.H. Park, K.K. Singh, S.A. Abdulkadir, D.R. Spitz, C.X. Deng, D. Gius, SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress, *Cancer Cell* 17 (2010) 41–52.
- [73] N.S. Kenneth, B.A. Ramsbottom, N. Gomez-Roman, L. Marshall, P.A. Cole, R.J. White, TRRAP and GCN5 are used by c-Myc to activate RNA polymerase III transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 14917–14922.
- [74] L. Chen, T. Wei, X. Si, Q. Wang, Y. Li, Y. Leng, A. Deng, J. Chen, G. Wang, S. Zhu, J. Kang, Lysine acetyltransferase GCN5 potentiates the growth of non-small cell lung cancer via promotion of E2F1, cyclin D1, and cyclin E1 expression, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 14510–14521.
- [75] J. Chen, Q. Luo, Y. Yuan, X. Huang, W. Cai, C. Li, T. Wei, L. Zhang, M. Yang, Q. Liu, G. Ye, X. Dai, B. Li, Pygo2 associates with MLL2 histone methyltransferase (HMT) and GCN5 histone acetyltransferase (HAT) complexes to augment Wnt target gene expression and breast cancer stem-like cell expansion, *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 5621–5635.
- [76] M.H. Cho, J.H. Park, H.J. Choi, M.K. Park, H.Y. Won, Y.J. Park, C.H. Lee, S.H. Oh, Y.S. Song, H.S. Kim, Y.H. Oh, J.Y. Lee, G. Kong, DOT1L cooperates with the c-Myc-p300 complex to epigenetically derepress CDH1 transcription factors in breast cancer progression, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7821.
- [77] L. Liu, D.M. Scolnick, R.C. Trievel, H.B. Zhang, R. Marmorstein, T.D. Halazonetis, S.L. Berger, p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 1202–1209.
- [78] Y. Tang, J. Luo, W. Zhang, W. Gu, Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis, *Mol. Cell* 24 (2006) 827–839.
- [79] S.M. Sykes, H.S. Mellert, M.A. Holbert, K. Li, R. Marmorstein, W.S. Lane, S.B. McMahon, Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction, *Mol. Cell* 24 (2006) 841–851.
- [80] H. Zimmermann, R. Degenkolbe, H.U. Bernard, M.J. O'Connor, The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300, *J. Virol.* 73 (1999) 6209–6219.
- [81] X. Ge, Q. Jin, F. Zhang, T. Yan, Q. Zhai, PCAF acetylates β -catenin and improves its stability, *Mol. Biol. Cell* 20 (2009) 419–427.
- [82] Y. Sun, X. Jiang, B.D. Price, Tip60: connecting chromatin to DNA damage signaling, *Cell Cycle* 9 (2010) 930–936.
- [83] P.R. Thompson, D. Wang, L. Wang, M. Fulco, N. Pediconi, D. Zhang, W. An, Q. Ge, R.G. Roeder, J. Wong, M. Levrero, V. Sartorelli, R.J. Cotter, P.A. Cole, Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 308–315.
- [84] B. Sun, S. Guo, Q. Tang, C. Li, R. Zeng, Z. Xiong, C. Zhong, J. Ding, Regulation of the histone acetyltransferase activity of hMOF via autoacetylation of Lys274, *Cell Res.* 21 (2011) 1262–1266.
- [85] H. Santos-Rosa, E. Valls, T. Kouzarides, M. Martínez-Balbás, Mechanisms of P/CAF auto-acetylation, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 4285–4292.
- [86] J.E. Herrera, M. Bergel, X.J. Yang, Y. Nakatani, M. Bustin, The histone acetyltransferase activity of human GCN5 and PCAF is stabilized by coenzymes, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 27253–27258.
- [87] K. Balasubramanyam, M. Altaf, R.A. Varier, V. Swaminathan, A. Ravindran, P.P. Sathale, T.K. Kundu, Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 33716–33726.
- [88] C. Gao, E. Bourke, M. Scobie, M.A. Famme, T. Koolmeister, T. Helleday, L.A. Eriksson, N.F. Lowndes, J.A.L. Brown, Rational design and validation of a Tip60 histone acetyltransferase inhibitor, *Sci. Rep.* 4 (2014) 5372.
- [89] K. Balasubramanyam, V. Swaminathan, A. Ranganathan, T.K. Kundu, Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 19134–19140.
- [90] H. Yang, C.E. Pinello, J. Luo, D. Li, Y. Wang, L.Y. Zhao, S.C. Jahn, S.A. Saldanha, J. Planck, K.R. Geary, H. Ma, B.K. Law, W.R. Roush, P. Hodder, D. Liao, Small-molecule inhibitors of acetyltransferase p300 identified by high-throughput screening are potent anticancer agents, *Mol. Cancer Ther.* 12 (2013) 610–620.
- [91] M. Pinkerneil, M.J. Hoffmann, R. Deenen, K. Kohrer, T. Arent, W.A. Schulz, G. Niegisch, Inhibition of class I histone deacetylases 1 and 2 promotes urothelial carcinoma cell death by various mechanisms, *Mol. Cancer Ther.* 5819 (2016) 299–313.
- [92] H. Adams, F.R. Fritzsche, S. Dirnhofer, G. Kristiansen, A. Tzankov, Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in classical Hodgkin's lymphoma, *Expert Opin. Ther. Targets* 14 (2010) 577–584.
- [93] F.R. Fritzsche, W. Weichert, A. Röske, V. Gekeler, T. Beckers, C. Stephan, K. Jung, K. Scholman, C. Denkert, M. Dietel, G. Kristiansen, Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in renal cell cancer, *BMC Cancer* 8 (2008) 381.
- [94] W. Weichert, A. Röske, S. Niesporek, A. Noske, A.C. Buckendahl, M. Dietel, V. Gekeler, M. Boehm, T. Beckers, C. Denkert, Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 1669–1677.
- [95] M. Chao, P. Chu, H. Chuang, F. Shen, C. Chou, E. Hsu, L.E. Himmel, H. Huang, S.K. Kulp, C. Teng, C. Chen, Non-epigenetic function of HDAC8 in regulating breast cancer stem cells by maintaining Notch1 protein stability, *Oncotarget* 7 (2015) 1796–1807.
- [96] H. Ozdağ, A.E. Teschendorff, A.A. Ahmed, S.J. Hyland, C. Blenkiron, L. Bobrow, A. Veerakumarasivam, G. Burt, T. Subkhankulova, M.J. Arends, V.P. Collins, D. Bowtell, T. Kouzarides, J.D. Brenton, C. Caldas, Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers, *BMC Genomics* 7 (2006) 90.
- [97] T. Milde, I. Oehme, A. Korshunov, A. Kopp-Schneider, M. Remke, P. Northcott, H.E. Deubzer, M. Lodrini, M.D. Taylor, A. Von Deimling, S. Pfister, O. Witt, HDAC5 and HDAC9 in medulloblastoma: novel markers for risk stratification and role in tumor cell growth, *Clin. Cancer Res.* 16 (2010) 3240–3252.
- [98] M. Ouassif, I. Sieleznoff, R. Silvestre, B. Sastre, J.P. Bernard, J.S. Lafontaine, M.J. Payan, L. Dahan, N. Pirrò, J.F. Seitz, E. Mas, D. Lombardo, A. Ouassif, High histone deacetylase 7 (HDAC7) expression is significantly associated with adenocarcinomas of the pancreas, *Ann. Surg. Oncol.* 15 (2008) 2318–2328.
- [99] V. Skov, T.S. Larsen, M. Thomassen, C.H. Riley, M.K. Jensen, O.W. Bjerrum, T.A. Kruse, H.C. Hasselbalch, Increased gene expression of histone deacetylases in patients with Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms, *Leuk. Lymphoma* 53 (2012) 123–129.
- [100] A.K.B. Lucio-Eterovic, M.A.A. Cortez, E.T. Valera, F.J.N. Motta, R.G.P. Queiroz, H.R. Machado, C.G. Carloti, L. Neder, C.A. Scrideli, L.G. Tone, Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoxpressed in glioblastomas, *BMC Cancer* 8 (2008) 243.
- [101] A. Valenzuela-Fernández, J.R. Cabrero, J.M. Serrador, F. Sánchez-Madrid, HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions, *Trends Cell Biol.* 18 (2008) 291–297.
- [102] D. Kaluza, J. Kroll, S. Gesierich, T.P. Yao, R.A. Boon, E. Hergenreider, M. Tjwa, L. Rössig, E. Seto, H.G. Augustin, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, C. Urbich, Class IIb

- HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin, *EMBO J.* 30 (2011) 4142–4156.
- [103] L. Gao, J. Alunkal, Epigenetic regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer, *Epigenetics* 5 (2010) 100–104.
- [104] H. Osada, Y. Tatematsu, H. Saito, Y. Yatabe, T. Mitsudomi, T. Takahashi, Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients, *Int. J. Cancer* 112 (2004) 26–32.
- [105] I. Oehme, J.P. Linke, B.C. Böck, T. Milde, M. Lodrini, B. Hartenstein, I. Wiegand, C. Eckert, W. Roth, M. Kool, S. Kaden, H.J. Gröne, J.H. Schulte, S. Lindner, A. Hamacher-Brady, N.R. Brady, H.E. Deubzer, O. Witt, Histone deacetylase 10 promotes autophagy-mediated cell survival, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) E2592–E2601.
- [106] C. Song, S. Zhu, C. Wu, J. Kang, Histone deacetylase (HDAC) 10 suppresses cervical cancer metastasis through inhibition of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 expression, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 28021–28033.
- [107] H.E. Deubzer, M.C. Schier, I. Oehme, M. Lodrini, B. Haendler, A. Sommer, O. Witt, HDAC11 is a novel drug target in carcinomas, *Int. J. Cancer* 132 (2013) 2200–2208.
- [108] A. Villagra, F. Cheng, H.W. Wang, I. Suarez, M. Glozak, M. Maurin, D. Nguyen, K.L. Wright, P.W. Atadja, K. Bhalla, J. Pinilla-Ibarz, E. Seto, E.M. Sotomayor, The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 92–100.
- [109] D. Buglio, N.M. Khaskhely, K.S. Voo, H. Martinez-Valdez, Y.J. Liu, A. Younes, HDAC11 plays an essential role in regulating OX40 ligand expression in Hodgkin lymphoma, *Blood* 117 (2011) 2910–2917.
- [110] C.A. Bradbury, F.L. Khandim, R. Hayden, C.M. Bunce, D.A. White, M.T. Drayson, C. Craddock, B.M. Turner, Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors, *Leukemia* 19 (2005) 1751–1759.
- [111] D.M. Huffman, W.E. Grizzle, M.M. Bamman, J.S. Kim, I.A. Eltoum, A. Elgavish, T.R. Nagy, SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer, *Cancer Res.* 67 (2007) 6612–6618.
- [112] W. Stünkel, B.K. Peh, Y.C. Tan, V.M. Nayagam, X. Wang, M. Salto-Tellez, B.H. Ni, M. Entzeroth, J. Wood, Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer, *Biotechnol. J.* 2 (2007) 1360–1368.
- [113] J. Yuan, K. Minter-Dykhouse, Z. Lou, A c-Myc-SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation, *J. Cell Biol.* 185 (2009) 203–211.
- [114] G.E. Simmons, W.M. Pruitt, K. Pruitt, Diverse roles of SIRT1 in cancer biology and lipid metabolism, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 950–965.
- [115] Y. Fang, B. Michael, M.B. Nicholl, A dual role for sirtuin 1 in tumorigenesis, *Curr. Pharm. Des.* (2013) 2634–2636.
- [116] T. Inoue, M. Hiratsuka, M. Osaki, M. Oshimura, The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation, *Cell Cycle* 6 (2007) 1011–1018.
- [117] V. Lennerz, M. Fatho, C. Gentilini, R.A. Frye, A. Lifke, D. Ferrel, C. Wölfel, C. Huber, T. Wölfel, The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 16013–16018.
- [118] J.E. Bolden, M.J. Peart, R.W. Johnstone, Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 769–784.
- [119] C. Campas-Moya, Romidepsin for the treatment of cutaneous t-cell lymphoma, *Drugs Today* 45 (2009) 787–795.
- [120] Y. Li, K. Chen, Y. Zhou, Y. Xiao, M. Deng, Z. Jiang, W. Ye, X. Wang, X. Wei, J. Li, J. Liang, Z. Zheng, Y. Yao, W. Wang, P. Li, B. Xu, A new strategy to target acute myeloid leukemia stem and progenitor cells using chidamide, a histone deacetylase inhibitor, *Curr. Cancer Drug Targets* 15 (2015) 493–503.
- [121] T. Cheng, L. Grasse, J. Shah, J. Chandra, Panobinostat, a pan-histone deacetylase inhibitor: rationale for and application to treatment of multiple myeloma, *Drugs Today* 51 (2015) 491–504.
- [122] M. Ciró, E. Prosperini, M. Quarto, U. Grazini, J. Walfridsson, F. McBlane, P. Nucifero, G. Pacchiana, M. Capra, J. Christensen, K. Helin, ATAD2 is a novel cofactor for MYC, overexpressed and amplified in aggressive tumors, *Cancer Res.* 69 (2009) 8491–8498.
- [123] W.W. Tsai, Z. Wang, T.T. Yiu, K.C. Akdemir, W. Xia, S. Winter, C.Y. Tsai, X. Shi, D. Schwarzer, W. Plunkett, B. Aronow, O. Gozani, W. Fischle, M.C. Hung, D.J. Patel, M.C. Barton, TRIM24 links a non-canonical histone signature to breast cancer, *Nature* 468 (2010) 927–932.
- [124] M. Weidner-Glunde, M. Ottinger, T.F. Schulz, WHAT do viruses BET on? *Front. Biosci.* 15 (2010) 537–549.
- [125] A. Lin, S. Wang, T. Nguyen, K. Shire, L. Frappier, The EBNA1 protein of Epstein-Barr virus functionally interacts with Brd4, *J. Virol.* 82 (2008) 12009–12019.
- [126] C. Dhalluin, J.E. Carlson, L. Zeng, C. He, A.K. Aggarwal, M.M. Zhou, Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain, *Nature* 399 (1999) 491–496.
- [127] J. Morinière, S. Rousseaux, U. Steuerwald, M. Soler-López, S. Curtet, A.L. Vitte, J. Govin, J. Gaucher, K. Sadoul, D.J. Hart, J. Krijgsveld, S. Khochbin, C.W. Müller, C. Petosa, Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain, *Nature* 461 (2009) 664–669.
- [128] P. Filippakopoulos, J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W.B. Smith, O. Fedorov, E.M. Morse, T. Keates, T.T. Hickman, I. Felletar, M. Philpott, S. Munro, M.R. McKeown, Y. Wang, A.L. Christie, N. West, M.J. Cameron, B. Schwartz, T.D. Heightman, N. La Thangue, C.A. French, O. Wiest, A.L. Kung, S. Knapp, J.E. Bradner, Selective inhibition of BET bromodomains, *Nature* 468 (2010) 1067–1073.
- [129] U. Fischer, D. Heckel, A. Michel, M. Janka, T. Hulsebos, E. Meese, Cloning of a novel transcription factor-like gene amplified in human glioma including astrocytoma grade I, *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997) 1817–1822.
- [130] A. Daser, T.H. Rabbitts, The versatile mixed lineage leukaemia gene MLL and its many associations in leukaemogenesis, *Semin. Cancer Biol.* 15 (2005) 175–188.
- [131] J. Baeza, J.A. Dowell, M.J. Smallegan, J. Fan, D. Amador-Noguez, Z. Khan, J.M. Denu, Stoichiometry of site-specific lysine acetylation in an entire proteome, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 21326–21338.
- [132] F. Yeung, J.E. Hoberg, C.S. Ramsey, M.D. Keller, D.R. Jones, R.A. Frye, M.W. Mayo, Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase, *EMBO J.* 23 (2004) 2369–2380.
- [133] E. Langley, M. Pearson, M. Faretta, U.M. Bauer, R.A. Frye, S. Minucci, P.G. Pelicci, T. Kouzarides, Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence, *EMBO J.* 21 (2002) 2383–2396.