

H3K27me3 (Lys27) - Anticorpo monoclonal de coelho H3K27me3 (Lys27) (clone C36B11)

Código	EP-12-53333	1ml	Concentrado
• Validade e lote do produto	:		Ver frasco
• Temperatura de armazenamento	:		2 à 8°C (não congelar)
• Clone	:		C36B11
• Isotipo Ig	:		IgG de coelho
• Diluição	:		1:50
• Imunógeno	:		Peptídeo sintético correspondente aos aminoácidos terminais da histona 3 humana em que o Lys27 é trimetilado.
• Reatividade	:		RUO - (Humanos - não testados em outras espécies)
• Controle positivo	:		Tumor maligno da bainha do nervo periférico
• Marcação	:		Nuclear

Aplicações conhecidas

Em Imunohistoquímica (IHQ) para uso em tecidos embebidos em parafina.

Especificações:

O nucleossomo, que é feito de quatro proteínas histonas centrais (H2A, H2B, H3 e H4), é o componente cromatina principal. Foi originalmente pensado para funcionar como um andaime estático para o Empacotamento de DNA, embora as histonas tenham posteriormente demonstrado ser proteínas dinâmicas, pois eles sofrem vários tipos de modificações pós-tradução, incluindo acetilação, fosforilação, metilação e ubiquitinação.

A metilação das histonas é um determinante fundamental para a formação de regiões ativas e inativas do genoma e é crucial para sua programação adequada durante o desenvolvimento embrionário. Metilação de arginina das histonas H3 (Arg2, 17, 26) e H4 (Arg3) promove a ativação transcricional e é mediada por uma família de proteínas semelhantes à arginina metiltransferase (PRMT), incluindo os coativadores PRMT1 e CARM1 (PRMT4). Em contraste, um conjunto mais diverso de histonas do tipo lisina metiltransferase foi identificado, entre os quais todos, exceto um, contêm um domínio SET catalítico conservado que foi originalmente identificado em as proteínas reguladoras Zeste e Trithorax da mosca *Drosophila Su (var) 3-9*.

A metilação da lisina ocorre principalmente nas histonas H3 (Lys4, 9, 27, 36, 79) e H4 (Lys20) e tem sido envolvido na ativação transcricional e no silenciamento do gene. Além disso, metilação desses resíduos de lisina coordena o recrutamento de enzimas modificadoras da cromatina que contêm módulos de ligação de metil lisina, como cromodomínios (HP1, PRC1), dedos PHD (BPTF, ING2), domínios Domínios Tudor (53BP1) e WD-40 (WDR5). Finalmente, a descoberta de histonas demetilases, como PADI4, LSD1, JMJD1, JMJD2 e JHDM1 mostraram que a metilação é um marcador epigenético reversível.

Mutações NF1 e inativação de CDKN2A são encontradas na maioria dos tumores malignos do bainha de nervo periférico (TMVNP), onde a inativação de CDKN2A é um evento precoce durante sua desenvolvimento que ocorre durante a progressão do neurofibroma convencional para o atípico. Além disso, a inativação do complexo repressivo polycomb 2 (PRC2) resultante de mutações mutuamente exclusivas de suas porções SUZ12 ou EED1 foi recentemente identificado em 70-90% dos TMVNPs. Nesse sentido, a inativação de PRC2 leva à perda de trimetilação na histona H3 lisina 27 (H3K27me3).

A restauração de H3K27me3 e, portanto, a redução da transcrição de genes regulados por PRC2, inibe crescimento celular em TMVNP, sugerindo um efeito cooperativo de mutações PRC2 inativadas, NF1 e CDKN2A no desenvolvimento e progressão desse tumor. Assim, a histona H3K27me3 pode ser usada como biomarcador para prever a atividade funcional de PRC2 em TMVNP.

O anticorpo trimetilhistona H3 (Lys27), clone de coelho C36B11, detecta níveis endógenos de histona H3 sozinha quando ocorre trimetilação em Lys27. Assim, o anticorpo não apresenta reação cruzada com o variante Lys27 monometilada, dimetilada ou não metilada ou com as histonas monometiladas, dimetiladas ou não metiladas H3 trimetilado em Lys4, Lys9, Lys36 ou com histona H4 metilada em Lys20.

Armazenagem e estabilidade:

Armazenar entre 2°C e 8°C, porém o uso é feito em temperatura ambiente.

Conteúdo:

1. Ver frasco.

Notas técnicas importantes:

1. Evitar contato dos reagentes com os olhos e membranas mucosas. Caso os reagentes entrem em contato com áreas sensíveis lavar abundantemente com água.
2. Esse produto é prejudicial se ingerido.

3. Consulte as autoridades locais ou estaduais com relação ao método recomendado de descarte
4. Evitar a contaminação microbiana dos reagentes
5. Recomendado para uso em pesquisa (RUO)

Notas do protocolo:

A diluição ideal do anticorpo e protocolos para uma aplicação específica podem variar. Estes incluem, mas não estão limitados a: fixação, método de recuperação com calor, tempos de incubação, espessura do corte do tecido e kit de detecção usado. Devido a sensibilidade superior destes reagentes únicos, a recomendação dos tempos de incubação e títulos enumerados não são aplicáveis para outros sistemas de detecção, pois os resultados podem variar. As recomendações da bula e protocolos estão baseados com o uso exclusivo dos produtos EasyPath. É de responsabilidade do pesquisador determinar as condições ideais.

Protocolo:

- 1 - Desparafinização - Estufa 60-65 °C por 1 hora, depois bateria de Xilol e diluições decrescentes de álcool e lavar em água destilada
- 2 - Recuperação antigênica - Colocar 600 ml de água destilada na panela elétrica (Muscae Plus / EasyPath) e a(s) lâmina(s) no recipiente com tampão EDTA 10X pH8,5 (Recomendado EP-12-20553/6 EasyPath) ou Diva (Biocare), tampar a panela e deixar 10 minutos em 110°C, conforme pré-programado, esfriar em temperatura ambiente por 20 minutos no próprio tampão.
- 3 - Bloqueador de Peroxidase (Recomendado EP-11-20521/2/3 - EasyPath) por 5 minutos, lavar com TBS (Recomendado EP-11-20551/2 - EasyPath) e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 4 - Bloqueador de Proteína (Recomendado EP-12-20531/2/3 - EasyPath) por 5 minutos, lavar com TBS (Recomendado EP-11-20551/2 - EasyPath) e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 5 - Anticorpo primário por 30 minutos, lavar com TBS (Recomendado EP-11-20551/2 - EasyPath) e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 6 - Sistema de Detecção (Recomendado EP-12-20501/2/3/4/5/6 - EasyLink One EasyPath) por 30 minutos, lavar com TBS (Recomendado EP-11-20551/2 - EasyPath) e em seguida secar a lâmina com papel macio.
- 7 - DAB (Recomendado EP-12-20541/2/3/5 - EasyPath) por 5 minutos, lavar com TBS (Recomendado EP-11-20551/2 - EasyPath), depois com lavar com água deionizada e secar a lâmina com papel macio.
- 8 - Hematoxilina (Recomendado EP-11-20571/3 - EasyPath) por 1 minuto e lavar em água corrente por 1 minuto.
- 9 - Bateria de álcool e xilol
- 10 - Montar a(s) lâmina(s)

INSTRUÇÕES GERAIS

Para a obtenção de um melhor resultado da metodologia e uma completa compreensão da terminologia utilizada, nós recomendamos as seguintes indicações:

Número de testes realizados *

O número mínimo de testes é calculado com 100µl gotas de reagente, aconselhamos seguir esta quantidade de reagentes. Em casos de seções pequenas, no entanto, pode-se utilizar menos.

Tempo de execução

O tempo de execução foi calculado somando-se a duração de todas as etapas do método. Ele não inclui o tempo de desparafinizar, hidratar e desidratar o corte.

Coloração final

A metodologia foi padronizada a uma temperatura média de 20°C e em condições normais de trabalho, utilizando-se os produtos indicados nesta literatura. Pode ocorrer uma pequena variação na coloração final, devido principalmente a variação da temperatura, ocorrendo esta variação deve-se alterar o tempo utilizado em cada reagente, com o objetivo de intensificar ou diminuir a coloração.

Validade

Indica o tempo em que produto permanece inalterado a partir de sua fabricação, se armazenado adequadamente. Cada produto possui uma etiqueta com identificação do lote e data de vencimento.

Equipamento básico

Bandeja de coloração horizontal, comercializada pelo Grupo Erviegas, código EP-51-05021.

Câmara pressurizada Muscae Plus (EasyPath) para recuperação antigênica com controle de pressão, temperatura e tempo.

Duas séries de solventes, conforme metodologia de cada kit:

- DESCENDENTE: para desparafinar e levar os cortes das seções para água destilada, composta de: xilol (x2), etanol absoluto (x2), etanol a 96%, etanol a 70% e água destilada.
- ASCENDENTE: para desidratar e limpar, composta de: etanol a 70%, etanol a 96%, etanol absoluto (x2) e xilol (x2).

Aconselhamos o uso do meio de montagem ERV-MOUNT, comercializado pela Grupo Erviegas código EP-51-05042 frasco com 500ml e EP-51-05041 frasco com 100ml.

Equipamento complementar

Podem-se ser utilizadas micropipetas para reduzir a quantidade de reagentes utilizados durante o processo, bem como outros sistemas de recuperação antigênica como micro-ondas, panela de pressão, banho maria ou sistema automatizados para imuno-histoquímica como IntelliPATH (Biocare).

Fixação e meios de inclusão

Os tempos dos métodos foram determinados a partir de cortes histológicos de fragmentos fixados em formol tamponado com pH 7 com tampão fosfato e inclusos em parafina, pelo tempo mínimo de fixação (Recomendado – Histofix, fixador EasyPath). A utilização de outros fixados nas práticas histológicas comuns (piocromoformol de Bouin, B5), temperatura do processamento, inclusão e desparafinação podem interferir na metodologia e tempos de incubações.

Garantia Grupo Erviegas

O Grupo Erviegas garante o funcionamento do produto conforme especificado nesta literatura. Para maiores informações sobre o produto ou detalhes sobre outras técnicas e produtos acesse nosso site www.grupoerviegas.com.br.

Referência Bibliografia

1. Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol*. 2004 Jul 27;14(14):R546-51.
2. Kubicek S, Schotta G, Lachner M, Sengupta R, Kohlmaier A, Perez-Burgos L, Linderson Y, Martens JH, O'Sullivan RJ, Fodor BD, Yonezawa M, Peters AH, Jenuwein T. The role of histone modifications in epigenetic transitions during normal and perturbed development. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2006;(57):1-27.
3. Lin W, Dent SY. Functions of histone-modifying enzymes in development. *Curr Opin Genet Dev*. 2006 Apr;16(2):137-42.
4. Lee DY, Teyssier C, Strahl BD, Stallcup MR. Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev*. 2005 Apr;26(2):147-70.
5. Daniel JA, Pray-Grant MG, Grant PA. Effector proteins for methylated histones: an expanding family. *Cell Cycle*. 2005 Jul;4(7):919-26.
6. Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Peña P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Côté J, Chua KF, Gozani O. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature*. 2006 Jul 6;442(7098):96-9.
7. Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, Kauer M, Tackett AJ, Chait BT, Badenhorst P, Wu C, Allis CD. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*. 2006 Jul 6;442(7098):86-90.
8. Chiang S. S100 and Pan-Trk Staining to Report NTRK Fusion-Positive Uterine Sarcoma: Proceedings of the ISGYP Companion Society Session at the 2020 USCAP Annual Meeting. *Int J Gynecol Pathol*. 2021 Jan;40(1):24-27
9. Schaefer IM, Fletcher CD, Hornick JL. Loss of H3K27 trimethylation distinguishes malignant peripheral nerve sheath tumors from histologic mimics. *Mod Pathol*. 2016 Jan;29(1):4-13.
10. Mentzel T, Kiss K. Reduced H3K27me3 expression in radiation-associated angiosarcoma of the breast. *Virchows Arch*. 2018 Mar;472(3):361-368.
11. Clevon AH, Al Sanna GA, Briaire-de Bruijn I, Ingram DR, van de Rijn M, Rubin BP, de Vries MW, Watson KL, Torres KE, Wang WL, van Duinen SG, Hogendoorn PC, Lazar AJ, Bovée JV. Loss of H3K27 tri-methylation is a diagnostic marker for malignant peripheral nerve sheath tumors and an indicator for an inferior survival. *Mod Pathol*. 2016 Sep;29(9):1113. doi: 10.1038/modpathol.2016.103. Erratum for: *Mod Pathol*. 2016 Jun;29(6):582-90.
12. Lu VM, Marek T, Gilder HE, Puffer RC, Raghunathan A, Spinner RJ, Daniels DJ. H3K27 trimethylation loss in malignant peripheral nerve sheath tumor: a systematic review and meta-analysis with diagnostic implications. *J Neurooncol*. 2019 Sep;144(3):433-443.
13. Hornick JL, Nielsen GP. Beyond "Triton": Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors With Complete Heterologous Rhabdomyoblastic Differentiation Mimicking Spindle Cell Rhabdomyosarcoma. *Am J Surg Pathol*. 2019 Oct;43(10):1323-1330.
14. Gilder HE, Puffer RC, Spinner RJ, Raghunathan A, Bydon M. Low-Grade Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Mimicking Schwannoma: Role and Importance of Trimethylated H3K27M Staining. *World Neurosurg*. 2018 Sep;117:178-181.
15. Alexandrescu S, Meredith DM, Lidov HG, Alaggio R, Novello M, Ligon KL, Vargas SO. Loss of histone H3 trimethylation on lysine 27 and nuclear expression of transducin-like enhancer 1 in primary intracranial sarcoma, DICER1-mutant. *Histopathology*. 2021 Jan;78(2):265-275.
16. Nambirajan A, Sharma A, Rajeshwari M, Boorgula MT, Doddamani R, Garg A, Suri V, Sarkar C, Sharma MC. EZH2 inhibitory protein (EZH2/Cxorf67) expression correlates strongly with H3K27me3 loss in posterior fossa ependymomas and is mutually exclusive with H3K27M mutations. *Brain Tumor Pathol*. 2021 Jan;38(1):30-40.
17. Kitahama K, Iijima S, Sumiishi A, Hayashi A, Nagahama K, Saito K, Sasaki N, Kobayashi K, Shimizu S, Nagane M, Shibahara J. Reduced H3K27me3 levels in diffuse gliomas: association with 1p/19q codeletion and difference from H3K27me3 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Brain Tumor Pathol*. 2021 Jan;38(1):23-29.

18. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Utility of histone H3K27me3 and H4K20me as diagnostic indicators of melanoma. *Melanoma Res.* 2020 Apr;30(2):159-165.
19. Hoffmann F, Niebel D, Aymans P, Ferring-Schmitt S, Dietrich D, Landsberg J. H3K27me3 and EZH2 expression in melanoma: relevance for melanoma progression and response to immune checkpoint blockade. *Clin Epigenetics.* 2020 Feb 10;12(1):24.
20. Hornick JL. Limited biopsies of soft tissue tumors: the contemporary role of immunohistochemistry and molecular diagnostics. *Mod Pathol.* 2019 Jan;32(Suppl 1):27-37.
21. Anderson WJ, Hornick JL. Immunohistochemical correlates of recurrent genetic alterations in sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2019 Feb;58(2):111-123.