

# Contraste Ontológico: Una Herramienta para el Análisis de Experimentos de Proteómica/Genómica Funcional.

Fresno C<sup>1</sup>, Llera AS<sup>2,3</sup>, Girotti MR<sup>2,3,a</sup>, Valacco MP<sup>2,3</sup>, López JA<sup>5</sup>,  
Podhajcer OL<sup>2,3</sup>, Balzarini MG<sup>2,4</sup>, Prada F<sup>6</sup>, Fernández EA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Minería de Datos en Bio-Ciencias, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina, <sup>2</sup>CONICET, Buenos Aires, Argentina, <sup>3</sup>Laboratorio de terapia molecular y celular, Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina, <sup>4</sup>Laboratorio de Biometría, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, <sup>5</sup>Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, España, <sup>6</sup>Universidad Argentina de la Empresa, Buenos Aires, Argentina, <sup>a</sup>Institución actual: Instituto de investigación del cáncer, Londres, Reino Unido

## Datos de Contacto:

Cristóbal Fresno. Grupo de Minería de Datos en Bio-Ciencias, Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina. Av. Armada Argentina 3555 (5017). Córdoba - Argentina. cristobalfresno@gmail.com

## Resumen

La identificación de la activación de funciones biológicas u otros fenómenos mediados por genes suele ser una tarea compleja y dificultosa. Los resultados dependen de las referencias de contraste y la manera en que son visualizados o proporcionados al investigador, para su análisis. Presentamos aquí, una herramienta para analizar y comparar, en forma simultánea, múltiples referencias de contraste mediante una interfaz de análisis simple, que identifica automáticamente los términos biológicos de interés; facilitando la exploración y descubrimiento, en experimentos genómicos/proteómicos funcionales.

La herramienta fue evaluada en un experimento de expresión diferencial de proteínas en progresión tumoral mediada por SPARC, permitiendo la identificación de vías metabólicas asociadas a ella tales como organización de filamentos intermedios del citoesqueleto y regulación positiva de migración de leucocitos entre otras.

**Palabras Clave:** Integración de datos, proteómica, genómica, análisis de enriquecimiento, ontologías, referencias, ontologías, Gene Ontology.

## Introducción

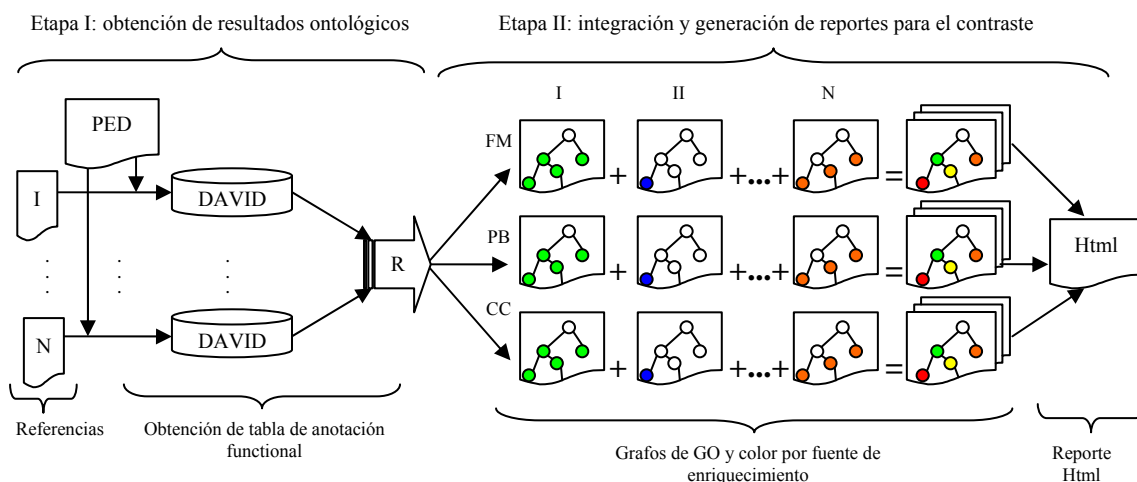
El análisis de ontologías es una etapa fundamental en el análisis de experimentos de proteómica/genómica funcional de alto rendimiento. Este análisis permite identificar términos de relevancia biológica “activados” o enriquecidos, por los genes/proteínas diferenciales identificadas en el experimento y de esta forma, identificar funciones o vías metabólicas. Uno de las metodologías para llevar a cabo este análisis se conoce como “Set enrichment análisis” (SEA) la cual evalúa si un determinado concepto o término de la ontología, usualmente “Gene Ontology” (GO, [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org) [1]) se encuentra estadísticamente “enriquecido”. Para ello, se evalúa si la proporción de genes diferenciales difiere a la esperada, con respecto a un determinado “universo” de genes de contraste. Existen diversas herramientas para realizar este tipo de análisis, las cuales permiten que el usuario proporcione la referencia de contraste que considere más apropiada [2-3]. Sin embargo, es reconocido que diferentes referencias (“universos” de contraste) pueden dar diferentes resultados y una selección inapropiada de ésta puede contradecir los supuestos estadísticos, potencialmente sesgando los resultados [4]. Actualmente no existe consenso sobre cuál es la mejor opción en cada escenario experimental, dado que si utilizamos todo el genoma, este puede introducir un sesgo de representación o bien podemos estar incluyendo genes, que es imposible observar por las características del experimento (por caso el análisis de secretoma de proteínas) [5]. Por otro lado, el análisis de estos resultados o su interpretación es

complejo y dificultoso, dado que suelen ser presentados en forma tabular, lo que demanda de un gran esfuerzo del usuario para su análisis e inspección.

En este trabajo se presenta una herramienta que aborda ambos problemas. La misma permite realizar el análisis ontológico, a partir del contraste visual simultáneo de múltiples referencias e integración de información de expresión. La exploración se realiza sobre reportes HTML interactivos, sin necesidad de estar conectado a la herramienta. En ellos la información se encuentra codificada mediante un patrón de colores sobre la estructura de GO, permitiendo una rápida navegación producto del contraste visual de los resultados. Como ejemplo de aplicación, se analizó un experimento de expresión de proteínas en líneas celulares de melanoma que expresan la proteína SPARC, para evaluar vías metabólicas mediadas por ésta y su relación a progresión tumoral. La presente herramientas resaltó en forma automática, términos altamente asociados a SPARC y a progresión tumoral; los cuales fueron validados tanto por búsqueda bibliográfica al igual que experimentalmente.

### Elementos del trabajo y metodología

La herramienta consta de dos etapas. En la primera de ella se obtienen los resultados ontológicos, mientras que en la segunda, se realiza la integración mediante la generación de un reporte que permite el contraste simultáneo de los resultados; como se aprecia en el diagrama de la figura 1.



**Figura 1:** diagrama de flujo de la herramienta.

La obtención de los resultados comienza con la carga de la lista de proteínas/genes expresados diferencialmente en DAVID [6-7], junto con la lista de referencia definida por el investigador. Los términos enriquecidos son identificados utilizando la anotación completa de GO, sobre cada una de las categorías principales - funciones moleculares (FM), procesos biológicos (PB) y componentes celulares (CC). Posteriormente se descarga la tabla de anotación funcional, sin aplicar ningún tipo de filtrado (puntaje EASE = 1 y cantidad de genes mínimo en cada término  $\geq 1$ ). De esta forma, la totalidad de términos de GO es extraída y almacenada de forma local. Este proceso se repite por cada una de las referencias a considerar en el contraste.

La integración de los resultados se realiza en forma paralela, debido a la independencia entre las diferentes categorías (FM, PB y CC), para el conjunto de referencias procesadas utilizando lenguaje R y Bioconductor [9-10]. En cada una de las categorías se determinan los términos enriquecidos fijando un umbral para cada una de las referencias ( $EASE \geq 0.1$  [11]). A partir de ellos, se genera el correspondiente grafo dirigido acíclico basado en la estructura de GO, utilizando *GoStats* [12]. Mediante un

patrón de colores, se integra automáticamente el enriquecimiento de las diferentes referencias, a los efectos de determinar de manera inequívoca el grado de superposición. Una vez obtenida la estructura se generan dos vistas: una de enriquecimiento y otra de expresión. En la primera de ellas, se puede navegar el grafo observando el nombre de los términos (nodos) y fuentes de enriquecimiento en color. La segunda vista integra, adicionalmente a la información de GO, la expresión de los genes asociados al experimento. En ésta cada nodo representa un gráfico de sección circular, con el tipo de expresión génica (sub o sobreexpresada) y un punto central con la fuente de enriquecimiento. En ella la herramienta automáticamente muestra la tendencia, si es que existe, en la expresión de los genes asociada a términos biológicos específicos; es decir, si existen ramas del grafo que presentan sobre o subexpresión. A su vez, para ambos casos, el usuario puede seleccionar un nodo de interés y acceder a su información asociada (genes, símbolos, vínculos a bases de datos externas, etc). De esta manera, el usuario tiene la posibilidad de explorar información funcional adicional. Finalmente, se genera un reporte HTML que integra las diferentes vistas obtenidas para cada una de las tres categorías (FM, PB y CC) e incluso permite acceder a la información original obtenida por DAVID.

A los efectos de mostrar un caso de uso de la herramienta, se presentan los resultados obtenidos en un experimento de proteómica funcional de geles 2D-DIGE de secretomas (proteínas extracelulares) de dos líneas celulares de melanoma, en las que varía el nivel de expresión de la proteína protumoral SPARC ([13] y Girotti y *col.* no publicado). En este experimento se identificó 72 proteínas con expresión diferencial (46 sobreexpresadas y 26 subexpresadas). El contraste ontológico propuesto se realizó utilizando dos referencias: el genoma (elección por defecto en DAVID) y una referencia definida por el usuario de la misma línea celular (3154 genes), a partir de la identificación por LC-MS/MS utilizando Orbitrap (Girotti y *col.*, no publicado).

## Resultados

Un reporte típico de la herramienta se muestra en la figura 2. En este se puede apreciar en el margen superior una barra de navegación, que permite acceder a diferentes fuentes de información: genes diferenciales del experimento, vías metabólicas de KEGG (ambas en formato tabular) y las tres categorías principales de GO. Las últimas pueden ser inspeccionadas mediante: la vista de enriquecimiento, vista de expresión o las tablas originales obtenidas por DAVID.

En un primer análisis exploratorio, el usuario usualmente puede elegir seguir el esquema numerado (1 al 4) en la figura 2. Inicialmente en 1, seleccionó la vista de enriquecimiento de FM. En la sección del grafo mostrada, se aprecian solamente aquellos nodos que resultaron enriquecidos, con su correspondiente nombre y grado de superposición (en color). En ella se observa un elevado consenso entre los dos contrastes utilizados (en rojo), es decir, nodos enriquecidos en ambas referencias y esperables desde la biología del experimento (siempre enriquecidos). Al utilizar este tipo de representación, el usuario puede obtener rápidamente un pantallazo global del experimento y filtrar visualmente aquellos nodos más genéricos, para focalizar su atención en los nodos enriquecidos más específicos (más profundos). De esta manera, se observa una rama de gran especificidad que termina sólo en dos nodos naranja, enriquecidos en el genoma (elipse en trazo discontinuo, en la figura 2).

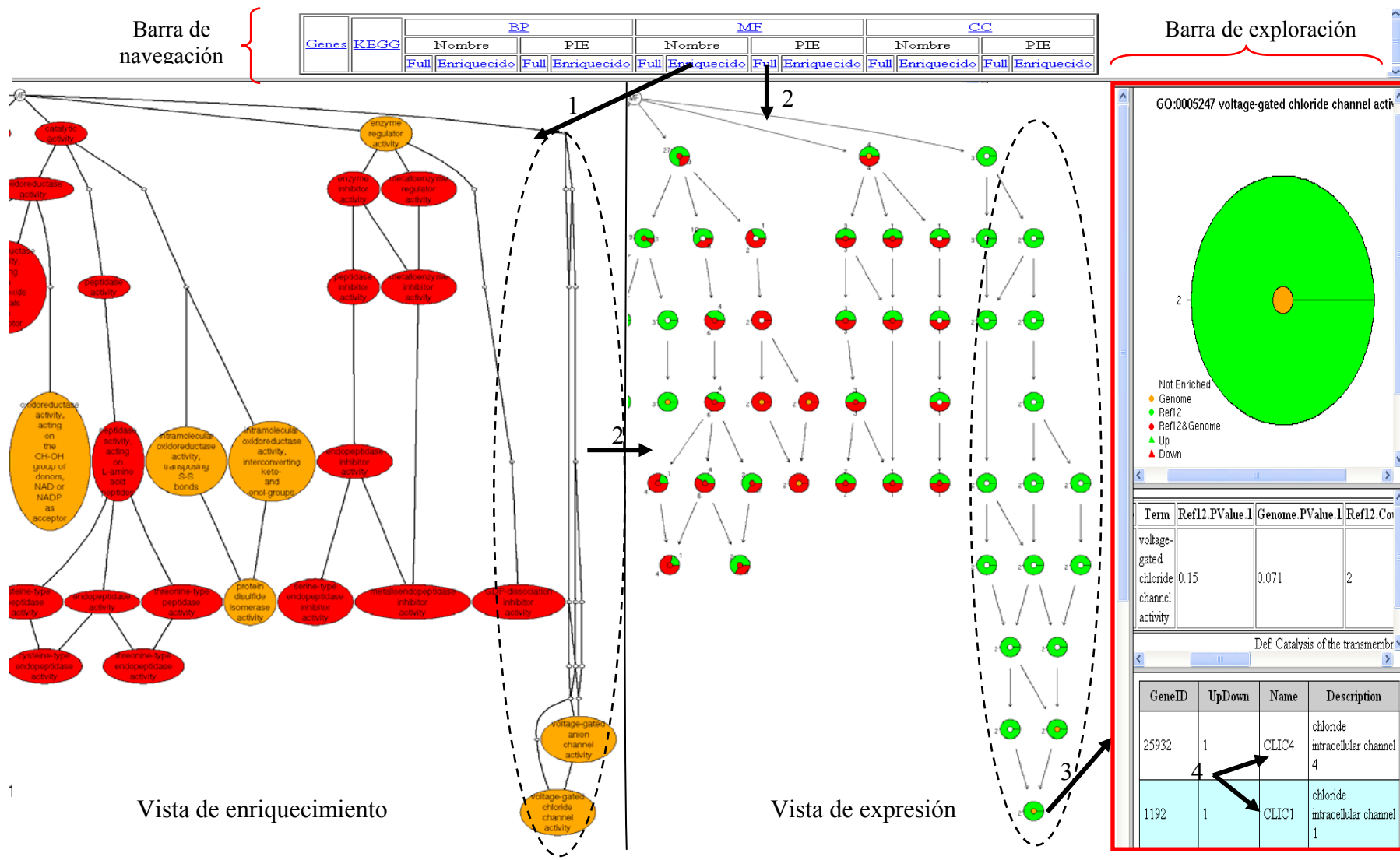


Figura 2: capturas de pantalla del contraste ontológico para el experimento de proteómica funcional de SPARC (ver texto).

Motivado por esta observación, el usuario puede trasladarse a la vista de expresión completa como es en el caso de 2. En ella se observa que la totalidad de la rama se encuentra sobrepresada (sección verde completa), manteniendo en el punto central la fuente de enriquecimiento (blanco para los no enriquecidos y naranja para los observados en la vista de enriquecimiento). A su vez, con la herramienta se puede continuar el análisis solicitando información adicional para el caso del nodo de *actividad regulada por voltaje de canales de cloruro*, la cual se presenta en la barra de exploración (3, figura 2). En ésta se presenta al nodo con mayor aumento, tablas con diferentes medidas asociadas (p-valores de enriquecimiento, definición del término, etc) y una descripción de los genes con expresión diferencial, que resultaron asociados a dicho término biológico. En particular se observan dos genes de la familia CLIC, para los cuales se les puede seguir a PubMed con el enlace provisto por la herramienta, a los efectos de continuar la búsqueda (4, figura 2). De hecho, realizando una búsqueda bibliográfica se relacionaron estos genes con migración celular de melanomas por Madeja y col. [14-15]. Adicionalmente, utilizando una estrategia similar sobre el resto del grafo, resultó de interés el nodo *unión de proteínas no plegadas*. Este nodo resultó relacionado con SPARC durante el desarrollo embrionario en estudios de deposición de colágeno tipo IV en la lámina basal y también fue mencionado como un chaperón molecular en el retículo endoplasmático [16-17].

Al utilizar la herramienta en la categoría PB, el contraste ontológico automáticamente resaltó 10 nodos fuera del consenso (naranja), altamente específicos (hojas) y a su vez relacionados con SPARC. Por ejemplo, *organización de filamentos intermedios del citoesqueleto*, es intrínsecamente afectado por SPARC [18]. Del mismo modo, *regulación positiva de migración de y quemo taxis de leucocitos*, son directamente afectados por la expresión de SPARC según lo reportado por Alvarez y col. [19] y Kelly y col. [20]. Términos de respuesta a *stress celular*, *daño de axones* y *hormona esteroide* también fueron resaltados y asociados a este gen [21-26]. Proteínas de la matriz celular como SPARC, también se encuentran involucradas en los términos resaltados, *desarrollo de sistema nervioso* y *diferenciación celular* [27-29]. Por otra parte, es interesante observar que mediante la herramienta propuesta, se encontraron términos resaltados en FM y PB donde genes de la familia CLIC también están presentes. Una relación entre SPARC y familia CLIC en *regulación negativa de ubiquitinación de proteínas* ha sido recientemente sugerida por Nakayama [30] y Belli y col. [31].

Por otra parte, *transporte de aminos*, fue el único nodo que emergió en PB con la herramienta relacionado con la referencia definida por el usuario (en verde). Sin embargo, la evidencia en la literatura no resultó concluyente acerca de la relación de SPARC a este proceso, a pesar de que SPARC posee capacidad para transglutaminarse, debido a la alta densidad de ácidos glutámicos del extremo N-terminal [32], pero las transglutaminasas de tejidos no están involucradas en este tipo de procesos.

En la última categoría principal de GO, CC, la herramienta resaltó tres hojas en el genoma (naranja), *membrana basal*, *complejo de enzimas de ubiquitinación* y *envoltura nuclear* asociadas a expresión de SPARC, de acuerdo con las observaciones de Fukunaga-Kalabis y col. [34], Anwar y col. [35] y Sacks-Wilner & Freddo [36].

## Discusión

En el presente trabajo se presentó una herramienta bioinformática, capaz de abordar la problemática de sus predecesoras, en lo que respecta al contraste e integración simultánea de diferentes fuentes de información y una visualización intuitiva para la inspección de los resultados obtenidos a partir de SEA. Si bien los resultados varían debido a la referencia utilizada, el contraste ontológico mostró ser de utilidad para resumir automáticamente el panorama del experimento en el consenso (nodos rojos), en

concordancia con la observación de Hedegaard [37]; quien sugirió que si los resultados biológicos (genes diferenciales) son confiables, los resultados entre las diferentes referencias deben ser comparables en cierta medida. Sin embargo, en un análisis tradicional (con una sola referencia) pueden no ser considerados términos ontológicos potencialmente atractivos para el investigador.

A diferencia de otras herramientas, el contraste ontológico, hace uso de la estructura de GO para presentar de forma amigable para la exploración simultánea de los resultados. En este contexto la propia estructura de grafo, permite que el usuario pueda con un simple filtrado visual acceder rápidamente a la información experimental relevante; mientras que la metodología tradicional (por ejemplo, formato tabular), hace dificultoso el proceso de descubrimiento y exploración de información biológica. Adicionalmente, se propuso un esquema de color para mejorar los resultados ontológicos. Este esquema facilitó la identificación de términos biológicamente informativos, dando una rápida visión general de los resultados del experimento. El método automáticamente resaltó nodos y ramas del grafo, que tuvieron relevancia biológica para nuestro contexto experimental. Más aún, la vista de expresión permitió extender el análisis a ramas completamente sobreexpresada o subexpresadas, aportando información propia de la biología al investigador. Así, la estrategia propuesta facilita la inspección del grafo, evitando la búsqueda en detalle y ahorrando tiempo de análisis.

Nuestros resultados sugieren que en los nodos consenso se presentan un pantallazo general del experimento e información sobre la fiabilidad de los genes expresados en el experimento (aparecen enriquecidos independientemente de la elección de la referencia). Por el contrario, encontramos que los nodos fuera del consenso poseen información de interés, fuertemente relacionada con contexto experimental, con artículos científicos que sustentan su relevancia biológica.

A diferencia de otras herramientas, nuestro método incluye toda la información *a priori* (sin poda de los grafos) y *posteriori* (sin aplicar criterios de filtrado), con el fin de dejar que los grafos hablen conjuntamente por sí mismos. Nuestros resultados soportados por validación mediante búsqueda bibliográfica, sugieren una ganancia de información al emplear los resultados de DAVID y Gene Ontology sin ningún tipo de restricciones (ajustes o filtrado). La herramienta propuesta para recuperación de información (consulta simultánea a bases de datos) y visualización, como una herramienta de minería de datos, nos ayudó a ver fácilmente información contextual mediante el realce de nodos potencialmente relevantes (identificando información novel en el panorama que presenta el grafo). Por ejemplo, la rama enriquecida de *actividad regulada por voltaje de canales de cloruro*, la cual resultó tener un elevado grado de importancia para el experimento de melanoma, no hubiera sido identificada utilizando DAVID con sus parámetros por defecto (excluye términos con menos de 3 genes). Esto es especialmente importante en estudios de proteómica donde, en nuestro caso, un término que contiene solo dos genes (CLIC4 y CLIC1) resultó enriquecido; a pesar que estos genes se encontraron presentes diferencialmente en varias isoformas del gel de melanoma.

### **Agradecimientos**

Este trabajo fue realizado con fondos de la Agencia Nacional de Promoción de Ciencia y Tecnología, de Argentina [PICT00667/07, A.S.L], Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [PIP2009, M.B.] y Ministerio de Ciencia y Tecnología de Córdoba, Argentina [PID2008, E.A.F].

### **Referencias**

[1] M. Ashburner, C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin, G. Sherlock, Gene Ontology: tool for the unification of biology, Nat. Genet., 25, 25-29 (2000)

- [2] P. Khatri, S. Drăghici, Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems, *Bioinformatics*, 21, 3587-3595 (2005)
- [3] D. Wei Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists, *Nucleic Acids Res.*, 37, 1-13 (2009)
- [4] I. Rivals, L. Personnaz, L. Taing, M-C. Potier, Enrichment or depletion of a GO category within a class of genes: which test? *Bioinformatics*, 23, 401-407 (2007)
- [5] B. R. Zeeberg, W. Feng, G. Wang, M. D. Wang, A. T. Fojo, M. Sunshine, S. Narasimhan, D. W. Kane, W. C. Reinhold, S. Lababidi, K. J. Bussey, J. Riss, J. C. Barrett, J. N. Weinstein, GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data, *Genome Biol.*, 4, R28 (2003)
- [6] G. Dennis, B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane, R. A. Lempicki, DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery, *Genome Biol.*, 4, P3 (2003)
- [7] D. W. Huang, B. T. Sherman, Q. Tan, J. Kir, D. Liu, D. Bryant, Y. Guo, R. Stephens, M. W. Baseler, H. C. Lane, R. A. Lempicki, DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res.*, 35, W169-W175 (2007)
- [9] R Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0 (2009).
- [10] R. C. Gentleman, V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A. J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J. Y. Yang, J. Zhang, Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics, *Genome Biol.*, 5, R80 (2004)
- [11] D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat. Protoc.*, 4, 44-57 (2009)
- [12] S. Falcon, R. Gentleman, Using GOstats to test gene lists for GO term association, *Bioinformatics*, 23, 257-258 (2007)
- [13] M. S. Sosa, M. R. Girotti, E. Salvatierra, F. Prada, J. A. de Olmo, S. J. Gallango, J. P. Albar, O. L. Podhajcer, A. S. Llera, Proteomics analysis identified N-cadherin, clusterin and HSP27 as mediators of SPARC activity in melanoma cells, *Proteomics*, 22, 4123-4134 (2007)
- [14] Z. Madeja, I. Szymkiewicz, A. Zaczek, J. Sroka, K. Miekus, W. Korohoda, Contact-activated migration of melanoma B16 and sarcoma XC cells. *Biochem Cell Biol.*, 79, 425-440 (2001)
- [15] Z. Madeja, A. Master, M. Michalik, J. Sroka, Contact-mediated acceleration of migration of melanoma B16 cells depends on extracellular calcium ions, *Folia Biol (Krakow)*, 49, 113-124 (2001)
- [16] N. Martinek, J. Shahab, J. Sodek, M. Ringuette, Is SPARC an evolutionarily conserved collagen chaperone?, *J. Dent. Res.*, 86, 296-305 (2007)
- [17] M. Pfaff, M. Aumailley, U. Specks, J. Knolle, H. G. Zerwes, R. Timpl, Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI, *Exp Cell Res*, 206,167-176 (1993)
- [18] M. J. Alvarez, Rol de la proteína de matriz extracelular SPARC en la progresión tumoral del melanoma humano. Ph.D. Thesis, Universidad de Buenos Aires - Instituto de Investigaciones Bioquímica: Argentina (2006).
- [19] M. J. Alvarez, F. Prada, E. Salvatierra, A. I. Bravo, V. P. Lutzky, C. Carbone, F. J. Pitossi, H. E. Chuluyan, O. L. Podhajcer, Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity, *Cancer Res.*, 65, 5123-5132 (2005)
- [20] K. A. Kelly, J. R. Allport, A. M. Yu, S. Singh, E. H. Sage, R. E. Gerszten, R. Weissleder, SPARC is a VCAM-1 counter-ligand that mediates leukocyte transmigration, *J. Leukoc. Biol.*, 81, 748-756 (2007)
- [21] S. V. Vadlamuri, SPARC affects glioma cell growth differently when grown on brain ECM proteins in vitro under standard versus reduced-serum stress conditions, *Neuro. Oncol.*, 5, 244-254 (2003)
- [22] M. W. Schellings, Y. M. Pinto, S. Heymans, Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling, *Cardiovasc. Res.*, 64, 24-31 (2004)
- [23] C. Luna, G. Li, J. Qiu, D. L. Epstein, P. Gonzalez, Role of miR-29b on the regulation of the extracellular matrix in human trabecular meshwork cells under chronic oxidative stress, *Mol. Vis.*, 15, 2488-2497 (2009)
- [24] E. Au, M. W. Richter, A. J. Vincent, W. Tetzlaff, R. Aebersold, E. H. Sage, A. J. Roskams, SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair, *J Neurosci.*, 27, 7208-7221 (2007)
- [25] S. C. Dieudonné, J. M. Kerr, T. Xu, B. Sommer, A. R. DeRubeis, S. A. Kuznetsov, I. S. Kim, P. Gehron Robey, M. F. Young, Differential display of human marrow stromal cells reveals unique mRNA expression patterns in response to dexamethasone, *J. Cell. Biochem.*, 76, 231-243 (1999)
- [26] R. S. Sawhney, Expression and regulation of SPARC, fibronectin, and collagen IV by dexamethasone in lens epithelial cells, *Cell Biol. Int.*, 26, 971-983 (2002)

- [27] C. Chavey, J. Boucher, M. N. Monthouël-Kartmann, E. H. Sage, I. Castan-Laurell, P. Valet, S. Tartare-Deckert, E. Van Obberghen, Regulation of secreted protein acidic and rich in cysteine during adipose conversion and adipose tissue hyperplasia, *Obesity (Silver Spring)*, 14, 1890-1897 (2006)
- [28] A. J. Vincent, P. W. Lau, A. J. Roskams, SPARC is expressed by macroglia and microglia in the developing and mature nervous system, *Dev Dyn.*, 237, 1449-1462 (2008)
- [29] C. Eroglu, The role of astrocyte-secreted matricellular proteins in central nervous system development and function, *J. Cell Commun. Signal*, 3, 167-176 (2009)
- [30] K. Nakayama, Growth and progression of melanoma and non-melanoma skin cancers regulated by ubiquitination, *Pigment. Cell Melanoma Res.*, 23, 338-351 (2010)
- [31] B. Bellei, V. Maresca, E. Flori, A. Pitisci, L. Larue, M. Picardo, p38 regulates pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase, *J Biol Chem.*, 285, 7288-7299 (2010)
- [32] C. Hohenadl, K. Mann, U. Mayer, R. Timpl, M. Paulsson, D. Aeschlimann, Two adjacent N-terminal glutamines of BM-40 (osteonectin, SPARC) act as amine acceptor sites in transglutaminaseC-catalyzed modification, *J. Biol. Chem.*, 270, 23415-23420 (1995)
- [33] M. Fukunaga-Kalabis, A. Santiago-Walker, M. Herlyn, Matricellular proteins produced by melanocytes and melanomas: in search for functions, *Cancer Microenviron*, 1, 93-102 (2008)
- [34] A. Anwar, D. A. Norris, M. Fujita, Ubiquitin proteasomal pathway mediated degradation of p53 in melanoma, *Arch. Biochem. Biophys.*, Article in Press (2010)
- [35] R. Sacks-Wilner, T. F. Freddo, Differences in nuclear pore density among human choroidal melanoma cell types, *Ultrastruct. Pathol.*, 14, 311-9 (1990)
- [36] J. Hedegaard, C. Arce, S. Bicciato, A. Bonnet, B. Buitenhuis, M. Collado-Romero, L. N. Conley, M. Sancristobal, F. Ferrari, J. J. Garrido, M. A. Groenen, H. Hornshøj, I. Hulsegge, L. Jiang, A. Jiménez-Marín, A. Kommadath, S. Lagarrigue, J. A. Leunissen, L. Liaubet, P. B. Neerinx, H. Nie, J. van der Poel, D. Prickett, M. Ramirez-Boo, J. M. Rebel, C. Robert-Granié, A. Skarman, M. A. Smits, P. Sørensen, G. Tosser-Klopp, M. Watson, Methods for interpreting lists of affected genes obtained in a DNA microarray experiment, *BMC Proc.*, 3, S5 (2009)