



Título del artículo.

Efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en la actividad transcripcional de genes relacionados con el cáncer

Título del artículo en idioma Inglés.

Effect of over-expression of DNMT3B on transcriptional activity of genes related to cancer.

Autores.

Irlanda Peralta-Arrieta
Berenice Illades-Aguiar
Daniel Hernández-Sotelo

Referencia bibliográfica:

MLA

Peralta-Arrieta, Irlanda, Berenice Illades-Aguiar y Daniel Hernández-Sotelo. Efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en la actividad transcripcional de genes relacionados con el cáncer. *Tlamati* 8.1, (2017): 11-20. Print.

APA

Peralta-Arrieta, I., Illades-Aguiar, B. y Hernández-Sotelo, D. (2017). Efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en la actividad transcripcional de genes relacionados con el cáncer. *Tlamati*, 8(1), 11-20.

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 30 de Junio del 2017

© 2017 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

TLAMATI, es una publicación semestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAGro. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



Efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en la actividad transcripcional de genes relacionados con el cáncer

Irlanda Peralta-Arrieta^{1*}
 Berenice Illades-Aguiar¹
 Daniel Hernández-Sotelo¹

¹Universidad Autónoma de Guerrero. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas. Laboratorio de Biomedicina Molecular Av. Lázaro Cárdenas s/n. C.U. Zona Sur. C. P. 39070. Chilpancingo, Guerrero, México. Tel: + (52) 7471-066-864.

*Autor de correspondencia
 peralta_ireland@yahoo.com.mx

Resumen

La metilación anormal de promotores de genes supresores de tumor y reparadores de DNA es un proceso epigenético que lleva a su silenciamiento transcripcional y es además un evento común observado en cáncer. DNMT3B es una DNA metiltransferasa que se encuentra sobre-expresado en varios tipos de cáncer y tumores primarios y es responsable de la metilación anormal de genes relacionados con cáncer. A pesar de que se conocen 5 genes como blancos de DNMT3B, los elementos que explican la metilación sitio-específica están actualmente en proceso de ser explicados. En esta investigación se pretende encontrar genes blancos de DNMT3B y analizar qué elementos en su región promotora además de la presencia de islas CpG son elementos importantes para entender la relación DNMT3B/gen metilado. En ese sentido se pretende encontrar, secuencias comunes en promotores metilados y factores de la transcripción que formando complejo con DNMT3B en el promotor del gen blanco. Actualmente en este estudio, se tienen como genes candidatos para el análisis de genes blanco de DNMT3B al gen reparador de DNA, MSH2 y al supresor de tumor, CDKN2A, los cuales participan en procesos biológicos claves en el desarrollo de cáncer como es reparación del DNA, y regulación del ciclo celular y la vía de p53 respectivamente. Además de contar con una isla CpG en su promotor, estos dos genes son regulados por el factor de la transcripción c-myc el cual es un factor que puede interactuar con DNMT3B, formar complejo en su promotor y favorecer la metilación de sus genes blanco.

Palabras clave: DNMT3B, cáncer, metilación

Abstract

Abnormal methylation of promoters of genes suppressors of tumor and repairers of DNA is an epigenetic process that leads to its transcriptional silencing and is also a common event observed in cancer. DNMT3B is a DNA methyltransferase that is over-expressed in several types of cancer and primary tumors and it is responsible for the abnormal methylation of cancer-related genes. Although 5 genes are known as targets of DNMT3B, the elements that explain site-specific methylation are currently in the process of being explained. This research aims to find white genes of DNMT3B and analyze which elements in its promoter region besides the presence of CpG islands are important elements to understand the relationship DNMT3B / methylated gene. In that sense it is intended to find, common sequences in methylated promoters and factors of the transcription that forms complexed with DNMT3B in the promoter of the target gene. Currently in this study, the DNA repair gene, MSH2 and the tumor suppressor, CDKN2A, which participate in key biological processes in the development of cancer such as DNA repair, are candidates for the analysis of DNMT3B target genes and regulation of the cell cycle and p53 pathway respectively. In addition to having a CpG island in its promoter, these two genes are regulated by the c-myc transcription factor which is a factor that can interact with DNMT3B, form a complex in its promoter and favor the methylation of its target genes.

Key words: DNMT3B, cancer, methylation

Como citar el artículo:

Peralta-Arrieta, I., Illades-Aguiar, B. y Hernández-Sotelo, D. (2017). Efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en la actividad transcripcional de genes relacionados con el cáncer. *Tlamati*, 8(1), 11-20.

Introducción

La metilación del DNA es un proceso epigenético importante en la regulación de la expresión de genes (Bird, 2002). La metilación ocurre en las citosinas, en el contexto de dinucleótidos CpG (Bestor, 2000), los cuales se agrupan en regiones llamadas “islas CpG” en los promotores de genes. Una isla CpG se define como una región de más 200 pb con un contenido de G+C del 50% (Gardiner-Garden y Frommer, 1987). Aproximadamente el 70% de los promotores de genes humanos se asocian a una isla CpG, entre los cuales se encuentran genes constitutivos, oncogenes y genes supresores de tumor (Deaton y Bird, 2011). Se ha considerado a las islas CpG como una región reguladora que tienen como característica que no se encuentran metilada en una célula somática normal. Sin embargo, durante el desarrollo de cáncer las islas CpG de genes involucrados en el control del ciclo celular (*Rb*, *p1^{INK4a}*, *BRCA1*, por citar algunos) son metilados anormalmente llevando a su silenciamiento transcripcional y dando origen y progresión a procesos tumorales (Jones y Baylin, 2002).

Las DNA metiltransferasas (DNMTs) son las enzimas responsables del establecimiento y mantenimiento de los patrones de metilación en el genoma. DNMT1 o DNMT de mantenimiento, mantiene los patrones de metilación durante la replicación del DNA (Jurkowska, Jurkowski y Jeltsch, 2011). Las DNMTs *de novo* (DNMT3A y DNMT3B) tienen preferencia por los CpGs no metilados y establecen los patrones nuevos de metilación durante el desarrollo embrionario (Chen, Ueda, Dodge, Wang, y Li, 2003). DNMT3B está sobre-expresada en muchos tipos de cáncer,

y es la principal DNMT que contribuye con el fenotipo oncogénico a través del silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumor y reparadores de DNA por metilación (Esteller, 2007; Linhart, Lin, Yamada, Moran, Steine, Gokhale, Lo, Cantu, Ehrich, He, Meissner, y Jaenisch, 2007). Hasta ahora, se han identificado solo 5 genes blanco de DNMT3B los cuales tienen un papel importante en la progresión de tumores (MTSS1, HOXB13, Igf2, Sfrp2 y MAL) (Linhart et al., 2007; Ghoshal, Motiwala, Claus, Yan, Kutay, Datta, Majumder, et al., 2010; Fan, Chen, Zhang, Quan, Su, Qiu, et al., 2012; Teneng, Tellez, Picchi, Klinge, Yingling, Snider, Liu y Belinsky., 2014). Sin embargo, los factores que regulan la metilación sitio-específica por DNMT3B son poco claros e incompletos. Existen evidencias que señalan que la interacción de DNMTs con factores de la transcripción (Di Croce, Veronica, Raker, Corsaro, Fazi, Faretta y Fuks, 2002; Brenner, Deplus, Didelot, Lorient, Viré, De Smet, Gutierrez., et al., 2005; Hervouet, Vallette y Cartron., 2009, 2010), secuencias comunes en promotores metilados (Handa y Jeltsch, 2005), secuencias que flanquean CpGs (Feltus, Lee, Costello, Plass y Vertino, 2006) y el contenido de CpGs en los promotores de genes (Weber, Hellmann, Stadler, Ramos, Paabo, Rebhan, Schubeler, 2007) puede dirigir la metilación sitio-específica de promotores de genes. En base a lo anterior e identificando que genes relacionados con el desarrollo de cáncer son regulados de forma negativa por DNMT3B (además de los ya reportados), tendremos herramientas que nos ayudarán a entender de forma más clara la relación DNMT3B/gen metilado, ya que conocer el papel de la metilación del DNA es esencial para entender el proceso de la enfermedad, en este caso el cáncer. Además,

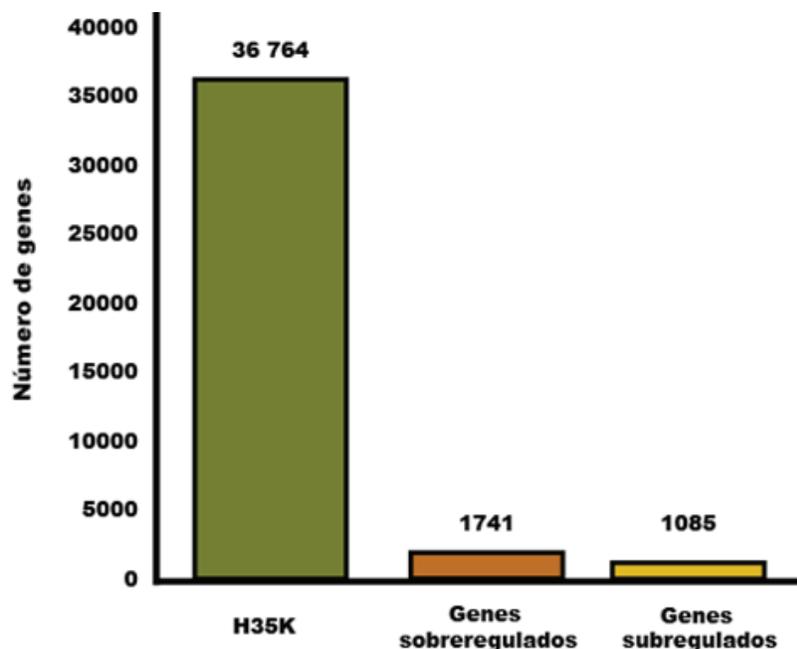


Figura 1. Cambio en la expresión de genes al sobre-expresar a DNMT3B en HaCaT. Se sobre-expresó a DNMT3B en HaCaT para valorar mediante un microarreglo que genes son regulados negativamente por DNMT3B. De los 36764 genes del microarreglo de genoma humano completo H35K, 1741 genes fueron sobreexpresados y 1085 subregulados.

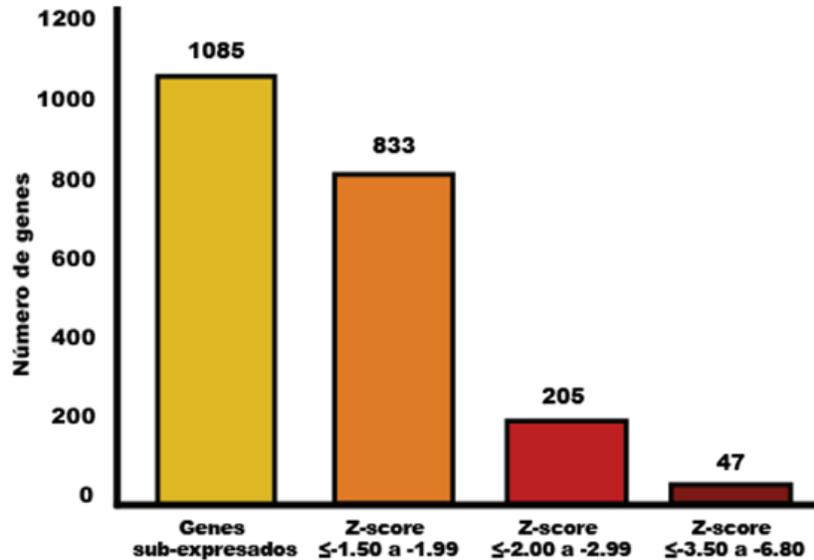


Figura 2. Genes que disminuyeron su expresión al sobre-expresar a DNMT3B en HaCaT. De los 1085 genes subregulados por DNMT3B se hicieron 3 grupos en base al valor del Zscore.

esclarecer este proceso epigenético permitirá la búsqueda de fármacos dirigidos contra DNMT3B, y así inducir la expresión de genes que se encuentren silenciados por metilación de su promotor en un tipo de cáncer.

Material y métodos

Línea celular

Las línea celular humana HaCaT (*Epidermal keratinocyte cell line, human adult low calcium temperature*) se cultivaron con medio DMEM/F12 1:1 (Sigma-Aldrich) suplementados con 10% de suero fetal bovino (FBS, PAA Laboratories GmbH, Austria), 120 U/mL de penicilina

(Penprocilin 800,000 U, Lakeside, México), 150 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Sulfestrep, Pisa Laboratories, México) y 40 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Schering Plough, México) y se incubarán a 37°C con 5% de CO_2 .

Transfecciones

Para los experimentos de transfección alrededor de 665,000 células se sembraron en placas de 60 mm en el medio correspondiente suplementado con 10% FBS. Las células HaCaT fueron transfectadas transitoriamente usando lipofectamina (Lipofectamine 2000 Invitrogen) con 3.5 μg del vector de expresión de DNMT3B (pHMT3B) por 4 horas (el vector pHMT3B fue proporcionado por el Dr.

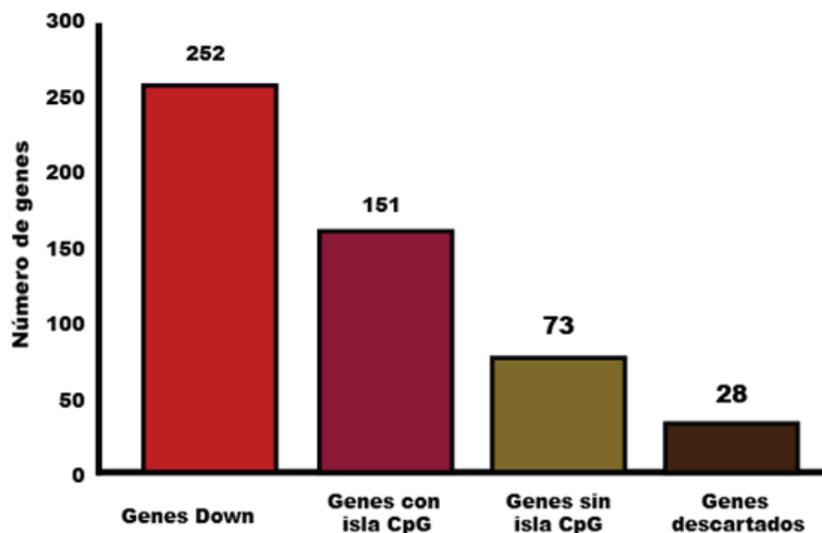


Figura 3. Total de genes con y sin isla CpG en su promotor. De los 252 genes con un Zscore de -2.00 a -6.8 se realizó el análisis *in silico* para la búsqueda de isla CpG en el promoto del gen. De estos, 151 genes presentan isla CpG y 73 genes no presentan isla.

Tabla 1. GO del proceso biológico de los genes con un Zscore de ≤ -2.00 a -6.80 con isla CpG

Nombre GO	Genes de referencia (Homosapiens) (21804)	Genes Zscore ≤ -2.00 a -6.80 (n= 146)	Esperado	Sub/sobre	P Bonferroni
Proceso biológico					
Proceso apoptótico (GO: 0006915)	697	5	4.67	+	1.00E00
Inducción de apoptosis (GO: 0006917)	228	2	1.53	+	1.00E00
Adhesión biológica (GO: 0022610)	890	3	5.96	-	1.00E00
Adhesión celular (GO:0007155)	890	3	5.96	-	1.00E00
Adhesión célula-célula (GO: 0016337)	506	2	3.39	-	1.00E00
Adhesión célula-matriz (GO: 0007160)	115	1	0.77	+	1.00E00
Organization celular o biogénesis (GO: 0071840)	1137	11	7.61	+	1.00E00
Organización de la cromatina (GO: 0006325)	257	3	1.72	+	1.00E00
Proceso celular (GO: 0009987)	5952	48	39.85	+	1.00E00
Comunicación celular (GO:0007154)	3221	26	21.57	+	1.00E00
Señalización célula-célula	835	5	5.59	-	1.00E00
Ciclo celular (GO:0007049)	1399	15	9.37	+	1.00E00
Meiosis (GO: 0007126)	100	1	0.67	+	1.00E00
Mitosis (GO: 0007067)	528	4	3.54	+	1.00E00
Regulación del ciclo celular (GO: 0051726)	13	1	0.09	+	1.00E00
Proliferación celular (GO:0008283)	45	2	0.3	+	1.00E00
Segregación de cromosoma (GO:0007059)	181	2	1.21	+	1.00E00
Procesos del desarrollo (GO: 0032502)	2846	23	19.06	+	1.00E00
Diferenciación celular (GO:0030154)	93	1	0.62	+	1.00E00
Muerte (GO:0016265)	699	5	4.68	+	1.00E00
Muerte celular (GO:0008219)	697	5	4.67	+	1.00E00
Proceso metabólico (GO: 0008152)	8613	68	57.67	+	1.00E00
Recombinación del DNA (GO: 0006310)	87	2	0.58	+	1.00E00
Reparación del DNA (GO: 0006281)	191	2	1.28	+	1.00E00
Replicación del DNA (GO: 0006260)	221	1	1.48	-	1.00E00
No clasificados	9422	52	63.09	-	1.00E00

Daniel Hernández Sotelo (UCQB-UAG)). Las células se cosecharon 48 h postransfección y se realizó la extracción del RNA total mediante el kit de extracción Direct-Zol RNA miniPrep (Zymo Research). La integridad estructural del RNA se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cuantificó (Nanodrop 2000).

Microarreglo

Para el análisis de la expresión de genes, se usó un microarreglo con 36 764 genes del genoma humano (Microarreglos de humano 35 K-Genoma completo). El microarreglo se obtuvo y procesó en la unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM a cargo del Dr. Jorge Ramírez. Para el análisis del microarreglo se obtuvo el RNA total del orden de 30 µg de las células HaCaT que sobre-expresaron DNMT3B y de las células HaCaT no tratadas (control). Las muestras fueron marcadas como C y P, la muestra C se marcó con el fluoróforo Cy3, la P con el fluoróforo Cy5 y se hibridizó el chip H35K. El análisis estadístico de los resultados se hizo tomando como referencia la muestra marcada como C y como condición experimental la muestra marcada como P. El análisis de la expresión de genes fue realizado con el programa estadístico genArise, desarrollado en la Unidad de Informática del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Autónoma Nacional de México [UNAM] para

evaluar el grado de variación en la expresión génica (Z-score). Con ese criterio, los genes con un valor de Zscore mayor o menor a dos desviaciones estándar fueron los que se consideraron expresados diferencialmente.

Análisis *in silico*

Seleccionamos los genes que de acuerdo a los datos del microarreglo fueron subregulados por la sobre-expresión de DNMT3B. De estos genes se realizó un análisis *in silico* para buscar islas CpG en su promotor. Para lo cual se obtuvo la secuencia completa del gen de la base de datos Ensembl Genome Browser (Ensembl, 2015). Posteriormente se identificaron todos los sitios de inicio de la transcripción y se predijo el promotor de cada gen, se consideraron 3000 pb (2000 pb hacia el extremo 5' y 1000 pb al 3') relativo al sitio de inicio de la transcripción usando el programa ExPASy Bioinformatics Resource Portal (Swiss Institute of Informatics [SIB], 2014)). Como primer criterio de la selección de genes para nuestro análisis consideramos aquellos que tuvieran isla CpG en su promotor usando el programa MethPrimer (Plus CpG Island Prediction) (Peking Union Medical College Hospital [PUMCH], 2014), los criterios para considerar una isla CpG fueron una longitud de >200 pb, >50 GC% y una relación esperada/observada de >0.6. Posteriormente se realizó un GENE ONTOLOGY (GO) de todos los genes que tuvieron isla

Tabla 2. GO de la vía de los genes con un Zscore de ≤ -2.00 a -6.80 con isla CpG.

Nombre GO	Genes de referencia (Homosapiens) (21804)	Genes Zscore ≤ -2.00 a -6.80 (n=146)	Esperado	Sub/sobre	P Bonferro-ni
Vía					
Vía de señalización de PDGF	132	5	0.88	+	3.76E-01
Vía feedback loops 2 de p53	47	3	0.31	+	7.16E-01
Vía de p53	81	3	0.53	+	1.00E+00
Vía de señalización de Wnt	297	2	1.99	+	1.00E+00
Vía de señalización de VEGF	58	3	0.39	+	1.00E+00
Vía de Ras	73	2	0.49	+	1.00E+00
Vía de Cinasa PI3	47	2	0.31	+	1.00E+00
Vía de señalización de integrina	175	3	1.17	+	1.00E+00
Vía de señalización de FGF	115	3	0.77	+	1.00E+00
Vía de señalización del endotelio	79	2	0.53	+	1.00E+00
Vía de señalización del receptor EGF	123	2	0.82	+	1.00E+00
Vía de señalización de de caderina	153	2	1.02	+	1.00E+00
Angiogénesis	152	4	1.02	+	1.00E+00
No clasificados	19446	122	130.21	-	1.00E+00

Tabla 3. GO de genes con Zscore \leq -2.00 a -6.80 con isla CpG.

Símbolo del gen (ID)	Z-score	Proceso biológico	Vía
1. TUBA4A (ENSG00000127824)	-6.792568	Segregación cromosómica, ciclo celular, mitosis	
2. RPS6KA3 (ENSG00000177189)	-4.330745	Ciclo celular, comunicación celular	Vía de Ras, Vía de señalización PDGF s
3. PAPLN (ENSG00000100767)	-4.224023	Adhesión célula-célula, adhesión célula-matriz, adhesión celular, comunicación celular	
4. PGRMC1 (ENSG00000101856)	-4.16715	Comunicación celular	
5. ECE1 (ENSG00000117298)	-3.431365	Comunicación celular	Vía de señalización endotelial
6. ERBB3 (ENSG00000065361)	-3.425798	Proliferación celular, adhesión célula-célula, proceso apoptótico, muerte celular, adhesión celular	
7. NSD1 (ENSG00000165671)	-3.358409	Organización de la cromatina	
8. PPM1B (ENSG00000138032)	-3.191615	Comunicación celular	
CDK9 (ENSG00000136807)	-3.128962	Cell cycle, cell communication, mitosis	
9. SLC22A2 (ENSG00000112499)	-3.04728	Comunicación celular, señalización célula-célula	
10. FGF4 (ENSG00000075388)	-2.948159	Ciclo celular, comunicación celular	Vía de FGF
11. DBF4 (ENSG0000016169)	-2.721753	Ciclo celular	
12. ADIPOR1 (ENSG00000159346)	-2.71476	Comunicación celular	
13. GNG3 (ENSG00000162188)	-2.69523	Comunicación celular	Vía de señalización de Wnt
14. CDKN2A (ENSG00000147889)	-2.693064	Ciclo celular	Vía de p53
15. PDE10A (ENSG00000112541)	-2.611827	Comunicación celular	
16. MSH2 (ENSG00000095002)	-2.515924	Regulación del ciclo celular, ciclo celular, reparación DNA, recombinación de DNA, Meiosis	
17. CDH2 (ENSG00000170558)	-2.503473		Vía de señalización de Wnt, vía de señalización de cadherina
18. VEGFC (ENSG00000150630)	-2.387484	Ciclo celular, comunicación celular	
19. CBX8 (ENSG00000141570)	-2.320587	Organización de la cromatina, proceso apoptótico	
20. RCCD1 (ENSG00000166965)	-2.300347	Ciclo celular, mitosis	
21. SPRY2 (ENSG00000136158)	-2.273044	Comunicación celular	Señalización del receptor EGF, señalización de FGF
22. PABPC5 (ENSG00000174740)	-2.261433	Ciclo celular, replicación del DNA	
23. RBL1 (ENSG00000080839)	-2.258828	Ciclo celular	Vía feedback loops 2 p53
24. PIK3R2 (ENSG00000105647)	-2.235933	Comunicación celular	Vía de señalización de integrina, vía de p53, vía feedback loops 2 de p53, señalización de VEGF, vía PI3 cinasa, Angiogénesis, señalización de PDGF
25. BRAFF (ENSG0000015)	-2.217979	Ciclo celular, comunicación celular, inducción de apoptosis	Vía de señalización de integrina, vía de VEGF, vía de Ras, Angiogénesis, vía de PDGF
26. TAC3 (ENSG00000166863)	-2.217151	Comunicación celular	
27. TOM1L1 (ENSG00000141198)	-2.190353	Comunicación celular	
28. PTK2 (ENSG00000169398)	-2.15297	Proliferación celular, diferenciación celular, adhesión celular, comunicación celular, proceso apoptótico, señalización célula-célula	Vía de señalización de integrina, VEGF, y angiogénesis

Tabla 3. GO de genes con Zscore ≤-2.00 a -6.80 con isla CpG (Cont..)

29. ATR (ENSG00000175054)	-2.142932	Ciclo celular, comunicación celular, organización de la cromatina, apoptosis, reparación de DNA, recombinación de DNA, inductor de apoptosis	Vía de p53 y vía feedback loops 2 de p53
30. SH3GL1 (ENSG00000141985)	-2.129474	Comunicación celular y señalización célula-célula	
31. UBE2Z (ENSG00000159202)	-2.121392	Segregación cromosomica, ciclo celular, mitosis	
32. OLFM3 (ENSG00000118733)	-2.112171	Comunicación celular	
33. TTC7A (ENSG00000068724)	-2.100998	Comunicación celular	
34. VAV3 (ENSG00000134215)	-2.095619	Comunicación celular	Vía de señalización de PDGF
35. FGF2 (ENSG00000138685)	-2.028312	Comunicación celular, señalización célula-célula	Vía de señalización de FGF, Angiogenesis
36. MEGF11 (ENSG00000157890)	-2.021867	Comunicación celular	
37. ELK4 (ENSG00000158711)	-2.007778	Ciclo celular, comunicación celular	Vía de señalización de PDGF

CpG, para tener una visión general en que procesos biológicos o vías participan y poder seguir haciendo la discriminación de genes usando el programa PANTHER classification system (Gene Ontology Consortium, 2014). En este caso seleccionamos aquellos genes que tuvieran que ver con procesos o vías que favorecen el desarrollo de cáncer. Finalmente se hizo una búsqueda bibliográfica para valorar si los genes seleccionados tienen relación con su silenciamiento transcripcional por metilación de su promotor o si tienen alguna relación en el desarrollo de cáncer (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2014).

Resultados

Análisis de expresión de genes

Con el fin de buscar genes blancos de DNMT3B, se realizó un ensayo de sobreexpresión de DNMT3B en la

línea celular HaCaT y un análisis de cambio de la expresión de genes a base de un microarreglo. Los posibles genes blanco de DNMT3B se eligieron a base de los siguientes criterios: 1) Genes que disminuyan su expresión según los datos del microarreglo, 2) los genes presentaron una isla CpG en su promotor, 3) según el *gene ontology* los genes están dentro de funciones en procesos biológicos o en vías que tienen que ver con el desarrollo de cáncer, y 4) existe algún antecedente de regulación por metilación o estar involucrados en el desarrollo de algún tipo de cáncer. En base a lo anterior el análisis del microarreglo H35K nos indicó que de los 36 764 genes que tiene, 1741 se encontraron sobrerregulados y 1085 subregulados (véase figura 1). Se realizaron 3 grupos de genes en base a su Zscore: Zscore ≤-1.50 a -1.99, Zscore ≤-2.00 a -2.99 y Zscore ≤-3.03 a -6.80 (véase figura 2). Seleccionamos los genes con un Zscore <-2.00 a -6.80 para el análisis de las islas CpG en su promo-

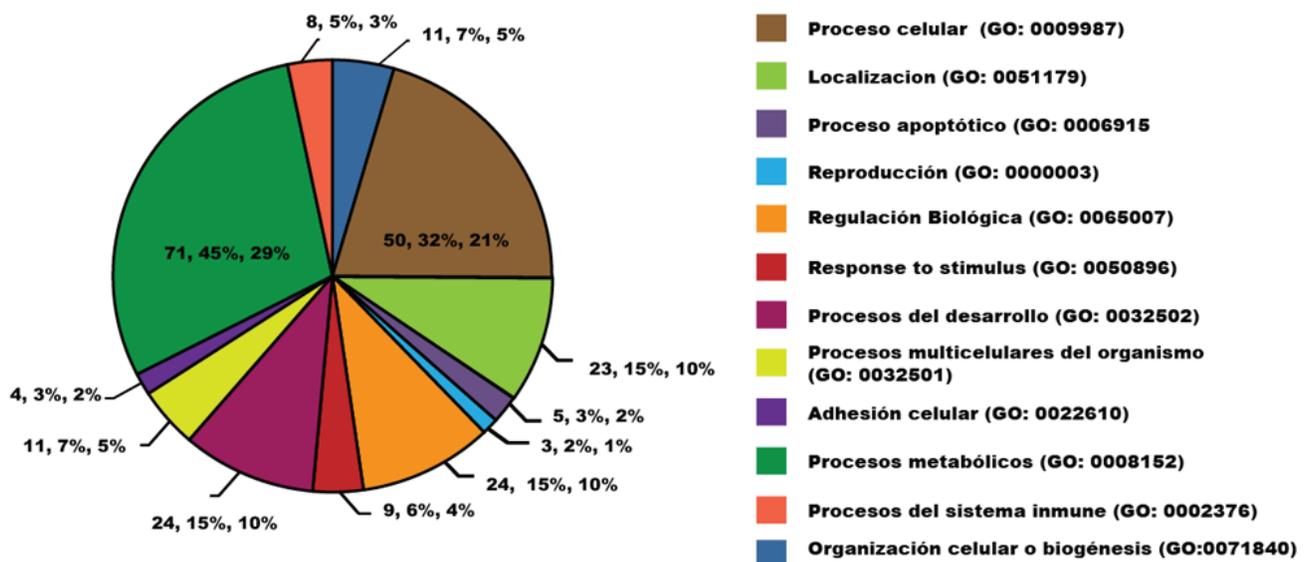


Figura 4. Gene ontology (GO): Distribución en la ontología del Proceso biológico de los genes que disminuyeron su expresión (Zscore -2.00 a -6.80).

Tabla 4. Referencias bibliográficas de análisis de metilación relación con cáncer de genes con Zscore ≤ -2.00 a -6.80 con isla CpG (candidatos a análisis de metilación).

Símbolo del gen (ID)	Z-score	Proceso biológico	Vía	Antecedente con cáncer o metilación	Regulados por c-myc
1. ECE1 (ENSG00000117298)	-3.431365	Comunicación celular	Señalización endotelial	Funke-Kaiser et al. (2003). En la isoforma ECE-1c.	Sin dato
2. NSD1 (ENSG00000165671)	-3.358409	Organización de la cromatina		Berdasco et al. (2009). Human neuroblastoma and glioma cell	Sin dato
3. SLC22A2 (ENSG00000112499)	-3.04728	Comunicación celular, señalización célula, célula		Aoki et al. (2008) is regulated by DNA methylation in Kidney Yang et al. (2012) Renals tumors: the epigenetic suppression of the organic cation transporters in Tsc-associated mouse renal tumours may contribute to the lack of response to metformin treatment.	Sin dato
4. FGF4 (ENSG00000075388)	-2.948159	Ciclo celular, comunicación celular	Vía de señalización de FGF	Hartmann et al. (2009). DNA Methylation Markers Predict Outcome in Node-Positive	Sin dato
5. CDKN2A (ENSG00000147889)	-2.693064	Ciclo celular	Vía de p53	Bilgrami et al. (2014); Guerrero-Preston et al. (2014); Liau et al. (2014); Mishra et al. (2010); Chiaki Banzai. et al. (2013). Mishra et al. (2010), prostate cancer cell lines; Loss et al. (2010) in breast cancer cell line	Si
6. MSH2 (ENSG00000095002)	-2.515924	Regulación del ciclo celular, ciclo celular, reparación y recombinación de DNA, Meiosis		Hinrichesen et al. (2014); Gomes et al. (2014); Ling et al. (2012).	Si
7. CDH2 (ENSG00000170558)	-2.503473		Vía de señalización de Wnt y caderina	Yamashita et al. (2006), methylation -silenced genes in gastric cancer cell lines; Kober et al. (2011) genes hypermethylated in colorectal cancer.	Sin dato
8. VEGFC (ENSG00000150630)	-2.387484	Ciclo celular y comunicación celular		Dai W., et al. (2013), ovarian cancer.	Sin dato
9. CBX8 (ENSG00000141570)	-2.320587	Organización de la cromatina y proceso apoptótico		Geng et al. (2012), in NSCLC.	Sin dato
10. SPRY2 (ENSG00000136158)	-2.273044	Comunicación celular	de señalización del receptor de EGF y FGF	Velasco et al. (2011), methylation in endometrial carcinoma.	Sin dato
11. RBL1 (ENSG00000080839)	-2.258828	Ciclo celular	Vía feedback loops 2 de p53	McKie et al. (2005), methylation in prostate cancer. Mishra DK., et al. 2010 (prostate cancer cell lines)	Sin dato
12. TOM1L1 (ENSG00000141198)	-2.190353	Comunicación celular		Bocklandt et al. (2011). DNA emthylation patterns change with increasing age.	Sin dato
13. VAV3 (ENSG00000134215)	-2.095619	Comunicación celular	Vía de señalización de PDGF	Loss et al. (2010) in breast cancer cell line.	Sin dato
14. FGF2 (ENSG00000138685)	-2.028312	Comunicación celular y comunicación célula-célula	Vía de FGF y Angiogénesis	Sin dato	Sin dato

tor. Con este criterio se tienen 252 genes, de los cuales 151 presentan isla CpG, 73 no presentan isla CpG en su promotor y se descartaron 28 genes debido a que no se encontró la secuencia del gen en la base de datos (véase figura 3). Los genes que presentan isla CpG pueden indicar que la disminución de su expresión se debió probablemente a la metilación del promotor por DNMT3B.

Gene ontology (GO)

Antes de realizar la ontología de los genes con islas CpG, se realizó la ontología de los 252 genes que disminuyeron su expresión utilizando el programa Panther. De manera general se encontró, que los genes se encuentran distribuidos en diferentes procesos biológicos, como es: procesos celulares (50/32%), localización (23/ 15%) , proceso apoptótico (5/3%), reproducción (3/2%), regulación biológica (24/15%), respuesta a estímulos (9/6%), procesos del desarrollo (24/15%), procesos multicelulares (11/7%) , adhesión biológica (4/3%), procesos metabólicos (71/45%), sistema inmune (8/5%) y organización celular (11/7%) (véase figura 4). En cuanto a las vías, los genes se distribuyeron en vías como: la vía de señalización de PDGF, FGF, p53, Ras, Wnt, ésta última por ejemplo tienen un papel importante en los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular (véase figura 5). Cabe mencionar que algunos genes se encontraban en más de un proceso biológico o vía de señalización. Posteriormente valoramos la función biológica y vías de los 151 genes con isla CpG para identificar la categoría ontológica sobre-representada por cada gen (véanse tabla 1 y 2). En base a los datos anteriores, se buscaron que genes eran los que representaban las vías y procesos biológicos mencionados anteriormente (véase tabla 3), de esta manera seleccio-

namos un total de 37 genes, los cuales su valor de Zscore iba de ≤ -2.00 a -6.79 .

Genes candidatos

De los 37 genes seleccionados, se realizó una búsqueda bibliográfica para continuar con la eliminación de los genes, se consideraron dos criterios en este caso, el primero era que ya haya un antecedente de análisis de metilación para los genes o bien que tuvieran alguna relación con el desarrollo y/o progresión de algún tipo de cáncer. En este sentido seleccionamos 14 genes (véase tabla 4). Actualmente se tienen considerados a dos genes como posibles candidatos para los futuros análisis de metilación y como genes blancos de DNMT3B en nuestro análisis, considerados en base al criterio de presentar isla CpG en su promotor, participar en procesos biológicos importantes para el desarrollo de cáncer, y tener antecedentes de ser regulados por metilación de su promotor. Los posibles genes candidatos son: MSH2, un reparador de DNA y CDKN2A, un supresor de tumor. Cabe mencionar que la lista puede aumentar considerando otros criterios. Cabe mencionar también que como en el estudio se pretende buscar interacción de DNMT3B con factores de la transcripción que regulen los genes candidatos, existe la evidencia de que MSH2 y CDKN2A son regulados por el factor de la transcripción c-myc, actualmente se sabe que este factor de la transcripción es capaz de formar complejo con DNMT3B en la región promotora de sus genes blanco favoreciendo la metilación del gen y por tanto su silenciamiento transcripcional. En este sentido, este criterio hace de estos genes sean seleccionados para futuros análisis, además de que su silenciamiento transcripcional por metilación de su promotor es alta en diversos tipos de cánceres.

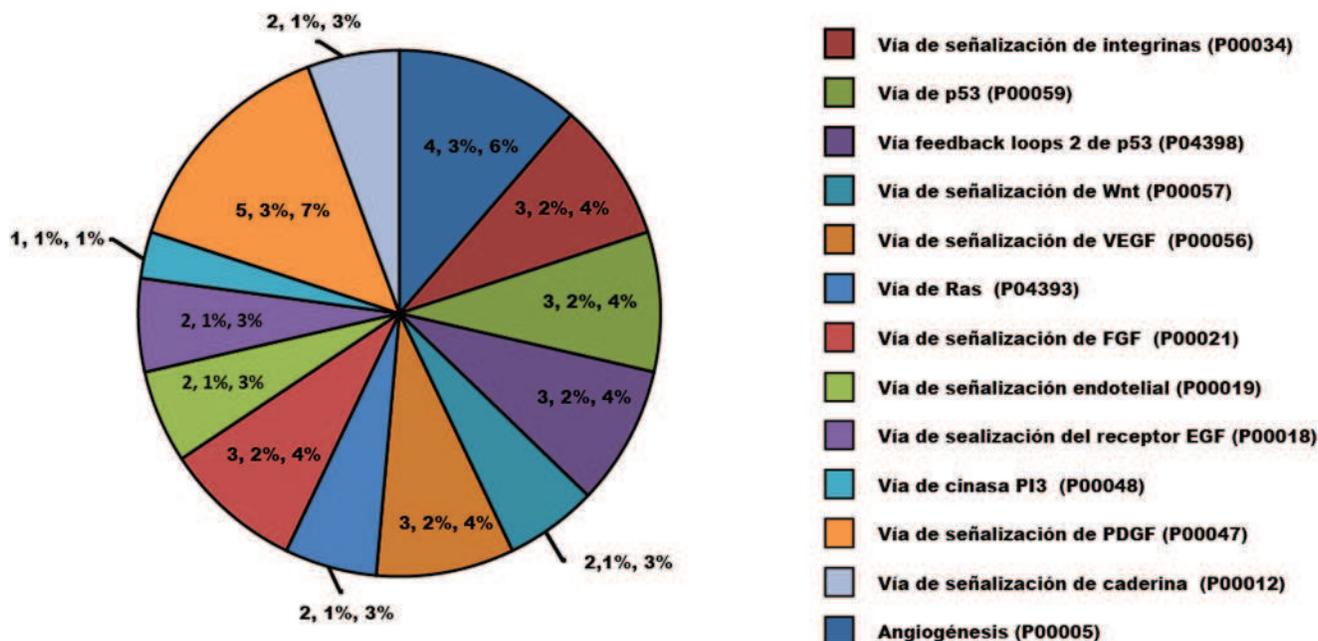


Figura 5. Gene ontology (GO). Distribución en la ontología de vía de los genes que disminuyeron su expresión (Zscore - 2.00 a -6.80).

Discusión y conclusión

La selección de los genes que son metilados en cáncer es un proceso complejo. En la actualidad conocemos que el número de CpGs presentes en un promotor, la presencia de secuencias específicas y los factores de la transcripción presentes en dicho promotor son los elementos que nos ayudan a entender que genes son metilados. El conocer a mayor profundidad los elementos que regulan la metilación anormal puede generar oportunidades terapéuticas para algunos tipos de cáncer humano y para entender mejor el papel de la metilación del DNA en distintos procesos biológicos. El gen reparador de DNA (MSH2) y a un supresor de tumor (CDKN2A) parecen ser posibles genes blanco de DNMT3B para la búsqueda y análisis de los elementos mencionados anteriormente y esclarecer si todos estos elementos en conjunto pueden explicar el hecho de que DNMT3B seleccione sus genes blancos llevando a la metilación sitio específico.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Jorge Ramírez, Lorena Chávez, José Luis Santillán y Simón Guzmán por el procesamiento y análisis estadístico del microarreglo, encargado de la unidad de Microarreglos del departamento de Fisiología Celular de la UN

Referencias

- Bestor, T.H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, 9, 2395-2402.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16, 6-21.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Viré, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T. P., Pelicci, G., Amati, B., Kouzarides, T. de Launoit, Y., Croce, L.D., Fuks, F. (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *European Molecular Biology Organization*, 24, 336-346.
- Chen, T., Ueda, Y., Dodge, J.E., Wang, Z. y Li, E. (2003). Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 5594-5605.
- Deaton, A.M. y Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25, 1010-1022.
- Di Croce, L., Raker, V. A., Corsaro, M., Fazi, M. F., Faretta, M., Fuks, F., Lo Coco, F., Kouzarides, T., Nervi, C., Minucci, S., Pelicci, P.G., (2002). Methyltransferase Recruitment and DNA Hypermethylation of Target Promoters by an Oncogenic Transcription Factor. *SCIENCE*, 295, 1079-1082.
- Ensemblr (Febrero, 20, 2015). *Ensemblr Genome Browser*. Obtenido de <http://www.ensembl.org/index.html>
- Esteller, M. (2007). Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylation. *Human Molecular Genetics*, 16(1E), 50-59.
- Fan, H., Chen, L., Zhang, F., Quan, Y., Su, X., Qiu, X., Zhao, Z., Kong, K. L., Dong, S., Song, Y., Chan, T. H., Guan, X. Y. (2012). MTSS1, a novel target of DNA methyltransferase 3B, functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 31, 2298-2308.
- Feltus, F. A., Lee, E. K., Costello, J. F., Plass, C. y Vertino, P. M. (2006). DNA motifs associated with aberrant CpG island methylation. *GENOMICS*, 87, 572-579.
- Gardiner-Garden, M. y Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology*, 196, 261-282.
- Gene Ontology Consortium (2014) *Panther classification system*. Obtenido de <http://www.pantherdb.org/>
- Ghoshal, K., Motiwala, T., Claus, R., Yan, P., Kutay, H., Datta, J., Majumder, S., Bai, S., Majumder, A., Huang, T., Plass, C. y Jacob, S.T. (2010). HOXB13, a target of DNMT3B, is methylated at an upstream CpG island, and functions as a tumor suppressor in primary colorectal tumors. *PLoS One*, 5, e10338.
- Handa, V., Jeltsch, A. (2005). Profound flanking sequence preference of Dnmt3a and Dnmt3b mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome. *Journal of Molecular Biology*, 348, 1103-1112.
- Hervouet, E., Vallette, F. M. y Cartron, P. F. (2009). Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics*, 4, 487-499.
- Hervouet, E., Vallette, F. M. y Cartron, P. F. (2010). Dnmt1/Transcription factor interactions: an alternative mechanism of DNA methylation inheritance. *Genes Cancer*, 1, 434-443.
- Jones, P. A. y Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 3, 415-428.
- Jurkowska, R. Z., Jurkowski, T. P. y Jeltsch, A. (2011). Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembio chem*, 12, 206-222.
- Linhart, H. G., Lin, H., Yamada, Y., Moran, E., Steine, E. J., Gokhale, S., Lo, G., Cantu, E., Ehrlich, M., He, T., Meissner, A. y Jaenisch, R. (2007). Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. *Genes & Development*, 21, 3110-3122.
- Swiss Institute of Informatics (2014). *ExpASY Bioinformatics Resource Portal*. Obtenido de <http://expasy.org/proteomics>
- Peking Union Medical College Hospital (2014). *Plus CpG Island Prediction*. Obtenido de <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>
- National Center for Biotechnology Information (2014) *PubMed*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- Teneng, I., Tellez, C. S., Picchi, M. A., Klinge, D. M., Yingling, C. M., Snider, A. M., Liu, Y., Belinsky, S. A. (2014). Global identification of genes targeted by DNMT3b for epigenetic silencing in lung cancer. *Oncogene*, 34(5), 621-30
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M., Schubeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, 39, 457-466.