

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

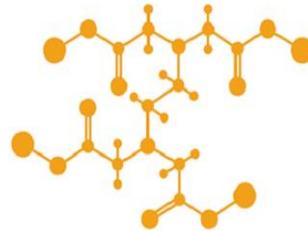


**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
LABORATORIO DE EPIGENÉTICA DEL CÁNCER**



**“EFECTO DE DNMT3B EN LA EXPRESIÓN DE GENES
RELACIONADOS CON DIFERENCIACIÓN CELULAR,
REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS Y ADHESIÓN
CELULAR EN CÉLULAS HaCaT”**

T E S I S



**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

Q. B. P. Samy Yaniri Sierra Juárez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Chilpancingo de los Bravo, Gro. Diciembre del 2017

**“EFECTO DE DNMT3B EN LA EXPRESIÓN DE GENES
RELACIONADOS CON DIFERENCIACIÓN CELULAR,
REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS Y ADHESIÓN
CELULAR EN CÉLULAS HaCaT”**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 26 días del mes de junio de dos mil diecisiete se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto de DNMT3B en la expresión de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y adhesión celular en células HaCaT", presentada por la alumna Samy Yaniri Sierra Juárez, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

 Dr. Daniel Hernández Sotelo
 Dirección de tesis

 Dr. Napoleón Navarro Tito

 Dra. Berenice Illades Aguiar

 Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

 Dr. Rodrigo Balam Muñoz Soto

Vo. Bo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UAGro
 Dra. Isela Parra Rojas
 Coordinación de
 Posgrado de la Facultad de
 Ciencias Químico Biológicas
Coordinación 2014-2018

Vo. Bo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
 Dra. Amalia Vences Velázquez
 Dirección de la Facultad de Ciencias Químico
 Biológicas
DIRECCIÓN 2014 - 2018

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Epigenética del Cáncer en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo de los Bravo, Guerrero. Bajo la asesoría de:

DIRECTOR DE TESIS

DR. DANIEL HERNÁNDEZ SOTELO

COMITÉ TUTORAL

DRA. BERENICE ILLADES AGUIAR

DR. NAPOLEON NAVARRO TITO

DR. EDUARDO CASTAÑEDA SAUCEDO

ASESOR EXTERNO

DR. RODRIGO BALAM MUÑOZ SOTO

Tecnológico de Monterrey | ITESM. Campus Ciudad de México.

Durante el periodo en el que la C. Samy Yaniri Sierra Juárez cursó la maestría en Ciencias Biomédicas, recibió la beca CONACYT número 704998. El proyecto se desarrolló con apoyo financiero otorgado al Dr. Daniel Hernández Sotelo mediante el Programa de Ciencia Básica 2014 (242812).

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer de manera especial y sincera al **Dr. Daniel Hernández Sotelo** por su apoyo y confianza durante todo el proceso de este proyecto, su capacidad para guiar mis ideas ha sido invaluable, no solamente en el desarrollo de la tesis, sino también en mi formación como maestra en ciencias y como persona. Las ideas propuestas, siempre enmarcadas con su orientación y rigurosidad, fueron la clave del buen trabajo realizado juntos. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo los experimentos propuestos durante el desarrollo del presente trabajo.

Le agradezco al **M.C. Eric Genaro Salmeron Barcenas** por haberme instruido en varias técnicas para llevar a cabo los experimentos, por su tiempo, paciencia y consejos de ciencia y de vida. Gracias infinitas.

Le agradezco a mis sinodales, **Dr. Napoleón Navarro Tito, Dr. Eduardo Castañeda Saucedo, Dra. Berenice Illades Aguiar y Dr. Rodrigo Balam Muñoz Soto**, por tomarse el tiempo en realizar las observaciones que consideraban convenientes y sus aportaciones a esta investigación.

DEDICATORIAS

A mis padres Gabino y Juanita que con sus consejos, dedicación y esfuerzo han sabido guiarme en el ámbito profesional, y sobre todo por su paciencia y apoyo incondicional en los momentos difíciles.

A mis hermanos Silver y Ada que me tuvieron paciencia en los momentos de estrés, con su forma de ser tan particular de cada uno aportaron momentos inolvidables que hicieron más ameno este proceso de cambios constantes. Espero ser un buen ejemplo para ustedes.

A mi tío Jesús Alberto por su apoyo incondicional y guía en los momentos que lo necesitaba.

A mis compañeros del laboratorio (Yu, Sherlyn, Nestor, Ime, Sara y Cítla), por crear vínculos, cada viernes en el laboratorio, en cada viaje y experimento realizado, que serán inolvidables. Espero continúe esta amistad.

A mis compañeros y amigos de la maestría (X-men), por su compañía, apoyo y buenos momentos.

A Oscar y Viki por su amistad incondicional, apoyo, comprensión, aventuras incontables y paciencia... mucha paciencia. Están en mi gélido corazón.

Contenido

I. RESUMEN.....	- 8 -
II. INTRODUCCIÓN	- 8 -
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	- 11 -
IV. JUSTIFICACIÓN	- 12 -
V. HIPÓTESIS	- 13 -
VI. OBJETIVOS	- 14 -
Objetivo general	- 14 -
Objetivos específicos	- 14 -
VII. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	- 15 -
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	- 16 -
IX. RESULTADOS.....	- 18 -
X. DISCUSIÓN	- 26 -
XI. CONCLUSIÓN	- 28 -
XII. ANEXOS.....	- 29 -
Anexos 1	- 29 -
Anexo 2.....	- 30 -
Anexo 3.....	- 31 -

Anexo 4.....	- 32 -
Anexo 5.....	- 33 -
Anexo 6.....	- 34 -
XIII. REFERENCIAS.....	- 35 -

I. Resumen

La metilación anormal es una de las alteraciones epigenéticas más importantes en el cáncer humano. DNMT3B, metiltransferasa *de novo*, está claramente implicada en la metilación anormal de genes relacionados con el mantenimiento de las funciones normales de las células y su sobreexpresión contribuye a procesos oncogénicos y tumorigénesis *in vivo*. El objetivo de este estudio fue valorar el efecto de la sobreexpresión de DNMT3B en los niveles de ARNm de genes relacionados con diferenciación celular (TCF2, SPRY2, PPL y PAXIP1), regulación de la apoptosis (IRF1, DNMT1L, PSMA7 y SPTAN1) y comunicación celular (CDH2, TOM1L1, PRKAB1 y BRAF) en células HaCaT. Encontramos que tras la sobreexpresión de DNMT3B, disminuye significativamente la expresión de 8 (IRF1, PSMA7, SPTAN1, TCF2, PPL, PAXIP1, CDH2 y BRAF) de los 12 genes seleccionados, además estos tienen interacciones con proteínas encargadas de modular funciones como apoptosis, diferenciación, comunicación, entre otros procesos celulares importantes para el mantenimiento de las funciones normales de la célula. Estos resultados destacan la importancia de DNMT3B en la expresión génica y el cáncer humano.

II. Introducción

El destino y fenotipo celular están determinados por mecanismos epigenéticos que son heredables a través de la división celular. Las marcas epigenéticas incluyen la metilación del ADN, las modificaciones covalentes de las histonas (acetilación, fosforilación, metilación y otras), la incorporación de variantes de histonas y RNAs no codificantes. Todos estos procesos tienen función sinérgica para modular la estructura de la cromatina y por lo tanto, determinar la actividad transcripcional de los genes (Jurkowska et al. 2011). El grupo metilo se adiciona covalentemente en el carbono 5 de citosinas adyacentes a guanina (CpG) principalmente en eucariotas superiores. Los grupos metilo están posicionados en el surco mayor del ADN, donde no interfieren con el apareamiento de las bases (Baylin & Herman 2000; Hermann et al. 2004; Jurkowska et al. 2011).

La metilación se realiza preferentemente en regiones con alta densidad de CpGs, a estas zonas se les denomina islas CpG y alrededor del 50% de los genes humanos tienen islas CpG en sus promotores (Bestor 2000; Siedlecki & Zielenkiewicz 2006; Baylin & Herman 2000). La metilación del ADN tiene diversas funciones como: control de la expresión génica, regulación de la impronta del genoma, inactivación del cromosoma X, defensa del genoma contra activación de retrovirus endógenos y transposones y participación en el desarrollo del sistema inmunológico (Ryazanova et al. 2012; Meng et al. 2011). Las alteraciones en los patrones de metilación global están asociados con letalidad para los mamíferos, incluso la desmetilación focal o hipermetilación causan anomalías, como represión transcripcional, formación de estructuras compactas de la cromatina, inactivación del cromosoma X, control del imprinting, psicosis, enfermedades del sistema inmunológico y diferentes tipos de cáncer humano (Robertson et al. 1999; Ryazanova et al. 2012).

En tejidos tumorales los promotores de genes supresores de tumor frecuentemente son afectados por hipermetilación e hipometilación del genoma (Peter & Baylin 2007, Lahtz & Pfeifer 2011). La metilación de citosinas es catalizada por DNA metiltransferasas (DNMTs). En eucariotes hay tres familias DNMT 1, 2 y 3. En los mamíferos los patrones de metilación del ADN se establecen y mantienen por cinco metiltransferasas: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L. DNMT1 se encarga del mantenimiento de los patrones de metilación mientras que DNMT3A y DNMT3B de la metilación *de novo*. DNMT2 metila RNA de transferencia y DNMT3L regula la función de DNMT1, DNMT3A y DNMT3B (Siedlecki & Zielenkiewicz 2006; Esteller 2007; Denis et al. 2011).

El nivel de expresión de DNMT3B es elevado en varias líneas de células tumorales y en numerosos tipos de cáncer humano, como por ejemplo: cáncer de mama, pulmón, leucemias, carcinoma hepatocelular y tumor colorrectal. Lo que podría indicar un papel importante en el desarrollo del cáncer (Ghoshal et al. 2010; Fan et al. 2012; Ben et al. 2013; Teneng et al. 2014). A pesar de que hay evidencia suficiente del papel de DNMT3B en la metilación anormal en cáncer, existen pocos genes blanco identificados para DNMT3B. Entre los genes confirmados como blancos están: MTSS1, HOXB13,

“Efecto de DNMT3B en la expresión de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT”

CAVEOLIN1, TBX18 y DCC (genes supresores de tumor) en cáncer de colon, pulmón y hepatocelular (Ghoshal, Motiwala et al. 2010; Fan, Chen et al. 2012). Por otro lado, nuestro grupo de trabajo reporto que la sobre-expresión de DNMT3B en células HaCaT disminuyo la expresión de 151 genes con isla CpG relacionados a cáncer (Peralta-arrieta et al. 2017).

Partiendo de estos datos en este trabajo evaluamos el efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en el nivel de ARNm de 12 genes relacionados a cáncer, particularmente relacionados con apoptosis (DNM1L, SPTAN1, IRF1 y PSMA7) diferenciación celular (PAXIP1, PPL, TCF2 y SPRY2) y comunicación celular (Tom1L-1, PRKAB1, BRAF y CDH2).

“Efecto de DNMT3B en la expresión de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT”

III. Planteamiento del problema

¿La sobreexpresión de DNMT3B afectará el nivel de ARNm de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT?

IV. Justificación

La metilación es un mecanismo epigenético implicado en el silenciamiento génico. Los promotores de los genes son parte importante de la expresión de su proteína, y es la región en donde la metilación podría tener más efecto en su expresión. La hipometilación o la hipermetilación de los promotores pueden modificar la expresión génica. Por otro lado, se ha observado que el grado de metilación de promotores de algunos genes tiene relación con la progresión del cáncer. Las DNA metiltransferasas (DNMTs) y particularmente DNMT3B se han relacionado en la metilación anormal del ADN y con el desarrollo de cáncer.

En cáncer humano es común la sobre-expresión de DNMT3B, lo que trae como consecuencia la metilación anormal y en algunos casos el silenciamiento de genes, particularmente genes supresores de tumor, reparadores de ADN y reguladores negativos del ciclo celular. A pesar de lo anterior, no existen evidencias claras de cuáles y cuantos genes modifican su expresión debido a los cambios en el nivel de expresión de DNMT3B. Por lo que en este trabajo analizamos el efecto que tiene la sobre-expresión de DNMT3B en el nivel de ARNm de genes que participan en varios procesos celulares, algunos de los cuales tienen relevancia en el desarrollo del cáncer.

“Efecto de DNMT3B en la expresión de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT”

V. Hipótesis

La sobreexpresión de DNMT3B disminuye el nivel de ARNm de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular.

VI. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de DNMT3B en la expresión de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT.

Objetivos específicos

1. Aumentar el nivel de expresión de DNMT3B en células HaCaT.
2. Valorar el efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en los niveles de ARNm de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT.
3. Analizar, *in silico*, el posible efecto funcional de los cambios en el nivel de ARNm de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular inducidos por la sobre-expresión de DNMT3B.

VII. Diseño de la investigación

Estudio Experimental

Modelos experimentales

a) Criterios de selección de los sistemas de estudio: línea celular HaCaT: no tumoral, de queratinocitos inmortalizados, permite la sobre-expresión de DNMT3B evento común en cáncer humano y es fácil de transfectar.

b) Características del grupo control y grupo experimental. Grupo control: línea celular HaCaT transfectada con el vector de expresión pcDNA3.1. Grupo experimental: línea celular HaCaT transfectada con el vector de expresión pHMT3B, que nos permitirá aumentar el nivel de expresión de DNMT3B.

c) Número de comparaciones entre los grupos de estudio (repeticiones del experimento): 3 experimentos independientes por triplicado.

d) Variables:

- De respuesta: Nivel de ARNm de los genes a evaluar.
- De exposición: Sobre-expresión de DNMT3B.
- Modificadora de efecto: Numero de pase de la línea celular y variación en la eficiencia de transfección.

e) Consideraciones éticas y de bioseguridad.

El manejo y la eliminación de residuos peligrosos biológicos infecciosos se realizará de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

La línea celular humana de queratinocitos inmortalizados, HaCaT, se cultivó con medio DMEM/F12 (CAISSON Laboratories) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, PAA Laboratories GmbH, Austria) y 120 U/mL de penicilina (penprocilin 800,000 U, Lakeside, México), 150 µg/mL de estreptomina (Sulfestrep, Pisa Laboratories, México) a 37°C y 5% de CO₂.

Transfecciones

Se sembraron alrededor de 665,000 células HaCaT por pozo en placas de 6 pozos con 3 mL de medio. Para sobre-expresar a DNMT3B las células se transfectaron con 2 µg del vector de expresión pHMT3B o con pcDNA3.1 usando lipofectamina (Lipofectamine 2000 Invitrogen). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se cosecharon y procesaron para la extracción de ARN total.

RT-qPCR

La extracción de ARN total se realizó con Trizol (Invitrogen, California EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 5). El nivel de ARNm de DNMT3B (sobre-expresión) y del nivel de ARNm de los genes blanco candidatos de DNMT3B se realizó por RT-qPCR, usando el kit KAPATMSYBR[®] FAST One-Step RT-qPCR (KapaBiosystems) con 50 ng de ARN total y con iniciadores específicos mostrados en la Tabla 1. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: para retrotranscripción 37°C 30s, 42°C 5 min, 95°C 5 min, para PCR 95°C 20s, temperatura de alineamiento Tabla 1 30s, 72°C 30s por 40 ciclos. Las amplificaciones se realizaron en el equipo RT-qPCR Quant Studio3, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific. El gen GAPDH fue usado para la normalización del nivel de expresión de los genes

“Efecto de DNMT3B en la expresión de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT”

analizados. Los niveles de expresión se determinaron por el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabla 1. Iniciadores para RT-qPCR.

Gen	Sentido	Antisentido	Temperatura
SPRY2	TTGCTCGGAAGTTGGTCTAA	TCAGGTCTTGGAAGTGTGGT	60 °C
CDH2	GTAGAGGCTTCTGGTAAAAT	GCTCACTGCTCTCATATTGT	46 °C
IRF	GCATGAGACCCTGGCTAGAGAT	TTCCCTGCTTTGTATCGG	62 °C
TCF2 (HNF1B)	GACGGCGACGACTATGA	CTCACTGAGCATCCGGTCCA	62 °C
DNM1L	GAGTCATGGAGGCGCTAATT	TCCCACTACGACGATTTGAG	54 °C
TOM1L-1	GGCTACATTTGCTGGAGTTC	TTTCACTGCATCTTTTGGCC	54 °C
PPL	CGGAGCATCTCTAACAAGGA	CACGATGTTCTTCTCCACCT	62 °C
BRAF	GAGCATA2ATCCACCATCAAT	CTGTTGTTCTTTTGTGGGA	60 °C
SPTAN1	ACAGGAAAACTTCAGATTGC	CTTCAGCTTCAAATGCTTGA	54 °C
PSMA7	CACCTCTTCCAAGTGGAGTA	ACAACAATGTCTTCTCTCG	54 °C
PRKAB1	GTTTACTTATCTGGGTCCTT	AGGATGGCTACAAAGTTAT	55 °C
PAXIP1 (PTIP)	CTTCTTGGGTGATTCTGTCCGT	AGGCAGGCAGTGATTCCAAA	61 °C

Análisis *in silico* del papel funcional

El análisis del posible efecto biológico que tendrían las alteraciones en el nivel de expresión de los genes afectados por la sobre-expresión de DNMT3B se determinó usando el programa STRING (<https://string-db.org/>).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como los valores de la media +/- el error estándar (E.E). Para evaluar diferencias en el nivel de ARNm se utilizó la prueba de *t* de Student. Los datos obtenidos se analizaron en el programa Sigma Plot 10. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $p \leq 0.05$.

IX. RESULTADOS

Para valorar el efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en el nivel de ARNm de genes relacionados a cáncer se realizaron experimentos de transfección en la línea celular HaCaT. En la Figura 1 mostramos el nivel de ARNm de DNMT3B posterior a la transfección con el vector pHMT3B y con el vector pcDNA3.1 (control). Se observó que el nivel de ARNm de DNMT3B aumentó aproximadamente 150 veces respecto a las células transfectadas con el vector control.

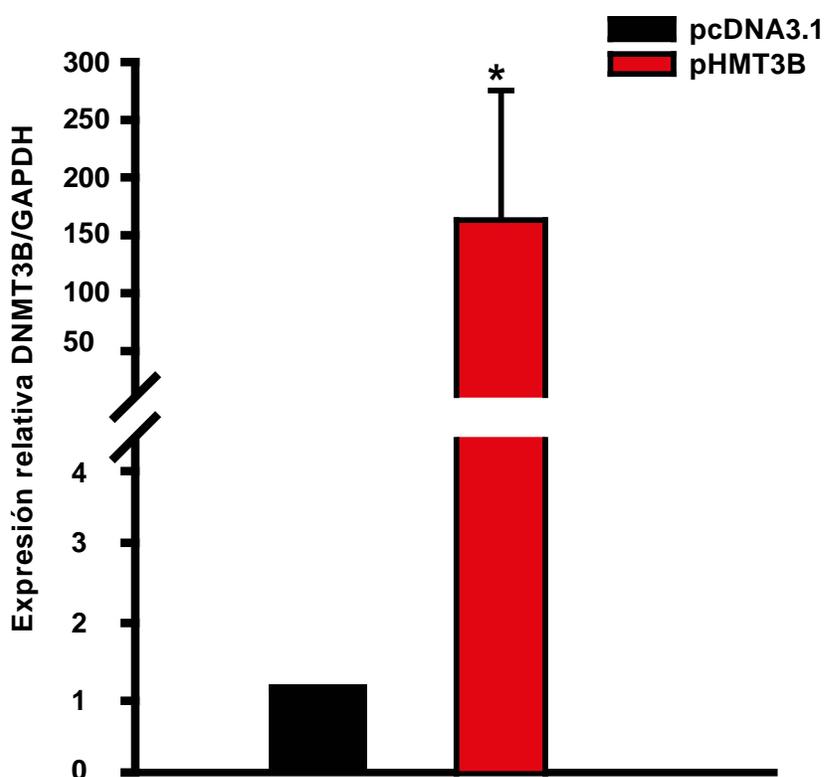


Figura 1. Expresión de ARNm de DNMT3B. Células HaCaT fueron transfectadas con 2 μ g de pcDNA3.1 o pHMT3B y 48 hrs después las células fueron analizadas para la expresión de ARNm. Los datos corresponden a la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. * $p < 0.05$

Una vez que se logró aumentar el nivel de expresión de DNMT3B analizamos su efecto en la expresión de los genes relacionados a cáncer, particularmente genes involucrados en apoptosis, diferenciación celular y comunicación celular.

En la Figura 2 se muestra el efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en el nivel de ARNm de IRF1, DNML1, PSMA7 y SPTAN1 (genes relacionados con apoptosis). Se encontró que la sobre-expresión DNMT3B disminuyó de manera significativa la expresión de IRF1 (40%), PSMA7 (50%) y SPTAN1 (55%), mientras que la expresión de DNML1 aumentó aproximadamente 20%.

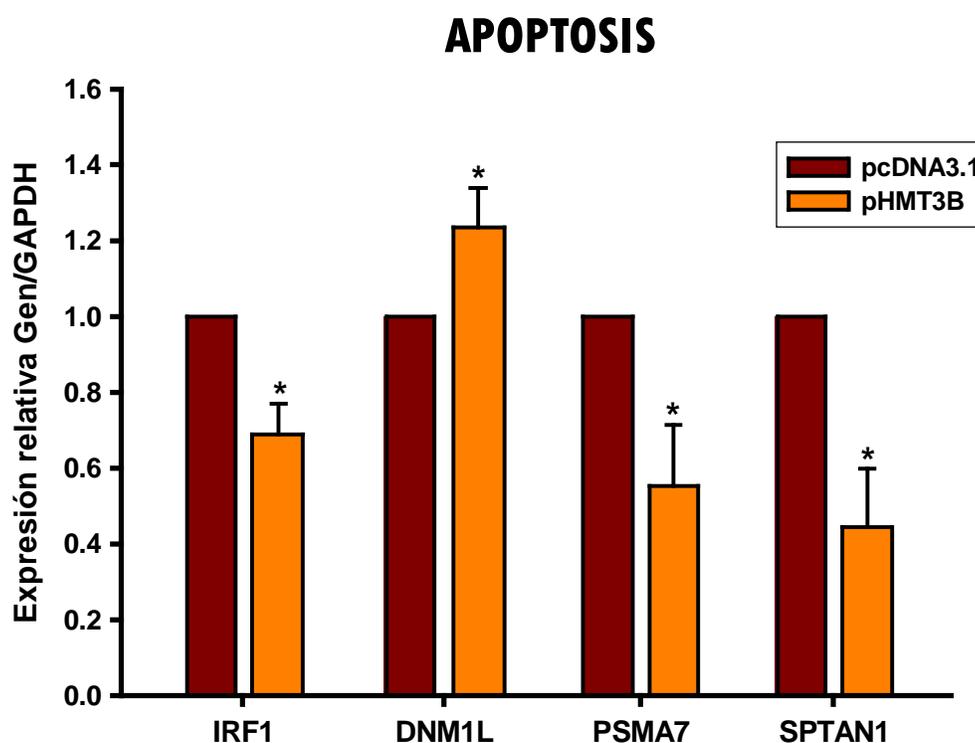


Figura 2. Efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en la expresión de IRF1, DNML1, PSMA7 y SPTAN1 en células HaCaT. Las células fueron transfectadas con 2 µg de pcDNA3.1 o pHMT3B y 48 hrs después las células fueron analizadas para la expresión de ARNm. Los datos corresponden a la media ± error estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. *p<0.05

En la Figura 3 se muestra el efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en el nivel de ARNm de TCF2, SPRY2, PPL y PAXIP1 (genes relacionados con diferenciación

“Efecto de DNMT3B en la expresión de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT”

celular). Se puede observar que la sobre-expresión DNMT3B disminuyó la expresión de TCF2, PPL y PAXIP1 en 60%, 40% y 45%, respectivamente. El cambio en la expresión de SPRY2 no fue significativo.

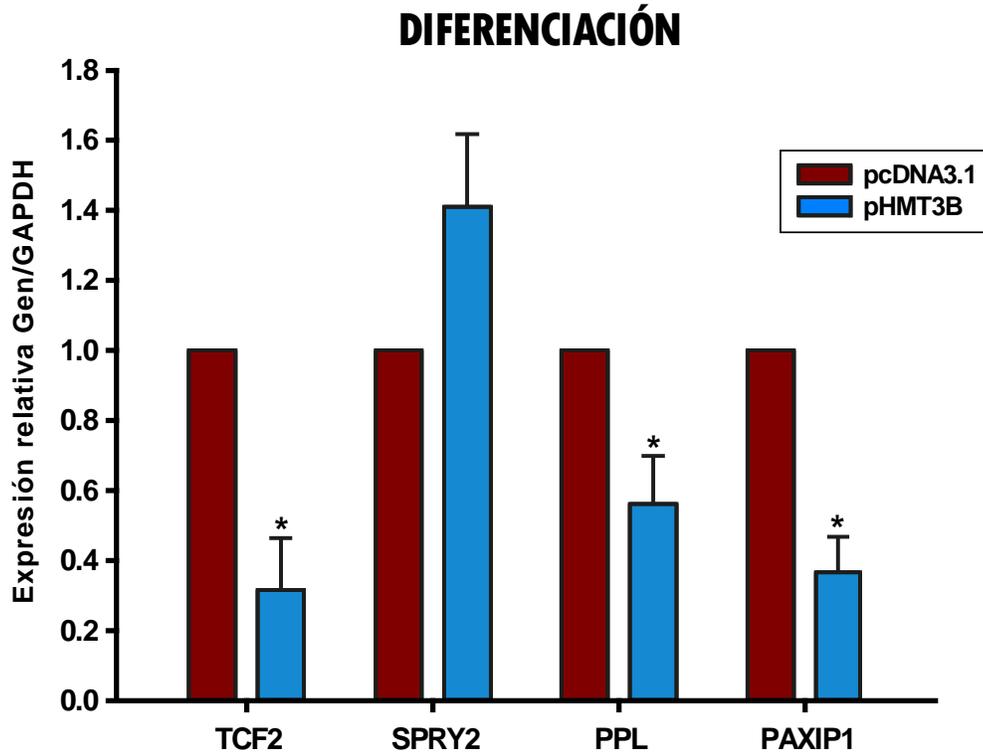


Figura 3. Efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en la expresión de TCF2, SPRY2, PPL y PAXIP1 en células HaCaT. Las células fueron transfectadas con 2 µg de pcDNA3.1 o pHMT3B y 48 hrs después las células fueron analizadas para la expresión de ARNm. Los datos corresponden a la media ± error estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. *p<0.05

En la Figura 4 se muestra el efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en el nivel de ARNm de CDH2, TOM1L-1 PRKAB1 y BRAF (genes relacionados con comunicación celular). Se encontró que la sobre-expresión DNMT3B disminuyó la expresión de CDH2 45% y BRAF 28%, mientras que los cambios en la expresión de TOM1L-1 y PRKAB1 no fueron significativos.

COMUNICACIÓN

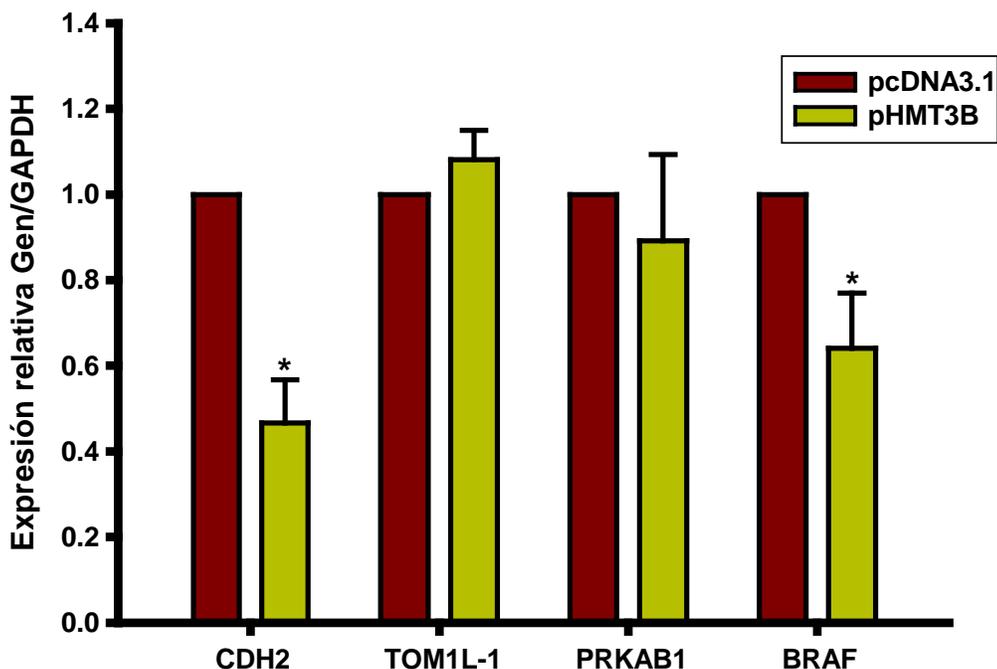
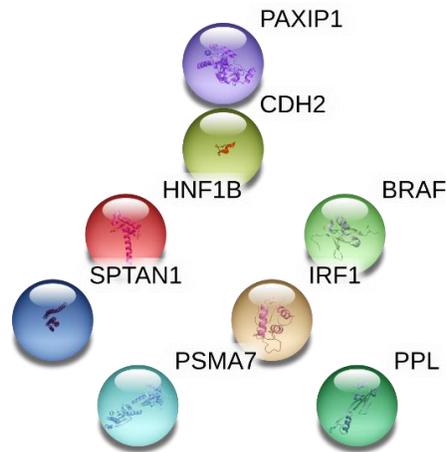


Figura 4. Efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en la expresión de CDH2, TOM1L-1, PRKAB1 y BRAF en células HaCaT. Las células fueron transfectadas con 2 µg de pcDNA3.1 o pHMT3B y 48 hrs después las células fueron analizadas para la expresión de ARNm. Los datos corresponden a la media ± error estándar de 3 experimentos independientes por triplicado. *p<0.05

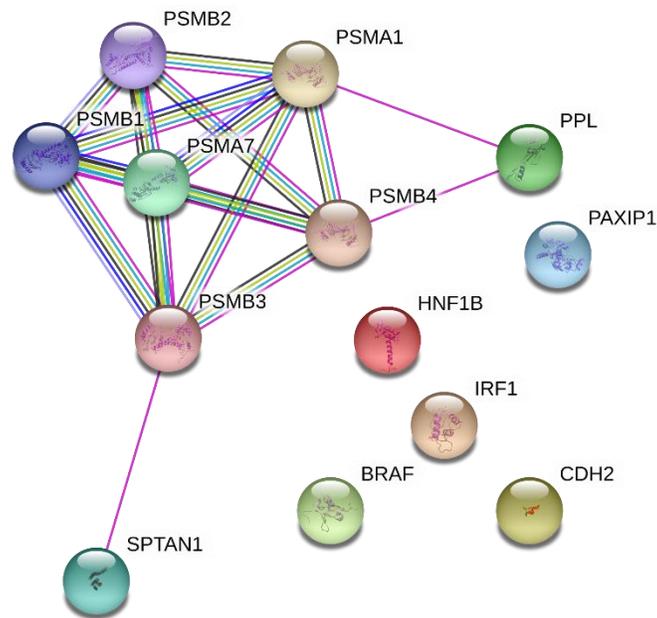
Finalmente, para conocer si los 8 genes que disminuyeron su nivel de RNAm, debido a la sobre-expresión de DNMT3B, están implicados en alguna función biológica en común realizamos varios análisis *in silico*. Primero analizamos las posibles interacciones entre los productos proteicos de los 8 genes, Figura 5. Se encontró que de manera directa no hay interacción alguna Figura 5A. Debido a lo anterior se realizó el análisis en segundo nivel, en el cual se buscan segundas proteínas que puedan funcionar como puentes en una red de interacción proteica, Figura 5B. En este análisis se encontró que tres de los ocho productos proteicos pueden interactuar físicamente a través de miembros de la familia de PSMAB.

“Efecto de DNMT3B en la expresión de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT”

A)



B)



Interacciones conocidas	Interacciones previstas	Otros
De bases de datos curados	Genes cercanos	Extracción de textos
Determinado experimentalmente	Fusiones de genes	Co-expresión
	Co-ocurrencia genética	Homología de proteínas

Figura 5. Predicción de las redes de interacción de proteínas. A) Análisis simple. B) Análisis en segundo nivel. La red de interacción se realizó con todos los genes que disminuyeron su expresión por DNMT3B (IRF1, PSMA7, SPTAN1, TCF2, PPL, PAXIP1, CDH2 y BRAF).

“Efecto de DNMT3B en la expresión de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT”

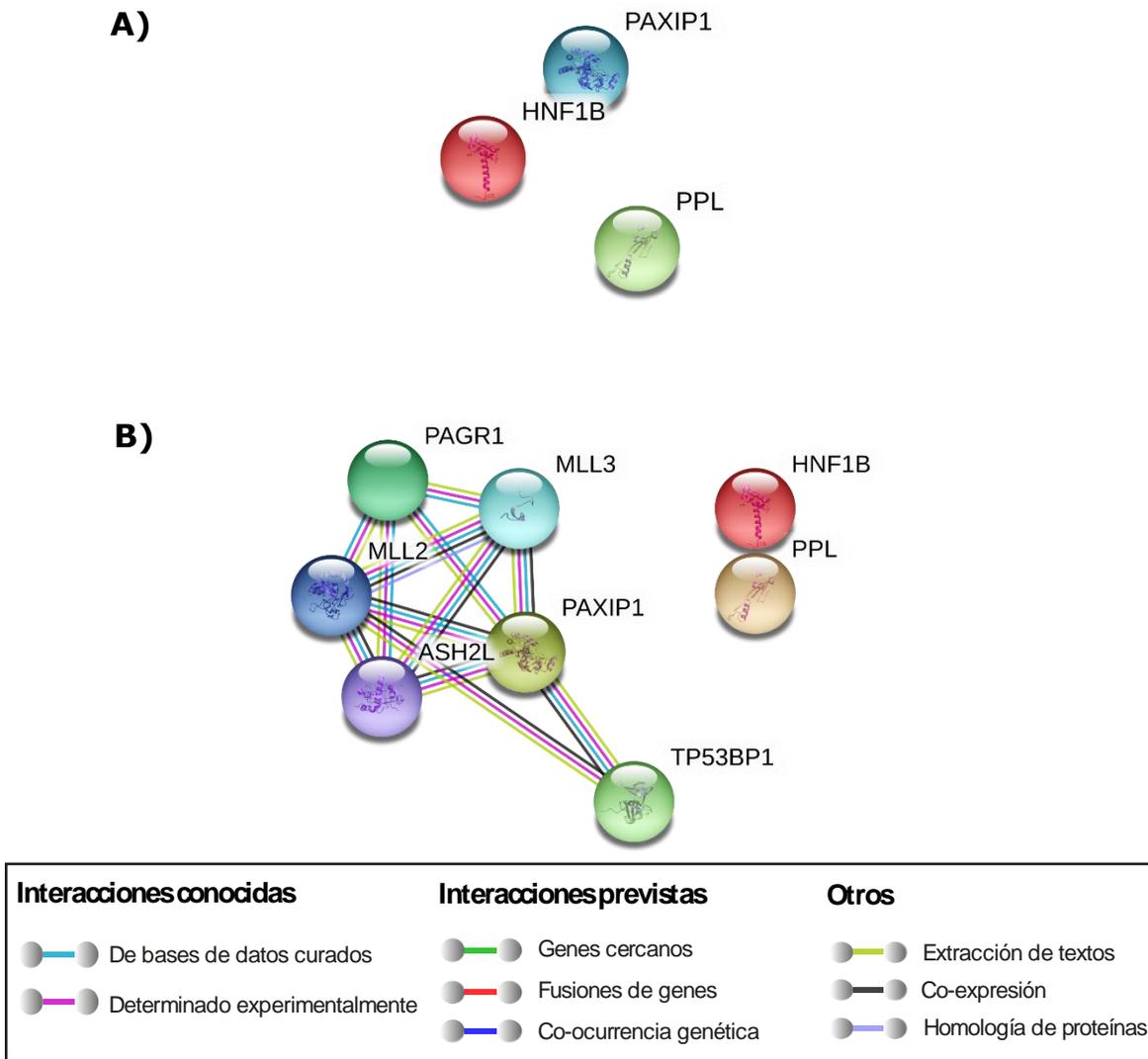
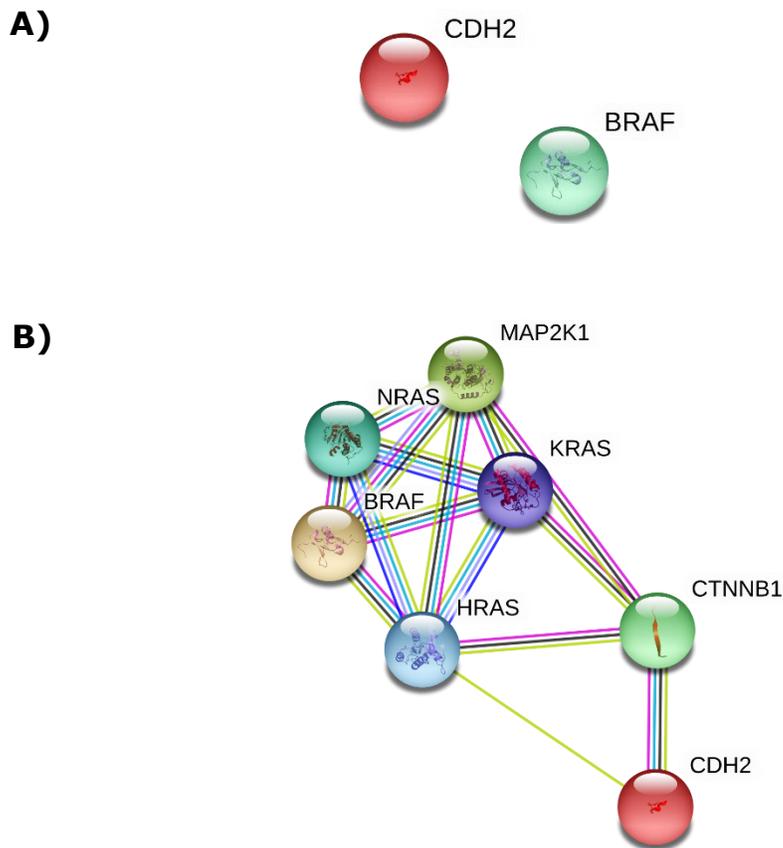


Figura 6. Predicción de las redes de interacción de proteínas. A) Análisis simple. B) Análisis en segundo nivel. La red de interacción se realizó con los genes relacionados con diferenciación y que disminuyeron su expresión por DNMT3B (PPL, PAXIP1, TCF2 o HNF1B).

En la Figura 6 se muestra el análisis de los productos proteicos relacionados con diferenciación. No encontramos interacción directa en el análisis simple entre estas proteínas, Figura 6A. En el análisis en segundo nivel, únicamente PAXIP1 se incluye en una red de interacción de proteínas, algunas de las cuales forman parte de

“Efecto de DNMT3B en la expresión de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT”

complejos remodeladores de la cromatina los cuales a su vez participan en regulación transcripcional, Figura 6B.



Interacciones conocidas	Interacciones previstas	Otros
De bases de datos curados	Genes cercanos	Extracción de textos
Determinado experimentalmente	Fusiones de genes	Co-expresión
	Co-ocurrencia genética	Homología de proteínas

Figura 7. Predicción de las redes de interacción de proteínas. A) Análisis simple. B) Análisis en segundo nivel. La red de interacción se realizó con los genes relacionados con comunicación celular y que disminuyeron su expresión por DNMT3B (CDH2 y BRAF).

En la Figura 7 se muestra el análisis de los productos proteicos relacionados con comunicación celular. No encontramos interacción directa en el análisis simple entre estas proteínas, Figura 7A. En el análisis en segundo nivel, se encontró una red de interacción de proteínas que incluye a CDH2, BRAF y proteínas que forman parte de complejos remodeladores de la cromatina los cuales a su vez participan en regulación transcripcional, Figura 7B

“Efecto de DNMT3B en la expresión de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT”

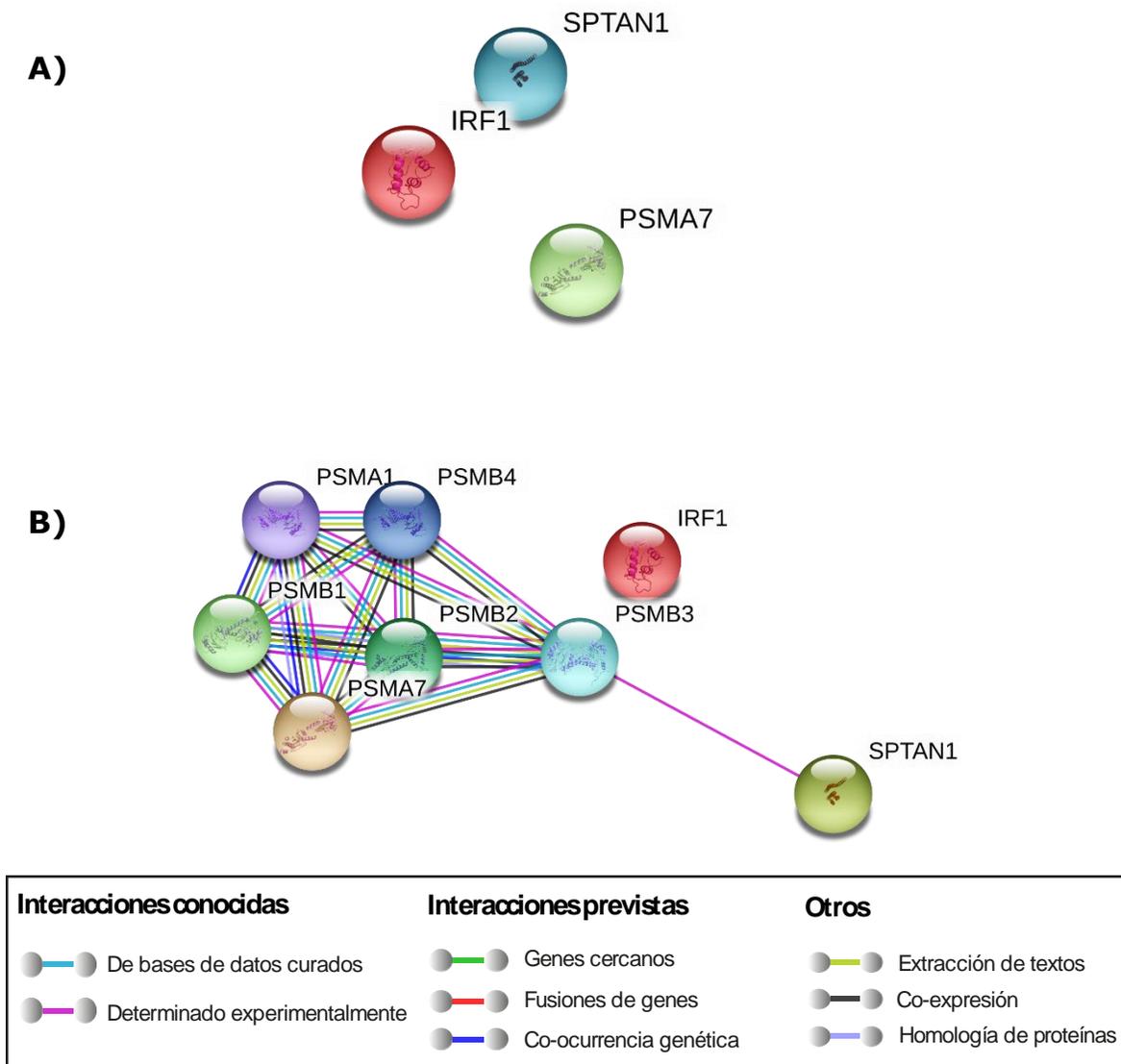


Figura 8. Predicción de las redes de interacción de proteínas. A) Análisis simple. B) Análisis en segundo nivel. La red de interacción se realizó con los genes relacionados con apoptosis celular y que disminuyeron su expresión por DNMT3B (IRF1, PSMA7, SPTAN1).

En la Figura 8 se muestra el análisis de los productos proteicos relacionados con apoptosis. No encontramos interacción directa en el análisis simple entre estas proteínas, Figura 8A. En el análisis en segundo nivel, se encontró una red de interacción de proteínas que incluye a SPTAN1, PSMA7 y varias proteínas que forman parte del proteosoma complejo involucrado en la degradación de proteínas, Figura 8B.

X. DISCUSIÓN

La metilación anormal de genes en cáncer humano es un evento común. Sin duda DNMT3B es la principal enzima involucrada en la metilación anormal en cáncer. En este trabajo se valoró el efecto de la sobre-expresión de DNMT3B en la expresión de genes relacionados a cáncer en la línea celular HaCaT.

Una de las funciones celulares con frecuencia afectadas durante el desarrollo de cáncer es la apoptosis. En este trabajo encontramos que la sobre-expresión de DNMT3B disminuyó la expresión de 3 genes relacionados con apoptosis IRF-1, PSMA7 y SPTAN. IRF-1 es un mediador clave de la muerte celular, el cual participa en la transcripción de PUMA, que a su vez suprime la función de Bcl-2 (proteína antiapoptótica) (Yu et al. 2001; Gao et al. 2010; Yu & Zhang 2008). PSMA7 es componente del proteasoma que interactúa con proteínas implicadas en tumorigénesis para promover su degradación (Liu et al. 2006; Pendergast 2002). Espectrina (SPTAN1) y PKC θ participan en varios eventos tempranos de la apoptosis (Wro et al. 2005; Dubielecka et al. 2010). En la literatura existen evidencias de la disminución o pérdida de la función de estos 3 genes en distintos tipos de cáncer humano (Zhang et al. 2017; Lowney et al. 1999; Wang et al. 2007). Por lo anterior creemos que DNMT3B podría afectar la apoptosis mediante la represión de estos y quizá otros genes más relacionados con apoptosis.

Otra de las funciones celulares afectadas durante el desarrollo del cáncer es la comunicación celular. Encontramos que la sobre-expresión de DNMT3B disminuyó 2 genes implicados en esta función CDH2 y BRAF. CDH2 regula la adhesión célula-célula dependiente de calcio (van Roy 2014). BRAF está relacionado con el control de la vía MEK/ERK (Hussain et al. 2015). Evidencias experimentales muestran que los promotores de estos genes se encuentran metilados o que disminuyen su expresión en distintos tipos de cáncer (Hagihara et al. 2004, Yamashita et al. 2006, Yamashita et al. 2006, Kober et al. 2011).

En la diferenciación celular, que también suele ser alterada durante el desarrollo del cáncer, se encontraron disminuidos 3 genes PPL, TCF2 y PAXIP1. PPL se organiza

alrededor de desmosomas en queratinocitos diferenciados (Li et al. 2017). Los genes PAX codifican para factores de la transcripción que tienen papeles cruciales en la embriogénesis (Dahl et al. 1997). HNF1B (TCF2) es un factor de transcripción (Edghill et al. 2006; Bach & Yaniv 1993; Wu et al. 2004), que es identificado como un gen supresor de tumor a través del control de la expresión de PKHD1 (Rebouissou et al. 2005). Hay evidencias que demuestran la disminución de estos genes en distintos tipos de cáncer y su efecto en el desarrollo del cáncer (Terasawa et al. 2006; Donizetti Silva et al. 2013).

El análisis *in silico* funcional indica que los genes que disminuyeron su expresión, cuando se sobre-expresa DNMT3B, interactúan con genes implicados en comunicación celular, apoptosis, diferenciación celular, entre otros procesos también importantes en el desarrollo del cáncer.

En particular los genes involucrados en diferenciación celular se relacionan con genes como MML2 (leucemia mieloide de linaje mixto 2) actúa como coactivador del receptor de estrógenos, MML3 (leucemia mieloide de linaje mixto 2) coactivador transcripcional implicado en la leucogénesis y el trastorno del desarrollo, TP53BP1 (proteína de unión a p53) juega un papel clave en la respuesta al daño de ADN.

Los genes encontrados en el grupo de apoptosis se involucran con diferentes miembros de la familia de proteínas que integran el proteosoma, además que SPTAN1 interactúa por medio de PSMB3 (subunidad del proteosoma tipo B, 3) con PSMA7, esto fue analizado experimentalmente.

CDH2 y BRAF, que pertenecen al grupo de comunicación celular, interactúan de manera muy cercana por medio de miembros de la vía de señalización Wnt canónica, en particular CTNNB1, componente clave de la vía de Wnt y KRAS que promueve eventos oncogénicos al inducir la transcripción de genes supresores de tumor. Todo esto indica que la sobre-expresión de DNMT3B en HaCaT altera la expresión de genes cuya función está involucrada en redes de interacción de proteínas que en su conjunto afectan funciones claves del mantenimiento de la normalidad celular.

XI. CONCLUSIÓN

La sobre-expresión de DNMT3B disminuye el nivel de RNAm de los genes: IRF1, PSMA7, SPTAN1, TCF2, PPL, PAXIP1, CDH2 y BRAF.

Los genes que disminuyeron el nivel de RNAm por la sobre-expresión de DNMT3B forman parte de redes de interacción de proteínas con funciones clave en el mantenimiento de la normalidad celular.

XII. ANEXOS

Anexos 1

Transformación con pHMT3B

1. Partiendo de una dilución a una concentración de 112 ng/ μ L se tomar 2 μ L y 50 mL de células competentes y se colocan en un tubo Eppendorf de 1.5 μ L.
2. Colocar 20 minutos en hielo.
3. Choque térmico 1:30 minutos a 42 °C.
4. Pasar rápidamente el tubo al hielo durante 2 minutos.
5. Adicionar 500 μ L de medio LB sin ampicilina.
6. Incubar en agitación constante durante 15 minutos a 37 °C.
7. Centrifugar 1 minuto a temperatura ambiente a 13000 rpm.
8. Retirar el sobrenadante y dejar aproximadamente 100 μ L en el tubo.
9. Homogenizar suavemente hasta disolver el pellet.
10. Plaquear las bacterias transformadas en medio LB solido con ampicilina.
11. Incubar de 12-16 horas a 37 °C.

Anexo 2

Cultivo masivo de p^HMT3B

1. Tomar una colonia de la placa con bacterias transformadas, con un asa bacteriológica estéril y sembrarla el 50 ml de medio LB con ampicilina.
2. Colocar el matraz en el agitador magnético e incubar a 37 °C de 12-16 horas.

Anexo 3

Extracción del ADN plasmídico

Centrifugar 35 mL del medio de cultivo para obtener el paquete de bacterias para la transformación.

1. Adicionar 1 mL de 7X Lysis Buffer (azul) y mezclar suavemente por inversión de 4-6 veces. Reposar 2 minutos.
2. Agregar 3.5 mL de Neutralization Buffer (amarillo) y mezclar vigorosamente hasta que la mezcla se torne amarilla. Invertir de 2-3 veces.
3. Colocar la columna azul Zymo-midiFilter en un tubo falcon de 50 mL. Agregar la muestra a la columna, cerrar la tapa y centrifugar a 4000 rpm durante 6 minutos.
4. Remover y descartar la columna azul (ZymoMidiFilter) de la parte inferior (Zymo Spin V-E).
5. Transferir la parte de debajo de la columna (Zymo Spin V-E) en un tubo colector.
6. Adicionar 350 μ L de Endo-Wash Buffer y centrifugar a 11000 g por 30 segundos. Descartar el fluido.
7. Agregar 400 μ L de ZyppyWash Buffer y centrifugar a 11000 g por 1 minuto. Repetir este paso.
8. Transferir la columna a un tubo Eppendorf limpio y etiquetado. Adicionar 75 μ L de ZyppyElution Buffer, e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 11000 g por 30 segundos para eluir el plásmido. Guardar en refrigeración.

Anexo 4

Transfección con lipofectamina

- 1.- El día anterior, se sembraron las células a una concentración de 5×10^5 en una multipozos de 6.
- 2.- Al día siguiente, 4 o 5 horas antes de comenzar la transfección, se cambia el medio de cultivo a las placas. Las células deben estar semiconfluentes.
- 3.- Se retira el medio de cultivo y se adiciona 500 mL de tripsina y 500 mL de verseno. Se incubo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos.
- 4.- Adicionar 3000 μL de medio DMEM para inactivar la tripsina y el verseno.
5. Después de desprender las células, se homogenizan suavemente y se colocan 250 μL en cada pocillo.
6. Incubar durante 4 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para fijar las células. Posteriormente retirar el exceso de medio.
7. Preparar la mezcla de transfección y adicionar al pocillo correspondiente:

pHMT3B -----	10 μL
DMEM 1X-----	500 μL
Lipofectamina-----	3 μL
8. Incubar durante 4 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para que se lleve a cabo la transfección.
9. Retirar la mezcla de transfección y agregar 1000 μL de medio DMEM al 10%. Incubar durante 24 horas para posteriormente obtener el ARNm.

Anexo 5

Extracción de RNA

- 1.- Agregar 500 mL de Trizol.
- 2.- Incubar 5 minutos en hielo
- 3.- Agregar 100 µL de cloroformo a cada tubo.
- 4.- Vortex 15 segundos, incubar 2 a 3 minutos en hielo, centrifugar en frío 10 minutos a 12600 rpm.
- 5.- Separar fase acuosa en tubo nuevo.
- 6.- Agregar 500 µL de isopropanol frío (Inversión) ----- Almacén y paro -70°C.
- 7.- Incubar en hielo 10 minutos
- 8.- Centrifugar 12 minutos a 12000 rpm (en frío), eliminar el sobrenadante.
- 9.- Lavar la pastilla con 200 µL de etanol al 70%, mezclar por inversión y centrifugar por 5 minutos a 12000 rpm.
- 10.- Eliminar el sobrenadante.
- 11.- Resuspender pastilla en 15 µL de H₂O-DEPC.
- 12.- Almacenar a -20°C por 1 semana y a -70°C por más tiempo.

	<i>p60</i>	<i>p12</i>	<i>p100</i>
<i>Trizol</i>	300 µL	100 µL	600 µL
<i>Cloroformo</i>	60 µL	20 µL	120 µL
<i>Isopropanol</i>	500 µL	500 µL	500 µL

Anexo 6

RT-qPCR en tiempo real

1 reacción

H₂O	-----	1.9 μ L
dUTP's	-----	0.2 μ L
RoxLow	-----	0.2 μ L
RT	-----	0.2 μ L
qPCR	-----	5 μ L
		<hr/>
		7.5 μ L
-> Primer	0.5 μ L	
->ARN	2 μ L (50ng/ μ L)	

XIII. REFERENCIAS

- Bach, I. & Yaniv, M., 1993. transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family. , 12(1), pp.4229–4242.
- Baylin, S.B. & Herman, J.G., 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics*, 16(4), pp.168–174.
- Ben, G.R. et al., 2013. DNMT3B (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 17(2), pp.88–93. Available at: <http://hdl.handle.net/2042/48489>.
- Bestor, T.H., 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics*, 9(16), pp.2395–2402.
- Dahl, E., Haruhiko, K. & Balling, R., 1997. Pax genes and organogenesis. In *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. pp. 755–765.
- Denis, H., Ndlovu, M.N. & Fuks, F., 2011. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO reports*, 12(7), pp.647–56. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3128952&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Donizetti Silva, T. et al., 2013. DNA methylation as an epigenetic biomarker in colorectal cancer. *Oncology Letters*, 6(6), pp.1687–1692.
- Dubielecka, P.M. et al., 2010. Aggregation of spectrin and PKC h is an early hallmark of fludarabine / mitoxantrone / dexamethasone-induced apoptosis in Jurkat T and HL60 cells. , pp.63–77.
- Edghill, E.L. et al., 2006. Hepatocyte nuclear factor-1 beta mutations cause neonatal diabetes and intrauterine growth retardation: Support for a critical role of HNF-1?? in human pancreatic development. *Diabetic Medicine*, 23(12), pp.1301–1306.
- Esteller, M., 2007. Epigenetic gene silencing in cancer: The DNA hypermethylome. *Human Molecular Genetics*, 16(R1), pp.50–59.
- Fan, H. et al., 2012. MTSS1, a novel target of DNA methyltransferase 3B, functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 31(18), pp.2298–2308.
- Gao, J. et al., 2010. IRF-1 transcriptionally up-regulates PUMA which mediates the mitochondrial apoptotic pathway in IRF-1 induced apoptosis in cancer cells. *Cell Death Differ*, 17(4), pp.699–709.
- Ghoshal, K. et al., 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(4), p.e10338. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2861599&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hagihara, A. et al., 2004. Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene*, 23(53), pp.8705–8710.
- Hermann, A., Gowher, H. & Jeltsch, A., 2004. Biochemistry and biology of mammalian DNA

“Efecto de DNMT3B en la expresión de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT”

methyltransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(19-20), pp.2571–2587. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-004-4201-1>.

Hussain, M.R.M. et al., 2015. BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(4), pp.359–373. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.10.002>.

Jurkowska, R.Z., Jurkowski, T.P. & Jeltsch, A., 2011. Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases. *ChemBioChem*, 12(2), pp.206–222. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cbic.201000195>.

Kober, P. et al., 2011. Methyl-CpG binding column-based identification of nine genes hypermethylated in colorectal cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 50(11), pp.846–856.

Lahtz, C. & Pfeifer, G.P., 2011. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *Journal of molecular cell biology*, 3(1), pp.51–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3030973&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Li, X. et al., 2017. Loss of periplakin expression is associated with the tumorigenesis of colorectal carcinoma. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 87, pp.366–374. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.103>.

Liu, X. et al., 2006. Interaction between c-Abl and Arg Tyrosine Kinases and Proteasome Subunit PSMA7 Regulates Proteasome Degradation. *Molecular Cell*, 22(3), pp.317–327.

Lowney, J.K. et al., 1999. Interferon Regulatory Factor-1 and -2 Expression in Human Melanoma Specimens. , 6(6), pp.604–608.

Meng, H.X. et al., 2011. Apoptosis and DNA methylation. *Cancers*, 3(2), pp.1798–1820.

Pendergast, A.M., 2002. The Abl Family Kinases : Mechanisms of Regulation and Signaling.

Peralta-arrieta, I. et al., 2017. DNMT3B modulates the expression of cancer-related genes and downregulates the expression of the gene VAV3 via methylation. , 7(1), pp.77–87.

Peter, A.J. & Baylin, S.B., 2007. The Epigenomic of Cancer. *Cell*, pp.683–692. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21959306>.

Rebouissou, S. et al., 2005. Germline hepatocyte nuclear factor 1alpha and 1beta mutations in renal cell carcinomas. *Hum Mol Genet*, 14(5), pp.603–614. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15649945.

Robertson, K.D. et al., 1999. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic acids research*, 27(11), pp.2291–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=148793&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

van Roy, F., 2014. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 14(2), pp.121–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24442140>.

“Efecto de DNMT3B en la expresión de genes relacionados con diferenciación celular, regulación de la apoptosis y comunicación celular en células HaCaT”

- Ryazanova, A.Y. et al., 2012. Diverse domains of (cytosine-C5)-DNA methyltransferases: structural and functional characterization. *Methylation: from DNA, RNA and histones to diseases and treatment*, pp.29–69. Available at: <http://www.intechopen.com/books/methylation-from-dna-rna-and-histones-to-diseases-and-treatment/diverse-domains-of-cytosine-5-dna-methyltransferases-structural-and-functional-characterization>.
- Siedlecki, P. & Zielenkiewicz, P., 2006. Mammalian DNA methyltransferases. *Acta biochimica Polonica*, 53(2), pp.245–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16582985>.
- Teneng, I. et al., 2014. Global identification of genes targeted by DNMT3b for epigenetic silencing in lung cancer. *Oncogene*, 34(October 2013), pp.1–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24469050>.
- Terasawa, K. et al., 2006. Epigenetic inactivation of TCF2 in ovarian cancer and various cancer cell lines. *British journal of cancer*, 94(6), pp.914–921.
- Wang, Y. et al., 2007. Involvement of IFN regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 in the formation and progression of human esophageal cancers. *Cancer Research*, 67(6), pp.2535–2543.
- Wro, T. et al., 2005. Changes in spectrin organisation in leukaemic and lymphoid cells upon chemotherapy. , 69, pp.73–85.
- Wu, G., Bohn, S. & Ryffel, G.U., 2004. The HNF1B transcription factor has several domains involved in nephrogenesis and partially rescues Pax8/lim1-induced kidney malformations. *European Journal of Biochemistry*, 271(18), pp.3715–3728.
- Yamashita, S. et al., 2006. Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Science*, 97(1), pp.64–71.
- Yu, J. et al., 2001. PUMA Induces the Rapid Apoptosis of Colorectal Cancer Cells. , 7, pp.673–682.
- Yu, J. & Zhang, L., 2008. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27(April 2009), pp.1–22.
- Zhang, R. et al., 2017. MicroRNA-128-3p regulates mitomycin C-induced DNA damage response in lung cancer cells through repressing SPTAN1. , 8(35), pp.58098–58107.