

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS DNA METILTRANSFERASES (DNMTs) PELAS PROTEÍNAS p53 E SP1

Vanessa Paiva Leite de Sousa (Doutorado)¹, Tatiana de Almeida Simão^{1,2}, Pedro Nicolau Neto¹, Nathalia Meireles da Costa¹, Luis Felipe Ribeiro Pinto^{1,2}

¹Programa de Carcinogênese Molecular, Centro de Pesquisa (CPQ), Instituto Nacional de Câncer (INCA)

²Laboratório de Toxicologia e Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

INTRODUÇÃO

- O termo epigenética diz respeito a modificações que levam a alterações na expressão gênica sem afetar a sequência de bases do DNA [1].
- DNA Metiltransferases (DNMT) Metilação de citosinas em dinucleotídeos CpG [2].
- Em carcinoma Epidermóide de Esôfago: maior expressão de *DNMT3B* em tumores com mutações em *TP53*.

- Cerca de metade dos tumores humanos apresentam mutações no gene *TP53* [4].
- Supereexpressão do fator de transcrição *SP1* em tumores estadiamento avançado, potencial metastático e pior prognóstico
- Complexo entre p53 e o fator de transcrição *SP1* redução da expressão gênica de *DNMT1* em linhagem de câncer de pulmão não pequenas células [3].

OBJETIVO

Avaliar a possível regulação das enzimas responsáveis pela metilação do DNA (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*) pelas proteínas *p53* e *SP1*.

RESULTADOS

Expressão basal das DNMTs e SP1 nas linhagens TE-1 e HCT-116

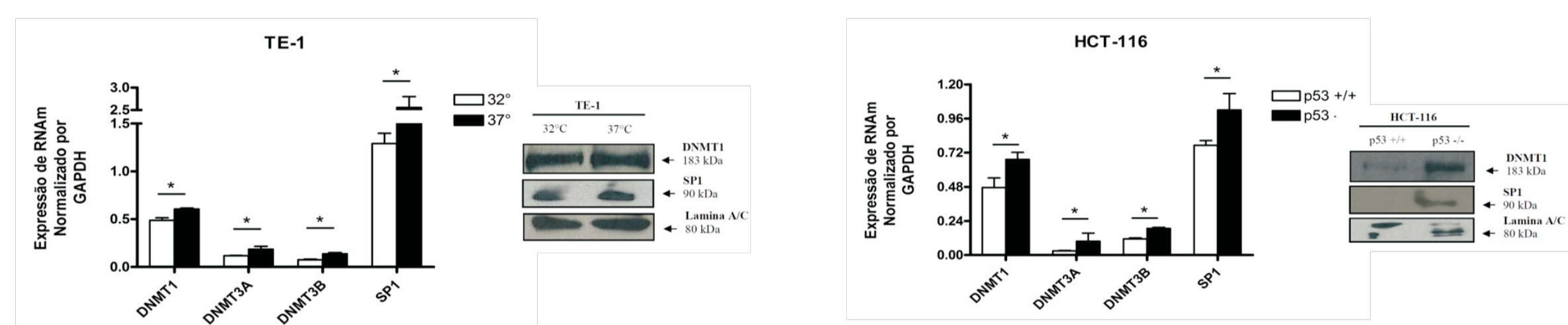


Figura 1: Expressão basal das DNMTs e SP1 por RT-PCRq e western blotting na linhagem derivada de CEE TE-1 (cultivada à 32°C-p53 selvagem e 37°C-p53 mutante) e na linhagem derivada de carcinoma colorretal HCT-116 (p53+/+ e p53-/-). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Expressão das DNMTs, DNMT3A, DNMT3B e p53 nas linhagens TE-1, TE-13 e HCT-116 após transfeção de vetor de expressão para p53

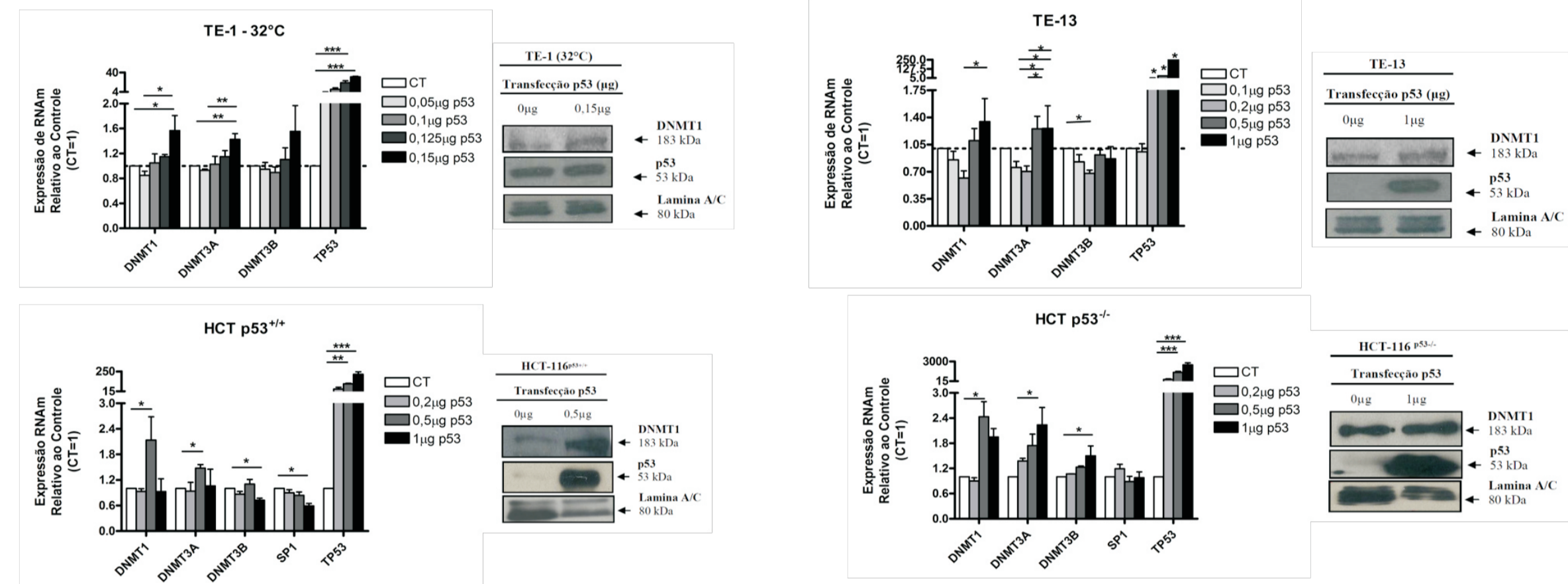


Figura 2: Expressão das DNMTs e p53 por RT-PCRq e western blotting na linhagem derivada de CEE TE-1 (cultivada à 32°C-p53 selvagem), na linhagem derivada de CEE TE-13 (p53 nulo) e na linhagem derivada de carcinoma colorretal HCT-116 (p53+/+ e p53-/-) transfectada com quantidades crescentes do vetor de expressão para p53. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Expressão das DNMTs, DNMT3A, DNMT3B e p53 na linhagem TE-1 após tratamento com MMS 1mM

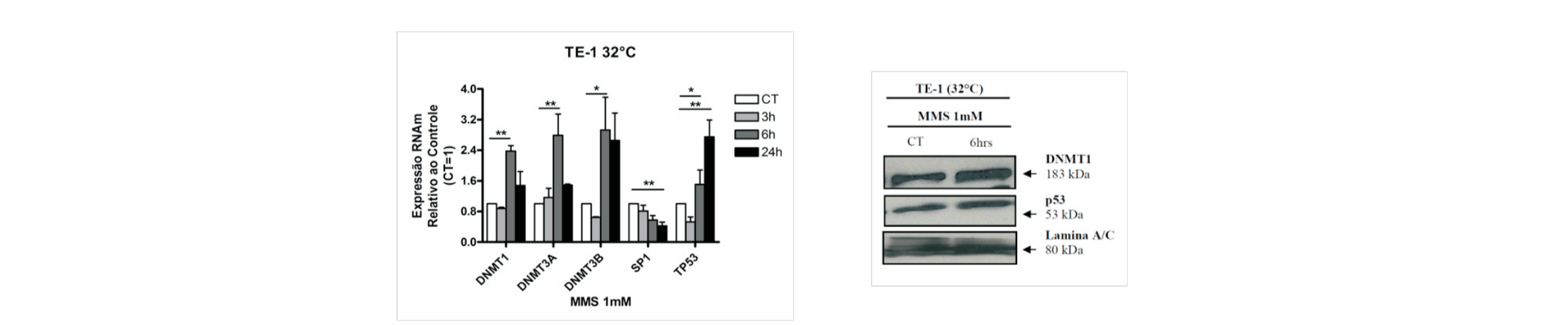


Figura 3: Expressão das DNMTs e p53 por RT-PCRq e western blotting na linhagem derivada de CEE TE-1 cultivada à 32°C (p53 selvagem) submetida à tratamento com MMS 1mM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Expressão das DNMTs, DNMT3A, DNMT3B e p53 nas linhagens TE-1 e HCT-116 após silenciamento de TP53 por siRNA

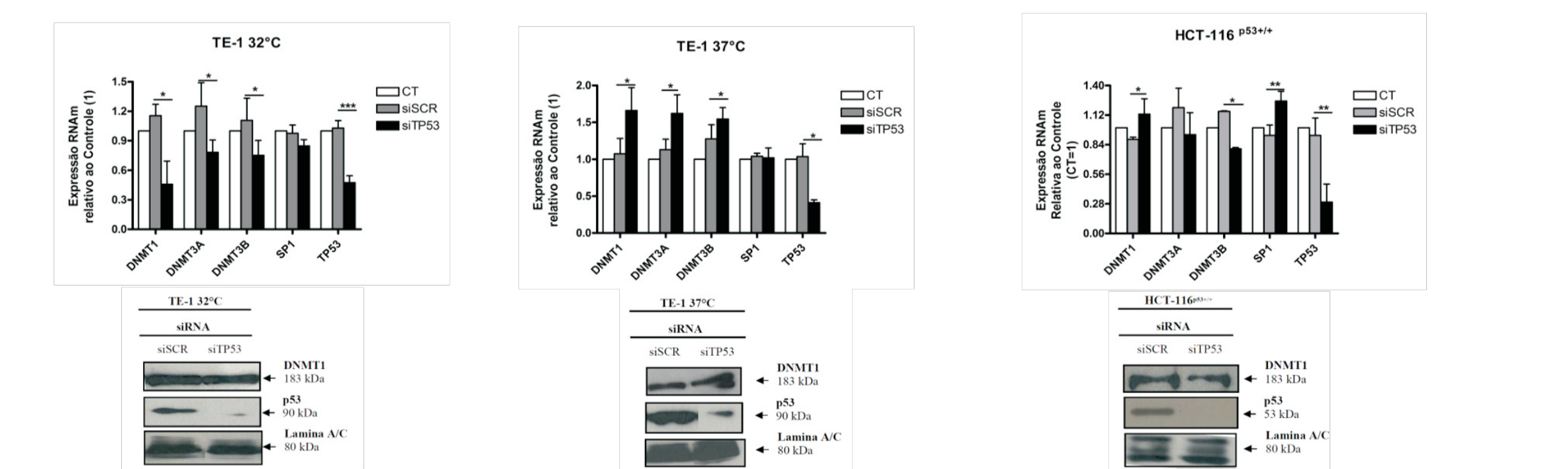


Figura 4: Expressão das DNMTs e p53 por RT-PCRq e western blotting na linhagem derivada de CEE TE-1 (cultivada à 32°C-p53 selvagem) e derivada de carcinoma colorretal HCT-116 (p53+/+ e p53-/-) após silenciamento de TP53 por siRNA. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Expressão das DNMTs e SP1 de acordo com presença ou ausência de mutação em TP53 em amostras humanas de CEE

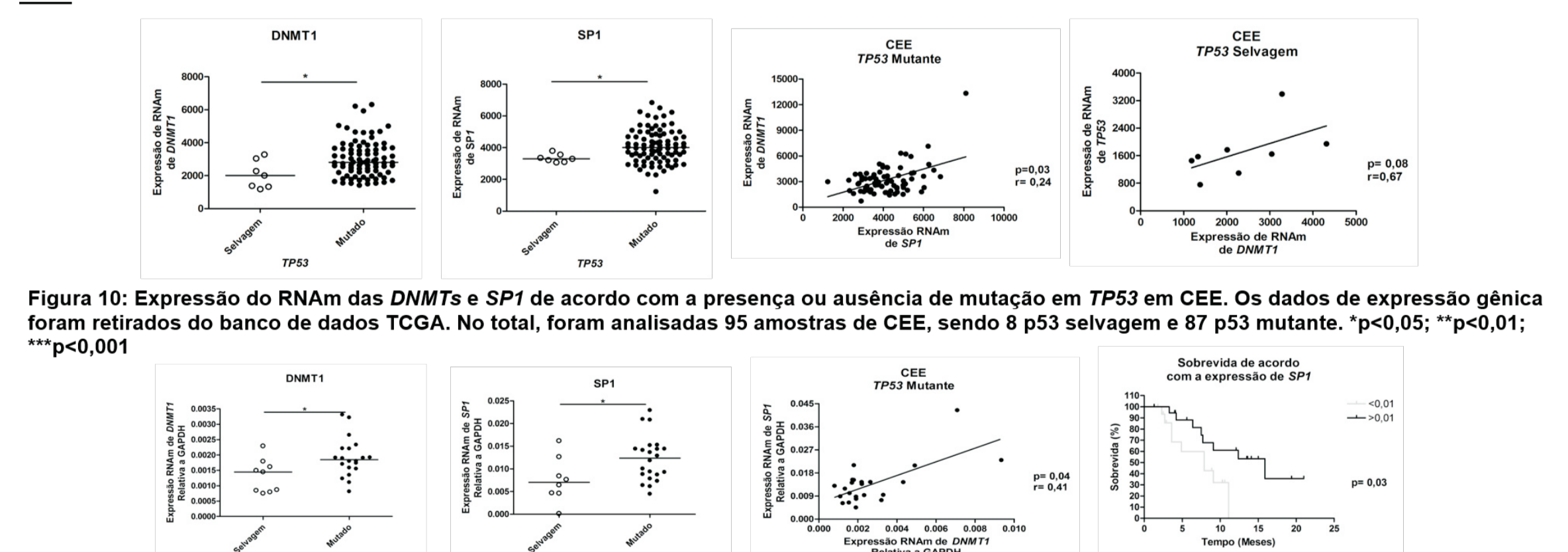


Figura 10: Expressão do RNAm das DNMTs e SP1 de acordo com a presença ou ausência de mutação em TP53 em CEE. Os dados de expressão gênica foram retirados do banco de dados TCGA. No total, foram analisadas 95 amostras de CEE, sendo 8 p53 selvagem e 87 p53 mutante. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Figura 11: Expressão do RNAm das DNMTs e SP1 de acordo com a presença ou ausência de mutação em TP53 em CEE de pacientes matriculados no INCA. A expressão gênica de SP1 e DNMT1 foram avaliadas por RT-PCRq. No total, foram analisadas 95 amostras de CEE, sendo 8 p53 selvagem e 25 p53 mutante. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Expressão das DNMTs, DNMT3A, DNMT3B e SP1 nas linhagens TE-1, TE-13 e HCT-116 após transfeção de vetor de expressão para SP1

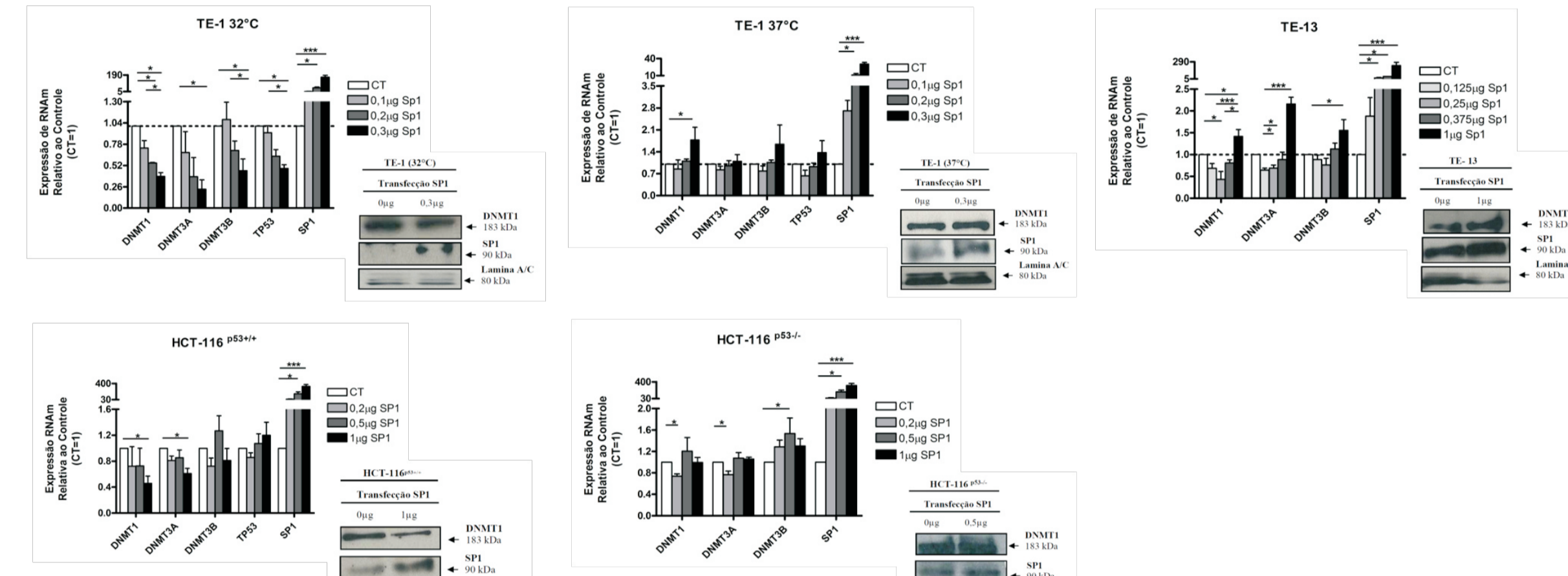


Figura 5: Expressão das DNMTs e SP1 por RT-PCRq e western blotting na linhagem derivada de CEE TE-1 (cultivada à 32°C-p53 selvagem e 37°C-p53 mutante), na linhagem derivada de CEE TE-13 (p53 nulo) e na linhagem derivada de carcinoma colorretal HCT-116 (p53+/+ e p53-/-) transfectadas com vetor de expressão para SP1. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Expressão das DNMTs, DNMT3A, DNMT3B e SP1 nas linhagens TE-1, TE e HCT-116 após silenciamento de SP1 por siRNA

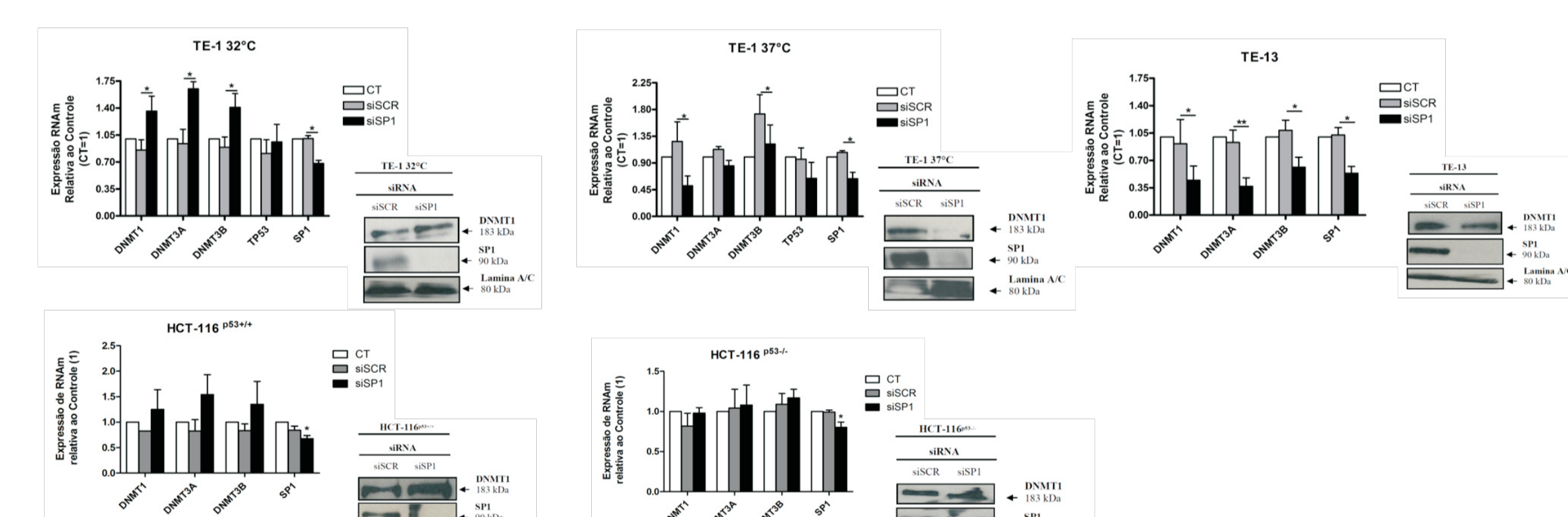


Figura 6: Expressão das DNMTs e SP1 por RT-PCRq e western blotting nas linhagem derivada de CEE TE-1 (cultivada à 32°C-p53 selvagem e 37°C-p53 mutante), na linhagem derivada de CEE TE-13 (p53 nulo) e na linhagem derivada de carcinoma colorretal HCT-116 (p53+/+ e p53-/-) após silenciamento de SP1 por siRNA. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Expressão das DNMTs, DNMT3A, DNMT3B na linhagem TE-1 e TE-13 após tratamento com Mitramicina A

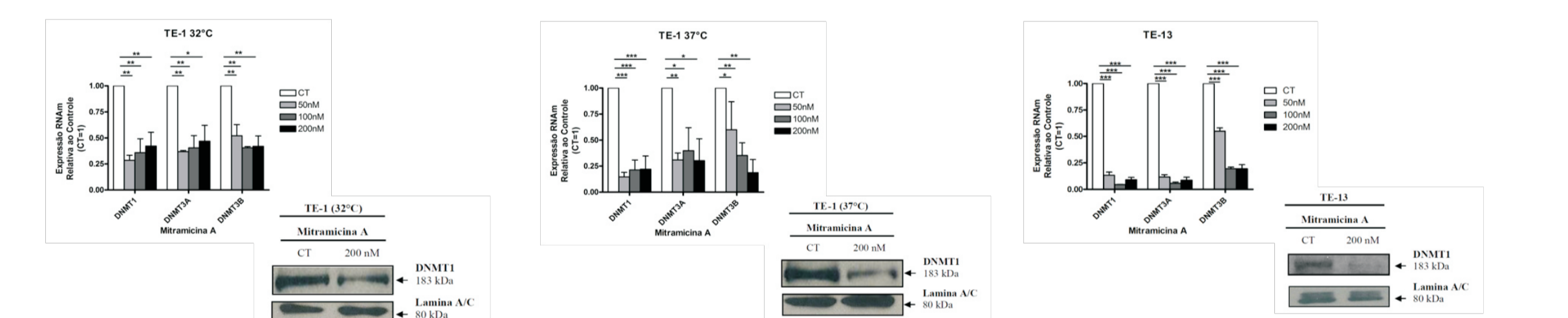


Figura 7: Expressão das DNMTs por RT-PCRq e western blotting nas linhagens derivadas de CEE TE-1 (cultivada à 32°C-p53 selvagem e 37°C-p53 mutante) e TE-13 (p53 nulo) após tratamento com Mitramicina A. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Expressão de RNAm das DNMTs, DNMT3A, DNMT3B, TP53 e SP1 na linhagem TE-1 e TE-13 após transfeção combinada com vetores de expressão para p53 e SP1

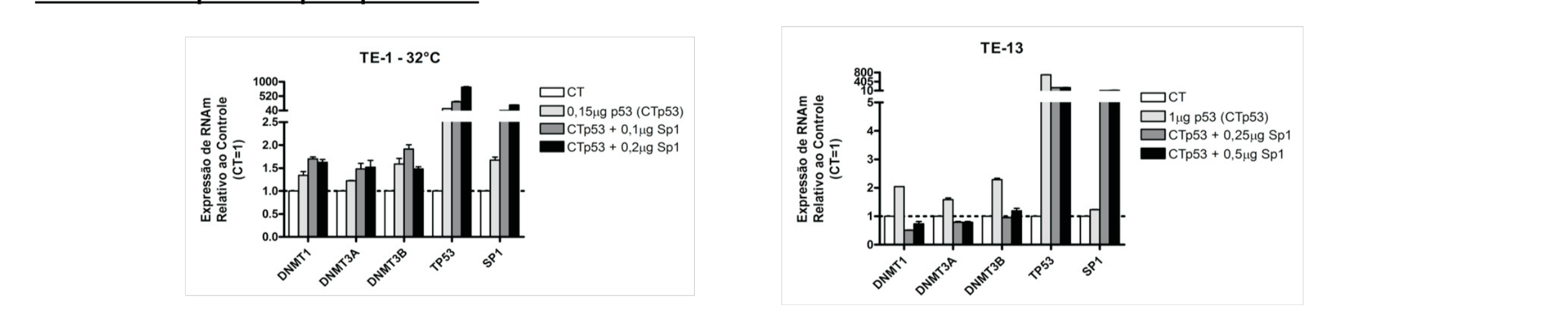


Figura 8: Expressão do RNAm das DNMTs, TP53 e SP1 por RT-PCRq nas linhagens derivadas de CEE TE-1 (cultivada à 32°C-p53 selvagem) e TE-13 (p53 nulo) após transfeção combinada com vetores de expressão para p53 e SP1.

Avaliação da presença de elementos responsivos à p53 e SP1 na região promotora das DNMTs e TP53

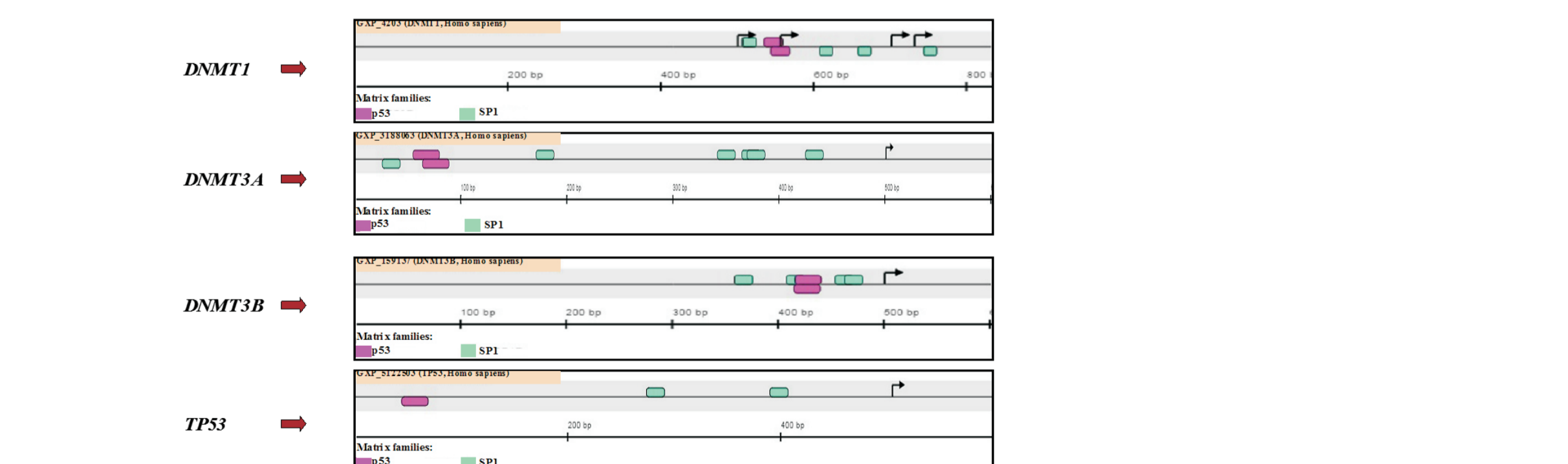


Figura 9: Avaliação da presença de elementos responsivos à p53 e SP1 na região promotora dos genes que codificam as DNMTs e TP53. A análise foi realizada utilizando o software MatInspector.

METODOLOGIA

Tabela 1: Linhagens humanas utilizadas.

Linhagem	Tecido Origem	Status p53
TE-1	Carcinoma Epidermóide de Esôfago	Mutação Termo-sensível (32°C proteína selvagem e 37°C proteína mutante)
TE-13	Carcinoma Epidermóide de Esôfago	Ausente
HCT-116	Carcinoma Colorretal	Selvagem
HCT-116 -/-	Carcinoma Colorretal	Ausente

- A linhagem TE-1 foi submetida à tratamento com Metil Metanosulfonado (MMS) 1mM.
- As linhagens TE-1 e TE-13 foram submetidas à tratamento com Mitramicina A 50nM, 100nM e 200 nM.
- A expressão gênica das DNMTs, *Sp1* e *TP53* foi avaliada por RT-PCRq e a expressão proteica foi avaliada por Western Blotting.
- Os dados de expressão gênica foram retirados do banco de dados TCGA. A significância estatística entre os grupos foi calculada pelos testes *Mann-Whitney* e *Spearman*.

CONCLUSÃO

Esses dados demonstram que p53 e SP1 tem um papel conjunto na regulação gênica das DNMTs e essa regulação pode variar de forma tecido-específica. No entanto, outros experimentos são necessários para entendermos como essa regulação ocorre.

REFERÊNCIAS

- Adams RL, McKay EL, Craig LM et al. Mouse DNA methylase: methylation of native DNA. *Biochim Biophys Acta*, v. 561, n. 2, p. 345-57, 1979.
- Luccak M, Jagozinski PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol*, v.44, n. 3, p.143-154, 2006.
- Lin RK, Wu CY, Chang JW, et al. Dysregulation of p53/Sp1 control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer. *Cancer Res*, v. 70, n. 14, p. 5807-17, 2010.
- Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*, v.77 p.81-137, 2000.

Projeto Gráfico: Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica / INCA