

Metilació de l'ADN durant l'espermatogènesi del gall.

N. Rocamora

Departament de Fisiologia, grup de "Fisiologia nuclear i diferenciació", Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Casanova 143, Barna 36.

Introducció

La metilació de l'ADN és una modificació covalent postreplicativa que en els vertebrats afecta únicament a les citosines (C) transformant-les en citosines metilades (m^5C) i deixant el grup metil en una situació exposada en el solc major de la doble hèlix.

Les m^5C representen per terme mig d'un 2-7% del total de les C i la seva distribució en el genoma no és a l'atzar sino que es troben principalment en seqüències palindròmiques i en un 90% dels casos acompanyades per l'extrem 3'de guanina (Roy 1975).

L'ADN satèlit presenta un nivell de metilació superior al de l'ADN únic i mitjanament repetitiu (Solage 1978) fet que és recolçat per la incorporació d'anticossos específics principalment en zones heterocromàtiques dels cromosomes metafàsics (Miller 1974).

Estudiant la localització de les m^5C mitjançant digestions amb nucleasa micrococal s'ha vist que aquestes es troben en un 75% en la zona del "core" del nucleosoma (Pollack 1980).

El interès despertat per l'estudi d'aquesta modificació de l'ADN (Razin 1980, Ehrlich 1981, Felsenfeld 1982) és degut a que s'han trobat una sèrie de correl·lacions entre les variacions de nivell de metilació i els canvis en el material hereditari tant a nivell estructural com funcional.

A nivell funcional s'ha trobat una forta correl·lació negativa entre el nivell de metilació i l'activitat de transcripció (Mandel 1979, Bird 1981), encara que la hipometilació sembla una condició necessària però no suficient per a la transcripció (Ott 1982).

La metilació podria jugar també un paper en els processos de diferenciació, sobretot degut a la situació exposada del grup metil, que l'hi permetria afectar al "binding" de proteïnes; i a la especificitat de determinades metilases per metilar l'ADN hemimetilat, que podria ésser un mecanisme pel manteniment dels patrons de diferenciació.

Respecte a l'estructura es coneix que les zones riques en GC tenen més tendència a adoptar la forma Z de l'ADN i que aquesta forma és més fàcilment induïble si les C estan metilades (Behe 81).

També es coneix que la metilació afecta a l'estabilitat tèrmica de la doble hèlix, de tal manera que m⁵C-G és més estable que C-G (Ehrlich 1975).

El model de l'espermatogènesi és, doncs, molt interessant per l'estudi d'aquesta modificació ja que en ell es donen una sèrie de canvis dràstics en la cromatina tant a nivell estructural com funcional.

Existeixen moltes dades comparatives de la metilació entre espermatozoides i cèl.lules somàtiques tant per a gens aïllats com per a tot l'ADN, les dades globals ens indiquen una hipometilació del espermatozoide (Ehrlich 1982), mentre que les dades referents a determinats gens (globina, ovalbúmina.) ens indiquen una hipermetilació d'aquests en el espermatozoide (Mandel 1979).

No existeixen, però, gaire estudis sobre la metilació durant el procés de l'espermatogènesi que ens indiquin quan es dona la hipometilació i amb quins paràmetres es pot relacionar, o que estudiïn els nivells de metilació de gens involucrats d'algun manera en el procés de diferenciació.

En aquest treball hem quantificat la metilació global de l'ADN al llarg del procés de l'espermatogènesi, relacionant aquests resultats amb les dades obtingudes per Mezquita (1976) sobre replicació i transcripció durant el procés.

Material i mètodes

Material: Galls de la raça Hubbard White Mountain.

Mètodes:

- Obtenció de nuclis amb ac.cítric 10mM segons Mezquita (1976)
- Separació dels nuclis de diferents estadis de l'espermatogènesi segons la seva velocitat de sedimentació a gravetat unitat (Mezquita 1976).
- Obtenció de l'ADN de cada tipus nuclear segons la metodologia de Marmur (1961).
- Digestió enzimàtica controlada de l'ADN mitjançant DNasa I, nucleasa P1 i fosfatasa alcalina (Kuo 1980).
- Separació dels nucleòsids mitjançant RP-HPLC i quantificació dels resultats segons el mètode del estàndar intern (Kuo 1980).
- Obtenció de la fracció d'espermátides de transició (Loir 1978).

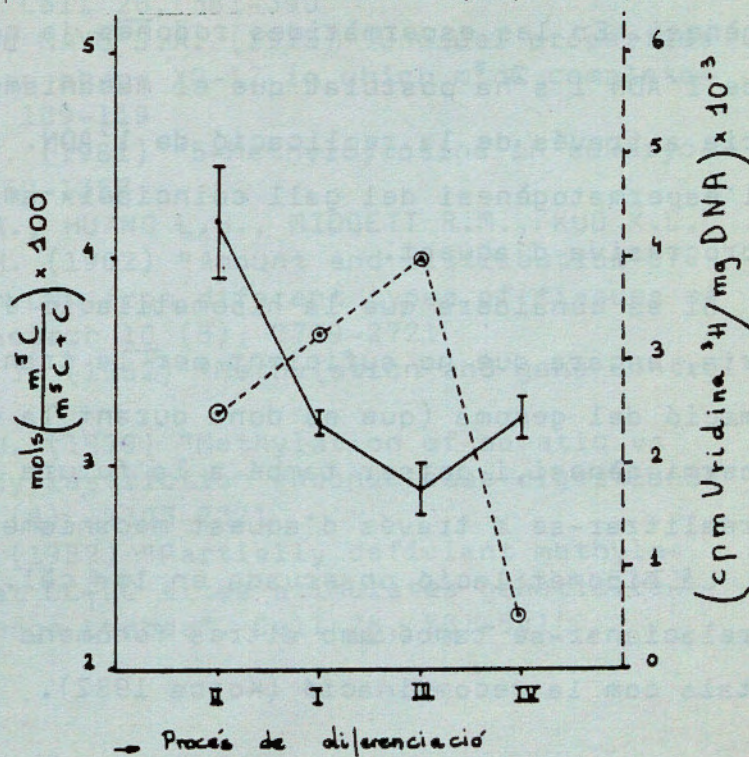
Resultats

S'han analitzat els nivells de metilació de l'ADN nuclear al llarg de l'espermatogènesi del gall (fig.1).

S'han analitzat també els nivells de metilació de: fetge (F), testicle inmadur (TI), espermátides de transició (ET) i espermatozoides (E) (taula I)

Fig.1-

--- Incorporació d'Uridina H "in vivo" al llarg de l'espermatogènesi.
 — Variacions del nivell de metilació al llarg de l'espermatogènesi.



Els resultats obtinguts al llarg de l'espermatogènesi ens indiquen una disminució clara en el nivell de metilació en el pas de cèl.lules premeiòtiques (II) a meiòtiques (I) i a espermàtides rodones (III), mentre que sembla que existeix un petit increment de metilació en el pas d'espermàtides rodones a allargades (IV).

| | $\text{mols} \left(\frac{\text{m}^5\text{C}}{\text{m}^5\text{C} + \text{C}} \right) \times 100$ |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F | 4.11 |
| TI | 4.49 |
| ET | 2.8 |
| E | 3 |

taula I

Els resultats de la taula I, recolzen també la hipometilació durant l'espermatogènesi.

Discussió

Al llarg de l'espermatogènesi del gall, s'observa una hipometilació de l'ADN del nucli cel.lular en correl·lació inversa amb la incorporació de uridina. La metilació arriba al seu grau mínim en les espermàtides rodones, cèl.lules molt actives a nivell de transcripció, i ja no disminueix més durant l'espermio-gènesi. En les espermàtides rodones ja no existeix replicació de l'ADN i s'ha postulat que el mecanisme de hipometilació seria a través de la replicació de l'ADN. La síntesi de ADN durant l'espermatogènesi del gall coincideix amb una hipometilació progressiva d'aquest.

Si es considera que la hipometilació és una condició necessària, encara que no suficient per la transcripció, la reprogramació del genoma (que es dona durant la meiosi) cara a la espermio-gènesi, i potser també a la futura embriogènesi, podria realitzar-se a través d'aquest mecanisme.

La hipometilació observada en les cèl.lules meiòtiques podria relacionar-se també amb altres fenòmens d'activitat genètica, tals com la recombinació (Korba 1982).

En espera de una posterior confirmació estadística podríem dir que si realment existeix un increment de la metilació al final del procés de l'espermatogènesi, no podríem interpretar-ho com un mecanisme global de inactivació del genoma, ja que persisteix la hipometilació global respecte a fases inicials del procés i respecte a cèl.lules somàtiques, sino que es podria tractar més aviat de un mecanisme de inactivació restringida a determinats gens.

S'ha postulat, també, una interpretació diferent de la disminució de metilació durant l'espermatogènesi, que suposa una hemimetilació de l'ADN (Kaput 1979), la qual es produiria en cas de no haver-hi activitat metiltransferasa després de la última replicació de l'ADN abans de la meiosi, quedant la cadena "nova" sense metilar.

Bibliografia

- BEHE M. and FELSENFELD G. (1981) "Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: The B-Z transition in poly(dG-m⁵dC). poly(dG-m⁵dC)". PNAS USA 78, 1619-1623
- BIRD A, TAGGART M. and MACLEOD D. (1981) "Loss of rDNA methylation accompanies the onset of ribosomal gene activity in early development of X.laevis". Cell 26, 381-390
- EHRlich M., EHRlich K. and MAYO J.A. (1975) "Unusual properties of the DNA from Xanthomonas phage XP-12 in which m⁵dC completely replaces dC". BBA 395, 109-119
- EHRlich M. and WANG R.Y.H. (1981) "5-Methylcytosine in eukaryotic DNA". Science 212, 1350-1357
- EHRlich M., GAMA-SOSA M.A., HUANG L.H., MIDGETT R.M., KUO K.C., McCUNE R.A. and GEHRKE CH. (1982) "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells". Nucleic Acids Research 10 (8), 2709-2721
- FELSENFELD G. and McGHEE J. (1982) "Methylation and gene control" Nature 296, 602-603
- KAPUT J. and SNEIDER T.W. (1979) "Methylation of somatic vs germ cell DNAs analyzed by restriction endonuclease digestions" Nucleic Acids Research 7 (8), 2303-2321
- KORBA B.E. and HAYS J.B. (1982) "Partially deficient methylation of cytosine in DNA at CC^AGG sites stimulates genetic recombination of bacteriophage Lambda". Cell 28, 531-541

- KUQ K.C., McCUNE R. and GEHRKE W. (1980) "Quantitative reversed phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA". *Nucleic Acids Research* 8 (20), 4763-4776
- MANDEL J.L. and CHAMBON P. (1979) "DNA methylation: organ specific variations in the methylation pattern within and around ovalbumin and other chicken genes". *Nucleic Acids Research* 7 (8), 2081-2103
- MARMUR J. (1961) "A procedure for the isolation of DNA from microorganisms". *J. Mol. Biol.* 3, 208-218
- MEZQUITA C. and TENG CH.S. (1976) "Studies on sex-organ development: changes in nuclear and chromatin composition and genomic activity during spermatogenesis in the maturing rooster testis". *Biochem. J.* 164, 99-111
- MILLER O.J., SCHNEDI W., ALLEN J. and ERLANGER B.F. (1974) "5-methylcytosine localised in mammalian constitutive heterochromatin". *Nature* 251, 636-637
- OTT M.O., SPERLING L., CASSIO D., LEVILLIERS J., SALA-TREPAT J. and WEISS M.C. (1982) "Undermethylation at the 5' end of the ovalbumin gene is necessary but not sufficient for albumin production by rat hepatoma cells in culture". *Cell* 30, 825-833
- POLLACK Y., STEIN R., RAZIN A. and CEDAR H. (1980) "Methylation of foreign DNA sequences in eukaryotic cells". *PNAS USA* 77 (11), 6463-6467
- RAZIN A. and RIGGS A.D. (1980) "DNA methylation and gene function". *Science* 210 (7), 604-609
- ROY P.H. and WEISSBACH A. (1975) "DNA methylase from HeLa cell nuclei". *Nucleic Acids Research* 2 (10), 1669-1684
- SOLAGE A. and CEDAR H. (1978) "Organization of 5-methylcytosine in chromosomal DNA". *Biochemistry* 17. 2934-2938

Acetilación de las histonas durante la espermatogénesis del gallo.

C. Mezquita, R. Oliva y J. Mezquita.

Departamento de Fisiología, grupo de "Fisiología nuclear y diferenciación", Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, Casanova 143, Barcelona-36.

Introducción

La función precisa de la acetilación de las histonas del octámero es actualmente desconocida. Existen numerosos datos que avalan la existencia de una correlación entre la acetilación de las histonas y la transcripción. No obstante, algunos datos son discordantes. Por ejemplo, la acetilación afecta a un 40 % de las histonas H3 y H4, mientras que el ADN activo en la transcripción sólo representa alrededor de un 10 % del genoma. Se ha observado una mejor correlación entre la hiperacetilación de la histona H4 y la transcripción. También existe una mejor correspondencia entre el porcentaje de histonas acetiladas con un recambio rápido de sus grupos acetilo y la fracción de cromatina activa en la transcripción.

Nuestro objetivo consistió en determinar el grado de acetilación de las histonas y el recambio de sus grupos acetilo en células germinales de testículo de pollo activas en la transcripción, y en células germinales genéticamente inactivas. Con ello pretendíamos demostrar si la hiperacetilación y el recambio rápido de los grupos acetilo de las histonas están unívocamente relacionados con la transcripción. Los experimentos realizados han demostrado la existencia de hiperacetilación de la histona H4 y de recambio rápido de los grupos acetilo, tanto en células genéticamente activas como en células genéticamente inactivas.

Otro aspecto investigado ha sido el control de la actividad enzimática que desacetila las histonas. Se ha postulado que las HMG 14 y 17 inhiben dicha actividad enzimática y podrían ser responsables de la hiperacetilación de las histonas en los genes activos. Los experimentos realizados no permiti-

tieron confirmar el papel inhibidor de la HMG 17 y demostraron la existencia de un factor activador termoestable que fue identificado como la proteína ubiquitina.

Materiales y Métodos

Gallos "Hubbard White Mountain" de 25-30 semanas de edad, o animales sexualmente inmaduros (8-10 semanas) fueron utilizados en estas investigaciones. Una suspensión de células testiculares (250 ml) fue incubada durante 1 hora a 37°C en un medio que contenía 5 mCi de H^3 -acetato (Amersham, 300 mCi/mmol) en presencia de cicloheximida. La suspensión celular fue enfriada y se añadió butirato sódico a una concentración 50 mM. Los métodos para determinar el recambio de grupos acetilo, la actividad desacetilasa de las histonas y el aislamiento y separación de los núcleos de células testiculares de gallo, han sido previamente descritos (Oliva et al., 1982, Mezquita et al., 1982, Mezquita y Teng, 1977).

Las histonas fueron extraídas con SO_4H_2 0.2M y precipitadas con 5 volúmenes de etanol. La separación electroforética se llevó a cabo en geles de poliacrilamida-SDS (gradiente exponencial 10 %- 16 %) o en geles de poliacrilamida acético/urea conteniendo triton X-100. La cuantificación de la radioactividad se realizó por fluorografía a -70°C durante 15 días utilizando films Fuji de rayos-X presensibilizados. La preparación del activador de la desacetilasa de histonas y los métodos de purificación de la HMG 17 y ubiquitina han sido previamente descritos (Mezquita et al., 1982).

Resultados

Los análisis electroforéticos de las histonas extraídas de testículo inmaduro y de testículo maduro pusieron de manifiesto que, en éste último, la histona predominantemente acetilada es la H4, y que en ella abundan las formas tri y tetraacetiladas (Fig.1 A y B).

Separando los diferentes tipos de núcleos de células testiculares por el método de velocidad de sedimentación a fuerza de gravedad unidad, se puso de manifiesto que la acetila-