

Metilació de l'ADN i diferenciació cel.lular. Quantificació de la S-Adenosilmetionina (SAM), S-Adenosilhomocisteina (SAH) i Metiltioadenosina (MTA) durant l'espermatogènesi del gall.

N.Rocamora i C.Mezquita

Laboratori de Fisiologia del Nucli Cel.lular  
Departament de Fisiologia i Bioquímica  
Fac.Medicina Univ.Barcelona Av.Diagonal s/n  
08028 Barcelona

To study whether changes in methylation of DNA were related to the structural and functional changes that chromatin undergoes during spermatogenesis we have previously determined the 5-methyl cytosine content of DNA purified from chicken testis cells at different stages of differentiation. The DNA of meiotic and premeiotic cells appears hypomethylated containing 30% less methyl cytosines than the DNA obtained from premeiotic and somatic cells (1). S-Adenosylmethionina (SAM) is involved in two essential processes: transmethylation and polyamine biosynthesis. Both are important during the differentiation of the germinal cell line and could be mutually related in the sense that both reactions use a common precursor and because polyamines, whose synthesis increases during spermatogenesis (2), could inhibit DNA methylase activity. Since all the putative involvements of these enzymatic activities require the measurement of SAM and S-Adenosylhomocysteine (SAH) we have determined these metabolites in rooster testis cells and liver by HPLC. We have also determined the content of Methylthioadenosine (MTA) as a parameter of polyamine biosynthesis. The content of SAM, expressed in nmol/mgDNA, was  $29,15 \pm 0,95$  for mature testis,  $9,3 \pm 0,6$  for immature testis and  $52 \pm 1,73$  for liver. The content of SAH was  $3,57 \pm 0,09$ ,  $2,0 \pm 0,3$  and  $20,0 \pm 1,2$  respectively. The content of MTA was  $1,0 \pm 0,1$ , (mature testis) not detectable (immature testis) and  $0,75 \pm 0,1$  (liver). No appreciable amounts of SAM, SAH and MTA were detected in spermatozoa.

### Introducció

La diferenciació cel.lular és el resultat d'una activitat gènica diferencial que va especialitzant la cèl.lula embrionària "totipotent" cap a un estat de "determinació" i posterior "diferenciació" que es caracteritza per un patró proteic típic.

El control de la diferenciació s'exerceix directament sobre la molècula de l'ADN.

La informació continguda en aquesta molècula no és únicament la seqüència covalent de les quatre bases sino que;

- L'estructura terciària de la molècula és també informativa ja que influeix en l'accessibilitat de determinades seqüències i també pot tenir més o menys afinitat per determinades proteïnes.
- L'existència de seqüències transponibles introdueix també un nou factor de regulació ja que aquestes en funció del lloc a on es troben poden, per exemple activar o no un grup de gens.
- La metilació de l'ADN, además de poder controlar els mecanismes esmentats anteriorment és un altre possible factor de regulació que analitzarem amb més profunditat.

La metilació de l'ADN és una modificació covalent post-replicativa, regulada enzimàticament, que introdueix un grup  $-CH_3$  en el carboni 5 de les citosines, quedant aquest grup exposat en el solc ample de la doble hèlix.

Les  $m^5dC$  es troben en un 90% en el dinucleòtid CpG.

Els patrons de metilació són característics per cada tipus cel.lular i es mantenen a causa de les anomenades metilases "de còpia" que introdueixen un grup metil a la nova cadena recentment sintetitzada de forma simètrica al patró preexistent en la cadena paterna.

Quand s'inicia un patró la metilasa "de novo" necessita un reconeixement de seqüència altament específic per no metilar totes les citosines.

Per altra banda ja que la major part de les cèl.lules sembla que no tenen desmetilases la pèrdua de metilació es donarà per dilució deguda a la manca d'activitat metilasa.

També per a la desmetilació podria ésser important l'especificitat de seqüència per l'unió d'inhibidors a llocs específics, actuant

llavors la metilasa sobre el reste de seqüències no bloqueixades. La metilació s'ha correlacionat principalment amb l'activitat de transcripció, trobant-se generalment una correlació positiva entre: hipometilació i transcripció (3,4) encara que aquesta no és una situació universal.

En models de diferenciació cel.lular s'ha vist que inhibint la metilació de les cèl.lules "totipotents" mitjançant 5-Azacitidina (anàleg de la citinina que inhibeix l'activitat metil-transferasa) s'indueix la diferenciació d'aquestes (5).

Durant l'espermatogènesi podem considerar que existeixen dues classes d'ADN que actuen de forma diferent respecte a la metilació (6). Un grup de gens que són actius en cèl.lules somàtiques i que es troben altament metilats en els espermatozoides, aquests gens s'activarien posteriorment per dilució de la metilació. Un altre grup de seqüències que inclouen DNA altament repetitiu i determinats genomes vírics integrats que arriben al cigot de forma desmetilada i es metilen durant el desenvolupament (7).

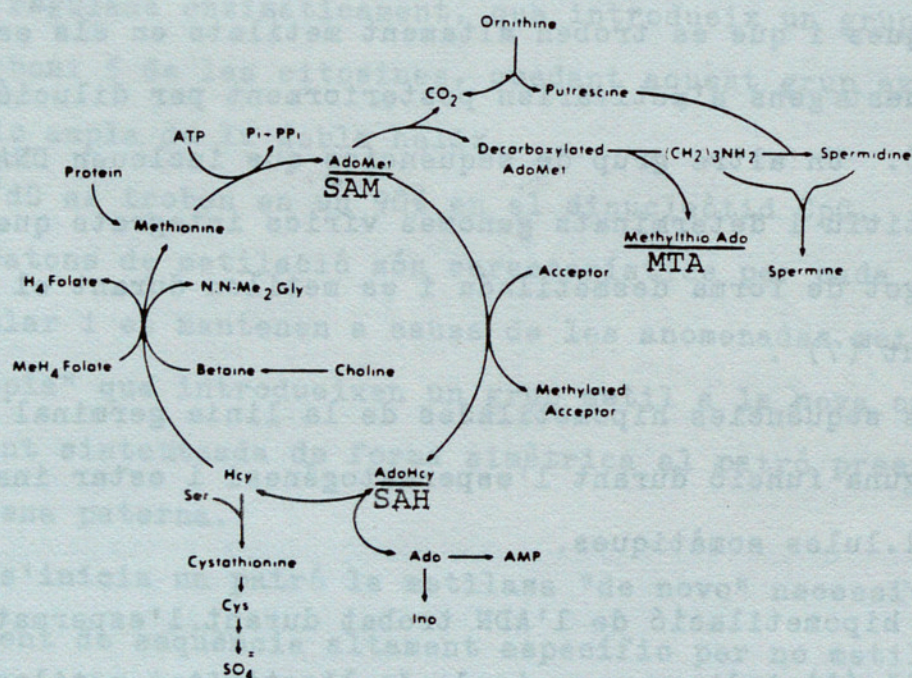
Les seqüències hipometilades de la línia germinal poden tenir alguna funció durant l'espermatogènesi i estar inactives a les cèl.lules somàtiques.

La hipometilació de l'ADN trobat durant l'espermatogènesi del gall (1) indica una caiguda de l'activitat metilasa. Ja que la metilasa és un enzim limitant la caiguda d'activitat es podrà explicar per una disminució de la quantitat d'enzim (8). D'altra banda el balanç SAM (sustracte)/SAH (producte i inhibidor de les transmetilacions) s'ha postulat com a factor regulador de l'activitat de l'enzim (9).

La SAM actua de sustrate, tant en les transmetilacions com en la síntesi de poliamines (Fig.1). A més a més ambdós processos podrien estar relacionats, ja no únicament pel sustrate comú (SAM) sinó perquè les poliamines s'ha comprovat que "in vitro" poden inhibir l'activitat metilasa d'ADN (10).

Per l'estudi de les activitats enzimàtiques de metilació de l'ADN és important quantificar els nivells de SAM, SAH i MTA al teixit germinal durant el procés de diferenciació i comparar aquest nivell amb els d'un teixit somàtic, el fetge.

D'altra banda la quantificació de la MTA pot ésser indicativa de l'activitat de síntesi de poliamines.



**Fig. 1.** - Vies metabòliques relacionades amb la SAM i els seus metabòlits sulfurats.

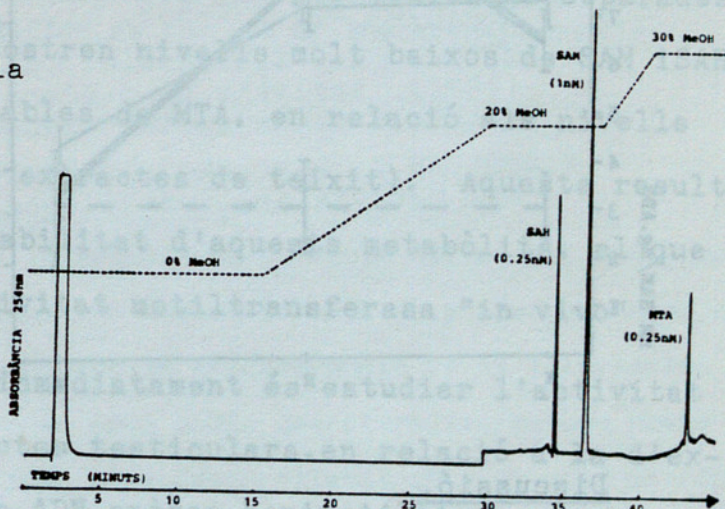
### Metodologia.

L'obtenció dels metabòlits s'ha fet, a partir de teixit fresc o immediatament congelat en  $N_2$  líquid, mitjançant extracció directa amb àcid sulfosalicílic al 5% p/v (11). També s'han extret metabòlits de suspensions cel·lulars obtingudes en presència (+) o absència (-) de adenosina (inhibidor de la SAH hidrolasa) i també a partir de les fraccions cel·lulars, (indicatives de les diferents fases de l'espermatogènesi) obtingudes per elutriació.

L'anàlisi de l'extracte s'ha fet mitjançant HPLC. La columna utilitzada ha estat una RP-18 (partícula esfèrica de  $5 \mu$ ) i la separació dels metabòlits s'ha aconseguit a una temperatura de  $45^\circ C$  i un flux de 1 ml/min. Els solvents d'elució han estat A)  $KH_2PO_4$  50 mM, àcid heptansulfònic 5 mM pH = 3.2 i B) metanol

Fig.2.- Cromatograma de la separació dels patrons : SAM (1nM) , SAH (0.25nM) i MTA (0.25).

El pic que s'observa als 3 minuts és degut a l'àcid sulfusalicílic.



### Resultats.

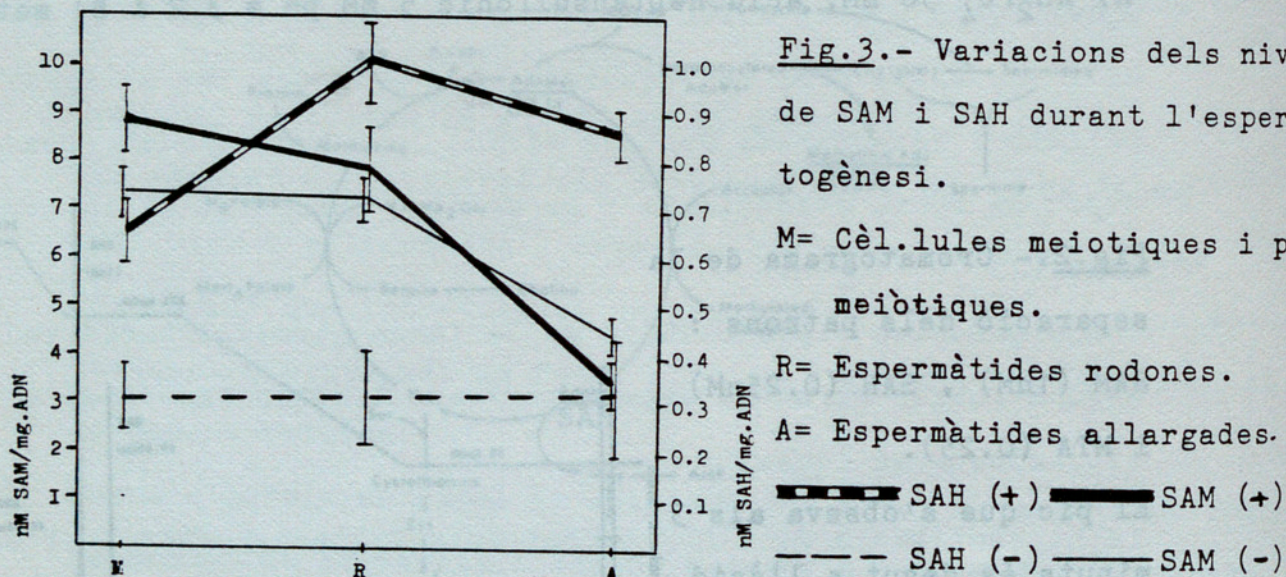
La quantitat obtinguda de cada metabòlit s'ha calculat en referència a cada un dels tres patrons (SAM, SAH i MTA).

Els resultats es donen en forma de nM de cada un dels metabò-

lits per mgr. d'ADN (Taula I i Fig 3).

	SAM	SAH	SAM/SAH	MTA
TM	29.2 ± 1.0	3.6 ± 0.1	8.2	1.0 ± 0.1
TI	9.3 ± 0.6	2.0 ± 0.2	4.6	—
F	52 ± 3.0	20 ± 1.5	2.6	0.75 ± 0.1
E	—	—	—	—
CT(+)	11.4 ± 0.2	1.8 ± 0.1	6.3	—
CT(-)	8.9 ± 0.5	0.5 ± 0.1	17.8	—

Taula I.- Resultats obtinguts en teixits : Testicle madur (TM)  
Testicle immatur (TI), Fetge (F) així com en esperma-  
tozoides (E) i en suspensions cel.lulars totals (CT)  
preparades en presència (+) o absència (-) de adenosina.



### Discussió.

La hipometilació de l'ADN (1), indicativa d'una disminució de l'activitat DNA metiltransferasa, junt amb l'increment en la biosíntesi de poliamines durant l'espermiogènesi (2) podrien reflexar-se en els nivells i proporcions relatives de SAM, SAH i MTA

existens en el teixit testicular en relació als detectats en un teixit somàtic.

Els resultats obtinguts per HPLC en teixits frescos o ràpidament congelats i extrets directament indiquen que els nivells absoluts de SAM i SAH en teixit testicular es troben disminuïts respecte al teixit hepàtic, el que podria suggerir l'existència d'una menor activitat transmetilant en la línia germinal. El fet de que la relació SAM/SAH sigui superior en el testicle madur que en el immatur i sobre tot en relació al fetge indicaria d'una banda l'existència d'un menor flux:  $SAM \rightarrow SAH$  i en conseqüència menys activitat de transmetilació en el testicle madur. D'altra banda la relació SAM/SAH indica que la disminució en l'activitat metiltransferasa no seria deguda a l'excés de SAH sinó que podria justificar-se bé per una disminució de la quantitat d'enzim (8) o per la presència d'altres inhibidors (10,12).

Els resultats obtinguts a partir de suspensions cel·lulars, tant per cèl·lules totals (CT) (Taula I) com per cèl·lules separades per elutriació (Fig. 3) mostren nivells molt baixos de SAM i SAH i pràcticament no detectables de MTA, en relació als nivells endògens (els trobats en extractes de teixit). Aquests resultat és indicatiu de la inestabilitat d'aquests metabòlits, el que fa difícil de mesurar l'activitat metiltransferasa "in vivo".

El que ens proposem fer immediatament és estudiar l'activitat metiltransferasa d'extractes testiculars, en relació a la d'extractes hepàtics sobre un ADN exògen hemimetilat.

#### Bibliografia.

- 1.- ROCAMORA, N., MEZQUITA, C., (1984). Hypomethylation of DNA in meiotic and postmeiotic rooster testis cells. FEBS LETT. 177, 81-84.

- 2.- OLIVA, R., VIDAL, S., MEZQUITA, C., (1982). Cellular content and biosynthesis of polyamines during rooster spermatogenesis. Biochem J. 208, 269-273.
- 3.- 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.
- 4.- OPT, M.O., SPERLING, I., 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.
- 5.- KONIECZNY, S.F. and EMERSON, Ch.P.Jr. (1984). 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells : Evidence for regulatory Genes controlling determination. Cell, 38, 791-800.
- 6.- TAYLOR, J.H. (1984). DNA methylation and cellular differentiation. Cell Biol. Monographs. 11.
- 7.- JAHNER, D., STUHLMANN, H., STEWART, C.L., HARBERS, K., LOHLER, J., SIMON, I. and JAENISCH, R. (1982). De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis Nature, 298, 623-628.
- 8.- SZYF, M., AVRAHAM-HAETZNI, K., REIFMAN, A., SHLOMAI, J., KAPLAN, F., OPPENHEIM, A. and RAZIN, A. (1984). DNA methylation pattern is determined by the intracellular level of the methylase. Proc. Natl.Sci. USA 81, 3278-3282.
- 9.- HOFFMAN D.R. (1980). S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine metabolism in isolated rat liver. J.Biol. Chem. 255, 10822-10827.
- 10.- COX, R. (1979). Polyamines inhibit DNA methylation in vitro B.B.R.C. 86, 594-598.
- 11.- MIURA, G.A., SANTANGELO, J.R., GORDON, R.K. and CHIANG, P.K. (1984). Analysis of S-Adenosylmethionine and related sulfur metabolites in animal tissues. Anal. Biochem, 141, 161-167.
- 12.- BOLDEN, A., WARD, Ch., SIEDLECKI, J.A. and WEISSBACH, A. (1984) DNA Methylation. J.Biol.Chem. 259, 12437-12443.