

Capítulo 6

Desmetilación activa del ADN: un mecanismo epigenético para la reactivación de genes silenciados

Ariza RR, Roldán-Arjona T¹, García-Ortiz MV, Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo AP, Martínez-Macías MI, Ponferrada-Marín MI, Schiliro E

Dep. de Genética, Edificio C5 (Gregor Mendel), Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba;
¹CE: <ge2roarm@uco.es>

RESUMEN

Los mecanismos de control epigenético son esenciales para una regulación estable de los patrones de expresión génica y desempeñan un papel central en los ciclos de vida de animales y plantas. La metilación de la citosina en el carbono 5 del anillo de pirimidina (5-meC) es una marca epigenética estable, pero reversible, que promueve el silenciamiento génico transcripcional. Comprender cómo se regula el estado de metilación del genoma a nivel global o local requiere una definición de los procesos enzimáticos que metilan y desmetilan el ADN. Sin embargo, aunque las enzimas responsables del establecimiento y mantenimiento de la metilación de ADN han sido bien caracterizadas, los mecanismos de desmetilación no se conocen con exactitud. Nuestro grupo, junto con otros, ha obtenido datos genéticos y bioquímicos que sugieren que dos proteínas de Arabidopsis con dominio ADN glicosilasa (ROS1 y DME) actúan como ADN desmetilasas capaces de activar la expresión de genes previamente silenciados. Nuestros resultados previos indican que ROS1 y DME catalizan la liberación de 5-meC del ADN mediante un mecanismo ADN glicosilasa. Estos resultados sugieren que una de las funciones de ROS1 y DME es iniciar el borrado de 5-meC mediante un proceso de escisión de bases y proporcionan una importante evidencia bioquímica a favor de la existencia de una ruta de desmetilación activa en plantas. En la actualidad, nuestro grupo de investigación se concentra en caracterizar funcionalmente este novedoso mecanismo de control epigenético mediante una aproximación multidisciplinar que combina metodologías del campo de la bioquímica, la genética y la biofísica. Este estudio suministrará una información esencial para entender los mecanismos responsables de la reprogramación epigenética en el núcleo celular, con aplicaciones potenciales en biotecnología y biomedicina.

Palabras clave: expresión génica, silenciamiento transcripcional, epigenoma.

Introducción

Los procesos responsables de la transmisión estable de estados concretos de actividad génica son esenciales para un correcto desarrollo, y se agrupan bajo el término de mecanismos epigenéticos. Como tales se entienden aquellos procesos que ocasionan cambios en la función génica heredables mitóticamente y meióticamente y que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia del ADN.

Más allá de la secuencia primaria del ADN, los mecanismos epigenéticos asignan un papel crucial a la organización de la cromatina en el establecimiento de patrones específicos de expresión génica. El avance en el estudio de la epigenética ha favorecido el uso del concepto de epigenoma como responsable de la regulación del genoma.

A diferencia del genoma, que es idéntico en todos los tipos celulares a lo largo de la vida, el epigenoma es dinámico y cambia en cada tipo celular y en cada momento del ciclo vital. De este modo, el epigenoma incluye un conjunto de marcas epigenéticas que constituyen una capa adicional de información, superpuesta a la secuencia de ADN. Hasta la fecha, los dos tipos de marcas epigenéticas identificadas son la modificación covalente de proteínas cromatínicas y la

metilación de ADN.

La metilación de ADN y su papel en el silenciamiento génico

La metilación de ADN se ha detectado en los genomas de diversos organismos, incluyendo procariontes y eucariontes. En procariontes, la metilación tiene lugar tanto en citosina como en adenina, participa en el sistema de restricción y modificación, y puede causar la activación o la represión de la transcripción. En eucariontes multicelulares, por el contrario, esta restringida a residuos de citosina y se asocia con una inhibición de la expresión génica. La metilación de ADN en eucariontes se ha detectado en protistas, hongos, plantas y animales y desempeña funciones importantes en el establecimiento de programas de desarrollo y en la defensa del genoma frente a elementos parasíticos móviles. La hipermetilación de genes supresores de tumores se considera además un importante mecanismo en el desarrollo de muchos tipos frecuentes de cáncer.

La metilación de ADN es llevada a cabo por ADN metiltransferasas que catalizan la transferencia de un grupo metilo desde la S-adenosil-L-metionina al carbono 5 de la citosina. La mayor parte de la metilación de ADN en mamíferos y plantas está restringida a secuencias simétricas CpG, pero las plantas poseen además niveles

significativos de citosinas metiladas en el contexto simétrico CpNpG (donde N puede ser cualquier nucleótido) e incluso en contextos asimétricos. Los patrones de metilación de ADN son establecidos por ADN metiltransferasas que actúan *de novo* sobre ADN bicatenario no metilado. La metilación en secuencias simétricas se preserva durante los sucesivos ciclos de replicación por la acción de metiltransferasas de mantenimiento, que muestran una preferencia por sustratos hemimetilados y modifican las citosinas simétricas presentes en la cadena de nueva síntesis. Los mecanismos de mantenimiento de la metilación en secuencias asimétricas se desconocen, pero se considera que deben incluir una metilación *de novo* después de cada división celular.

Hay dos mecanismos generales mediante los cuales la metilación de ADN inhibe la expresión génica. En primer lugar, la modificación de residuos de citosina puede reprimir de forma directa la transcripción al bloquear la unión de activadores transcripcionales a sus secuencias diana. En segundo lugar, existen proteínas que reconocen ADN metilado y pueden reclutar co-represores que efectúan el silenciamiento de la expresión génica. Se dispone de una amplia evidencia experimental sobre la existencia en vertebrados y plantas de proteínas de unión a secuencias CpG metiladas ("methyl-CpG-binding proteins"; MBP) que usan co-represores transcripcionales para silenciar la transcripción y modificar la cromatina, lo que proporciona un vínculo entre la metilación de ADN y la remodelación y modificación cromatínicas.

La metilación de ADN es una señal biológica reversible, pero los mecanismos de desmetilación no se conocen con exactitud

La metilación de ADN es importante para la iniciación, establecimiento y mantenimiento del silenciamiento génico a lo largo de sucesivas divisiones celulares. Pero, al igual que otras modificaciones bioquímicas, también es un proceso reversible. La desmetilación del ADN puede tener lugar de forma pasiva, por ausencia de metilación de mantenimiento durante varios ciclos de replicación, o como un proceso activo en ausencia de replicación. En embriones preimplantacionales de mamíferos el genoma materno se desmetila de forma pasiva a lo largo de las sucesivas divisiones celulares, mientras que el genoma paterno se desmetila por un mecanismo activo inmediatamente tras la fecundación. Además de esta desmetilación global, también tiene lugar una desmetilación local en posiciones específicas del genoma a lo largo del desarrollo y durante la diferenciación tisular.

En un claro contraste con el avance registrado en el análisis genético y molecular de los mecanismos de metilación de ADN, los procesos mediante los que las células desmetilan activamente su genoma, ya sea global o localmente, siguen siendo prácticamente desconocidos. Aunque se ha propuesto la eliminación directa del grupo metilo de los residuos de 5-meC, este mecanismo se ha visto seriamente cuestionado al implicar la rotura termodinámicamente desfavorable de un enlace carbono-carbono y las pruebas experimentales en su favor no han

podido ser reproducidas de forma independiente por otros laboratorios. Otro mecanismo alternativo es la rotura del enlace N-glicosídico entre la 5-meC y la desoxirribosa, seguida de la sustitución por una citosina no metilada. En 1995 se identificó embriones de pollo una actividad 5-meC-ADN glicosilasa y posteriormente se encontró que dicha actividad co-purificaba con una proteína homóloga a la timidina-ADN glicosilasa humana (TDG). Más tarde se encontró que MBD4 ("methyl CpG binding protein 4"), otra ADN glicosilasa sin semejanza estructural a TDG, también poseía actividad 5-meC-ADN glicosilasa *in vitro*. Tanto TDG como MBD4 son ADN glicosilasas que muestran una preferencia por residuos de U y T en pares incorrectos U:G o T:G localizados en un contexto CpG. En comparación, su actividad frente a residuos de 5-meC en pares 5-meC:G es mucho más baja, por lo que su función en procesos de desmetilación de ADN no está clara. También se ha sugerido que la desmetilación de ADN podría tener lugar indirectamente por desaminación de 5-meC a T catalizada por la enzima Aid ("activation-induced deaminase"), y la posterior reparación del par erróneo resultante T:G. Resultados recientes obtenidos durante el análisis de la desmetilación de un gen endógeno en células de mamífero en cultivo indican que la desmetilación conlleva la inducción de roturas de ADN lo que sugiere la implicación de una ruta de reparación de ADN.

Pruebas a favor de un mecanismo de desmetilación de ADN por escisión de 5-meC

El trabajo de varios grupos de investigación, entre ellos el nuestro, ha proporcionado pruebas convincentes a favor de una desmetilación activa de ADN en plantas mediada por ADN glicosilasas (Morales-Ruiz et al, 2006). El gen *ROS1* ("repressor of silencing 1") de *Arabidopsis* fue identificado por nuestro grupo en colaboración con el laboratorio del Dr. Zhu mediante un escrutinio para identificar mutantes con expresión alterada del transgén *RD29A-LUC* (Gong et al, 2002). Mientras que en plantas silvestres se detecta la expresión de dicho transgén y de su gen homólogo endógeno, en los mutantes *ros1* ambos loci se encuentran transcripcionalmente silenciados e hipermetilados (Gong et al, 2002).

La proteína codificada por *ROS1* presenta una secuencia significativamente similar al producto de un segundo gen de *Arabidopsis* denominado *DME (DEMETER)*. *DME* fue identificado en un escrutinio diseñado para detectar mutaciones cuyos efectos sobre la viabilidad de las semillas dependiesen del origen parental del alelo mutante. *DME* se expresa primordialmente en la célula central del gametofito femenino, donde es necesario para la expresión de los alelos maternos de los genes improntados *MEA* y *FWA*. Al menos en el caso de la impronta de *MEA*, el requerimiento de un gen *DME* activo se ve contrarrestado por mutaciones en el gen de la metiltransferasa *MET1*. Así pues, *ROS1* es necesario para contrarrestar el silenciamiento transcripcional de un transgén hipermetilado y *DME* activa la expresión materna de dos genes con impronta, silenciados por metilación.

ROS1 y *DME* codifican proteínas voluminosas, que contienen un dominio ADN glicosilasa con una similitud de secuencia significativa a proteínas de reparación por escisión de bases pertenecientes a la superfamilia HhH-GPD (Figura 1). La presencia de un residuo invariante de lisina en el motivo HhH-GPD indica que *ROS1* y *DME* pertenecen al subconjunto de ADN glicosilasas/liasas, capaces de hidrolizar el enlace N-glicosídico que une la base al ADN y posteriormente romper el esqueleto azúcar-fosfato en el sitio donde se ha eliminado la base.

Nuestro grupo ha demostrado con anterioridad que una forma recombinante truncada de *ROS1* es capaz de introducir roturas de cadena en ADN plasmídico metilado (Gong et al, 2002), y la expresión ectópica de *DME* en plantas da lugar a roturas en el promotor de *MEA*. Además, la mutación de un ácido aspártico invariante en el motivo HhH-GPD suprime su capacidad para activar la transcripción de *MEA* en la célula central del gametofito femenino.

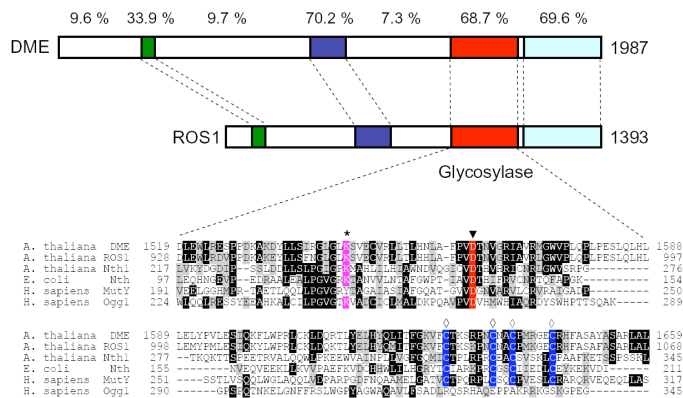


Figura 1. ROS1 y DME contienen un dominio ADN glicosilasa y están estrechamente relacionadas. (A) Diagrama de ROS1 y DME con los dominios conservados representados por regiones coloreadas. El porcentaje de residuos idénticos en ambas proteínas se muestra en la parte superior de cada región. (B) Alineamiento de la secuencia aminoacídica de ROS1 (aminoácidos 928-1068) y DME (1519-1659) con las proteínas Nth1 de *A. thaliana*, Nth de *E. coli*, y MutY y Ogg1 de *H. sapiens*. Los asteriscos marcan un residuo de lisina característico de las enzimas con actividad bifuncional ADN glicosilasa/liasa; el triángulo indica el residuo de ácido aspártico conservado en el sitio activo; los rombos señalan los residuos de cisteína que en la enzima Nth de *E. coli* unen un complejo sulfoférrico [4Fe-4S].

Los efectos de *ROS1* y *DME* al contrarrestar la metilación de ADN y el silenciamiento génico podrían explicarse de distintas formas. Una posibilidad es que ambas proteínas ejerzan un efecto indirecto debido a interacciones con factores transcripcionales y proteínas que modifican la cromatina, quizá promovidas por incisiones en el ADN que facilitan una remodelación local. Una segunda posibilidad es que *ROS1* y *DME* efectúen directamente una escisión de residuos de 5-meC del ADN, iniciando su sustitución por citosina no metilada, y dando lugar a una hipometilación y la activación de la expresión génica. Nuestra reciente caracterización bioquímica de la actividad enzimática de *ROS1* y *DME* apoya claramente el segundo mecanismo, al demostrar que tanto *ROS1* como *DME* catalizan directamente la liberación de 5-meC del ADN mediante un mecanismo glicosilasa/liasa (Morales-Ruiz et al, 2006) (Figura 2).

Análisis funcional de la desmetilación de ADN

Uno de nuestros objetivos inmediatos es caracterizar bioquímicamente la actividad 5-meC glicosilasa e identificar otros cambios epigenéticos inducidos por *ROS1* y *DME* en la cromatina. En la actualidad estamos generando versiones mutantes de *ROS1*/*DME* para explorar los motivos estructurales y los residuos críticos para su actividad ADN glicosilasa y su capacidad de interacción con el ADN. También estamos analizando si, además de liberar 5-meC, *ROS1* y *DME* son capaces de inducir cambios epigenéticos adicionales en la cromatina.

Otro de nuestros objetivos es identificar el mecanismo de búsqueda y reconocimiento de residuos de 5-meC en el ADN. *ROS1* y *DME* han de realizar la difícil tarea de buscar y reconocer los residuos de 5-meC en la doble hélice de ADN entre un gran número de residuos no metilados de citosina. Existen dos mecanismos posibles: un mecanismo no procesivo, en el que la enzima extrude al azar residuos del ADN hasta que localiza una 5-meC, y un mecanismo procesivo, en el que la enzima se une aleatoriamente a una base y la extrude, pero a continuación migra a lo largo de la doble hélice intercambiando una base extrahelicoidal por la siguiente hasta que encuentra una 5-meC que se adapte a su sitio activo. Para distinguir entre ambas posibilidades emplearemos la microscopía de fuerza atómica (“atomic force microscopy”; AFM) de alta velocidad, que permite analizar el comportamiento dinámico de *ROS1* y *DME* en su interacción con el ADN. Determinaremos si *ROS1* y *DME* se disocian del ADN tras cada ciclo de reacción o si migran a lo largo del ADN.

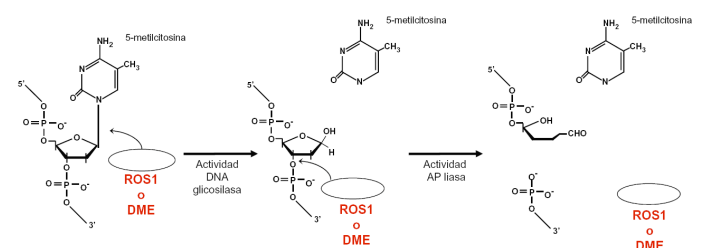


Figura 2. ROS1 y DME procesan los residuos de 5-meC del ADN mediante un mecanismo ADN glicosilasa liasa que genera un intermediario covalente transitorio [ver detalles en (Morales-Ruiz et al, 2006)].

También nos interesa determinar si el ARN desempeña algún papel guiando a *ROS1* y *DME* hacia sus secuencias diana. El proceso de escisión de 5-meC iniciado por *ROS1* y *DME* participa en la desmetilación local de genes específicos durante el desarrollo. Tanto *ROS1* como *DME* son proteínas voluminosas, en las que el dominio ADN glicosilasa constituye sólo una pequeña parte. Es probable que el resto de la proteína sea importante para dirigir su actividad ADN glicosilasa a genes específicos, ya sea directamente o mediante interacciones con otros factores. Nuestra hipótesis actual es que el ARN puede ejercer una función guiando a *ROS1* y *DME* a sus genes diana. Por una parte, existen datos genéticos que sugieren que *ROS1* podría estar conectado a una ruta que genera RNAs cortos. Además, disponemos de datos bioquímicos (nuestros resultados no publicados) que

indican que ROS1 y DME son proteínas capaces de unirse a ARN. Estamos purificando ROS1 y DME en estado nativo y determinaremos la posible presencia de RNAs cortos asociados. Asimismo, examinaremos si siRNA asociados a ROS1 y DME pueden dirigir su actividad desmetilasa, "cargando" in vitro ROS1 o DME con un siRNA homólogo a un sustrato de ADN que se usará en un ensayo de incisión de oligonucleótidos

ROS1 y DME son ADN glicosilasas atípicas de un gran tamaño, con múltiples dominios que sugieren interacciones tanto con ácidos nucleicos como con diversas proteínas. La identificación de proteínas que interactúan con ROS1 y DME es esencial para comprender cómo funcionan ambas enzimas in vivo, y su papel en la ruta de activación epigenética. En la actualidad estamos utilizando dos aproximaciones (un escrutinio con el sistema de doble híbrido en levadura y una combinación de Purificación por afinidad en tándem y espectrometría de masas) para identificar proteínas que interaccionan con ROS1 y DME.

Agradecimientos

El trabajo de nuestro grupo de investigación se encuentra financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (Proyectos BMC2001-1797, BFU2004-05303 y BFU2007-60956/BMC), la Junta de Andalucía (Grupo PAI CVI-301) y la Universidad de Córdoba (Programa Propio de Fomento de la Investigación).

Referencias

Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo AP, Ponferrada-Marin M. I, Martínez-Macias MI, Ariza RR, Roldan-Arjona T

(2006): DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine ADN glycosylases. Proc Natl Acad Sci USA 103: 6853-6858.

Gong Z, Morales-Ruiz T, Ariza RR, Roldan-Arjona T, David L, Zhu JK (2002): ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a ADN glycosylase/lyase. Cell 111: 803-814.

García-Ortiz MV, Roldan-Arjona T, Ariza RR (2007): The noncatalytic C-terminus of AtPOLK Y-family ADN polymerase affects synthesis fidelity, mismatch extension and translesion replication. FEBS J 254: 3340-3350.

García-Ortiz MV, Ariza RR, Hoffman PD, Hays JB, Roldán-Arjona T (2004): Arabidopsis thaliana AtPOLK encodes a DinB-like ADN polymerase that extends mispaired primer termini and is highly expressed in a variety of tissues. Plant J 39: 84-97.

Morales-Ruiz T, Birincioglu M, Jaruga P, Rodriguez H, Roldan-Arjona T, Dizdaroglu, M (2003): Arabidopsis thaliana Ogg1 protein excises 8-hydroxyguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine from oxidatively damaged ADN containing multiple lesions. Biochemistry 42: 3089-3095.

García-Ortiz MV, Ariza RR, Roldán-Arjona T (2001): A chemiluminescent method for the detection of ADN glycosylase/lyase activity. Anal Biochem 298: 127-129.

García-Ortiz MV, Ariza RR, Roldán-Arjona T (2001): An OGG1 orthologue encoding a functional 8-oxoguanine ADN glycosylase/lyase in Arabidopsis thaliana. Plant Mol Biol 47: 795-804.

Roldán-Arjona T, García-Ortiz MV, Ruiz-Rubio M, Ariza RR (2000): cDNA cloning, expression and functional characterization of an Arabidopsis thaliana homologue of the Escherichia coli ADN repair enzyme endonuclease III. Plant Mol Biol 44: 43-52.