

R. 31.418
#137

T.O
#137

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**EXPRESIÓN DEL GEN FMR1 Y SU REPRESIÓN
POR ÓXIDO NÍTRICO VÍA METILACIÓN DEL
PROMOTOR**

Tesis doctoral presentada por
D. ABDELKRIM HMADCHA

Sevilla, 2000



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR

AVDA. SANCHEZ PIZJUAN, 4
41009 - SEVILLA

Dña. Elizabeth Pintado Sanjuán, Profesora titular del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Certifica que:

D. Abdelkrim Hmadcha, Licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección en dicho departamento el trabajo titulado **“Expresión del gen FMR1 y su represión por Óxido Nítrico vía metilación del promotor”**, reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Sevilla, 21 de Febrero del 2000.

VºBº del Director

E. Pintado

Dra. Elizabeth Pintado



El interesado

Hmadcha

D. Abdelkrim Hmadcha

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
NEGOCIADO DE TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al

folio 89 número 27 del libro correspondiente.

06 MAR. 2000

Sevilla,

El Jefe del Negociado.

Alvarez

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Elizabeth Pintado, por el apoyo prestado durante la realización de este trabajo y por ser mi guía en el aspecto científico.

A todos los profesores de este Departamento por sus consejos y por conseguir hacer de mi estancia en el Departamento una experiencia fructífera.

A todos los compañeros de este Departamento y de los demás Departamentos de la Facultad de Medicina por el tiempo compartido.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. El síndrome del cromosoma X-frágil y el gen FMR1	1
1.1 Estructura del gen FMR1	2
1.2 Expresión del gen FMR1	3
1.3 Función del gen FMR1	4
2. La metilación del AND	5
2.1 ADN metiltransferasa	7
3. Metabolismo y dianas de acción del óxido nítrico	9
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y MÉTODOS	15
1. Obtención de las muestras	15
1.1 Muestras de sangre y de tejidos	15
1.2 Líneas celulares	15
2. Reactivos	15
3. Procedimientos	16
3.1 Preparación de linfocitos humanos	16
3.2 Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares	16

3.2.1	Células en suspensión	17
3.2.2	Células adherentes	17
3.2.3	Congelación de las líneas celulares	17
3.3	Determinación de la viabilidad y proliferación celular	17
3.3.1	Exclusión con azul de tripán	18
3.3.2	Actividad LDH en el sobrenadante libre de células	18
3.4	Medida de los nitritos	18
3.5	Extracción del ADN y determinación de su concentración	19
3.5.1	Extracción por el método de la precipitación salina	19
3.5.2	Extracción con fenol	20
3.5.3	Determinación de la concentración del AND	21
3.6	Reacción en cadena de la polimerasa ("PCR")	21
3.6.1	Amplificación del locus FRAXA	22
3.6.2	Detección del producto amplificado	22
3.7	Técnica de transferencia de Southern	23
3.7.1	Obtención y marcaje de la sonda	24
3.7.2	Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción	25
3.7.3	Electroforesis en gel de agarosa y tratamiento del gel	25
3.7.4	Hibridación con la sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	26
3.8	Extracción del ARN	27
3.8.1	Extracción del ARN a partir de tejidos	27
3.8.2	Extracción del ARN a partir de líneas celulares	28
3.9	Reacción de la transcriptasa inversa y RT-PCR	29
3.10	Secuenciación del producto de PCR	30

3.11	Técnica de transferencia de Northern	31
3.11.1	Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante	32
3.11.2	Hibridación con la sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	32
3.12	Técnica de transferencia de Western	33
3.12.1	Lisis celular para el análisis de proteínas nucleares	33
3.12.2	Electroforesis y transferencia de proteínas	34
3.12.3	Transferencia a una membrana de "polyvinylidene difluoride"	34
3.12.4	Incubación con los anticuerpos ("Immunoblotting")	35
3.12.5	Revelado por el método ("ECL")	35
3.13	Determinación de diferentes actividades enzimáticas	35
3.13.1	ADN metiltransferasa	36
3.13.2	Lactato deshidrogenas	37
3.13.3	Piruvato quinasa	37
3.13.4	Hexoquinasa	37
RESULTADOS		38
1.	Estudio de la expresión del gen FMR1 por RT-PCR de las zonas KH1 y KH2	38
1.1	Expresión en distintos tejidos y en diferentes especies	38
1.2	Expresión en familias X-frágile	40
2.	Efecto de la IL-1 β sobre la expresión del gen FMR1 en células RIN	41
2.1	El efecto inhibitor de la IL-1 β es mediado por el óxido nítrico	41
2.2	El óxido nítrico no altera la estabilidad del ARN mensajero	42
3.	Efecto de los dadores de óxido nítrico en células Jurkat	43

3.1 Efecto del SNP y SIN sobre la expresión del gen FMR1	43
3.2 Efecto del óxido nítrico sobre el promotor del gen FMR1	44
3.2.1 Efecto del AzadC sobre el estado de metilación del gen FMR1	45
3.2.2 Reexpresión del gen FMR1 por agentes desmetilantes	46
4. Efecto de los dadores de óxido nítrico sobre la actividad ADN MeTasa	47
4.1 Efecto de la IL-1 β y SIN sobre la actividad ADN MeTasa en células intactas	48
4.2 El óxido nítrico no afecta la expresión de la MeTasa	48
4.3 Efecto de los dadores de óxido nítrico sobre la actividad metiltransferasa en extractos nucleares de células Jurkat	49
4.4 El efecto del óxido nítrico es específico sobre la AND MeTasa	51
5. El óxido nítrico inhibe la expresión del gen HPRT	52
6. El estado de metilación producido por el óxido nítrico es reversible	53
7. Efecto de la tricostatina A sobre la metilación del gen FMR1	54
DISCUSIÓN	56
1. La transcriptasa inversa y posterior PCR (RT-PCR) de la zona KH puede ser el método de elección para estudiar la expresión del gen FMR1	56
2. La IL-1 β y los dadores de óxido nítrico inhiben la expresión genética y su efecto no está mediado por la guanil ciclasa	57
3. El óxido nítrico provoca la metilación de la isla CpG del promotor del gen FMR1	58
4. La metilación inducida por óxido nítrico se debe a la activación de la enzima ADN metiltransferasa y óxido nítrico a un aumento de su	

Contenido

enzima ADN metiltransferasa y óxido nítrico a un aumento de su expresión	59
5. El efecto del óxido nítrico sobre la expresión genética depende del tipo de célula y del gen	61
6. La represión de la expresión del gen FMR1 en células de pacientes X-frágiles y en células incubadas con óxido nítrico tiene características diferentes	63
7. El efecto mutagénico del óxido nítrico podría explicarse por su acción sobre la metilación de las citosinas	63
CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	67
ABREVIATURAS	79

INTRODUCCIÓN

1. El síndrome del cromosoma X-frágil y el gen FMR1

En 1991 se caracterizó el gen responsable del síndrome del cromosoma X-frágil denominado FMR1 (Retraso mental ligado al sitio frágil 1). Este síndrome se corresponde con un cuadro descrito por Martin y Bell de retraso mental familiar, de herencia ligada al sexo y con unas características físicas más evidentes en varones postpuberales. El síndrome del X-frágil se asocia a una fragilidad en el brazo largo del cromosoma X, en la región Xq27.3 (figura 1), lo que da nombre al síndrome (Sutherland y Ashforth. 1979). La alteración molecular responsable de la enfermedad es la expansión de los tripletes CGG localizados en la zona 5' no traducida (UTR) del primer exón del gen FMR1. La expansión de los tripletes CGG conlleva la metilación de la isla CpG del promotor y por lo tanto la falta de expresión del gen.

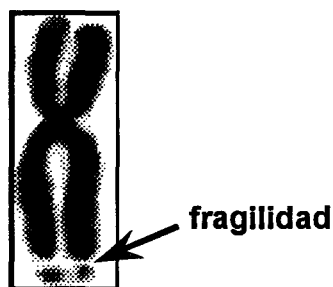


Figura 1: Representación de la fragilidad al final del brazo largo del cromosoma X.

Introducción

1.1 Estructura del gen FMR1

Los estudios sobre el gen FMR1 indican que ocupa unas 38 Kb en Xq27.3 y está compuesto por 17 exones y 16 intrones (figura 2A). La zona de repeticiones de tripletes CGG es polimórfica en la población, siendo los alelos de 29 y 30 repeticiones los más frecuentes (Kunst et al. 1996; De Diego et al. 1999). El gen FMR1 presenta zonas o dominios muy conservados en la escala filogenética (figura 2B). El dominio KH1 se encuentra en el exón VII y el dominio KH2 se localiza entre los exones IX y X. Estos dominios están formados por 90 nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos homóloga a los dominios KH encontrados en las proteínas hnRNP (complejo heterogéneo de proteínas ribonucleares) y en otras proteínas unidoras de ARN (Ashley et al. 1993). Se ha descrito una mutación puntual en el dominio KH2 que produce un fenotipo grave del síndrome lo que apoya la hipótesis de la importancia de esta secuencia en la función de la proteína (De Boulle et al. 1993). En el exón XV se sitúa otra zona conservada que presenta homología con la caja RGG (Verkerk et al. 1993). La caracterización estructural y funcional del promotor del gen FMR1 humano indica que tiene similitudes con la región promotora del gen hnRNP-A2 (Drouin et al. 1997).

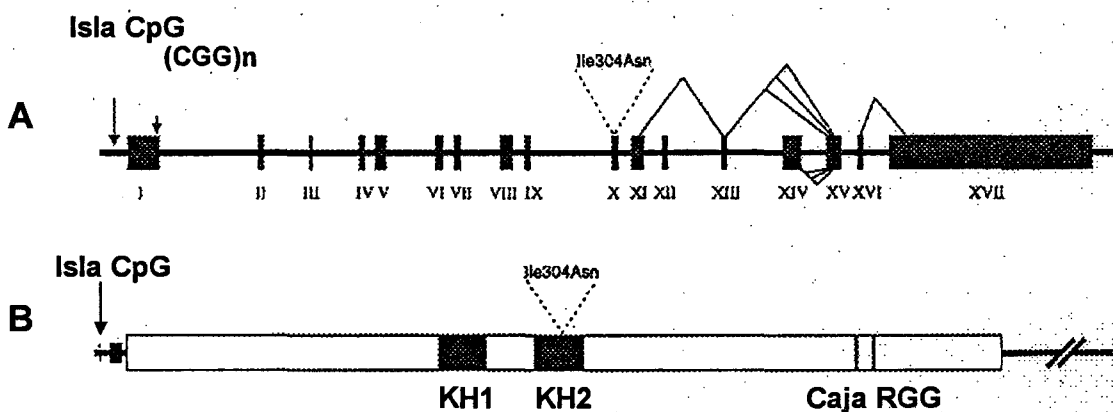


Figura 2: Estructura del gen FMR1. **A:** Esquema de la estructura del gen FMR1. Los exones están representados en números romanos, se indica la posición de la isla CpG y de la zona de repeticiones de tripletes (CGG) $_n$. Los lugares de maduración alternativa están representados por los ángulos superiores. **B:** Localización de los dominios KH, la caja RGG del gen FMR1 y de la mutación puntual en el dominio KH2.

La secuenciación de la zona 5' de la UTR del FMR1 en 44 especies de mamíferos indica una gran conservación de las repeticiones; la mayoría de los mamíferos tienen una media de 8 tripletes que aumenta a una media de 20 en los primates, si bien en éstos las repeticiones no son puras y están interrumpidas por tripletes AGG (Kunst y Warren. 1994; Zhong et al. 1995). Estudios "in vitro" sobre la estructura de hebras simples de ADN repetitivo demuestran que tienen tendencia a formar horquillas (Gacy et al. 1995; Chen et al. 1995). Las interrupciones de los CGG con AGG desorganizan la horquilla haciendo más improbable la expansión. Por otra parte, las estructuras en horquilla representan buenos substratos para las metiltransferasas lo que puede explicar la metilación de la isla CpG en el extremo 5' del gen FMR1 observada en los pacientes X-frágiles (Chen et al. 1995).

1.2 Expresión del gen FMR1

Los estudios de la expresión del gen FMR1 a nivel del ARNm indican que se expresa en numerosos tejidos y más abundantemente en cerebro y testículos (Hinds et al. 1993). En estadíos tempranos del desarrollo embrionario la transcripción es ubicua mientras que en fetos de 20 semanas la expresión es más intensa en cerebro, ojos, hígado, músculo esquelético, médula espinal y pulmones, manteniéndose la expresión en el adulto sobre todo en cerebro, linfocitos y gónadas (Abitbol et al. 1993; Hergersbey et al. 1995) y la expresión esta muy conservada en la escala filogenética (Verheij et al. 1995; Hmadcha et al. 1998).

En familias X-frágiles se observa que existe expresión de ARNm en los portadores pero no en los individuos afectados por el síndrome (Pieretti et al. 1991, Hmadcha et al. 1998). La causa principal de las manifestaciones de este síndrome es la metilación de la isla CpG del promotor. Estudios recientes han observado la reexpresión del gen FMR1, después de tratar células de pacientes

Introducción

X-frárgiles en cultivo con un agente desmetilante como el 5-aza-2'-deoxicitidina (5-azadC) (Chiurazzi et al. 1998).

La metilación del ADN y la desacetilación de las histonas están asociadas a la inactivación transcripcional (figura 3). La proteína MeCP2 ("methyl cytosine-binding protein") se une específicamente a citosinas metiladas y ensambla un complejo proteico que activa a las desacetilasas e inhibe la transcripción. Sin embargo, el tratamiento en "vitro" de células de pacientes X-frárgiles con un inhibidor de las desacetilasas, la tricostatina-A (TSA), conlleva a una acetilación completa de la histona H4, pero no de la histona H3 por lo que no hay reexpresión del gen (Coffee et al. 1999).

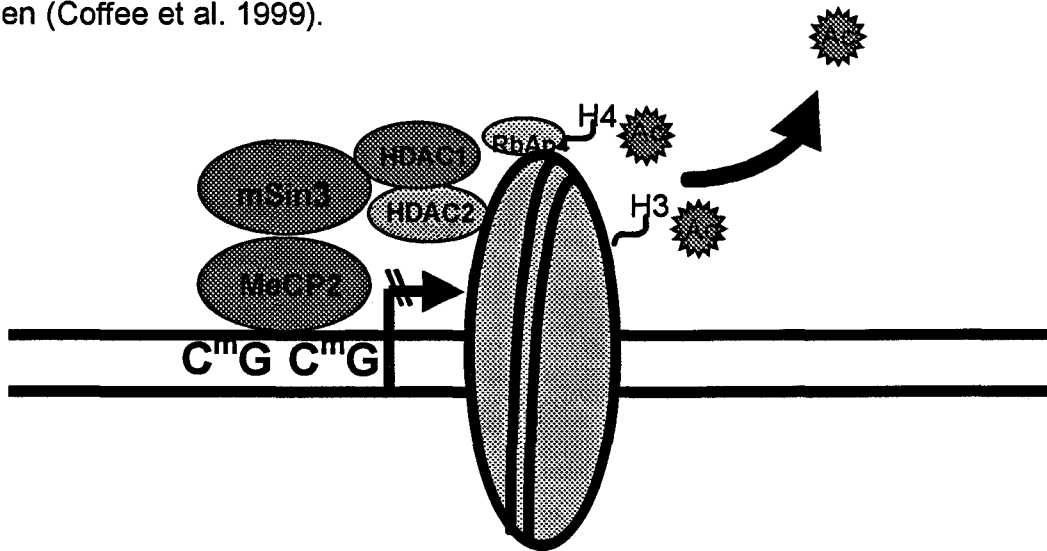


Figura 3: Complejo proteico represor. Modelo de inactivación transcripcional mediado por MeCP2 y formación del complejo represor. La proteína MeCP2 se une a citosinas metiladas ensamblando un complejo proteico que activa a las desacetilasas HDAC1 y HDAC2 que desacetilan a las histonas H3 y H4 dando un estado de la cromatina inaccesible a los factores de transcripción (Tomada de Razin, A.1998).

1.3 Función del gen FMR1

La función del gen FMR1 no se conoce, sin embargo su papel como gen responsable del síndrome del X-frágil se ha establecido de forma inequívoca (De-Boulle et al. 1993). El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen FMR1 (FMRP) indica que forma parte de la familia de proteínas unidoras de ARN que tiene, como se ha dicho anteriormente, dos

Introducción

dominios KH y una caja RGG (Siomi et al. 1994). Utilizando espectroscopía con resonancia magnética nuclear se ha establecido que el dominio KH1 tiene un pliegue alfa-beta que consistiría en tres hojas beta antiparalelas conectadas por dos hélices alfa (Musco et al. 1997). Los estudios de expresión de la proteína han puesto de manifiesto que existen diferentes isoformas que vendrían determinadas por maduración alternativa del ARNm. Las isoformas de 67-90 kDa tienen el mismo extremo amino terminal que las de 39-41 kDa pero se diferencian en el extremo carboxilo-terminal. Estas isoformas de menor tamaño no tienen capacidad de unirse al ARN (Verheij et al. 1995). Se ha demostrado que FMRP puede unir su propio ARNm y a un 4% de todos los ARNm celulares sugiriéndose que tenga alguna función en el metabolismo de estos ARN (Siomi et al, 1994). La proteína FMRP coprecipita con la subunidad 60 S de los ribosomas libres y pegados al retículo endoplasmático (Khandjian et al. 1996; Willemsen et al. 1996; Corbin et al. 1997).

Se han descrito dos proteínas llamadas FXR1 y FXR2 cuyos genes están localizados en los cromosomas 12q13 y 17p13.1 respectivamente, con secuencias sorprendentemente similares entre sí y con el gen FMR1. Tienen dos dominios KH con una identidad del 86% entre FMR1 y FXR1 y del 60% con FXR2. Estas proteínas también actuarían como proteínas unidoras de ARNm, sin embargo su expresión es normal en pacientes con el síndrome X-frágil. Se sugiere que las proteínas FXR1 y FXR2 participarían en la regulación de la actividad de la proteína FMRP (Siomi et al. 1995).

2. La metilación del ADN

En los eucariotas la transcripción está controlada generalmente por combinaciones de proteínas reguladoras. Se cree que cada tipo celular en un eucariota superior contiene una combinación especial de proteínas reguladoras que aseguran la expresión de exclusivamente los genes apropiados para ese tipo de célula. Una proteína reguladora se puede expresar en diferentes

Introducción

circunstancias y en general está implicada en el control de muchos genes. Además de las proteínas de regulación que difunden, en los eucariotas también se utilizan ciertos estados de compactación de la cromatina, para regular la expresión génica (Razin. 1998).

El ADN puede ser modificado de forma covalente, siendo una de estas modificaciones la metilación en citosina que parece constituir un mecanismo importante para distinguir genes activos de los que no lo son. La metilación del ADN en eucariotas, está restringida a los nucleótidos citosina de las secuencias CG (Bender. 1998). Debido al funcionamiento de la vía de reparación de ADN, los residuos de C metilados en el genoma tienden a ser eliminados en el curso de la evolución. La desaminación accidental de una C no metilada da lugar a U, base que habitualmente no está presente en el ADN, por lo que es reconocida fácilmente por la enzima de reparación uracilo-ADN-glucosilasa, eliminada y reemplazada por una C. Pero la desaminación accidental de una 5-metil C no puede ser reparada de este modo, porque el producto de la desaminación es una T que no puede diferenciarse de los otros residuos T del ADN. Aunque existe un sistema especial de reparación para eliminar estas T, muchas de estas desaminaciones no son detectadas, por lo que los residuos C del genoma que están metilados tienden a mutar a T. A lo largo de la evolución más de tres de cada cuatro CG se han perdido por este sistema, dejando a los vertebrados con una deficiencia notable en este dinucleótido. Las secuencias CG que todavía existen están distribuidas de una forma desigual por el genoma, con acumulo de secuencias CG en determinadas regiones denominadas islas CpG. Estas islas, con algunas excepciones, parecen mantenerse no metiladas en todos los tipos celulares; se ha observado que rodean los promotores de los llamados genes de mantenimiento ("housekeeping genes") que codifican proteínas constitutivas, que se expresan en muchas células.

La inhibición de la expresión del gen FMR1 se debe como se ha expuesto anteriormente a la metilación de la isla CpG de su promotor. También se conoce la implicación de la metilación en la inactivación del cromosoma X femenino y en

Introducción

la impronta genética (Keohane et al. 1998; Kladde et al. 1999). Estudios recientes han puesto de manifiesto la relación existente entre la hipermetilación de las islas CpG y la tumorigénesis. El papel de la metilación del ADN y sus posibles efectos sobre la carcinogénesis no se conoce bien (Shaoping et al, 1999). Parece estar implicada la expresión o la actividad inadecuada de la ADN metiltransferasa y la consiguiente inactivación de antioncogenes con islas CpG en el promotor. Paradójicamente, la hipometilación también se asocia a la tumorigénesis probablemente por una expresión génica anormalmente elevada e inducción de oncogenes. Existe un segundo mecanismo oncogénico de la hipermetilación que no afecta a la expresión génica, sino que es directamente mutagénico: la metilación de C aumenta la probabilidad de transiciones CG/TA como se ha descrito anteriormente (Counts y Goodman. 1995).

2.1 ADN metiltransferasa

La ADN Metiltransferasa (ADN MeTasa) principal enzima implicada en la metilación del ADN, transfiere un grupo metilo de la S-adenosilmetionina (S-adoMet) al carbono 5' de la citosina (figura 4). Tiene un peso molecular aproximado de 170-190 kDa, con un extremo carboxilo terminal donde se encuentra el centro catalítico con un resto de prolina y cisteína (ProCys) y un extremo amino terminal (2/3 de la enzima) rico en cisteínas (figura 5), que no parece esencial para la catálisis y actuaría de regulador (Bestor et al,1992). El extremo amino esta separado del dominio catalítico por una región flexible bisagra, formada de repeticiones glicina-lisina, y una secuencia que une zinc o ADN (Zn/ADN) independientemente (Glickman et al. 1997).

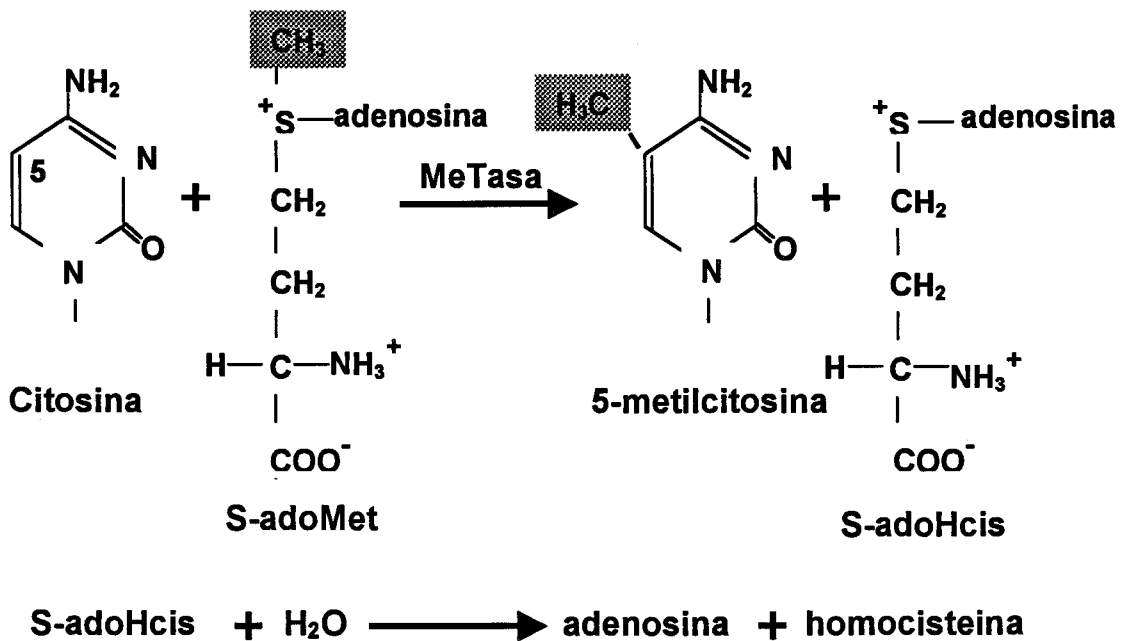


Figura 4: Reacción de la ADN MeTasa. La enzima ADN MeTasa cataliza la transferencia de un grupo metilo (CH₃) de la molécula donante, la S-adoMet a citosinas situadas en secuencias de dinucleótidos CG.

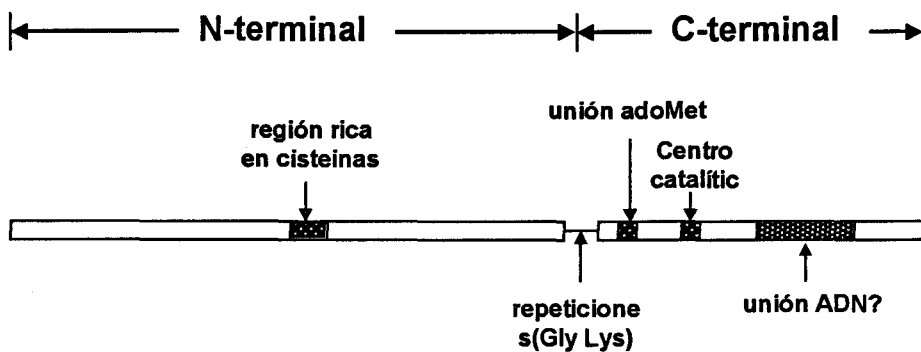


Figura 5: Estructura de la ADN MeTasa. El extremo amino terminal (2/3 de la enzima) es rico en cisteínas y el extremo carboxilo terminal donde se encuentra el centro catalítico con un resto de prolina y cisteína (Tomada de Bestor, 1992).

La ADN MeTasa debe tener un papel muy importante en el desarrollo ya que los ratones transgénicos que carecen del gen para esta enzima, mueren en el estado de embriones tempranos (Li et al. 1992). En Y1, células humanas de la glándula adrenal, la regulación de la expresión de la ADN MeTasa y por lo tanto de su actividad enzimática esta controlada por la vía Ras/Jun y AP1 (Macleod et

al. 1995). Recientemente se ha demostrado que la expresión de la ADN MeTasa incrementa en fibroblastos transfectados con el oncogen fos (Bakin y Curran, 1999).

Se han descrito recientemente tres familias de genes que codifican la ADN MeTasa (Shaoping et al. 1999). El gen dnmt1 se expresa de una manera constitutiva y es responsable de mantener la metilación antes de la replicación, el gen dnmt2 contiene todos los dominios altamente conservados de la metiltransferasa, pero su función es desconocida y se expresa muy poco en la mayoría de los tejidos y la familia dnmt3 que consiste en dos genes relacionados, llamados dnmt3a y dnmt3b (Okano et al. 1998) que son primordiales en la metilación de "novo".

3. Metabolismo y dianas de acción del óxido nítrico

El óxido nítrico (NO), es un radical libre de nitrógeno, relativamente inestable, que actúa de mediador en importantes funciones celulares (Kronke et al. 1997); El interés sobre el posible papel funcional del NO se originó en las observaciones hechas por Magee y Barnes en 1956, sobre nitrosaminas carcinogénicas generadas por el cuerpo humano a partir de los nitratos de alimentos conservados. Cuando los macrófagos son activados por endotoxinas, responden transformando arginina en NO (Xie y Nathan, 1992), el cual les permite eliminar bacterias, hongos y/o células tumorales, mediante acciones intracelulares no precisadas completamente aunque van desde cambios en las características de la membrana celular hasta modificaciones en la secuencia de ADN (Moncada et al. 1991; Kanner et al. 1992).

En estos últimos años se han descritos numerosas acciones mediadas por el NO. Se ha identificado como mensajero químico y como un potente mediador citotóxico en diferentes tejidos (Kolb y Kolb-Bachofen, 1998). Así actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central (SNC) y como efector citotóxico en

Introducción

el sistema inmune (Liew y Cox, 1991). El NO cumple funciones fundamentales, aunque algunas parecen contradictorias.

El NO se sintetiza a partir de L-arginina y oxígeno molecular, mediante una reacción en cascada de transferencia de electrones (figura 6). La reacción esta catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS), que utiliza NADPH y tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactores de óxido reducción, obteniéndose NO y L-citrulina (Nathan y Hibbs. 1991; Guoyao et al. 1998).

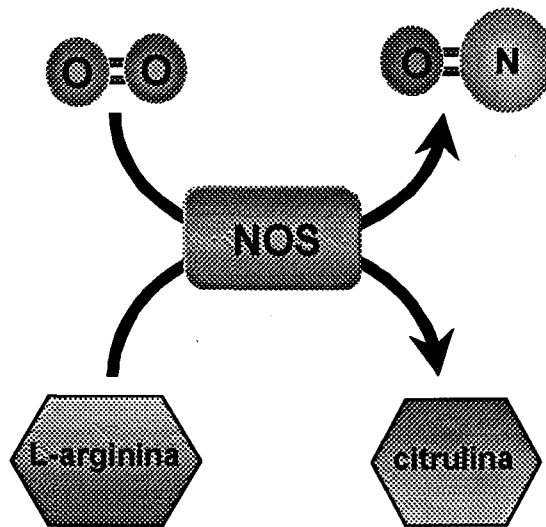


Figura 6: Síntesis enzimática del NO. La óxido nítrico sintasa (NOS) utiliza oxígeno molecular y L-arginina y produce citrulina y óxido nítrico.

La NOS tiene tres isoenzimas: la constitutiva endotelial (eNOS), la constitutiva neuronal (cNOS) y la forma inducible (iNOS). Las isoformas eNOS y cNOS se expresan constitutivamente en dichos tejidos, producen una pequeña cantidad de NO durante un corto periodo de tiempo y son dependientes de calcio-calmodulina. La iNOS es muy activa en macrófagos inmunológicamente activados con interferón γ (IFN γ) y lipopolisacaridos (LPS) (Nathan, 1992), también en células RIN estimuladas con IL-1 β (Andrade et al. 1993). La inducción de la iNOS requiere horas y tiene un tiempo de vida media de días (figura 7).

Las dianas de acción del NO son múltiples, la mejor establecida es la activación de la enzima guanilato ciclasa que cataliza la conversión de GTP a

Introducción

Matthews et al. 1996) y de AP-1 a sus respectivas secuencias específicas en el ADN (Tabuchi et al. 1994). El NO también actúa directamente a nivel del genoma, causando desaminación de los desoxinucleótidos (Nguyen et al. 1992), roturas de las hebras del ADN en regiones ricas en CG, aumento de transiciones CG/TA e inhibición de enzimas de reparación (Sugiura y Matsumoto. 1995; Wilson et al. 1997).

OBJETIVOS

El presente trabajo se centra en el estudio de la expresión del gen FMR-1, cuya alteración produce el síndrome del cromosoma X-frágil. Este síndrome es la primera causa de retraso mental hereditario y la segunda después del síndrome de Down. El gen FMR1 pertenece a los genes de "mantenimiento" con una isla CpG en el promotor, que cuando está metilada reprime la expresión del gen. Nos proponemos estudiar factores que regulen la expresión del gen FMR1 y la ADN metiltransferasa, principal enzima que cataliza la reacción de metilación de las citosinas en secuencias CG. Los objetivos específicos son:

a. Estudiar la expresión del gen FMR-1 en personas normales y en pacientes con el síndrome X-frágil. Estudiar su expresión en distintos tejidos y en diferentes especies.

b. Estudiar la expresión del gen FMR-1 en células en cultivo expuestas a citoquinas y óxido nítrico y analizar el patrón de metilación del gen.

Objetivos

c. Analizar la actividad de la enzima ADN metiltransferasa en células incubadas con citoquinas y óxido nítrico y en extractos nucleares expuestos a dadores de óxido nítrico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención de las muestras

1.1 Muestras de sangre y de tejidos

Las muestras de sangre de las familias X-frágiles se recibían a través de la Asociación Andaluza del síndrome de cromosoma X-frágil. Los tejidos utilizados fueron aislados de los siguientes animales: ratas Wistar que se obtenían del Servicio Animalario de la Facultad de Medicina de Sevilla. Los oocitos se extrajeron de las ranas hembras de la especie: *Xenopus laevis*, obtenidas del "Centre d'Élevage de Xenopes du Centre de la Recherche Biologique et Moléculaire" de Francia.

1.2 Líneas celulares

Las células Jurkat E6-1, se obtuvieron de la ATCC ("American Tissues Culture Collection"), y Las células RINm5F (Células de páncreas de rata), fueron cedidas por el Dr. Décio L.Eizirik (Departamento de Biología Celular. Universidad de Uppsala, Suecia). Las células de neuroblastomas Neuro2A, fueron cedidas por el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Sevilla.

2. Reactivos

Material y Métodos

Todos los productos químicos utilizados eran de grado molecular y se obtenían fundamentalmente de las siguientes casas comerciales: Sigma Chemical Co., Amersham Pharmacia Biotech, Boehringer Mannheim, Roche, Promega, Panreac Química S.A., Fluka BioChemica y Merck. En el texto se indica la procedencia de los productos que se obtuvieron de otras compañías.

3. Procedimientos

3.1 Preparación de linfocitos humanos

La sangre heparinizada se diluye con igual volumen de suero fisiológico (NaCl 0.9%, Braun), mezclándose suavemente. Con una pipeta pasteur se deposita esta mezcla cuidadosamente sobre Ficoll en una proporción 1:2 (3 ml de Ficoll y 6 ml de la solución celular), evitando que se mezclen las dos soluciones. Se centrifuga 20 minutos a 2.000 rpm y se obtiene un anillo blanco de células mononucleares (linfocitos, monocitos y plaquetas). Los linfocitos se separan de los monocitos haciendo que estos últimos se adhieran a una placa de cultivo. Los linfocitos se lavan dos veces con tampón fosfato salino (PBS, Amresco) y a continuación se cultivan en un frasco de plástico esteril, con 10 ml de medio RPMI-completo: Medio RPMI 1640 suplementado con Hepes 10 mM, conteniendo 1.5 g/l bicarbonato de sodio, suero fetal bovino 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, anfotericina-B 2.5 µg/ml. Las células se mantienen en un incubador a una temperatura constante de 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂.

3.2 Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares de uso frecuente, se mantuvieron en medio RPMI completo, dejando siempre una reserva de células. Según la confluencia y el número de células, se congelaba una parte y al resto se les daba un pase que consiste en la substitución del medio de cultivo.

3.2.1 Células en suspensión

Las células Jurkat se cultivan de igual manera que los linfocitos humanos. El cultivo celular se mantiene por cambio de medio, realizando un pase cada 3 o 4 días.

3.2.2 Células adherentes

Las células RINm5F se siembran en placas (Petrie) de 15x60 mm, con 5 ml de medio RPMI-completo y se mantienen en un incubador de CO₂. Cuando alcanzan una confluencia máxima, se descarta el medio antiguo y las células pegadas se lavan con PBS, después o se añade 1 ml de PBS y se rascan con una paleta de goma esteril, o se añade 1 ml de Tripsina 0.5% y se incuban a 37°C durante 10 minutos para despegarlas; a continuación las células se pasan a un tubo eppendorf, se centrifugan 5 minutos a 1.000 rpm, se lavan con 1 ml de PBS, se resuspenden en medio completo y se incuban nuevamente en el incubador de CO₂.

3.2.3 Congelación de las líneas celulares

Las células se lavan con PBS, se centrifugan 5 minutos a 1.000 rpm, y se resuspenden en 1 ml de medio de cultivo con 70% de suero fetal bovino. Se añade 1 ml de medio de cultivo con 70% de suero fetal bovino y 20% de DMSO. La mezcla se agita suavemente, se divide en 2 alícuotas de 1 ml, se incuba en hielo durante 20 minutos y a continuación se congela a -80°C.

3.3 Determinación de la viabilidad y proliferación celular

La viabilidad celular se determina por la exclusión con azul de tripán o por la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante de las células. La

Material y Métodos

proliferación celular se determina con un kit "Cell Proliferation Kit I" de la casa comercial Boehringer Mannheim.

3.3.1 Exclusión con azul de tripán

Este método se basa en la permeabilidad de la membrana plasmática a ciertos colorantes en las células no viables. El número de células de una suspensión celular se determinaba contándolas en cámara de "Neubauer", de la siguiente forma: 10 μ l de la suspensión celular, 15 μ l de medio de cultivo y 5 μ l de una solución de azul de tripán (4 partes del azul de tripán al 0,2% con 1 parte de NaCl al 4,25%).

3.3.2 Actividad LDH en el sobrenadante libre de células

Las células no viables incrementan la permeabilidad de su membrana plasmática a enzimas intracelulares que son liberadas al medio extracelular. El cociente entre la actividad de estas enzimas en el medio extracelular y la actividad total de las mismas (actividad intra más extracelular) es un índice fiable de la viabilidad celular. Se usó la liberación de LDH como índice de viabilidad, midiendo su actividad por espectrofotometría siguiendo las instrucciones del kit comercial de la Boehringer Manheim.

3.3.3 determinación de la proliferación celular

La proliferación celular se determina por colorimetría con el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial Boehringer Manheim.

3.4 Medida de los nitritos

Material y Métodos

Es posible hacer una estimación de la cantidad de óxido nítrico producido por un cultivo, mediante la determinación de los nitritos acumulados en el sobrenadante. A pH fisiológico, dos moléculas de NO reaccionan con una de oxígeno, generando una molécula de nitrito y otra de nitrato. Ambos compuestos son químicamente estables, por lo que son muy útiles en la estimación del NO producido. Para cuantificar los nitritos acumulados se utilizó la técnica de Griess. Cada molécula de nitrito presente en la muestra reacciona con una arilamina y produce su diazotización. El producto se acopla para producir un azocromógeno de color púrpura, que posee un pico de absorbancia a 540 nm.

El procedimiento consiste en colocar 200 μ l del sobrenadante del cultivo celular con o sin tratamiento en un pocillo de una placa de cultivo "microtiters", y añadir 20 μ l del reactivo de Griess. Este reactivo está formado por la mezcla, realizada en el momento de su uso, a partes iguales de una solución de sulfanilamida 1% en HCl 3M con una solución de N-1-Naftilendiamina 0.02 %. Ambas soluciones por separado son estables a 4 °C un mínimo de dos meses. Una vez añadida al sobrenadante, se deja 15 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia en un lector de placa (MIOS Merck MR700) a 540 nm. El color se mantiene estable al menos una hora. Para preparar el blanco, se añade RPMI-completo en lugar del sobrenadante celular. El cálculo de la concentración de nitritos se realiza utilizando una curva estándar elaborada con NO_2Na a concentraciones de 1, 2, 5, 10, 15 y 20 μ M.

3.5 Extracción del ADN y determinación de su concentración

La extracción del ADN se realizó por distintos métodos según el tipo de muestra. Para muestras sanguíneas se siguió el protocolo de precipitación salina y para las líneas celulares se utilizó la técnica de extracción con fenol.

3.5.1 Extracción por el método de la precipitación salina

Material y Métodos

Se utiliza de 6 a 10 ml de sangre heparinizada a los que se añade 2,5 ml de dextrano salino 6%, se mezcla cuidadosamente y se deja reposar durante 1 hora para que sedimente el dextrano con los hematíes. Se recoge la fase superior y se centrifuga durante 10 minutos a 3.000 rpm. El precipitado se resuspende en 2 ml de suero fisiológico y se da un choque hipotónico para eliminar los hematíes que no hubieran quedado atrapados en el dextrano. Para ello se añade 6 ml de H₂O destilada esteril, mezclándose durante un minuto, se restaura la molaridad añadiendo 2 ml de NaCl 3,5% y se mezcla durante unos segundos (todas las soluciones deben estar a 4°C). Las células nucleadas se obtienen por centrifugación durante 5 minutos a 1.500 rpm, se resuspenden en 100 µl de PBS y se añaden 3 ml de tampón de lisis de leucocitos (BLL: 0.01 M Tris-HCl, 0.4 M NaCl, 0.002 M EDTA), 200 µl de SDS al 10% y 35 µl de proteinasa-K a 20 mg/ml; Después de dejar los tubos durante una hora a 50°C con agitación suave y rotatoria, se incuban a 37°C hasta el día siguiente. Para precipitar las proteínas se añade 1 ml de NaCl 6 M, agitando la muestra hasta que esté homogénea; a continuación se centrifuga a 3.000 rpm durante 30 minutos, pasando el sobrenadante con cuidado a un tubo "Falcon" de 50 ml y se añade 8 ml (2 volúmenes) de etanol absoluto mantenido a -20°C. Se mezcla suavemente hasta que se ve aparecer una medusa que corresponde al ADN precipitado, que se recoge con un asa de plástico esteril y se lava con etanol al 70%, dejando que se seque durante unos minutos; se resuspende en TE 10:1 (Tris-EDTA: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), pH 8 y se guarda a 37°C con agitación suave para que se disuelva totalmente el ADN antes de medir su concentración.

3.5.2 Extracción con fenol

Las células (5-10 millones) se colocan en un tubo "eppendorf" y se añade 500 µl de una solución de lisis (0.01 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA, 0.1 M NaCl, 0.039 M DTT, 2% SDS, 100 µg/ml proteinasa-K). Se deja durante una hora a 50°C, y luego toda la noche a 37°C para conseguir una digestión completa. Al día siguiente se añade 500 µl (1 volumen) de fenol:cloroformo:isoamil alcohol 24:25:1,

Material y Métodos

pH 8, se vortea durante un minuto, y se deja en hielo durante 15 minutos. Se centrifuga durante 20 minutos a 12.000 rpm, la fase superior se pasa a otro tubo etiquetado, donde se añade 0.1 volumen de acetato sódico 3 M pH 7, y 1 volumen de isopropanol absoluto mantenido a -20°C; se mezcla bien hasta la aparición de una “medusa” que se recoge con un asa estéril y se lava con etanol. Se deja secar a temperatura ambiente y se resuspende en TE 10:1 pH 8. El ADN así obtenido se incuba a 37°C hasta disolución total y después se procede a medir su concentración.

3.5.3 Determinación de la concentración del ADN

Para determinar la concentración del ADN extraído se toma una alícuota de la muestra, se diluye en agua destilada y se mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 260 nm. Una absorbancia de 1 corresponde a una concentración de 50 µg/ml de ADN de doble cadena. La concentración de la muestra se calcula multiplicando el valor de la absorbancia obtenida por 50 y por la dilución, expresándose en µg/ml. Para conocer el grado de pureza del ADN se mide la absorbancia de la muestra a 280 nm. La razón de la absorbancia 260/280 debe dar valores comprendidos entre 1.8 a 2. Si el valor obtenido es inferior a 1.7 se realiza una reextracción con fenol.

3.6 Reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”)

Cualquier molécula de ADN bicatenario puede ser amplificada mediante el empleo de cebadores específicos para las dos cadenas del ADN y una enzima ADN Polimerasa termoestable (Taq DNA pol). Las dos cadenas de ADN se separan mediante calor y luego se enfrían en presencia de oligonucleótidos cebadores complementarios para cada cadena a la altura de los extremos de la región del ADN que quiere ser amplificada. La neosíntesis de ADN sólo se producirá en la región limitada por los dos cebadores. Si la reacción se calienta de nuevo, las cadenas modelo originales del ADN y las cadenas neosintetizadas se

Material y Métodos

desnaturalizan otra vez, los cebadores ahora se unen tanto a las cadenas originales como a las nuevas y la síntesis del ADN prosigue nuevamente. Una única copia de ADN se puede amplificar de manera exponencial a través de la repetición de este ciclo.

3.6.1 Amplificación del locus FRAXA

Para la amplificación del locus FRAXA (zona de la región 5' del gen FMR1 que engloba las repeticiones CGG) se mezcla en frío en un volumen de 10 μ l: 100 ng de ADN genómico, 1x tampón (10 mM Tris-HCl pH: 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 200 μ M dATP, 200 μ M dTTP, 200 μ M dCTP, 200 μ M 7-deaza-dGTP, 5 pmoles de cada cebador, 10% DMSO, 1 μ Ci de α -³²P-dCTP y 1 unidad de Taq polimerasa. La mezcla de reacción se cubre con una gota de aceite mineral.

La utilización del 7-deaza-dGTP en lugar de dGTP permite una mejor amplificación de los fragmentos ricos en CGG pero impide su visualización en bromuro de etidio. Para visualizar el producto de la PCR del locus FRAXA con bromuro de etidio se utilizaba la Pfu ADN polimerasa (Stratagene) y la Taq Extender (Stratagene) que amplifican más eficientemente y no necesita la sustitución del 100% del dGTP por 7-deaza-dGTP.

Los tubos se colocan en un Termociclador y tras una desnaturalización de 4 minutos a 95°C, se realizan 40 ciclos con el siguiente perfil térmico:

Desnaturalización	1 min.	95°C
Hibridación	1.5 min.	55°C
Polimerización	2 min.	72°C

La amplificación se completa con un ciclo final de polimerización (7 min, 72°C). Se utilizaron los cebadores descritos por Fu (Fu et al. 1991): cebador sentido: 5'-GCT CAG CTC CGT TTC AC TTC CGGT-3' y el cebador antisentido: 5'-AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA-3'. Con estos cebadores se obtiene un fragmento de 309 pb cuando el número de tripletes CGG es de 29.

3.6.2 Detección del producto amplificado

Los fragmentos amplificados se separan por electroforesis vertical en un gel de poliacrilamida desnaturalizante, corriendo en paralelo un control de secuenciación o un marcador de peso molecular PBR 322, cortado con MspI. El aparato de electroforesis esta compuesto de 2 cristales, 2 separadores y un peine de 0.4 milímetros. Uno de los cristales se trata con Sigmacote para facilitar la separación del gel una vez acabada la electroforesis. Entre los dos cristales se carga unos 30 ml de Acrilamida/Bisacrilamida 19:1 (Amresco) 6%, 8M Urea, 1X TBE (TBE 5X: 0.445 M Tris-Borato, 0.01M EDTA pH 8.3), 210 µl de persulfato amonico (PSA) al 10% y 36 µl de TEMED. El gel se deja polimerizar durante una hora. A las muestras de PCR se les añade 2 µl de tampón de carga (95% formamida, 10 mM EDTA, 0.5% azul de bromofenol, 0.5% xilene cianol), se desnaturalizan a 95°C durante 5 minutos y luego se cargan en el gel. La electroforesis se realiza a 1500-1800 voltios durante 3 horas. Transcurrido el tiempo de electroforesis se desensambla el aparato, el gel se pega a un papel de filtro (Watman 3MM) de igual tamaño, se cubre con un plástico transparente fino y se seca con vacío durante 3 horas a 80°C, en un secador de geles. El gel perfectamente seco se coloca dentro de un cassette con intensificadores, junto a una placa de alta sensibilidad y se deja a -80°C, al menos durante 12 horas. La placa se revela manualmente o con un aparato automático. Con el sistema manual la placa se pone en líquido de revelado (Kodak) hasta que aparecen las bandas; la reacción se para con ácido acético 1% durante 2 minutos y después se le da un baño de fijación.

3.7 Técnica de transferencia de Southern

El ADN puede ser analizado por la técnica de Southern que consiste en transferir los fragmentos digeridos por enzimas de restricción y separados en gel de agarosa, a un soporte sólido, generalmente una membrana de nylon, ya sea por vacío o capilaridad. Luego puede hibridarse la membrana con una sonda radioactiva que contenga una secuencia de ADN de interés.

3.7.1 Obtención y marcaje de la sonda

Se ha utilizado la sonda StB12.3, cedida por el Dr. J.L. Mandel (Universidad de Estrasburgo) que está insertada en un plásmido pBluescript II KS de 2.9 Kb con resistencia a ampicilina e incorporado en bacterias XLI blue KS. El tamaño del inserto es de 1.2 Kb y se obtiene con la enzima de restricción Pst1. Partiendo del medio sólido en el que nos enviaban las bacterias, se toma una muestra para crecer en 50 ml de medio líquido "LB-Broth" (10 g Bacto-agar, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl que se mezclan en agua desionizada y se le ajusta el pH a 7.0), autoclavado y suplementado con ampicilina 50 µg/ml. Se utiliza un tubo control con el mismo medio y sin bacterias para comprobar la efectividad de la ampicilina. Después de incubar toda la noche a 37°C con agitación fuerte se recrecen las bacterias en un "matraz" de vidrio esteril en un volumen de 250 ml de "heart-brain infusión" (37 g en 1.000 ml de agua desionizada, Difco) autoclavado y con ampicilina 50 µg/ml.

La obtención del plásmido a partir del cultivo de bacterias se hace por lisis de las células y posterior separación del ADN cromosómico con un "kit" comercial Qiagen o Wizard y siguiendo el protocolo de la "Maxiprep" indicado por la casa comercial. Para comprobar que el inserto que lleva el plásmido corresponde a nuestra sonda se digiere 1 µg de ADN plásmidico con la enzima de restricción adecuada durante 1 horas a 37°C. El producto de la digestión y la muestra sin digerir se visualizan corriendo una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 V durante 1-2 h y tiñendo el gel con bromuro de etidio. Se utiliza el marcador de peso molecular "Lambda/HindIII" para determinar el tamaño de las bandas.

Del cultivo inicial de bacterias, se congelaban unas muestras, tomando 600 µl y mezclándose con 300 µl de glicerol esteril. Las bacterias así tratadas pueden congelarse a -80°C y volver a crecerlas cuando se necesite más cantidad de sonda. Por último se procede a la digestión de todo el plásmido obtenido en la "Maxiprep" con las enzimas correspondientes. Los fragmentos de la digestión se separan por electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión Nusieve 3:1 al 1%

Material y Métodos

en TBE 1x con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Bajo luz ultravioleta se visualizan los fragmentos correspondientes a nuestra sonda, se recortan con un bisturí y se colocan en un tubo previamente pesado para su posterior purificación. La eliminación de la agarosa se hacía siguiendo los pasos descritos por el kit de la casa comercial "Wisard PCR prep" o utilizando una agarasa.

Una vez que se tiene la sonda purificada y se conoce su concentración se procede a su marcaje. Se utiliza un sistema de marcaje comercial "Rediprime ADN labelling system" de la casa Amersham. Con este protocolo 50 ng de la sonda se diluye hasta 45 µl con agua destilada esteril, se desnaturaliza 10 minutos a 98°C, se centrifuga para recoger las condensaciones del tapón y se añade a la mezcla de marcaje comercial. Después se añade 5 µl de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl), se mezcla bien con la pipeta y se incuba de 10 minutos a 1 hora a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se para la reacción añadiendo 5 µl de 0.2M de EDTA pH: 8.0.

3.7.2 Digestión del ADN genómico con enzimas de restricción

Se utilizaban las enzimas de restricción EcoRI o HindIII y EagI o SacII (Biolabs), siendo estas últimas sensibles a metilación, lo que permite conocer el estado de metilación de la isla CpG del promotor del gen FMR1. Debido a que el gen FMR1 es de copia única en el genoma humano para que la señal obtenida tras la hibridación tuviera una intensidad adecuada se utilizaba en la digestión 10 µg de ADN. En un tubo de 1.5 ml se pipetea la muestra de ADN, 5 µl de tampón del enzima o de un tampón compatible cuando es doble digestión, 2 U/µg de ADN, de enzima de restricción y TE 10:1 pH 8 hasta completar un volumen de 50 µl. Se mezcla bien y se incuba a 37°C durante 20 horas.

3.7.3 Electroforesis en gel de agarosa y tratamiento del gel

Después de la digestión del ADN se procede a separar los fragmentos obtenidos por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en tampón TBE 1x. Las

Material y Métodos

muestras se cargan en el gel, con un tampón de carga conteniendo el azul de bromofenol. El colorante permite controlar la velocidad a la que se mueven los fragmentos dentro de la agarosa. En el primer pocillo se carga un marcador de peso molecular que sirva de referencia para conocer el tamaño de los fragmentos. La electroforesis se realiza en tampón TBE 1x a 75 voltios durante 6 horas; terminada la electroforesis se tiñe el gel con bromuro de etidio y se expone a la luz ultravioleta para comprobar que el ADN está digerido.

Para realizar la transferencia del ADN desde gel de agarosa a la membrana de nylon se procede primero a la despurinización del gel con una solución de HCl 0.1 M durante 15 minutos; después a la desnaturalización y posterior neutralización del gel. Se realizan 2 baños desnaturalizantes de 20 minutos en una solución de 0.5 M NaOH y 1.5 M NaCl pH 13.5 con agitación suave. Después de lavar el gel con agua destilada se neutraliza en una solución de 0.5 M Tris-HCl y 1.5M NaCl pH 7.5, durante 20 minutos con agitación suave. La transferencia se hace por capilaridad durante 20 horas con SSPE o SSC 20x. Transcurrido el tiempo indicado se fija el ADN a la membrana con un aparato comercial "Ultraviolet crosslinker" de la casa Amersham, con lo que la fijación se realiza en unos segundos con una radiación de 100 mJ/cm². Después de fijar el ADN, la membrana se puede guardar a 4°C, entre dos hojas de papel de filtro hasta que se realice la hibridación. Para conocer la eficiencia de la transferencia, el gel se tiñe 20 minutos con bromuro de etidio 0.5 µg/ml y se observa con luz ultravioleta el ADN no transferido.

3.7.4 Hibridación con la sonda marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP

Una vez que se tiene la membrana con el ADN fijado se procede a la hibridación con la sonda marcada, para lo que se usa un tampón de hibridación comercial "Rapid-hybridation buffer" de la casa Amersham. La membrana se prehibrida a 65°C con 5 ml de buffer, durante 30 minutos. A continuación se hibrida con 20 ng/ml de sonda marcada durante 2 horas.

Material y Métodos

Terminada la hibridación se quita el tampón y la membrana se lava dos veces con una solución SSPE 2x, SDS 0.1% a temperatura ambiente, durante 15 minutos cada lavado, dos veces más con una solución SSPE 0.1x, SDS 0.1% a 60°C durante 30 minutos. En algunos casos se realiza otro lavado a 65°C durante 15 minutos con la solución utilizada en el segundo lavado. La membrana se escurre y se mete en una bolsa de plástico que se sella por calor. La membrana se coloca en un "cassette" de radiografía entre 2 placas radiográficas de alta sensibilidad (Kónica o Kodak) y se guarda a -80°C. La primera placa se revela a las 24 horas y dependiendo de la intensidad de las bandas la segunda placa se revela entre 3 y 6 días más tarde.

3.8 Extracción del ARN

La extracción del ARN debe hacerse en las máximas condiciones de esterilidad y condiciones libres de ARNasas. El agua utilizada en todo el proceso de aislamiento de ARN debe ser tratada con diethilo de pirocarbonato (DEPC) al 0.1%. El DEPC es utilizado como potente inhibidor de ARNasa. Se prepara agua desionizada con DEPC al 0.1%, se deja en agitación durante 12 horas para permitir una incorporación completa del producto; a continuación se autoclava la solución con el fin de destruir el DEPC que a la temperatura y presión de la autoclave se degrada a dióxido de carbono y etanol, ambos productos muy volátiles. Todas las soluciones que estén en contacto con el ARN se preparan con agua-DEPC. También todo el material que se utilice será exclusivo para el aislamiento de ARN, deberá estar libre de ARNasa y será lavado con agua-DEPC.

3.8.1 Extracción del ARN a partir de tejidos

El ARN se aísla siguiendo el método de Chomczynski y Sacchi (1987). Se parte de 1 gramo de tejido fresco que se homogeniza en frío en 10 ml de solución desnaturante (tiocianato de guanidina 4 M, citrato sódico 25 mM pH 7, sarcosil 0.5% y mercaptoetanol 0.1 M). La homogenización se lleva a cabo en un

Material y Métodos

homogenizador Politrón, a intensidad media y durante 1 minuto. Se centrifuga 5 minutos a 3.000 rpm, y el sobrenadante se transfiere a otro tubo. Se añade 1 ml de acetato sódico 2 M pH 4, 10 ml de fenol saturado en agua pH 4 y 2 ml de cloroformo:isoamil-alcohol (49:1), mezclando cuidadosamente por inversión tras cada una de las adiciones. Se agita el tubo vigorosamente durante 1 minuto y se deja incubar la solución 15 minutos en hielo para separar las fases; a continuación se centrifuga 20 minutos a 12.000 rpm manteniendo la temperatura a 4°C. Se transfiere la fase acuosa superior a un nuevo tubo, al cual se le añade un volumen igual de isopropanol y se deja precipitar el ARN durante 2 horas a -20°C. El ARN se obtiene en el precipitado después de centrifugar a 12.000 rpm 20 minutos y a 4°C. El precipitado se lava con 6 ml de etanol al 75%, se deja secar y se disuelve en agua-DEPC. Se toma una alícuota para determinar la concentración de ARN obtenida. Es conveniente separar el ARN así obtenido en alícuotas, ya que las sucesivas descongelaciones producen la degradación de las muestras. Las alícuotas se almacenan a -80°C.

La concentración de ARN se determina midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm, en cubeta de cuarzo. Previamente se ajusta el espectrofotómetro con un blanco que sólo lleva agua-DEPC, después se toma 1 µl de la muestra y se le añaden 49 µl de agua-DEPC y la concentración de ARN se obtiene multiplicando el valor de la absorbancia por 40 y por la dilución (D; en nuestro caso vale 50). La concentración de ARN queda expresada en µg/ml. Valores de absorbancia inferiores a 0.1 no son fiables. La contaminación con proteínas se determina midiendo la absorbancia de la muestra a 280 nm. La razón de absorbancia 260/280 debe dar un valor de 2 ± 0.05 .

3.8.2 Extracción del ARN a partir de líneas celulares

La extracción de ARN a partir de líneas celulares es idéntica a la descrita en el apartado anterior, solo que se usan volúmenes más pequeños. Las células se centrifugan a 1.000 rpm, se lavan con PBS esteril y se homogenizan en frío con 500 µl de solución desnaturizante. La lisis completa de las células se lleva a

Material y Métodos

cabo con una pipeta automática. Se añade 50 µl de acetato sódico 2 M pH 4, 500 µl de fenol saturado en agua pH 4, y 100 µl de cloroformo:isoamil-alcohol (49:1). La mezcla se vortea durante un minuto y se deja en hielo 15 minutos; a continuación se centrifuga a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. La fase acuosa superior se transfiere a un nuevo tubo eppendorf al que se le añade 1V de isopropanol y se deja precipitar el ARN durante 2 horas a -20°C. El ARN se recupera centrifugando a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sedimento se lava con etanol al 75%, se seca y se disuelve en agua-DEPC.

3.9 Reacción de la transcriptasa inversa y RT-PCR

La síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN se hace mediante la enzima transcriptasa inversa. Para ello se pipetea en un tubo de 1,5 ml de 2 a 5 µg de ARN, se desnaturaliza calentando durante 5 minutos a 65°C, se añade 8 µl de tampón (5x) del enzima transcriptasa inversa, 4 µl de una mezcla de nucleótidos (dNTPs) 10 mM, 4 µl de DTT 10 mM, 20 unidades de inhibidor de ARNasa (RNAsin), 0.3 µM de cebadores aleatorios ("Random primers") y 200 unidades de transcriptasa inversa (M-MLV), en un volumen total de 40 µl. La reacción se incuba a 37°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se para la reacción calentando a 95°C durante 5 minutos.

El ADNc resultante puede usarse como material para amplificar secuencias de ARN específicas por PCR. La reacción de amplificación se realiza en tubos de PCR siliconizados de 0.5 ml (BioRad) en un volumen de 10 µl con 2 µl de ADNc, 1 µl de tampón: 10 mM Tris-HCl pH: 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 5 pmoles de cada cebador, 10% DMSO y 1 unidad de Taq polimerasa, la mezcla se cubre con una gota de aceite mineral.

Los cebadores utilizados para amplificar las zonas de los genes que se indican fueron los siguientes:

- repeticiones CGG del gen FMR-1: (Fu et al. 1991)

sentido: GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT

antisentido: AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA

Material y Métodos

- dominio KH del FMR-1: (Hmadcha et al. 1998)
 - sentido: GAC ATG CAC TTT CGG AGT CTG CGC AC
 - antisentido: TTC TGG GGC ATT AGG TCC AAC CCT TG
- gen de la GAPDH humano: (Rodríguez et al. 1994)
 - sentido: CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GC
 - antisentido: TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC
- gen de la HPRT de ratón: (Dubravka et al. 1997)
 - sentido: CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC
 - antisentido: GCT GGT GAA AAG GAC CTC T
- gen de la HPRT humano: (Litt et al. 1997)
 - sentido: TCC TCC TGA GCA GTC AGC
 - antisentido: GGC GAT GTC AAT AGG ACT C
- gen de la ATPasa Na⁺/K⁺: (Dpto. Fisiología)
 - sentido: GCT TCA TGG ATT TGA TTG TCA AAC C
 - antisentido: CGA GGC TGT CAT CTT CCT CAT TGG

El producto de la reacción de PCR se carga en un gel de agarosa que contiene 0.5 µg/ml de bromuro de etidio, se aplica una corriente de 90 voltios durante una hora y se visualiza en un transiluminador.

3.10 Secuenciación del producto de PCR

El producto de PCR del dominio KH se corre en un gel de agarosa conteniendo bromuro de etidio que se visualiza bajo luz ultra violeta. Se corta la banda correspondiente al dominio KH y se purifica con el "Kit" comercial Wizard PCR Prep. El producto así purificado, se cuantifica por espectofotometría y servirá como molde para la reacción de secuenciación.

La secuenciación del producto de la PCR (RT-PCR del dominio KH) se ha realizado siguiendo las instrucciones de un "Kit" comercial (Termosecuencasa), diseñando un cebador específico: 5'-TGC GCA CTA AGT TGTCTC TGA TAA TG-3'. La reacción de secuenciación se hace en dos etapas. La primera es una

Material y Métodos

utilizados para transformar las células competentes DH α -1 y el procedimiento de la obtención del ADNc fue el mismo descrito en el apartado (3.7.1).

3.11.1 Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante

La electroforésis se realiza en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes para lo que se añade formaldehído. Se prepara un gel de agarosa al 1% en tampón MOPS 1x (MOPS 0.2 M, acetato sódico 0.05 M, EDTA 0.01 M, pH 5.5) y se añade formaldehído al 37%. Se deja reposar durante 15 minutos para minimizar los vapores de este producto.

Se vierte el gel en la batea de la cubeta, y se deja solidificar. Se toman 10 μ g de ARN, que se desecan en un aparato de vacío y se resuspenden en 10 μ l de tampón de carga. El ARN se desnaturaliza calentando durante 5 minutos a 68°C, se mantiene en hielo 5 minutos, se carga en el gel y se deja correr durante dos horas a 70 Voltios, en MOPS 1x. Una vez acabada la electroforesis se tiñe el gel con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml), se fotografía sobre el transiluminador UV y se trata con agua DEPC a 65°C durante 15 minutos para quitarle el formaldehído que puede influir en la transferencia. Transcurrido este tiempo, se procede a la transferencia del ARN a una membrana de Nylon positiva, por el método de capilaridad. La transferencia se deja 16 horas. A continuación se hace la fijación del ARN transferido a la membrana ("Cross linking") mediante luz UV, con una irradiación de 100.000 μ J/cm².

3.11.2 Hibridación con la sonda marcada con α^{32} P-dCTP

El marcaje de la sonda se realiza como se ha descrito anteriormente para el Southern (3.7.1). La membrana se prehibrida con una solución de hibridación (50% formamida, 6x SSPE, 5X Denhart's, 0.5% SDS, 100 μ g/ml ADN de sperma de salmón) a 42°C durante 3 horas, después se hibrida con la misma solución añadiendo 10 ng/ml de sonda marcada, a 42°C durante 16 horas.

Material y Métodos

Después de hibridar la membrana, se quita el tampón de hibridación y se lava dos veces con una solución SSPE 2x, SDS 0.1% a temperatura ambiente 15 minutos cada uno y dos veces más con una solución SSPE 0.1x, SDS 0.1% a 60°C durante 30 minutos. La membrana se coloca en un "cassette" de radiografía entre 2 placas radiográficas de alta sensibilidad y se guarda a -80°C hasta su posterior revelado.

3.12 Técnica de transferencia de Western

La técnica de transferencia de Western se ha utilizado para estudiar los niveles de expresión de la proteína nuclear ADN MeTasa. Para ello se han utilizado anticuerpos policlonales cedido por el Dr. Szyf (Universidad McGill, Montreal, Canadá) contra la secuencia de aminoácidos 1101-1119 de la proteína ADN MeTasa humana.

3.12.1 Lisis celular para el análisis de proteínas nucleares

Todo el proceso de lisis celular se hace en frío. Después de incubar las células con las adiciones según las condiciones experimentales, estas se centrifugan a 3.000 rpm durante 5 minutos y se lavan dos veces con PBS frío. El sedimento celular se rompe con 100 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, MgCl₂ 5 mM, Glicerol 10% y NP-40 1%) y 5 µl de una mezcla de inhibidores de proteasas (leupeptina 10 mg y pepsina 2 mg), la solución se sonica durante 10 segundos y se centrifuga a 13.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se pasa a otro tubo y se deja en hielo para determinar la concentración de proteínas obtenidas.

La cantidad de proteína contenida en el sobrenadante se determina por la técnica de Bradford: Se prepara un estándar de albúmina, con las siguientes concentraciones (0.5, 1, 2, 5, 10, 15 y 20 µg/ml). Se diluye cada tubo del estándar con NaCl 150 mM (1 µl de cada muestra + 4 µl NaCl) y se le añade 945 µl de agua y 50 µl reactivo de Bradford concentrado (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent

Material y Métodos

Concentrate), los tubos se incuban 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación se mide la absorbancia a 595 nm. Así se elabora una curva estándar que nos va a permitir determinar la concentración de las muestras problema. Para la muestra, se usa 1 μ l del sobrenadante del homogenado celular, al que se añade 4 μ l de NaCl 150 mM y se diluye con 945 μ l de agua y se sigue el mismo procedimiento que las muestras del estándar. El blanco se prepara reemplazando el homogenado con 1 μ l de tampón de lisis.

3.12.2 Electroforesis y transferencia de proteínas

La electroforesis se realiza utilizando un gel de apilamiento de poliacrilamida al 4% y un gel de poliacrilamida de separación al 7.5%. El sistema de geles se prepara utilizando una mini-PROTEAN II (Bio-Rad); para ello, primero se prepara la solución separadora, para una polimerización completa se cubre el gel con agua; una vez polimerizado, se elimina el agua y se añade la solución de apilamiento, en la cual se construyen los pocillos. Se introduce el sistema en el tanque de electroforesis, se rellena con el tampón de corrida (Tris-HCl 25 mM pH 6.8, SDS 0.1%, glicina 250 mM). Se añaden 2 μ l de tampón de carga ("Laemmli": Tris-HCl 125 mM, SDS 2%, glicerol 5%, azul de bromofenol 0.003% y mercaptoetanol 1%) a 10 μ g de muestra, se incuban en un baño de agua hirviendo durante 7 minutos, luego se cargan en los pocillos del gel, al lado de un marcador de peso molecular. Por último, el sistema se conecta a una fuente de alimentación manteniendo un voltaje constante de 150 voltios durante 1 hora.

3.12.3 Transferencia a una membrana de "polyvinylidene difluoride"

La transferencia se realiza siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial Bio-Rad para la transferencia húmeda a una membrana "polyvinylidene difluoride" (PDVF). Una vez terminada la electroforesis, el gel se enjuaga con el tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.08%, metanol 20%, pH 9.2), después se coloca en el aparato de transferencia en forma de "sandwich"

Material y Métodos

de la siguiente manera: soporte, esponja, papel filtro, membrana, gel, papel filtro, esponja, soporte. El sistema se coloca en un baño de hielo y se le aplica durante 3 horas una corriente de intensidad constante 350 mA.

3.12.4 Incubación con los anticuerpos ("Immunoblotting")

En primer lugar, la membrana de PVDF se incuba toda la noche con 5% de leche en polvo diluido en TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7.6), para bloquear los espacios libres con caseína. Tras tres lavados con TBS, se incuba la membrana durante 12 horas con el anticuerpo diluido 1:2000 en TBS. Luego se lava la membrana tres veces con TBS y se incuba con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo, marcado con peroxidasa y diluido en TBST (TBS, Tween-20 0.5%) 1:5000. Por último, se lava nuevamente la membrana tres veces con TBS.

3.12.5 Revelado por el método ("ECL")

Se incuba la membrana 1 minuto en 10 ml de una mezcla preparada a volúmenes iguales de luminol (4 mg de luminol se disuelven en 25 μ l de NaOH 1 N y se completan a 5 ml con Tris-HCl 10 mM pH 8.5) y Yodofenol (1 mg de 4-Yodofenol en 5 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8.5) a la cual se añaden 5 μ l de H₂O₂ concentrada y se coloca a temperatura ambiente en un "cassette" con intensificadores, en contacto con una película radiográfica, que se revela pasados unos 3 o 5 minutos.

3.13 Determinación de diferentes actividades enzimáticas

Para determinar las actividades enzimáticas, las células tratadas según las condiciones experimentales, se centrifugan a 1.000 rpm durante 5 minutos, se lavan 2 veces con PBS esteril, se homogenizan con la solución de lisis apropiada para la determinación de las distintas actividades enzimáticas. La concentración de proteínas se determina por el método de Lowry modificado.

3.13.1 ADN metiltransferasa

Para la determinación de la actividad ADN MeTasa las células se lavan con PBS conteniendo RNAasa e inhibidores de proteasas: EDTA, Na_3VO_4 . Se lisan utilizando una pipeta automática con 200-500 μl de una solución de lisis con inhibidores de proteasas: NP-401%, Tris-HCl pH 8 20 mM, NaCl 137 mM, MgCl_2 5 mM, glicerol 10%, EDTA 5 mM, Na_3VO_4 1 mM, aprotinina 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, leupeptina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, PMSF 2%, RNasa 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El lisado se incuba durante 30 minutos a 4°C con agitación; después se centrifuga a 4°C durante 5 minutos a 10.000 rpm. Se descarta el sobrenadante, se lava el sedimento con 100 μl de solución de reacción: Tris 20 mM, glicerol 6.7%, EDTA 5 mM, DTT 0.5 mM, se centrifuga y se resuspende nuevamente en la misma solución. Se deja una alícuota para medir proteínas con el método del Lowry modificado.

Una vez obtenidas y cuantificadas las proteínas nucleares, se incuban 10 a 15 μg de proteínas durante 2 horas a 37°C con 4 μg Poly[d(I-C)] 5.25 μM S-adoMet y 1 μCi S-adoMet tritiada. Transcurrido este tiempo se para la reacción durante 30 min a 37°C, con 300 μl de solución de parada: SDS 1 %, EDTA 2 mM, 4-aminosalicilato 3% preparado con NaOH 10 N, butanol 5%, NaCl 125 mM, ADNss 0.25 mg/ml, Proteinasa-K 1 mg/ml. A continuación se añade el mismo volumen de cloroformo, se vortea la solución un minuto, se deja en hielo unos 15 minutos, y se centrifuga 10 minutos a 12.000 rpm. Se coge la fase superior que se transfiere a otro tubo y se le añade 0.1 volumen de acetato sodico y 1 volumen de isopropanol. La solución se centrifuga 15 minutos a 12.000 rpm, se descarta el sobrenadante; y el sedimento se seca en un liofilizador, después se disuelve en 30 μl de NaOH 0.3 M y se incuba 1 hora a 37°C. La solución se pipetea sobre un filtro de fibras de vidrio (Milipore), las proteínas se fijan en el filtro lavando 5 veces con 1 ml de Tricloracético 5%, se lava 2 veces con 1 ml de Etanol 100% y se seca con 1 ml de éter. El filtro se coloca en 5 ml de líquido de centelleo y se miden las cuentas en un contador beta.

3.13.2 Lactato deshidrogenasa

La actividad LDH se determinó según el método descrito por Sobrino (Sobrino et al. 1988). La mezcla de reacción contiene Tris-HCl 100 mM, pH 7.4, piruvato 1.2 mM, NADH 0.3 mM. Se dispara la reacción con 10 µg de proteínas, el blanco se trata igual pero sin proteína. Después se mide en una cubeta de plástico de 1 ml, la absorbancia a 340 nm a tiempo 0 y pasados 3 minutos.

3.13.3 Piruvato quinasa

La actividad PK se determinó según el método descrito por Sobrino (Sobrino et al. 1988). En 1 ml de ensayo, se mezclan para cada condición: la solución de reacción (Tris-HCl 50 mM, KCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7.4), ADP 1.25 mM, NADH 0.15 mM, LDH 10 unidades y 10 µg de proteínas. Se dispara la reacción con 1 mM de PEP, el blanco no lleva PEP. Después se mide la absorbancia a 340 nm a tiempo 0 y pasados 3 minutos.

3.13.4 Hexoquinasa

La actividad HK se determinó según el método descrito por Krebs (Krebs et al. 1983). En 1 ml de ensayo, se mezclan para cada condición: la solución de reacción Hepes 20 mM, ClK 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, DTT 0.25mM, pH 7, NADP⁺ 2.5 mM, ATP 2.5 mM, G6PDH (Leoconostor) 15 unidades, 10 mM de glucosa. Se disparar la reacción con el enzima (10 µg de proteínas) se dejan los tubos a 37°C durante 20 minutos y se lee absorbancia a 340 nm.

RESULTADOS

1. Estudio de la expresión del gen FMR1 por RT-PCR de las zonas KH1 y KH2

La expresión del gen FMR1 se ha analizado utilizando unos cebadores que amplifican una zona muy conservada del gen FMR1, que comprende los dominios KH1 y KH2.

1.1 Expresión en distintos tejidos y en diferentes especies

El ARN total se aisló por el método indicado en Material y Metodos a partir de linfocitos humanos, de cerebro, testículo, timo y músculo de rata, de células de neuroblastoma Neuro2A y de ovocitos de xenopus. Se sintetiza el ADNc y después se realiza la RT-PCR de los dominios KH. Se utiliza un ADN como control negativo y agua como blanco de la RT-PCR. Como se observa en la figura 1 se obtiene en todos los casos una banda de 500 pb. El gen es ubicuo, se expresa en todos los tejidos y las especies estudiadas. El ADN genómico (carril 1) no se amplifica puesto que los dos dominios KH están separados por un intrón.

Las bandas obtenidas después de la amplificación de la zona KH de los linfocitos humanos y de ovocitos de xenopus se purifican para su posterior secuenciación utilizando el kit de la termosecuensasa (figura 2). Ambas secuencias tenían una homología del 85% indicando que esta zona esta muy conservada en la escala filogenética. Nuestra secuencia en linfocitos humanos se corresponde con la secuencia publicada por Verkerk (Verkek et al. 1993).

Resultados

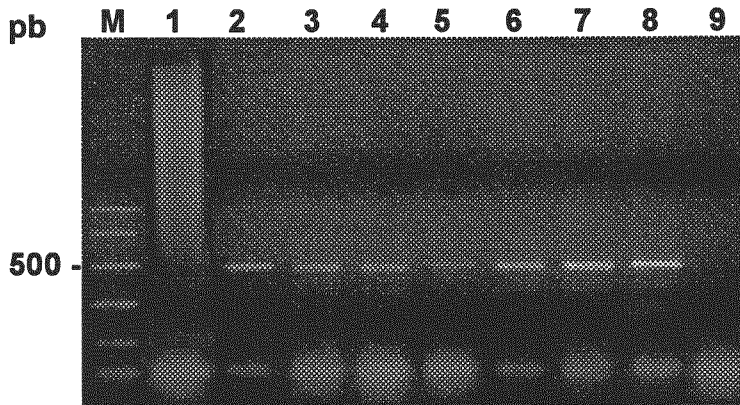


Figura 1: Estudio de la expresión del gen FMR1 en distintos tejidos y especies. Producto de la RT-PCR del dominio KH, de 500 pb de tamaño visualizado en gel de agarosa. Se observa que el gen FMR1 se expresa en todos los tejidos y especies estudiados. M: Marcador de peso molecular (PCR Marker), 1: ADN genómico, 2: linfocitos humanos, 3: cerebro de rata, 4: testículos de rata, 5: músculo cardiaco de rata, 7: neuro2A, 8: xenopus y 9: H₂O.

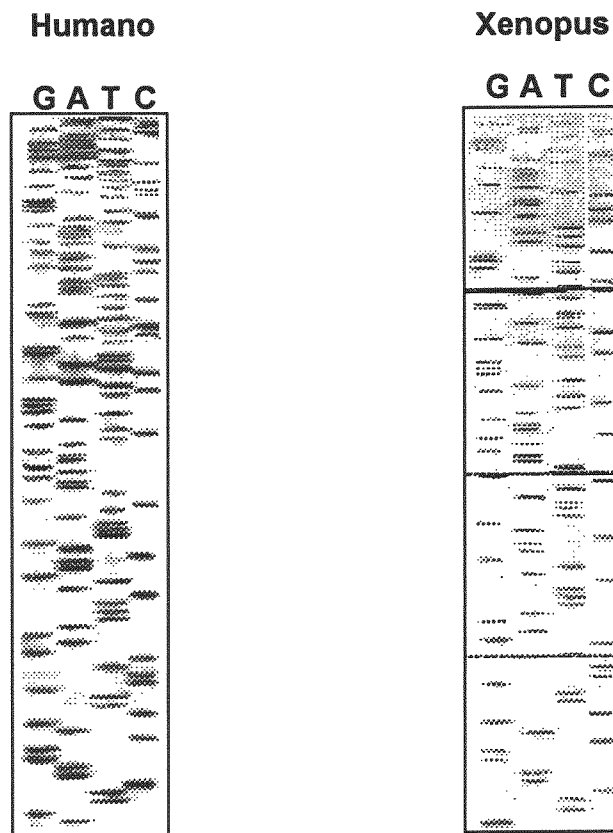


Figura 2: Secuenciación de los dominios KH. Secuenciación directa por temosecuenciación del dominio KH de linfocitos humanos y de xenopus.

Resultados

1.2 Expresión en familias X-frágiles

Los cebadores utilizados para amplificar los dominios KH se han usado para estudiar por RT-PCR la expresión del gen FMR1 en familias X-frágiles, previamente diagnosticadas por Southern y/o PCR del locus FRAXA. Esta técnica es rápida y permite diferenciar entre sujetos normales que expresan el gen y sujetos X-frágiles cuyo gen FMR1 está silenciado y no expresa ARNm. Se muestra en la figura 3, el estudio de tres familias X-frágiles, observándose que los individuos afectados por el síndrome no expresan el gen FMR1, aunque si expresan un gen de referencia como la gliceraldeido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH).

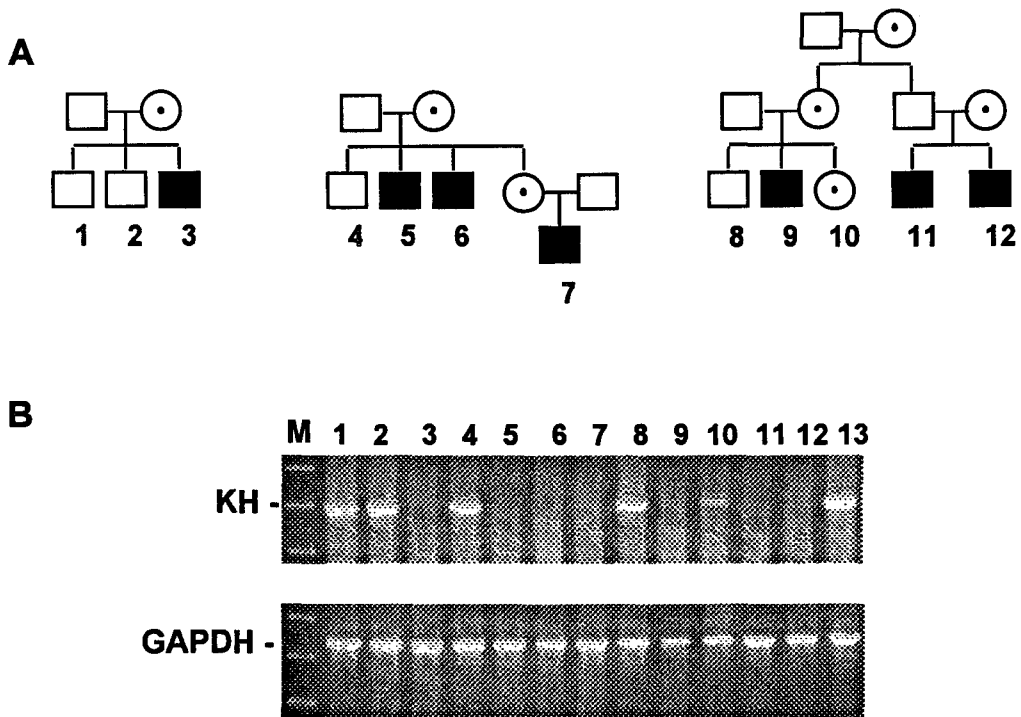


Figura 3: Estudio de expresión del gen FMR1 por RT-PCR del dominio KH en familias X-frágiles. **A:** árbol genealógico de las tres familias, **B:** los pacientes X-frágiles no expresan ARNm (carriles 3, 5, 6, 7, 9, 11 y 12), los individuos normales tienen una banda de 500 pb (1, 2, 4 y 8) y la mujer portadora tiene la misma banda de 500 pb (10). El carril 13 corresponde a la RT-PCR de ADNc de linfocitos control.

Resultados

2. Efecto de la IL-1 β sobre la expresión del gen FMR1 en células RIN

La regulación o los factores que modifican la expresión del gen FMR1 no se conocen. Como se ha expuesto anteriormente el síndrome del X-frágil se debe en el 99% de los casos a una falta de la expresión de dicho gen. Nuestro interés se centró en estudiar la expresión del gen FMR1 en células en cultivo incubadas con diferentes agentes con potencialidad de modificar la expresión genética. En la figura 4 se muestra la potente inhibición de la expresión del gen FMR1 inducida por la IL-1 β . A partir de las 16 horas de incubación se observa una represión absoluta del gen.

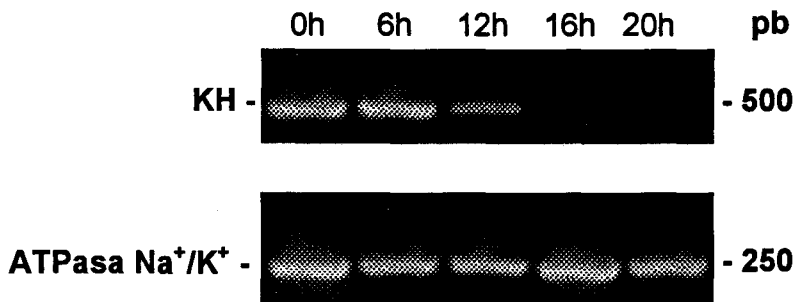


Figura 4: Dependencia del tiempo de incubación con la IL-1 β sobre la expresión del gen FMR1 en células RIN. Las células se incuban a los tiempos indicados con 25 U/ml de IL-1 β . En el panel superior se muestran los resultados obtenidos por RT-PCR de la zona KH. En el inferior la ATPasa Na⁺/K⁺ que se utilizó como control.

2.1 El efecto inhibitor de la IL-1 β es mediado por el óxido nítrico

En células RIN esta descrito que la IL-1 β induce la iNOS y se produce NO (Andrade et al. 1993). Para averiguar si el efecto inhibitor era debido al NO, se trataron las células RIN con IL-1 β y con inhibidores tanto inespecíficos (L-NMA) como específicos (AMT, EIT, L-NIL) de la NOS inducible. También se trataron las células con dadores de NO (SNP). La figura 5 muestra que el SNP tiene el mismo efecto que la IL-1 β . También se puede observar que el efecto inhibitor de la IL-1 β se revierte en presencia de inhibidores de la iNOS. Estos resultados indican que el efecto inhibitor es causado por el NO sintetizado por la iNOS.

Resultados

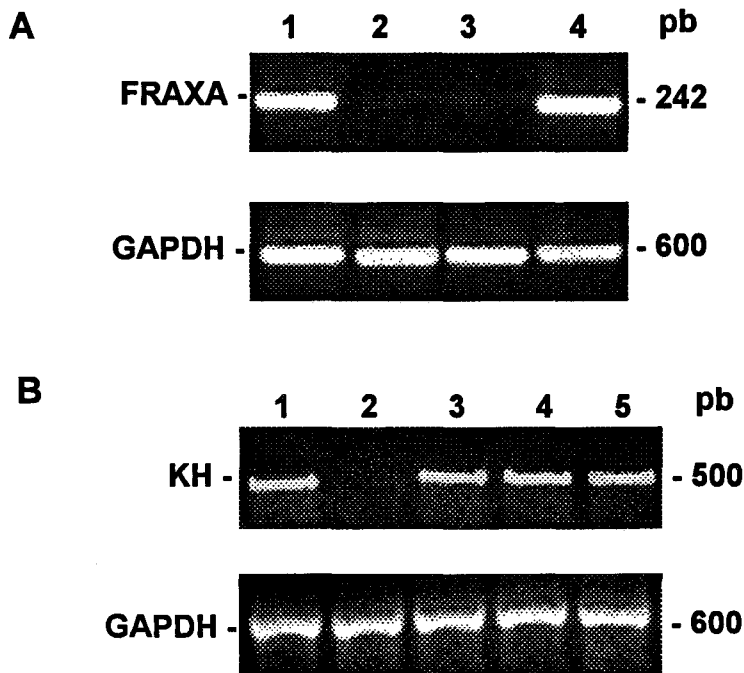


Figura 5: A. Inhibición de la expresión del gen FMR1 en células RIN incubadas con IL-1 β 25 U/ml (2) o SNP 100 μ M (3), durante 16 horas y la reexpresión del gen en presencia de NMA 100 μ M (4), estudiada por RT-PCR de la zona de los CGG del gen FMR1 (242 pb) y la GAPDH. El carril 1 muestra la células controles. B. Reexpresión del gen FMR1 con inhibidores específicos de la iNOS. AMT 20 nM (3), EIT 100 nM (4) y L-NIL 10 μ M (5), por RT-PCR del dominio KH y de la GAPDH, en células RIN tratadas durante 16 horas con IL-1 β 25 U/ml (2). Las células controles se muestran en el carril 1.

2.2 El óxido nítrico no altera la estabilidad del ARN mensajero

Para descartar la posibilidad de que la inhibición de la expresión fuera debida a una degradación del ARNm por el NO, las células se incubaron con la Actinomicina-D (Act-D) un inhibidor de transcripción, en ausencia y en presencia de SNP. Los resultados se muestran en la figura 6, observándose que a las 12 horas la Act-D inhibe completamente la expresión del ARN y este tiempo no es alterado por la presencia del SNP.

Resultados

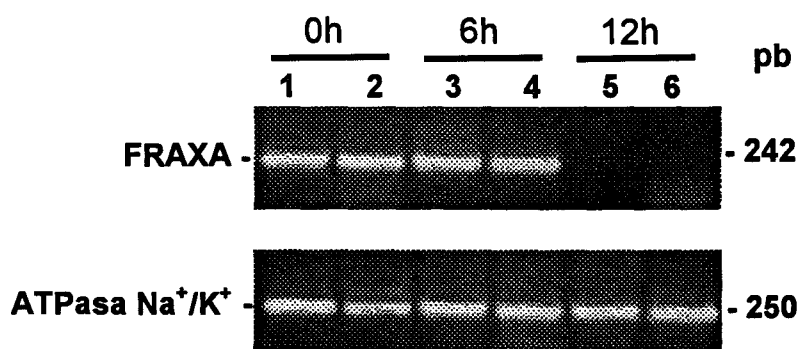


Figura 6: Efecto del SNP sobre la integridad del ARNm. RT-PCR del locus FRAXA (242 pb) y de la ATPasa Na⁺/K⁺ en células RIN tratadas a distintos tiempos (0, 6, y 12 horas) con Act-D 5 µg/ml carriles 1, 3 y 5. En los carriles 2, 4 y 6 las células se trataban con SNP 100 µM y Act-D 5 µg/ml simultáneamente.

3. Efecto de los dadores de óxido nítrico en células Jurkat

Debido a un mejor conocimiento del gen FMR1 en células humanas, proseguimos nuestra investigación en células Jurkat que es una línea de linfocitos humanos. En estas células la IL-1β no es capaz de inducir la iNOS por lo que no se observaba inhibición del gen FMR1. Por ello estudiamos el efecto de diferentes dadores de NO sobre la expresión del gen FMR1 en estas células.

3.1 Efecto del SNP y SIN sobre la expresión del gen FMR1

Las células Jurkat se incubaron con dadores de NO durante 16 horas y la expresión del gen FMR1 se estudió por RT-PCR de la zona KH. La figura 7 muestra que las células tratadas tanto con SNP como con SIN no expresan el gen FMR1.

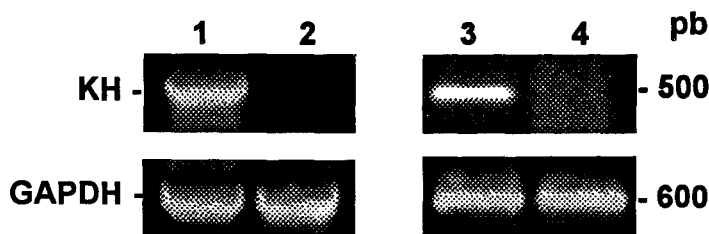


Figura 7: El SNP y el SIN inhiben la expresión del gen FMR1 en células Jurkat. Inhibición total del gen FMR1 estudiada por RT-PCR del dominio KH (500 pb) en células Jurkat controles (1, 3) y tratadas durante 16 horas con SNP 500 µM (2) y SIN 100 µM (4). La GAPDH (600 pb) se utilizó como control interno.

3.2 Efecto del óxido nítrico sobre el promotor del gen FMR1

Una de las dianas mejor conocidas del NO es la activación de la Guanilato ciclasa. Queríamos estudiar si esta era la vía utilizada por el NO para inducir la represión del gen FMR1. Para ello incubamos las células con dibutiril-GMPc que es permeable a través de la membrana celular y remedia las acciones mediadas por la Guanil ciclasa. Sin embargo el aumento de GMPc no tenía ningún efecto sobre la expresión del gen FMR1 (figura 8).

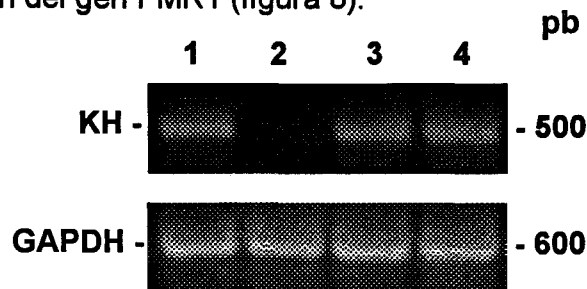


Figura 8: Efecto del dibutiril GMPc sobre la expresión del gen FMR1 estudiada por RT-PCR del dominio KH (500 pb) en células Jurkat. Células control (1), células tratadas con SNAP 100 μM (2), con GMPc 2 mM (3) y dibutiril GMPc 4 mM (4). La GAPDH (600 pb) se ha usado como control interno.

Esta descrito en la literatura que el NO provoca roturas de las hebras del ADN en regiones ricas en CG (Sugiura y Matsumoto.1995). Nuestra hipótesis era que el NO podría alterar la zona promotora rica en CG (isla CpG) o la zona de los CGG en el primer exón del gen FMR1, lo que provocaría la inhibición del gen.

Para estudiar este efecto directo del NO sobre el ADN, se amplificó la zona de los CGG y se secuenció con el método de Maxam y Gilbert, sin embargo no se observaron roturas del ADN. También se utilizaron enzimas de restricción que cortan en la isla CpG del promotor del FMR1 y por la técnica de Southern se observaron los cambios en el patrón de restricción. Los resultados fueron inesperados, puesto que las células tratadas con dadores de NO mostraban un patrón de restricción que correspondía a una ausencia de corte con la enzima de restricción sensible a metilación, lo que sugería que la isla CpG estaba metilada en lugar de cortada. La figura 9 muestra el Southern de las células tratadas y no

Resultados

tratadas con dadores de óxido nítrico, utilizando una enzima sensible a metilación SacII.

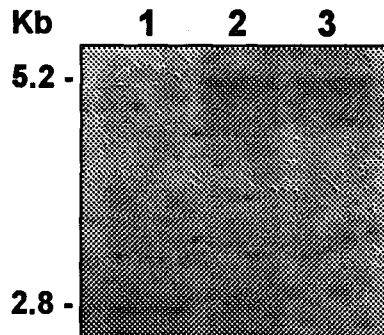


Figura 9: Patrón de restricción del gen FMR1 en células Jurkat tratadas con dadores NO. Southern blot de una doble digestión con HindIII/SacII en células controles (1) y células tratadas con SIN 100 μ M (2, 3).

3.2.1 Efecto del AzadC sobre el estado de metilación del gen FMR1

El AzadC es un agente desmetilante que ha sido utilizado "in vitro" en células de pacientes X-frágiles y que provoca la desmetilación del gen FMR1 y la reactivación de su expresión. Para demostrar que los resultados obtenidos por Southern correspondían realmente al gen metilado y no a algún otro efecto o artefacto, se estudió el efecto del AzadC en células incubadas con dadores de NO. Como se observa en la figura 10 el ADN de las células tratadas con dadores de NO como el SNP y el SIN, muestra una banda que se corresponde con el gen metilado; sin embargo en presencia de un agente desmetilante las enzimas de restricción vuelven a cortar indicando que el promotor se ha desmetilado.

Como se muestra en la figura 4 la inhibición total del gen FMR1 en células RIN y en presencia de IL-1 β se observa a partir de las 16 horas de incubación. La IL-1 β tiene que inducir a la iNOS y después el NO produce la metilación del promotor. Nos pusimos a estudiar, en células Jurkat, el tiempo de exposición a los dadores de NO necesario para producir la metilación completa del promotor. Se estudió la metilación del promotor a diferentes tiempos de incubación con el SNAP

Resultados

a una concentración de 100 μM . Como se observa en la figura 11 a partir de las 3 horas comienza la metilación de la isla CpG del gen FMR1, a las 4 y 5 horas se observa estados intermedios de metilación, mientras que a las 6 horas la isla CpG esta completamente metilada.

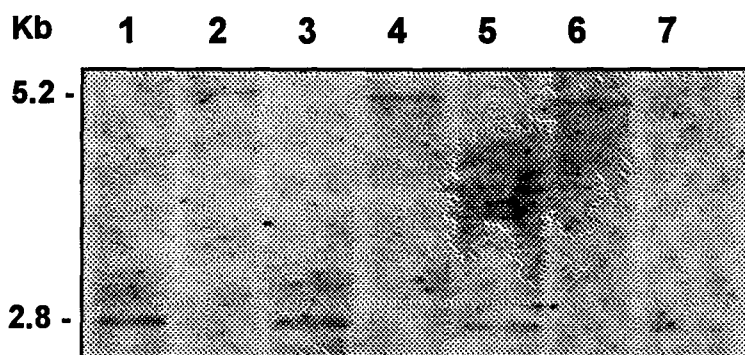


Figura 10: Efecto del AzadC sobre la metilación del promotor del gen FMR1 en células Jurkat incubadas con dadores de NO. Southern blot de una doble digestión con EcoRI/EagI de ADN de células Jurkat control (1) y tratadas con SNP (2), con SIN (3, 5) y con SNP y AzadC (3), SIN y AzadC (5) durante 24 horas. En el carril 7 las células se tratarón primero con SIN durante 16 horas y después de lavarlas, se incuban con AzadC durante 24 horas.

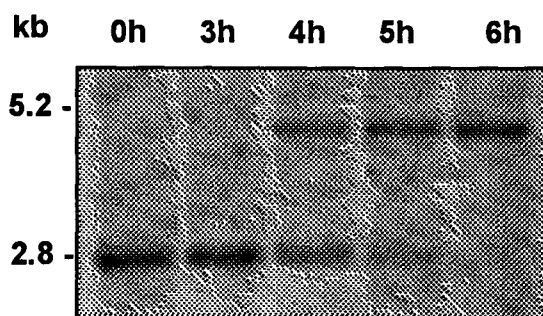


Figura 11: Dependencia de tiempo del estado de metilación del gen FMR1 en células Jurkat tratadas con SNAP 100 μM .

3.2.2 Reexpresión del gen FMR1 por agentes desmetilantes

Puesto que el NO induce a la metilación de la isla CpG del promotor del gen FMR1 y el AzadC revierte este efecto, era de esperar que la expresión del gen

Resultados

silenciado por metilación se revirtiera con el AzadC. Se estudió la expresión del gen FMR1 por la técnica de Northern, utilizando una sonda de ADNc del gen FMR1 según se especifica en el apartado de Material y Métodos. Tanto las células Jurkat tratadas con dadores de NO como las células RIN tratadas con IL-1 β (ver figura 12) muestran reexpresión del gen después de ser tratadas con el AzadC.

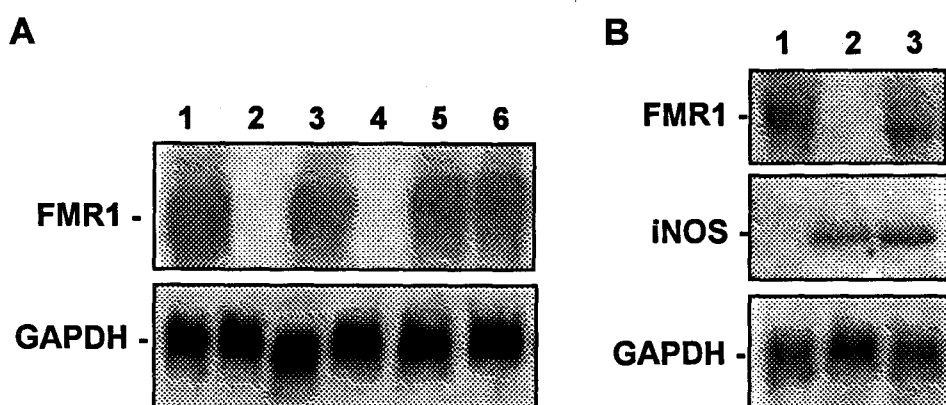


Figura 12: Efecto del AzadC sobre la expresión del gen FMR1 previamente silenciado por dadores de NO. **A:** Northern blot de células Jurkat tratadas con SNP 500 μ M (2), SNAP 100 μ M (4) y con el dador de NO mas Azad C (3, 4 y 5) en el carril 6 la células se tratan primero con SNAP se lavan y se incuban nuevamente con AzadC. **B:** Northern blot de células RIN tratadas con IL-1 β (2) y con IL-1 β mas AzadC (3). Se observa la expresión de la iNOS por exposición a la IL-1 β . La GAPDH se utilizó como control. El carril 1 muestra las células controles.

4. Efecto de los dadores de óxido nítrico sobre la actividad ADN MeTasa

Como se ha expuesto anteriormente el NO provoca la metilación del gen FMR1. La principal enzima responsable de la metilación del ADN es la ADN MeTasa. Hemos estudiado si el efecto del NO era mediado por un aumento de la expresión de la enzima ADN MeTasa y/o un aumento de su actividad.

Resultados

4.1 Efecto de la IL-1 β y del SIN sobre la actividad ADN MeTasa en células intactas

Las células RIN se incubaron con 25 U/ml de IL-1 β durante 16 horas y las células Jurkat se incubaron el mismo periodo de tiempo con 100 μ M SIN. Al finalizar la incubación se recogen las células y se obtiene un extracto de proteínas nucleares en el que se determina la actividad ADN MeTasa. Como se observa en la figura 13 la actividad ADN MeTasa esta aumentada de forma estadísticamente significativa en las células tratadas con respecto a las células controles.

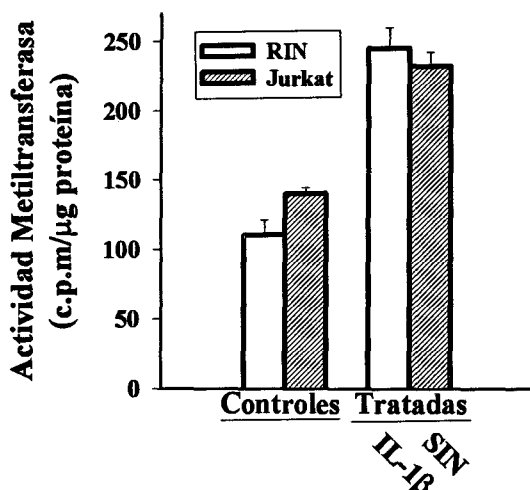


Figura 13: Actividad ADN MeTasa, en células RIN y Jurkat, controles y expuestas a IL-1 β y SIN respectivamente. Cada condición representa la media de tres experimentos independientes \pm SEM.

4.2 El óxido nítrico no afecta la expresión de la ADN MeTasa

Como se ha descrito anteriormente, el NO aumenta la actividad de la enzima ADN MeTasa. Para conocer si el incremento de la actividad se debía a un aumento de la expresión de esta enzima se realizó un Northern y un Western. Con un ADNc de la ADN MeTasa y con anticuerpos policlonales respectivamente. Como se refleja en la figura 14, el NO no altera la expresión de la ADN MeTasa.

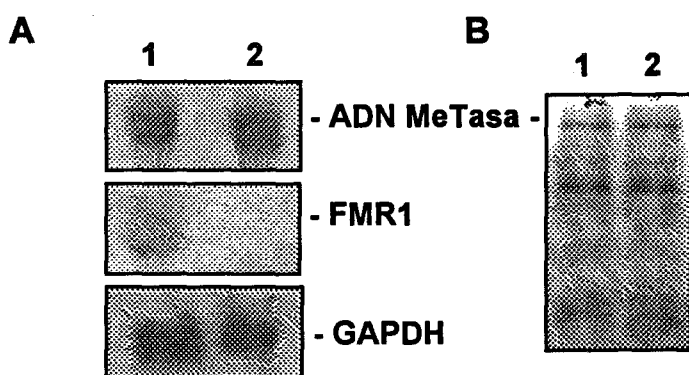


Figura 14: Efecto del NO sobre la expresión del gen de la ADN MeTasa. **A.** Northern blot de la ADN MeTasa en células Jurkat control (1) e incubadas durante 16 horas con SNAP 100 μ M (2). El FMR1 y la GAPDH se utilizaron como controles. **B.** Western blot de la ADN MeTasa utilizando un anticuerpo policlonal en células jurkat incubadas 16 horas con SNAP 100 μ M.

4.3 Efecto de los dadores de óxido nítrico sobre la actividad metiltransferasa en extractos nucleares de células Jurkat

Para determinar si el efecto del NO se ejercía de forma directa sobre la enzima ADN MeTasa se incubaron extractos nucleares con distintas concentraciones de SNAP durante 3 horas y se determinó la actividad de la enzima. En la figura 15 se muestra una dependencia de concentración donde puede observarse un aumento de la actividad ADN MeTasa a partir de 5-10 μ M y el máximo se alcanza con 20 μ M, la exposición a los peroxinitritos y al nitrito sódico no altera la actividad enzimática, lo que demuestra que es un efecto del NO.

La figura 16 muestra una dependencia de tiempo con distintos dadores de NO, observándose que la actividad ADN MeTasa incrementa con el tiempo de exposición y alcanza un máximo a las 3 horas. Se utilizaron como controles negativos el SIN y el SNP caducados (expuestos a temperatura ambiente durante un tiempo superior a su vida media) sin que se obtuviera ningún efecto.

Estos resultados sugieren que el NO, directamente o a través de mediadores nucleares regula la actividad ADN MeTasa.

Resultados

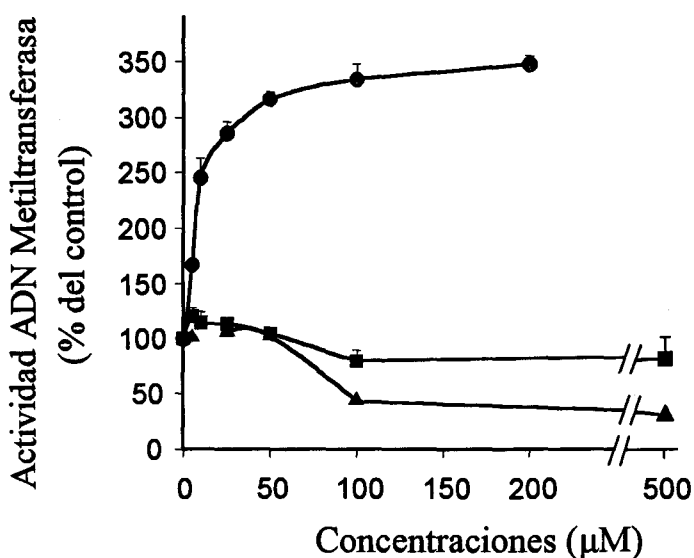


Figura 15: Dosis efecto de SNAP sobre la actividad ADN MeTasa , en extracto de proteínas nucleares. SNAP (●), peroxinitritos (■) y nitrito sodico (▲). La actividad ADN MeTasa se expresa como % del control, cada punto representa la media de tres experimentos independientes \pm SEM.

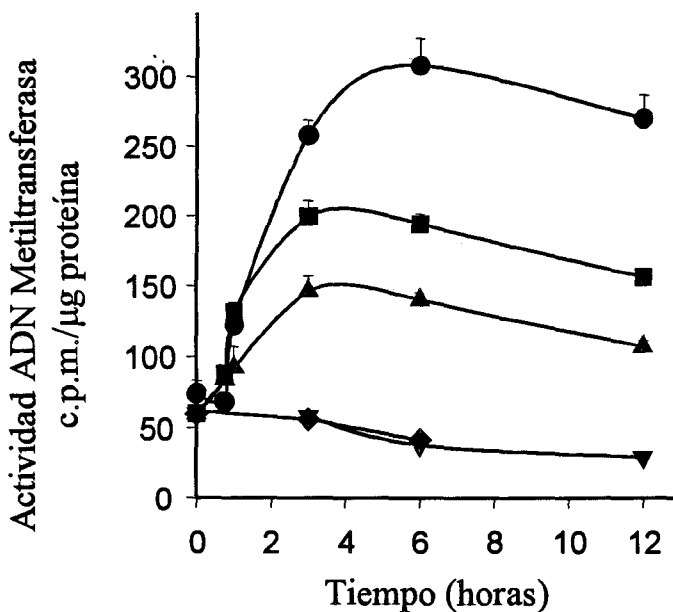


Figura 16: Dependencia del tiempo de exposición a distintos dadores de NO, sobre la actividad ADN MeTasa en extracto de proteínas nucleares, SNAP (●), SNP (■), SIN (▲). Como controles se utilizaron SNAP (◆) y SIN (▼) caducados. Cada punto representa la media de tres experimentos independientes \pm SEM.

Resultados

Para determinar si el efecto del NO sobre la actividad ADN MeTasa podría explicarse por nitrosilación de alguna cisteína de la proteína, se estudio el efecto de agentes antioxidantes como el DTT, GSH o β -ME. El incremento de la actividad ADN MeTasa inducido por SNAP se revierte después de centrifugar o pasar por una columna de sefadex G-25 el extracto nuclear para quitar el dador de NO e incubar nuevamente con los agentes reductores (figura 17). Dado la ADN MeTasa tiene una cisteina en el centro catalítico y 8 en la región reguladora (Bestor.1992) es probable que el efecto del NO se debe a la nitrosilación de algunos de estos residuos.

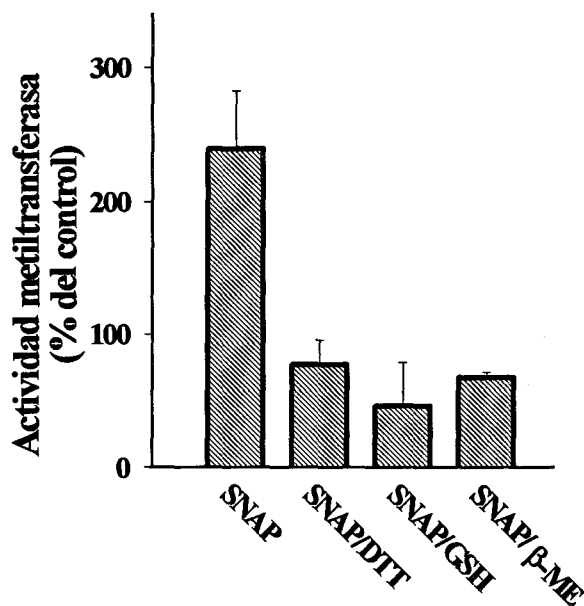


Figura 17: Efecto de agentes reductores sobre la actividad ADN MeTasa, en extracto de proteínas nucleares. Los extractos se incuban con SNAP 50 μ M durante 3 horas, se lavan y se incuban con los agentes reductores DTT 5mM, GSH 100 μ M y β -ME 100 μ M durante 2 horas. El control se trato de igual manera pero sin la adición del SNAP.

4.4 El efecto del óxido nítrico es específico sobre la ADN MeTasa

Como se ha expuesto anteriormente el NO aumenta la actividad ADN MeTasa tanto en células enteras como en extractos de proteínas nucleares. Hemos estudiado también el efecto del NO sobre algunas enzimas comunes como

Resultados

la LDH, la HK y la PK, para determinar si modifica sus actividades (Tabla. 1). Los resultados in vitro muestran que el NO activa específicamente a la ADN MeTasa sin alterar las otras enzimas estudiadas. Sin embargo, la incubación de las células enteras con el SNAP producía un ligero descenso, estadísticamente significativo de la HK. Debido a la falta de efecto en los experimentos in vitro y que la HK tiene una región CG en el promotor, puede suponer una inhibición de la expresión de la enzima por metilación del promotor inducida por el SNAP.

	DNA MeTasa	LDH	HK	PK
In vivo (100 μ M SNAP)	235 \pm 94*	98 \pm 1.4	86.3 \pm 23*	99 \pm 17
In vitro (50 μ M SNAP)	366 \pm 90*	105 \pm 17	100 \pm 1	107 \pm 12

Tabla.1: Efecto del SNAP sobre la actividad de distintas enzimas en células Jurkat. En los experimentos "in vivo" el SNAP se aplicaba sobre células enteras. En los experimentos "in vitro" el SNAP se aplicaba sobre fracciones subcelulares. * $p < 0.001$ vs control (valores estadísticamente significativos).

5. El óxido nítrico inhibe la expresión del gen HPRT

Como se ha expuesto anteriormente, la inhibición de la expresión del gen FMR1 por el NO se debe a la metilación de la isla CpG de su promotor. Hemos estudiado si el NO pudiese afectar a otros genes con isla CpG, como el gen de la HPRT. Para ello se ha estudiado la expresión de este gen por RT-PCR, en células Jurkat incubadas con SNAP 100 μ M y en células RIN estimuladas con IL-1 β . Los resultados se muestran en la figura 18 donde se observa la inhibición completa del gen inducida por NO y su reexpresión por el agente desmetilante AzadC, indicando que el NO afecta otros genes con isla CpG y no es un efecto específico

Resultados

sobre el gen FMR1. Como la ADN MeTasa tiene una actividad aumentada en muchas células tumorales, estudiamos también el efecto del NO sobre la expresión del gen FMR1 y el gen HPRT en linfocitos frescos humanos. Los resultados se muestran también en la figura 18.

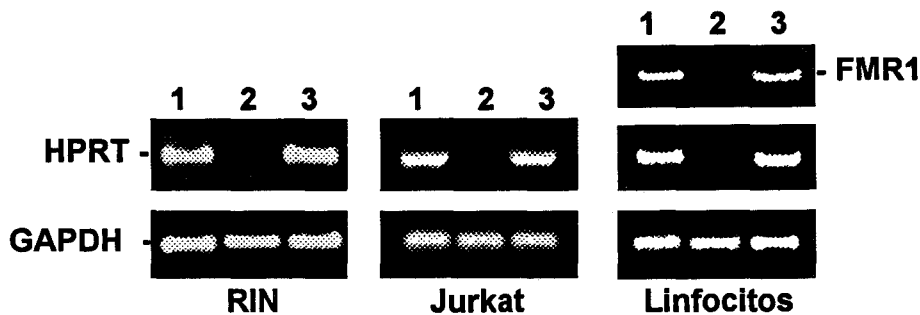


Figura 18: Estudio por RT-PCR de la inhibición de la expresión del gen HPRT por NO en células RIN (250 pb) y en Jurkat (794 pb) (2). Los controles se muestran en los carriles 1 y la reversibilidad con AzadC se en los carriles 3. En el panel de la derecha se muestran los resultados obtenidos en linfocitos frescos obtenidos de sangre periférica.

6. El estado de metilación producido por el óxido nítrico es reversible

Dado que la metilación tiene un efecto drástico sobre la expresión de los genes susceptibles era importante determinar si el estado de metilación se transmitía mitóticamente en las células en fase de proliferación. Para ello se ha estudiado por Southern blot el estado de metilación del gen FMR1 en células Jurkat después de quitar el estímulo determinando en paralelo la multiplicación celular. La figura 19.A muestra que a las 48 horas después de quitar el estímulo, el número de células ha aumentado, y en el Southern solo aparece la banda que corresponde al gen metilado lo que sugiere que la metilación se ha transmitido a las células hijas. Sin embargo a las 72 horas después de eliminar el NO, comienza a perderse la metilación (figura 19.B) lo que indicaría que la metilación puede ser reversible. Sin embargo la aparición de las dos bandas en el Southern podría ser el resultado de la pérdida de la metilación en las nuevas generaciones. Para descartar esta posibilidad se estudio la metilación en linfocitos frescos que no

Resultados

están en fase de división, obteniéndose el mismo resultado, lo que apoya la idea de la reversibilidad de la metilación (figura 19.C).

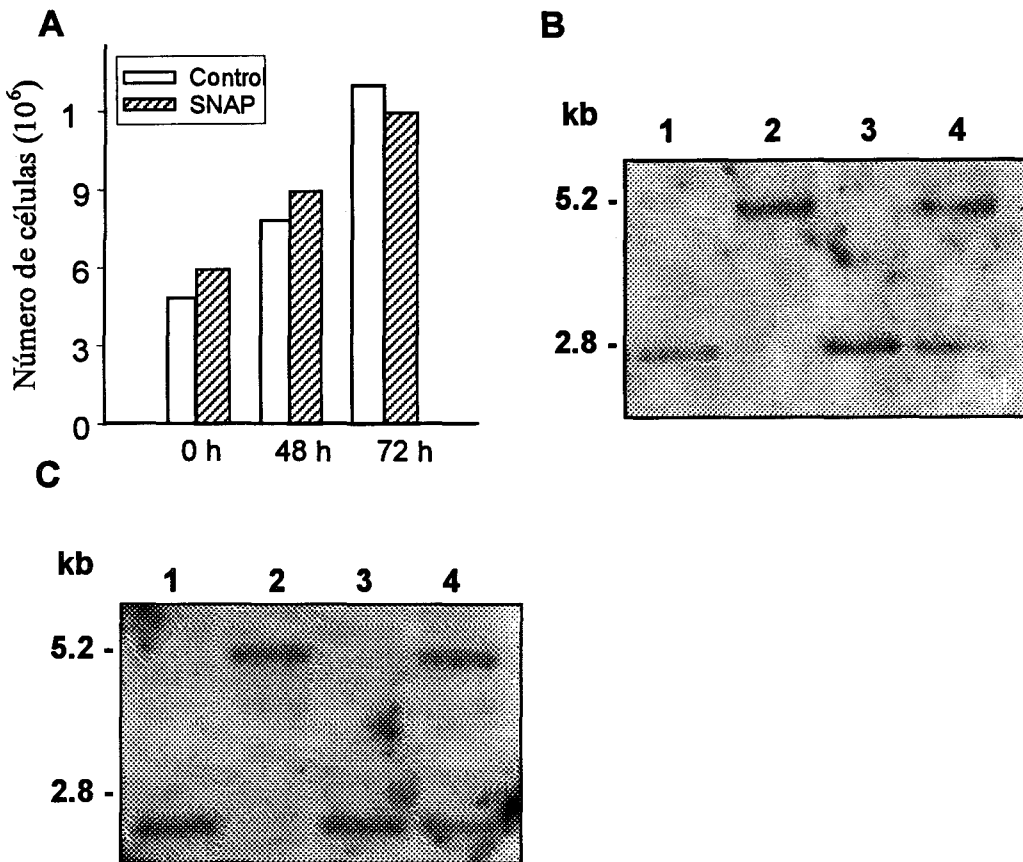


Figura 19: Reversibilidad de la metilación producida por el NO en células Jurkat y linfocitos frescos de sangre periférica. **A:** Estudio de la proliferación celular, con el "Kit" AMT, después de quitar el estímulo del medio y recrecer las células en medio libre de NO. **B:** Estudio del estado de metilación en células Jurkat en fase de división, después de quitar el SNAP del medio a las 48 h (2) y a las 72 h (4), los carriles 1 y 3 muestra los controles. **C:** El protocolo experimental es como en B pero en linfocitos frescos.

7. Efecto de la tricostatina A sobre la metilación del gen FMR1

En Introducción se ha expuesto la relación existente entre la metilación del ADN y la formación del complejo proteico represor con activación de las desacetilasas. La activación de las desacetilasas de las histonas H3 y H4 forma un

Resultados

estado de la cromatina que le hace inaccesible a los factores de transcripción. Para conocer si la metilación inducida por NO utiliza el mismo complejo represor se estudio el efecto de la tricostatina A (TSA), un inhibidor de desacetilasas, sobre la expresión del gen FMR1 en células Jurkat expuestas a dadores de NO. En la figura 20 se observa que la inhibición se revierte cuando las células se incuban con SNAP y TSA sugiriendo que el NO activa el complejo represor descrito, vía metilación de las citosinas.

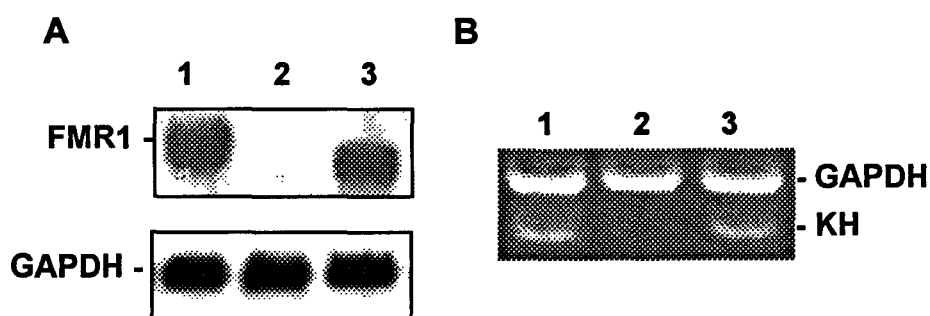


Figura 20: Efecto de la TSA sobre la expresión del gen FMR1 previamente silenciado con NO. **A.** Northern blot del gen FMR1, control (1), SNAP 100 μM (2) y SNAP 100 μM + TSA 2 μM (3). **B.** Las mismas condiciones experimentales que en A estudiando la expresión del gen por RT-PCR. En ambos casos la GAPDH se utilizó como control.

DISCUSIÓN

1. La transcriptasa inversa y posterior PCR (RT-PCR) de la zona KH puede ser el método de elección para estudiar la expresión del gen FMR1

En este trabajo se ha estudiado la expresión del gen FMR1 por la técnica de RT-PCR, amplificando parte de los dominios KH1 y KH2 que constituyen una zona del gen altamente conservada, localizada en la primera parte del gen donde no se ha detectado maduración ("Splicing") alternativa del ARN m (Verkerk et al. 1993). Se han diseñado unos cebadores que amplifican los dominios KH y el producto de la amplificación da una banda de 500 pb de tamaño, independientemente de las especies y/o los tejidos estudiados, lo que corrobora la conservación de esta región. Nuestros resultados en pacientes concuerdan con los descritos por Pieretti (Pieretti et al. 1991), con expresión del gen en portadores y ausencia de expresión en afectados. Sin embargo, la zona KH parece ser más fácil de amplificar porque nosotros encontramos sistemáticamente expresión del gen FMR1 en músculo cardíaco de rata donde previamente, utilizando los cebadores descritos por Pieretti, no se observaba expresión (Deys et al. 1993; Khandjian et al. 1995). Para el diagnóstico de los pacientes X-frágiles la mejor técnica sigue siendo la hibridación de Southern, aunque en algunos casos, puede ser útil conocer la expresión del gen y para ello la RT-PCR de los dominios KH puede ser el método de elección. La RT-PCR es muy sensible, se puede hacer con muy poca cantidad de muestra y es muy específica; genes con una gran homología con FMR1 como son FXR1 y FXR2 no se amplifican, sin embargo la

zona KH amplificada tiene el mismo tamaño (500 pb) en especies tan alejadas como la humana y el *Xenopus*. Uno de los inconvenientes de la RT-PCR es que no puede diferenciarse entre mujeres normales y portadoras, para ello se requiere hacer una PCR cuantitativa. Otro punto de interés de la amplificación de esta zona es la facilidad con la cual se puede secuenciar el producto de PCR y estudiar homologías entre tejidos y entre especies. La secuenciación de esta zona puede también ser importante para localizar mutaciones en pacientes con el fenotipo típico del síndrome del X-frágil pero que no tengan un número anómalo de tripletes CGG. De hecho la única mutación puntual descrita como causa del síndrome X-frágil, en un paciente con un cuadro severo, se encuentra en la zona KH probablemente por la relevancia funcional de esta región en la proteína FMRP.

2. La IL-1 β y los dadores de óxido nítrico inhiben la expresión genética y su efecto no está mediado por la guanil ciclasa

El gen FMR1 pertenece a una familia heterogénea de genes conocidos como genes "housekeeping" o de mantenimiento (Coy et al. 1995). La mayoría de estos genes se expresan constitutivamente, aunque muchos de ellos son específicos de tejidos y tienen con frecuencia una isla CpG en su promotor. La drástica inhibición de la expresión del gen FMR1 en células RIN por incubación con IL-1 β se debe a la producción de NO puesto que se previene cuando las células se incuban con inhibidores de la iNOS tanto inespecíficos como el L-NAME o específicos como el AMT, el EIT y L-NIL. Además, los dadores de NO en células Jurkat, donde no hay receptores para la IL-1 β tienen el mismo efecto represor. Estos resultados muestran, por primera vez, un efecto claro y potente de la IL-1 β a través de la producción de óxido nítrico sobre la expresión de genes con isla CpG en el promotor. Puesto que la diana del NO mejor conocida es la guanil ciclasa, estudiamos si la acción sobre la expresión del gen FMR1 podría estar mediada por activación de dicha enzima y producción de GMPc. Sin embargo, la incubación de las células con 2 mM dibutilil GMPc que es permeable y mimetiza

los efectos del GMPc no tenía ningún efecto sobre la expresión descartándose esa vía como mediadora de la acción del NO (ver figura 8).

3. El óxido nítrico provoca la metilación de la isla CpG del promotor del gen FMR1

La regulación de la expresión de los genes de mantenimiento no se conoce, pero en aquellos que contienen una isla CpG se sabe que su expresión depende del estado de metilación de la citosina en las secuencias CG. Los pacientes X-frálgiles tienen metilada la isla CpG del promotor del FMR1 y no expresan el gen (Pieretti et al. 1991; Hmadcha et al. 1998). El NO es un radical libre que actúa de mediador en importantes funciones celulares y está involucrado en muchos procesos fisio-patológicos (Moncada y Higgs. 1993; Avila et al. 1998). Las acciones del NO sobre el genoma no están bien definidas. Se ha descrito que el NO produce roturas en el ADN sobre todo en los lugares ricos en CG. Nuestra primera hipótesis sobre el mecanismo por el que el NO induce la drástica inhibición de la expresión del gen FMR1 fue que producía roturas a nivel de los CG, abundantes tanto en el primer exón como en la zona promotora. Utilizamos el método de secuenciación de Maxam Gilbert según el protocolo de trabajo de Sugiura (Sugiura y Matsumoto.1995; Wilson et al. 1997), pero no se observó una clara rotura del ADN a nivel de los CG. Otra aproximación para poner de manifiesto la posible alteración de los CG fue realizar un Southern con las enzimas empleadas para el diagnóstico de los pacientes X-frálgiles ya que una de las dos que se utilizan en la doble digestión, tiene un centro de restricción en la isla CpG del promotor. De forma inesperada el patrón de restricción que se obtuvo correspondía a una digestión en la que la isla CpG estaba metilada. La demostración de que el efecto del NO se debía a la metilación de la isla CpG se comprobó por la reversión inducida por el 5-AzadC que es un agente desmetilante utilizado en numerosos trabajos (Chiurazzi et al. 1998). Para descartar que el AzadC reaccionara con el NO y pudiera simular una reversión, en algunos casos

se incubaban las células con el dador de NO y después de lavar el estímulo se incubaba con el agente desmetilante obteniéndose los mismos resultados. Además, la metilación no era un efecto colateral sino la causa principal de la inactivación del gen, ya que por Northern se observaba una reexpresión del gen cuando se trataban las células con agentes desmetilantes. El proceso de metilación y desmetilación del ADN esta asociado con la inactivación del cromosoma X en mujeres, el desarrollo y la carcinogénesis (Keohane et al. 1998; Shaoping et al. 1999). Además el síndrome del cromosoma X-frágil y el retraso mental ligado a FRAXE se deben a metilación del promotor y ausencia de expresión de los genes FMR1 y FMR2 respectivamente (Oberle et al. 1991; Li et al. 1993). La metilación de los genes con islas CpG representa un mecanismo importante de regulación de la expresión de genes específicos de tejidos y diferentes factores de transcripción se asocian con una activación de la enzima ADN MeTasa (Marin et al. 1997; Matsuo et al. 1998; Merlo et al. 1995; Chen et al. 1998; Fitzpatrick et al. 1998). Por ello este nuevo efecto del NO puede ser importante en algunos procesos fisiopatológicos.

4. La metilación inducida por óxido nítrico se debe a la activación de la enzima ADN MeTasa y no a un aumento de su expresión

Como se ha expuesto en Introducción la principal enzima encargada de la metilación de las citosinas en las secuencias CG es la ADN MeTasa. Era de esperar que el efecto del NO sobre la metilación se debiera a un aumento en la expresión y/o actividad de dicha enzima. Experimentos realizados en células RIN incubadas con IL-1 β o en células Jurkat incubadas con dadores de NO pusieron de manifiesto un aumento estadísticamente significativo de la actividad ADN MeTasa del mismo orden de magnitud que el incremento observado por Bakin y Curran en células transformadas vía fos (Bakin y Curran 1999). Sin embargo, mientras que estos autores observaban un aumento de expresión de la enzima en las células transfectadas con fos, los dadores de NO parecen no inducir un

Discusión

aumento de expresión de la enzima ADN MeTasa, determinada por Northern o por Western (ver figura 14 de los resultados). El aumento de actividad de la ADN MeTasa también podría deberse a un aumento de expresión de la ADN MeTase II o III (Okano et al. 1998), sin embargo estas enzimas se expresan sobre todo en tejidos fetales y el hecho de que se haya observado un efecto directo del NO sobre un extracto nuclear (ver figura 15) hace improbable que el NO tenga un efecto sobre la expresión de ninguna de las ADN MeTasas descritas.

Puesto que esta descrito que el NO tiene efectos directos sobre diferentes proteínas (Kröncke et al. 1997) y no hemos observado cambios en la expresión de la ADN MeTasa, estudiamos si los dadores de NO tenían efecto directo sobre un extracto nuclear. Efectivamente la exposición directa del extracto de proteínas nucleares a dadores de NO inducía un aumento de actividad de la enzima compatible con los resultados observados en células enteras. La ADN metiltransferasa tiene una cisteína en el centro catalítico y varios grupos SH en el extremo amino terminal al que se le adscribe una función reguladora (Bestor et al. 1992). Por ello, la nitrosilación de cualquiera de dichos grupos SH por NO puede ser la causa del cambio de actividad de la enzima. Además, la incubación posterior del extracto con agentes reductores como el ditiotreitól, 2-mercaptoetanol o glutatión reducido revertía el efecto del NO, lo que apoya la hipótesis de la nitrosilación de alguna cisteína del enzima. Sin embargo, es necesario estudiar el efecto del NO sobre la enzima purificada para determinar si el efecto es realmente directo sobre la ADN MeTase o participa como intermediaria alguna otra proteína del extracto. En caso de un efecto directo sobre la enzima habría que determinar que aminoácido estaría implicado. Se ha descrito que la pérdida del extremo amino-terminal, por proteólisis activa al enzima (Glickman et al. 1997). Podría especularse que el NO favorecería la hidrólisis de la ADN MeTasa y con la eliminación del extremo amino-terminal así aumentar su actividad. Sin embargo los datos del western no apoyan esta hipótesis porque la banda correspondiente a la ADN MeTasa tiene el peso molecular estimado para la proteína completa sin la pérdida de los 2/3 de la enzima correspondiente al extremo amino regulador. El incremento de la actividad de la ADN MeTasa inducida por NO que hemos

encontrado en nuestros experimentos, contrasta con la inhibición que produce sobre la metiononina adenosil transferasa (Avila et al. 1998), enzima que cataliza la síntesis de S-adenosil metionina sustratos de la ADN Metasa. La concentración de NO a la que inhibe la adenosil transferasa es más baja que la que nosotros utilizamos y se ha descrito en hígado. Sería conveniente estudiar el efecto del NO sobre la ADN MeTasa en células hepáticas para explicar este aparente contradicción.

5. El efecto del óxido nítrico sobre la expresión genética depende del tipo de célula y del gen

Puesto que el efecto del NO se debe a un aumento de actividad de la enzima ADN MeTasa, es lógico pensar que otros genes con isla CpG también puedan ser silenciados por el NO. La enzima de recuperación de las purinas, la HPRT se localiza en el cromosoma X, tiene una isla CpG en el promotor y se utiliza como modelo de silenciamiento de genes por metilación, en el proceso de inactivación de uno de los dos cromosomas X en mujeres (Keohane et al. 1998). Efectivamente tanto la IL-1 β en células RIN como los dadores de NO en células Jurkat producen la represión completa de este gen. Además, la represión por aumento de actividad de la ADN MeTasa no es un fenómeno exclusivo de células tumorales porque ambos genes se inhiben cuando linfocitos humanos no tumorales se incuban con dadores de NO (ver figura 18). Sin embargo, el fenómeno no es tan ubicuo como habíamos pensado a partir de los resultados expuestos en esta Tesis y datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio muestran que el efecto del NO depende del tipo de células y del gen que estudiemos. Por ejemplo, en células RAW, el INF- γ que induce a la iNOS y produce una gran cantidad de óxido nítrico (superior a los dadores de NO a la concentración utilizada por nosotros), no inhibe completamente la expresión del gen FMR1, pero este gen sí es inhibido en estas células por la exposición directa a dadores de NO. Sin embargo, estos dadores no tienen efecto, en estas mismas células, sobre el gen de la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD-Mn) que

Discusión

tiene una región CG en el segundo intrón que actúa de promotor y que se inhibe por metilación. Además, en células Jurkat los dadores de NO no afectan la expresión del gen de la proteína precursora del beta amiloide que tiene una región rica en CG en el promotor. Estos resultados indican que es necesario estudiar diferentes dadores de NO, en diferentes células y sobre distintos genes para determinar el papel que la represión génica producida por NO tiene como mediadora de sus efectos fisiopatológicos. En el caso de las interleuquinas es necesario estudiar si la puesta en marcha de otros mediadores intracelulares interaccionan con la activación de la enzima ADN MeTasa lo que puede resultar en efectos contrapuestos. La resultante sería diferente en cada tipo celular, dependiendo del estímulo y del gen en particular.

Siguiendo con este razonamiento, esta descrito que el factor nuclear de transcripción NF- κ B produce en células B una desmetilación específica del gen de la Inmunoglobulina en el locus IgK (Kirillov et al. 1996) lo que induce su expresión en determinada etapa de la maduración de la célula. En muchas células incluyendo las células RIN, la IL-1 β induce la estimulación de una cascada de señales que activa al factor NF- κ B (Cao et al. 1996), por lo que la IL-1 β actuaría sobre dos procesos contrapuestos. Sin embargo, el efecto metilante de la IL-1 β mediado por el NO parece más poderoso que el efecto desmetilante del factor NF- κ B. Además en células Jurkat la incubación con PMA y ionoforo (A23187) que está descrito inducen la activación de NF- κ B (Imbert et al. 1996) no impide la inhibición de la expresión génica producida por NO. Especulamos, que en células RIN la IL-1 β podría de una manera transitoria inducir la inhibición de genes de mantenimiento metilando sus islas CpG mediante NO e inducir la expresión de otros genes activando la desmetilación a través de la activación del NF- κ B. Recientemente se han descrito las enzimas desmetilasas (Cervoni et al. 1999), que pueden ser importantes en la diferente susceptibilidad a la metilación de distintas células y genes. También se ha descrito que Ras induce un aumento de actividad desmetilante en paralelo con un aumento de la transcripción de la ADN MeTasa (Rouleau et al. 1995). Como se ha expuesto previamente, en células

RAW la exposición a dadores de NO reprime la expresión del gen FMR1, sin embargo el IFN- γ no tiene un efecto claro sobre la expresión de dicho gen. En estas células, la inducción de otras vías, como la activación de NF- κ B, por el IFN- γ puede contrarrestar la metilación inducida por el NO. En estudios preliminares hemos observado que la incubación simultánea con dadores de NO y agentes que inducen NF- κ B revierten el efecto represor del NO.

6. La represión de la expresión del gen FMR1 en células de pacientes X-frágiles y en células incubadas con óxido nítrico tiene características diferentes

Nuestros resultados describen la primera inhibición total por metilación del gen FMR1, fuera del cuadro clínico del síndrome X-frágil y de la inactivación del gen en el cromosoma X inactivo de las mujeres. Pero la metilación en las dos condiciones tiene características diferentes. La metilación inducida por NO, se pierde con el tiempo (ver figura 19), mientras que es permanente en las células procedentes de pacientes X-frágiles. Además, la inhibición de la expresión genética inducida por la exposición a NO de las células en cultivo se revierte por agentes desmetilantes como el AzadC así como por inhibidores de las desacetilasas como la TSA (figura 20). Sin embargo, las células procedentes de pacientes X frágiles revierten la expresión del gen FMR1 cuando se tratan con agentes desmetilantes (Chiurazzi et al. 1998) pero no con inhibidores de las desacetilasas (Coffee et al. 1999). Estos autores postulan que el incremento en el número de CGG induce un cambio conformacional de la cromatina que impide la desacetilación completa de las histonas. Otros autores obtienen resultados ligeramente diferentes observando una reactivación parcial cuando las células se tratan con TSA (Chiurazzi et al. 1999).

7. El efecto mutagénico del óxido nítrico podría explicarse por su acción sobre la metilación de las citosinas

Discusión

Existen numerosos trabajos que muestran que el NO tiene capacidad mutagénica sobre todo por inducción de transiciones C→T (Sugiura y Matsumoto 1995). La potente activación de la ADN MeTasa y la consiguiente metilación en citosinas que hemos encontrado en nuestro trabajo puede explicar dichas transiciones C→T. Las citosinas metiladas pueden convertirse en timinas por simple desaminación, proceso que ocurre de una manera espontánea y que se potencia en presencia de NO (Wink et al. 1991). Puede sugerirse que las transiciones C→T inducida por NO son el resultado de su potente efecto sobre la metilación de las citosinas. Por otro lado sería interesante estudiar el efecto del NO sobre la ADN MeTasa en células hepáticas, ya que en estas células el efecto del NO sobre la expresión de genes con isla CpG, como algunos antioncogenes podría explicar la gran incidencia de cáncer de hígado en los pacientes con cirrosis circunstancia en la que el NO esta muy elevado de forma crónica.

BIBLIOGRAFÍA

Abitbol M, Menini C, Delezoide AL, Rhyner T, Vekemans M, Mallet J. Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR1 expression in the human fetal brain. *Nat Genet* . **1993**; 4(2): 147-153.

Andrade J, Conde M, Sobrino F, Bedoya FJ. Activation of peritoneal macrophages during the prediabetic phase in low-dose streptozotocin-treated mice. *FEBS Lett*. **1993**; 327(1): 32-34.

Ashley CT Jr, Wilkinson KD, Reines D, Warren ST. FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science*. **1993**; 262(5133): 563-566.

Avila MA, Carretero MV, Rodriguez EN, Mato JM. Regulation by hypoxia of methionine adenosyltransferase activity and gene expression in rat hepatocytes. *Gastroenterology*. **1998**; 114: 364-371.

Bakin AV, Curran T. Role of DNA 5-Methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science*. **1999**; 283: 387-390.

Bender J. Cytosine methylation of repeated sequences in eukaryotes: the role of DNA pairing. *Trends Biochem Sci* .**1998**; 23: 252-256.

Bibliografía

Bestor TH. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J.* **1992**; 11(7): 2611-2617.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* **1994**; 368(6474): 850-853.

Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature.* **1996**; 383(6599): 443-446.

Cervoni N, Bhattacharya S, Szyf M. DNA demethylase is a processive enzyme. *J Biol Chem.* **1999**; 274(13): 8363-8366.

Coffee B, Zhang F, Warren ST, Reines D. Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells. *Nat. Genet.* **1999**; 22: 98-101.

Corbin F, Bouillon M, Fortin A, Morin S, Rousseau F, Khandjian EW. The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)⁺ mRNA in actively translating polyribosomes. *Hum Mol Genet.* **1997**; 6(9): 1465-1472.

Counts JL, Goodman JI. Alterations in DNA methylation may play a variety of roles in carcinogenesis. *Cell.* **1995**; 83(1): 13-15.

Coy JF, Sedlacek Z, Bachner D, Hameister H, Joos S, Lichter P, Delius H, Poustka A. Highly conserved 3' UTR and expression pattern of FXR1 points to a divergent gene regulation of FXR1 and FMR1. *Hum Mol Genet.* **1995**; 4(12): 2209-2218.

Chen X, Mariappan SV, Catasti P, Ratliff R, Moyzis RK, Laayoun A, Smith SS, Bradbury EM, Gupta G. Hairpins are formed by the single DNA strands of

Bibliografía

the fragile X triplet repeats: structure and biological implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92(11): 5199-5203.

Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenish R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*. 1998; 395: 89-92.

Chiurazzi P, Pomponi MG, Willemsen R, Oostra BA, Neri G. In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 1998; 7: 109-113.

Chiurazzi P, Pomponi MG, Pietrobono R, Bakker CE, Neri G, Oostra BA. Synergistic effect of histone hyperacetylation and DNA demethylation in the reactivation of the FMR1 gene. *Hum Mol Genet.* 1999; 8(12): 2317-2323.

Chiurazzi P, Pomponi MG, Pietrobono R, Bakker CE, Oostra BA, Neri G. Reactivation of the FMR1 gene with histone deacetylase inhibitors in fragile X syndrome and synergistic effect of DNA demethylation. 9º congreso internacional del síndrome X-frágil. 1999 Aug; 23-25. Bischenberg, Strasbourgo, France.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162(1): 156-159.

De Boule K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van den Bos F, de Graaff E, Oostra BA, Willems PJ. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet.* 1993;3(1): 31-35.

De Diego, Y., Hmadcha, A., Carrasco, M., Lucas, M. Y Pintado, E. Fragile X síndrome and CGG repeats distribution among the mentally retarded population

Bibliografía

of Andalucía, southern Spain. 9º congreso internacional del síndrome X-frágil. 1999 Aug; 23-25. Bischenberg, Strasbourgo, France.

Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet.* 1993; 4(4): 335-340.

Drouin R, Angers M, Dallaire N, Rose TM, Khandjian W, Rousseau F. Structural and functional characterization of the human FMR1 promoter reveals similarities with the hnRNP-A2 promoter region. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(12): 2051-2060.

Drabek D, Raguz S, De Wit TP, Dingjan GM, Savelkoul HF, Grosveld F, Hendriks RW. Correction of the X-linked immunodeficiency phenotype by transgenic expression of human Bruton tyrosine kinase under the control of the class II major histocompatibility complex E α locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(2): 610-615.

Fitzpatrick DR, Shirley KM, McDonald LE, Bielefeldt-Ohmann H, Kay GF, Kelso A. Distinct methylation of the interferon gamma (IFN-gamma) and interleukin 3 (IL-3) genes in newly activated primary CD8⁺ T lymphocytes: regional IFN-gamma promoter demethylation and mRNA expression are heritable in CD44(high)CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 1998; 188: 103-117.

Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST, Oostra BA, Nelson DL, Caskey CT. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell.* 1991; 67(6): 1047-1058.

Bibliografía

Gacy AM, Goellner G, Juranic N, Macura S, McMurray CT. Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro. *Cell*. 1995; 81(4): 533-540.

Glickman JF, Pavlovich JG, Reich NO. Peptide mapping of the murine DNA methyltransferase reveals a major phosphorylation site and the start of translation. *J Biol Chem*. 1997; 272(28): 17851-17857.

Guoyao WU, Sydney M, Morris JR. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J*. 1998; 336: 1-17.

Gupta S, McArthur C, Grady C, Ruderman NB. Stimulation of vascular Na(+)-K(+)-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *Am J Physiol*. 1994; 266(5 Pt 2): H2146-H2151.

Hergersberg M, Matsuo K, Gassmann M, Schaffner W, Luscher B, Rulicke T, Aguzzi A. Tissue-specific expression of a FMR1/beta-galactosidase fusion gene in transgenic mice. *Hum Mol Genet*. 1995; 4(3): 359-366.

Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, Housman DE, Schalling M. Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet*. 1993; 3(1): 36-43.

Hmadcha A, De Diego Y, Pintado E. Assessment of FMR1 expression by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of KH domains. *J Lab Clin Med*. 1998; 131(2): 170-173.

Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Pahl HL, Traenckner EB, Mueller-Dieckmann C, Farahifar D, Rossi B, Auburger P, Baeuerle PA, Peyron JF. Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. *Cell*. 1996; 86(5): 787-798.

Kanner J, Harel S, Granit R. Nitric oxide, an inhibitor of lipid oxidation by lipoxygenase, cyclooxygenase and hemoglobin. *Lipids*. **1992**; 27(1): 46-49.

Keohane AM, Lavender JS, O'Neill LP, Turner BM. Histone acetylation and X inactivation. *Dev Genet*. **1998**; 22: 65-73

Khandjian EW, Corbin F, Woerly S, Rousseau F. The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nat Genet* .**1996**;12(1): 91-93.

Khandjian EW, Fortin A, Thibodeau A, Tremblay S, Cote F, Devys D, Mandel JL, Rousseau F. A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. *Hum Mol Genet* . **1995**;4(5): 783-789.

Kirillov A, Kistler B, Mostoslavsky R, Cedar H, Wirth T, Bergman Y. A role for nuclear NF-kappaB in B-cell-specific demethylation of the Igekappa locus. *Nat Genet*. **1996**; 13(4): 435-441.

Kladde MP, Xu M, Simpson RT. DNA methyltransferases as probes of chromatin structure in vivo. *Methods Enzymol*. **1999**; 304: 431-447.

Koh SD, Campbell JD, Carl A, Sanders KM. Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. *J Physiol (Lond)*. **1995**; 489 (Pt 3): 735-743.

Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator?. *Immunol Today*. **1998**; 19(12): 556-561.

Bibliografia

Krebs A, Wiggings D, Stubbs M, Sols A, Bedoya F. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem J.* **1983**; 214: 657-663.

Krippeit-Drews P, Kroncke KD, Welker S, Zempel G, Roenfeldt M, Ammon HP, Lang F, Drews G. The effects of nitric oxide on the membrane potential and ionic currents of mouse pancreatic B cells. *Endocrinology.* **1995**; 136(12): 5363-5369.

Kroncke KD, Fehsel K, Schmidt T, Zenke FT, Dasting I, Wesener JR, Bettermann H, Breunig KD, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem Biophys Res Commun.* **1994**; 200(2): 1105-1110.

Kunst CB, Zerylnick C, Karickhoff L, Eichler E, Bullard J, Chalifoux M, Holden JJ, Torroni A, Nelson DL, Warren ST. FMR1 in global populations. *Am J Hum Genet.* **1996**; 58(3): 513-522.

Kunst CB, Warren ST. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell.* **1994**; 77(6): 853-861.

Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* **1992**; 69: 915-926.

Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature.* **1993**; 366: 362-365.

Liew FY, Cox FE. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol Today.* **1991**; 12(3): A17-A21.

Bibliografia

Litt, MD, Hansen RS, Hornstra IK, Gartler SM, Yang TP. 5-Azadeoxycytidine-induced chromatin remodeling of the inactive X-linked HPRT gene promoter occurs prior to transcription factor binding and gene reactivation. *J Biol Chem.* **1997**; 272: 14921-14926.

MacLeod AR, Rouleau J, Szyf M. Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway. *J Biol Chem.* **1995**; 270(19): 11327-11337

Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipson S. Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell.* **1997**; 89: 619-628.

Marletta MA. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem Sci.* **1989**; 14(12): 488-492.

Matsuo K, Silke J, Georgiev O, Marti P, Giovannini N, Rungger D. An embryonic demethylation mechanism involving binding of transcription factors to replicating DNA. *EMBO J.* **1998**; 17: 1446-1453.

Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res.* **1996**; 24(12): 2236-2242.

Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, SB Baylin, Sidransky D. CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* **1995**; 1: 686-692

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* **1993**; 329: 2002-2012.

Bibliografia

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* **1991**; 43(2): 109-142.

Musco G, Kharrat A, Stier G, Fraternali F, Gibson TJ, Nilges M, Pastore A. The solution structure of the first KH domain of FMR1, the protein responsible for the fragile X syndrome. *Nat Struct Biol.* **1997**; 4(9): 712-716.

Nathan CF, Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* **1991**; 3(1): 65-70

Nathan C. Nitric oxide as secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **1992**; 6: 3051-3064.

Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1992**; 89(7): 3030-3034.

Nishikawa M, Sato EF, Utsumi K, Inoue M. Nishikawa M, Sato EF, Utsumi K, Inoue M. Oxygen-dependent regulation of energy metabolism in ascites tumor cells by nitric oxide. *Cancer Res.* **1996**; 56(19): 4535-4540.

Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas MF, Mandel JL. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science.* **1991**; 252(5010): 1097-1102.

Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet.* **1998**; 19(3): 219-220.

Bibliografia

Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem.* **1995**; 270(23): 14214-14219.

Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL. Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell.* **1991**; 66(4): 817-822.

Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J.* **1998**; 17: 4905-4908.

Rodriguez IR, Mazuruk K, Schoen TJ, Chader GJ. Structural analysis of the human hydroxyindole-O-methyltransferase gene. Presence of two distinct promoters. *J Biol Chem.* **1994**; 269: 31969-31977

Rouleau J, MacLeod AR, Szyf M. Regulation of the DNA methyltransferase by the Ras-AP-1 signaling pathway. *J Biol Chem.* **1995**; 270(4): 1595-1601.

Sato T, Kamata Y, Irifune M, Nishikawa T. Inhibition of purified (Na⁺,K⁺)-ATPase activity from porcine cerebral cortex by NO generating drugs. *Brain Res.* **1995**; 704(1): 117-120

Shaoping X, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene.* **1999**; 236(1): 87-95.

Siomi H, Choi M, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G. Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell.* **1994**; 77(1): 33-39.

Bibliografía

Siomi MC, Siomi H, Sauer WH, Srinivasan S, Nussbaum RL, Dreyfuss G. FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *EMBO J.* **1995**; 14(11): 2401-2408.

Sobrino F, Gualberto A, Pintado E. Regulation of fructose 2,6-bisphosphate levels in cold-acclimated brown adipose tissue of rat. *FEBS Lett.* **1988**; 229(1): 91-94

Sugiura Y, Matsumoto T. Nucleotide-selective cleavage of duplex DNA by nitric oxide. *Biochem Biophys Resear Comm.* **1995**; 211: 748-753.

Sutherland GR, Ashforth PL. X-linked mental retardation with macroorchidism and the fragile site at Xq 27 or 28. *Hum Genet.* **1979**; 48(1): 117-120.

Tabuchi A, Sano K, Oh E, Tsuchiya T, Tsuda M. Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1. *FEBS Lett.* **1994**; 351(1): 123-127.

Verheij C, de Graaff E, Bakker CE, Willemsen R, Willems PJ, Meijer N, Galjaard H, Reuser AJ, Oostra BA, Hoogeveen AT. Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Hum Mol Genet.* **1995**; 4(5): 895-901.

Verkerk AJ, de Graaff E, De Boule K, Eichler EE, Konecki DS, Reyniers E, Manca A, Poustka A, Willems PJ, Nelson DL. Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet.* **1993**; 2(8): 1348

Wilson GL, Patton NJ, LeDoux SP. Mitochondrial DNA in beta-cells is a sensitive target for damage by nitric oxide. *Diabetes.* **1997**; 46(8): 1291-1295.

Bibliografía

Willemsen R, Bontekoe C, Tamanini F, Galjaard H, Hoogeveen A, Oostra B. Association of FMRP with ribosomal precursor particles in the nucleolus. *Biochem Biophys Res Commun.* **1996**; 225(1): 27-33.

Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science.* **1991**; 254(5034): 1001-1003.

Xie QW, Nathan C. Macrophage-derived nitric oxide: generation and consequences. From: Cochrane C, Gimbrone M, ed. Cellular and molecular mechanisms of inflammation. *New York: Academic Press.* **1992**; 432-457.

Zhong N, Yang W, Dobkin C, Brown WT. Fragile X gene instability: anchoring AGGs and linked microsatellites. *Am J Hum Genet.* **1995**; 57(2): 351-361.

ABREVIATURAS

A	Adenina
5-azadC	5-aza-2'-deoxicitidina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMT	2-amino-5,6-dihidro-6-metil-4H-1,3-tiazina
AP-1	Proteína activadora 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
β-ME	β-mercaptoetanol
C	Citosina
cNOS	Óxido nítrico sintasa constitutiva neuronal
DEPC	Diethilo de Pirocarbonato
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Deoxinucleotidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EIT	S-etilisotiurea
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial

Abreviatura

FMR1	Gen del retraso mental ligado al sitio frágil 1
FMRP	Proteína del FMR1
fos	Factor de transcripción fos
G	Guanina
GAPDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GSH	Glutación reducido
H3	Histona 3
H4	Histona 4
HDAC	Desacetilasa
HK	Hexoquinasa
HPRT	Hipoxantina fosforribosiltransferasa
IFNγ	Interferón γ
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IL-1β	Interleuquina-1 β
I-κB	Proteína inhibidora de κ B
Jun	Factor de transcripción jun
Kda	Kilodalton
LDH	Lactato deshidrogenasa
L-NIL	N6-(1-iminoetil)-L-lisina)
LPS	Lipopolisacárido
MeCP2	Proteína de unión a citosina metilada 2
MeTasa	Metiltransferasa
M-MLV RT	Transcriptasa inversa del virus de leucemia murina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NF-κB	Factor nuclear κ B
NMA	N-metil arginina

Abreviatura

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDVF	Polivinilidino difluorido
PK	Piruvato quinasa
PMSF	Fluoruro de metilsulfonilfenilo
Poly [(dI-dC)]	poli deoxi-inosina-deoxicitosina
PSA	Persulfato amonico
Ras	Oncogen ras
RNasa	Ribonucleasa
RNAsin	Inhibidor de RNasa
RT	Transcriptasa inversa
S-adoHcis	S-adenosilhomocisteina
S-adoMet	S-adenosilmetionina
SDS	Dodecil sulfato sódico
SIN	3-morfolinosidnonimina
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
SNP	Nitroprusiato
T	Timina
Taq DNA poli	DNA polimerasa de <i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N, N' -tetrametil-etilendiamina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TSA	Tricostatina-A
UTR	Región no traducida

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Según el Tribunal Superior por las partes presentes
en el día de la fecha, para tener la Tesis Doctoral de

D. A. HANDEKA
título Exposición del fea PAR-1

por unanimidad Reprobada la Tesis
por unanimidad

Sevilla, 22 de Mayo 2000

El Vocal

Fra. Pini

El Presidente

El Vocal

Blas

El Secretario

2000

El Vocal

Alberto

El Doctorado

Adrián

Mat

Kare