



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DEL PATRON DE METILACION DE LOS  
GENES DE LAS ISOENZIMAS DE LA 5<sup>a</sup>-  
REDUCTASA ESTEROIDEA DE RATA.

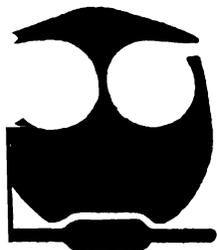


T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

P R E S E N T A

Q. ELSA MERIT REYES REYES



MEXICO, D. F.



1997



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

|                   |                                |
|-------------------|--------------------------------|
| Presidente:       | Dra. Estela Sánchez Jiménez    |
| Primer Vocal:     | Dr. Antonio Velázquez Arellano |
| Secretario:       | Dra. Angelina Quintero Ruiz    |
| Primer Suplente:  | M. en C. Marisol López López   |
| Segundo Suplente: | Dr. Fernando Montiel Aguirre   |

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Endocrinología Molecular. Departamento de Biología. Facultad de Química UNAM.

Tutor:

\_\_\_\_\_  
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

Sustentante:

  
\_\_\_\_\_  
Q. Elsa Merit Reyes Reyes

## DEDICATORIAS

A MI ESPOSO:

Marco Antonio Tavera García

*Por su amor y confianza.*

A MIS PADRES:

Rosa Ma. Reyes Benitez

y

José Carlos Reyes Cuevas

*Como un atributo a lo que  
han sembrado.*

A MIS HERMANOS:

Magdalena

Karla Socorro

Rafael

*Que siempre ocuparan un  
lugar exclusivo en mi corazón.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco Antonio Cerbón  
*por la dirección y asesoramiento  
del presente trabajo.*

A la Dra. Sara Meza-Höjer  
y al Dr. Germund Höjer  
*Gracias por su gran apoyo y  
comprensión.*

A mis amigas:  
Rocío Aguilar y  
Rosa Ma. Hernández.

# ÍNDICE

---

|                                                      |    |
|------------------------------------------------------|----|
| 1. RESUMEN.                                          | 1  |
| 2. INTRODUCCIÓN.                                     | 2  |
| 3. ANTECEDENTES.                                     |    |
| 3.1 Estructura nuclear de DNA eucariótico.           | 4  |
| -Características básica del DNA.                     | 4  |
| -Empaquetamiento del DNA.                            | 6  |
| 3.2 Metilación del DNA en citosinas.                 | 12 |
| -Inhibición de la transcripción por el DNA metilado. | 12 |
| -Mecanismo de metilación.                            | 13 |
| -Formación de los patrones de metilación.            | 16 |
| -Regulación del gen de la DNA metiltransferasa.      | 18 |
| -DNA metilado y el cáncer.                           | 19 |
| 3.3 Metilación del DNA en adeninas.                  | 20 |

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| 3.4 Isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea. | 21 |
| -Acción androgénica.                                   | 22 |
| -Características principales.                          | 24 |
| -Deficiencia de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea 2. | 25 |
| <br>                                                   |    |
| 4. OBJETIVOS.                                          | 27 |
| <br>                                                   |    |
| 5. HIPÓTESIS DE TRABAJO.                               | 28 |
| <br>                                                   |    |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS.                                 |    |
| <br>                                                   |    |
| 6.1 Transformación de bacterias competentes.           | 29 |
| 6.2 Amplificación de los plásmidos.                    | 30 |
| 6.3 Purificación de los cDNAs.                         | 31 |
| 6.4 Animales de experimentación.                       | 32 |
| 6.5 Extracción de DNA genómico.                        | 32 |
| 6.6 Análisis por transferencia tipo Southern.          |    |
| -Digestión del DNA genómico.                           | 33 |
| -Transferencia del DNA.                                | 34 |
| -Hibridación.                                          | 34 |
| 6.7 Extracción de RNA total.                           | 37 |
| 6.8 Análisis por transferencia tipo Northern.          | 38 |
| 6.9 Soluciones.                                        | 37 |
| 6.10 Endonucleasas utilizadas                          | 41 |

|     |                                                                                                            |    |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.  | RESULTADOS.                                                                                                |    |
| 7.1 | Características del DNA genómico.                                                                          | 42 |
| 7.2 | Patrón de metilación en citosina de los genes de las isoenzimas 5 $\alpha$ -reductasa 1 y 2 de rata.       | 43 |
| 7.3 | Patrón de metilación en adeninas de los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 y 2 de rata. | 46 |
| 7.4 | Expresión de los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 y 2 de rata.                        | 49 |
| 8.  | DISCUSIÓN.                                                                                                 | 52 |
| 9.  | CONCLUSIONES.                                                                                              | 56 |
| 10. | REFERENCIAS.                                                                                               | 57 |
| 11. | APÉNDICE.                                                                                                  | 67 |

# 1. RESUMEN

---

---

La metilación del DNA ha sido intensamente involucrada en la regulación de la expresión génica tejido específico. La 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea es una molécula clave para el desarrollo de los genitales externos masculinos en los mamíferos, ya que induce la bioconversión de testosterona a dihidrotestosterona que es el andrógeno masculino más potente. En el presente trabajo se determinó el patrón de metilación en citosinas y adeninas de los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea 1 y 2 de rata, utilizando el DNA genómico de hígado, epidídimo y testículo.

El DNA genómico fue estudiado por análisis RFLP utilizando enzimas de restricción sensibles a metilación y sus isoesquizómeros en adeninas (*Mbo I* y *Sau3A I*) y citosinas (*Hpa II* y *Msp I*). El patrón de metilación obtenido fue correlacionado con la expresión de ambos genes por transferencia tipo Northern.

Cuando el DNA genómico fue digerido con *Hpa II* o *Msp I* se encontró que el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea 2 estaba menos metilado en citosina en los tejidos del epidídimo y testículo, que en el hígado. En contraste, cuando el DNA genómico fue digerido con *Mbo I* o *Sau3A I*, se observó que el gen 2 estaba más metilado en adeninas en el epidídimo y el testículo que en el hígado. El patrón de metilación en citosinas y adeninas presente en el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea 1 es similar en todos los tejidos que se estudiaron.

Nuestros resultados sugieren que el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea 2 está más metilado en adeninas y menos metilado en citosinas en tejidos del aparato reproductor y que este patrón de metilación podría estar involucrado en la regulación de su expresión.

# 2. INTRODUCCIÓN

---

---

La metilación del DNA es un proceso muy bien establecido en células procarióticas y eucarióticas. Por medio de este mecanismo, la transcripción génica puede ser regulada y el DNA puede ser modificado para evitar su degradación (Christophe and Pinchon, 1994; Muiznieks and Doerfler, 1994). En vertebrados el DNA está metilado en la posición 5 de la citosina en la secuencia nucleotídica CpG. Casi el 60%-80% de estas secuencias que se encuentran en el genoma de los vertebrados están metiladas. Las CpG se encuentran distribuidas a todo lo largo del DNA de una manera específica, no al azar. El patrón de metilación de citosinas es gen y tejido específico (Szyf, 1991). La metilación de citosinas en las regiones reguladoras de los genes, particularmente en la región del promotor, ha sido asociada con inhibición de la expresión de los mismos (Yisraeli and Szyf, 1984; Cedar, 1994). Por ejemplo se ha demostrado que el gen que codifica para el receptor de estrógenos en líneas celulares humanas de cáncer de mama presenta metilación en citosinas y este proceso de metilación inhibe la actividad transcripcional del gen de este receptor (Ottaviano *et al.*, 1994).

La enzima de la  $5\alpha$ -reductasa esteroidea ( $5\alpha$ -reductasa) cataliza la reducción, dependiente de NADPH, de una variedad de esteroides que contienen el doble enlace  $\Delta^{4,5}$  3-ceto. Uno de los principales papeles de esta enzima es la de catalizar la transformación de testosterona a dihidrotestosterona, siendo este último el andrógeno más potente responsable de la diferenciación de los genitales externos masculinos y de la próstata (Wilson, 1975). Además de tener un papel importante en la diferenciación sexual masculina se ha propuesto que la inhibición selectiva de la enzima podría ser un mecanismo para el control y tratamiento de enfermedades que son activadas por la dihidrotestosterona tales como hiperplasia prostática benigna, calvicie masculina y acné (Metcalf *et al.* 1989). Han sido clonados dos genes de la  $5\alpha$ -reductasa esteroidea, estos

genes codifican diferentes isoenzimas llamadas 1 y 2, que presentan diferentes propiedades bioquímicas y farmacológicas (Andersson and Russell, 1990). Las comparaciones intraespecie e interespecie entre estas enzimas muestran moderada homología, sugiriendo diferente estructura, función y regulación. La 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea 2 (5 $\alpha$ -reductasa 2) es expresada principalmente en tejidos del aparato reproductor como: próstata, testículo, epidídimo etc., sin embargo la isoenzima 1 ó 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea 1 (5 $\alpha$ -reductasa 1) se expresa en forma más abundante en tejido no-reproductor (hígado, cerebro, intestino etc.) (Normington and Russell, 1992).

En este estudio se determinó el patrón de metilación de los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa de rata en tejidos del aparato reproductor y no-reproductor por análisis de RFLP usando enzimas de restricción que poseen diferente capacidad para digerir citosinas y adeninas metiladas.

# 3. ANTECEDENTES

---

---

## 3.1 Estructura Nuclear del DNA Eucariótico.

El DNA es una molécula esencial para la vida, almacena la información genética necesaria para la síntesis de un producto biológico funcional (proteínas) y las cantidades de cada uno de estos. La comprensión de su estructura es importante para entender el código genético y los procesos de duplicación y transcripción. Toda célula contiene docenas de enzimas y proteínas para llevar a cabo estos procesos, las cuales se unen al DNA por reconocer ciertas características estructurales y secuencias específicas del DNA.

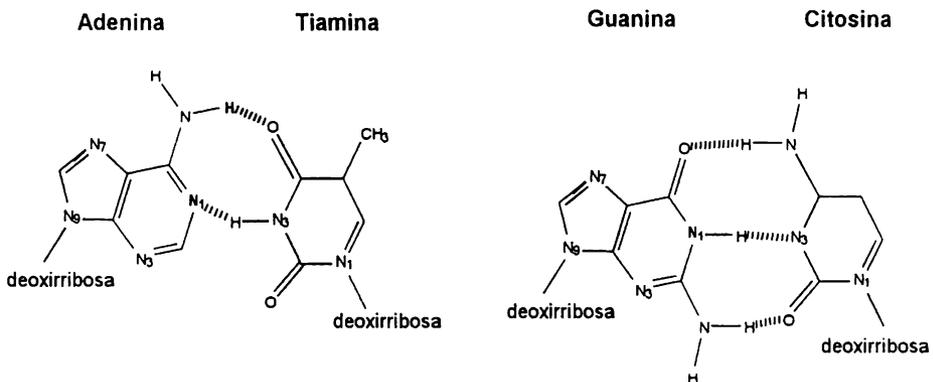
### *CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DEL DNA.*

El DNA está principalmente constituido por cuatro monómeros llamados nucleótidos. La estructura de un nucleótido está formada de: un grupo fosfato, una pentosa (desoxirribosa) y una base orgánica. Las bases heterocíclicas presentes son: 1) las purinas, adenina (6-aminopurina) y guanina (2-amino-6-oxipurina) y 2) las pirimidinas, citosina (2-oxi-4-aminopiridimina) y timina (2,4-dioxi-5-metilpirimidina).

La estructura primaria de los ácidos nucleicos es la secuencia lineal de los nucleótidos conectados por enlaces fosfodiéster 3'-5'. Cada grupo fosforilo que participa en un enlace fosfodiéster lleva una carga negativa a pH neutro ( $pK_a$  aproximadamente 2). En consecuencia, los ácidos nucleicos son polianiones en condiciones fisiológicas y generalmente se encuentran formando complejos con iones de carga contraria como el ion  $Mg^{2+}$  o con proteínas catiónicas (Friedberg, 1985).

El DNA está formado de dos cadenas antiparalelas de ácidos nucleicos. Cada base de la cadena establece puentes de hidrógeno con una base de la cadena opuesta, creando un par de bases. Sólo los tautómeros lactama y amino de cada base acomodan dichos

puentes de hidrógeno. La guanina se aparea con la citosina formando tres enlaces de hidrógeno y la adenina con la timina formando dos enlaces de hidrógeno; es decir las cadenas de ácidos nucleicos son complementarias (figura 1). Los pares de bases tienen una estructura plana y están apilados uno encima de otro creando un interior hidrofóbico, la torsión del esqueleto de azúcar-fosfato que confiere la formación de una hélice de doble cadena. La región exterior de la hélice tiene un carácter hidrofílico. Debido a la forma en que se apilan las bases, la hélice presenta dos surcos de diferente ancho, llamados surco mayor y surco menor (Saenger, 1984; Kornberg and Baker, 1991).



**Figura 1.** Enlaces de hidrógeno en los pares de bases.

El DNA de doble cadena puede presentar diferentes estructuras dependiendo de las condiciones físicas de su entorno. Las estructuras más investigadas han sido: DNA-A, DNA-B (modelo idealizado de Watson y Crick) y DNA-Z. En la actualidad se sabe que el DNA dentro de la célula no se encuentra en conformación "DNA-B" pura como se pensaba, sino que es una molécula dinámica cuya conformación cambia a medida que la molécula de DNA se pliega y forma complejos proteicos. La conformación "DNA-B" es la más estable y las características principales de esta conformación son: hélice dextrógira con un diámetro de 2.37 nm, la distancia entre cada par de bases a lo largo del eje central de la hélice es de 0.33 nm, la distancia para completar una vuelta es de 3.4 nm y presenta 10.4 pares de bases por vuelta. El DNA-A está presente en condiciones de deshidratación y está enrollado en forma más estrecha que el DNA-B. El DNA-Z difiere todavía más del

DNA-B, esta estructura no presenta surcos y la hélice está orientada hacia la izquierda (Dickerson, 1983).

## *EMPAQUETAMIENTO DEL DNA.*

Las moléculas de DNA tienen una enorme longitud comparada con las dimensiones de los núcleos de las células eucariotes que lo contienen. La capacidad del DNA de superenrollarse tiene un papel fundamental en el empaquetamiento del genoma dentro de los núcleos en interfase o en cromosomas mitóticos (el nivel más alto de compactación). En ambos casos una gran porción de las moléculas de DNA están cubiertas por diversas proteínas. La mezcla de proteínas y el DNA constituye la cromatina la cual permite una diversidad de configuraciones de las moléculas de DNA y tipos de control que son únicos de las células eucarióticas (van Holde and Zlatanova, 1995).

La estructura general de la cromatina es similar en todas las células eucarióticas, ésta se compone de: moléculas de DNA de doble cadena, una masa casi igual de proteínas básicas llamadas histonas, una cantidad menor de proteínas no histónicas (la mayor parte de las cuales tienen naturaleza ácida y son más grandes que las histonas), y de una pequeña cantidad de RNA (Udvardy, 1990).

El empaquetamiento de la cromatina dentro de los núcleos eucarióticos es un proceso biológico y bioquímico aun no completamente dilucidado. Las histonas tienen un papel esencial en el plegamiento del DNA. La familia de las histonas está integrada de cinco proteínas básicas, denominadas H1, H2A, H2B, H3 y H4. Las cinco histonas contienen numerosos residuos de lisina y arginina cuyas cargas positivas se fijan al esqueleto de azúcar-fosfato del DNA cargado negativamente. En forma frecuente los extremos del esqueleto peptídico de las histonas son modificados postraduccionalmente por adición de grupos fosfato, metilo o acetilo, produciendo muchas subespecies de histonas. La secuencia de aminoácidos de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, de una gran variedad de especies es muy similar, independientemente de la distancia filogenética existente entre las especies. Sin embargo la secuencia de aminoácidos de la H1 varía de un organismo a otro (Caserta and Di Mauro, 1996)

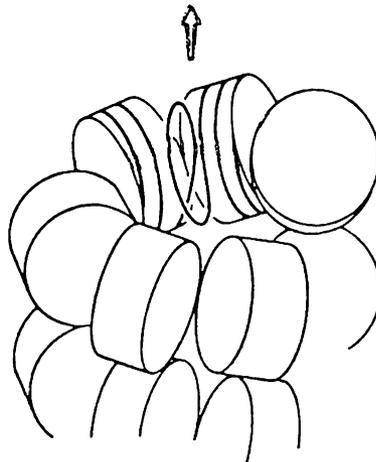
La unidad básica de organización más estudiada es el nucleosoma que es el primer nivel de compactación. Los nucleosomas pueden ser observados en una micrografía electrónica de la cromatina, la cual es desplegada previamente con soluciones de baja fuerza iónica, dando una apariencia de "cuentas ensartadas en un hilo", llamada fibra nucleosomal (Miller and Bakken, 1972; Woodcock, 1973; Olins and Olins, 1973; Olins and Olins, 1974). Cada nucleosoma está formado por un octámero proteico constituido por dos copias de cada una de las siguientes histonas H2A, H2B, H3 y H4. El contenido de DNA entre cada nucleosoma varía entre 160 a 200 pares de bases, donde aproximadamente 140 pb de DNA se enrolla alrededor del octámero histónico y el resto sirve como elemento de enlace entre cada nucleosoma (DNA de enlace). El número de vueltas del DNA alrededor del octámero es casi de dos (van Holde, 1988; Tsanev et al, 1992; Giannasca, 1993). Varios grupos de investigación reportaron que la fibra nucleosomal se compactaba en un filamento de 10 nm, pero las condiciones experimentales para la reproducción de la fibra eran contradictorias, creyéndose que esta estructura es un artificio experimental (Widom, 1989).

El ensamblaje del octámero de histonas está todavía en estudio. Sin embargo en estudios con huevos de rana y análisis de los complejos proteicos por anticuerpos monoclonales, se detectó la presencia de dos proteínas ácidas de preensamble, la nucleoplasmina (29-kDa) y la N1, que forman los siguientes complejos: (1) la nucleoplasmina se une a las histonas H2A y H2B y (2) la proteína N1 se une a las histonas H3 y H4. Cuando los complejos 1 y 2 purificados parcialmente son mezclados en presencia de DNA, se forma un nucleosoma liberándose las proteínas de preensamble. Estas proteínas de preensamble se han observado en otro tipo de células, por lo que se ha propuesto que estas proteínas podrían jugar un papel similar al observado con las proteínas nucleoplasmina y N1 (Chang *et al.* 1997; Fukuma *et al.* 1994).

La compactación inducida por los nucleosomas es alrededor de 5 a 10 veces la longitud de la cadena de la cromatina. Una mayor reducción de la fibra nucleosomal es ejercida por la organización de ésta como un filamento irregular de 30 nm. Se cree que la cromatina transcripcionalmente inactiva en núcleos interfásicos tiene una conformación de

filamento de 30 nm (Zlatnova, 1990; Garrard, 1991). Hay varios modelos propuestos para explicar esta estructura, pero los tres modelos básicos son:

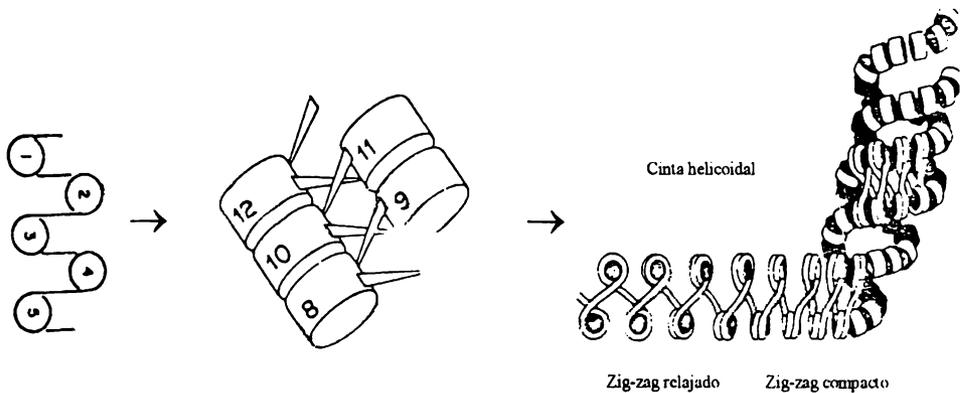
A) **Modelo solenoidal**, se propone que la fibra de 30 nm sea formada por nucleosomas acomodados consecutivamente de tal manera que entre cada nucleosoma, el DNA de enlace tenga un doblamiento, enrollamiento o curvatura concordante. La fibra solenoidal se asemeja a un cilindro donde cada vuelta contiene de 6 a 8 nucleosomas (figura 2). Este modelo predice que el DNA de enlace es flexible y capaz de superenrollarse a la izquierda o la derecha (Thoma et al, 1979; Butler, 1984). Por ejemplo, en condiciones iónicas una histona H1 se asocia al DNA de enlace y a una partícula central del nucleosoma, en cada vuelta de la espiral hay seis histonas H1. Sin embargo aun en ausencia de la histona H1 el DNA de enlace entre cada nucleosoma es flexible (Yao et al, 1990; Yao et al, 1991).



**Figura 2.** Modelo solenoidal. Versión donde el DNA de enlace hace una vuelta a la derecha (EMBO J. 3:2599; 1984).

B) **Modelo de cinta helicoidal doble**: hay varias versiones de este modelo pero la más relevante es la propuesta por Worcel (figura 3), en donde los nucleosomas están acomodados consecutivamente formando un zigzag atrasado y antepuesto. Posteriormente el zigzag se compacta dando una especie de cinta, la cual se enrolla helicoidalmente

formando un cilindro que determina la fibra de 30 nm ( Worcel et al, 1981; Woodcock et al, 1984).

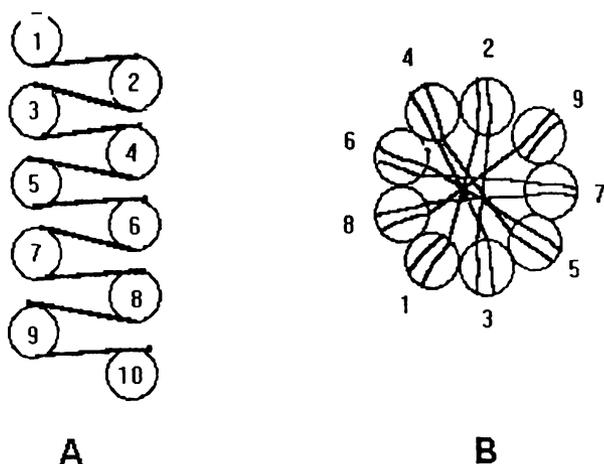


**Figura 3.** Modelo de cinta helicoidal doble (J. Cell Biology. 99:42; 1984)..

C) Modelo de unión entrecruzada de la doble helicoidal. Este modelo fue propuesto por Langmore (Williams et al, 1986), en donde se sugiere que la fibra nucleosomal forma una cinta de la misma manera a la del modelo anterior, pero en lugar de que la cinta nucleosomal se enrolle sobre la superficie del cilindro, ésta da un giro alrededor de su eje central formando una hélice con orientación a la izquierda. Para construir finalmente la fibra de 30 nm los nucleosomas adyacentes se acomodan en lados opuestos del espacio central de la fibra creando un entrecruzamiento de los DNAs de enlace en el espacio central. Los nucleosomas alternos son adyacentes, los nucleosomas impares forman una rampa helicoidal hacia abajo en un lado y los nucleosomas pares forman una rampa en dirección opuesta. Este modelo predice que el diámetro de la fibra es proporcional a la longitud del DNA de enlace (figura 4).

Se cree que la histona H1 juega un papel importante en la formación de la fibra de 30 nm, pero el único modelo que la ha introducido específicamente es el modelo solenoidal. También se cree que la cromatina transcripcionalmente inactiva toma una estructura de filamento de 30 nm (Thomas. 1988). Por lo tanto a la histona H1 se le ha atribuido un papel de represor génico, aunque en la actualidad este papel está en debate.

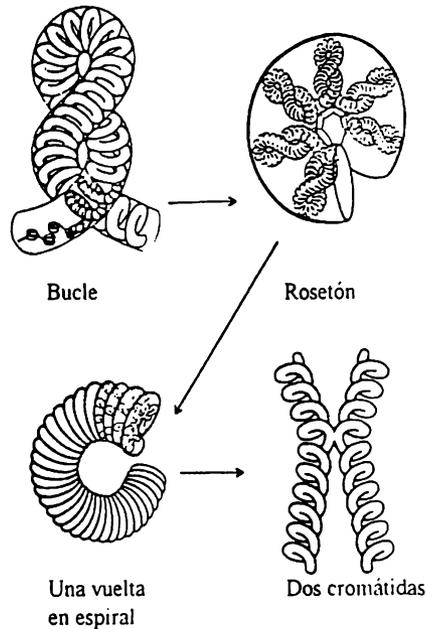
Se sabe que la histona H1 es abundante en la heterocromatina y tiene una alta preferencia por el DNA que contiene 5-metil-citosinas en la secuencia CpG. Se sugiere que la cooperatividad entre histona H1 y DNA metilado juega un papel importante en la estabilización de la cromatina altamente organizada, así como en la regulación génica tejido específico. La unión de la histona H1 al DNA metilado probablemente reprime la transcripción al provocar un cambio en la conformación nucleoproteína, evitando que los factores de transcripción reconozcan o se unan al promotor (McArthur and Thomas, 1996).



**Figura 4.** Modelo de unión entrecruzada de la doble helicoidal de la fibra de 30 nm. A) Nucleosomas acomodados en zigzag. B) Vista de arriba de la estructura final.

El empaquetamiento de los nucleosomas a la estructura de fibra de 30 nm logra una reducción de cuatro veces la longitud de la fibra cromosómica. Hay un modelo que propone que las fibras de 30 nm se fijan a un andamiaje proteico no histónico para formar estructuras más organizadas. Estas estructuras son: bucles (50 Kpb), rosetones (6 bucles), vueltas en espiral (30 rosetones) y finalmente dos cromátidas (10 vueltas en espiral cada una) (figura 5). Este empaquetamiento estructura cromosomas de 5 a 10

micrómetros de longitud y un micrómetro de diámetro. (Igo-Kemenes and Zachau, 1978; Filipski et al, 1990; Kellum and Schedl, 1991; Udvardy and Schedl, 1991).



**Figura 5.** Modelo para los diferentes niveles de organización de la fibra de 30 nm (EMBO J. 9:1319, 1990).

Aún no se ha podido llegar a una conclusión sobre las estructuras definitivas de la cromatina con base en las evidencias obtenidas hasta el momento. Por un lado la mayoría de las evidencias experimentales se basan en estudios *in vitro* de fragmentos aislados de cromatina y por otro lado las células que se han utilizado son un mal modelo (eritrocitos de gallina, espermatozoides de invertebrados etc.), ya que son relativamente inactivas y el plegamiento de la cromatina no se asemeja a una célula eucariótica general (van Holde and Zlatanova, 1995)

### 3.2 Metilación del DNA en Citosinas.

La 5-metilcitosina es un componente importante del DNA y está presente en cada uno de los cinco diferentes reinos: Monera, Protista, Plantae, Fungi y Animal, los cuales han sido admitidos por el sistema internacional moderno (Margulis and Schawartz, 1988).

En vertebrados las citosinas de una fracción de las secuencias CpG esta metilada (60-80%). Aproximadamente más del 50% de estas citosinas metiladas estan localizadas en familias de secuencias repetitivas. La otra porción de DNA metilado se localiza en otros sitios. Sin embargo, la distribución de las secuencias CpG metiladas es específica y no al azar. formando un patrón de metilación que es gen y tejido específico (Yisraeli and Szyf . 1984).

El mecanismo normal de metilación está relacionado con un número variado de procesos tales como: regulación génica (Meehan et al. 1992), desarrollo (Cedar and Razin, 1990), inactivación del cromosoma X (Singer-Sam and Riggs, 1993) y marcaje del genoma también llamado impronta génica (Barlow, 1993). Se cree que el proceso anormal de metilación esta involucrado con el desarrollo de la oncogénesis (Jones. 1996) y que causa mutaciones puntuales en dinucleótidos CpG, las cuales se han relacionado con algunas enfermedades y síndromes en el humano (Bestor and Coxon, 1993).

#### *INHIBICIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN.*

Se ha descrito la metilación del DNA en muchos genes que en condiciones normales no se expresan en algunos tejidos de vertebrados (Bird, 1992; Razin and Cedar, 1991). Se han propuesto tres modelos para explicar los mecanismos fundamentales de la correlación existente entre metilación e inactividad. (1) Los grupos metilo en el promotor pueden directamente interferir con la unión de algunos factores de transcripción. tal como la proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc (Iguchi-Arigo and Schaffner, 1993) y el factor de transcripción AP-2 (Comb and Goodman, 1990). (2) La metilación participa en la formación de una estructura de cromatina inactiva que no permite la entrada a los factores de transcripción (Graessmann and Graessman, 1993). Varios

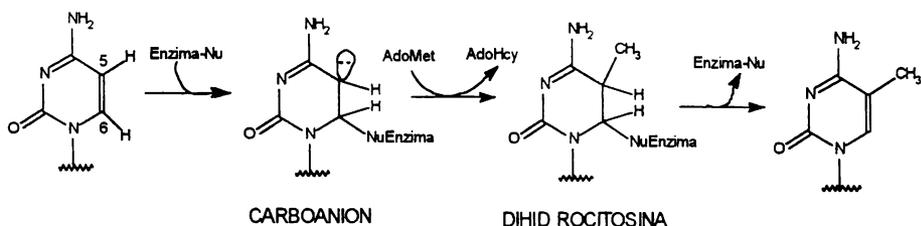
estudios han mostrado que el DNA metilado en la cromatina es inaccesible a ciertas nucleasas, tales como la DNAasa I y la Msp I (Keshet et al, 1986; Antequera et al, 1989) y se cree que los factores de transcripción son afectados por esta inaccesibilidad. (3) El proceso de inactivación génica por metilación requiere la participación de proteínas que se unen preferencialmente al DNA metilado (Ehrlich and Ehrlich, 1993). Varias proteínas de este tipo han sido descritas y clasificadas como: proteínas de unión a los dinucleótidos CpG metilados (MeCPs) y proteínas de unión al DNA metilado (MDBPs). Por ejemplo, la proteína MeCP-2 se ha asociado con heterocromatina centromérica y la MDBP-2 a una porción idéntica a la secuencia de la histona H1. Estas investigaciones sugieren que ambas proteínas tienen una función en la cromatina inactiva (Meehan et al, 1989; Zhang et al, 1990; Jost et al, 1991; Lewis et al, 1992; Jost and Hofsteenge, 1992).

### *MECANISMO DE LA METILACIÓN*

En vertebrados, la metilación del DNA es llevada a cabo por la enzima DNA 5-metilcitosina-transferasa (DNA MTasa o DNA metiltransferasa). A diferencia de los procariotes donde se han encontrado varios tipos de DNA MTasa, en mamíferos sólo una enzima ha sido aislada y caracterizada (Bestor et al, 1988). En todas las DNA MTasas la porción de la región carboxilo terminal correspondiente al dominio catalítico es similar. La DNA MTasa de mamífero tiene una gran región amino terminal adicional. Se cree que esta región amino terminal es un dominio regulatorio. El dominio catalítico de las DNA metiltransferasas es una región muy conservada, proponiéndose un mecanismo general de acción de las DNA MTasas tanto en procariotes como en eucariotes (Smith et al. 1992; Taylor et al. 1993; Ford et al, 1993).

Las características generales del mecanismo de acción de estas enzimas han sido dilucidadas principalmente llevando a cabo experimentos con ayuda de la 5-azacitósina; que es un potente inhibidor de la metilación del DNA en procariotes y en eucariotes (Friedman, 1981). El mecanismo de acción general de las DNA MTasas está basado en el ataque nucleofílico al carbón 6 de la citosina blanco por un residuo de cisteína de la enzima para producir un carboanión transitorio, la 5.6-dihidrocitosina, la cual provoca un

ataque al grupo metilo de la molécula S-adenosilmetionina (AdoMet) entrante. Subsecuentemente, se produce la extracción del protón del C-5 y la eliminación del enlace covalente entre la enzima y el C-6, liberando la 5-metilcitosina y regenerando la actividad de la DNA metiltransferasa (figura 6).



**Figura 6.** Mecanismo de metilación de la citosina.

El carboanión es formado antes de la unión a la AdoMet. El ataque al carbono 6 genera un enlace covalente entre el C-6 de la citosina y el sulfhídrido de la cisteína presente en un dipéptido Pro-Cys de la enzima, este dipéptido es una secuencia conservada en 24 DNA 5-metilcitosina-transferasas (Osterman et al. 1988; Lauster et al. 1989; Chen et al. 1991).

La unión de la AdoMet al sitio de reconocimiento de la DNA MTasa parece ocurrir en ausencia de DNA, probablemente la presencia de éste aumenta la afinidad de la AdoMet (Friedman and Ansaki, 1992). La AdoMet se une después de la formación del complejo covalente DNA-enzima. Subsecuentemente, el carboanión del C-5 ataca al grupo metilo de la AdoMet para formar el intermediario 5,6-dihidrocitosina, no se ha observado la formación de complejos estables en ausencia de AdoMet, indicando con esto que la transferencia del grupo metilo es requerido para la estabilidad del complejo DNA-enzima. La estabilidad del complejo radica en que la enzima no puede catalizar la eliminación del grupo metilo del C-5 en el intermediario dihidrocitosina debido a la estabilidad del enlace C-C. Posteriormente, el hidrógeno del C-5 es extraído como una β-eliminación por el nucleófilo (Nu:) localizado en el C-6. La β-eliminación regenera la actividad enzimática y produce S-adenosilhomocisteína (AdoHcy) junto con la 5-metilcitosina del sitio blanco del DNA (figura 6)(Smith: 1994).

El ataque nucleofílico al C-6 requiere la rehibridación  $sp^2 \rightarrow sp^3$  del C-6, la cual induce simultáneamente la rehibridación  $sp^2 \rightarrow sp^3$  del C-5. La estequiometría y la energía de este paso está probablemente dirigida por la conformación estructural del sustrato del DNA. En la conformación DNA-B, requiere que el nucleótido (N) 5' a la citosina en la secuencia 5' N-C-G 3' sea desplazado hacia adelante del surco mayor a una posición relativa de la citosina, mientras la 3' guanina está oculta detrás de la citosina. Esto significa que el C-6 de la citosina es más fácilmente accesible del lado del anillo adyacente a la guanina 3' (lado 3'), que del lado del anillo adyacente al nucleótido 5' a la citosina (lado 5'). De hecho, la incapacidad de las DNA metiltransferasas de metilar al DNA con conformación DNA-Z, puede ser debida a la inaccesibilidad del C-6 en cada uno de sus lados cuando el DNA se encuentra en dicha conformación (Pfeifer et al, 1983; Vardimon and Rich, 1984; Bestor, 1987)

Aunque hay un mecanismo de acción común entre las diversas metiltransferasas, la especificidad por el sustrato varía dependiendo de las secuencias nucleotídicas adyacentes a las citosinas blanco. Las metiltransferasas pueden tener secuencias de reconocimiento que dan especificidades muy estrictas. En el caso de la enzima de mamíferos el reconocimiento es menos riguroso. La DNA metiltransferasa humana exhibe una secuencia de especificidad de un motivo de sólo dos nucleótidos y esta secuencia está conformada por el par de dinucleótidos C-G (Renbaum and Razin, 1992; Baker et al, 1993).

En base a su velocidad de reacción se han identificado tres formas de acción de las metiltransferasas: (1) La metilación *de novo*, que se define como la metilación lenta de residuos de citosina en la conformación DNA-B que contiene las secuencias C-G no metiladas en ninguna de las dos cadenas del DNA (2) La metilación de las secuencias C-G donde en una de las cadenas una citosina está previamente metilada lo que permite una metilación rápida de la citosina de la cadena opuesta. En este mecanismo se sabe que la citosina metilada en la cadena opuesta estimula el proceso de metilación con un procedimiento aún desconocido (metilación dirigida por un grupo metilo). (3) La metilación provocada a cambios estructurales del DNA, definida como la metilación rápida del DNA, relacionada a una estructura inusual del DNA, por ejemplo los heteroduplex afectan la estructura de los dinucleótidos C-G, aumentando la velocidad de metilación de

éstos e incluso estableciendo el sitio de metilación (Smith et al, 1987; Baker et al, 1988; Smith et al, 1989; Smith et al, 1991; Baker et al, 1993; Chen et al, 1993).

## *FORMACIÓN DE LOS PATRONES DE METILACIÓN.*

Los patrones de metilación son tejido específico y clonalmente estables, los cambios de éstos no son producto de la casualidad, sino un reflejo de procesos biológicos bien definidos. Los cambios en el patrón de metilación ocurren durante el desarrollo y diferenciación celular; los sitios que son metilados en genes específicos están hipometilados cuando son activos durante el desarrollo (Yisraeli and Szyf, 1984; Brandeis *et al*, 1993).

Los patrones de metilación tienen un papel crítico en la diferenciación celular como se ha demostrado experimentalmente por: (1) Las mutaciones dirigidas en el gen de la DNA metiltransferasa por recombinación homóloga en células germinales produce la muerte embrionaria y (2) La inhibición del proceso de metilación del DNA por la incorporación de un oligonucleótido antisentido en la DNA metiltransferasa, produce el cambio de identidad de los fibroblastos a células diferenciadas de tipo miogénicas (Li et al, 1992, Szyf et al, 1992).

Se han establecido dos aspectos biológicos esenciales para la formación de un patrón de metilación. Primero, el patrón de metilación está determinado por secuencias específicas, ya que se ha demostrado que secuencias semejantes adoptan un patrón de metilación semejante en diferentes *loci*. Segundo, la formación del patrón tiene que ser dirigida por uno o más factores capaces de regular la metilación o mantener DNA ya metilado. Considerando estos dos aspectos biológicos, se propone que el patrón de metilación durante el desarrollo es establecido por eventos secuenciales de metilación *de novo*, metilación conservada y desmetilación de citosinas. Hasta el momento todavía no han sido completamente dilucidados los mecanismos que conducen a estos eventos. Existen varios modelos que explican como los patrones de metilación son establecidos sin olvidar su naturaleza biológica. Estos modelos son:

1) El modelo de Razin y Riggs (1980), este modelo explica que los patrones de metilación son formados y mantenidos en los seres vivos por herencia clonal, es decir son establecidos durante la replicación del DNA. Basándose en que la enzima DNA metiltransferasa es muy eficiente en la metilación de los motivos hemimetilados CpG (metilación dirigida por un grupo metilo) pero es relativamente deficiente en la metilación de substratos no metilados (metilación *de novo*). Este modelo no explica como sitios específicos son metilados *de novo* o desmetilados durante el proceso de diferenciación y transformación celular.

2) El patrón es establecido por la expresión pasajera de factores involucrados en el blanco de sitios específicos para la metilación. Estos factores pueden influir en la actividad de la metilación del DNA directa o indirectamente, ya sea por la inducción de cambios en la estructura de la cromatina que pueden alterar la accesibilidad de la maquinaria de metilación a un sitio o por cambiar la actividad de la DNA metiltransferasa. Ninguno de estos factores putativos han sido identificados y es aun incierto si tales factores son responsables de la metilación *de novo*, de la metilación conservada y la desmetilación (Turker et al. 1990; Hasse and Schulz, 1994).

3) El patrón de metilación es determinado por una interacción entre concentración de DNA metiltransferasa activa y sitios señal específicos (Szyf, 1991).

4) Una hipótesis alternativa de la formación del patrón de metilación está basada en que la desmetilación es realizada por una maquinaria enzimática independiente. La pérdida de la metilación de sitios específicos es una faceta bien establecida durante el proceso de diferenciación en vertebrados. La desmetilación es un proceso activo en células mamíferas, similar a la metilación *de novo*. Se cree que la desmetilación es dirigida por señales específicas en la secuencia de DNA. Posiblemente el proceso de desmetilación puede llevarse a cabo por una enzima o un grupo de enzimas que tiene la tarea de remover el grupo metilo de la citosina metilada o por excisión de las bases de citosinas o mononucleótidos metilados, remplazándolas con citosinas y nucleótidos no metilados. Sin embargo, también es posible que las células mamíferas tengan una enzima de DNA desmetilasa general similar a la de DNA metilasa. Si esta actividad desmetilasa existiera la desmetilación del DNA sería controlada: a) a un nivel celular por la regulación

de la actividad de la desmetilasa y b) a un nivel local por la regulación de la accesibilidad de los sitios específicos de la maquinaria de la desmetilasa activada. Por lo tanto el patrón final de metilación podría ser un estado de equilibrio entre la actividad de la DNA metilasa y la actividad de la DNA desmetilasa. Estas dos reacciones tendrían el sustrato específico invertido. El patrón final de metilación estaría reflejado en el balance entre la disponibilidad de ambas actividades enzimáticas y a los cambios locales en la estructura de la cromatina. Las aplicaciones farmacológicas de este modelo es que se podrían producir cambios específicos en el patrón de metilación de una célula por la modulación a nivel general de la metilasa y la actividad enzimática desmetilasa (Szyf, 1994)

### *REGULACIÓN DEL GEN DE LA DNA METILTRANSFERASA.*

Se ha demostrado que la regulación de la expresión del gen de la DNA metiltransferasa está involucrada en el mantenimiento y la alteración del patrón de metilación. La expresión del gen de la DNA metiltransferasa debe estar controlada por dos clases de señales: (1) por elementos que establecen los niveles de actividad dentro de los límites adecuados que conservan las condiciones normales de metilación y (2) por señales reguladas a la alza que pueden responder a un requerimiento programado de la metilasa. Esto está apoyado en la demostración de que la expresión de la DNA metiltransferasa es controlada por el estado proliferativo de la célula a nivel post-transcripcional. La región que precede al extremo 5' del gen de la DNA metiltransferasa contiene tres secuencias de reconocimiento para la proteína activadora 1 (AP-1) (en 1744-1650). AP-1 es un complejo transactivador compuesto de un heterodímero de las proteínas de unión al DNA, *fos* y *jun* ó un homodímero de *jun* el cual es activado por el oncogen *ras*.

El modelo propuesto para explicar la regulación de la expresión del gen de la DNA MTasa en células Y1, está fuertemente relacionado con el mecanismo de señalización de *ras*. La amplificación del proto-oncogen c-Ki *ras*, produce una sobre expresión de *ras*, provocando la inducción de una cascada de cinasas, teniendo como consecuencia la activación y la fosforilación de *jun*. La activación de *jun*, activa el promotor de la DNA MTasa induciendo su actividad e incrementando su capacidad de metilar al DNA de la célula. Este cambio en la capacidad de metilar provoca una aberración en el patrón de

metilación, el cual está involucrado en el establecimiento y conservación de un estado transformante de la célula por un mecanismo aún desconocido (MacLeod, 1995).

## *DNA METILADO Y CÁNCER*

Las alteraciones en el patrón de metilación de DNA son muy comunes en células cancerígenas. La metilación en citosinas es responsable de la inducción de un alto porcentaje de enfermedades causadas por mutaciones puntuales en genes supresores de tumores en células somáticas y germinales. Estas enfermedades pueden ser debidas a una desaminación espontánea de la 5-metilcitosina o a un proceso más complejo durante la reacción enzimática de metilación del DNA (Jones, 1996).

En células normales los errores al azar debidos a la metilación *de novo* en secuencias CpG seguramente contribuyen a una inactivación progresiva de genes inhibidores del crecimiento, produciéndose una selección clonal de células con un patrón de metilación altamente anormal. El modelo de inactivación génica durante la progresión del cáncer tiene importantes implicaciones clínicas, porque es posible reactivar estos genes apagados utilizando inhibidores del proceso de metilación del DNA y restaurar el control del crecimiento de la célula. Se ha comprobado que cerca del 25% de las mutaciones puntuales en el gen p53 en todos los cánceres estudiados ocurre en sitios CpG y casi el 50% de los sitios están metilados en el cáncer de colon (Greenblatt et al, 1994).

Recientes experimentos en ratones con deficiencia de la DNA metiltransferasa, causada por una manipulación génica o farmacológica, provoca una notable disminución en la formación de pólipos en el colon, disminuyendo la predisposición del cáncer causado por diversas mutaciones (Laird et al, 1995; Laird and Jaenisch, 1994). Estos resultados proveen una evidencia directa de que la metilación y la carcinogénesis están relacionadas. Otros estudios que atribuyen fuertemente un papel importante de la metilación anormal en la carcinogénesis son una serie de observaciones en donde las secuencias llamadas islas CpG de los genes reguladores del crecimiento y particularmente genes supresores de tumores son frecuentemente metilados *de novo* en tumores y en líneas celulares (Merlo et al. 1995; Herman et al. 1995; González-Zulueta et al. 1995; Yoshiura et al, 1995).

Por otra parte en células oncogénicamente transformadas también ha sido observado la hipometilación. Esto parece contradecir la hipótesis de que la hipermetilación induce carcinogénesis. Se sugiere que la desmetilación también podría ser un proceso involucrado en la tumorigénesis pero hasta el momento son escasos los trabajos que indican que la azacitidina (un inhibidor de la DNA metiltransferasa) induce la carcinogénesis *in vivo* y/o promueve la acción de los oncogenes transformados (Feinberg and Vogelstein, 1985; Jones and Buckley, 1990)

Una explicación preliminar de la hipometilación en células cancerígenas, está basada en la posible existencia de una actividad desmetilasa que se sobreexpresa en ciertas células cancerígenas y que la actividad desmetilasa exhiba diferente selectividad por el sustrato específico que la DNA metiltransferasa; por lo tanto ésta afectará diferentes poblaciones de sitios causando la hipometilación (Szyf, 1994).

Podemos concluir que los cambios anormales en el patrón de metilación del DNA contribuyen a la oncogénesis al afectar los niveles expresión de proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes que controlan el crecimiento celular. Posiblemente la hipometilación del DNA permitiría el incremento de la expresión de oncogenes y la hipermetilación el silenciamiento de genes supresores de tumores y de genes que participan en el control del crecimiento.

### 3.3 Metilación del DNA en Adeninas.

La metilación de la adenina en el N-6 en la secuencia 5'-GATC-3' es un proceso muy frecuente en procariones. En *Escherichia coli* la metilación en adeninas (metilación dam) tiene un papel crítico en los procesos de reparación del DNA, en la regulación de la replicación de plásmidos y en la regulación de la expresión de algunos genes (Marinus, 1987. Pálmer and Marinus, 1994). Sin embargo, la información obtenida del proceso de metilación dam en eucariotes es muy escasa.

Se ha comprobado por evidencia indirecta, basada en análisis por RFLP, usando enzimas de restricción sensibles a metilación en adeninas, la existencia de 6-metiladenina

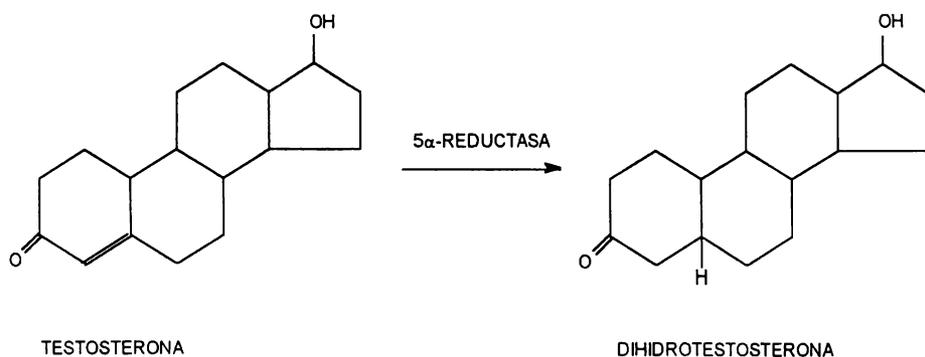
en DNAs genómicos de plantas y animales (Pintor-Toro, 1987; Kay et al, 1994). El papel biológico de esta modificación todavía no ha sido elucidada.

Se ha sugerido que posiblemente el proceso de metilación en adeninas tiene un papel en la expresión génica, esta hipótesis se basa principalmente en que: a) la metilación *in vitro* en adeninas en sitios dam en la región del promotor, incrementa la expresión génica de genes transitorios en plantas como por ejemplo los genes de deshidrogenasa alcohólica *Arabidopsis* (Adh1), ubiquitina de maíz (Ubil), actina de arroz (Act1) etc. y b) la dam metilación *in vitro* de un elemento respuesta a hormonas esteroides eucariótico produce un incremento en la afinidad de unión a los receptores de esteroides (Truss et al, 1992; Graham and Larkin, 1995).

El mecanismo de cómo la metilación dam puede aumentar la transcripción podría ser directa, incrementando la afinidad de unión de los factores de transcripción en puntos estratégicos del promotor o indirecta a través de cambios conformacionales en el DNA (Graham and Larkin, 1995).

### 3.4 Isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea

Un organismo es capaz de expresar isoenzimas (proteínas diferentes que catalizan la misma reacción enzimática) para incrementar su capacidad de respuesta a los cambios metabólicos. La expresión de las isoformas puede ser regulada por varios mecanismos a nivel molecular. Por esta razón, es de gran interés el estudio del papel de una isoenzima en el metabolismo de una célula o tejido. Un buen ejemplo es la 5 $\alpha$ -reductasa, esta enzima cataliza la reducción, en forma dependiente de NADPH, en la posición 5 de una variedad de esteroides que contienen el grupo 3-ceto y el doble enlace  $\Delta^{4,5}$  (Wilson, 1975). La 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea es una proteína microsomal clave para el desarrollo sexual de mamíferos de sexo masculino, esta enzima transforma la testosterona en 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, el andrógeno masculino más potente (Bruchovsky and Wilson, 1976).

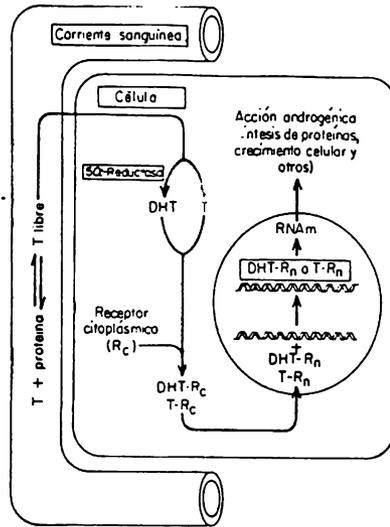


**Figura 7.** Reacción de la 5 $\alpha$ -reducción de la testosterona

## ACCIÓN DE LOS ANDRÓGENOS.

La 5 $\alpha$ -reductasa participa en el mecanismo de acción de los andrógenos el cual ha sido elucidado por estudios realizados sobre el metabolismo de los andrógenos y la fisiología de animales y embriones normales (Wilson, 1975). La testosterona es el andrógeno principal secretado por el testículo y el más abundante en el sistema circulatorio de los mamíferos masculinos. Esta hormona se introduce a las células blancas por un mecanismo de difusión pasiva. Dentro de la célula la testosterona puede ser reducida por la 5 $\alpha$ -reductasa a dihidrotestosterona o ser aromatizada a estradiol (figura 8). La dihidrotestosterona y testosterona tienen la misma afinidad al receptor de andrógenos localizado en el núcleo celular. Sin embargo la testosterona tiene una constante de disociación mayor que la dihidrotestosterona. El receptor de andrógenos es un miembro de la familia de factores de transcripción a hormonas esteroideas-tiroideas-retinoides, que regulan la expresión génica al unirse a sitios reguladores en o adyacentes a los genes que controlan (McPhaul et al, 1991). Aunque la dihidrotestosterona y la testosterona se unen al mismo receptor, las dos hormonas tienen diferentes papeles fisiológicos. El complejo receptor-testosterona induce la secreción de la hormona luteinizante por el sistema hipotálamo-hipofisario, para la estimulación de los ductos wolffianos durante la diferenciación sexual y probablemente para el control de la espermatogénesis (Griffin and Wilson, 1989). El complejo receptor-dihidrotestosterona es responsable de la virilización

es decir, del desarrollo de los genitales externos, uretra y próstata durante la embriogénesis y de muchos eventos de la maduración sexual masculina regulados por andrógenos (crecimiento de vello en diversas regiones del cuerpo, calvicie, maduración de los órganos genitales externos etc.,).



**Figura 8.** Esquema del mecanismo de acción de los andrógenos (Greenspan FS y Forsham PH (eds). *Endocrinología básica y clínica*. Ed. El manual moderno; 1988).

El mecanismo por el cual las dos diferentes hormonas se unen al mismo receptor provocando diferentes efectos no ha sido completamente dilucidado (Wilbert et al, 1983). Se sabe que el complejo receptor-dihidrotestosterona se une más fácilmente a sus sitios de reconocimientos al DNA, activa con mayor eficiencia a un sistema de genes reporteros y puede regular genes específicos que no responden al complejo receptor-testosterona (Kovacs et al, 1983; Deslypere et al. 1986; George et al, 1991). Consecuentemente, la formación de dihidrotestosterona juega dos papeles en la acción androgénica; uno es una amplificación general y la otra una función específica en la regulación de algunos genes (Wilson et al. 1980).

## *CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LAS ISOENZIMAS DE LA 5 $\alpha$ -REDUCTASA ESTEROIDEA.*

Hay dos isoenzimas descritas, tanto en la rata como en el humano, de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea conocidas como 1 y 2 de acuerdo al orden en que sus cDNAs fueron clonados (Andersson and Russell, 1990; Andersson et al, 1991; Jenkins et al, 1992; Normington and Russell, 1992). La comparación intraespecie e interespecie de la secuencia aminoacídica entre estas dos enzimas muestran una moderada similitud, sugiriendo diferencias estructurales, funcionales y de regulación (tabla 1).

La isoenzima tipo 2 tiene su actividad óptima a un pH ácido (5.5), es altamente expresada en tejidos reproductivos masculinos tales como próstata, vesículas seminales, testículo etc.; tiene un papel anabólico en el metabolismo de los esteroides y es inhibida por finasterina. (Stoner, 1990; Andersson et al, 1991; Normington and Russell, 1992). En próstata humana es expresada por células estromales y epiteliales basales (Richard et al, 1994).

La isoenzima tipo 1 tiene una actividad óptima a pH alcalino (7.0-8.0), es expresada en tejidos no andrógeno dependientes tales como hígado, cerebro, intestino etc., en tejido andrógeno dependiente su expresión es mínima o nula; por ejemplo, hasta el momento no se ha podido demostrar la expresión de esta enzima en próstata humana. Se ha comprobado que esta enzima tiene una actividad catabólica en el metabolismo de los esteroides que aún no ha sido comprendida y es insensible a la finasterina (Stoner, 1990; Andersson et al, 1991; Normington and Russell, 1992).

La dos enzimas tienen aproximadamente una similitud del 50% en su secuencia aminoacídica, ambas son hidrofóbicas y tienen estructura similar en sus genes: poseen cinco exones y cuatro intrones. El dominio de unión de las dos enzimas al andrógeno está codificado en la región amino terminal de la molécula (Andersson et al, 1991; Jenkins et al, 1992 Thigpen et al, 1992). En el humano, la enzima 1 es codificada por el gen SRD5A1 en el cromosoma 5 y la enzima 2 es codificada por el gen SRD5A2 en el cromosoma 2.

**TABLA No. 1**

|                   | <b>5<math>\alpha</math>-reductasa tipo 1.<br/>(humana y rata).</b> | <b>5<math>\alpha</math>-reductasa tipo 2.<br/>(humana y rata).</b> |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>Expresión</b>  | tejido periférico (hígado, piel, etc.).                            | tejido andrógeno regulado (epidídimo, testículo etc.).             |
| <b>pH óptimo.</b> | básico a neutro.                                                   | ácido.                                                             |
| <b>Actividad</b>  | catabólica                                                         | anabólica                                                          |

### *DEFICIENCIA DE LA 5 $\alpha$ -REDUCTASA 2.*

La deficiencia de la 5 $\alpha$ -reductasa 2 causa el síndrome llamado pseudohermafroditismo masculino (deficiencia de la 5 $\alpha$ -reductasa 2). El pseudohermafroditismo es un síndrome que afecta a individuos con cariotipo masculino (46,XY), debido a una alteración autosómica recesiva, la cual se caracteriza por presentar externamente un fenotipo femenino al nacer, testículos bilaterales internos y virilización normal de los ductos wolffianos con terminación de vagina. Este síndrome es el resultado de una producción deficiente de dihidrotestosterona (Walsh et al, 1974; Imperato-McGinley et al, 1974; Peterson et al, 1977; Thigpen et al, 1992).

Desde 1963 se estudiaron varias familias no relacionadas entre sí, que presentaban el síndrome de deficiencia de la 5 $\alpha$ -reductasa 2. En la actualidad se ha establecido que esta deficiencia es debida a mutaciones presentadas en el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 provocando que la enzima: 1) Presente una actividad baja, es decir una Km anormal para la testosterona, 2) Una Km normal, pero una baja afinidad por su coenzima NADPH, provocando inestabilidad para llevar a cabo la reacción y/o 3) que sea degradada más rápido de lo normal (Wilson et al, 1993).

Se ha encontrado que muchas de las mutaciones en el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 2, causantes de su deficiencia, son producidas en secuencias nucleotídicas CpG. Por ejemplo en una familia de la República Dominicana se encontró que varios de sus miembros presentaban el síndrome de pseudohermafroditismo, al estudiar la causa de este mal se

observó que era debido a una mutación en una secuencia CpG que producía la transformación de C→T en el exón 5 del gen, sugiriéndose que una 5-metilcitosina fue desmetilada. Este cambio provoca una sustitución en el aminoácido 246 de triptofano a arginina, localizado en la región carboxilo terminal de la enzima; altera su pH óptimo y la afinidad por su coenzima NADPH (Wilson et al, 1993).

La deficiencia de la 5 $\alpha$ -reductasa 2 no es interesante por su frecuencia ya que esta enfermedad es muy rara, es importante porque ayuda entender el mecanismo de acción de los andrógenos, el proceso de diferenciación sexual en donde la dihidrotestosterona juega un papel muy importante en la diferenciación fenotípica y los factores que influyen en la conducta sexual normal.

# 4. OBJETIVOS

---

---

**I.** *Determinar el grado de metilación en citosinas y adeninas en los genes que codifican para las enzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 y 2 de rata en tejidos del organo reproductor masculino (testículo y epididimo) y tejido no-reproductor (higado) normales.*

**II.** *Correlacionar el grado de metilación de los genes tipo 1 y 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa- con el grado de expresión de las isoenzimas en los tejidos mencionados.*

# ***5. HIPÓTESIS DE TRABAJO***

---

---

Debido a que la metilación del DNA en citosinas ha sido involucrada en la regulación de la expresión génica tejido específico y a que la expresión de las isoenzimas de las 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea es tejido específico. La 5 $\alpha$ -reductasa 2 se expresa en tejidos del órgano reproductor masculino (epidídimo y testículo) y la 5 $\alpha$ -reductasa 1 en tejido no-reproductor (hígado). En este estudio se espera que los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea de rata presenten una menor metilación de citosinas en los tejidos donde se expresa y una mayor metilación en los tejidos donde no se expresa.

Sin embargo debido a la poca información obtenida del proceso de metilación en adeninas se espera comprobar de una forma indirecta la existencia de 6-metiladenina en los genes de las isoenzimas de los genes de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea y además si la 6-metiladenina está correlacionada con la expresión de los mismos.

# ***6. MATERIAL Y MÉTODOS***

---

---

## ***6.1 Transformación de bacterias competentes Escherichia coli DH5 $\alpha$***

Los plásmidos usados fueron clonados y donados por el Dr. David W. Russell y son: 1) pB5 $\alpha$ -RED1 que contiene el cDNA que codifica la isoenzima de la esteroide 5 $\alpha$ -reductasa 1 de rata, insertada en la región *Eco RI-Not I* del vector pBluescript SK, correspondiente a los nucleótidos 1-2470 de la figura 4 del artículo Andersson et al. 1989 y 2) pT801 que contiene el cDNA que codifica la isoenzima esteroide 5 $\alpha$ -reductasa 2 de rata, insertada en la región *Eco RI* del vector pBluescript SK, correspondiente a los nucleótidos 1-1786 de la figura 1 del artículo de Normington y Russell 1992.

La transformación bacteriana se hizo de la siguiente forma:

Las bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes (Gibco BRL) guardadas a -70°C se descongelaron en un baño de hielo por 20 minutos.

Se tomaron 100  $\mu$ l de bacterias y se colocaron en un tubo eppendorf estéril frío. Se le agregó 10 ng del plásmido con el que se quería transfectar y se dejó reposar en el hielo por 30 minutos.

Se colocó el tubo en un baño de agua a 42° C por 60 segundos, posteriormente se transfirió a un baño de hielo por 3 minutos. Se agregó 800  $\mu$ l de medio de cultivo LB al tubo y se colocó en un horno a 37° C por 60 minutos.

Se tomaron dos muestras una 100  $\mu$ l y la otra de 50 $\mu$ l y se colocaron individualmente en una caja petri que contenían medio de cultivo LB sólido + 20  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las muestras con las bacterias se extendieron en la placa con un rodillo de vidrio y se dejaron incubando a 37° C por 12-16 horas.

## **6.2 Amplificación de los plásmidos.**

Se tomó una colonia de la placa y se sembró en 500 ml de medio líquido LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina. Se incubó a 37° C con agitación por 12-18 horas.

Se transfirió la solución a dos tubos Beckman de 500 ml y fueron colocados en un baño en hielo 10 minutos, posteriormente se centrifugaron a 4,000 rpm por 15 minutos a 4° C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100 ml de solución STE fría y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones.

Se decantó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 18 ml de Solución I y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó 2 ml de lisozima (10 mg/ml) recién preparada y 40 ml de Solución II recién preparada. Se mezcló invirtiendo lentamente los tubos y se incubó a temperatura ambiente por 5-10 minutos. Se agregó 20 ml de Solución III fría, se mezcló y se colocó en hielo por 10 minutos.

Se centrifugó el lisado bacteriano a 4,000 rpm por 15 minutos a 4° C. Se filtró el sobrenadante por 4 capas de gasa estéril y se colocó en otro tubo de centrifuga. Se le adicionó 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló bien y se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos.

Se centrifugó a 8,000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 70% a temperatura ambiente. Se decantó el etanol y se disolvió la pastilla en 3 ml de TE (pH 8).

Se adicionó RNAsa pancreática libre de DNAsa a una concentración final de 10 µg/ml y se incubó la mezcla por 1 hora a temperatura ambiente.

Se extrajo el DNA con un volumen igual de fenol-cloroformo equilibrado a pH 8 y se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos. Se tomó la fase acuosa y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío por 12 horas a -20° C.

Se centrifugó a 14, 000 rpm por 20 minutos a 4° C y se desechó el sobrenadante. La pastilla se disolvió en TE (pH 8). Se hicieron diluciones 1:100 y se leyó la absorbancia de estas muestras a las siguientes longitudes de onda : 260, 280 y 310 nm para determinar la concentración de DNA mediante la siguiente fórmula: 1 unidad de Absorbancia a 260

nm = 50 µg de DNA /ml. Se determinó la pureza del DNA por medio de la relación de absorbancias obtenida a 260 y 280 nm (260/280 nm).

Para determinar la integridad de los plásmidos obtenidos estos se observaron en un gel de agarosa al 1%, el cual se corrió en TBE 0.5X a 80 V por una hora.

### 6.3 Purificación de los cDNAs.

Los plásmidos fueron digeridos siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante Gibco BRL para cada una de las enzimas de restricción correspondiente: 1) pB5α-RED1 que contiene el cDNA de la 5α-reductasa 1 con las enzimas *Eco RI* y *Not I* y 2) pT801 que contiene el cDNA de la isoenzima 5α-reductasa 2 con la enzima *Eco RI*.

Los plásmidos digeridos se corrieron en un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X a 80 V por 1 hora.

Con un bisturí se cortó el segmento del gel que contenía el cDNA, se colocó dentro de una bolsa de diálisis y se le agregó 300 µl de TE (pH 8). Se colocó la bolsa de diálisis dentro de una cámara de electroforesis y se emigró la banda a 80 V en TBE 0.5X por 1 hora. Se invirtió el sentido de la corriente y se migró a 80 V por 45 segundos.

Se tomó la solución de TE que se encontraba dentro de la bolsa de diálisis y se colocó dentro de un tubo eppendorf. La bolsa de diálisis se enjuagó con 100 µl de TE y éstos se colocaron en el tubo eppendorf.

Se extrajo el cDNA con un volumen de fenol-cloroformo, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos y se tomó la fase acuosa. Se precipitó el cDNA con 2.5 volúmenes de etanol + 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M a -20° C por 12 horas.

Se centrifugó a 14,000 rpm a 4° C por 30 minutos, se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 80 %. Se centrifugó a 14,000 rpm a 4° C por 10 minutos y se desechó el sobrenadante.

Se disolvió la pastilla en 20 µl de TE.

Se verificó el cDNA por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X a 80 V por 1 hora, posteriormente el gel fué visualizado en luz UV:

## **6.4 Animales de experimentación.**

En este estudio se utilizaron ratas adultas macho de la cepa Wistar de 250-300 g, que fueron mantenidas en un ciclo luz:oscuridad 12:12, con agua y comida *ad libitum*.

Todos los animales fueron anestesiados con quetamina y sacrificados por decapitación. El testículo, hígado y epidídimo fueron rápidamente removidos a 4°C y inmediatamente procesados para la extracción de RNA y DNA.

## **6.5 Extracción de DNA genómico.**

El DNA fue extraído de los tejidos de testículo, epidídimo e hígado. Aproximadamente 300 mg de cada tejido fue congelado y pulverizado en un mortero. El polvo de cada tejido fue resuspendido en amortiguador de lisis e incubado por 2 horas.

Se agregó proteinasa K a una concentración final de 100µg/ml, se dejó incubando la suspensión a 37°C por 24 horas.

Las proteínas fueron removidas por tres extracciones de una mezcla fenol a pH 8.0/cloroformo/alcohol isoamílico (50:49:1) y una extracción final con cloroformo/alcohol isoamílico (49:1). Las extracciones se hicieron mezclando muy suavemente las dos fases para evitar en lo más posible el rompimiento del DNA genómico.

A la fase acuosa de la última extracción se le agregaron 0.05 volúmenes de acetato de amonio 3 M. El DNA fue precipitado por la adición de 2.5 volúmenes de etanol absoluto a 4°C. El DNA fue recuperado con una pipeta pasteur sellada de la punta, enjuagado con etanol a 75% y resuspendido en 300 µl de TE

Para conocer la concentración de DNA se hicieron diluciones 1:100 en agua y se leyó la absorbancia de cada muestra a las siguientes longitudes de onda : 260, 280 y 310 nm: La concentración DNA fue determinada mediante la siguiente fórmula: 1 unidad de Absorbancia a 260 nm=50 µg de DNA /ml. La pureza del DNA fue verificada por medio de la relación de absorbancias obtenida a 260 y 280 nm (260/280 nm) y la lectura de absorbancia a 310nm que detecta la presencia de proteínas.

La integridad del DNA fue verificado por electroforesis, en un gel de agarosa al 0.3 % en TBE 0.5X a 80 V por 1 hora.

## 6.6 Análisis por transferencia tipo Southern blot.

### *DIGESTIÓN Y SEPARACIÓN DEL DNA.*

El DNA genómico de los tejidos de hígado, epididimo y testículo fue digerido de la siguiente forma: se tomaron 4 muestras de 15µg de DNA de cada uno de los tejidos mencionados y fueron digeridas con 4 U/µg de una de las siguientes enzimas de restricción: *Mbo I*, *Sau3A I*, *Hpa II* o *Msp I*. Las enzimas fueron añadidas paulatinamente 10 unidades cada dos horas, utilizando las indicaciones del proveedor (Gibco BRL), la duración de cada digestión fue de 24 horas a temperatura de 37°C.

El DNA digerido fue separado por electroforesis en geles de agarosa 0.8% en TBE 0.5X a 30 V por 12 horas.

El DNA contenido en el gel de agarosa se desnaturalizó en varios volúmenes de una solución de NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M con agitación constante durante 45 minutos. El gel se enjuagó con agua desionizada, posteriormente se neutralizó lavándolo en varios volúmenes de una solución de NaCl 1.5 M, Tris-HCl 1 M pH 7.4 durante 30 minutos. Se enjuagó el gel con agua estéril varias veces.

### *TRANSFERENCIA DEL DNA.*

Para hacer la transferencia se cortó un pedazo de membrana de Nylon (Gene Screen) y dos de papel Whatman 3 MM del mismo tamaño que el gel. Los cuales se colocaron 1 minuto en agua estéril y 10 minutos en SSC 10 X

Aparte se colocó un pedazo de papel Whatman 3 MM sobre un soporte de superficie plana, el papel tenía la misma anchura del gel y era más largo de tal manera que sobrepasara la superficie del soporte. El soporte estaba colocado dentro de un recipiente que contenía SSC 10 X, la solución no sobrepasaba la altura del soporte pero si

humedecía las orillas del papel Whatman 3MM. El papel Whatman se impregnó completamente con la solución SSC 10X, se eliminaron las burbujas de aire con una varilla de vidrio. Se colocó el gel sobre el soporte en posición invertida y se eliminaron las burbujas entre el gel y el papel Whatman con una varilla de vidrio. Se colocó la membrana de Nylon sobre el gel y se eliminaron las burbujas de aire entre estos. Se colocaron sobre la membrana, dos pedazos de papel Whatman y se eliminó el aire. Se pusieron toallas de papel del mismo tamaño que el gel sobre el papel Whatman hasta alcanzar una altura de 8 a 10 centímetros. Se colocó un soporte de vidrio sobre las toallas de papel y sobre éste un peso de 500 g.

El DNA fue transferido por capilaridad durante 18 horas. Al pasar este tiempo se quitaron las toallas y el papel Whatman. Se marcaron los pozos del gel en la membrana con un lápiz. La membrana se retiró del gel y se eliminó el exceso de sales sumergiéndola en SSC 6 X a temperatura ambiente durante unos segundos. Se colocó la membrana sobre papel Whatman y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La membrana se colocó entre dos pedazos de papel Whatman y se calentó durante 2 horas a 80° C en un horno con vacío para fijar el DNA a la membrana.

## *HIBRIDACIÓN.*

Primero la membrana se prehibrida por 18 horas a 42° en una solución de formamida 40%, SDS 0.2%, EDTA (pH 8) 10 mM, reactivo Denhardt 4X, PB (pH 6.5) 120 mM, DNA esperma de salmón 100 µg/ml y SSC 2X. Se prepararon 0.2 ml de esta solución por cada cm<sup>2</sup> de membrana. El DNA de esperma de salmón se disolvió en 1 ml de agua estéril tratada y se calentó a 100° C por 5 minutos, en seguida se colocó en hielo por 5 minutos y posteriormente se le agregó la solución. Se eliminó las burbujas de aire de la bolsa de hibridación antes de sellarla.

Se marcaron los cDNA de 5α-reductasa tipo 1 con [α-<sup>32</sup>P] dCTP por medio del método de "Iniciadores Aleatorios" (Sambrook et al., 1989). Para ello se preparó la siguiente mezcla: cDNA 100 ng. amortiguador de iniciadores aleatorios 15 µl. dATP 2 µl. dGTP 2 µl. dTTP 2 µl. [α-<sup>32</sup>P] dCTP 5 µl (actividad específica 1-2 x 10<sup>8</sup> cpm/µg de

DNA), fragmento Klenow de la DNA polimerasa 1  $\mu\text{l}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  cbp 50  $\mu\text{l}$ . La mezcla se hizo con el siguiente orden: 1) se mezcló el cDNA con el agua y se desnaturalizó a  $100^\circ\text{C}$  por 5 minutos, 2) se sacó e inmediatamente se colocó en hielo otros 5 minutos, 3) se le agregó el amortiguador de iniciadores aleatorios, el dATP, dGTP, el dTTP y el  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP, 4) por último se agregó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa, 5) se mezcló y se dejó incubar la mezcla 3 horas a temperatura ambiente.

Para parar la reacción se agregaron a la mezcla, 5  $\mu\text{l}$  de amortiguador de inactivación del fragmento Klenow ( $\text{Na}_2\text{LTA}$  0.2 M pH 7.5) y 100  $\mu\text{l}$  de TE (pH 8).

Se colocaron los 155  $\mu\text{l}$  de mezcla dentro una columna de Sephadex G-50 y se centrifugaron a 1,500 rpm por 3 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Esta columna fue utilizada para separar el  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP no incorporado. Para hacer la columna se utilizó una jeringa de insulina, en el fondo de ésta se puso un poco de fibra de vidrio siliconizada estéril, posteriormente fue llenada con el Sephadex G-50 usando una pipeta Pasteur estéril. y fue centrifugada a 1,500 rpm por 3 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . La columna fue colocada en un tubo de centrífuga, en el fondo del tubo tenía un tubo eppendorf sin tapa.

Después de la centrifugación, la radiactividad fue medida con el contador Geiger para calcular la cantidad de radioactividad que se quedó en la columna y la que se incorporó a las sondas. El porcentaje de incorporación en todos los casos realizados fue mayor del 50%.

Cuidadosamente se sacó el tubo eppendorf del tubo de centrífuga, se tapó y se calentó la sonda por 5 minutos, después se enfrió en un baño de hielo por 5 minutos.

Aparte se sacó la bolsa de hibridación de la incubación de prehibridación, se le hizo un pequeño corte en una de las esquinas y se sacó la mitad del amortiguador de hibridación. Con una pipeta Gilson se metió dentro de la bolsa la sonda marcada. Se selló la bolsa y se dejó hibridando a  $40^\circ\text{C}$  por 24 horas.

Transcurrido el tiempo de la hibridación, la bolsa fue abierta por una esquina. El amortiguador de prehibridación con la sonda marcada fue vaciada dentro de un tubo Falcon. El tubo se colocó en un blindaje de plomo y se guardó en el congelador ya que puede ser reutilizada en otra hibridación.

Se colocó 10 ml de solución SSC 2X dentro de la bolsa para lavar la membrana. Se desechó esta solución en el bote para desechos radioactivos.

La membrana fue sacada de la bolsa y puesta en un recipiente con SSC 2X. Se agitó durante media hora a temperatura ambiente. Se cambió la solución por una nueva de SSC 2X y se dejó agitando 30 minutos como en el paso anterior.

Se cambió la solución por otra de SSC 0.1X + SDS 0.1%. Se colocó el recipiente en un baño de agua a 50° C y se lavó por media hora. Se sacó la membrana y se verificó con el contador Geiger la radiactividad. Este paso se repite hasta que se elimine toda la reactividad innecesaria que pueda meter ruido en nuestros resultados.

Las secciones experimentales que implicaban el manejo del material radiactivo fueron realizadas bajo las normas de seguridad requeridas en el uso de este tipo de material.

La membrana dentro de una bolsa de plástico sellada se expusieron a una película X-OMAT (Kodak) por diferentes tiempos a una temperatura de -20°C y posteriormente se revelaron.

Las membranas fueron lavadas en condiciones de alta severidad con una solución de Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM y SDS 1% por 10 a 30 min a una temperatura de 100°C. Nuevamente la membrana fue expuesta a una película por un periodo de tres días a 20°C, para observar si la reactividad había sido eliminada. Posteriormente las membranas fueron rehibridadas con cDNA de la 5 $\alpha$ -reductasa II, como se explicó anteriormente.

## **6.7 Extracción de RNA total.**

El RNA total se extrajo de los tejidos de hígado, epidídimo y testículo, provenientes de los diferentes grupos de ratas en estudio. Se pesó 100 mg de tejido y se pusieron con 1 ml de TRIzol a 4° C en tubos nuevos y estériles. El tejido fue homogeneizado con un politrón.

Las muestras homogenizadas fueron transferidas a tubos eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo por 1 ml de homogenado. Se taparon los tubos y se agitaron con vortex por 30 seg. Los tubos fueron transferidos a un baño de hielo por 5 minutos, después se centrifugaron a 12,000 rpm a 4° C por 15 minutos.

Se obtuvieron dos fases: la inferior de color rojo compuesta por fenol:cloroformo y la porción superior acuosa incolora. El RNA quedó en la fase acuosa, el DNA y las proteínas se quedaron en la interfase y en la fase orgánica respectivamente. La fase acuosa fue transferida a otro tubo eppendorf y se le agregó un volumen igual de isopropanol. La muestra se mantuvo a 4° C durante toda la noche.

Al día siguiente las muestra fueron centrifugada por 15 minutos a 12,000 rpm a 4° C. El RNA se precipitó formando una pastilla blanca amarillenta. Se removió el sobrenadante, se lavó la pastilla con etanol al 80% y se centrifugó a 7,500 rpm durante 8 minutos a 4° C. Se removió el sobrenadante y se colocaron los tubos en sentido inverso sobre una gasa estéril. Se secó la pastilla en un horno con vacío a temperatura ambiente evitando un secado total de la pastilla para evitar la insolubilidad de la misma.

Por último la pastilla de RNA fue disuelta en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEPC, de esta solución se hicieron diluciones 1:100 y se leyó la absorbancia de estas muestras a las siguientes longitudes de onda: 260, 280 y 310 nm. Se determinó la concentración de RNA mediante la siguiente fórmula: 1 unidad de Absorbancia a 260 nm = 40  $\mu$ g de RNA /ml. También se determinó la pureza del RNA por medio de la relación de absorbancias obtenida a 260 y 280 nm (260/280 nm) y la lectura de absorbancia a 310 para detectar la presencia de proteínas.

## **6.8 Análisis por transferencia tipo Northern.**

El RNA fue separado por electroforesis en un gel desnaturizante de agarosa al 1% que contenían formaldehído 6 % y MOPS 1X. Primero se disuelve la agarosa en el agua estéril tratada con DEPC. Posteriormente se agregan el formaldehído y el MOPS.

Para el corrimiento electroforético cada muestra de 20 µg de RNA estaba contenido en una mezcla de formamida 50 %, formaldehído 6.5 %, MOPS 1 X, amortiguador Loading para RNA 1 X y bromuro de Etidio 2.5 µg. El RNA primero se mezcló con la formamida, el formaldehído y el MOPS para calentarse a 75° C por 5 minutos, enseguida se colocó inmediatamente en hielo por 5 minutos y se le agregó el amortiguador de carga y el bromuro de etidio.. Se cargaron las muestras en el gel y se corrieron a 80 volts por 120 minutos. El gel de agarosa fue enjuagado por unos minutos en agua estéril tratada con DEPC. La transferencia del RNA a membranas de nylon y la hibridación fueron realizadas como se describió en el análisis tipo Southern.

*Nota: Los diseños experimentales fueron basado en: Maniatis T, Fristch EF, Sambrook (1982). Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY.*

## 6.9 Soluciones.

Medio de cultivo liquido LB: 10 g NaCl, 5 g extracto de levadura, 10 g peptona, agua c.b.p. 1000 ml. Se ajustó el pH a 7.5 y se esterilizó por autoclave.

Medio de cultivo en placa LB: 10 g NaCl, 5 g extracto de levadura, 10 g peptona, 5 g agar, agua c.b.p. 1000 ml. Se ajustó el pH a 7.5 y se esterilizó por autoclave.

Solución de ampicilina: 12.5 mg/ml ampicilina, amortiguador de fosfatos 0.6 M pH= 6.4. Se esterilizó por filtración en Millipore 0.45 mm.

Solución STE (pH 8): 0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8). Se esterilizó por autoclave.

Solución I: 50 mM glucosa. 25 mM Tris-HCl (pH 8). 10 mM EDTA (pH 8). Se esterilizó por autoclave y se guardó a 4°C.

Solución de lisozima: 10 mg/ml lisozima, 10 mM Tris-HCl (pH = 8). Se preparó en el momento que se tenía que utilizarse.

Solución II: 0.2 N NaOH (recién diluido de una solución 10 N de NaOH), 1% SDS.

Solución III: 60 ml acetato de potasio 5 M, 11.5 ml ácido acético glacial, 28.5 ml agua. La solución resultante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato.

Solución TE (pH 8.0): 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8).

RNAse pancreática: 10 mg/ml RNAse pancreática libre de DNase, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM NaCl.

Amortiguador de lisis: 10 mM Tris-Cl (pH 8), 0.1 M EDTA (pH 8), 20 µg/ml RNAse pancreática, 0.5% SDS.

Fenol saturado pH > 7.8: Se fundió el fenol a 68° C y se adicionó 8-hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1%. Se adicionó un volumen igual de Tris-HCl 0.5 M (pH 8) y se agitó durante 10 minutos, después de los cuales se descartó la fase acuosa (superior). Se repitió la operación dos veces más y se adicionó un volumen igual de Tris-HCl 0.1 M (pH 8). Se agitó durante 15 minutos y se descartó la fase acuosa. Se repitió la misma operación hasta que el pH del fenol fue superior a 7.8. El fenol se almacenó con 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M (pH 8) conteniendo 0.2% de β-mercaptoetanol. Se almacenó en un frasco oscuro a 4° C.

Solución fenol-cloroformo: 1 volumen de fenol saturado pH > 7.8, 1 volumen de cloroformo. Se preparó justo antes de usarse.

Acetato de sodio 3 M (pH 5.2): 3 M acetato de sodio. Se ajustó el pH con ácido acético glacial y se esterilizó por autoclave.

TBE 10 X (25 mM): 54 g Trizma base, 27.5 g ácido bórico, 20 ml EDTA 0.5 M (pH 8), agua cbp 500 ml. Se esterilizó por autoclave.

Amortiguador de carga para DNA 6X :: 0.25 % azul de bromofenol, 0.25 % xilencianol, 30.0 % glicerol. Se preparó en condiciones estériles y se guardó a 4° C.

Amortiguador de carga para RNA 6X : 50 % glicerol, 1 mM EDTA (pH 8.0), 0.25 % azul de bromofenol, 0.25 % xilencianol.

TRIZOL Reactivo para la extracción de RNA (Gibco BRL): Tiocianato de guanidina, fenol, β-mercaptoetanol.

H<sub>2</sub>O-DEPC: Se mezcló 1 ml de dietilpirocarbonato (DEPC) con 9 ml de alcohol etílico absoluto y se aforó a 1000 ml con H<sub>2</sub>O destilada. Se colocó a una temperatura de 37° C por dos horas y se esterilizó por autoclave.

MOPS 12X: 0.1 M MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanesulfónico), 40 mM acetato de sodio, 5 mM EDTA. Se preparó con H<sub>2</sub>O + DEPC y se esterilizó por filtración.

SSC 20X: 175.3 g NaCl, 88.2 g citrato de sodio, 800 ml agua. Se ajustó el pH a 7.0, se aforó a 1000 ml y se esterilizó por autoclave.

Reactivo de Denhart 100X: 10 g Ficoll tipo 400, 10 g polivinilpirrolidina, 10 g Albúmina sérica bovina (ASB), agua cbp 500 ml. Se esterilizó por filtración y se guardó a - 20° C.

PB 0.6 M pH 6.5 (Amortiguador de fosfatos): Se disolvieron 21.3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 250 ml de agua. En otros 250 ml de agua se disolvieron 20.7 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . A la solución de fosfato dibásico se adicionó poco a poco la solución de fosfato monobásico hasta que se alcanzó el pH deseado.

Sephadex G-50: 10 g de sephadex G-50 se lavaron varias veces con 160 ml de agua desionizada para eliminar el dextran soluble. Se equilibró la resina con TE (pH 8) y se esterilizó por autoclave.

### 6.10 Endonucleasa utilizadas.

| Enzima         | Sitio de reconocimiento    | Características                                                                                                                                                 |
|----------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Sau3A I</i> | 5'-↓GATC-3'<br>3'-CTAG↑-5' | Aislada de <i>Staphilococcus aureus</i> 3A                                                                                                                      |
| <i>Mbo I</i>   | 5'-↓GATC-3'<br>3'-CTAG↑-5' | Aislada de <i>Moraxella bovis</i> . Isoesquizómero de <i>Sau3A I</i> . No corta su sitio de reconocimiento cuando el DNA esta metilado en el residuo de adenina |
| <i>Msp I</i>   | 5'-C↓CGG-3'<br>3'-GGC↑C-5' | Purificada de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .                                                                                                              |
| <i>Hpa II</i>  | 5'-C↓CGG-3'<br>3'-GGC↑C-5' | Purificada de <i>Haemophilus parainfluenzae</i> . No corta su sitio de reconocimiento cuando el residuo 3' C es metilado en la posición 5                       |

# 7. RESULTADOS

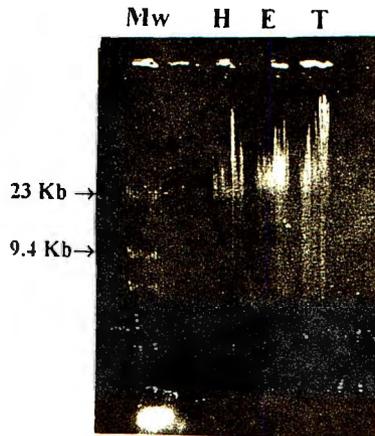
---

---

## 7.1 Características del DNA genómico.

Con el objetivo de determinar si las isoformas del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 y 2, presentan un patrón de metilación diferencial en tejidos del aparato reproductor masculino (epidídimo y testículo) y no reproductor (hígado), primeramente se extrajo el DNA genómico de estos tejidos como se describe en la sección de métodos. La pureza del DNA fue examinada por medio de la relación de absorbancias obtenidas a 260 y 280 nm (260/280 nm), la cual siempre estuvo en un rango de 1.8-1.9, lo que indica que el DNA está en condiciones puras. La integridad del DNA fue verificada por electroforesis, en un gel de agarosa al 0.3 % en TBE 0.5X a 80 V durante 1 horas.

En la *figura 9* se muestra la integridad de DNA genómico. El carril Mw corresponde al marcador de peso molecular (DNA del fago  $\lambda$  digerido con *Hind III*). En los demás carriles se muestra el DNA genómico de hígado (H), epidídimo (E) y testículo (T) respectivamente. Como se puede observar las condiciones del DNA extraído de los tejidos en estudio fueron adecuadas ya que todos tenían un tamaño de 23 Kb o mayor y no estaban degradados.

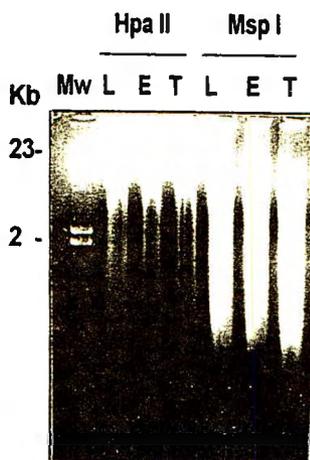


*Figura 9. Integridad del DNA genómico.*

## 7.2 Patrón de metilación en citosinas de los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea 1 y 2 de rata.

El patrón de metilación de citosinas de los genes de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 y 2, fue determinado al digerir el DNA genómico de hígado, testículo y epidídimo con endonucleasas de restricción sensibles a citosina metilada en la posición 5 y sus isoesquizómeros. La enzima *Hpa II* no corta al DNA en su sitio de reconocimiento cuando la citosina se encuentra metilada. Sin embargo la enzima *Msp I* corta el DNA en su sitio de reconocimiento aunque esté o no esté metilado. Después de la digestión se prosiguió con el análisis tipo Southern utilizando el cDNA correspondiente a cada gen.

La *figura 10* muestra el DNA genómico digerido con las enzimas *Hpa II* y *Msp I* en tejidos del aparato reproductor y no-reproductor. Los carriles son nombrados de la siguiente forma: DNA de hígado (L), epidídimo (E) y testículo (T) de ratas macho adulto digeridas con *Hpa II* y *Msp I*. EL carril Mw indica DNA de lambda digerido con *Hind III* utilizado como marcador de peso molecular. La electroforesis fue realizada en geles de agarosa 0.8% en TBE 0.5 X a 30 v por 12 horas.



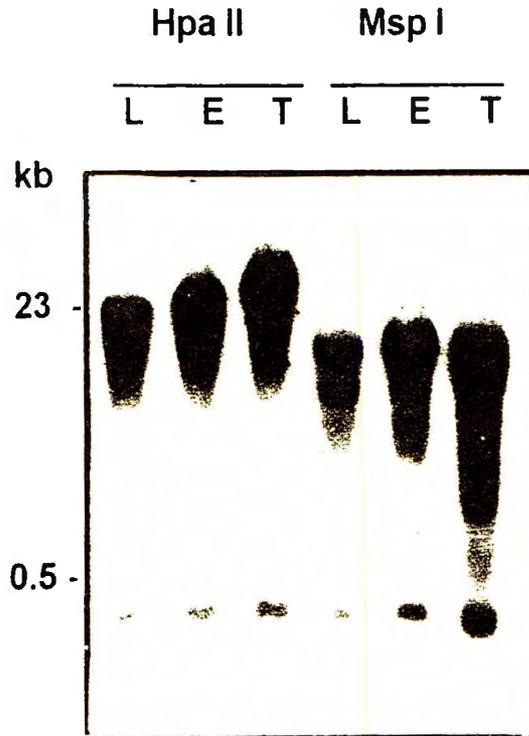
**Figura 10.** Electroforesis del DNA genómico digerido con las enzimas *Hpa II* y *Msp I* en tejidos del aparato reproductor y no-reproductor dependiente

Las figuras 11 y 12 representan los resultados de los análisis de tipo Southern de los genes de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 y 2 digeridos con enzimas sensibles a metilación en citosinas y sus isoesquizómeros. El DNA genómico de hígado (L); epidídimo (E) y testículo (T) digeridos con las endonucleasas *HpaII* y *Msp I*; y el marcador de peso molecular (Mw). Los fragmentos de DNA digeridos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y transferidos a una membrana de nylon e hibridados con el cDNA marcado del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 como es mencionado en la sección de material y métodos. En este análisis el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 mostró un patrón de metilación de citosinas semejante en todos los tejidos de estudio (Figura 11)..

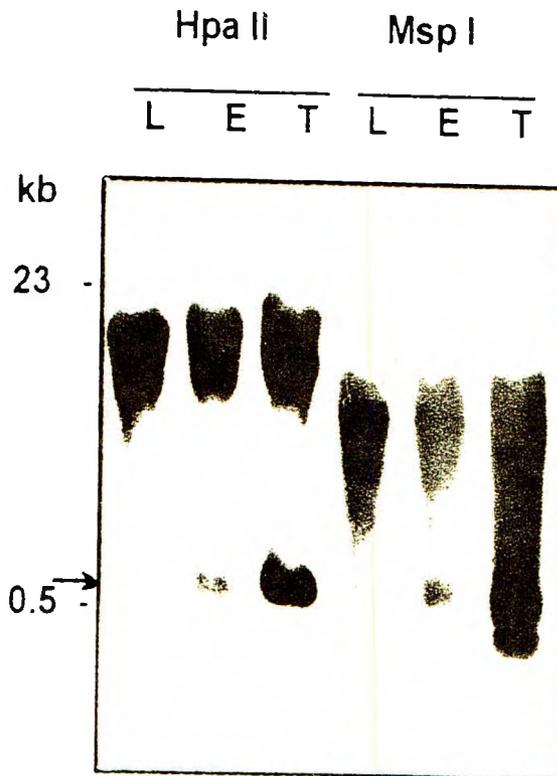
En todos los experimentos realizados se observó una muy pequeña diferencia entre epidídimo y testículo, la cual no le dimos mucha importancia para nuestro estudio ya que nos dimos cuenta que eran producto: 1) el DNA genómico de testículo que siempre obteníamos estaba un poco más degradado que el DNA genómico de epidídimo (Figura 9) y 2) aunque el testículo es muy activo en la conversión de testosterona a

dihidrotestosterona, esta conversión solo es realizada en células Leyding de testículo y nosotros estudiamos un homogenado de este tejido.

La membrana de nylon hibridada con el cDNA marcado del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 fue lavada bajo condiciones rigurosa y rehibridada con el cDNA marcado del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 2. En la *figura 12* la flecha indica la principal diferencia en el patrón de metilación en citosinas del gen 2 digerido con la enzima *Hpa II*. En contraste con el gen 1 de la 5 $\alpha$ -reductasa que presenta un patrón de metilación semejante en todos los tejidos, el gen 2 exhibe un patrón de metilación diferencial. En epididimo y en testículo el gen 2 está menos metilado que en hígado como se puede observar en la *figura 12*.



**Figura 11.** Análisis Southern blot del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 digerido con enzimas sensible a citosina metilada.

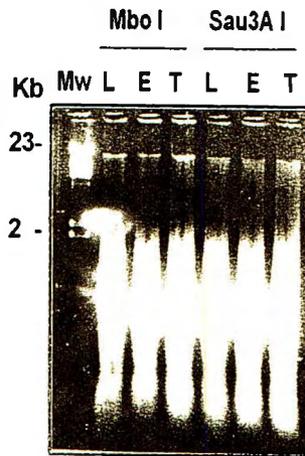


**Figura 12.** Análisis Southern blot del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 digerido con enzimas sensible a citosina metilada.

### 7.3 Patrón de metilación en adeninas de los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 y 2 de rata.

Para determinar el grado de metilación en adeninas de los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa se utilizó el mismo procedimiento que la determinación del patrón de metilación para citosinas. En este estudio, el DNA genómico de los tejidos de hígado (L), epidídimo (E) y testículo (T), fue digerido con enzimas de restricción *Mbo I* y *Sau3A I*. Estas dos enzimas son isoesquizómeros, pero la *Mbo I* no corta su sitio de reconocimiento (GATC) cuando la adenina está metilada. El DNA fragmentado fue separado por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % en TBE 0.5X en presencia del

fago lambda digerido con *Hind III* utilizado como marcador de peso molecular (Mw) como es mostrado en la *figura 13*.

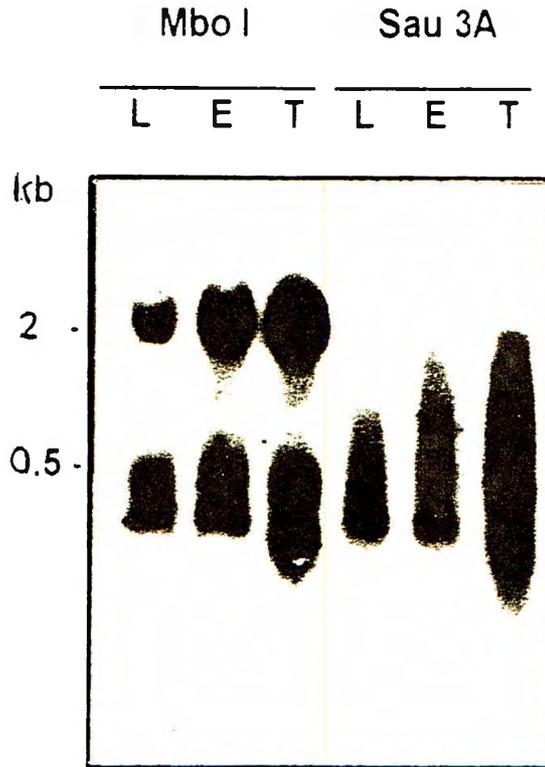


**Figura 13.** Electroforesis del DNA genómico digerido con las enzimas *Mbo I* y *Sau3A I* en tejidos del aparato reproductor masculino y no-reproductor.

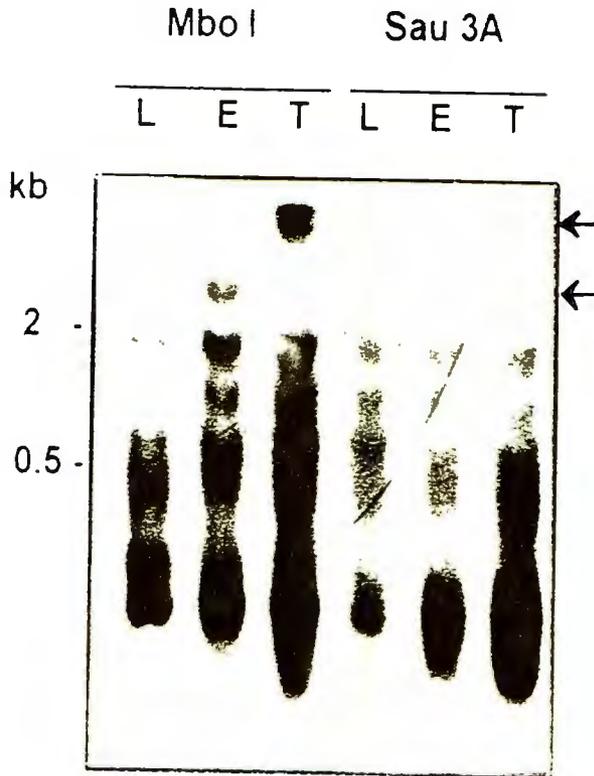
Después de que el DNA fue separado por electroforesis, este fue desnaturalizado, transferido a una membrana de nylon e hibridado con el cDNA marcado del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 1. La membrana fue lavada en condiciones de alta severidad y rehibridada con el cDNA del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 2.

En las *figuras 14 y 15* se pueden observar los resultados del Southern de los genes de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 y 2, digeridos con enzimas sensibles a adenina metilada. En la *figura 14* se muestra el DNA genómico de hígado (L), epidídimo (E) y testículo (T) digeridos con *Mbo I* y *Sau3A I*, e hibridado con el cDNA marcado radiactivamente del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 1. La membrana fue lavada en condiciones de alta severidad. En la *figura 15* se muestra la rehibridación de esta membrana con el cDNA marcado radiactivamente del gen 5 $\alpha$ -reductasa 2. Las flechas indican las principales diferencias en el patrón RFLP después de la digestión con *Mbo I* en el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 2.

En este análisis observamos que el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 presenta el mismo patrón de metilación en adeninas en los tejidos que estudiamos (*Figura 14*). Sin embargo en el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 2 observamos un patrón de metilación diferencial en adeninas que dependía del tipo de tejido (del aparato reproductor: epidídimo y testículo, o no-reproductor: hígado); presentándose una mayor metilación del gen en epidídimo y testículo (*Figura 15*).



**Figura 14.** Análisis tipo Southern del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 digerido con enzimas de restricción sensibles adeninas metiladas.

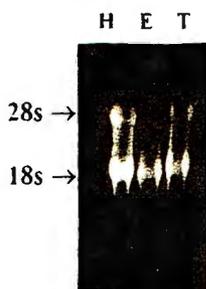


**Figura 15.** Análisis tipo Southern del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 digerido con enzimas de restricción sensibles adeninas metiladas.

#### 7.4 Expresión de los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea 1 y 2 de rata.

La expresión de los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa fue analizada por la técnica de Northern. Primeramente se extrajo el RNA total de los tejidos de estudio: hígado, epidídimo y testículo. Los tejidos fueron procesado por medio de la técnica del isotiocianato de guanidina/fenol/cloroformo para obtener el RNA total. La concentración y la pureza de los RNAs obtenidos se determinó por medio de las lecturas de la absorbancia a 260 y 280 nm de diluciones 1:100. En todas las muestras la relación

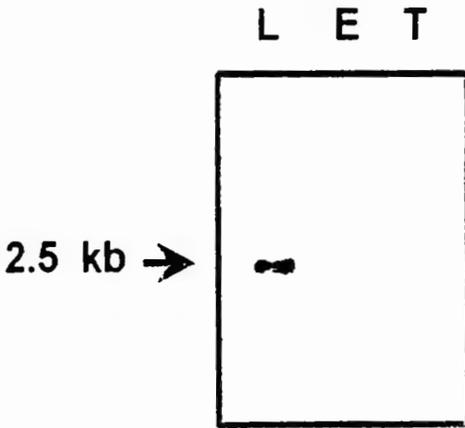
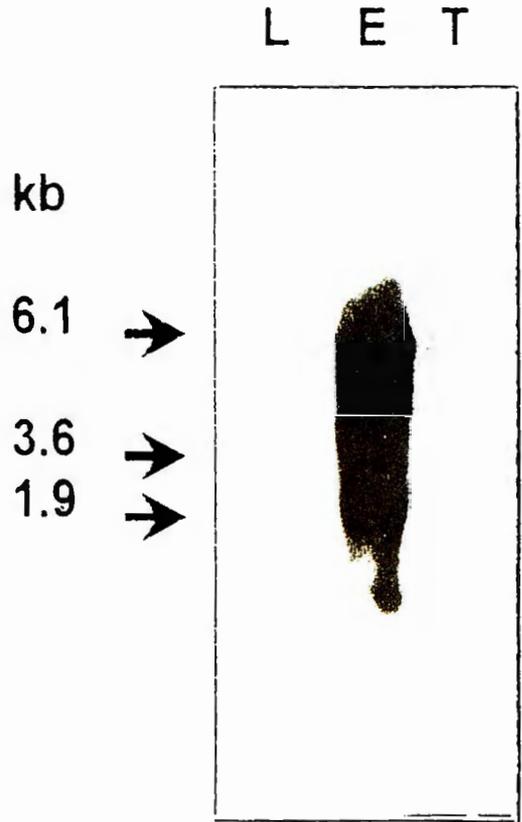
260/280 fue mayor a 1.8, lo cual indica que los RNAs obtenidos se encontraban puros. Posteriormente se realizó una electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa para observar la integridad de los RNAs (*Figura 16*).



**Figura 16.** RNAs de los tejidos del aparato reproductor y no-reproductor. Hígado (H), epidídimo (E) y testículo (T) de rata. 28s y 18s = RNAs ribosomales.

Los RNAs se transfirieron a una membrana de nylon y se fijaron por medio de calor. La membrana se prehibridó y posteriormente se hibridó con el cDNA marcado con [ $\alpha^{32}$ -P]dCTP del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 1. La membrana fue lavada en condiciones de alta severidad y rehibridada con el cDNA marcado radiactivamente del gen de la isoenzima 5 $\alpha$ -reductasa 2.

En la *figura 17* se muestran los resultados de las hibridaciones, es donde se observa que el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 sólo fue expresada en el hígado (L), se puede ver solamente un transcrito de 2.5 kb (*Figura 17 A*). Sin embargo el gen 2 fue expresado solamente en los tejidos del aparato reproductor. En el epidídimo (E) se observó tres transcritos de 6.1, 3.6 y 1.9 kb (*Figura 17B*). En el testículo también se logró observar los tres transcritos, cuando la membrana de nylon se sobre exponía.

**A****B**

**Figura 17.** *Trasferencia Northern de los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea en tejidos del aparato reproductor y no-reproductor. 17 A) Hibridaci3n con el cDNA del gen 1. 17 B) Hibridaci3n con el cDNA del gen 2. Las flechas indican los transcritos de cada uno de los genes.*

# 8. DISCUSIÓN

---

---

En este estudio demostramos que existe un patrón de metilación diferencial en citosinas y adeninas en el gen de la isoenzima 5 $\alpha$ -reductasa 2 en epidídimo y testículo en relación con el hígado. En la actualidad se tiene conocimiento que un gran número de genes en eucariotes están metilados y que en muchos casos la metilación en citosinas representa un mecanismo para la regulación de estos genes en vertebrados (Cedar and Razin, 1990; Meehan et al, 1992). También se sabe que una mayor metilación en citosinas en estos genes provoca una inhibición en la expresión de los mismos como por ejemplo en genes muy metilados en líneas celulares de fibroblastos. Sin embargo, cuando diferentes copias de éstos genes no metilados son introducidos dentro algún tipo celular éstos llegan a ser transcripcionalmente activos (Boyes and Bird, 1992). El mecanismo exacto por el cual los grupos metilo en la posición 5 de la citosina interfiere con la transcripción es aún desconocido. Hasta el momento se han propuesto tres modelos, cada uno basado en alguno de los siguientes factores: 1) a cambios conformacionales, 2) a la interferencia para la unión de factores de transcripción a su sitio de reconocimiento en el promotor directamente o 3) indirectamente. Estos modelos con base en evidencias experimentales sugiere que posiblemente la inhibición se deba a una combinación de los tres mecanismos antes mencionados.

Nosotros demostramos que existe una correlación entre el patrón de metilación en citosinas del gen de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea tipo 2 y su expresión. En efecto, este gen está menos metilado en tejidos tales como el epidídimo y el testículo donde es expresado, comparado con el hígado en el cual no es expresado (*Figura 12 y 17*).

También exploramos la presencia de metilación en adenina en los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea. Aunque la 6-metiladenina está presente frecuentemente en procariotes, en la actualidad hay evidencia indirecta usando análisis de restricción que sugiere que la 6-metiladenina también se encuentra presente en el DNA genómico de plantas y animales (Pintor-Toro, 1987, Kay et al, 1994). La N6-adenosina metilasa ha sido caracterizada en células HeLa (Bokar et al, 1994). En diferentes estudios *in vitro* se ha demostrado que la metilación de adeninas en promotores incrementa la velocidad de transcripción de varios genes de plantas (Torres et al, 1993; Dolferus et al, 1994). Los resultados obtenidos en este estudio apoyan y amplían estas observaciones.

A semejanza con la metilación en citosinas, la metilación en adeninas modifica la conformación del DNA ó la afinidad de los factores de transcripción a sus sitios de reconocimiento en el promotor (Graham and Larkin, 1995) pero con la diferencia del DNA metilado en citosinas, el DNA que presenta metilación en adeninas incrementaría la transcripción de estos genes. Hasta el momento no se ha reportado de como la metilación en adeninas provoca un aumento en la transcripción.

Se ha reportado que la metilación en los elementos de respuesta de hormonas esteroideas en genes blanco incrementa la afinidad de su receptor análogo (Truss et al, 1992). Nosotros hemos demostrado que el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 2 presenta metilación en adeninas (*Figura 15*). Además el gen 2 está menos metilado en hígado, donde no se expresa comparando con los tejidos donde se expresa tales como el epidídimo y el testículo..

Nuestros datos apoyan la posibilidad de que la 6-metiladenina pueda jugar un papel *in vivo* en la regulación de la expresión génica en eucariotes y soporta la hipótesis que la 5-metilcitosina participa en la regulación de la expresión gen-tejido específico. De manera interesante se ha observado que muchas de las mutaciones descritas en el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 2 en pacientes con el síndrome conocido como deficiencia de la 5 $\alpha$ -reductasa ocurren en las citosina de la secuencia nucleotídica CG, produciendo un cambio

de citosina por adenina. Además se ha sugerido que este cambio nucleotídico es debido a la desaminación inducida por la citosina metilada en la secuencia CG.

En contraste con el patrón de metilación diferencial observado en citosinas y en adeninas en el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2, nosotros encontramos que el gen 1 presenta el mismo patrón de metilación en citosinas y adeninas en los tejidos estudiados. Esto sugiere que hay otros factores además de la metilación que participan en la regulación de la expresión de estos genes en diferentes tejidos.

La relación entre la estructura de la cromatina y los factores involucrados en la regulación génica es compleja, y el estado de metilación de un gen es sólo uno de los elementos multifactoriales en los procesos que regulan la transcripción génica en los eucariotes (Bird, 1986; Li et al, 1993).

Las diferencias encontradas en el patrón de distribución y expresión de los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa han sido relacionadas a su respectivo papel en el metabolismo. La 5 $\alpha$ -reductasa 2 es preferencialmente expresada en los tejidos del aparato reproductor masculino, donde esta proteína juega un papel crítico en la diferenciación sexual masculina y en el metabolismo anabólico. En contraste la isoenzima tipo 1 es expresada en tejido no reproductivo como hígado, intestino, cerebro, músculo, etc., tanto en mamíferos de sexo masculino como del femenino; en donde se ha demostrado que esta proteína juega un papel en metabolismo catabólico de esteroides (Wilson et al, 1993).

En este estudio observamos un alta expresión de la enzima en el epidídimo y una baja expresión en el testículo. Aunque el último tejido es muy activo en la conversión de testosterona a dihidrotestosterona la expresión detectada de la 5 $\alpha$ -reductasa 2 fue baja debido al hecho que sólo las células Leyding contienen esta enzima en el testículo y nosotros estudiamos un homogenado de este tejido que incluye otro tipo de células que no expresan el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 2 (*Figura 17 B*).

En este estudio presentamos una nueva diferencia molecular entre las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 1 y tipo 2, basada en el patrón de metilación diferencial tanto en citosinas y adeninas que existe entre el gen tipo 1 y el tipo 2 en tejidos andrógeno y no-andrógeno dependiente.

# 9. CONCLUSIONES

---

---

En este trabajo de investigación se estudio la correlación del patrón de metilación en citosinas y adeninas de los genes que codifican para las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa esteroidea y su expresión en tejidos del aparato reproductor masculino y no-reproductor del cual hemos podido concluir lo siguiente:

- Por análisis de restricción hemos demostrado la presencia de metilación en adenina en los genes de las isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa.

- Existe un patrón de metilación diferencial en citosinas y adeninas en el gen de la isoenzima de la 5 $\alpha$ -reductasa 2 en tejidos del aparato reproductor masculino (epidídimo y testículo) y no-reproductor (hígado). Estos patrones están correlacionados con la expresión del gen. El gen 2 está hipometilado en citosinas en los tejidos tales como el epidídimo y testículo donde se expresa, comparado con el hígado en el cual no es expresado. Contrariamente, el gen tipo 2 está más metilado en adeninas en los tejidos donde se expresa, comparado con el tejido donde no se expresa.

-El gen de la 5 $\alpha$ -reductasa 1 presenta el mismo patrón de metilación en citosinas y adeninas en los tejidos estudiados

-La metilación en citosinas y adeninas en el gen de la 5 $\alpha$ -reductasa tipo 2 podría proveer un mecanismo para explicar la expresión diferencial de esta enzima en tejidos de rata. La metilación en citosinas podría estar relacionada con la inhibición de la expresión del gen de la enzima tipo 2 en tejido no reproductor y la metilación en adeninas podría contribuir a la expresión del mismo gen en tejidos del aparato reproductor masculino como epidídimo y testículo.

# 10. REFERENCIAS

---

---

- ◆ Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW (1991). *Deletion of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism*. Nature 354:159.
- ◆ Andersson S, Bishop RW, Russell DW (1989) *Expression cloning and regulation of steroid 5 $\alpha$ -reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation*. J. Biol. Chem. 264:16249.
- ◆ Andersson S, Russell DW (1990). *Structural and biochemical properties of clones and expressed human and rat steroid 5 $\alpha$ -reductases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3640
- ◆ Antequera F, MacLeod D, Bird AP (1989). *Specific protection of methylation CpG in mammalian nuclei*. Cell 58:509
- ◆ Baker DJ, Kan JLC, Smith SS (1988). *Recognition of structural perturbation in DNA by human DNA(cytosine-5)methyltransferase*. Gene 74:207
- ◆ Baker DJ, Laayoun A, Smith SS (1993). *Transition state analog as affinity label for human DNA methyltransferases*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:864
- ◆ Barlow DP (1993). *Methylation and imprinting: from host defense to gene regulation?*. Science. 260:309.
- ◆ Bestor T (1987). *Supercoiling-dependent sequence specificity of mammalian DNA methyltransferase*. Nucleic. Acid. Res. 15: 3835.
- ◆ Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V (1988). *Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cell*. J. Mol. Biol. 203:971.
- ◆ Bestor TH, Coxon A (1993). *The pros and cons of DNA methylation*. Curr Biol 3:384.
- ◆ Bird AP (1993). *Functions for DNA methylation in vertebrates*. Cold. Spring. Harb. Symp. Biol. 58:281.

- ◆ Brandeis M, Ariel M, Cedar H (1993). *Dynamics of DNA methylation during development*. BioEssays 13:709.
- ◆ Butler PJG (1984). *A defined structure of the 30nm chromatin fiber which accommodates different nucleosomal repeat lengths*. EMBO J 3:2599.
- ◆ Caserta M, Di Mauro E (1996) *The active role of DNA as a chromatin organizer*. BioEssays 8:685.
- ◆ Cedar H (1994). *DNA methylation and gene activity*. Cell 53:3.
- ◆ Cedar H, Razin A (1990). *DNA methylation and development*. Biochem. Biophys. Act. 1049:1.
- ◆ Chang L, Loranger SS, Mizzen C, Ernst SG, Allis CD, Annunziato AT (1997). *Histones in transit: cytosolic histones complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells*. Biochemistry 36:469
- ◆ Chen L, MacMillan AM, Chang W, Ezaz-Nikpay K, Lane WS, Verdine GL (1991). *Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase*. Biochemistry. 30:11018.
- ◆ Christophe D, Pichon B (1994). *DNA methylation and gene activity: toward the end of the debate?*. Mol Cell Endocrinol. 100:155.
- ◆ Comb M, Goodman HM (1990). In *DNA Methylation: molecular biology and biological significance*. Jost JP, Saluz HP (ed). Birkhäuser Verlag, Basel p.404.
- ◆ Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ (1992). *Testosterone and 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene*. Mol. Cell. Endocrinol. 88:15.
- ◆ Dicerson RE (1983). *The DNA helix and how it is read*. Sci. Am. 249:94.
- ◆ Ehrlich M, Ehrlich KC (1993). In *DNA Methylation: molecular biology and biological significance*. Jost JP, Saluz HP (ed). Birkhäuser Verlag, Basel p.145.
- ◆ Feinberg AP, Vogelstein B (1985). *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counter parts*. Nature (Lond). 301:89.
- ◆ Filipski J, Leblanc J, Youdale T, Sikorska M, Walker PR (1990). *Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures*. EMBO J 9:1319.

- ◆ Ford K, Taylor C, Connolly BA, Hornby DP (1993). *Effects of cofactor and deoxy cytidine substituted oligonucleotide upon sequence-specific interaction between Msp I DNA methyltransferase and DNA*. J. Mol. Biol. 230:779.
- ◆ Friedberg EC (1985). In: *DNA Repair*. Freeman WH and Company (ed). New York p.87.
- ◆ Friedman S (1981). *The inhibition of DNA (cytosine-5) methylases by 5-azacytidine. The effect of azacytosine-containing DNA*. Mol Pharmacol 19:314.
- ◆ Friedman S, Ansari N (1992). *Binding of the EcoR II methyltransferase to 5-fluorocytosine-containing DNA. Isolation of a bound peptide*. Nucleic. Acids. Res. 20:3241.
- ◆ Fukuma M, Hiraoka Y, Sakurai H, Fukasawa T (1994) Purification of yeast histones competent for nucleosome assembly in vitro. Yeast 10:319
- ◆ Garrard WT (1991). *Histone H1 and the conformation of transcriptionally active chromatin*. BioEssay 13:87.
- ◆ George FW, Russell DW, Wilson JD (1991). *Feed-forward control of prostate growth: Dihydrotestosterone induce expression of its own biosynthetic enzyme, steroid 5 $\alpha$ -reductase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8044.
- ◆ Giannasca PJ, Horowitz RA, Woodcock CL (1993) *Transition between in situ and isolated chromatin*. J. Cell. Sci. 105:551.
- ◆ Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA (1995). *Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor genes in normal y transformed human tissues correlated with gene silencing*. Cancer Res 55:4531.
- ◆ Graham WM, Larkin PJ (1995). *Adenine methylation at dam sites increases transient gene expression in plant cells*. Trans. Res. 4:324
- ◆ Greenblat MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC (1994). *Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis*. Cancer. Res. 54:4855.

- ◆ Griffin JE, Wilson JD (1989). *In: The Metabolic Basis of Inherited Disease*. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (ed). ed 6 McGraw-Hill, New York, p 191.
- ◆ Hasse A, Schulz WA (1994). *Enhancement of reporter gene de novo methylation by DNA fragments from the alpha-fotoprotein control region*. J. Biol. Chem. 269:1821.
- ◆ Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa J-PJ, Davidson NE, Sindrasky D, Baylin SB (1995). *Inactivation of the CDKN2/p16/MTS gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers*. Cancer. Res. 55:4525.
- ◆ Igo-Kemenes T, Zachau HG (1978). *Domains in chromatin structure*. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 42:109.
- ◆ Iguchi-Aruga SMM, Schaffner W (1989). *CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation*. Genes Dev 3:612.
- ◆ Imperato-McGinley J, Guerrero L, Gautier T, Peterson RE (1974). *Steroid 5 $\alpha$ -reductase deficiency in man: An inherited form of male pseudohermaphroditism*. Science 186:1213.
- ◆ Jenkins EP, Andersson S, Imperato-McGinley J, Wilson J, Russell DW (1992). *Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 $\alpha$ -reductase*. J. Clin. Invest. 89:293.
- ◆ Johnson CA, Goddard JP, Adams RL (1995). *The effect of histone H1 and DNA methylation on transcription*. Biochem. J. 305:791.
- ◆ Jones PA (1996). *DNA methylation errors and cancer*. Cancer Res. 56:2463.
- ◆ Jones PA, Buckley JD (1990). *The role of DNA methylation in cancer*. Adv. Cancer. Res. 54:1.
- ◆ Jost J-P, Hofsteenge (1992). *The repressor MDBP-2 is a member of the histone H1 family that binds preferentially in vitro and in vivo to methylated nonespecific DNA sequences*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9499.

- ◆ Jost J-P, Saluz H-P, Pawlak A (1991). *Estradiol down regulated the binding activity of avian vitellogenin gene repressor (MDBP-2) and triggers a gradual demethylation of the mCpG pair of its DNA sequences.* Nucleic Acid Res 19:5771.
- ◆ Jue K, Benoit G, Alcivar-Warren A, Trasler J (1995). *Developmental and hormonal regulation of DNA methyltransferase in the rat testis.* Biol. Reprod. 52:1364.
- ◆ Kay PH, Pereira E, Marlow SA, Turbett G, Mitchell CA, Jacobsen PF, Holiday R, Papadimitriou JM (1994). *Evidence for adenine methylation within the mouse myogenic gene Myo-D1.* Gene 151:100.
- ◆ Kellum R, Schedl (1991). *A position effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains.* Cell 64:941.
- ◆ Keshet I, Lieman-Hurwitz J, Cedar H (1986). *DNA methylation affect the formation active chromatin.* Cell 44:535.
- ◆ Kornberg A, Baker TA (1991). *DNA Replication.* Freeman and Company (ed). 2.<sup>a</sup> New York, p.56.
- ◆ Kovacs WJ, Griffin JE, Wilson JD (1983). *Transformation of human androgen receptor to the deoxyribonucleic acid-binding state.* Endocrinology 113:1574.
- ◆ Laird PW and Jaenisch R (1994). *DNA methylation and cancer.* Hum. Mol. Genet. 3:1487.
- ◆ Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazell A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA, Jaenisch R (1995). *Suppression of interstitial neoplasia by DNA hypomethylation.* Cell 81:197.
- ◆ Lauster R, Trautner TA, Noyer-Weider M (1989). *Cytosine-specific type II DNA methyltransferase. A conserved enzyme core with variable target-recognizing domains.* J. Mol. Biol. 206:305.
- ◆ Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A (1992). *Purification, sequence and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA.* Cell 69:905.
- ◆ Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992). *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.* Cell 69:915.

- ◆ MacLeod AR, Rouleau J, Szyf M (1995). *Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway*. J. Biol. Chem. 270:11327.
- ◆ Margulis L, Schwartz KV (1988). *Five kingdoms: an illustrated guide to the Phyla of life on earth*. Freeman (ed). 2nd New York p.13
- ◆ Marinus MG (1987). In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium cellular and molecular Biology*. Ingraham JL, Brooks LK, Magasanik B, Schaechter M, Umberger HE (ed). Volume 1 Washington USA, American Society for Microbiology, p67.
- ◆ McArthur M; Thomas JO (1996). *A preference of histone H1 for methylated DNA*. EMBO J. 15:1705.
- ◆ McPhaul MJ, Marcelli M, Tilley WD, Griffin JE, Wilson JD (1991). *Androgen resistance caused by mutations in the androgen receptor gene*. FASEB. J. 5:2910.
- ◆ Meehan R, Lewis J, Cross S, Nan XS, Jeppesen P, Bird A (1992) *Transcriptional repression by methylation of CpG*. J. Cell. Sci. Suppl. 16:9.
- ◆ Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP (1989). *Identification of a mammalian protein that bind specifically to DNA containing methylated CpGs*. Cell 58:499.
- ◆ Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin S, Sidransky D (1995). *5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS 1 in human cancers*. Nat. Med. 1:686.
- ◆ Metcalf BW, Levy MA, Holt DA (1989). *Inhibitors of steroid 5 $\alpha$ -reductase in benign prostatic hyperplasia, male patten baldness and acne*. Trends Pharmac Sci 10:491.
- ◆ Miller OL Jr, Bakken AH (1972). *Morphological studies of transcription*. Acta. Endocrinol. Suppl. 168:155.
- ◆ Muiznieks I, Doerfler W (1994). *The impact of 5'-CG-3' methylation on the activity of different eukaryotic promoters: a comparative study*. FEBS lett. 344:251
- ◆ Normington K, Russell DW (1992). *Tissue distribution and kinetic of rat steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes*. J. Biol. Chem. 267:19548.
- ◆ Olins AL, Carlson RD, Olins DE (1975). *Visualization of Chromatin. Substructure: uppsilon bodies*. J. Cell. Biol 59:252.

- ◆ Olins AL, Olins DE (1974). *Spheroid Chromatin unit (v bodies)*. Science 183:330.
- ◆ Osterman DG, DePillis GD, Wu JC, Matsuda A, Santi DV (1988). *S-fluorocytosine in DNA is a mechanism-based inhibitor of Hha I methyltransferase*. Biochemistry 27:5204.
- ◆ Palmer BR, Marinus MG (1994). *The dam and dcm strains of Escherichia coli-a review*. Gene 143:1
- ◆ Peterson RE, Imperato-McGinley J, Gautier T, Sturla E (1977). *Male pseudohermaphroditism due to steroid 5 $\alpha$ -reductase deficiency*. Am. J. Med. 62:170.
- ◆ Pfeifer GP, Gruunwald S, Boehm TLJ, Drahovsky D (1983). *Isolation and characterization of DNA cytosine 5-methyltransferase from human placenta*. Biochim. Biophys. Acta. 740:323.
- ◆ Pintor-Toro JA (1987). *Adenine methylation in zein genes*. Biochem. Biophys Res. Comm. 147:1087
- ◆ Razin A, Cedar H (1991). *DNA methylation and gene expression*. Microbiol Rev 55:451.
- ◆ Razin A, Riggs AD (1980). *DNA methylation and gene function*. Science 210:604.
- ◆ Reinisch KM, Chen L, Verdine GL, Lipscomb WN (1994). *Crystallization and preliminary crystallographic analysis*. JACS 115:5318.
- ◆ Renbaum P, Razin A (1992). *Mode action of the Spiroplasma CpG methylase M.SssI*. FEBS Lett. 313:243.
- ◆ Saenger W (1984). *Principles of nucleic acid structure*. (ed) Springer-Verlag, New York, p.78.
- ◆ Silver RI, Wiley EL, Thigpen AE, Guileyardo JM, McConnell JD, Russell DW (1994). *Cell type specific expression of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2*. J. Urol. 152:438.
- ◆ Singer-Sam J, Riggs AD (1993). In: *DNA methylation: Molecular Biological Significance*. (ed) Jost JP, Saluz HP, Boston: Birkhäuser Verlag p.358.
- ◆ Smith SS (1994). In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. (Ed) Copyright by Academic Press Inc. 49:65.

- ◆ Smith SS, Hardy TA, Baker DJ (1987). *Human DNA (cytosine-5)methyltransferase selectively methylates duplex DNA containing mispairs.* Nucleic. Acid. Res. 15:6899.
- ◆ Smith SS, Kan JLC, Baker DJ, Kaplan BE, Dembek P (1991). *Recognition of unusual DNA structures by human DNA (cytosine-5)methyltransferase.* J. Mol. Biol. 217:39.
- ◆ Smith SS, Kaplan BE, Sowers LC, Newman EM (1992) *Mechanism of human methyl-directed DNA methyltransferase and the fidelity of cytosine methylation.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4744.
- ◆ Stoner E (1990). *The clinical development of a 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, fenasterine.* J. Steroid. Biochem. Molec. Biol 37:375.
- ◆ Szyf M (1985). *Cell cycle-dependent regulation of eukaryotic DNA methylase level.* J. Biol. Chem. 260:8653.
- ◆ Szyf M (1991). *DNA methylation patterns: an addition level of information?.* Biochem. Cell. Biol. 69:764.
- ◆ Szyf M (1994). *DNA methylation properties: consequences for pharmacology.* Trends. Pharmacol. Sci. 15:233.
- ◆ Szyf M, Bozovic V, Tanigawa (1991). *Growth regulation of mouse DNA methyltransferase gene expression.* J. Biol. Chem. 266:10027.
- ◆ Szyf M, Rouleau J, Therberge J, Bozovic (1992). *Induction of myogenic differentiation by an expression vector encoding the DNA methyltransferase cDNA sequence in the antisense orientation.* J Biol Chem 267:12831.
- ◆ Taylor C, Ford K, Connolly BA, Hornby DP (1993). *Determination of the order of substrate addition to Msp I DNA methyltransferase using a novel mechanism- based inhibitor.* Biochem. J. 291:493.
- ◆ Thigpen AE, Davis DL, Milatovich A, Mendonca BB, Imperato-McGinley, Griffin JE, Francke U, Wilson JD, Russell DW (1992). *The molecular genetic of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency.* J. Clin. Invest. 90:799.

- ◆ Thomas F (1988). In: *The role of histone H1 in nucleosomes and chromatin fibers in Architecture of eukaryotic genes*. Kohl G (ed), Weinheim Federal Republic of Germany, VHC Verlagsgesellschaft, chap 7.
- ◆ Thomas F, Koller TH, Klug A (1979). *Involvement of histone H1 in the organization of nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin*. J. Cell. Biol. 83:403.
- ◆ Truss M, Bartsch J, Chalepakis J, Beato M (1992). *Artificial steroid hormone response element generated by dam-methylation*. Nucl. Acids. Res. 20:1483
- ◆ Tsanev R, Russev G, Pashev I, Zlatanova J (1992). In: *Replication and transcription of Chromatin*. CRC Press (ed) , Inc., Boca Raton, FL p.14.
- ◆ Turker MS, Mummanen P, Bishop PL (1991). *Region and cell type-specific de novo DNA methylation in cultured mammalian cells* Somatic Cell Mol Genet 17:151.
- ◆ Udvardy A, Schedl P (1990). *Chromatin structure, not DNA sequence specificity, is the primary determinant of topoisomerase II sites of action in vivo*. Mol. Cell. Biol. 11:4973.
- ◆ van Holde K, Zlatanova J (1995) *Chromatin higher order structure: Chasing a mirage?*. J. Biol. Chem. 270:8373.
- ◆ van Holde KE (1988) In: *Chromatin*. (ed) Springer Verlag New York p.289
- ◆ Vardimon L, Rich A (1985). *In vitro methylation of B-DNA and Z-DNA*. Prog. Clin. Biol. Res. 198:23.
- ◆ Walsh PC, Madden JD, Harrod MJ, Goldstein JL, MacDonald PC, Wilson JD (1974). *Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias*. N. Engl. J. Med. 291:944.
- ◆ Widom J (1989). *Toward a unified model of chromatin folding*. Annu. Rev. Biophys. Chem. 18:365.
- ◆ Wilbert DM, Griffin JE, Wilson JD (1983). *Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 56:113.

- ◆ Williams SP, Athey BD, Muglia LJ, Schappe RS, Gough AH, Langmore JP (1986). *Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length.* Biophys. J. 49:233.
- ◆ Wilson JD (1975). In: *Metabolism of testicular androgens.* Greep RO, Astwood EB (ed) Handbook of Physiology, sect 7: Endocrinology. American Physiological Society, Washington DC, vol. 5: 491.
- ◆ Wilson JD, Aiman J, MacDonald PC (1980). *The pathogenesis of gynecomastia.* Adv. Intern. Med. 25:1.
- ◆ Wilson JD, Griffin JE, Russell DW (1993). *Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency.* Endrocr. Rev. 14:577.
- ◆ Woodcock CLF (1977). *Reconstitution of chromatin subunits.* Science 195:1350.
- ◆ Woodcock CLF, Frado LLY Rattner JB (1984) *The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement.* J.Cell. Biol. 99:42.
- ◆ Worcel A, Strgatz S, Riley D (1981). *Structure of Chromatin and the linker number of DNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1461.
- ◆ Yao J, Lowary PT, Widom J (1990) *Direct detection of linker DNA bending in defined-length oligomer of chromatin.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7603.
- ◆ Yao J, Lowary PT, Widom J (1991) *Linker DNA bending induced by core histones of chromatin.* Biochemistry 30:8408.
- ◆ Yisraeli J, Szyf M (1984). In: *DNA methylation: Biochemistry and Biological Significance.* Razin A, Cedar H, Riggs AD (ed). Springer-Verlag p.353.
- ◆ Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Shimoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S (1995). *Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7416.
- ◆ Zhang X-Y, Asiedu CK, Supakar PC, Khan R, Ehrlich M. Ehrlich KC (1990). *Binding sites in mammalian genes and viral genes regulatory region recognized by methylated DNA-binding protein.* Nucleic Acid Res 18:6253.
- ◆ Zlatnova J (1990) *Histone H1 and the regulation of transcription fo genes.* Trends Biochem Sci 15:273

# ***APÉNDICE***

---

---

# Journal of ANDROLOGY

Co-Editors-in-Chief  
Donald J. Tindall • Ronald W. Lewis

Editorial Assistant  
Denise Lecy

Official Publication of the American Society of Andrology

February 26, 1997

Ms. Ref. No. 96-102 (Revision 2)

Tentatively scheduled for: July/August, 1997

Marco A. Cerbon, M.D., Ph.D.  
Departamento de Biología  
Facultad de Química  
Ciudad Universitaria  
Coyoacan 04510, Mexico D.F.  
MEXICO

Dear Doctor Cerbon:

It is a pleasure to inform you that your manuscript has been accepted for publication in the *Journal of Andrology*. Page proofs should reach you approximately three to four months before the scheduled publication date. If your address changes, please notify us immediately.

We would like to call your particular attention to the following:

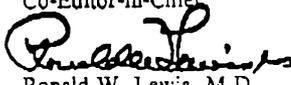
1. When page proofs are received, please read, correct, and return them to the Managing Editor (along with the complete original typescript) within 72 hours. Proofs should be returned by the fastest mail service available. If proofs are not returned on time, the article will be published without the authors' corrections.
2. A form for ordering reprints will be included with your proofs. A purchase order (or payment) for reprints must be included with the proofs when they are returned to Allen Press, otherwise shipment of reprints will be delayed.
3. Changes in proofs entail considerable expense and publication delay and thus are discouraged unless absolutely necessary.
4. When reading proofs, please answer carefully all of the copy editor's queries, and pay particular attention to the illustrations to ensure the quality and accuracy of their reproduction.
5. Please read the entire manuscript carefully to verify that no changes in meaning have been introduced through copy editing.
6. Retain a copy of your corrected proof in the event that the original is lost or delayed in the mail.

We would also invite you to submit high-quality, color photographs or colorful diagrams of models pertaining to your manuscript which may serve as a cover illustration for our journal. Photos should be formatted vertically with 5½ x 7 inch dimensions. Please include a caption for your figure. Thank you in advance for your cooperation.

Sincerely,



Donald J. Tindall, Ph.D.  
Co-Editor-in-Chief



Ronald W. Lewis, M.D.  
Co-Editor-in-Chief

DJT/RWL:drl  
Enclosure

#### Editorial Office

Department of Urology Research • Guggenheim 1711 • Mayo Clinic • 200 First Street SW • Rochester, MN 55905  
Tel: 507 254 2323 • Fax: 507 254 2324 • E-mail: ASA@MAYO.EDU

# DIFFERENTIAL METHYLATION IN STEROID 5 $\alpha$ -REDUCTASE ISOZYME GENES IN EPIDYDIMIS, TESTIS AND LIVER OF THE ADULT RAT

Elsa M. Reyes, Ignacio Camacho-Arroyo, Gabriel Nava<sup>1</sup> and Marco A. Cerbón

Facultad de Química and <sup>1</sup>Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Short running head: Methylation of steroid 5 $\alpha$ -reductase genes

Address correspondence to:

Marco A. Cerbón. M.D., Ph.D.

Departamento de Biología,

Facultad de Química.

Ciudad Universitaria,

Coyoacán 04510, México D.F.

MEXICO

Tel: 525 6 22 30 98.

Fax: 525 6 16 20 10.

E-mail: macer@servidor.unam.mx

This study was supported by a grant of Facultad de Química , UNAM.

## **ABSTRACT:**

DNA methylation has been largely involved in the regulation of tissue-specific gene expression. The aim of the study was to determine the methylation pattern of steroid 5 $\alpha$  reductase genes 1 and 2 in two reproductive tissues (testis and epididymis) and a nonreproductive one (liver) which exhibit different content of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes. These isozymes induce the bioconversion of testosterone to dihydrotestosterone which in mammals is a key molecule for external genitalia development. Genomic DNA from the testis, the epididymis and the liver from normal adult rats was used to determine cytosine and adenine methylation pattern of steroid 5 $\alpha$ -reductase genes 1 and 2 by RFLP analysis using restriction enzymes sensitive to adenine (Mbo I and Sau3A I) and cytosine (Hpa II and Msp I) methylation. We also evaluated the expression of both steroid 5 $\alpha$ -reductase genes by Northern blot. When genomic DNA was digested with Hpa II or Msp I, we found that steroid 5 $\alpha$ -reductase gene 2 was less cytosine methylated in the epididymis and in the testis than in the liver. In contrast when genomic DNA was digested with Mbo I or Sau3A I, we observed that gene 2 was more adenine methylated in the epididymis and in the testis than in the liver. 5 $\alpha$ -reductase gene 1 presented the same adenine and cytosine methylation pattern in the studied tissues. We also found a differential expression of steroid 5 $\alpha$ -reductase genes. Gene 2 was expressed both in the testis and the epididymis, but not in the liver, whereas gene 1 was only expressed in the latter. Our results suggest that the differential methylation pattern in 5 $\alpha$ -reductase gene 2 in reproductive and nonreproductive tissues should be involved in the regulation of its expression.

**Keys Words:** gene methylation, gene expression, androgens, dihydrotestosterone, eukaryotic adenine methylation.

## INTRODUCTION

The enzyme steroid 5 $\alpha$ -reductase catalyses the NADPH-dependent reduction of a variety of steroids containing 3-keto  $\Delta^{4,5}$  double bond. The enzyme participates in the transformation of testosterone into dihydrotestosterone, the most potent androgen responsible for differentiation of male external genitalia and prostate (Wilson, 1975). Two steroid 5 $\alpha$ -reductase genes have been cloned. These genes encode different isozymes (types 1 and 2) which present different biochemical and pharmacological properties (Andersson et al, 1991). Intraspecies and interspecies comparisons between these enzymes show moderate homologies which suggest different structure, function and regulation.

In most male reproductive tissues type 2 isozyme is more abundant than type 1, whereas the latter predominates in nonreproductive tissues (Normington and Russell, 1992). Gene expression of steroid 5 $\alpha$ -reductase is up-regulated by androgens in tissues such as the prostate (George et al, 1991), nevertheless the molecular mechanisms involved in steroid 5 $\alpha$ -reductase gene regulation by androgens are not completely understood (Normington and Russell, 1992).

One of the main recognized mechanism of gene expression regulation probably related to the differential 5 $\alpha$  reductase expression is gene methylation. DNA methylation is a widely distributed process in eukaryotic and prokaryotic cells. Through this mechanism, gene transcription can be regulated and DNA can be modified to prevent its degradation (Christophe and Pichon, 1994; Muiznieks and Doerfler, 1994). DNA is methylated at 5-position of cytosines in several animal species. In vertebrates CpG sequences have a methylation pattern that is gene and tissue-specific (Vanyushin et al, 1970; Szyf, 1991). In fibroblast cell lines heavily methylated genes are not expressed, however when different copies of these unmethylated genes are introduced into the same cell type they become transcriptionally active (Boyes and Bird, 1992).

Indirect evidence based on restriction analysis suggests that adenine methylation is present in plant and animal genomic DNAs (Pintor-Toro, 1987; Kay et al, 1994). N<sup>6</sup>-Adenosine methyltransferase has been characterized in HeLa cells (Bokaret et al, 1994). Different in vitro studies have demonstrated that adenine methylation acts by increasing the transcription rate of most plant promoters (Dolferus

et al, 1994; Torres et al, 1993). It has been suggested that adenine methylation modifies DNA conformation and the affinity of transcription factors to critical promoter sites (Graham and Larkin, 1995).

In this study we determined the methylation pattern of steroid 5 $\alpha$ -reductase isozyme genes both in reproductive and nonreproductive tissues which present a different steroid 5 $\alpha$ -reductase isozyme content by using RFLP with restriction enzymes that possess differential ability to cut methylated cytosines and adenines. We also assessed steroid 5 $\alpha$ -reductase gene expression by Northern blot.

## **METHODS**

### **Animals**

Adult male Wistar rats (250-300 g) were maintained in a 12:12 light-dark cycle with water and food ad libitum. All animals were deeply anesthetized with ketamine (Rhône Merieux, Quéretaro, Mexico) and killed by decapitation. Testis, epididymis and liver were quickly removed at 4°C and immediately processed for total RNA and DNA preparation.

### **Genomic DNA Preparation**

DNA was prepared from frozen tissues. In brief, each tissue was powdered and resuspended in lysis buffer (10 mM Tris·HCl, pH 7.4, 0.1 M EDTA, 20  $\mu$ g/ml pancreatic RNAase, 0.5% SDS). After 1 hour of incubation at 37°C the lysates were incubated with proteinase K (100  $\mu$ g/ml) at 37°C overnight. Proteins were removed by three extractions with a mixture of buffered phenol/chloroform/isoamyl alcohol (50:49:1) and a final extraction with chloroform/isoamyl alcohol (49:1). The aqueous phase was adjusted to 0.5 M ammonium acetate and precipitated by the addition of 2.5 vol. absolute alcohol. DNA concentration was determined by absorbance measurement at 260 nm, and its integrity was verified by electrophoresis on 0.3% agarose gels in 0.5X TBE buffer (0.045 M Tris-borate, pH 8.0, 1 mM EDTA).

### **Southern blot**

Total DNA (15  $\mu$ g) was digested with 6 U/ $\mu$ g of the following enzymes: Mbo I, Sau3A I, Hpa II, or Msp I (all enzymes were purchased from Promega, WI) using the

buffers described by the supplier. DNA was then separated by electrophoresis on 0.8% agarose gels in 0.5X TBE buffer at 30 V for 12 h. DNA was transferred to Gene Screen membranes (New England Nuclear Corp., Boston, USA) in 10X SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M sodium citrate, pH 7.0), washed with 6X SSC buffer for 3 min and heated at 80°C for 2 h under vacuum. Membranes were prehybridized overnight in 1X Denhart's solution (1% bovine serum albumin, 1% polyvinylpyrrolidone, 1% Ficoll 400) which contained 50% formamide, 0.2% SDS, 10 mM EDTA, 120 mM phosphate buffer and 50 µg/ml denatured DNA salmon sperm. Hybridization was performed in prehybridization solution (0.1 ml/ cm<sup>2</sup>) with rat 5α-reductase cDNA gene 1 which was labeled by the random primer method (Feinberg and Vogelstein, 1983) with <sup>32</sup>P-dCTP (specific activity 1-2 x 10<sup>8</sup> cpm/µg of DNA). After hybridization, membranes were washed with 2X SSC at room temperature, followed by two washes under high stringency conditions (0.1 X SSC, 0.1% SDS at 60 °C). Membranes were then exposed to a Kodak X-AR film for 24 h at -70°C. After film exposure, membranes were stripped and rehybridized with 5α-reductase rat cDNA gene 2 under the above described conditions.

### **Isolation of total RNA**

Total RNA was obtained from each tissue with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction (Chomczynski and Sacchi, 1987) using Trizol reagent (Gibco-BRL Inc. Gaithersburg, MD, USA). RNA concentration was determined by absorbance measurement at 260 nm. Its integrity was verified by electrophoresis on 1.1% denaturing agarose gels in presence of 2.2 M formaldehyde.

### **Northern Blot Analysis**

RNA samples were size-fractionated by electrophoresis on 1.1% agarose gels containing 2.2 M formaldehyde and then transferred to Gene Screen membranes which were hybridized with [<sup>32</sup>P]dCTP labeled 5α-reductase cDNA gene 1 as described above. Membranes were stripped by high stringency washing, and rehybridized with labeled 5α-reductase cDNA gene 2.

## RESULTS

In order to determine whether steroid 5 $\alpha$ -reductase gene isoforms, type 1 and 2, present different methylation pattern, we digested total genomic DNA from the testis, the epididymis and the liver with restriction endonucleases sensitive to cytosine and adenine methylation followed by Southern blot by using specific cDNA probes for each gene. Figures 1A and 1B show ethidium bromide stained gels from total DNA digested with enzymes sensitive (HpaII and Mbo I) and non-sensitive (Msp I and Sau3A I) to cytosine and adenine methylation respectively. As shown in all cases the digestion of the DNAs used for Southern blot analysis was complete.

Southern blot analysis of steroid 5 $\alpha$ -reductase gene 1 showed a similar cytosine methylation pattern in all tissues (Figure 2A). In contrast, steroid 5 $\alpha$ -reductase gene 2 from the same samples exhibited a clear different cytosine methylation pattern. Both in the testis and the epididymis this gene was less methylated than it was in the liver (Figure 2B).

As in the case of cytosine methylation, steroid 5 $\alpha$ -reductase gene 1 presented a similar adenine methylation pattern in the studied tissues (Figure 3A), whereas a differential adenine methylation pattern was observed in steroid 5 $\alpha$ -reductase gene 2 which was more methylated in the testis and in the epididymis than in the liver (Figure 3B).

The expression of steroid 5 $\alpha$ -reductase genes 1 and 2 was assessed by Northern blot technique. We observed that steroid 5 $\alpha$ -reductase gene 1 was only expressed in the liver, whereas gene 2 was expressed both in the testis and in the epididymis but not in the liver. The highest gene 2 expression was detected in the epididymis (Figure 4A and 4B).

## DISCUSSION

This study demonstrates a differential cytosine and adenine methylation pattern in steroid 5 $\alpha$ -reductase gene 2 in reproductive and nonreproductive tissues which are sensitive to androgen action (Shan et al, 1990; Supakar et al, 1995).

Methylation in cytosines represents a mechanism for the regulation of gene expression in vertebrates (Meehan et al, 1992; Cedar and Razin, 1990). It has been demonstrated that estrogen receptor gene presents cytosine methylation in human breast cancer cell lines (Ottaviano et al, 1994). This methylation process inhibits the transcriptional activity of this receptor. In other genes such as chorionic gonadotropin, despite the almost identical sequences and close chromosomal proximity of the six genes of the chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit multigene family they present a different methylation pattern within the same and different cell types which is related to their expression (Campain et al, 1993). In steroid  $5\alpha$ -reductase gene 2 cytosine methylation could be related to the inhibition of its expression.

We also explored the presence of adenine methylation in steroid  $5\alpha$ -reductase genes. We found that gene 2 was more methylated in the testis and in the epididymis than in the liver, whereas gene 1 exhibited the same adenine methylation pattern in the studied tissues. Adenine methylation may contribute to the expression of this gene. It has been reported that dam methylation of the steroid hormone responsive elements of target genes increases the affinity for their cognate receptors (Truss et al, 1992).

These data raise the possibility that 6-methyladenine could play a role *in vivo* in eukaryotic regulation of gene expression and support the hypothesis that 5-methylcytosine participates in the regulation of tissue-specific gene expression (Szyf, 1991). The relation between methylation of steroid  $5\alpha$ -reductase gene 2 and the mechanisms involved in its expression requires further research.

In contrast to the differential methylation pattern observed both in cytosines and adenines in steroid  $5\alpha$ -reductase gene 2, we found that gene 1 presents the same cytosine and adenine methylation pattern in the studied tissues. It is possible that apart from methylation, other tissue specific factors are involved in the regulation of gene 1 expression since it is only expressed in nonreproductive tissues such as the liver. Differences in tissue distribution and expression pattern of steroid  $5\alpha$ -reductase gene isozymes have been related to their role.  $5\alpha$ -reductase type 2 is preferentially expressed in male reproductive tissues where it plays a key role in sex differentiation.

In this study we observed a high expression of this enzyme in the epididymis and a lower one in the testis. Although this last tissue is very active in the conversion of testosterone to dihydrotestosterone the expression of 5 $\alpha$  reductase 2 that we detected was low due to the fact that only Leydig cells contain this enzyme in the testis (Wilson et al, 1993), and we studied an homogenate of this tissue that includes other cell types that do not express 5 $\alpha$  reductase gene 2 (figure 4B), whereas in the epididymis both the epithelial cells and the connective tissues derived from the mesenchyme express 5 $\alpha$  reductase gene (Tsuji et al, 1994). In this work we present new molecular evidence which indicates that 5 $\alpha$  reductase gene 2 exhibits a differential cytosine and adenine methylation pattern in reproductive and nonreproductive tissues.

## **Acknowledgments**

The authors thank professor David W. Russell from the Department of Molecular Genetics, The University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas Texas USA, for the revision and comments on the manuscript and for generous supply of the steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes cDNAs used in all experiments. We also thank M. L. A. Flora García-Formentí from CELE, Universidad Autónoma de México for the revision of the English manuscript.

## REFERENCES

- Andersson S, Berman M, Jenkins EP, Russell DW. Deletion of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 1991;354:159-161.
- Bokar JA, Rath-Shambaugh ME, Ludwiczak R, Narayant P, Rottman F. Characterization and partial purification of mRNA N<sup>6</sup>-Adenosine methyltransferase from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem* 1994;26:17697-17704.
- Boyes J, Bird A. Repression of genes by DNA methylation by CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO Journal* 1992;11:327-333.
- Bruchovsky N, Wilson JD. The conversion of testosterone to 5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol-3 one by rat prostate in vivo and vitro. *J Biol Chem* 1968;243:2012-2021.
- Campaign JA, Gutkin DW, Cox GS. Differential DNA methylation of the chorionic gonadotropin  $\beta$ -subunit multigene family. *Mol Endocrinol* 1993;7:1331-1346.
- Cedar H, Razin A. DNA methylation and development. *Biochim Biophys Acta* 1990;1049:1-8.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidin thiocyanate-phenol-chloroform extractions. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
- Christophe D, Pichon B. DNA methylation and gene activity: towards the end of the debate?. *Mol Cell Endocrinol* 1994;100:155-158.
- Dolferus R, Jacobs M, Peacock WJ, Dennis ES. Differential interaction of promoter element in stress response of *Arabidopsis Adh* gene. *Plant Physiol* 1994;105:1075-1087.
- Feinberg A, Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity. *Anal Biochem* 1983;137:6-13

- George FW, Russell DW, Wilson JD. Feed-forward control of prostate growth: dihydrotestosterone induce expression of its own biosynthetic enzyme, steroid 5  $\alpha$ -reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8044-8047.
- Graham MW, Larkin PJ. Adenine methylation at dam sites increases transient gene expression in plant cells. *Trans Res* 1995;4:324-331.
- Kay PH, Pereira E, Marlow SA, Turbett G, Mitchell CA, Jacobsen PF, Holliday R, Papadimitriou JM. Evidence for adenine methylation within the mouse myogenic gene Myo-D1. *Gene* 1994;151:89-95.
- Meehan R, Lewis J, Cross S, Nan XS, Jeppesen P, Bird A. Transcriptional repression by methylation of CpG. *J Cell Sci Suppl* 1992;16:9-14.
- Metcalfe BW, Levy MA, Holt DA. Inhibitors of steroid 5 $\alpha$ -reductase in benign prostatic hyperplasia, male pattern baldness and acne. *Trends Pharmacol Sci* 1989;10:491-495.
- Muiznieks I, Doerfler W. The impact of 5'-CG-3' methylation on the activity of different eukaryotic promoters: a comparative study. *FEBS Lett* 1994;344:251-254.
- Normington K, Russell DW. Tissue distribution and kinetic characteristic of rat steroid 5  $\alpha$ -reductase isozymes. *J Biol Chem* 1992;267:19548-19554.
- Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, Davidson NE. Methylation of estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1994;54:2552-2555.
- Pintor-Toro JA. Adenine methylation in zein genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;147:1082-1087
- Shan L, Rodriguez MC, Jänne OA. Regulation of androgen receptor protein and mRNA concentrations by androgens in rat ventral prostate and seminal vesicles and in human hepatoma cells. *Mol Endocrinol* 1990;4:1636-1646.

- Supakar PC, Jung MH, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. Nuclear factor kB functions as a negative regulator for the rat androgen receptor gene and NF-kB activity increases during the age-dependent desensitization of the liver. *J Biol Chem* 1995;270:837-842.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-517.
- Szyf M. DNA Methylation patterns: an additional level of information?. *Biochem Cell Biol* 1991;69:764-767.
- Torres JT, Block A, Hahlbrook K, Somssich IE. Influence of bacterial strain genotype on transient expression of plasmid DNA in plant protoplast. *Plant J* 1993;4:587-592.
- Truss M, Bartsch J, Chalepakis G, Beato M. Artificial steroid hormone response element generated by dam-methylation. *Nucleic Acids Res* 1992;20:1483-1486.
- Tsuji M, Shima H, Terada N, Cunha GR. 5 $\alpha$ -reductase activity in developing urogenital tracts of fetal and neonatal male mice. *Endocrinology* 1994;134:2198-2205.
- Vanyushin BF, Tkachera SG, Belozersky AN. Rare bases in animal DNA. *Nature* 1970;225:948-949.
- Wilson JD. Metabolism of testicular androgens. *Handb Physiol* 1975;5:491-508.
- Wilson JD, Griffin JE, Russell DW. Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. *Endocr Rev* 1993;14:577-592.

**Fig. 1.** Genomic DNA digestion with enzymes sensitive to methylation in reproductive and nonreproductive tissues. DNA from the testis (T), the epididymis (E) and the liver (L) of adult male rats was digested with Hpa II and Msp I (1A), MboI and Sau3A I (1B) as described in Materials and Methods. Electrophoresis was performed on 0.8% agarose gels in 0.5X TBE buffer at 30V for 12 h and stained with ethidium bromide. Lambda DNA digested with Hind III was used as a molecular weight marker (Mw).

**Fig. 2.** Representative Southern blot of 5 $\alpha$ -reductase genes 1 and 2 digested with enzymes sensitive to cytosine methylation. Genomic DNA from the testis (T), the epididymis (E) and the liver (L) was digested with HpaII and MspI, and hybridized with the labeled cDNA probe of gene 1 (2A) Membranes were stripped by high stringency washing and rehybridized with labeled 5 $\alpha$ -reductase cDNA gene 2 (2B) as described in Materials and Methods. The arrow indicates the main difference in RFLP pattern after digestion with Hpa II in gene 2 (2B) .

**Fig. 3.** Representative Southern blot of 5 $\alpha$ -reductase genes 1 and 2 digested with enzymes sensitive to adenine methylation. Genomic DNA from the testis (T), the epididymis (E) and the liver (L) was digested with Mbo I and Sau3A I, and hybridized with the labeled cDNA probe of gene 1 (3A). Membranes were stripped by high stringency washing and rehybridized with labeled 5 $\alpha$ -reductase cDNA gene 2 (3B) as described in figure 2. Arrows indicate the main differences in RFLP pattern after digestion with Mbo I in gene 2 (3B).

**Fig. 4.** Representative Northern blot of 5 $\alpha$ -reductase genes 1 and 2 in reproductive and nonreproductive tissues. Total RNA from the testis (T), the epididymis (E) and the liver (L) was size-fractionated on formaldehyde denaturant agarose gels, transferred to Gene Screen membranes, and hybridized with [ $\alpha$ <sup>32</sup>-P]dCTP labeled 5 $\alpha$ -reductase cDNA gene 1 (4A). Membranes were stripped by high stringency washing and rehybridized with labeled 5 $\alpha$ -reductase cDNA gene 2 (4B) as previously described. Arrows indicate the main 5 $\alpha$ -reductase genes 1 and 2 transcripts.