

Bioquimia

Volumen 29
Volume

Número 2
Number

Abril- Junio 2004
April-June

Artículo:

Etilnitrosourea causa subexpresión de la subunidad de 7.6 kDa de la ARN polimerasa II en ovocitos fetales de ratón y disminuye los niveles generales de transcripción

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*

Etilnitrosourea causa subexpresión de la subunidad de 7.6 kDa de la ARN polimerasa II en ovocitos fetales de ratón y disminuye los niveles generales de transcripción

Edmundo Bonilla,* Jesús del Mazo**

RESUMEN

Etilnitrosourea (ENU) es un agente alquilante que causa anomalías congénitas en los fetos cuando se administra a hembras gestantes. Se ha determinado que ENU es capaz de inducir apoptosis y detener el crecimiento de órganos y tejidos fetales inmediatamente después de ser administrado. Aunque las propiedades mutagénicas de ENU son bien conocidas, poco se conoce acerca de sus efectos a nivel de la transcripción celular. En el presente estudio se evaluó el efecto de este agente en la sobrevivencia de ovocitos fetales de ratón cultivados *in vitro*, y se analizaron sus alteraciones en la expresión génica. Una concentración de 1 mM de ENU disminuyó la sobrevivencia de los ovocitos en cultivo al 70% después de 24 h de exposición. El ARNm de los ovocitos control y tratados con ENU fue retrotranscrito, se elongaron los extremos 3' del ADNc generado con residuos de desoxiadenosina, y éste fue amplificado mediante PCR. La cantidad de ADNc formado a partir de 10 ovocitos tratados con ENU fue, en promedio, 5 veces menor a la formada a partir del mismo número de ovocitos control. El análisis diferencial de la expresión génica a partir de 6,000 clones mostró un solo clon correspondiente con un gen subexpresado en los ovocitos tratados con ENU. Este resultado fue confirmado mediante Southern blot, y el clon fue secuenciado e identificado como la subunidad de 7.6 kDa de la ARN polimerasa II. Se concluye que ENU disminuye los niveles generales de transcripción de los ovocitos expuestos, probablemente debido a la subexpresión de la subunidad de 7.6 kDa de la ARN polimerasa II.

Palabras clave: Etilnitrosourea, transcripción, ARN polimerasa II.

ABSTRACT

Ethyl nitrosourea (ENU), an alkylating agent, induces congenital anomalies in fetuses when it is administered to pregnant animals. It has been reported that ENU induced apoptosis and growth arrest in fetal tissues and organs immediately after its administration to pregnant rats. The mutagenic properties of ENU are well documented, but less is known about its effects on transcription. In the present study we have evaluated the effect of ENU on the viability and gene expression in fetal oocytes cultured in vitro. Results show that oocyte survival decreased significantly to 70% after 24 h exposure to 1 mM ENU. mRNA from control oocytes and oocytes exposed to 1mM ENU was reverse transcribed. Then, the 3' end of first-strand cDNA was elongated with deoxyadenosine residues, and cDNA was PCR amplified. In average, the amount of cDNA generated from 10 ENU oocytes was five times lower than that generated from the same number of control oocytes. Differential screenings were performed to monitor altered expression of genes in ENU exposed oocytes. Confirmation of the identity of clones corresponding to deregulated genes was obtained by Southern blot. After screening 6,000 clones, only one was found to be clearly down regulated in oocytes exposed to ENU: the 7.6-kDa subunit of RNA polymerase II. We conclude that ENU diminishes RNA expression levels in oocytes exposed to this agent, probably due to down-regulation of the 7.6-kDa subunit of RNA polymerase II.

Key words: Ethyl nitrosourea, transcription, RNA polymerase II.

* Profesor Titular del Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

** Investigador en el Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España.

Correspondencia:

Dr. Edmundo Bonilla González

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Departamento de Ciencias de la Salud

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina C.P. 09340, México DF. Fax: 58 04 47 27 e-mail: mundo@xanum.uam.mx

Este trabajo contó con el apoyo de DGICYT (PB95-0119), EU (PL 960183) y CAM (07B/0022/1997). E. Bonilla contó con el apoyo de CONACYT (México) y AEI-Mutis (España) para la realización de estudios de doctorado en el CIB, Madrid, España.

Recibido: 27-11-2003

Aceptado: 23-05-2004

INTRODUCCIÓN

Etilnitrosourea (ENU) es un potente agente mutagénico para un gran número de células somáticas y germinales de diferentes especies. Es capaz de causar etilación de cualquier átomo de oxígeno y nitrógeno del ADN, produciendo una gran cantidad de alquilfosfotriésteres.¹

ENU es también un teratógeno. En estudios toxicológicos *in vivo*, utilizando como modelos al ratón y la rata, se ha determinado que tiene la capacidad de causar anomalías en el sistema nervioso central, tejidos craneofaciales, así como en órganos reproductores, como consecuencia de una disminución de la proliferación celular y a un aumento en muerte celular por apoptosis.^{2,3}

Estudios *in vitro*, al igual que los estudios *in vivo*, muestran que ENU afecta la proliferación celular, causa apoptosis y aumenta la frecuencia de mutaciones en células germinales primordiales, y en líneas celulares linfoblastoides, entre otras.^{4,6}

Aunque las propiedades mutagénicas y teratogénicas de ENU, así como sus efectos en la proliferación y viabilidad celulares han sido estudiadas en profundidad, poco se conoce acerca de los efectos de este agente a nivel de la transcripción celular. Para obtener mayor información al respecto, en el presente estudio se evaluó el efecto de ENU en la sobrevivencia de ovocitos fetales de ratón cultivados *in vitro*, y se analizaron los niveles de transcripción general y los cambios en la expresión génica en los ovocitos expuestos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ovocitos fetales de ratón fueron cultivados de acuerdo con la metodología descrita.^{7,8} Brevemente, los ovarios de embriones de ratones hembra de 17 días postcoito se sembraron en medio Waymouth (Gibco-Brl, Alemania) suplementado con sueros fetales de bovino y de caballo (2.5 y 5%, respectivamente) y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. En el día 6 de cultivo, cuando los ovocitos alcanzaron un diámetro de aproximadamente 70 µm y se apreciaba claramente la zona pelúcida y la vesícula germinal, los cultivos fueron tratados con diferentes dosis de ENU (Sigma Chemical Co., EUA): 250, 500 y 1,000 µM por 24 h, y durante los siguientes 15 días se evaluó la sobrevivencia de los ovocitos (denominados ovocitos tratados), contando el número de éstos por placa. Otros cultivos no fueron tratados con ENU. Los ovocitos que se desarrollaron en estos cultivos se denominaron ovocitos control.

En base a los resultados del efecto de ENU en los cultivos de ovocitos, se seleccionó la dosis de 1 mM para tratar a los ovocitos con los que se generaría y amplificaría el ADN complementario (ADNc) que sería utilizado para realizar el análisis de los niveles de transcripción general, así como los análisis diferenciales que nos permitieran la identificación de algunos genes desregulados por efecto de ENU.

Dadas las limitaciones existentes para obtener ovocitos cultivados *in vitro* partiendo de ovarios fetales, la generación y amplificación del ADNc se desarrolló con una metodología que permite trabajar con un bajo número de células (10 células son suficientes).⁹ Brevemente, el ARN mensajero (ARNm) de 10 ovocitos fue retrotranscrito a 37°C durante 15 min utilizando un oligo(dT)₁₅ (Promega, EUA) y la enzima Superscript II (Gibco-Brl, Alemania). Para poder amplificar el ADNc generado, los extremos 3' de la primera cadena se extendieron con residuos de desoxiadensina utilizando la desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT; Roche, Alemania) a 37°C durante 15 min en presencia de dATP (Promega, EUA). La amplificación de las cadenas de ADNc con extensiones de poli(dA) se realizó por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la ADN polimerasa Amplitaq (Perkin Elmer, EUA) y un oligo (dT) con una diana de reconocimiento de la enzima *EcoRI*. Las condiciones utilizadas para la reacción de PCR fueron: desnaturalización inicial a 96°C durante 10 min; 25 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 1 min, anillamiento del oligo (dT) a 42°C durante 2 min, extensión a 72°C durante 6 min (con un incremento de 10 s en cada ciclo); y extensión final a 72°C durante 5 min. A continuación, se añadieron 10 U más de Amplitaq, y se realizó una segunda reacción de PCR, con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 96°C durante 10 min; 25 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 1 min, anillamiento a 42°C durante 2 min, extensión a 72°C durante 6 min; y extensión final a 72°C durante 30 min.

Los niveles de transcripción general en los ovocitos control y tratados fueron analizados mediante la cuantificación espectrofotométrica del ADNc generado, así como mediante el corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% en amortiguador TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8) de 10 µL de los productos obtenidos por PCR.¹⁰

Para poder realizar el análisis diferencial de la expresión génica, se generó una genoteca de expresión utilizando el ADNc de los ovocitos control. El ADNc se purificó utilizando el estuche para purificación de productos de PCR (Boehringer, EUA), siguiendo las

recomendaciones del proveedor. El ADNc fue digerido con 40 U de *EcoRI* (Promega, EUA) a 37°C durante 4 h. El ADNc se ligó a los brazos del vector ZAP-Express (Stratagene, EUA) previamente digerido con *EcoRI* con la T4 ADN ligasa a 12°C durante 12 h. La genoteca fue empaquetada con el sistema Gigapack III (Stratagene, EUA), según las condiciones especificadas por el proveedor. A continuación, 2,000 fagos de la genoteca generada se incubaron con bacterias XL1-Blue (Stratagene, EUA) sobre cajas con medio de cultivo LB-Agar¹⁰ a 37°C durante 12 h, hasta que se formaron claramente los halos de lisis que indicaban la replicación de los fagos. Éstos fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa por duplicado y una de las réplicas se incubó con una sonda radiactiva de ADNcs procedente de ovocitos control, mientras que la otra se incubó con una sonda radiactiva de ADNcs de ovocitos tratados con ENU. Fueron seleccionados aquellos clones que mostraron señal con la sonda de ovocitos control, pero no con la sonda de ovocitos tratados (pudiendo indicar una disminución de su expresión debida al tratamiento), así como los clones que no mostraron señal con la sonda de ovocitos control, pero sí con la de ovocitos tratados (pudiendo indicar un aumento de su expresión debida al tratamiento).

Los resultados del primer análisis diferencial fueron confirmados mediante Southern blot: los fagos correspondientes a ADNcs en los que se observó diferencia en señal se aislaron, sus insertos se amplificaron por PCR (desnaturalización inicial a 96°C durante 5 min; 25 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 30 s, anillamiento de los oligonucleótidos P y RP que flanquean al inserto a 60°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 1 min; extensión final a 72°C 10 min), fueron separados en geles de agarosa al 1% en TBE por duplicado, y transferidos a filtros de nylon para un segundo análisis, en el que fueron nuevamente incubados con las respectivas sondas radiactivas de ADNcs de ovocitos control o tratados con ENU. Los insertos de los clones de interés fueron secuenciados por el método de los terminadores de cadena por didesoxinucleótidos¹¹ en un secuenciador automático fluorescente (Perkin Elmer, EUA) y comparados con las bases de datos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) y GeneBank para su identificación. El tamaño del inserto secuenciado fue de 578 pares de bases.

El análisis estadístico de los valores de sobrevivencia de los ovocitos, así como el de los niveles de transcripción generales, se llevó a cabo mediante la prueba U de Mann-Whitney con el programa SAS (SAS Insti-

tute, EUA). La significancia estadística se estableció con un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

El efecto de ENU en la sobrevivencia de los ovocitos fetales en cultivo se observa en la *figura 1*. La sobrevivencia de los ovocitos tratados con una concentración de 250 μ M de ENU no fue significativamente afectada. Sin embargo, la concentración de 1 mM tuvo un efecto significativo a partir de 24 h de exposición de los ovocitos al agente.

El ARNm de 10 ovocitos control o tratados con 1mM de ENU durante 24 h fue retrotranscrito y amplificado por PCR. El análisis electroforético de alícuotas de 10 μ L de los productos de PCR mostró una estela de ADNc entre los 400 y 800 pb (*Figura 2*). Se observa que la cantidad de ADNc generado a partir de los ovocitos tratados con ENU es considerablemente menor que la producida a partir de ovocitos sin tratamiento. La cuantificación del ADNc generado a partir de ovocitos control mostró un valor promedio de $240 \pm 27 \mu$ g, en tanto que en los ovocitos tratados con ENU este valor fue de $46 \pm 13 \mu$ g, valores obtenidos a partir de tres experimentos independientes, que indican que la transcripción general en los ovocitos expuestos al agente se encuentra disminuida.

El análisis de 6,000 clones mostró un solo clon correspondiente con un gen subexpresado en los ovocitos tratados con ENU. Este resultado fue confirmado mediante Southern blot (*Figura 3*), y el clon fue se-

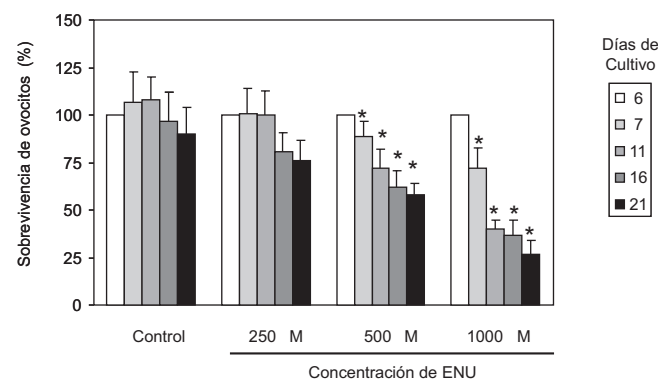


Figura 1. Efecto de ENU en la sobrevivencia de ovocitos fetales *in vitro*. En el día 6 de cultivo, los ovocitos se expusieron durante 24 h a diferentes dosis de ENU, y la sobrevivencia se evaluó en los días 7, 11, 16 y 21 de cultivo. Los valores representan los promedios \pm DE (barras) de 3 experimentos independientes. *Diferencia con respecto al control prueba U de Mann-Whitney, $p < 0.05$.

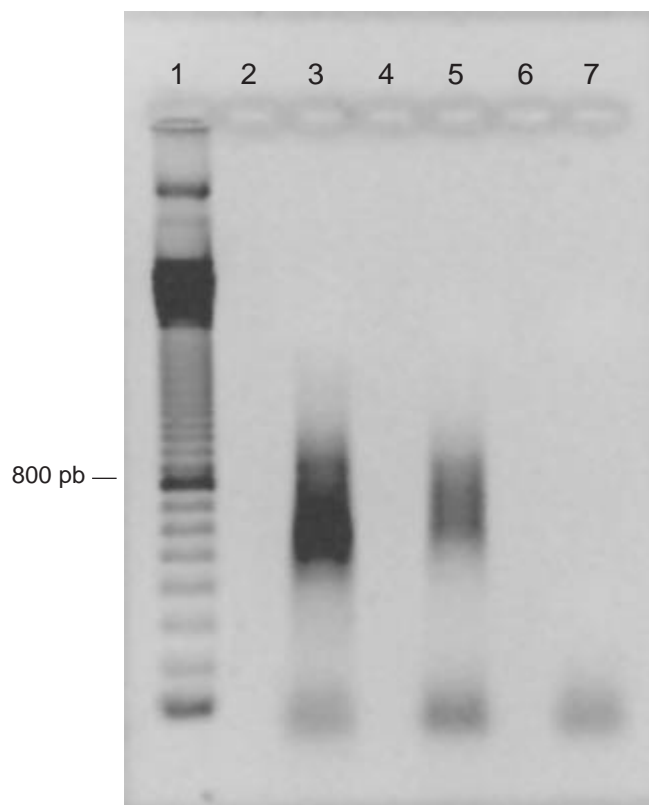


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de alícuotas de ADNc de ovocitos de ratón tras su síntesis y amplificación. Carril 1: Marcador de pares de bases (pb). Carril 3: ADNc de ovocitos sin tratamiento. Carril 5: ADNc de ovocitos tratados con ENU. Carril 7: Control negativo (se omitió la transcriptasa reversa en la reacción).

cuenciado e identificado como la subunidad de 7.6 kDa de la ARN polimerasa II (acceso EMBL AA208928), con el que mostró 98% de homología en 380 bases.

DISCUSIÓN

La citotoxicidad que ENU mostró hacia los ovocitos fetales de ratón en cultivo fue menor que la que han mostrado algunos otros agentes, como es el anti-neoplásico doxorrubicina, con el que a partir de una dosis mil veces menor ($1 \mu\text{M}$) se obtuvo una disminución en la sobrevivencia de los ovocitos al 50% después de 24 h de exposición.⁹ Sin embargo, ENU mostró un efecto sobre los niveles de transcripción general de los ovocitos que no fue observado con doxorrubicina⁹ o con el plastificador monoetil-hexil-ftalato (manuscrito en preparación).

Para obtener información acerca de los mecanismos moleculares del daño causado por ENU, se rea-

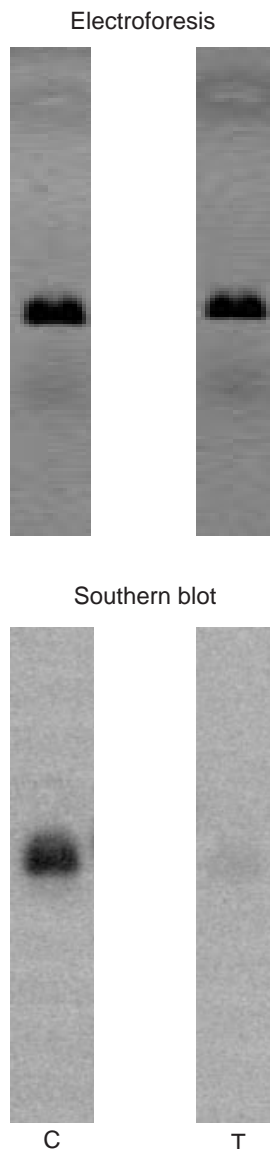


Figura 3. Análisis diferencial de la expresión génica. Un clon cuyo inserto presentó un gen diferencialmente expresado en ovocitos tratados con ENU en el primer análisis diferencial se amplificó mediante PCR, se separó por electroforesis y se transfirió a membranas de nylon por duplicado. Una membrana se incubó con una sonda de ADNc de ovocitos Control (C), y la otra con una sonda de ADNc de ovocitos tratados con ENU (T).

lizaron análisis diferenciales de la expresión génica a partir de 6,000 clones provenientes de una genoteca de ADNc de ovocitos fetales de ratón, y se determinó que ENU causa subexpresión del gen que codifica para la subunidad de 7.6 kDa de la ARN polimerasa II, enzima responsable de la síntesis de ARNm en los eucariontes. Este resultado podría justificar que los niveles de transcripción generales se encuentren disminuidos en los ovocitos tratados con ENU, ya que la subexpresión de una subunidad de la ARN polimerasa II necesariamente afectaría la eficiencia transcripcional del ovocito, aunque por supuesto se requieren estudios adicionales para confirmarlo.

Estudios previos han mostrado el efecto de ENU en la expresión específica de ciertos genes. Katayama y cols. (2002)¹² realizaron un estudio con ratas preñadas a las que se les administró ENU en el día 13 de gestación, en el que determinaron que la expresión de p53, así como la de sus genes blanco p21, bax, ciclina G1 y fas, aumentó significativamente en las células neuroepiteliales fetales 6 horas después del tratamiento. A continuación se observó arresto en el ciclo celular y apoptosis, lo que sugiere que ENU puede inducir estos eventos celulares en el sistema nervioso central fetal a través de la regulación de p53 y sus genes blanco. El mismo efecto fue observado en las células germinales primordiales de las ratas fetales después de estar expuestas a ENU.¹³ En el presente estudio, se observó el efecto de ENU en la expresión génica de la subunidad de 7.6 kDa de la ARN polimerasa II, lo que claramente muestra que ENU presenta, además de sus conocidos efectos mutagénicos que son hoy en día ampliamente utilizados para el esclarecimiento de la función de varios genes, efectos específicos sobre la transcripción génica.

Será muy interesante determinar los mecanismos moleculares a través de los cuales este agente modula la expresión génica. Lo más probable es un efecto mutagénico sobre las regiones reguladoras proximales (promotores) o distales (*enhancers*), que afectaría la unión de factores de transcripción, y por tanto la expresión de los genes que regulan. Sin embargo, no debe descartarse un efecto directo sobre las proteínas, en este caso sobre los propios factores de transcripción, dado que ENU puede causar la alquilación no sólo de ácidos nucleicos, sino también de proteínas.¹⁴

ENU ha sido ampliamente utilizado en investigación debido a sus propiedades mutagénicas. El hecho de que también presente efectos específicos en la transcripción celular abre la posibilidad de utilizar a este agente para estudiar la regulación génica, en especial la que se lleva a cabo durante la muerte celular programada desencadenada por este agente.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los doctores Luis A. López-Fernández y Mario Párraga por su asesoría científica y a Fernando Escolar por su asistencia técnica.

REFERENCIAS

1. Douglas GR, Jiao J, Gingerich JD, Gossen JA, Soper LM. Temporal and molecular characteristics of mutations induced by ethylnitrosourea in germ cells isolated from seminiferous tubules and in spermatozoa of lacZ transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7485-9.
2. Katayama K, Ishigami N, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K. Ethylnitrosourea (ENU)-induced apoptosis in the rat fetal tissues. *Histol Histopathol* 2000; 15: 707-11.
3. Katayama K, Uetsuka K, Ishigami N, Nakayama H, Doi K. Apoptotic cell death and cell proliferative activity in the rat fetal central nervous system from dams administered with ethylnitrosourea (ENU). *Histol Histopathol* 2001; 16: 79-85.
4. Iona S, Klinger FG, Sisti R, Ciccalese R, Nunziata A, De Felici M. A comparative study of cytotoxic effects of N-ethyl-N-nitrosourea, adriamycin, and mono-(2-ethylhexyl) phthalate on mouse primordial germ cells. *Cell Biol Toxicol* 2002; 18: 131-45.
5. Suzuki T, Itoh S, Takemoto N, Yajima N, Miura M, Hayashi M, et al. Ethyl nitrosourea and methyl methanesulfonate mutagenicity in sperm and testicular germ cells of lacZ transgenic mice (muta mouse). *Mutat Res* 1997; 388: 155-63.
6. Bronstein SM, Cochrane JE, Craft TR, Swenberg JA, Skopek TR. Toxicity, mutagenicity, and mutational spectra of N-ethyl-N-nitrosourea in human cell lines with different DNA repair phenotypes. *Cancer Res* 1991; 51: 5188-97.
7. De Felici M, Dolci S. Cellular interactions of mouse fetal germ cells in *in vitro* systems. *Curr Top Dev Biol* 1987; 23: 147-62.
8. Bonilla E, Párraga M, López LA, Escolar F, del Mazo J. Cuantificación de la expresión génica a partir de un número limitado de células mediante RT-PCR en tiempo real. *Bioquímica* 2002; 27: 2-6.
9. Bonilla E, del Mazo J. Deregulation of gene expression in fetal oocytes exposed to doxorubicin. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 1701-7.
10. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
11. Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-67.
12. Katayama K, Ohtsuka R, Takai H, Nakayama H, Doi K. Expression of p53 and its transcriptional target genes mRNAs in the ethylnitrosourea-induced apoptosis and cell cycle arrest in the fetal central nervous system. *Histol Histopathol* 2002; 17: 715-20.
13. Katayama K, Ueno M, Yamauchi H, Nakayama H, Doi K. Ethylnitrosourea-induced apoptosis in primordial germ cells of the rat fetus. *Exp Toxicol Pathol* 2002; 54: 193-6.
14. Shibuya T, Morimoto K. A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. *Mutat Res* 1993; 297: 3-38.

