

LA N6-METILADENINA: UNA POTENCIAL MARCA DE REGULACIÓN EPIGENÉTICA EN EUCARIONTES*

Adrián Rafael Murillo de Ozores, Jesús Rafael Rodríguez-Aguilera

Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. CDMX, México. Ambos autores contribuyeron por igual a la elaboración del presente trabajo. Correo E: jesusr_rodagu@comunidad.unam.mx

RESUMEN

La N6-metiladenina en el ADN (6mA), -la que fue descrita originalmente como un factor de protección para el ADN bacteriano en contra de las enzimas de restricción- recientemente ha cobrado importancia ya que en tres publicaciones en organismos eucariontes que incluyen a la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, al gusano *Caenorhabditis elegans* y al alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, identificaron variaciones en los niveles de esta modificación así como en las enzimas que la establecen y remueven. Dichas variaciones se correlacionan con alteraciones funcionales en estos organismos por lo que la 6mA resurge, ahora en eucariontes, como una potencial marca de regulación epigenética.

ABSTRACT

The modified nucleotide N6-methyladenine in DNA (6mA), -which was described originally as a mechanism of protection for the bacterial DNA against the restriction enzymes- recently it has become important because three reports in eukaryotic organisms, the fruit fly *Drosophila melanogaster*, the worm *Caenorhabditis elegans* and the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, identified variations in the levels of this modification as well as in the enzymes that establish and remove it. These variations correlate with the functional alterations of these three organisms and therefore, the 6mA reappears as a potential epigenetic mark.

PALABRAS

CLAVE:

Metilación del ADN, Epigenética, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Chlamydomonas reinhardtii*.

KEY WORDS:

DNA methylation, Epigenetics, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Chlamydomonas reinhardtii*.

MÁS ALLÁ DE LA GENÉTICA, LA EPIGENÉTICA

Las células de un organismo eucarionte son genéticamente idénticas pero son estructural y funcionalmente heterogéneas debido a que en cada tipo celular se expresan diferentes genes. Estas diferencias pueden surgir durante el desarrollo, la diferenciación celular o en la enfermedad. La regulación de la expresión génica es mediada por tres principales mecanismos que actúan en conjunto: el primero se basa en los factores de transcripción que se unen a secuencias específicas y que regulan a un grupo determinado de genes; el segundo involucra mecanismos de regulación epigenética que ayudan a establecer el estado de diferenciación de una célula y su progenie; el

tercero está relacionado con la organización de la cromatina nuclear.

La regulación epigenética está definida como todos aquellos cambios heredables en la expresión de los genes y en la función del genoma que ocurren sin afectar la secuencia del ADN (1). Dentro de los procesos epigenéticos que más correlacionan con la actividad génica y que se han estudiado mejor, resaltan: la metilación del ADN, las modificaciones post-traduccionales de histonas, los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP y los complejos represor Polycomb y activador Trithorax. Asimismo, en años recientes también se ha observado la acción coordinada de ARNs no-codificantes para proteínas, en la modulación de la estructura de la cromatina.

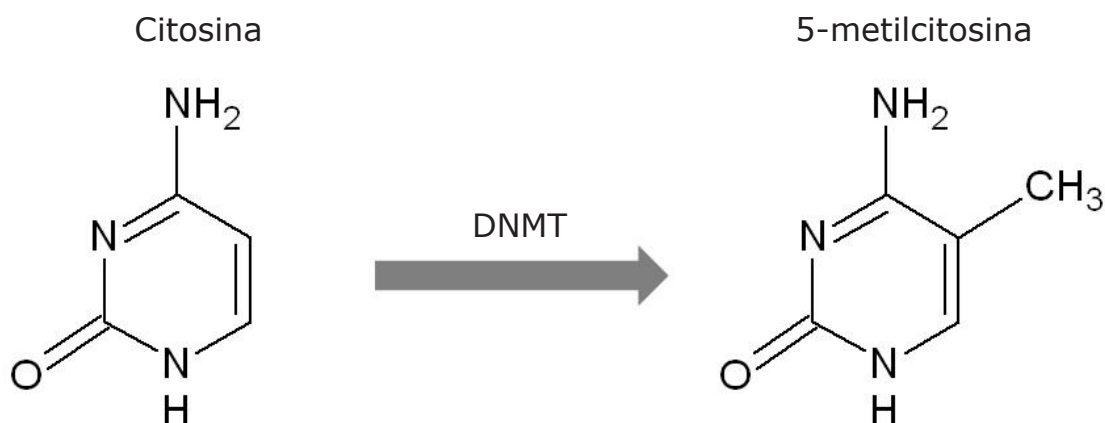


Figura 1. Metilación del ADN en CpGs de eucariontes. La reacción está dada por la actividad enzimática de DNA metiltransferasas (DNMT) (2).

LA METILACIÓN DEL ADN EN EUKARIONTES: LA 5-METILCITOSINA

La 5-metilcitosina (5mC) consiste en la incorporación de un grupo metilo en la posición 5 de la citosina (Fig. 1) (2). Esta modificación del ADN se ha descrito ampliamente en organismos eucariontes y está relacionada con la regulación de varios procesos celulares incluyendo el desarrollo embrionario, la transcripción, la inactivación del cromosoma X, la impronta genómica y la estabilidad cromosómica (1).

La metilación del ADN puede regular la expresión genética por impedimento estérico de los factores de transcripción con sus secuencias blanco, evitando así su activación o mediante el reclutamiento de proteínas que reconocen al ADN metilado, uniendo co-represores que provocan la compactación de la cromatina, principalmente mediante la acción de desacetilasas de histonas (1).

Se ha propuesto que este proceso es dinámico, pues mientras las metiltransferasas de ADN establecen y mantienen la presencia de 5mC, las dioxygenasas de citosina "tet-eleven translocation" (TET) oxidan a la 5mC hacia 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC) las cuales pueden ser removidas por el sistema de reparación de ADN por escisión de bases (BER) para restaurar una citosina sin modificar (3).

LA ADENINA TAMBIÉN PUEDE SER METILADA

La adición de un grupo metilo en la posición 6 de la adenina resulta en la N6-metiladenina (6mA), la cual se ha encontrado en el ADN de virus, bacterias, protistas, hongos y algas. Otra modificación en la adenina ocurre por la metilación en la primera

posición del anillo de purinas (1mA) y que en conjunto con la metilación en la posición 3 del anillo de pirimidina de la citosina (3mC) son consideradas como eventos de daño por metilación en el ADN, ya que impide la correcta formación del puente de hidrógeno con la base complementaria (4).

En bacterias, la 6mA fue inicialmente señalada como componente de los sistemas de restricción/modificación que corresponden a los mecanismos de defensa de estos organismos contra fagos y plásmidos y que les permiten distinguir entre el ADN propio y el del invasor (4). En otras palabras, el ADN del microorganismo con adeninas metiladas, se protege de la digestión de enzimas capaces de cortar en sitios metilados, mientras que el ADN externo al no contar con dicha marca, es cortado por estas enzimas una vez que entra a la célula.

En años recientes, la 6mA ha sido utilizada para identificar los sitios de interacción de proteínas con el genoma eucarionte *in vivo* a través de la tecnología denominada DamID (Fig. 2) (5), la cual es un método basado en la fusión de la proteína de interés con la metiltransferasa de adenina de *Escherichia coli* ("dam", por las siglas en inglés de metiltransferasa de ADN). La expresión de esta proteína de fusión *in vivo* conduce a la metilación de adeninas en el ADN alrededor de los sitios nativos de unión de la proteína a la cual esta fusionada la "dam", lo que permite la identificación de dichos sitios de unión (6).

Aunque se han propuesto ciertas funciones de esta modificación en procariontes, como la replicación y reparación del ADN o la expresión génica, no se ha descrito la función que pudiera desempeñar en eucariontes, o incluso si se encuentra o no en el genoma de algunos de éstos organismos. En

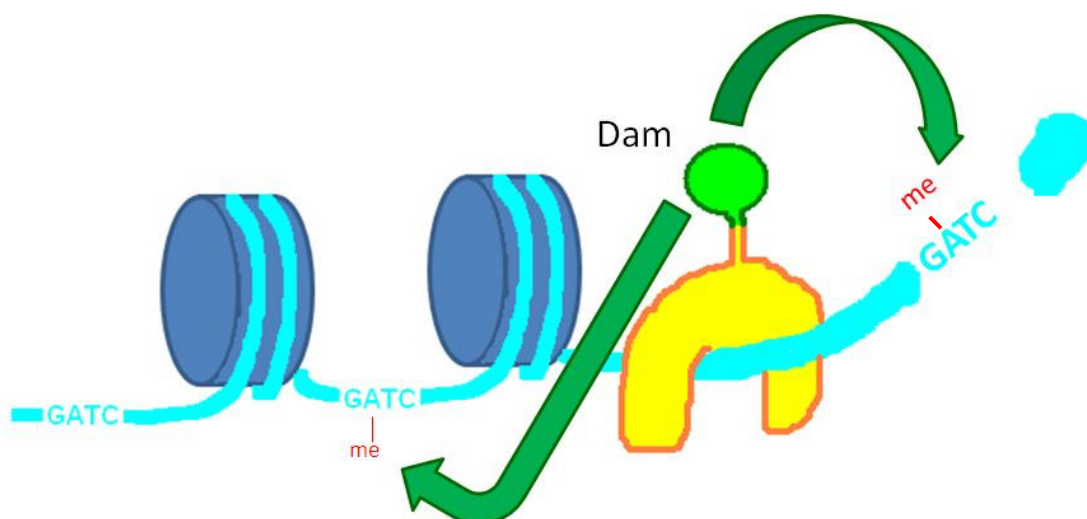


Figura 2. Principio de DamDI. El esquema muestra un fragmento de cromatina (se observa el DNA y dos nucleosomas). La enzima Dam (verde) fusionada con la proteína de interés (amarillo) es reclutada por ésta última a sus sitios de unión nativos en la cromatina lo que resultará en la metilación local de las adeninas la cual funcionará como una etiqueta única en el genoma que podrá detectarse utilizando enzimas de restricción. Modificado de (5).

este sentido, tres estudios recientes publicados en la revista *Cell*, demuestran la 6mA en *Drosophila melanogaster* (7), *Caenorhabditis elegans* (8) y *Chlamydomonas reinhardtii* (9), y aportan información sobre su distribución espacio-temporal y su papel en la biología celular de estos organismos.

La detección precisa de bajas cantidades de 6mA en el genoma de eucariontes fue posible gracias al desarrollo de técnicas más refinadas y sensibles. Dichas técnicas de última generación incluyen a la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo, la inmunoprecipitación de la 6mA seguida de secuenciación masiva y la secuenciación basada en enzimas de restricción o la secuenciación SMRT ("single-molecule real-time"), capaz de distinguir entre bases modificadas (10).

LA 6mA JUEGA UN PAPEL IMPORTANTE EN EL DESARROLLO DE *Drosophila*

Los bajos niveles de 5mC en la mosca de la fruta han sugerido que las diferentes modificaciones post-traduccionales (PTM) de histonas y sus reguladores son los principales determinantes en la configuración tridimensional del genoma de la *Drosophila*. Sin embargo, la reciente descripción de la desmetilación activa del ADN en vertebrados motivó la búsqueda de nuevas modificaciones del ADN, con la premisa de encontrar la desmetilasa responsable de remover esa modificación, abatirla y así poder detectar un aumento en los niveles de dicha modificación.

Chen y sus colaboradores (7) pudieron detectar 6mA en el genoma de embriones de *Drosophila*, mientras que en etapas posteriores del desarrollo no se encontró esta modificación, lo que sugiere un papel importante en el desarrollo temprano de la mosca. También se demostró que la presencia de extractos nucleares puede inducir la desmetilación de la 6mA en el ADN, lo que estableció las bases para la búsqueda bioinformática de una desmetilasa de ADN codificada en el genoma de la mosca. Se encontró que el gen CG2083 de *Drosophila melanogaster* codifica para una proteína con ciertas regiones altamente conservadas: como un dedo de zinc CXXC, el cual permite a la proteína interactuar con el ADN; un dominio rico en Cys y un tercer dominio DSBH ("double stranded beta hélix"), característico de oxigenasas y probable responsable de la actividad enzimática de esta proteína. Estas tres regiones también se encuentran en las proteínas TET de mamíferos, mientras que la desmetilasa bacteriana de ADN AlkB, responsable de re-establecer la adenina a partir de 6mA, sólo contiene la región DSBH. El grupo de investigación llamó a esta proteína DMAD (*Drosophila* DNA 6mA "demethylase") y la caracterizó.

DMAD se expresa en niveles bajos durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, pero su expresión aumenta durante las etapas embrionarias tardías. Debido a que DMAD se expresa de manera inversamente proporcional a la cantidad de 6mA, se sugiere que su función es la desmetilación de la 6mA en el ADN. Mediante ensayos de pérdida de función a través de ARN de doble

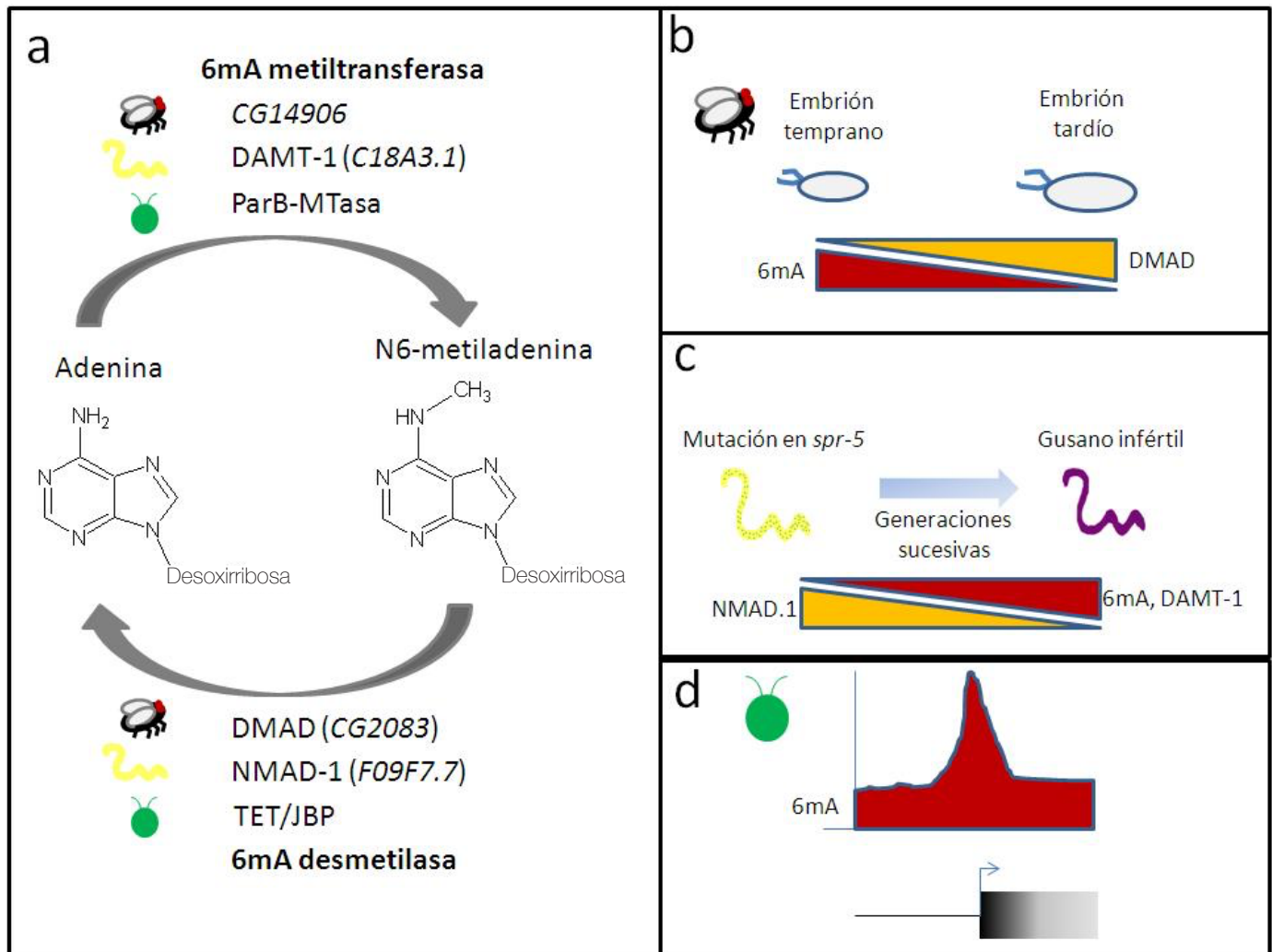


Figura 3. La 6mA y su comportamiento en eucariontes. a) Las bases de adenina en el DNA son modificadas por las N6-metiladenina (6mA) metiltransferasas y 6mA desmetilasa. Las enzimas modificadoras están conservadas en los super-reinos de la vida con actividad putativa también en *Homo sapiens*. b) Comportamiento de la 6mA y de la 6mA desmetilasa de *Drosophila* durante el desarrollo. c) Abundancia de la 6mA y de sus enzimas modificadoras a través de las generaciones de *C. elegans* con mutación en *spr-5* que las lleva a la infertilidad. d) Enriquecimiento de 6mA alrededor del TSS de la mayoría de los genes de *Chlamydomonas*. Modificado de (7).

cadena (dsRNA) y la herramienta de edición del genoma CRISPR/Cas9, se encontró que la proteína DMAD es esencial para el desarrollo de la mosca, pues su ausencia ocasiona letalidad en las últimas etapas embrionarias, lo cual está precedido por un aumento en la 6mA en su genoma (Fig. 3).

Mediante el uso de inmunoprecipitación del ADN, se encontró que este aumento se da principalmente en regiones del genoma que corresponden a transposones (7). Por lo tanto, es probable que la letalidad causada por la ausencia de DMAD pueda deberse a la inestabilidad genómica producida por la expresión de ciertos elementos genéticos transponibles.

6mA Y LA INFERTILIDAD DE *C. elegans* ¿QUÉ METILA Y QUÉ DESMETILA A LA ADENINA?

Durante varios años se pensó que el genoma de *Caenorhabditis elegans* no presentaba metilación, ya que no había sido posible replicar los experimentos que indicaban que la marca de 5mC incrementaba en función del envejecimiento además que este organismo no presenta homólogos de las metiltransferasas de ADN.

El grupo de Shi (8) se dio a la tarea de investigar las formas de metilación en el genoma del nematodo, encontrando a la 6mA como la única forma detectable. La 6mA está presente en el organismo

completo así como en embriones y líneas germinales exceptuando el núcleo del espermatozoides (8). Esto último indican los autores, puede atribuirse a la gran compactación de la cromatina en estas células lo que impide su detección o ser un indicativo de un borrado paterno de la marca.

La 6mA se encuentra en menos del 1% del total de las adeninas en el genoma de *C. elegans*, sin embargo, a diferencia de la metilación en la posición 5 de la citosina, que se presenta en el contexto CpG en varios eucariontes, la 6mA se encontró en motivos GAGG y AGAA. Esto indica que la metilación de la adenina ocurre en una sola cadena del ADN (8), debido a que no hay adenina en la cadena complementaria a estos motivos. Es decir, dichas secuencias no son complementarias, a diferencia de la citosina y la guanina, donde ambas cadenas tienen un sitio CpG en el mismo *locus*, por lo que la metilación o está presente en ambas cadenas o en ninguna.

En esa investigación se encontró además, una correlación entre la mutante para la desmetilasa de lisina 4 de la histona H3 (*spr-5*, ortóloga de LSD1/KDM1A), el incremento de 6mA de manera transgeneracional y la infertilidad del gusano (Fig. 3) (8).

Teniendo esto como antecedente, el grupo estudió a la familia de enzimas desalquilantes ALKB e identificó que mutantes para F09F7.7 aceleraban el proceso de infertilidad en mutantes para *spr-5*. Se evaluó la actividad desmetilante de F09F7.7 *in vitro* encontrando que la enzima era capaz de desmetilar oligonucleótidos con 6mA y 3mC. Esta actividad se verificó en gusanos mutantes para la desmetilasa, encontrando niveles elevados de 6mA, pero no de 3mC en estos organismos. Estos hallazgos sugieren que se trata de la principal desmetilasa de 6mA *in vivo*, por lo que se renombró como N6-metiladenina desmetilasa 1 (*nmd-1*) (8).

Una vez identificada la enzima que se encarga de remover a la 6mA en *C. elegans*, Shi y sus colaboradores se interesaron en identificar a la enzima responsable de colocar a dicha modificación. Un candidato interesante era C18A3.1 que es parte del complejo Ime4/Kar4 de la familia MTA-70 y que en levadura codifica a una metilasa de ARNm. Encontraron que la expresión de C18A3.1 en células SF9 conducía a un mayor nivel de 6mA en el ADN genómico y la mutación de aminoácidos del sitio de reconocimiento de sustrato abatía la cantidad de 6mA. Para comprobar que esta enzima actuara *in vivo*, realizaron "knockdowns" en gusanos silvestres y en mutantes para *spr-5* y encontraron en ambos casos una disminución de 6mA y que

además se suprimía el fenotipo transgeneracional de baja fertilidad. Esto sugería que la enzima es la 6mA metiltransferasa de *C. elegans* (Fig. 3) y se renombró como ADN N6 adenina metiltransferasa 1 (*damt-1*) (8).

Finalmente ese estudio encontró una intercomunicación entre la marca de H3K4me2 y la 6mA ya que la remoción de *damt-1* reduce los niveles de H3K4me2 en gusanos mutantes para *spr-5* así como el "knockdown" de *eap-1* (proteína de unión a H3K9me) misma que también disminuye a la 6mA (8). Estos resultados sugieren una regulación recíproca de H3K4 y la N6 metilación de adenina, así como una relación entre los reguladores de la metilación de adenina y de histonas.

***Chlamydomonas* REVELA UNA POSIBLE FUNCIÓN DE LA 6mA EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL**

Desde 1978 se había descrito que el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* presentaba altos niveles de 6mA (~0.3-0.5 mol%) en el ADN nuclear; por lo que con el interés de determinar la distribución, así como una posible función de esta marca, el grupo encabezado por He (9) desarrolló diferentes métodos para localizar a la 6mA en ADN genómico.

Para determinar la dinámica de la 6mA a lo largo del crecimiento celular, el grupo sincronizó células del alga para que crecieran durante la fase de luz (fase G1) y posteriormente tuvieran rondas de replicación del ADN y divisiones celulares (fases S/M) al entrar a la fase de oscuridad. Encontraron que los niveles de 6mA disminuían dramáticamente durante la replicación del ADN y que había una rápida recuperación de estos niveles, lo que indica que la marca se instala en el ADN recién sintetizado en un periodo corto de tiempo después de la replicación (9).

Al analizar la distribución de la 6mA de algas cultivadas en luz u oscuridad constante, se encontró una coincidencia en 88% en los picos de la modificación a lo largo del genoma, lo que sugiere que la instalación/mantenimiento de la marca se da en lugares específicos y se observó que el enriquecimiento se daba alrededor del sitio de inicio de la transcripción (TSS) en 84 % de los genes de *Chlamydomonas*. Dichos genes estaban relacionados con regiones altamente transcritas (Fig. 3); el resto de los sitios no presentaba un patrón de enriquecimiento y se encontraba tanto en el cuerpo de los genes como en regiones intergénicas (9).

Para identificar las secuencias a las que estaba asociada la 6mA, el grupo de He desarrolló un método con una resolución de ~33 pb que permi-

tió identificar que el enriquecimiento de la marca se asociaba a secuencias que contenían motivos con dinucleótidos ApT. La validación de sitios individuales de metilación permitió identificar dos motivos asociados a la metilación de adenina: CATG y GATC (9).

Tomando en cuenta que la marca de 6mA se encuentra alrededor del TSS, los autores decidieron evaluar la correlación de esta marca con la posición de nucleosomas y encontraron que los sitios de 6mA se localizan entre dos nucleosomas adyacentes, es decir en el ADN "linker". Además propusieron que si dos sitios adyacentes de 6mA se encuentran separados por una distancia mayor a 150 pb, entonces un nucleosoma se encontrará entre ambas y si la distancia es menor, entonces se originará un sitio libre de nucleosomas entre ellos, que indica que la 6mA puede coordinar el posicionamiento nucleosomal (9).

Considerando que en el alga también está presente la marca de 5mC, el grupo comparó la distribución de ésta con los sitios enriquecidos para 6mA y no encontró correlación lo que indica que ambas marcas tienen función diferente en este organismo. Por lo anterior, el grupo propuso que la 6mA puede estar contribuyendo a estructuras cromáticas que permiten el inicio de la transcripción mientras que la 5mC contribuye al silenciamiento de transposones, impronta la definición de exones y regula la elongación de la transcripción (9).

CONCLUSIONES

Los tres trabajos describen papeles importantes de la 6mA (7-9): primero, un mecanismo que favorece

la transcripción en el alga verde (9); segundo, la dinámica de dicha marca durante el desarrollo de la mosca de la fruta (7) y por último, su relevancia para la fertilidad en *C. elegans* (8). Dichas propiedades podrían ser el inicio del descubrimiento de una variedad de funciones de la 6mA, descrita originalmente en procariontes y que ahora podría representar una nueva marca de regulación epigenética para organismos eucariontes.

Es importante comentar que aunque la modificación de la 6mA únicamente se ha descrito -para el caso de eucariontes- en los tres organismos comentados, y que en comparación con la 5mC su distribución es mucho menor, no hay que descartar su trascendencia. Es posible que en el futuro las nuevas tecnologías con mayor sensibilidad de detección, puedan identificar esta marca en otros eucariontes o bien, describir un mayor número de funciones asociadas a la 6mA. Para una revisión más extensa sobre esta modificación del ADN y su posible papel en la regulación epigenética se sugiere consultar los trabajos de Luo *et al* (11), Sun *et al* (12), Summerer (13) y Huang *et al* (14).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo brindado para la redacción de este escrito a la M. en C. Rosario Pérez-Molina, a la M en C. Rebeca Pérez Cabeza de Vaca y a la Lic. María Elena Rodríguez-Aguilera así como a la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez y al Dr. Félix Recillas-Targa quienes nos han permitido formar parte de sus equipos de investigación al realizar nuestros proyectos de licenciatura y doctorado. 

REFERENCIAS

1. Recillas-Targa F (2014) Interdependency between genetic and epigenetic regulatory defects in cancer. *Meth Mol Biol* 1165: 33-52.
2. Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB (2008) *Genética*, 9ª Ed. Mc Graw Hill. España.
3. Bhutani N, Burns DM, Blau HM (2011) DNA demethylation dynamics. *Cell* 146: 866-872.
4. Arber W, Dussoix D (1962) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. I. Host controlled modification of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* 5: 18-36.
5. van Steensel lab: DamID info. Netherlands Cancer Institute. [Información en Internet] 2013 [acceso 31 de Julio de 2015] Disponible en http://research.nki.nl/vansteensellab/DamID_FAQ.htm
6. Greil F, Moorman C, van Steensel B (2006) DamID: mapping of in vivo protein-genome interactions using tethered DNA adenine methyltransferase. *Meth of Enzimol* 410: 342-357.
7. Zhang G, Huang H, Liu D, Cheng Y, Liu X, Zhang W, Yin R, Zhang D, Zhang P, Liu J, Li C, Liu B, Luo Y, Zhu Y, Zhang N, He S, He C, Wang H, Chen D (2015) N(6)-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell* 161: 893-906.

8. Greer EL, Blanco MA, Gu L, Sendinc E, Liu J, Aristizabal-Corrales D, Hsu CH, Aravind L, He C, Shi Y (2015) DNA Methylation on N(6)-Adenine in *C elegans*. *Cell* 161: 868-878.
9. Fu Y, Luo GZ, Chen K, Deng X, Yu M, Han D, Hao Z, Liu J, Lu X, Dore LC, Weng X, Ji Q, Mets L, He C (2015) N(6)-methyldeoxyadenosine marks active transcription start sites in *Chlamydomonas*. *Cell* 161: 879-892.
10. Heyn H, Esteller M (2015) An adenine Code for DNA: A Second Life for N6-methyladenine. *Cell* 161:710-713.
11. Luo GZ, Blanco MA, Greer EL, He C, Shi Y (2015) DNA N(6)-methyladenine: a new epigenetic mark in eukaryotes? *Nature reviews. Mol Cell Biol* 16:705-710.
12. Sun Q, Huang S, Wang X, Zhu Y, Chen Z, Chen D (2015) N(6)-methyladenine functions as a potential epigenetic mark in eukaryotes. *Bioassays* 37:1155-1162.
13. Summerer D (2015) N(6)-Methyladenine: A Potential Epigenetic Mark in Eukaryotic Genomes. *Angew Chem Int Ed Engl* 54: 10714-10716.
14. Huang S, Chen D (2015) N6-methyladenine: a potential epigenetic mark in eukaryotes. *Oncotarget* 6:15744-15745.