

EXPRESSIO DURANT L'ESPERMATOGENESI DEL GEN MITOCONDRIAL QUE  
CODIFICA LA SUBUNITAT 6 DE LA ATPasa (CANAL PROTONIC).

C. Mezquita i J. Mezquita

Unitat de Fisiologia Humana. Grup de Genètica Molecular.  
Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona. Av. Diagonal  
s/n, 08028 Barcelona.

Abstract

Expression of a mitochondrial gene coding for ATPase 6 (proton  
channel) during chicken spermatogenesis.

A cDNA clone prepared from poly (A)+ mRNA isolated from a population of chicken testis cells enriched in spermatids codifies the C-terminal region of a protein identified as the subunit 6 of chicken mitochondrial ATPase (proton channel) by its homology with the sequences of the subunit 6 of *X. laevis*, bovine and human mitochondrial ATPases (Mezquita & Mezquita, J. Cell Biol. 107, 751, 1988). The mRNA for ATPase 6 is present at successive stages of spermatogenesis: in immature testis, enriched in spermatogonia, in a fraction mainly containing meiotic cells, in round spermatids, in elongated spermatids and still is detectable in mature spermatozoa. The highest level was found in elongated spermatids. The mitochondrial DNA, digested with *MspI* and *HpaII*, showed no differential methylation during spermatogenesis. Southern blot analyses, after *MspI* digestion of chicken DNA, revealed one band of 5.3 kb in all tissues studied (testis, ovary, erythrocytes and lymphocytes) with the exception of very early chick embryos (before incubation), where an additional band of 4.5 kb was present.

Key words: Spermatogenesis, gen expression mitochondrial  
ATPase-6, methylation mitochondrial DNA.



## Introducció.

Durant l'espermatogènesi s'observen canvis de la morfologia de les mitocòndries (ANDRE, 1962; FAWCET, 1970; MACHADO DE DOMENECH et al., 1972; DE MARTINO et al., 1979). Les mitocòndries presenten canvis de densitat i de composició de polipèptids al llarg de l'espermatogènesi (HECHT i BRADLEY, 1981). També s'han descrit canvis en el DNA mitocondrial durant l'espermatogènesi (FISHER et al., 1977; BARTOOV i FISHER, 1980). El nombre de genomes mitocondrials disminueix durant l'espermatogènesi del ratolí entre 8 i 10 vegades (HETCH et al., 1984). No s'han detectat diferències en el patró de metilació del DNA mitocondrial digerit amb els enzims MspI i HpaII, ni en el patró de digestió d'altres enzims de restricció (HETCH et al., 1984).

Els experiments que presentem en aquesta comunicació tenen per finalitat determinar els possibles canvis durant l'espermatogènesi dels nivells de mRNA d'un gen mitocondrial, el gen de la subunitat 6 de la ATPasa, que codifica la proteïna que forma el canal protònic d'aquest enzim responsable de la síntesi d'ATP (Fig. 1). Al mateix temps hem determinat, utilitzant els enzims de restricció MspI i HpaII, la possible existència de canvis en el patró de metilació i en el patró de restricció al llarg de l'espermatogènesi i la embriogènesi inicial.

## Materials i Mètodes.

Testicles de pollastres sexualment immadurs (2 mesos d'edat) i testicles i altres teixits de galls (6-12 mesos d'edat) de la raça Hubbard White Mountain es varen utilitzar per obtenir els àcids nucleics. Cèl.lules testiculars en estadis successius de



## CHICKEN SPERMIOGENESIS

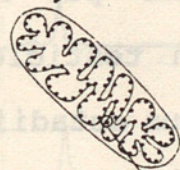
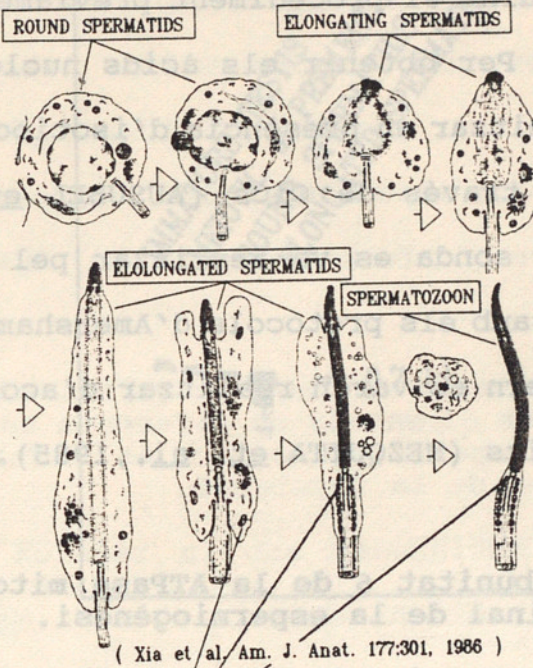
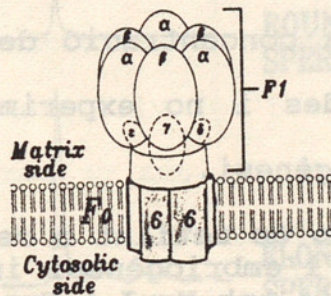
MITOCHONDRIAL  
ATPase

Fig. 1. Durant l'espermatogènesi del gall s'expressa un gen mitocondrial, el gen de la subunitat 6 de la ATPasa, que codifica la proteïna que forma el canal protònic d'aquest enzim responsable de la síntesi d'ATP.



diferenciació es van separar per centrifugació contra-flux (elutriació) seguint el procediment prèviament descrit (ROCA i MEZQUITA, 1989). Per obtenir els àcids nucleics les cèl.lules es varen homogeneitzar en presència d'isotiocianat de guanidina i centrifugar a través de ClCs (AUSUBEL *et. al.*, 1989). La preparació de la sonda es va realitzar pel mètode de "random primers" d'acord amb els protocols d'Amersham. Les hibridacions Northern i Southern es varen realitzar d'acord amb els mètodes prèviament descrits (MEZQUITA *et. al.*, 1985).

### Resultats.

El mRNA de la subunitat 6 de la ATPasa mitocondrial augmenta notablement al final de la espermiogènesi.

Utilitzant la sonda de la subunitat 6 de la ATPasa mitocondrial es va determinar per hibridació Northern la quantitat de mRNA present en testicle immadur, enriquit en espermatogònies, i en successius estadiis de l'espermatogènesi: una fracció de cèl.lules meiòtiques i premeiòtiques, de espermatides rodones i d'espermatides allargades. Les figures 2 i 3 mostren que la concentració del mRNA és màxima a les espermatides allargades i no experimenta canvis en estadis previs de l'espermatogènesi.

El DNA mitocondrial no és metilat o desmetilat al llarg de l'espermatogènesi o de l'embriogènesi inicial, tal com mostren els patrons de digestió amb MspI i HpaII.

No hem observat canvis en el patró de metilació, estudiat amb els enzims MspI i HpaII, al llarg de l'espermatogènesi i de l'embriogènesi inicial (Fig. 4) ni canvis en la metilació d'altres teixits com els limfòcits i l'ovari (Fig. 5).

El DNA mitocondrial dels espermatozoides es troba, en part, en un estat conformacional diferent al detectat en estadis previs de l'espermatogènesi.



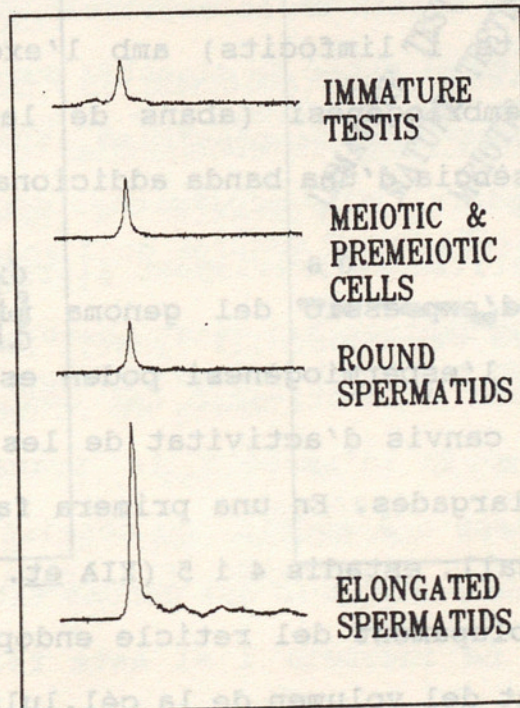
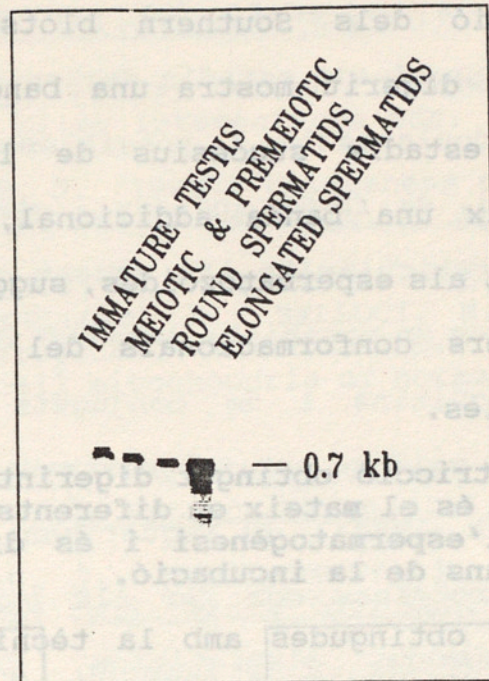


Fig. 2. La hibridació Northern mostra que el mRNA de la subunitat 6 de la ATPasa mitocondrial augmenta notablement al final de la espermiogènesi.



La comparació dels Southern blots obtinguts amb DNA mitocondrial no digerit mostra una banda comú en diferents teixits i en estadis succesius de l'espermatogènesi, i solament apareix una banda addicional, de major mobilitat electroforètica, als espermatozoides, suggerint l'existència de diferents isòmers conformacionals del DNA mitocondrial en aquestes cèl.lules.

El patró de restricció obtingut digerint el DNA mitocondrial amb MspI o HpaII és el mateix en diferents teixits i en estadis succesius de l'espermatogènesi i és diferent en cèl.lules embrionàries abans de la incubació.

Les anàlisis obtingudes amb la tècnica de Southern blot després de digerir el DNA amb els enzims MspI i HpaII mostra una banda de 5.3 kb en tots els teixits estudiats (testicles, ovari, eritròcits i limfòcits) amb l'excepció dels estadis inicials de l'embriogènesi (abans de la incubació) on hem detectat la presència d'una banda addicional de 4.5 kb (Fig. 3)

#### Discussió.

Els canvis d'expressió del genoma mitocondrial que hem observat durant l'espermogènesi poden estar relacionats amb els previsibles canvis d'activitat de les mitocondries a les espermàtides allargades. En una primera fase les espermàtides allargades del gall, estadis 4 i 5 (XIA *et. al.*, 1986), mostren el màxim desenvolupament del reticle endoplasmàtic rugós i un notable increment del volumen de la cèl.lula i de la superfície de la membrana plasmàtica. Aquestes cèl.lules són molt actives en la síntesi de glicoproteïnes que s'incorporarien a la membrana i en la síntesi de protamina. L'activitat biosintètica d'aquestes cèl.lules requereix la utilització de grans quantitats d'ATP i aquesta pot ser una de les raons de



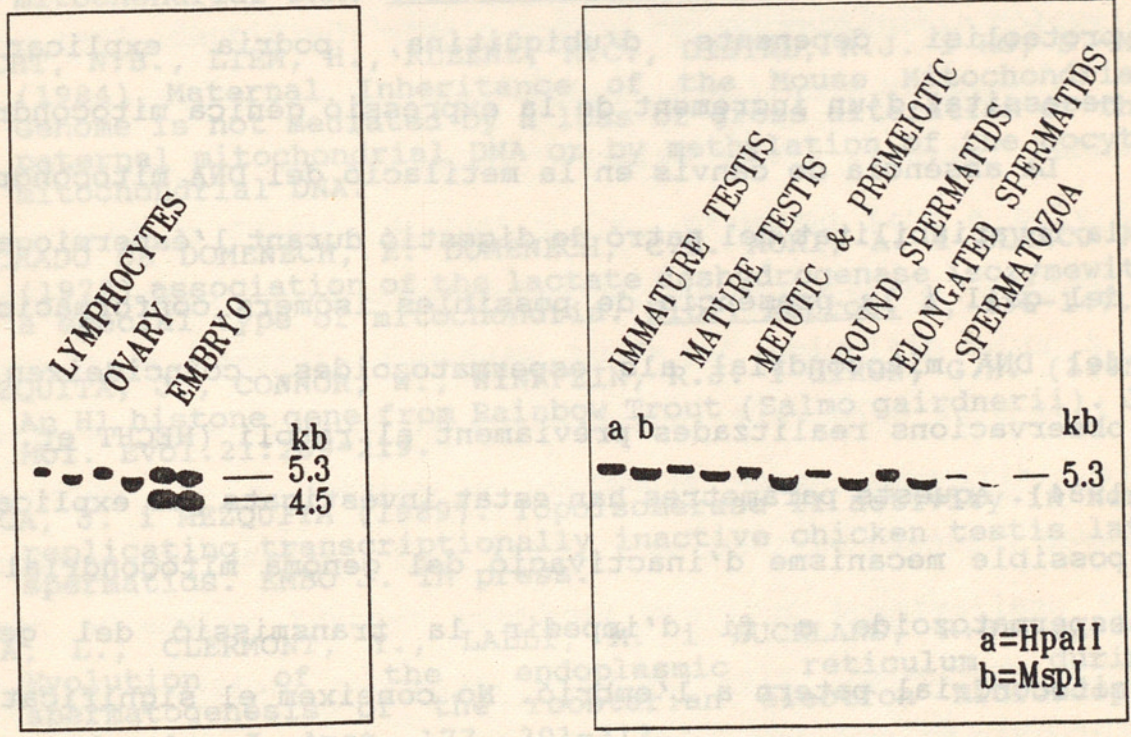


Fig. 3. El patró de restricció obtingut digerint el DNA mitocondrial amb MspI o HpaII és el mateix en diferents teixits i en estadis successius de l'espermatogènesi i és diferent en cèl.lules embrionaries abans de la incubació.

ANDRE, J. (1983) Contribution à la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la



l'increment de la expressió del gen de la ATP sintetasa. D'altra banda, durant els estadis següents té lloc la regressió del reticle endoplasmàtic i possiblement la degradació de moltes proteïnes, de forma anàloga a com s'observa durant la maduració dels reticulòcits. En aquest cas, moltes proteïnes són degradades per un mecanisme depenent d'ubiquitina i ATP. La presència d'ubiquitina i de conjugats d'ubiquitina a les espermatides del gall ha estat demostrada al nostre laboratori (AGELL i MEZQUITA, 1988). El requeriment d'ATP, tant per a la biosíntesi de proteïnes com per als possibles processos de proteolisi depenents d'ubiquitina, podria explicar la necessitat d'un increment de la expressió gènica mitocondrial.

La absència de canvis en la metilació del DNA mitocondrial, la invariabilitat del patró de digestió durant l'espermiogènesi del gall i la presència de possibles isòmers conformacionals del DNA mitocondrial als espermatozoides, coincideixen amb observacions realitzades prèviament al ratolí (HECHT *et. al.*, 1984). Aquests paràmetres han estat investigats per explicar un possible mecanisme d'inactivació del genoma mitocondrial del espermatozoide a fi d'impedir la transmissió del genoma mitocondrial patern a l'embrió. No coneixem el significat del canvi del patró de restricció del genoma mitocondrial observat en els embrions no incubats i si està relacionat amb canvis morfològics o funcionals de les mitocondries al començament de l'embriogènesi.

#### Bibliografia

- AGELL, N., i MEZQUITA, C. (1988) Cellular Content of Ubiquitin and formation of Ubiquitin Conjugates during Chicken Spermatogenesis. Biochem. J. 250, 883-889.
- ANDRE, J. (1962) Contribution a la connaissance du chondriome. Etude de ses modifications ultrastructurales pendant la



- spermatogenese. J. Ultrastruct. Res. 3, 1-185S.
- AUSUBEL F.M. et. al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology. Greene and Wiley Interscience eds.
- BARTOOV, B., i FISHER, J. (1980). Uniqueness of sperm mt DNA as compared to somatic mt DNA in ram. Int. J. Androl. 3, 594-601.
- DEMARTINO, C., FLORIDI, A., MARCANTE, M.L., MALORNI, M.L., SCORZA, W., BARCELLONA, P., BELLOCI, M. i SILVERSTRINI, B. (1979) Morphological, histochemical and biochemical studies of germ cell mitochondria of normal rats Cell Tissue Res. 196, 1-22.
- FAWCET, D.W. (1970). A comparative view of sperm ultrastructure. Biol. Reprod. (Suppl.) 2, 90-127.
- FISHER, J., LANGSAM, J., AND BARTOOV, b. (1977) Ram sperm mitochondrial DNA. Cell. Biol. Int. Rep. 1, 535-540.
- HECHT, N.B., LIEM, H., KLEENE, K.C., DISTEL, R.J. i HO, S.-M. (1984) Maternal Inheritance of the Mouse Mitochondrial Genome is not mediated by a loss or gross alteration of the paternal mitochondrial DNA or by methylation of the oocyte mitochondrial DNA.
- MACHADO DE DOMENECH, E. DOMENECH, C.É. AOKI, A. i BLANCO A. (1972) association of the lactate deshydrogenase isozymewith a special type of mitochondria. Biol. Reprod. 6, 136-147.
- MEZQUITA, J., CONNOR, W., WINKFEIN, R.J. i DIXON, G.H. (1985) An H1 histone gene from Rainbow Trout (*Salmo gairdnerii*). J. Mol. Evol. 21:209-219.
- ROCA, J. i MEZQUITA (1989). Topoisomerase II activity in non-replicating transcriptionally inactive chicken testis late spermatids. EMBO J. In press.
- XIA, L., CLERMONT, Y., LALLI, M. i BUCKLAND, R.B. (1986) Evolution of the endoplasmic reticulum during spermatogenesis of the rooster:an electron microscopic study. Am. J. Anat. 177, 301-312.

Key words: Spermatogenesis, gen expression of ubiquitin-fusion protein, ribosomal protein.