

Reaccions d'ADP-ribosilació de les proteïnes nuclears en diferents estadis de l'espermatogènesi del gall.

M. Corominas

Departament de Fisiologia, grup de "Fisiologia nuclear i diferenciació"  
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Casanova, 143, Barna. 36.

Introducció

La poli(ADP-ribosilació) és una modificació covalent post-transcripcional de determinades proteïnes nuclears que s'ha trobat tant en cèl·lules eucariotes com procariotes. Aquesta reacció és catalitzada per la poli(ADP-ribosa)polimerase, un enzim unit a la regió internucleosomal de la cromatina, el qual catalitza la síntesi d'un homopolímer d'ADP-ribosa procedent del  $\text{NAD}^+$  unit a la proteïna acceptadora (Chambon et al. 1956). El polímer és degradat per la poli(ADP-ribosa)glicohidrolasa, un enzim també associat a la cromatina i que és fortament inhibit per l'ADN desnaturalitzat (Purnell et al., 1980).

S'han identificat com a proteïnes acceptadores de l'ADP-ribosa la H1, H2A, H2B, H3, proteïnes no histones del grup de les HMGs, A-24, H6, una endonucleasa depenent de  $\text{Ca}^{++}$  i  $\text{Mg}^{++}$  i el propi enzim, la poli(ADP-ribosa)polimerasa (Hayaishi et al., 1977).

Malgrat s'ha intentat correlacionar l'ADP-ribosilació amb la replicació (Hayaishi et al., 1977), transcripció (Yukioka et al., 1978) o reparació de l'ADN (Durkacz et al., 1980) no s'ha pogut aclarir, per el moment, la seva funció. S'ha postulat que la poli(ADP-ribosilació) de la cromatina provoca una relaxació de la seva estructura (Poirier et al., 1982), la qual cosa podria facilitar qualsevol dels processos esmentats abans. Sembla que el que mereix una major credibilitat en base als resultats experimentals publicats és la intervenció de la poli(ADP-ribosilació) en les reaccions cel·lulars que apareixen en resposta a lesions induïdes a l'ADN. És conegut que diversos tractaments que danyen l'ADN provoquen una depleció del  $\text{NAD}^+$  intracel·lular i que aquest ADN danyat estimula l'activitat de la poli(ADP-R)polimerasa (Ogata et al., 1981). Wielckens et al. (1982) han demostrat que el turnover de grups poli(ADP-

ribosil) en cèl.lules tractades amb un agent que trenca l'ADN és extre- madament ràpid, el que comporta una degradació substancial del NAD.

L'espermatogènesi és un model molt adequat per l'estudi de la poli- (ADP-ribosilació) ja que al llarg d'aquest procés tenen lloc canvis dràstics en l'estructura i funció de la cromatina. Les espermatogonies i espermatòcits són actius en replicació, transcripció, reparació i recombinació ; a les espermatides rodones ja no hi ha replicació i a les espermatides en diferenciació no hi ha tampoc transcripció. L'es- tructura típica de la cromatina, en forma de nucleohistona, de les cèl- lules premeiòtiques, meiòtiques i espermatides primitives és reempla- çada durant l'espermiogènesi per una estructura més relaxada, amb ex- posició de llocs d'unió a l'ADN però sense activitat transcripcional. Al final de l'espermatogènesi té lloc una condensació massiva de la cromatina en forma de nucleoprotamina (Mezquita i Teng, 1977).

#### Materials i mètodes

La suspensió de cèl.lules testiculars s'ha preparat segons el mètode de Meistrich (1977). La separació d'aquestes cèl.lules s'ha fet pel mètode de sedimentació a gravetat unitat, inicialment descrit per Mez- quita i Teng (1977), però aplicant un gradient de glicerol.

La permeabilització de les cèl.lules al NAD<sup>+</sup> i l'assaig de l'activi- tat enzimàtica s'han fet segons Berger i Johnson (1976), incubant amb NAD<sup>+</sup> marcat amb [<sup>14</sup>C].

Els nuclis s'han aïllat per el procediment de la sacarosa (Mezquita i Teng, 1977) amb PMSF i bisulfit sòdic com a inhibidors de la proteòlisi.

L'extracció de proteïnes s'ha fet : a) extracció amb H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4 N i precipitació amb etanol, b) extracció amb PCA 0,74 N i precipitació amb acetona, c) extracció amb NaCl 0,35 N i precipitació amb TCA.

Les electroforesis s'han fet en gels de poliacrilamida/àc.acètic/ urea (Panyim, Chalkey, 1969) o bé en gels de poliacrilamida/SDS (Weber, Osborn, 1969).

La identificació de les proteïnes ADP-ribosilades s'ha fet mitjan- çant fluorografia segons el mètode de Laskey i Mills (1975).

El tractament de les cèl.lules amb dimetilsulfat (DMS) s'ha fet se-

guint el protocol de Durkacz et al. (1980).

La quantificació de les proteïnes s'ha fet mitjançant un Lowry (1951) i la quantificació de l'ADN segons el mètode de la difenilamina (Burton, 1956).

### Resultats

#### I- Activitat poli(ADP-ribosa)polimerasa al llarg de l'espermatogènesi

L'activitat poli(ADP-ribosa)polimerasa s'ha determinat en cèl.lules permeabilitzades al NAD<sup>+</sup> o bé en nuclis aïllats, obtinguts a partir de les cèl.lules ja separades pel mètode de sedimentació a gravetat unitat. Aquesta activitat, expressada respecte a l'ADN, decreix al llarg de l'espermatogènesi, fins arribar als espermatozous procedents del conducte deferent que mostren una activitat pràcticament menyspreable. Ara bé, els nuclis aïllats, amb excepció dels espermatozous, presenten una activitat més elevada que les cèl.lules permeabilitzades (fig.1)

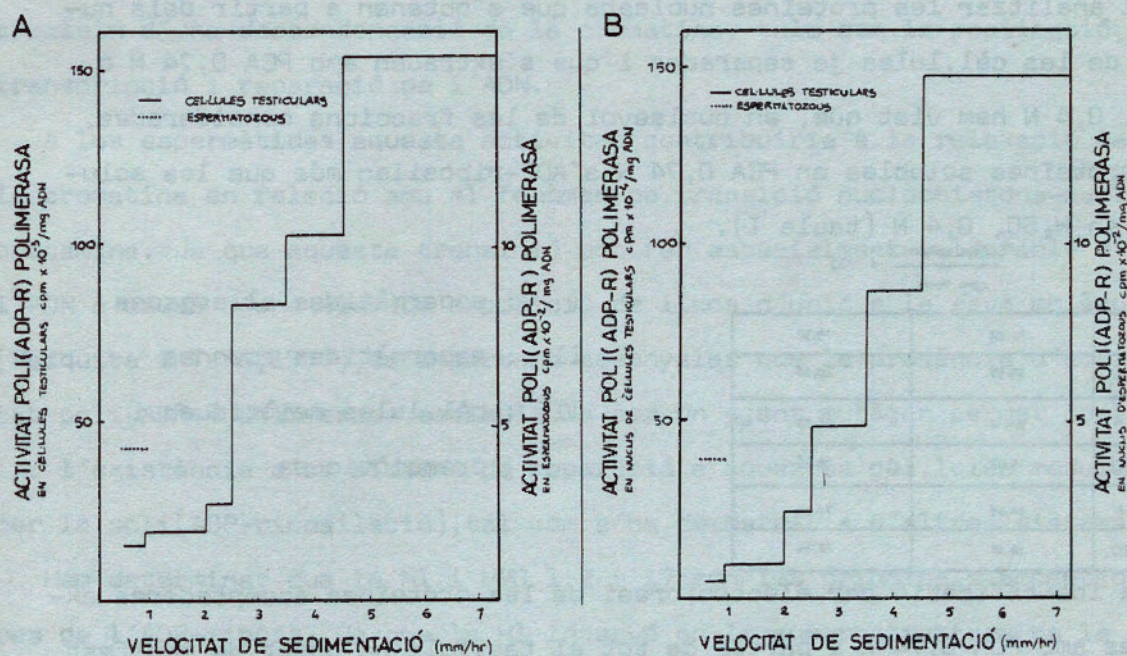
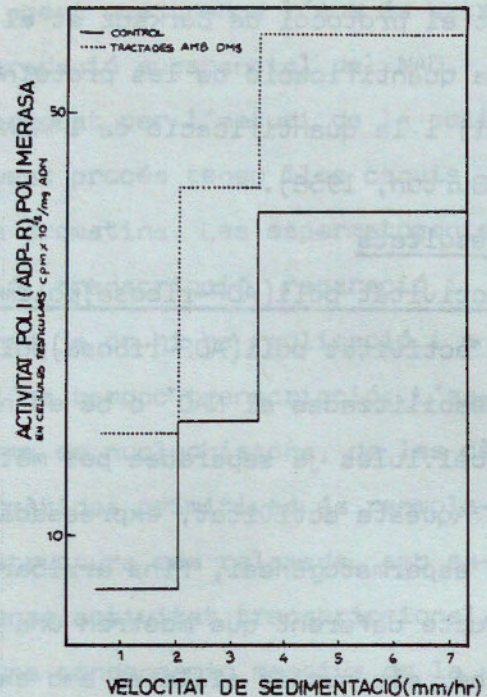


Fig 1. Activitat poli(ADP-ribosa)polimerasa com a funció de la velocitat de sedimentació de les cèl.lules testiculars : espermatozous i espermàtides més avançades (0,5-1 mm/h) ; espermàtides allargades (1-2 mm/h) ; les espermàtides rodones i cèl.lules meiotiques sedimenten d'acord amb les seves diferències de mida.

A) Cèl.lules permeabilitzades al NAD<sup>+</sup>

B) Nuclis aïllats

Quan hem tractat les diferents cèl.lules ja separades amb l'agent mutàgen DMS i hem fet l'assaig en cèl.lules permeabilitzades al  $\text{NAD}^+$  hem vist un augment de l'activitat poli(ADP-ribosa)polimerasa (fig.2)



## 2- ADP-ribosilació de proteïnes nuclears en cèl.lules testiculars

Al analitzar les proteïnes nuclears que s'obtenen a partir dels nuclis de les cèl.lules ja separades i que s'extrauen amb PCA 0,74 N o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,4 N hem vist que, en qualsevol de les fraccions considerades, les proteïnes solubles en PCA 0,74 N s'ADP-ribosilen més que les solubles en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,4 N (taula I).

$$\frac{\text{cpm EXTRACTE}}{\text{cpm TOTAL}} \times 100$$

I	PCA	74,65	79,37
	$\text{H}_2\text{SO}_4$	25,37	20,63
II	PCA	84,12	81,55
	$\text{H}_2\text{SO}_4$	15,88	18,45
III	PCA	65,69	77,36
	$\text{H}_2\text{SO}_4$	34,31	22,64

- I : espermàtides allargades  
 II : espermàtides rodones  
 III : cèl.lules meiòtiques i premeiòtiques

La identificació per electroforesi de les proteïnes acceptadores extretes amb PCA 0,74 N a partir de tot el testicle ha posat de manifest que en aquest extracte s'hi troben la H1, HMG 1,2 i 17. La quantificació del marcatge incorporat al determinar la radioactivitat retallant la banda o mitjançant fluorografia mostra que el grau d'ADP-ribosilació decreix seguint l'ordre HMG 1,2

(conjuntament), H1 i HMG 17.

$$\frac{\text{cpm}}{\text{mg PROTEÏNA}} \times 100$$

HMG 1,2	47,5
H1	34,7
HMG 17	17,8

### Discussió

Per poder interpretar la disminució observada en l'activitat de l'enzim al llarg de l'espermatogènesi s'ha de tenir en compte que aquesta activitat està referida a l'ADN de cada fracció cel·lular, i no a les proteïnes acceptadores de l'ADP-ribosa. La disminució dràstica dels substrats susceptibles d'ADP-ribosilació al final de l'espermiogènesi pot determinar un notable increment de l'activitat específica d'ADP-ribosilació a les espermatides allargades que experimenten diferenciació a espermatozous. Si bé la radioactivitat és baixa a aquestes últimes cèl·lules, l'activitat específica pot resultar comparable a la conseguida en estadis previs de l'espermatogènesi.

Si l'ADP-ribosilació en cèl·lules testiculars provoca, tal com s'ha demostrat a d'altres sistemes (Poirier et al., 1982) una relaxació de l'estructura de la cromatina, es pot pensar que aquesta activitat és un dels mecanismes que faciliten qualsevol de les funcions genètiques que precisin d'una descondensació de la cromatina, tals com la replicació, transcripció i reparació de l'ADN.

A les espermatides aquesta activitat contribuiria a la relaxació de la cromatina en relació amb el fenomen de transició nucleohistona-nucleo protamina. Ja que aquesta transició pot fer especialment vulnerable a l'ADN a causa d'una elevada exposició de llocs d'unió a la seva molècula (Mezquita i Teng, 1977), és important assenyalar que la presència d'activitat poli(ADP-R)polimerasa estimulable per un agent mutàgen permet postular l'existència d'un sistema de reparació a aquestes cèl·lules modulats per la poli(ADP-ribosilació), tal com s'ha demostrat a d'altres sistemes.

Hem determinat que la H1 i HMG 1,2 i 17 són les principals acceptadores de l'ADP-ribosa. Ja que la H1 intervé en la superestructura de la cromatina, la poli(ADP-ribosilació) d'aquesta proteïna podria suposar la neutralització del seu paper (Jump et al., 1979). S'ha postulat que les HMG 1 i 2 efectuen algun paper relacionat amb el seu tipus d'interacció amb l'ADN, facilitant la relaxació de la cromatina. L'ADP-ribosilació d'aquestes proteïnes podria suposar un augment de la seva acció desestabilitzant.

Bibliografia

- BERGER N.A., WEBER G. and KAICHI A.S.(1978). Characterization and comparison of poly(ADP-R) synthesis and DNA synthesis in nucleotide-permeable cells. *Biochim. et Biophys. Acta* 519 , 87-104.
- BURTON K.(1956). *Biochemical Journal* 62 , 315-323.
- CHAMBON P., WEILL J.D., DOLY J., STROSSER M.T. and MANDEL P.(1966). "On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 25 , 638-643.
- DURKACZ B.W., OMIDJI D., GRAY D. and SHALL S.(1980). (ADP-ribose)<sub>n</sub> participates in DNA excision repair. *Nature* 283 , 593-596.
- HAYAISHI O. and UEDA K.(1977). Poly(ADP-ribose) and ADP-ribosylation of proteins. *Ann.Rev.Biochem.* 46 , 95-116.
- JUMP D.B., BUTT T.R. and SMULSON M.(1979). Nuclear protein modification and chromatin substructure. *Biochem.* 18 , 983-990.
- LASKEY R.A. and MILLS A.D.(1975). Quantitative film detection of H and C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur.J.Biochem.* 56 , 335-341.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., LEWIS FARR A. and RANDALL R.J.(1951). *J. Biol.Chem.* 193 , 206.
- MEISTRICH M.L.(1977). "Separation of Spermatogenic Cells and Nuclei from Rodent Testes". *Methods in Cell Biology* vol. XV. Ed. by David M. Prescott. Academic Press. New York. San Francisco. London.
- MEZQUITA C. and TENG C.S.(1977). Studies on sex-organ development. Changes in chromatin structure during spermatogenesis in maturing rooster testes as demonstrated by the initiation pattern of ribonucleic acid synthesis in vitro. *Biochem.J.* 170 , 203-210.
- OGATA N., KAWAICHI M., UEDA K. and HAYAISHI O.(1981). Poly(ADP-ribose) synthetase, a main acceptor of poly(ADP-ribose) in isolated nuclei. *The Journal of Biological Chem.* 256 , 4135-4137.
- PANYIM S. and CHALKLEY R.(1969). *Archiv.Biochem.Biophys.* 130 , 337.
- POIRIER G.G., de MURCIA G., JONGSTRA-BILEN J., NIEDERLANG C. and MANDEL P. (1982). Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 79 , 3423-3427.
- PURNELL M.R., STONE P.R. and WHISH W.J.O.(1980). ADP-ribosylation of nuclear proteins. *Biochem.Soc.Trans.* 8 , 215-226.
- WEBER K. and OSBORN M. (1969). *J.Biol.Chem.* 244 , 4406.
- WIELCKENS K., SCHMIDT A., GEORGE E., BREDEHORST R. and HILZ H.(1982). DNA fragmentation and NAD depletion. *J.Biol.Chem.* 257 , 12872-12877.
- YUKIOKA M., OKA Y., HASUMA T. and INDUE A.(1978). *Febs Lett.* 86 , 85-88.