

TOPOISOMERASAS Y DIFERENCIACION CELULAR

ACTIVIDAD TOPOISOMERASA DURANTE LA ESPERMATOGENESIS DEL GALLO

J. Roca y C. Mezquita

Departamento de Fisiología y Bioquímica. Laboratorio de fisiología del núcleo celular y diferenciación. Facultad de Medicina.

Universidad de Barcelona. Avd. Diagonal s/n. Pedralbes. 08028.

Abstract

TOPOISOMERASE ACTIVITY DURING ROOSTER SPERMATOGENESIS.

The topological state of DNA affects its replication, recombination, transcription and nucleosome assembly. DNA topoisomerases are enzymes that change the DNA linking number by a coupled DNA breaking and sealing mechanism. These enzymes have been purified from a large number of prokaryotes, eukaryotes and viruses. To investigate if topoisomerases may be involved in the structural and functional changes that chromatin undergoes during spermatogenesis, we are surveying topoisomerase activities at different stages of rooster spermatogenesis. We have detected topoisomerase activity in extracts obtained from meiotic and premeiotic cells, round spermatids and elongated spermatids. The presence of topoisomerase activity in genetically inactive late spermatids suggests that these enzymes could be important in the structural changes that chromatin undergoes during the nucleohistone nucleoprotamine transition at the end of the spermiogenesis.

Cuando se propuso la estructura en doble hélice del DNA y posteriormente el modelo de replicación semiconservativa, si bien quedaron claras sus implicaciones en los procesos de transferencia de la información genética, resultaba difícil entender cómo podía desnaturalizarse una doble hélice de enorme longitud sin crear un superenrollamiento y un gran estrés torsional. Más tarde, en la década de los 60, el descubrimiento de pequeños DNA circulares en plásmidos y fagos, y de la organización del DNA en loops, tanto en los genomas de los procariontes como de los eucariotes, obligó a pensar que habría algún mecanismo que controlara la torsión del DNA cuando este se desnaturalizaba. La respuesta no llegó hasta la década

de los 70 con el descubrimiento de las topoisomerasas o "enzimas relajadores". En 1971 se aisló la primera topoisomerasa tipo I (prot. w de E. coli), cinco años después la primera topoisomerasa tipo II (Gyrasa de E. coli) y desde entonces hasta la actualidad se han venido encontrando estos enzimas en todos los procariotas y eucariotas, e incluso en virus. (rev.1-2-3-4-5).

Las topoisomerasas son enzimas que actúan modificando el número de enlace del DNA (7) (número de veces que se cruzan las dos cadenas en el espacio). Las topoisomerasas tipo I actúan produciendo roturas transitorias de una de las cadenas del DNA, modifican el número de enlace de uno en uno y no consumen ATP. Las topoisomerasas tipo II actúan rompiendo simultáneamente las dos cadenas del DNA modificando el número de enlace de dos en dos y requieren ATP y Mg^{2+} . Las topoisomerasas pueden relajar un DNA superenrollado tanto hacia la derecha como hacia la izquierda, aunque las procarióticas lo hacen sólo en el segundo caso. Las topoisomerasas tipo II aparte de su acción relajante en ambos sentidos pueden también encadenar o anudar y desencadenar o desanudar los DNA circulares, y crear superenrollamiento del DNA hacia la izquierda facilitando así la apertura de las dos cadenas.

En los últimos cinco años se han ampliado extraordinariamente las perspectivas de las implicaciones funcionales de las topoisomerasas, relacionándose con todo tipo de actividades genéticas. Principalmente en los procariotas se ha demostrado que estos enzimas están involucrados en los procesos de replicación, transcripción, reparación y recombinación (rev -6-). Algunos antibióticos actúan bloqueando las topoisomerasas. En los virus se han implicado en los procesos de replicación, integración genómica, empaquetamiento y encapsidación. En los eucariotas los estudios funcionales presentan una mayor dificultad, se han relacionado sin embargo con la replicación, transcripción, recombinación y reparación (11), ensamblaje nucleosómico (8-9), condensación y segregación cromosómica (10). Las transiciones a nuevas formas conformacionales del DNA como son el DNA-Z o las cruces palindrómicas pueden también estar moduladas por las topoisomerasas.

Hoy se acepta que la información y expresión genética no descansan pasivamente en un código de secuencia de bases, sino que la topología en un momento dado de un determinado dominio del DNA puede ser decisiva para el inicio de un proceso de proliferación o diferenciación celular, o de activación o inactivación génica por ejemplo. Las topoisomerasas al modular

específicamente esta topología pasan a ser enzimas clave para la regulación de tales procesos.

Muy poco se sabe todavía de como pueden estar reguladas las topoisomerasas. En procariontes parece que existe un control homeostático a través de la topología de sus propios genes. En eucariotas se ha visto que son susceptibles de ADP-ribosilación (12) y fosforilación (13). Se han propuesto como dianas de algunos factores de crecimiento celular (14-15) y también se ha visto que algunos agentes citostáticos (16-17) actúan sobre estos enzimas.

Actualmente el estudio funcional de las topoisomerasas ofrece el máximo interés y es de preveer que a medida que avancen los estudios, se demostrará que su implicación en los procesos genéticos de la célula es todavía más profunda.

La espermatogénesis es un modelo de diferenciación en el que concurren diversos y drásticos cambios en la función y estructura de la cromatina: replicación y cese de la misma, recombinación meiótica, transcripción y cese de la misma, reparación, desensamblaje nucleosómico y posterior empaquetamiento del DNA con la protamina. Resulta pues ideal para estudiar como la actividad topoisomérica puede estar involucrada en estos cambios de la topología del genoma.

La actividad topoisomerasa, ensayada por la capacidad de un extracto de relajar un DNA superhelicoidal, ha sido determinada en suspensiones celulares correspondientes a estadios sucesivos de la espermatogénesis del gallo, obtenidos por el sistema de centrifugación contra flujo (elutriación).

Materiales y métodos

Separación celular: Las células testiculares de gallo fueron preparadas y separadas por el método de centrifugación contra flujo (elutriación) tal como hemos descrito anteriormente (19). Se obtuvieron las siguientes fracciones celulares: .- espermátidas alargadas (90%), .- espermátidas redondas (85%), .- cél. meióticas y premeióticas (75%). También se obtuvieron espermatozoides de los conductos deferentes (pureza 100%).

Obtención de extractos con actividad enzimática (18) : cada fracción celular (10^8 cél. aprox.) fue lavada con $\text{PO}_4\text{H}_2\text{k}$ 0,01 M pH 7.5, NaCl 0,15 M y después de resuspenderla en 4 ml de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{k}$ 5 mM pH 7.5, MgCl_2 5 mM, PMSF 1 mM, 2 mercaptoetanol 1 mM, DTT 1 mM fue homogeneizada suavemente. El grado de disrupción celular fue controlado por microscopía de contraste de fases. Los nucleos fueron recogidos centrifugando a $2000 \times g$ 10 min., lavados con $\text{PO}_4\text{H}_2\text{k}$ 5 mM pH 7.5, PMSF 1 mM y DTT 1 mM, resuspendidos en 4 ml de este mismo tampón pero con EDTA 4 mM y extraídos con un volumen igual de NaCl 2 M, Tris 50 mM pH 7.5, 2 mercaptoetanol 10 mM y PMSF 1 mM. El DNA del extracto fue precipitado añadiendo gradualmente un volumen de polietilenglicol al 18 %, NaCl 1 M y sedimentándolo a $12000 \times g$, 30 min. El sobrenadante una vez dializado frente a $\text{PO}_4\text{H}_2\text{k}$ 30 mM pH 7.5, 2 mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM y glicerol al 25 % fue guardado en alícuotas a -20° y utilizado para los ensayos enzimáticos. Todos los pasos se realizaron a 4°C . En algunos casos se utilizaron extractos crudos obtenidos por la simple homogeneización de las células con Tris 20 mM pH 7.5, PMSF 1 mM y DTT 1 mM.

Condiciones de los ensayos: La actividad topoisomerasa fue ensayada por la relajación de un plásmido superhelicoidal (PBR322 forma I). Cada medio de reacción (15 μl) conteniendo: PBR322 0,3 μg , Tris 50 mM pH 7.5, KCl 120 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 1 mM y BSA 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fue incubado a 30° durante 20 min. con 4 μl de cada extracto enzimático. Se hicieron ensayos con y sin ATP 1 mM, con y sin EDTA 1 mM y con diversas concentraciones de espermidina (0, 0.5 y 3 mM). Las reacciones se detuvieron añadiéndoles 4 μl de SDS 5 %, EDTA 50 mM, glicerol 50 % y azul de bromofenol al 0,1 %. Los distintos topoisómeros fueron resueltos por electroforesis en un gel de agarosa 1 % (tampón TBE) que una vez teñido con bromuro de etidio fue fotografiado bajo luz ultravioleta.

El plásmido PBR322 se obtuvo de E.coli por lisis alcalina.

Resultados y discusión

La actividad topoisomerasa, determinada por la relajación de un plásmido superhelicoidal mediante la modificación paulatina del número de enlace, ha sido detectada en los extractos de células meióticas y premeió-

Biología del Desarrollo 3, (1985)

SCB.

155

tas, espermátidas redondas y espermátidas alargadas. En los espermatozoides no se ha detectado actividad en las mismas condiciones de ensayo. Los experimentos realizados hasta el momento permiten establecer las siguientes conclusiones, principalmente metodológicas:

- 1.- los ensayos realizados con extractos crudos pierden su actividad al ser congelados, posiblemente tanto por la activación de proteasas que destruyen al enzima como por la activación de nucleasas que provocan escisiones (nicks) en el DNA.
- 2.- los extractos preparados a partir de núcleos, congelados a -20° , conservan su actividad si bien paradójicamente hay que diluirlos varias veces para que el enzima muestre su actividad. Este efecto del extracto, ya observado por otros autores, parece ser debido a la interferencia que producirían las nucleasas o inhibidores específicos del enzima.
- 3.- los ensayos realizados con y sin ATP, EDTA o espermidina con el fin de diferenciar las actividades topoisomerasa I y II, no permiten diferenciar tales actividades enzimáticas. Una topoisomerasa I mayoritaria puede enmascarar a la topoisomerasa II. Mediante métodos cromatográficos y el uso de inhibidores y ensayos específicos será posible cuantificar diferencialmente las actividades I y II a lo largo de la espermatogénesis.
- 4.- la presencia de actividad topoisomerasa en células genéticamente inactivas en replicación y transcripción como son las espermátidas alargadas, sugiere que esta actividad puede ser importante en los cambios estructurales de la cromatina durante la transición nucleohistona nucleoprotamina que acontece al final de la espermiogénesis.

Bibliografía

- 1.- Wang J.C. and Liu L.F. (1979) in Molecular Genetics (Taylor ed) part III. p 65-88
- 2.- Cozzarelli N.R. (1980) Science. DNA Gyrase and the supercoiling of DNA. vol 207 p 953-960
- 3.- Gellert M. (1981) DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem 50 p 879-910
- 4.- Wang J.C. (1981) Type I topoisomerases. The Enzymes (Boyer ed.) vol 14 p 331-344
- 5.- Wang J.C. (1982) Topoisomerases de ADN. Investigación y Ciencia. Sept. 82 p 56-69

- 6.- Drlica K. (1984) Biology of bacterial deoxiribonucleic acid topoisomerases. *Microbiological Reviews* 48 p 273-289
- 7.- Crick F.H.C. (1976) Linking numbers and nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 p 2639-2643
- 8.- Ryoji M. and Worcel A. (1984) Chromatin assembly in *Xenopus* oocytes: in vivo studies. *Cell* 37 p 21-32
- 9.- Glikin G.C., Ruberti I. and Worcel A. (1984) Chromatin assembly in *Xenopus* oocytes: in vitro studies. *Cell* 37 p 33-41
- 10.- Di Nardo S., Voelkel K. and Sternglanz R. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 p 2616-2620
- 11.- Halligan B.P., Davis J.L., Edwards K.A. and Liu L.F. (1982) *J. of Biol. Chem* 257 p 3995-4000
- 12.- Ferro A.M. and Olivera B.M. (1984) Poly (ADP-ribosilation) of DNA topoisomerase I from calf thymus. *J. of Biol Chem* 259 p 547-554
- 13.- Sander M., Nolan J.M. and Hsieh T. (1984) A protein kinase activity tightly associated with *Drosophila* type II DNA topoisomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 p 6938-6942
- 14.- Miskimins R., Miskimins W.K., Berstein H. and Shimizu N. (1983) *Exp. Cell. Res.* 146 p 53-62
- 15.- Mroczkowski B., Bosig G. and Cohen S. (1984) *Nature* 309 p 270-273
- 16.- Nelson E.M., Tewey K.M. and Liu L.F. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 p 1361-1365
- 17.- Ross W., Rowe T., Glisson B., Yalowich J. and Liu L. (1984) Role of topoisomerase II in mediating Epipodophyllotoxin-induced DNA cleavage. *Cancer Research* 44 p 5857-5860
- 18.- Miller G.K., Liu L.F. and Englund P.T. (1981) A homogeneous type II DNA topoisomerase from HeLa cell nuclei. *J. of Biol Chem* 256 p 9334-9339
- 19.- J.Boix i J.Roca (1984) L'elutriació com a mètode de separació de cèl.lules aplicable a l'estudi de l'espermatogènesi del gall. *Biologia del desenvolupament* 2 p 77-84