

ADP-ribosilació i diferenciació cel.lular. Contingut cel.lular i nuclear de poli(ADP-ribosa) "in vivo" durant l'espermatogènesi del gall.

Montserrat Corominas i Cristóbal Mezquita

Departament de Fisiologia i Bioquímica. Laboratori de Fisiologia del nucli cel.lular i diferenciació. Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal s/n. Pedralbes. 08028 Barcelona.

Abstract

ADP-ribosylation and cellular differentiation. Cellular and nuclear content of poly(ADP-ribose) "in vivo" during rooster spermatogenesis.

The structural and functional changes of chromatin during spermatogenesis could be potentially regulated by ADP-ribosylation of nuclear proteins. In order to know the steady state level of ADP-ribosylation, we have determined by HPLC the amount of poly(ADP-ribose) present in vivo in chicken testis cells separated by sedimentation at unit gravity or in nuclei isolated from these fractions. The level of poly(ADP-ribose) in both intact cells or isolated nuclei decreases in parallel with the ADP-ribosyl transferase activity. The polymer is still present in spermatozoa isolated from the vas deferens. In these cells we have determined the existence of a branched portion of poly(ADP-ribose) also present in other rooster testis cells. The absence of turnover of ADP-ribosyl residues in chicken late spermatids may explain the levels of polymer still present in the germinal cells at the end of spermiogenesis.

Introducció

Els nuclis de la majoria de cèl.lules eucariòtiques contenen ADP-ribosil transferasa, un enzim que catalitza la transferència de residus d'ADP-ribosa des del NAD a proteïnes acceptadores o bé a d'altres molècules d'ADP-ribosa, i forma oligo o poli(ADP-ribosa) (Hayaishi i Ueda, 1977). Notables excepcions són, però, els granulòcits mieloides, les cèl.lules epidèrmiques terminalment diferenciades i les cèl.lules de l'epiteli intestinal (Ueda i col., 1983).

Els neutròfils no contenen poli(ADP-ribosa), tal com s'ha demostrat per tècniques immunohistològiques, i no es detecta activitat enzimàtica en els seus nuclis aïllats. En canvi, els precursors dels neutròfils, mieloblasts i promieloblasts, contenen ADP-ribosa, així com activitat ADP-ribosil transferasa, i s'ha proposat que la presència de poli(ADP-ribosa) podria ésser un marcador per a la maduració de les cèl.lules mieloides (Ikai i col., 1982). Una qüestió important encara per resoldre és si la pèrdua d'activitat ADP-ribosil transferasa i la consegüent pèrdua d'ADP-ribosa de les proteïnes nuclears és resultat de la diferenciació o si és un esdeveniment que precedeix i al mateix temps fa possible aquesta diferenciació.

Els estudis de Lucas i col. (1984) en cèl.lules leucèmiques promielocítiques

"in vitro" demostren que inhibint l'activitat de l'ADP-ribosil transferasa amb nicotinamida s'indueix la maduració morfològica i funcional d'aquestes cèl.lules. Aquesta observació, juntament amb el fet que l'activitat de l'ADP-ribosil transferasa nuclear és present a les cèl.lules mieloides precursors però no a les cèl.lules madures, suggereix als esmentats autors que una reducció de l'ADP-ribosilació de les proteïnes nuclears és important per a la diferenciació d'aquest tipus cel.lular.

Diferents tipus de leucèmies han estat també estudiades per Ueda i col. (1983). Les cèl.lules de pacients amb leucèmia mielocítica crònica presenten immunofluorescència negativa per a la poli(ADP-ribosa), com en el cas dels granulòcits normals. En canvi, les cèl.lules leucèmiques de pacients amb leucèmia mieloblàstica aguda mostren immunofluorescència positiva, la qual cosa significa que aquestes cèl.lules retenen l'activitat sintetitzant d'ADP-ribosa. El mateix fenomen s'observa quan un pacient amb leucèmia crònica entra dins una crisi aguda. Sembla que ambdós tipus de cèl.lules retenen l'activitat de síntesi d'ADP-ribosa durant un període anormalment llarg però necessari per reparar el DNA que es replica activament.

Ohashi i col. (1984) demostren que l'àcid retinoic, un inductor de la diferenciació, fa decreixer l'activitat de l'ADP-ribosil transferasa a les cèl.lules de teratocarcinoma prèviament als canvis morfològics, i que la supressió de la síntesi d'ADP-ribosa per inhibidors de l'enzim indueix la seva diferenciació.

Malgrat tot, s'han descrit també observacions aparentment contradictòries. Farzaneh i col. (1982) en mioblastes embrionaris de pollastre i Johnstone i Williams (1982) en limfòcits perifèrics humans han observat que inhibidors de l'ADP-ribosil transferasa inhibeixen la diferenciació d'aquestes cèl.lules. Segons Johnstone i Williams al inhibir l'ADP-ribosil transferasa s'inhibeix la unió dels trencaments en una cadena presents al DNA dels limfòcits.

Tot i que les raons d'aquestes discrepàncies no són clares, sembla que un canvi acusat, decrement o increment, en els nivells cel.lulars de poli(ADP-ribosa) podria tenir importants efectes en l'estructura de la cromatina, activant una sèrie de gens involucrats en la diferenciació cel.lular.

L'ADP-ribosilació de les proteïnes de la cromatina és també un component essencial per a l'eficient reparació per escisió del DNA (Shall, 1984), encara que no és clar a quin nivell hi participa. És acceptat, però, de manera general, que inhibidors de l'ADP-ribosil transferasa, com per exemple metilxantines o benzamides, així com la privació nutricional de nicotinamida, re-

tarden la reparació per escisió del DNA.

En el cas de la diferenciació de la línia germinal espermatogènica del gall hem vist que l'activitat de l'ADP-ribosil transferasa, així com el recanvi dels residus ADP-ribosil decreixen al llarg de l'espermatogènesi (Mezquita i Corominas, 1983). Els espermatozoides del conducte deferent no presenten aquesta activitat enzimàtica ni es pot estimular amb tractaments que danyen el DNA, com el dimetilsulfat o la irradiació amb raigs X (Corominas, 1984).

Metodologia

Material biològic: galls de la raça Hubbard White Mountain.

La preparació i separació de les cèl.lules testiculars s'ha fet segons Oliva i col. (1982). Els nuclis s'han aïllat de les diferents cèl.lules testiculars homogeneïtzant amb: 50 mM tris-HCl, pH 7.5, 5 mM Mg Cl₂, 250 mM sacarosa, 0.5% tritó X-100 i 50 mM benzamidina, 0.1 mM leupeptin com a inhibidors de la proteòlisi. Les cèl.lules en diferents estadis o bé els seus nuclis aïllats s'han precipitat amb 20% d'àcid tricloroacètic. La quantificació s'ha fet segons el mètode de Jacobson i col. (1984), que consisteix bàsicament en fer digestions del polímer, prèviament purificat per cromatografia d'afinitat, fins a obtenir nucleòsids. Una vegada formats els corresponents derivats fluorescents aquests nucleòsids se separen per cromatografia líquida d'alta pressió en fase reversa (RP-HPLC). La quantificació del DNA s'ha fet pel mètode de la difenilamina.

Resultats

Al separar per RP-HPLC els nucleòsids derivats de la poli(ADP-ribosa) s'obté: adenosina (Ado), ribosiladenosina (RAdo) i diribosiladenosina (R₂Ado). Aquests dos últims són nucleòsids que deriven dels residus lineal i ramificat respectivament. L'adenosina no és representativa de la poli(ADP-ribosa) ja que pot derivar d'altres molècules cel.lulars, inclòs el RNA (fig. 1).

La quantitat de cada nucleòsid s'ha calculat en referència als ribosiladenosina i diribosiladenosina estàndards.

La quantificació d'ambdós nucleòsids s'ha fet respecte al DNA de cada fracció, tant cel.lular com nuclear. Ja que els residus ramificats representen, generalment, menys del 2% dels residus interns totals, el diribosiladenosina no es detecta a totes les fraccions.

A la figura 2 es representa la variació en els nivells de ribosiladenosina respecte al DNA durant l'espermatogènesi.

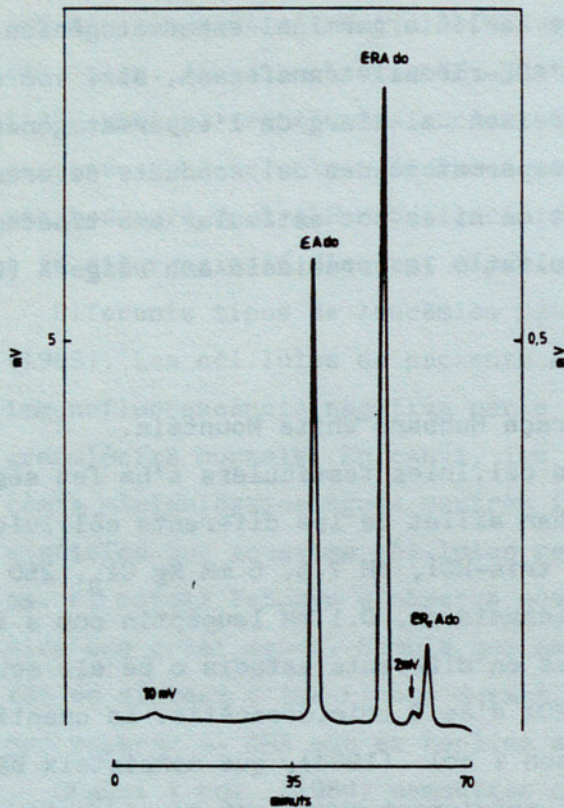
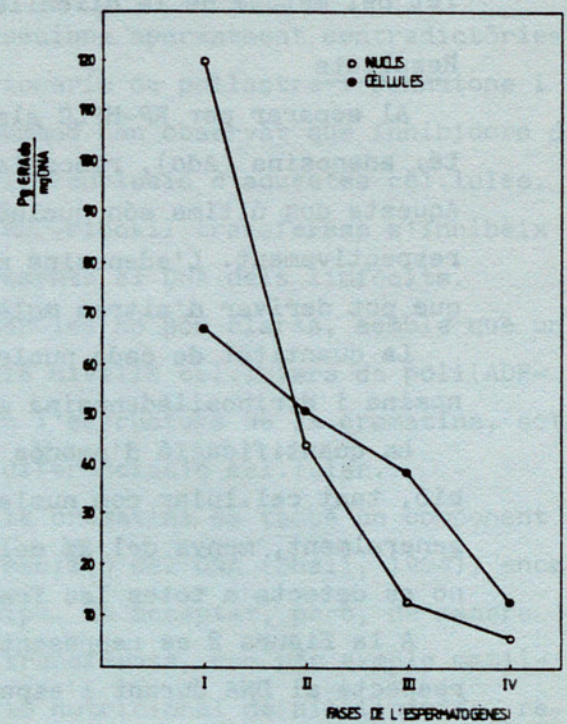


Fig. 1 - Cromatograma obtingut per HPLC dels nucleòsids derivats de la poli(ADP-ribosa).

Els nucleòsids fluorescents se separen en una columna de fase reversa (250 x 4.6 mm). La columna s'elueix isocràticament amb 7 mM format amònic, pH 5.8 i metanol 8.5%, a T ambient i a un flux de 1 ml/min.

Fig. 2 - Variació en els nivells de ribosiladenosina respecte al DNA durant l'espermatogènesi.

- I- cèl. premeiòtiques i meiòtiques
- II- espermatides rodones
- III- espermatides allargades
- IV- espermatozoides



Discussió

Entre les possibles funcions postulades per a l'ADP-ribosilació de les proteïnes nuclears s'hi troba la regulació dels canvis estructurals i funcionals de la cromatina al llarg del procés de diferenciació. No està clar, però, com s'afecta aquesta estructura ja que diferents estudis indiquen tant un relaxament (Niedergang i col., 1985) com una condensació (Wong i col., 1982) de la cromatina que conté proteïnes ADP-ribosilades.

Els nivells de poli(ADP-ribosa) a les cèl.lules i nuclis en diferents estadis de l'espermatogènesi decreixen al llarg d'aquest procés. En estudis anteriors havíem determinat que l'activitat de l'ADP-ribosil transferasa i el recanvi de residus d'ADP-ribosa decreixen també durant l'espermatogènesi (Mezquita i Corominas, 1983; Corominas, 1984). L'absència de recanvi de residus d'ADP-ribosa a les espermàtides més avançades podria explicar els nivells de polímer encara presents al final de l'espermiogènesi.

Els espermatozoides procedents del conducte deferent també contenen poli(ADP-ribosa), malgrat que no hem pogut detectar activitat enzimàtica en aquest tipus cel.lular. En aquests espermatozoides hem determinat l'existència de ramificacions, també presents a d'altres cèl.lules testiculars del gall. Les ramificacions podrien produir alteracions en l'estructura de la cromatina associades amb una o més de les funcions postulades per al polímer, a la vegada que intervenir en la regulació de les activitats enzimàtiques de síntesi i/o degradació de la poli(ADP-ribosa) (Juarez-Salinas i col., 1982).

Experiments posteriors que determinin els nivells de poli(ADP-ribosa) després de danyar el DNA així com la identificació de les proteïnes modificades podran ajudar a aclarir el possible paper d'aquesta modificació post-traduccional durant el procés de diferenciació de la línia germinal espermatogènica.

Bibliografia

- COROMINAS, M. (1984). Recanvi dels grups poli(ADP-ribosil) durant la diferenciació de la línia germinal espermatogènica. Biologia del Desenvolupament 2, 59-64.
- FARZANEH, F., ZALIN, R., BRILL, D., SHALL, S. (1982). DNA strand breaks and ADP-ribosyl transferase activation during cell differentiation. Nature 300, 362-366.
- HAYAISHI, O, UEDA, K. (1977). Poly(ADP-ribosylation) of chromatin. Annu. Rev. Biochem. 46, 95-116.
- IKAI, K., UEDA, K., HAYAISHI, O. (1982). Immunohistochemistry of poly(ADP-ribose). In: ADP-ribosylation Reactions, Biology and Medicine. O Hayaishi i K. Ueda eds. Academic Press, New York, pp 339-359.

- JACOBSON, M.K., PAYNE, M.D., ALVAREZ-GONZALEZ, R., JUAREZ-SALINAS, H., SIMS, J.L., JACOBSON, E.L. (1984). Methods in Enzymology 106, 483-494.
- JOHNSTONE, A.P., WILLIAMS, G.T. (1982). Role of DNA breaks and ADP-ribosyl transferase activity in eukaryotic differentiation demonstrated in human lymphocytes. Nature 300, 368-370.
- JUAREZ-SALINAS, H., LEVI, V., JACOBSON, E.L., JACOBSON, M.K. (1982). J.Biol. Chem. 257, 607-609.
- LUCAS, D.L., TANUMA, S., DAVIES, P.J.A., WRIGHT, D.G., JOHNSON, G.S. (1984). Maturation of human promyelocytic leukemia cells induced by nicotinamide: evidence of a regulatory role for ADP-ribosylation of chromosomal proteins. Journal of Cellular Physiology 121, 334-340.
- MEZQUITA, C., COROMINAS, M. (1983). ADP-ribosyl transferase activity during rooster spermatogenesis. J.Cell.Biology 97, 138.
- NIEDERGANG, C.P., de MURCIA, G., ITTEL, M.E., POUYET, J., MANDEL, P. (1985). Time course of polynucleosome relaxation and ADP-ribosylation. Eur.J.Biochem. 146, 185-191.
- OHASHI, Y., UEDA, K., HAYAISHI, O., IKAI, K., NIWA, O. (1984). Induction of murine teratocarcinoma cell differentiation by suppression of poly(ADP-ribose) synthesis. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 7132-7136.
- OLIVA, R., VIDAL, S., MEZQUITA, C. (1982). Cellular content and biosynthesis of polyamines during rooster spermatogenesis. Biochem.J. 208, 269-273.
- SHALL, S. (1984). ADP-ribose in DNA repair: a new component of DNA excision repair. Advances in Radiation Biology 11, 1-69.
- UEDA, K., KAWAICHI, M., OGATA, N., HAYAISHI, O. (1983). Poly(ADP-ribosylation) of nuclear proteins. Nucleic Acid Research. Academic Press, 143-164.
- WONG, M., MALIK, N., SMULSON, M. (1982). The participation of poly(ADP-ribosyl)ated histone H1 in oligonucleosomal condensation. Eur.J.Biochem. 128, 209-213.