

Estudi de l'activitat topoisomerasa a l'espermatogènesi del gall

J. Roca i C. Mezquita.

Departament de Fisiologia. Facultat de Medicina. Universitat de  
Barcelona. Av. Diagonal s/n.. 08028 Barcelona.

Abstract

Topoisomerase activity at different stages of 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. To investigate if topoisomerases may be involved in the structural and functional changes that chromatin undergoes during spermatogenesis, we have surveyed the type I topoisomerase activity at different stages of rooster spermatogenesis. A suspension of rooster testis cells was prepared by centrifugal elutriation in several fractions: meiotic and premeiotic cells, round spermatids, and elongated spermatids. Spermatozoa were obtained from the vas deferens. Nuclear extracts from these cell fractions and from hepatocytes and erythrocytes were assayed for relaxation of supercoiled DNA. We have detected the highest level of specific activity in nuclear extracts from meiotic and premeiotic cells. Decreasing levels have been detected in round and elongated spermatids. The high activity of meiotic cells could be related with genetic recombination, and the presence of DNA topoisomerase I activity in genetically inactive elongated spermatids suggest that this enzyme could be important in the structural changes that chromatin undergoes during the nucleohistone nucleoprotamine transition.

Introducció

Les topoisomerases són enzims que tenen la facultat d'interconvertir diferents topoisomers del ADN mitjançant un mecanisme acoplat de trencament i reparació de les cadenes d'ADN. Revisions amplies del tema són les d'en Gellert (1981) i d'en Wang (1985).

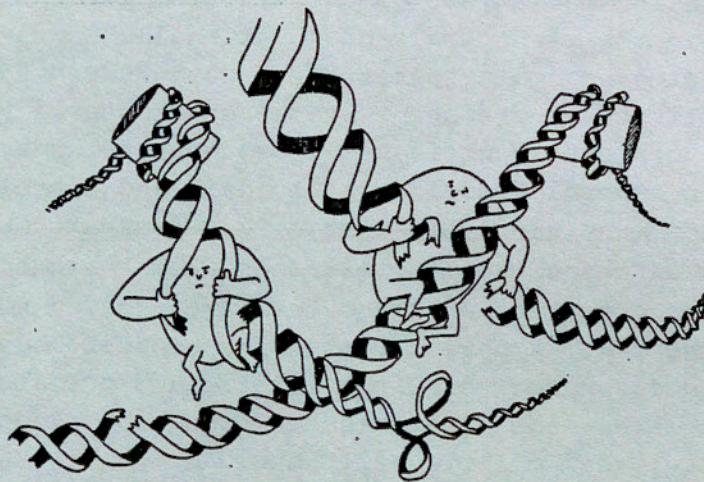
Les topoisomerases típics I actuen trencant una de les cadenes quedant unides covalentment al seu extrem 3' fins que la tornen a juntar amb l'extrem 5'. Això permet que puguin modificar el número



d'enllaç del ADN i relaxin l'ADN superhelicoidal. Amb aquest mecanisme també poden produir la transferència d'una cadena entre dues molècules d'ADN diferents. L'enzim no requereix ATP ni d'altres cofactors.

Les topoisomerases tipus II actuen trencan a la vegada les dues cadenes del ADN, mantenint-se unides covalentment als dos extrems de la doble helix. Entretant i abans de tornar a reparar-los permeten que un altre doble helix pugui creuar al través de la primera. L'enzim pot així encadenar i desencadenar o anusar i desanusar molècules d'ADN, o també relaxar o induir superhelicitat a la doble helix. L'enzim requereix ATP i Magnesi. La figura 1 representa la acció dels dos tipus d'enzims.

Fig. 1



Els papers *in vivo* proposats per les topoisomerases tan diversos com interessants: relaxament de la torsió originada a l'helix d'ADN durant la replicació i transcripció, desencadenament de les molècules d'ADN al final de la replicació i recombinació, inducció de superhelicitat per facilitar el ensamblatge o desensamblatge dels nucleosomes i l'inici de la replicació o transcripció, reparació, recombinació o transposició, i condensació o descondensació cromosòmica. (Weisbrod, 1982), (Ryoji i Worcel, 1984), (Zehnbauer i Volgestein, 1985).

Estudis sobre els mecanismes de regulació de les topoisomerases demostren que la poli(ADP-ribosilació) inhibeix específicament a la topoi, i que ambdues enzims poden fosforilarse per diferents



quinases resultan activades o inhibides segons el cas. (Ferro i Olivera, 1984), (Tse-Din, 1984), (Durban et al., 1983), (Ackerman et al., 1985).

Experiments immunoquímics han permetes localitzar a la topo I a nivell del nucleol i dels gens actius preferentment (Muller, 1985), (Fleishman et al., 1984), i a la topo II formen part del esquelet dels cromosomes mitòtics (Earnshaw et al., 1985). A nivell del ADN s'ha trobat que la topo I té gran afinitat per seqüències situades a les regions de hipersensitivitat a la DNasa I (Bonven et al., 1985), i la topo II amb seqüències de les regions d'anclatge del ADN a la matriu nuclear (Cockerill i Garrard, 1986).

-----

Al llarg de l'espermatogènesi tenen lloc canvis molt notables de l'estructura i funció de la cromatina. En els primers estadis té lloc la meiosi, amb una reorganització important de l'estructura de la cromatina i matriu nuclear, junt amb tots els events específics de la recombinació gènica. D'aquí es progressa ràpidament a la formació d'una cèl.lula haploide, la espermatida. A l'espermatida a la majoria de les espècies superiors s'inicia ara el procés que denominem "transició nuclihistona nucliprotamina" i que finalitza amb el total empaquetament del ADN a el nucli del espermatozoide. Aquesta transició coincideix amb un canvi morfològic molt aparent del nucli cel.lular. En el cas del gall sofreix una elongació amb gran reducció del seu volum.

Al inici de la transició nuclihistona nucliprotamina, com a conseqüència dels canvis de composició de la cromatina previament descrits per Mezquita (1985) o també per la possible inducció activa de superhelicitat per acció d'una topo II, la cromatina, previament estàtica, assoliria el estat de cromatina dinàmica. En aquest estat la protamina podria unir-se al ADN desensamblant els nucleosomes. Com a conseqüència del desplaçament massiu dels nucleosomes i



de la possible inducció activa de superhelicitat, l'ADN presentaria una elevadíssima densitat superhelicoidal, que de no ser ampliament relaxada, per l'acció d'una topo I per exemple, seria suficient per induir la conformació "Z" a determinades secuencias del ADN. Aquets dominis de Z-DNA, estabilitzats per les poliamines i protamina presents a les espermatides, tenen tendència a agregar-se ho que facilitaria la condensació de la nucleoprotamina (Mezquita, 1985) o podrien servir com a reservoris de superhelicitat negativa a determinats locus del genoma.

L'estudi de les activitats topoisomèriques en aquest model esperem aclareixi en part com esdevenen aquets afers. En el present treball hem quantificat els nivells de topoisomerasa tipus I en fraccions cel·lulars representants del succesius estadis de l'espermatoogènesi del gall, comparant-los també amb els d'altres cel·lules somàtiques. En els resultats observem alt nivells d'enzim a les cel·lules meiótiques, així com la seva presència a cel·lules genèticament inactives com són les espermatides allargades, on té lloc la transició nuclihistona nucliprotamina.

#### Material i mètodes

Galls "Hubbard White Mountain" de 25-50 setmanes d'edat foren utilitzats en aquets experiments. Tots els tàixts utilitzats ho han estat en fresc.

La preparació de suspensions cel·lulars i separació de les cel·lules testiculars pel sistema de "centrifugació contra fluxe" s'ha fet com s'ha descrit previament (Boix i Roca, 1984), obtenint-se una fracció de cel·lules meiótiques i premeiótiques, una d'espermàtides rodones i una d'espermàtides allargades.

#### Obtenció de nuclis

La preparació de nuclis s'ha fet sedimentant sobre un cuxi de tampó TKM-Sacarosa 0.8 M. cada fracció cel·lular un cop homogeneitzada amb embol de teflon en un medi TKM-Sacarosa 0.25 M.-Tritó 0.2%. En els experiments fets amb espermatozoides obtinguts del vasos deferens, testicle, fetje i eritrocits, els nuclis s'han preparat pel mateix mètode controlant en cada cas el grau de disrupció cel·lular i la puressa dels nuclis amb el microscopi de contrast de fases.



Obtenció del extracte nuclear

A cada població de nuclis (habitualment,  $10^8$ ), un cop resuspe -  
sa en 1 ml. de tampó TKM, s'afajeig EDTA fins 10mM, a continuació  
té lloc l'extracció al afajir progresivament un volum de disolució  
"B" amb dues tandes de sonocació suau. Amb l'adició d'un tercer volum  
de disolució "C", es precipiten els acids nucleics sedimentant-los a  
10.000xg durant 30 min. obtenintse així un sobrenedant, que un cop  
dialitzat en front a la disolució "D" i conservat a - 40°C. serà uti-  
litzat pels assaigs enzimatics.

Assaigs enzimatics

Els assaigs enzimàtics tenen lloc incuban durant 30 min. a 37°C.  
dilucions seriades de cada extracte nuclear en un volum total de  
20 µl que conté: tris 40mM pH 7.5, KCl 100mM, EDTA 0.5 mM, DTT 0.5  
mM, BSA 30 µg/ml i 0.5 µg del plasmidi pBR322. La reacció s'atu-  
ra afajint-hi 5 µl de SDS 5%, EDTA 50mM i Blau de bromofenol 0.05%.

La aparició de topoisomers relaxats del plasmidi l'observem  
al correr la mostra en un gel d'agarosa al 1% amb tampó TBE, que un  
cop tenyit amb bromur d'etidi fotografiam sota llum ultravioleta.

La quantificació dels nivells d'enzim es fa consideran 1 uni-  
tat, a la cantitat d'extracte que relaxa el 50% del plasmidi.

El plasmidi pBR322 s'obté: per amplificació amb cloramfeni-  
col a partir de la soca E.coli HB101 i pel mètode de lisi alcalina  
d'en Birnboim i Doly (1979). Es purificat amb una columna de hidro-  
xilapatita segons Colman et al. (1978).

Disolucions

- El tampó TKM es: tris 40mM pH 7.5, kCl 25mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM.
- La disolució "B" es: tris 40mM pH 7.5, NaCl 4 M.
- " " "C" : tris 40mM pH 7.5, NaCl 2 M., polietilenglicol 15%
- " " "D" : PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 50mM pH 7.5, EDTA 0.1 mM, Glicerol 50 %.

A totes elles s'afajeig just abans de fer servir: PMSF fins  
1mM (disolt amb isopropanol), Trasylol fins 100u/ml, OTT fins 1mM  
i BME fins 10mM, sen a les hores utilitzades sempre a 4°C.

Resultats

L'assaig de dilucions seriades dels extractes per la relaxa -  
ció d'un ADN superhelicoidal en ebsencia d'ATP ens ha permes quan -  
tificar l'activitat esocífica de la topoisomerasa I en els extrac-  
tes nuclears de les fraccions de cél.lules meiòtiques i premeiòti -  
ques, espermàtides rodones, i espermàtides allargades, obtingudes  
per separació d'una suspensió de cél.lules testiculars pel sistema  
de centrifugació contra fluxe. Tambè s'ha fet amb espermatozoides



obtinguts del vas deferent. Al gràfic de la figura 2 es representen els nivells d'activitat específica a cada tipus cel.lular.

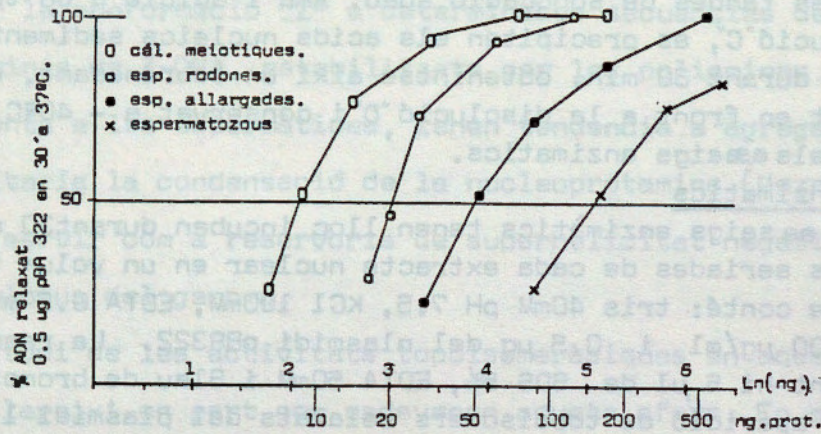


Fig. 2

Si mesurem els nivells d'enzim amb relació a la quantitat d'ADN i de nuclihistona obtinguts per cada fracció cel.lular, tal com es representa a la figura 3, s'observa un marcat descens del enzim en el sentit del procés de diferenciació amb relació al ADN cel.lular. En relació a la nuclihistona, hauria també un descens inicial, però

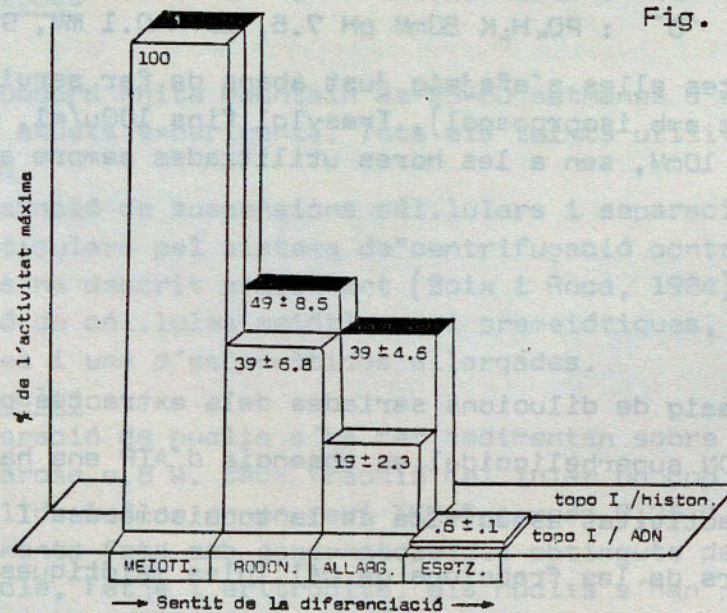


Fig. 3



els nivells es mantendrien més proporcionals a la quantitat de nucleohistona a les espermatides.

Per comparar els nivells d'enzim d'aquestes fraccions cel·lulars amb els d'altres cèl·lules somàtiques, els hem quantificat simultàneament amb hepatocits, eritrocits i el testicle en conjunt. El resultat es representa a la figura 4. En relació al testicle, els hepatocits mostren un major i els eritrocits un menor nivell d'enzim. Això era d'esperar si correlacionem aquest resultat amb els ben diferents graus d'activitat transcripcional d'aquestes cèl·lules. Però si considerem les fraccions testiculars, veiem com són les cèl·lules meiótiques i premeiótiques les que tenen el nivell més alt de tot el conjunt.

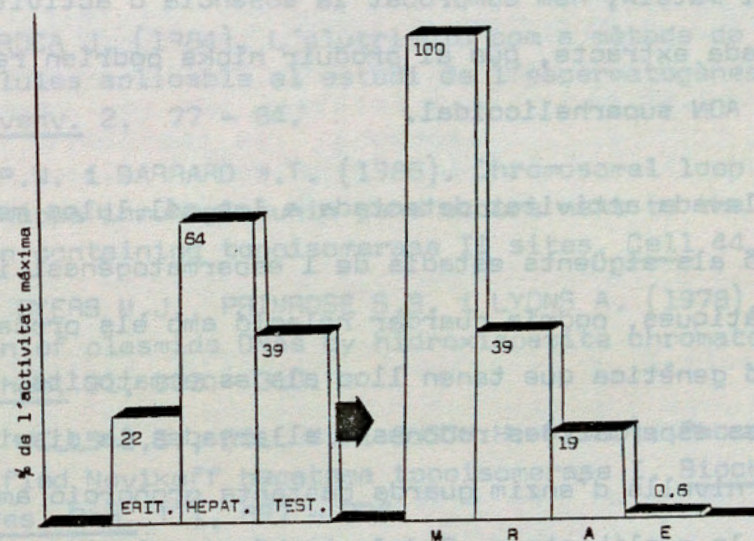


Fig. 4

#### Discussió

La determinació d'activitat específica de la topoisomerasa tipus I en els extractes nuclears obtinguts a partir de cèl·lules germinals espermatogèniques en estadis sucesius de diferenciació,



mostra uns alts nivells d'enzim a les cél.lules meiótiques en relació a altres cél.lules somàtiques, i uns menors nivells a les espermàtides que decreixen durant la transició nuclihistona nucliprotamina.

La validessa dels resultats obtinguts està condicionada a l'adequació de la metodologia utilitzada en la preparació de nuclis i extracció del enzim. Durant la preparació de nuclis no s'han de produir perdues selectives de proteïnes nuclears per inestabilitat del nucli o per proteolisi. L'absència d'activitat en el homogenitzat citoplasmic, la quantificació i caracterització de les proteïnes del extracte nuclear, així com l'estabilitat de l'activitat enzimàtica a cada tipus cel.lular, permeten justificar que el mètode utilitzat no comporta aquets riscos.

Així mateix, hem comprovat la absència d'activitats nucleàsiques en cada extracte, que al produir nicks podrien relaxar directament al ADN superhelicoidal.

L'elevada activitat detectada a les cél.lules meiótiques en comparació als sigüents estadis de l'espermatogènesi i altres cél.lules somàtiques, podria guardar relació amb els processos de recombinació genètica que tenen lloc als espermatocits.

A les espermàtides rodones i allargades la disminució progressiva dels nivells d'enzim guarda bastanta proporció amb el desplaçament de la nuclihistona. Podria també correlacionarse amb la progressiva reducció que el nucleol presenta a les espermàtides.

Tot i així, la presència d'activitat topoisomerasa a cél.lules genèticament inactives com las espermàtides allargades, podria tenir un paper important en els canvis que es donen a la cromatina durant la transició nuclihistona nucliprotamina, tal com diem a la introducció.

Finalment, respecte als petits nivells d'activitat que trovem als espermatozoides madurs, es difícil assegurar que tinguin un



origen nuclear, donada la compacta estructura de la nuclioprotamina. Cal considerar si són d'origen mitocondrial, doncs aquestes organelles són especialment majoritaries en aquestes cél.lules.

#### Bibliografia

- ACKERMAN P., GLOVER C.V. i OSHEROFF N. (1985). Phosphorylation of DNA topoisomerase II by casein kinase II: Modulation of eukaryotic topoisomerase II in vitro. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 82 , 3164 - 3168.
- BIRNBOIM H.C. i DOLY J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nuc. Acids. Res. 7, 1513 - 1523.
- BONVEN B.J., GOCKE E. i WESTERGAARD O. (1985). A high affinity topoisomerase I binding sequence is clustered at DNase I hypersensitive sites in tetrahymena r-chromatin. Cell 41, 641 - 651.
- BOIX J. i ROCA J. (1984). L'elutriació com a mètode de separació de cél.lules aplicable al estudi de l'espermatogènesi del gall. Biol.Devenv. 2, 77 - 84.
- COCKERILL P.N. i GARRARD W.T. (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. Cell 44, 273 - 282.
- COLMAN A., BYERS M.J., PRIMROSE S.B. i LYONS A. (1978) Rapid purification of plasmids DNAs by hidroxiapatite chromatography. Eur. J. Biochem. 91, 303 - 310.
- DURBAN E., MILLS J.S., ROLL M. i BUSCH H. (1983). Phosphorylation of purified Novikoff hepatoma topoisomerase I. Biochem. and Biophys. Res. Com. 111, 897 - 905.
- EARNSHAW W.C. i HECK M.M. (1985). Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. The J. of Cell Biol. 100, 1716 - 1725.
- FERRO A.M. i OLIVERA B.M. (1984) Poly (ADP-ribosylation) of DNA topoisomerase I from calf thymus. The J. of Biol. Chem. 259, 547 - 554.
- FLEISCHMAN G., PFLUGFELDER G., STEINER E.K., JAVAHERIAN K., HOWARD G.C., WANG J.C. i ELGIN S.C. (1984). Drosophyla type I topoisomerase is associated with transcriptionally active regions of the genome. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 6958 - 6962.
- GELLERT M. (1981). DNA topoisomerases. Ann.Rev.Biochem 50, 879-910.



- MEZQUITA C. (1985). Chromatin: composition, estructure and function in spermatogenesis. Revisiões sobre Biologia Celular v.5. Serv. edit. Univ. Pais Vasc.
- MULLER M.T., PFUND W.P., MEHTA V.B. i TRASK D.K. (1985) Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA. The EMBO J. 4, 1237 -1243.
- RYOJI M. i WORCEL A. (1984) Chromatin assembly in xenopus oocytes: in vivo studies. Cell 37, 21 - 32.
- SAHYOUN N., WOLF M., BESTERMAN J., HSIEH T., SANDER M., Levine III H., CHANG K. i CUATRECASAS P. (1986). Protein Kinase C phosphorylates topoisomerase II: Topoisomerase activation and its possible role in phorbol ester-induced differentiation. Proc.Nat.Acad Sci.USA 83, 1603 - 1607.
- TSE-DIN Y., WONG T. i GOLDBERG A.R. (1984). Virus-and cell-encoded tyrosine protein kinases inactivate DNA topoisomerases in vitro. Nature 312, 785 - 786.
- WANG J.C. (1985). DNA topoisomerases. Ann.Rev.Biochem 54, 665-697.
- WEISBROD S. (1982). Active chromatin. Nature 297, 289-295.
- ZEHNBAUER B.A. i VOGELSTEIN B. (1985) Supercoiled loops and the organization of replication and transcription in eukaryotes. Bio Essays 2, 52-54.
- COCKERILL P.W. i BARBARO W.T. (1986). Chromosomal loop anchors in the nucleus: localization of topoisomerase II sites. Cell 44, 575 - 582.
- COLMAN A. BYERS W.J. PRINGLE S.B. i LYONS A. (1978) Rapid purification of eukaryotic DNA by hydroxyapatite chromatography. J. Biochem. 81, 103-108.
- DEAN J.M. i HAYASHI K. (1985) Purification and characterization of purified topoisomerase II. Biochem. Biophys. Res. Comm. 131, 307 - 312.
- EARNSHAW W.C. i HECK W.W. (1985). Localization of topoisomerase II in the nucleus. J. Cell Biol. 95, 118-125.
- HEGDE A. i HAYASHI K. (1985) Purification and characterization of topoisomerase I from calf thymus. The J. of Biol. Chem. 260, 517 - 521.
- REICHMAN D., FLEISHER D., BREITER E.K., JAVANBAZI K., HOFFMAN R. (1985) Topoisomerase II is associated with transcriptionally active regions of the genome. Proc Natl Acad Sci USA 81, 6255 - 6258.
- SELLETT W. (1981). DNA topoisomerases. Ann. Rev. Biochem 50, 879-910.