

Activitat de les topoisomereses I i II durant l'espermatogènesi.

J. Roca i C. Mezquita

Grup de Genètica Molecular. Fisiologia. Facultat de Medicina.  
Dep. de Ciències Fisiològiques Humanes i de la Nutrició.  
Divisió de Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona.  
Avd. Diagonal s/n. 08028 Barcelona

Abstract

Changes in DNA topoisomerase activity (I & II) during chicken spermatogenesis.

Compaction of DNA into the nucleus is accomplished through the hierarchical folding of the DNA filament by chromosomal proteins. Histones fold the DNA into nucleosomes and chromatin fibers. Other non-histone proteins, constituents of the nuclear matrix, fold the chromatin fibers into supercoiled loops. Each loop can be a topological and functional independent domain. DNA topoisomerases have been involved in DNA replication, DNA transcription, chromatin assembly and chromatin organization. During spermatogenesis, chromatin undergoes marked functional and structural changes. We have assayed the type I and type II topoisomerase activities in nuclear extracts from cells at different stages of chicken spermatogenesis. Our results show that while topoisomerase I activity is high in meiotic cells, and decreases progressively in early and advanced spermatids, high levels of topoisomerase II activity remain throughout the differentiation process. In mature spermatozoa both type of activities are extracted scantily. We suggest that type I activity may correlate with transcriptional activity during spermatogenesis and that type II activity could play a role in chromatin assembly and loop organization at the successive stages of spermatogenesis including late spermatids, where nucleohistone is replaced by nucleoprotamine.

Introducció

L'organització i compactació del DNA a l'interior del nucli cel·lular s'assoleix amb el plegament jerarquitzat de la doble hèlix del DNA mitjançant la seva interacció amb les proteïnes de la cromatina. Les histones pleguen el DNA donant lloc a la subunitat bàsica de la cromatina, el nucleosoma. Els

nucleosomes es disposen en fibres cromatíniques de 30 i 100 nm. Altres proteïnes nuclears organitzen el DNA per punts d'anclatge específics a l'interior del nucli cel.lular. D'aquesta manera el genoma queda distribuït en asses o "loops" de DNA, que poden ser considerats diferents dominis funcionals regulats topologicament de modo independent. Així doncs l'organització i l'estat topològic del DNA ens ve definit per aquells factors que estableixen el límit de cada domini, i per aquells factors que dintre de cada domini condicionen el grau d'helicitat i superenrotllament de l'hèlix de DNA. "In vivo" molts d'aquests factors són interdependents i actuen coordinadament, resultant-ne l'activitat gènica d'un determinat tipus cel.lular.

Si bé en aquests moments es coneix poc el paper funcional de les topoisomerases de DNA, és clar que aquests enzims tenen molt a veure amb les característiques topològiques i per tant funcionals de la cromatina. S'ha proposat que les topoisomerases intervenen en gairebé tots els processos que afecten a la cromatina (Gellert M., 1981; Wang J.C., 1985). "In vivo" sembla que la topoisomerasa tipus I estaria preferentment lligada als processos de transcripció (Fleishmann et al, 1984; Bonven et al, 1985; Muller et al, 1985), on possiblement actuaria relaxant l'hèlix de DNA en ser oberta per la maquinària transcripcional. El paper de la topoisomerasa tipus II sembla ser més complexe i variat. S'ha demostrat que l'enzim és imprescindible per permetre la segregació cromosòmica després de cada tanda de replicació

(Uemura i Yanagida, 1986). També hi han prou evidències de que "in vivo" la topo II indueix activament superhelicitat a l'hèlix de DNA, el que comporta l'estat de "cromatina dinàmica" descrit per Ryoji i Worcel (1985), que seria l'adient per l'inici de la transcripció o replicació del DNA (Nelson et al, 1986; Brill et al, 1987). D'altra banda s'ha trobat a la topo II com un dels principals components de la matriu nuclear (Berrios et al, 1985) i de l'esquelet cromòsomic (Earnshaw i Heck, 1985; Gasser et al, 1986), el que sugereix un paper estructural en els punts d'anclatge del DNA.

L'espermatogènesi esdevé un model de diferenciació amb tots els ingredients adients per estudiar l'activitat topoisomerasa, ja pels diferents estats funcionals pels que passa el genoma, com pels marcats canvis que hi han a l'organització i estructura de la cromatina. Amb relació específica a aquest model de diferenciació es proposa que durant la meiosi seria necessària una topo II per resoldre els "interlocks" produïts a l'iniciar-se l'aparellament sinàptic (Von Wettstein et al, 1984). Per altra banda a l'espermogènesi, no és clar quin és l'estat topològic del DNA a les espècies que reemplacen la nuclihistona per nucliprotamina (Risley S.M. et al., 1986).

Nosaltres hem utilitzat l'espermatogènesi del gall per estudiar l'activitat de les topoisomerases I i II als diferents estadis del procés de diferenciació, comparant-los també amb altres teixits. Hem posat a punt els assaigs específics per detectar l'activitat de les topoisomerases I i

II, i hem quantificat la seva presència en extractes nuclears obtinguts amb diferents forces iòniques. Hem trobat que mentre l'activitat topoisomerasa I, que és extreta decreix progressivament així que avança el procés de diferenciació (Roca J. i Mezquita C., 1986), l'activitat topoisomerasa II que extreiem és molt elevada i es manté constant durant tot el procés, deixant-se practicament d'extreure a l'espermatozoide.

### Materials i mètodes

DNA. El plasmidi pBR322 va ser preparat amb la soca HB101 d'*Escherichia Coli*, mitjançant amplificació amb cloramfenicol i lisi alcalina amb SDS. La forma superhelicoidal del plasmidi es va purificar per centrifugació en gradient de CsCl. La forma nuada de DNA del fag P4 s'obtingué per extracció fenòlica dels caps del fag P4 vir.del01. Els caps del fag es purifiquen a partir de la infecció i lisi de la soca C-177 d'*Escherichia Coli* mitjantsant la centrifugació amb un gradient de CsCl tal com descriuen Liu i Davis (1981)

Preparació dels nuclis del teixit testicular. Un cop desangnat el gall, els testicles s'extreuen ràpidament, es treu la càpsula i es trossejen breument amb tissores. El teixit es resuspen en 10 volums de solució A (2 M Sacarosa, 3.3 mM Acetat Càlcic pH 5.8, 0.01 % Tritó X-100 i 100 u/ml Trasylol) i és homogenitzat amb un èmbol de tefló. Un cop filtrat amb Miracloth els nuclis es sedimenten a 52.800 g. durant 60 min. amb un rotor Beckman SW27. Els sediments nuclears es resuspenen amb 10 volums de solució B (com la solució A però amb 12 % Sacarosa). Tot el procés té lloc a 0-4°C.

Preparació dels nuclis d'espermatozoides. El semen s'obté dels vasos deferents del gall, es dilueix amb 10 volums de solució A i els nuclis dels espermatozoides es preparen tal com els testiculars.

Preparació dels nuclis d'eritròcit i d'hepatòcit. La sang del gall es recull directament en un volum de solució C (10 mM Citrat Sòdic pH 7.5 i NaCl 150 mM), els eritròcits es sedimenten i es resuspenen amb 10 volums de solució A. Seguidament els nuclis es preparen com els testiculars. El fetge del gall s'extreu i es desangna per perfusió portal amb la solució C, i a continuació el teixit es tracte com el teixit testicular. A cada tipus de teixit l'homogeneïtzació i el grau de

disrupció cel.lular es controlen per microscopia de contrast de fase.

Separació dels nuclis testiculars. La separació es duu a terme per sedimentació a 1 g. (Mezquita i Teng, 1976) o bé pel sistema de centrifugació contra fluxe (Boix i Roca, 1984).

Preparació dels extractes nuclears. Cada sediment nuclear obtingut dels diferents teixits o de les diferents fraccions d'una separació es resuspenen amb la solució B, els nuclis es contenen, i 10<sup>8</sup> nuclis es sedimenten per iniciar el procés d'extracció. Totes les solucions utilitzades són a 0-4°C. i contenen: 1mM PMSF, 0.1 mM Leupeptin, 100 u/ml Trasylol, 10 mM B-mercaptoetanol i 0.5 mM DTT.

Els nuclis es resuspenen amb 1000 ul de solució L (40 mM Tris pH 7.5 i EDTA 4 mM), a continuació s'hi afegeixen 200 ul de solució H (2.4 M KCl i Tris 40 mM pH 7.5), s'agita la mescla suaument durant 10 min. i es centrifuga a 5000 g. 15 min. El sobrenedant obtingut es barreja amb un volum de glicerol al 100% i es conserva a -40°C. Aquest seria l'extracte de baixa força iònica. El sediment es resuspen amb 200 ul de solució L, a continuació s'hi afegeixen lentament 1000 ul de solució H i la mescla es sonica durant 10 seg (60 w). El DNA resultant es precipita amb l'adició de 600 ul de solució P (16 % Polietilenglicol, 2M KCl i Tris 40 mM pH 7.5) i es sedimenta a 15000 g durant 25 min..El sobrenedant obtingut es barreja amb un volum de glicerol al 100 % i es conserva a -40°C.. Aquest seria l'extracte d'alta força iònica

Assaigs d'activitat topoisomerasa i quantificació. Les reaccions per mesurar l'activitat de la topoisomerasa I tenen lloc a 37°C. durant 30 min en un volum de reacció de 20 ul que conté: Tris 40 mM pH 7.5, KCl 100 mM, DTT 0.5 mM, 30ug/ml BSA, 0.4 ug del plasmidi pBR322 (forma I) i 2 ul de l'extracte a assajar, preparat mitjançant dilucions seriades de cada extracte nuclear.

Les reaccions per mesurar l'activitat de la topoisomerasa II tenen lloc en les mateixes condicions que la topo I, però amb l'adició d'ATP 1 mM i Magnesi 10 mM en el medi de reacció i la utilització de 0.4 ug de P4-DNA (forma nuada) en lloc del plasmidi.

Les reaccions s'aturen afegint-hi 5 ul de SDS 5 %, EDTA 50 mM i 0.25 mg/ml de Blau de bromofenol. Els productes de les reaccions s'analitzen per migració electroforètica dels topoisòmers del DNA en gels d'agarosa al 0.6 o 0.8 % amb tampó TBE pH 8.3. Els gels un cop tenyits amb bromur d'etidi (1 ug/ml) es destenyeixen amb aigua i es fotografien sota il.luminació U.V.. Mitjançant l'escandallatge dels negatius mesurem la quantitat i distribució dels topoisòmers de DNA.

Nosaltres definim una unitat de topoisomerasa I a la quantitat d'enzim necessari per relaxar el 50% del plasmidi

pBR322, i definim una unitat de topoiomerasa II a la quantitat d'enzim necessari per desnudar el 50% del P4-DNA en les condicions de reacció que utilitzem.

### Resultats

Obtenció i separació de nuclis. El mètode d'obtenció de nuclis s'ha aplicat a tots els tipus cel·lulars, el que fa més comparables els resultats. Així mateix la purificació dels nuclis amb un medi d'alta densitat minimitza d'entrada la contaminació citoplasmàtica.

La separació de nuclis testiculars realitzada per sedimentació a 1 g. permet obtenir quatre fraccions nuclears corresponents a: cèl. meiòtiques, cèl. premeiòtiques, espermatides rodones i espermatides allargades. Alternativament en alguns experiments hem utilitzat el sistema de centrifugació contra fluxe (elutriació) per separar els nuclis, obtenint poblacions morfològicament comparables a les del primer mètode però amb la ventatja del molt més reduït temps de separació.

Preparació dels extractes nuclears. El procediment d'obtenció d'extractes seqüencialment a baixa i alta força iònica té la finalitat de coneixer el grau d'internalització dels enzims a la cromatina. La presència en tot moment de tres inhibidors de proteases i d'agents reductors, així com la conservació amb glicerol a  $-40^{\circ}\text{C}$ . ens garantitza l'estabilitat del enzims. Hem comprovat que els extractes mantenen les activitats topoisomèriques durant més de sis mesos en aquestes condicions.

Assaigs específics per les activitats topoisomèriques.

L'assaig d'activitat per la topoisomerasa I consisteix en la relaxació d'un DNA superhelicoidal en absència d'ATP i Magnesi (Roca i Mezquita, 1986). L'assaig d'activitat topo II consisteix en la traslocació d'una hèlix de DNA a través del trencament transitori d'una altra hèlix de DNA en presència d'ATP i Magnesi. Nosaltres hem preparat com a substrate un DNA circular nuat, en el que l'activitat de la topoisomerasa II pot eliminar un a un tots els nusos fins deixar la forma circular sencilla. Les formes circulars nuades i les circulars sencilles les distingim per la seva diferent migració electroforètica (Roca i Mezquita 1987). Aquest DNA nuat l'obtenim d'un fag, que es caracteritza per tenir un DNA de 11 Kb amb extrems enganxosos, de manera que durant el procés d'ensamblatge de la càpside hi ha un moment en que aquests extrems poden unir-se a l'atzar dins del petit espai del cap del fag, el que deixa el DNA circularitzat però altament nuat (Liu i Davis, 1981).

Mesura de les activitats específiques de les topoisomerases I i II als extractes nuclears de diferents teixits del gall. A la figura 1 es representen els nivells relatius d'activitat específica de les topoisomerases I i II (unitats/DNA nuclear) que mesurem als nuclis de testicle matur (T), espermatozoides (S), eritròcits (E) i hepatòcits (H) del gall. També s'hi representen les activitats extremes a baixa (O) i alta (●) força iònica. Les condicions d'assaig i quantificació es descriuen als mètodes. Cada punt mesurat resulta de la mitjana de tres experiments independents. Ja que l'activitat

específica de les topoisomerases és molt alta en els extractes crus, cal diluir-los inclús mil vegades per mesurar l'activitat. Això permet minimitzar la interferència d'altres proteïnes durant la reacció.

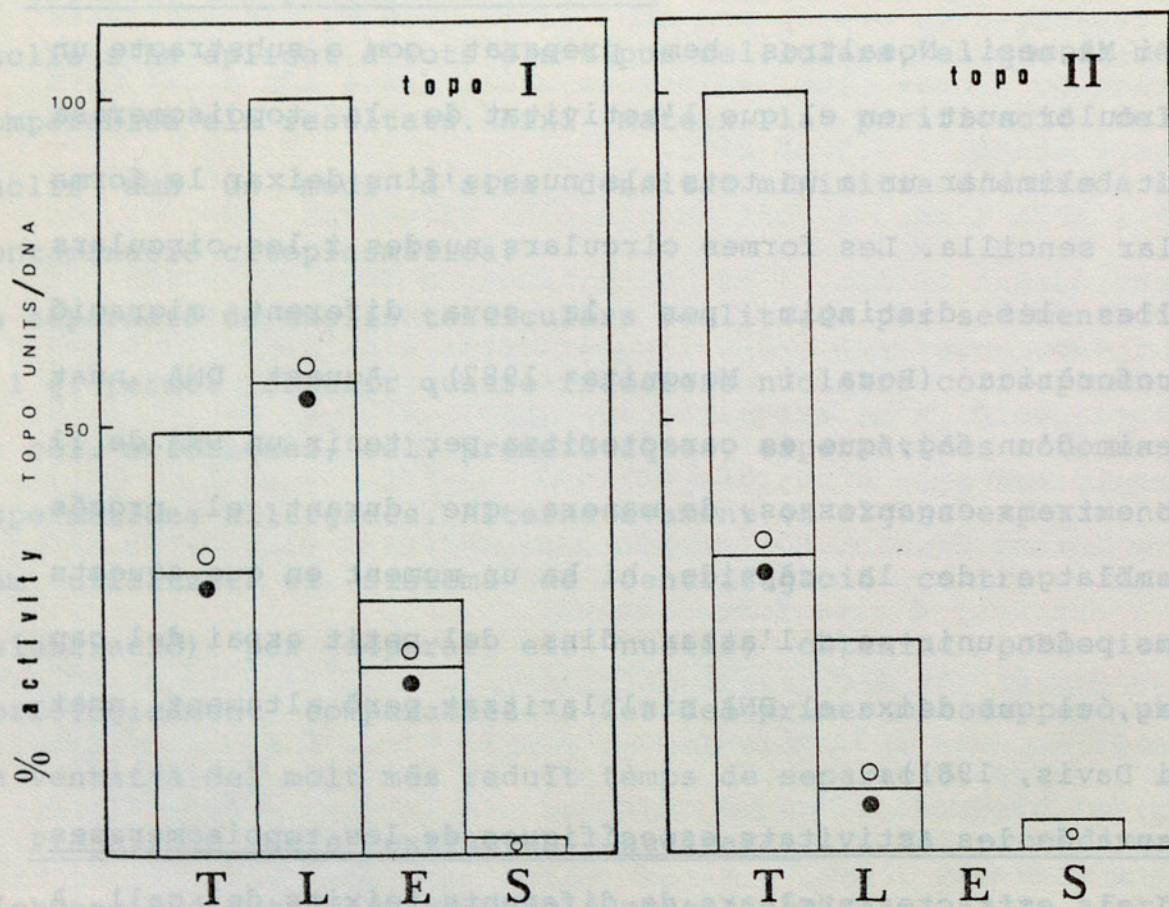


Figura 1. Explicació en el text.

Mesura de les activitats específiques de les topoisomerases I i II als extractes nuclears corresponents a diferents estadis de l'espermatogènesi. La figura 2 representa els nivells relatius d'activitat als extractes nuclears corresponents a: (1) cèl. meiòtiques, (2) cèl. premeiòtiques, (3) espermàtides rodones i (4) espermàtides allargades. Cada



punt dels gràfics és la suma de l'activitat extreta a baixa i alta força iònica, i és la mitjana de cinc experiments independents.

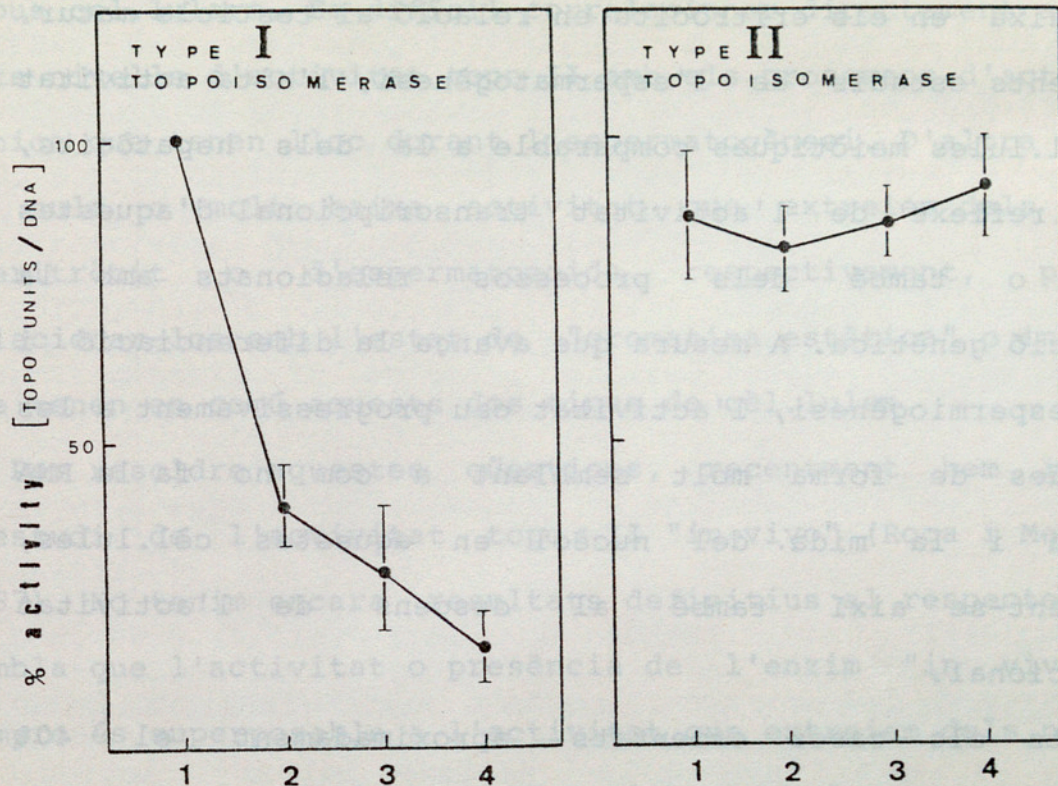


Figura 2. Explicació en el text

### Discussió

Els nivells d'activitat topoisomerasa mesurats al nostre laboratori corresponents a diferents tipus cel.lulars mostren com l'activitat topoisomerasa I en els extractes nuclears del testicle matur són en conjunt superiors als dels eritròcits i inferiors als dels hepatòcits. Durant l'espermatogènesi la màxima activitat la trobem a la fracció de cèl.lules meiòtiques, l'activitat és menor i decreix progressivament a mida que té lloc l'espermioogènesi, i s'extreu mínimament de

l'espermatozoide matur. Aquests resultats estarien molt d'acord amb la proposada vinculació de la topoisomerasa I i l'activitat transcripcional. En els hepatòcits seria més alta i més baixa en els eritròcits en relació al testicle matur. Als diferents estadis de l'espermatogènesi, l'alta activitat de les cel.lules meiòtiques comparable a la dels hepatòcits, pot ser reflexe de l'activitat transcripcional d'aquestes cèl.lules o també dels processos relacionats amb la recombinació genètica. A mesura que avança la diferenciació i durant l'espermioogènesi, l'activitat cau progressivament a les espermatides de forma molt semblant a com ho fa la RNA polimerasa i la mida del nuclèol en aquestes cèl.lules, corresponent-se així també al descens de l'activitat transcripcional.

En tots els casos esmentats aproximadament el 40% d'activitat topo I s'extreu a baixa força iònica i el 60% restant a alta. Dels nuclis d'espermatozoide s'extreu a baixa força iònica una mica d'activitat topo I. Es difícil interpretar el sentit d'aquest resultat.

En quan als nivells d'activitat de la topoisomerasa II, crida l'atenció en primer lloc l'elevada activitat que s'extreu del nuclis de testicle matur en comparació a la dels nuclis d'hepatòcit, no extreient-se en canvi en absolut dels nuclis d'eritròcit. En segon lloc, a diferència dels nivells de topo I, l'activitat topo II extreta es manté elevada i gairebé constant en tots els estadis de l'espermatogènesi, incluint-hi les espermatides més avançades, però deixant-se

d'extreure practicament en els espermatozoides. Observem també que l'activitat topo II s'extreu, en comparació a la topo I, més fàcilment a baixa força iònica de forma similar a tots els tipus cel·lulars. És difícil correlacionar directament aquests alts nivells d'activitat topo II amb els processos d'activitat gènica que tenen lloc durant l'espermatogènesi. D'altra banda, la nula o molt baixa activitat que extreiem dels nuclis d'eritròcit o d'espermatozoide respectivament, podríem relacionar-los amb l'estat de "cromatina estàtica" o inactiva que tenen en comú aquests dos tipus de cèl·lules.

Per resoldre aquestes qüestions, recentment hem iniciat l'estudi de l'activitat topo II "in vivo" (Roca i Mezquita 1987). No tenim encara resultats definitius al respecte, però sembla que l'activitat o presència de l'enzim "in vivo" no sempre és superposable a l'activitat que extreiem dels nuclis. Considerant que a la topo II se l'ha trobada com a component important de la matriu nuclear i de l'esquelet cromosòmic, nosaltres pensem que el que mesurem en els nostres extractes seria un "pool extraïble" de l'enzim, amb activitat funcional elevada, possiblement en relació als processos de reorganització gènica que tenen lloc durant la meiosi i les divisions meiótiques, i més endavant, considerant l'elevada presència d'enzim a les espermàtides no es pot descartar que tingui un paper important en la transició nuclihistona-nucliprotamina, possiblement modulant la topologia del DNA. Per altra banda hi hauria un "pool no extraïble" d'enzim amb una funció estructural no menys

important: la topo II, formant part de la matriu nuclear o l'esquelet cromosòmic, es juntaria potser covalentment a seqüències específiques del DNA (Cockerill i Garrard, 1986) definint així l'organització en asses del genoma a cada tipus cel.lular. Una qüestió a respondre és si aquests dos "pools" d'enzim varien i es regulen independentment, o bé són interconvertibles, sent llavors la quantitat global de topo II sempre la mateixa. Molt bé podria ser que en els espermatozoides s'hi trobés un "pool no extraïble" de topo II amb la missió de programar anticipadament l'organització del genoma durant l'embriogènesi.

#### Bibliografia

BERRIOS, M., OSHEROFF, N., i FISHER, P.A. (1985). In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82, 4142-4146.

BOIX, J., i ROCA, J. (1984). L'elutriació com a mètode de separació de cel.lules aplicable a l'estudi de l'espermatogènesi del gall. Biol.Desenv 2, 77-84

BONVEN, B.J., GOCKE, E., i WESTERGAARD, O. (1985). A high affinity topoisomerase I binding sequence is clustered at DNAase I hypersensitive sites in tetrahymena R-chromatin. Cell 41, 541-551

BRILL, S.T., DINARDO, S., VOELKEL-MEIMAN, K., i STERNGLANZ, R. (1987). Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication and transcription of ribosomal DNA. Nature 326, 414-416

COCKERILL, N.P., 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

EARNSHAW, W.E., i HECK, M.M.S. (1985) Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. J. of Cell. Biol. 100, 1716-1725

FLEISCHMANN, G., PFLUGFELDER, G., STEINER, E.K., JAVAHERIAN, K., HOWARD, G.C., WANG, J.C., i ELGIN S.C.R. (1984). *Drosophila* DNA topoisomerase I is associated with transcriptionally active regions of the genome. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 6958-6962

GASSER, S.M., LAROCHE, T., FALQUET, J., BOY DE LA TOUR, E., i LAEMMLI, U.K. (1986). Metaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II. J.Mol.Biol. 188, 613-629.

LIU, L.F., i DAVIS, J.C. (1981). Novel topologically knotted DNA from Bacteriophag P4 capsids: studies with DNA topoisomerases. Nuc.Acid.Res. 9, 3979-3989.

MEZQUITA, C., i TENG, C.S. (1976) Changes in nuclear and chromatin composition and genomic activity during spermatogenesis in maturing rooster testis. Biochem.J. 164, 99-111

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

NELSON, W.G., LIU, L.F., i COFFEY, D.S. (1986). Newly replicated DNA is associated with DNA topoisomerase II in cultured rat prostatic adenocarcinoma cells. Nature 322, 187-189

ROCA, J., i MEZQUITA, C. (1986). Estudi de l'activitat topoisomerasa durant l'espermatogènesi del gall. Biol Desenv. 4, 27-36

ROCA, J., i MEZQUITA, C. (1987). Metodologia per l'estudi de l'activitat topoisomerasa. Biol. Mol. IV, 19-22

RYOJI, M., i WORCEL, A. (1984) Chromatin assembly in xenopus oocytes. Cell 27, 21-32.

RISLEY, M.S., EINHEBER, S., i BUMCROT, D.A. (1986). Changes in DNA topology during spermatogenesis. Chromosoma 94, 217-227.

UEMURA, T., i YANAGIDA, M. (1986). Mitotic spindle pulls but fails to separate chromosomes in type II DNA topoisomerase mutants: uncoordinated mitosis. The EMBO J. 5, 1003-1010

VON WETTSTEIN, D., RASMUSSEN, S.W., i HOLM, P.B. (1984) The synaptonemal complex in genetic segregation. Ann.Rev.Genet 18, 331-413