

043
US
CDR
P1

POLI-ADP-RIBOSILACIÓ I CONTINGUT DE NAD DURANT LA DIFERENCIACIÓ DE LA LÍNIA GERMINAL ESPERMATOGÈNICA.

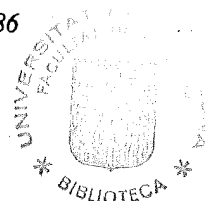
Memòria presentada per optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques, realitzada per Montserrat Coromines i Guiu, sota la direcció del Dr. Cristóbal Mezquita i Plà, en el Departament de Fisiologia i Bioquímica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

V.P.

Montserrat Coromines i Guiu

Cristóbal Mezquita i Plà

Barcelona, 10 de Novembre del 1986



Les cèl.lules primordials o gonòcits, d'origen extragonadal, es col.loquen al testicle primitiu i es multipliquen per donar lloc als espermatogonis, cèl.lules ancorades a la membrana basal dels túbuls seminífers.

Els espermatogonis tipus A són cèl.lules grans amb un nucli ovoide i una cromatina homogènia. Després de successives generacions aquestes cèl.lules originen els espermatogonis tipus B, que tenen un nucli esfèric més petit i quantitats en augment d'heterocromatina. La duració de la fase S s'incrementa des dels espermatogonis tipus A als B. Durant la maduració sexual a la pubertat, la població d'espermatogonis, diploid, es divideix i diferencia cap a espermatòcits, que són tetraploids.

Els espermatòcits primaris resulten de la divisió dels espermatogonis tipus B. La major part de la síntesi de DNA té lloc en aquest estadi, i la seva duració és considerablement més llarga que als espermatogonis. Els espermatòcits primaris són, doncs, molt més nombrosos que els espermatogonis i formen una capa molt més gruixuda. Aquests espermatòcits se separen de la membrana basal i passen al compartiment adluminal, que està separat del basal per les unions existents entre les cèl.lules de Sertoli. El seu nucli és esfèric, amb un diàmetre de $6 \mu\text{m}$ i un volum de $110 \mu\text{m}^3$ (4 vegades el de les espermatides rodones). Al paquetè la cromatina es torna fibrilosa, de manera que s'observen fibres de 30 nm al microscopi electrònic. Aquestes fibres s'estenen formant "loops" perpendiculars als elements laterals del complex sinaptinèmic. Durant la transició de paquetè a diplotè hi ha una marcada descondensació de la cromatina.

Els espermatòcits secundaris, més petits que els primaris però més grans que les espermatides, es troben en baixa quantitat a causa de la seva ràpida divisió. Aquests espermatòcits, a l'igual que altres cèl.lules premeiòtiques, meiòtiques i postmeiòtiques, estan connectats per ponts intracel.lulars.

Els espermatòcits entren en meiosi per produir espermatides haploids, cèl.lules que sense cap més divisió comencen un procés de metamorfosi anomenat espermiogènesi per a esdevenir vectors mòbils altament especialitzats per al transport d'informació genètica, els espermatozoides.

A les espermatides rodones el nucli encara és esfèric, amb un volum de $25 \mu\text{m}^3$, mentre que als espermatozoides és allargat ($11 \mu\text{m}$ de llarg $0.5 \mu\text{m}$ de diàmetre) i té un volum de $2 \mu\text{m}^3$ (McIntosh i Porter, 1967). L'estructura de la cromatina de les espermatides rodones és similar a la dels nuclis de les cèl.lules somàtiques. Les espermatides allargades, en canvi, tenen una cromatina amb unes característiques molt particulars:

- aspecte uniforme sense regions eucromàtiques ni heterocromàtiques.
- relaxació de la seva estructura amb l'aparició de llocs d'unió al DNA, determinats per la iniciació de la transcripció per la RNA polimerasa in vitro i unió d'actinomicina D (Mezquita i Teng, 1977a,b).

Al final de l'espermioogènesi té lloc una condensació massiva de la cromatina, de manera que el DNA s'empaqueta en un volum molt petit al cap dels espermatozoides, inaccessible a l'actinomicina D (Mezquita i Teng, 1977a,b).

Els canvis a nivell estructural de la cromatina van acompanyats de canvis en la seva composició. Els més destacables són els següents:

- Als estadis inicials de l'espermatogènesi la relació entre proteïnes bàsiques i DNA es manté constant als voltants de la unitat, mentre que es redueix aproximadament a la meitat en els estadis finals (espermàtides allargades i espermatozoides) (Mezquita i Teng, 1977a).
- La proporció de les diferents histones no es modifica significativament al llarg de l'espermatogènesi del gall (Mezquita i Teng, 1977a).
- Una hiperacetilació de la histona H4 té lloc als últims estadis. El recanvi de grups acetil és, però, molt elevat a totes les fraccions (Oliva i Mezquita, 1982). A les espermàtides allargades s'aprecia, també, un augment d'un conjugat d'ubiquitina (Agell et al., 1983; Agell, 1986).
- La protamina, una proteïna molt bàsica rica en arginina i amb molta més mobilitat que les histones, apareix al patró electroforètic de proteïnes bàsiques de les espermàtides més avançades. Als espermatozoides madurs les histones han estat desplaçades i la protamina és l'única proteïna bàsica present a la cromatina.
- El contingut en proteïnes no-histones és elevat als espermatogonis i espermatòcits, però comença a decaure a les espermàtides primitives per a disminuir dràsticament a les espermàtides allargades.
- Els nivells de RNA també decreixen al llarg de l'espermatogènesi, de 0.21 i 0.23 a les cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques fins a 0.17 a les espermàtides rodones i 0.10 i 0.09 al nucli de les espermàtides allargades i espermatozoides (Mezquita i Teng, 1977 a).

Respecte als canvis en les funcions de la cromatina durant l'espermatogènesi s'ha d'assenyalar:

- La replicació del DNA té lloc als espermatogonis i espermatòcits en estadi de preleptotè. Un petit percentatge de DNA es replica a les cèl.lules meiòtiques al zigotè i paquitè. L'activitat de trencament i unió del DNA que es troba al paquitè està probablement relacionada amb la recombinació genètica. Els espermatòcits estan programats per realitzar una síntesi de reparació dels "nicks" produïts per l'endonucleasa meiòtica en seqüències específiques del DNA (PsDNA) a l'esmentat estadi (Hotta i Stern, 1984).

Una síntesi no programada de DNA té lloc, però, al llarg de tota l'espermatogènesi, incloent les espermatides més avançades abans de la condensació final de la cromatina. Aquesta síntesi no programada o de reparació s'ha descrit a les cèl.lules de la línia germinal masculina després del tractament amb agents mutàgens (Sega, 1974; Lahdetie et al., 1983). L'estructura de la cromatina genèticament activa pot fer esdevenir el DNA susceptible als mutàgens. Una susceptibilitat similar s'observa durant els canvis estructurals que experimenta la cromatina a l'espermioogènesi.

- Els espermatogonis, espermatòcits i espermatides primitives són actius en transcripció nuclear, mentre que les espermatides en diferenciació i els espermatozoides són totalment inactius. La incorporació de ^3H -uridina en el RNA dels nuclis de cèl.lules testiculars del gall es troba només en els primers estadis, però és pràcticament indetectable a partir de la fase d'espermatides allargades (Mezquita i Teng, 1977a). L'activitat de la RNA polimerasa en testicle de ratolí és absent també als últims estadis de l'espermioogènesi (Monesi, 1971; Tres i Kierszbaum, 1975; Geremia et al., 1977).

A nivell citoplasmàtic un dels primers esdeveniments de l'espermioogènesi és la formació de la vesícula acrosomal en la regió de l'aparell de Golgi del citoplasma de les espermatides rodones. La vesícula augmenta de volum i densitat i es col.loca a un extrem de la cèl.lula i adquireix, així, una estructura semblant a una caputxa, l'acrosoma, que conté els enzims necessaris per penetrar la zona pel.lúcida de l'òvul.

La formació del flagel comença també a l'inici de l'espermioogènesi a partir d'un centriol del parell localitzat prop del complex de Golgi. Les mitocòndries adopten una disposició helicoidal que delimita la peça intermèdia de l'espermatozoide.

Associat amb el desplaçament del nucli cap a la perifèria del citoplasma de les espermatides, un conjunt de microtúbuls citoplasmàtics envolten el nucli. La major part del citoplasma d'aquestes espermatides es perd durant el procés d'alliberament de les cèl.lules de Sertoli que les envolten (espermiació). Aquestes cèl.lules intervenen d'una manera activa en el procés en fagocitar el citoplasma residual (cossos residuals) i degradar-lo mitjançant l'acció dels lisosomes (Courot et al., 1970).

L'espermatogènesi ofereix un bon model per investigar la relació entre el metabolisme de la poli(ADP-ribosa) i els canvis estructurals i funcionals que experimenta la cromatina durant el procés de diferenciació.

D'una banda, pot permetre establir una connexió entre la poli(ADP-ribosilació) i algun estadi particular de la diferenciació: -Si és necessària la pèrdua de modificació perquè les cèl.lules es diferenciïn, és raonable esperar una caiguda en la incorporació d'ADP-ribosa o en el contingut de polímer, tal com s'ha demostrat a d'altres sistemes (Ueda et al., 1983; Lucas et al., 1984). -Si, al contrari, es necessita la presència de poli(ADP-ribosilació) perquè es pugui donar la diferenciació (Farzaneh et al., 1982; Johnstone i Williams 1982), es trobarà un augment de la modificació al llarg de l'espermatogènesi.

D'altra banda, si és certa la hipòtesi que els agents mutàgens o els que danyen el DNA produeixen un increment en l'activitat enzimàtica, es podrà comprovar clarament a les espermatides genèticament inerts, on no tenen lloc ni ruptures ni unions fisiològiques del DNA.

La modificació de les proteïnes per poli(ADP-ribosilació) s'ha estudiat in vitro als nuclis de cèl.lules testiculars de truita (Wong et al., 1977; Levy-Wilson, 1981) i també al testicle total de ratolí in vivo (Faraone-Menella et al., 1982; Faraone-Menella et al., 1984). Tanmateix no existeixen dades, fins al moment, que permetin establir correlacions entre aquesta modificació i els diferents estadis de diferenciació que es troben durant l'espermatogènesi.

MATERIALS I MÈTODES

2.1. SEPARACIÓ DE CÈL.LULES TESTICULARS DE GALL

Aquest treball ha estat realitzat amb galls de la raça "Hubbard White Mountain" de 25-30 setmanes d'edat procedents de l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

2.1.1. Obtenció de cèl.lules testiculars

El mètode de preparació de la suspensió cel.lular a partir d'un teixit sòlid com és el testicle cal que permeti obtenir un màxim de cèl.lules individuals intactes i redueixi l'agregació entre elles. Si aquesta suspensió s'obté en un medi sense cations divalents i es tracta amb tripsina i DNasa I s'aconsegueix minimitzar l'agregació i destruir les cèl.lules danyades. La tripsina hidrolitza els glicopèptids que estan específicament involucrats en l'adhesió de les cèl.lules (Miestrich, 1977).

El procediment per obtenir les cèl.lules testiculars ha estat el següent:

- un cop mort el gall, per dislocació cervical, se'l sagna per secció dels vasos jugulars
- immediatament s'extrauen els testicles, es pesen i se separa la túnica albugínia
- es trosseja finament el teixit amb unes tisores durant uns 5 minuts a temperatura ambient
- se'l col.loca en 10 volums de medi de cultiu que conté 0.1% (p/v) tripsina (Gibco) i 2 µg/ml DNasa I (Sigma) i s'incuba a 31 °C durant 30 minuts en un bany amb agitació moderada

Medi de cultiu: minimum essential medium (Eagle's)

hepes 25 mM

pH 7.4 (ajustat amb NaOH)

- es filtra a través de gasa o niló, però sense forçar-ho
- se centrifuga a 1660*g (3000 rpm) durant 20 minuts a temperatura ambient en en rotor Beckman JS 7.5
- es descarta el sobrenedant i es resuspèn el sediment de cèl.lules amb una vareta de vidre en un medi de cultiu que conté 0.02% (p/v) inhibidor de la tripsina (Koch-light) i 1 mg/ml albúmina del sèrum boví (Boehringer)
- s'incuba durant 10 minuts a temperatura ambient i es filtra de nou a través de gasa

- es dilueix en PBS (tampó fosfat lliure de Mg^{++} i Ca^{++}), al qual s'ha afegit 0.1% (p/v) glucosa, fins a la concentració de cèl.lules desitjada

Solució tampó PBS: Na Cl 0.14 M
K Cl 2.7 mM
 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 6.7 mM
 KH_2PO_4 1.5 mM
el pH ha d'ésser 7.4

Els espermatozoides madurs s'obtenen directament del conducte deferent.

2.1.2. Separació de cèl.lules testiculars per sedimentació a força de gravetat unitat

El mètode emprat ha estat el prèviament descrit per Oliva et al. (1982).

El principi d'aquesta separació es basa en el fet de deixar sedimentar una suspensió cel.lular en una solució tampó, el PBS (vegeu secció 2.1.1). El sistema s'estabilitza per un gradient de glicerol dissolt en PBS (1.5-3-6%) que evita que les cèl.lules es barregin com a conseqüència dels corrents de convecció.

Les diferències de volum són el factor principal en la separació de cèl.lules testiculars d'acord amb la seva velocitat de sedimentació sota l'acció del camp gravitacional terrestre (1g).

La velocitat de sedimentació es calcula segons la llei de Stoke (Meistrich, 1977):

$$S = \frac{(\rho_p - \rho_f) v^{2/3} g}{\eta f}$$

on s: velocitat de sedimentació de la partícula

ρ_p : densitat de la partícula

ρ_f : densitat del fluid

v: volum de la partícula

g: acceleració de la gravetat

η : viscositat del fluid

f: coeficient de fricció

L'aparell per a la sedimentació consta bàsicament del sistema creador de gradient (vasos A, B i C), d'una xeringa per a introduir la mostra que a la vegada és una trampa per a les bombolles d'aire i d'una cambra de sedimentació cilíndrica de 28 cm de diàmetre (fig.2.1). Tant els vasos com la cambra estan col.locats en fred durant tot el procés de sedimentació.

El vas A s'omple amb 2 litres de glicerol al 6%, el vas B amb el mateix volum de glicerol al 3% i el vas C amb 250 ml de glicerol a l'1.5%.

Les cèl.lules s'introdueixen a la cambra diluïdes amb PBS que conté 0.1% glucosa fins a una concentració de $16 \cdot 10^6$ cèl/ml. 80 ml d'aquesta suspensió es col.loquen a la xeringa, a través de la qual s'han introduït prèviament a la cambra 100 ml de PBS. Immediatament es comença a formar el gradient que al principi ha de tenir un flux de formació lent, aproximadament 10 ml/min.

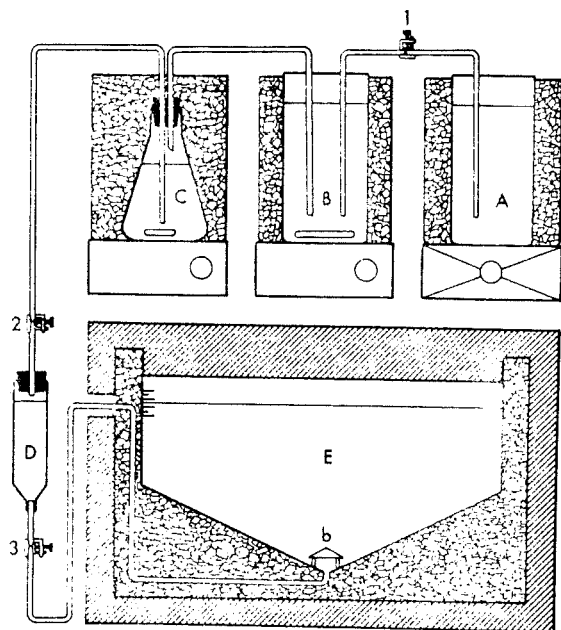


Fig.2.1- Aparell de sedimentació a gravetat unitat

- Vasos A, B i C- sistema creador de gradient
- D- xeringa per a introduir la mostra que serveix, a la vegada, de trampa per les bombolles d'aire
- E- cambra de sedimentació cilíndrica.

El temps total de separació és de 300 minuts, una vegada que han entrat les cèl.lules a la cambra.

En buidar la cambra es rebutgen els primers 1500 ml i el volum restant es recull en fraccions de 25 ml. La concentració de les cèl.lules de cada fracció es detecta en mesurar la D.O. a 600 nm, i els valors així obtinguts es representen en funció de l'ordre de sortida de cada fracció.

Un cop obtingut el perfil de separació les fraccions s'agrupen en fraccions superiors que representen cèl.lules en diferents estadis de l'espermatogènesi i tenen per tant una velocitat de sedimentació diferent.

El microscopi de contrast de fases permet concloure la puresa i l'adequada separació dels tipus cel.lulars.

Hem distingit les fraccions cel.lulars següents:

- estadis I i II - cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques, que tenen una velocitat de sedimentació ≥ 4 mm/h, d'acord amb les seves diferències en la mida
- estadi III - espermàtides rodones, amb velocitat de sedimentació en la regió de 2-4 mm/h
- estadi IV - espermàtides allargades, que mostren una velocitat de sedimentació entre 1-2 mm/h i cossos residuals
- estadi V - espermatozoides madurs, amb una velocitat de sedimentació de 0.5-1 mm/h

2.1.3. Separació de cèl.lules per elutriació

El mètode de separació de cèl.lules per elutriació va ésser descrit per Meistrich (1977) i ha estat posat a punt al nostre laboratori per Boix i Roca (1984).

Aquest mètode consisteix bàsicament en l'oposició d'una força centrífuga determinada a un flux de líquid. De l'equilibri d'ambdues forces resulta que les partícules de mides diferents formen bandes ben definides. Les bandes es poden visualitzar a través d'un sistema estroboscòpic (fig.2.2).

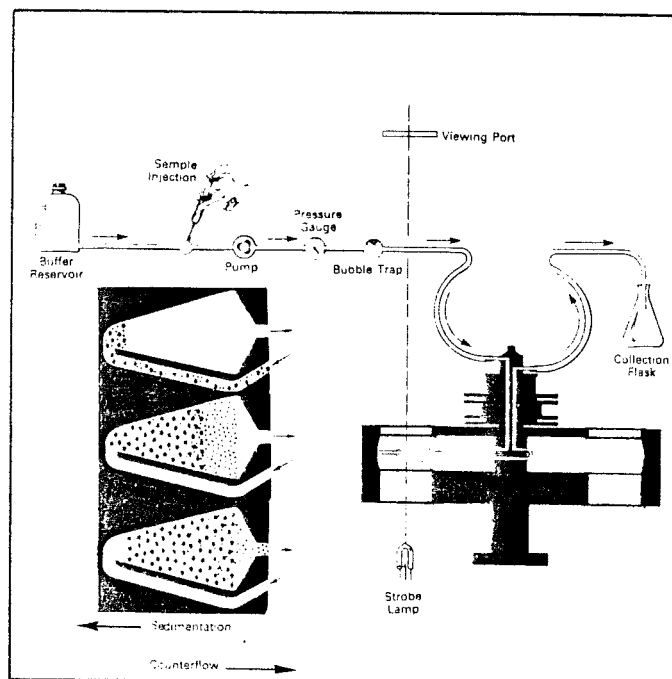


Fig.2.2- Elements bàsics del sistema d'elutriació (Beckman Instruments).

En incrementar el flux es produeix el desplaçament de les bandes en equilibri. Quan aquestes arriben a les parets convergents de la sortida de la cambra escapen de la força centrífuga i poden ésser recollides així que surten de l'aparell.

La mostra amb una concentració de $5 \cdot 10^8$ cèl.lules en PBS i 0.1% glucosa s'introdueix al rotor d'elutriació JE-6B col.locat en una centrífuga Beckman J2-21 i immediatament es comencen a recollir les fraccions.

El flux s'augmenta en relació al diàmetre o velocitat de sedimentació a lg de les partícules segons la fórmula:

$$F = D^2 \times X \times \left(\frac{\text{rpm}}{1000} \right)^2$$

on F: flux en ml/min

D: diàmetre de la partícula

X: constant de Sanderson (0.0378)

rpm: revolucions per minut del rotor

La determinació per microscòpia de contrast de fases permet determinar la puresa i homogeneïtat de les poblacions cel.lulars obtingudes.

A 3000 rpm s'obtenen els fluxs següents que corresponen a tipus cel.lulars diferents:

- flux = 3 ml/min - espermatozoides i residus subcel.lulars
- flux = 11 ml/min - espermàtides allargades i cossos residuals
- flux = 19 ml/min - espermàtides rodones (amb una contaminació màxima d'un 20% d'espermàtides allargades)
- flux \leq 37 ml/min - cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques

2.2. AÏLLAMENT DE NUCLIS

Els mètodes d'aïllament utilitzats consisteixen en l'homogeneïtzació de les cèl.lules en uns medis que contenen petites quantitats de ions divalents per evitar la fragmentació i reduir la tendència a l'agregació. La separació dels nuclis del material extranuclear es fa mitjançant centrifugació.

A causa que els nuclis de les cèl.lules testiculars tenen molta activitat proteolítica associada, hem utilitzat diferents inhibidors de proteases com són: fluorur de fenil-metil-sulfonat o PMSF (inhibidor de serinproteases), bisulfít sòdic (agent oxidant i que baixa el pH a 6), aprotinina (inhibidor de tiolproteases), leupeptin i benzamidina.

Durant tot el procés la temperatura està compresa entre 0°C i 4°C i es redueix al màxim el temps de manipulació.

Els detergents afegits al medi d'homogeneïtzació solubilitzen i dispersen el material extranuclear. Hem utilitzat el tritó X-100 o bé el nonidet P-40.

El protocol seguit és el següent:

- s'homogeneïtzen les cèl.lules en 5 volums de la solució de sacarosa amb un homogeneïtzador de vidre/teflon
solució de sacarosa:

tris-HCl	25 mM
MgCl ₂	10 mM
sacarina	250 mM
tritó X-100	0.1 %
(o nonidet P-40	0.05 %)
pH 7.5	

- se centrifuga durant 7 minuts a 1660*g (3000 rpm) en un rotor baculant

- es torna a homogeneïtzar el sediment amb la mateixa solució de sacarosa

- se centrifuga a 1660*g durant 7 minuts en gradient discontinu de sacarosa 0.25M/0.88M construït manualment

- es recull el sediment de nuclis i es controla l'estat de preservació i puresa per microscòpia de contrast de fases

En el cas de l'aïllament de nuclis per a l'obtenció de DNA s'ha utilitzat el mètode de l'àcid cítric (Mezquita i Teng, 1977a) per tal de minimitzar l'acció de les nucleases. El protocol és el descrit anteriorment excepte pel medi utilitzat:

àcid cítric	10 mM
tritó X-100	0.01 %
el pH queda 2.7-3	

Per a l'estudi de les proteïnes ADP-ribosilades, els nuclis s'han obtingut directament del testicle després d'homogeneïtzar en el medi següent:

sacarosa	2 M
acetat càlcic	3.3 mM
tritó X-100	0.01 %
pH 5.8	

i ultracentrifugar a 22.000 rpm durant 1 hora.

2.4. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT POLI (ADP-RIBOSA) POLIMERASA

La poli(ADP-ribosa) polimerasa necessita per actuar un medi que contingui Mg^{++} i un agent reductor (ditiotreitòl o 2-mercaptoetanol). El seu pH òptim és de 7.8-8 (Ohgushi et al., 1980).

La barreja estàndard per estudiar l'activitat enzimàtica és:

tris-HCl	25 mM
MgCl ₂	10 mM
2-mercaptoetanol	5%
pH 8.0	
i 2 μ M - ¹⁴ C-NAD (Amersham)	

Després d'incubar els temps adients a 37°C, es para la reacció amb àcid tricloroacètic (TCA) al 20% en fred i la radioactivitat del material insoluble en àcid es determina en filtres de vidre Whatman GF/A.

2.5. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS IN VIVO DE POLI(ADP-RIBOSA)

La determinació dels nivells in vivo de la poli(ADP-ribosa) presenta dificultats analítiques respecte a la sensibilitat i selectivitat. Per exemple, quantitats en picomols de compostos que contenen adenina derivats del polímer s'han de mesurar en mostres que contenen micromols d'anells d'adenina presents al DNA i RNA.

El mètode de Jacobson et al. (1984) permet solventar aquests dos problemes bàsics. En primer lloc, utilitza resines de boronat per a l'adsorció quantitativa i selectiva de l'ADP-ribosa polimèrica que prové de cèl.lules o teixits. En segon lloc, converteix els compostos que contenen adenina en derivats 1,N⁶ eteno altament fluorescents i que es poden quantificar a nivell de picomols.

2.5.1. Síntesi de dihidroxiboronil Bio-Rex

La resina de boronat se sintetitza tal com ha estat descrit per Wielckens et al. (1981). El procediment és el següent:

- 25 g de Bio-Rex 70 (Bio Rad, 200-400 mesh size) es ressuspenen en 100 ml de 0.25 M acetat amònic pH 5.0
- El pH s'ajusta a 5.0 en afegir àcid acètic concentrat
- es renta amb 1 l d'H₂O, es ressuspen en 100 ml de H₂O i s'ajusta el pH a 5.0 amb 6 N HCl si és necessari
- s'afegeixen 2.5 g d'1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)-carbodiïmida (Sigma) a la suspensió de resina i s'agita durant 15 min. a temperatura ambient
- després de comprovar el pH, s'afegeixen 2.5 g d'àcid aminofenilborònic hemisulfat (Aldrich) dissolts en 15 ml d'H₂O i s'agita durant 15 min. més
- s'ajusta el pH a 5.0 si és necessari i s'agita durant 18 hores a temperatura ambient i a les fosques
(Periòdicament es mira el pH i s'ajusta si cal)
- es filtra la resina i es renta amb les següents solucions:
 - a) 1 l d'H₂O
 - b) 1 l de 0.1 M NH₄OAc₃ / 1 M NH₄Cl pH 4.5
 - c) 1 l de 0.1 M NH₄HCO₃ / 1 M NH₄Cl pH 9.0
 - d) 500 ml d'H₂O
 - e) 100 ml de 0.5 M àcid morfolinopropanosulfònic o MOPS (Sigma) / 6 M guanidina-HCl (Sigma, grau I)
pH 6.0 (ajustat amb HCl)

- es resuspèn la resina en 50 ml de:
0.5 M MOPS / 6 M guanidina-HCl pH 6.0 i es guarda a 4°C

La quantitat que es desitja de resina es renta pel procediment del "batch" el dia de l'assaig. El protocol següent és per 1 ml de resina empaquetada:

- es renta una vegada amb 5 ml de solució tampó A
solució tampó A:
acetat amònic 250 mM
guanidina-HCl 6 M
pH 9.0
- després es fan tres rentats amb 5 ml d'H₂O,
un rentat amb 5 ml de tampó A
i es resuspèn en igual volum de tampó A

La resina està, doncs, preparada per a ésser utilitzada en el pas 2 (sec. 2.5.4).

2.5.2. Preparació del matrex Gel PBA-60

Aquesta resina és assequible comercialment d'Amicon Corporation.

- es preparen columnes de 0.5 ml de resina en xeringues de plàstic de 1 ml que contenen llana de vidre
- es renta cada columna amb 5 ml de 250 mM acetat amònic pH 4.5 i després amb 10 ml de 250 mM acetat amònic pH 9.0 (solució tampó B).

Les columnes ja es poden utilitzar en el pas 5 (sec. 2.5.4).

2.5.3. Preparació de la barreja d'enzims SVPD i BAP

La barreja de fosfodiesterasa de verí de serp (SVPD) i fosfatasa alcalina bacteriana (BAP) s'ha de preincubar i dialitzar per eliminar nucleòsids que deriven de DNA i RNA i que es troben presents a la preparació de fosfatasa alcalina. El protocol és el següent:

- una barreja de 1000 unitats de fosfatasa alcalina (Sigma, tipus III-S) i 100 unitats de fosfodiesterasa de verí de serp (Worthington VPH) s'incuba a 37 °C durant 2 hores en un volum final de 10 ml de 10 mM MOPS (secció 2.6.1.) pH 7.4 que conté 50 mM MgCl₂
- seguidament es dialitza aquesta solució enfront d'1 l de 10 mM MOPS / 50 mM MgCl₂ pH 7.4 durant 2 hores a 4°C, amb canvis de tampó a intervals de 8 hores
- el dialitzat es dilueix fins a 40 ml amb la mateixa solució tampó i es guarda congelat en alíquotes d'1 ml

2.5.4. Mesura de la poli(ADP-ribosa)

El procediment següent està dissenyat per 10⁸ cèl.lules o 1.3 g de teixit:

1- Dissolució de la mostra-

Les fraccions insolubles en àcid tricloroacètic (TCA) al 20% procedents de cèl.lules o nuclis testiculars es dissolen en 1 M KOH, 50 mM EDTA en incubar a 60°C durant 1 hora i agitar amb el vòrtex de manera ocasional.

Després d'aquesta incubació es pot agafar una alíquota per determinar DNA.

2- Unió i elució de la resina de boronat-

La solució es dilueix 5 vegades amb 250 mM acetat amònic pH 9.0 / 6 M guanidina HCl i s'ajusta el pH a 9.0 afegint-hi aproximadament 100 µl de HCl concentrat.

S'afegeix 0.2 ml de 50% (v/v) de la suspensió de DHB-Bio Rex prèviament rentada i s'incuba a T ambient durant 2 hores amb agitació rotatòria suficient per mantenir la resina resuspesa.

A continuació es transfereix la suspensió de resina a una columna de polipropilè de 0.8*4 cm (o una xeringa amb llana de vidre) i es renta amb 5 ml de solució tampó A (secció 2.5.1).

Seguidament es renta amb 10 ml d'1 M acetat amònic pH 9.0 i s'elueix amb 4 ml de H₂O a 37°C.

L'elut es recull en tubs de centrifuga que contenen 500 μ l de solució tampó B (secció 2.5.2) i 500 μ l de 0.5M $MgCl_2$.

3- Digestió enzimàtica fins a nucleòsids-

S'hi afegeixen 100 μ l de la barreja que conté fosfodiesterasa de verí de serp i fosfatasa alcalina (secció 2.5.3) i s'incuba a 37°C durant 3 hores.

4- Formació de derivats fluorescents-

Els derivats 1,N⁶ eteno fluorescents dels nucleòsids es formen afegint 555 μ l de 2.5 M acetat amònic pH 4.5 i 85 μ l de 7 M cloroacetaldehid i incubant a 60°C durant 4 hores en tubs completament tapats.

5- Preparació per a l'anàlisi de fluorescència-

Es dilueix fins a 10 ml amb solució tampó B (secció 2.5.1), s'ajusta el pH a 9.0 \pm 0.2 amb NH_3 (aproximadament 200-250 μ l) i se centrifuga a baixa velocitat per eliminar qualsevol material insoluble.

S'aplica la mostra a una columna de 0.5 ml de matrex Gel PBA-60 (secció 2.5.2) i es renta amb 10 ml de solució tampó B.

Els nucleòsids s'elueixen amb 5 ml de 200 mM citrat sòdic pH 4.0-4.5 a 37°C.

6- Anàlisi per cromatografia líquida d'alta pressió-

Els derivats fluorescents de la poli(ADP-ribosa) se separen en una columna de fase reversa Beckman-Altex Ultrasphere-ODS (250*4.6 mm i.d.).

Les mostres s'injecten en un volum de 2 ml en 200 mM citrat sòdic, pH 4.5.

La columna s'elueix isocràticament a un flux d'1 ml/min a T ambient amb una barreja de 7 mM format amònic pH 5.8 / 100% metanol (91.5/8.5).

La detecció de fluorescència es fa amb un fluorímetre Varian Fluorichrom equipat amb una font de llum de deuteri, un filtre d'excitació Varian 220-I i un filtre d'emissió Varian 3-75 de 370 nm.

Els controls de rendiment es fan utilitzant poli-(ADP-ribosa) marcada amb ¹⁴C prèviament sintetitzada in vitro.

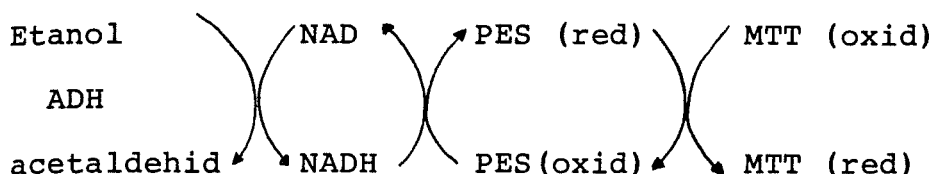
Els nucleòsids RAdo (ribosiladenosina) i R₂Ado (diribosiladenosina) s'estandaritzen per absorció ultraviolada al considerar un coeficient d'extinció molar de 6*10³ a pH 7 i 275 nm.

2.6. DETERMINACIÓ DEL NAD

2.6.1. Mètode enzimàtic

L'extracció del "pool" total de NAD i la seva mesura s'ha fet per un assaig enzimàtic cíclic (Jacobson i Jacobson, 1976; Jacobson et al., 1979).

El disseny bàsic d'aquest assaig és el següent:



El component limitant és el NAD i per tant la velocitat del procés cíclic és directament proporcional a la quantitat d'aquest nucleòtid.

El protocol és el següent:

- Es renten $2-5 \cdot 10^6$ cèl.lules en PBS (sec.2.1.1) en fred dues vegades

- Després de centrifugar s'extrauen amb $600 \mu\text{l}$ de tampó d'extracció durant 2 minuts a 4°C agitant amb el vòrtex

Tampó d'extracció:

NaOH 0.1 M
nicotinamida 1 mM

- s'afegeixen $100 \mu\text{l}$ de $0.37 \text{ M H}_3\text{PO}_4$ per neutralitzar

- s'afegeixen $100 \mu\text{l}$ de 2 mM fénazina etosulfat (PES) preparat al moment i es deixa durant 15 min a les fosques. La mostra es pot congelar fins al dia de l'assaig.

Les solucions de NAD estàndard (Lowry i Passonneau, 1972) segueixen a partir d'aquí les mateixes condicions.

- se centrifuga durant 10 min per eliminar substàncies que podrien interferir en la lectura de l'espectrofotòmetre

- es deixa que les mostres es tornin blaves (amb la llum del sol)

- es dilueix fins a 0.5 ml amb barreja d'extracció, si és necessari

Barreja d'extracció:

6 parts de tampó d'extracció
1 part de $0.37 \text{ M H}_3\text{PO}_4$
1 part de 2 mM PES

- a la foscor, s'afegeixen 0.6 ml de solució d'assaig i 0.1 ml d'alcohol deshidrogenasa (0.5 mg ADH/ml en 0.1 M Na Bicina, pH 8) a intervals de 0.1 min.

S'agita amb el vòrtex i s'incuba a 30°C.

A un dels tubs, s'hi afegeix 0.1 ml de 0.1 M Na Bicina, pH 8, en lloc d'ADH

Solució d'assaig:

5 M etanol	0.12 ml
1 M NaBicina	0.12 "
pH 8	
0.1 M EDTA pH 7	0.05 "
100 BSA/ml H ₂ O	0.01 "
H ₂ O	0.15 "
10 mM ² MTT (Sigma)	0.05 "
20 mM PES (Sigma)	0.10 "

per assaig

El MTT (tiazoil blau) i el PES s'afegeixen just abans d'usar

- al cap de 30 min a 30 °C s'addicionen 0.5 ml de 60 mM iodoacetat també a intervals de 0.1 min i a les fosques

- després d'agitar es llegeix la D.O. a 570 nm a la foscor

- es representa la corba estàndard D.O. a 570 nm vs picomols de NAD

2.6.2. Purificació per cromatografia d'afinitat en DHB-Bio Rex i HPLC de bescanvi aniònic

El mètode emprat és el descrit per Alvarez-Gonzalez et al. (1986). La quantificació del NAD es fa a partir de la fracció soluble en àcid tricloroacètic al 20%, després de precipitar les cèl.lules en aquest àcid en fred durant 10-15 min. La fracció insoluble en TCA 20% es pot utilitzar per quantificar poli(ADP-ribosa) o determinar DNA i/o proteïna.

1- Cromatografia d'afinitat-

Es prepara una columna de 0.5 ml de DHB-Bio Rex (resina empaquetada) sintetitzada tal com ha estat descrit a la sec. 2.5.1.

S'equilibra amb 2 rentats de 0.25 M acetat amònic pH 9.0±0.2, 5 ml cada un.

Mentre es deixa equilibrar el boronat s'afegeix 0.5 M acetat amònic pH 9.0 a l'extracte de TCA 20% fins a una concentració final de 100 mM acetat amònic i s'ajusta el pH a 9.0±0.2 amb NH₃.

Es prepara un control que tingui una quantitat coneguda de ¹⁴C- NAD per determinar el rendiment abans i després de la cromatografia d'afinitat.

Es prepara un control amb una quantitat coneguda de NAD fred per determinar el rendiment de tot el procés.

S'apliquen les mostres a les columnes de boronat i es renta 2 vegades amb 5 ml de 100 mM acetat amònic pH 9.0±0.2.

S'elueix amb 3 ml d'H₂O pre-equilibrada a 37 °C i immediatament neutralitzar en afegir 15 µl d'1 M KH₂PO₄, pH 4.7 i 30 µl de 6 M HCl. El pH ha d'ésser 5-6.

2- HPLC d'intercanvi aniònic-

S'equilibra una columna Partisil-SAX amb 40 ml de solució tampó prèviament filtrada i desgasificada a un flux d'1 ml/min.

Solució tampó:

KH₂PO₄ 50 mM
pH 5.0

S'injecten quantitats conegudes de NAD, AMP i ADP-ribosa estàndards (normalment 2,2 i 8 nmols respectivament) per calibrar l'integrador.

S'injecta 1 ml de mostra de NAD després de diluir 400 µl de l'elut de la columna de boronat fins a 2 ml amb 5 mM KH₂PO₄, pH 4.7 per minimitzar l'efecte de les sals en la resolució.

2.7. ANÀLISI DE LA SEDIMENTACIÓ DELS NUCLEOIDES

Els nucleoides s'han preparat i sedimentat seguint el mètode descrit per Cook et al. (1976) amb les modificacions introduïdes per Weniger (1979).

Aquest mètode consisteix en una centrifugació en gradients de sacarosa i el seu principi és una lisi suau de les cèl.lules que deixa el DNA en una estructura altament ordenada i que és fixada per residus de membranes. Aquest DNA té, per tant, una estructura superenrotllada. Cada trencament de cadena senzilla incrementa l'energia lliure de rotació del DNA, i per aquesta raó es redueix el nombre de voltes superhelicoidals. Això condueix a una disminució en la constant de sedimentació.

El procediment emprat és el següent:

- $5-8 \cdot 10^8$ cèl.lules en PBS (sec.2.1.1) es col.loquen al capdamunt d'1 ml de tampó de lisi prèviament dipositat sobre un gradient lineal de sacarosa (15-30% p/v) i es deixen a T ambient durant 15 min.

Tampó de lisi:

NaCl	2 M
EDTA	100 mM
Tris-HCl	2 mM
Tritó X-100	0.5 %
pH 8.0	

Solució de sacarosa:

NaCl	2 M
EDTA	100 mM
Tris-HCl	1 mM
Bromur d'etidi	30 μ g/ml
pH 8.0	

- a continuació s'ultracentrifuga a 20°C i 24000 rpm durant 2 hores en un rotor Beckman SW 40 Ti.
- al final de la centrifugació es deixen els tubs a la foscor durant 60 min
- es determina la posició de les bandes fluorescents gràcies a una llum de 360 nm o un transil.luminador.

2.8. PURIFICACIÓ DE DNA

La purificació del DNA s'ha fet mitjançant extraccions fenòliques després d'eliminar les proteïnes (Maniatis et al., 1982). S'ha seguit el següent protocol:

- s'aïllen els nuclis de les diferents cèl.lules amb àcid cítric (sec.2.2)
- es resuspèn el sediment en medi d'incubació i es tracta amb proteïnasa K (Boehringer) a una concentració de 200 µg/ml a 50 °C durant 3 hores

Medi d'incubació

Tris-HCl	10	mM
NaCl	200	mM
EDTA	50	mM
SDS	0.1	%

pH 7.4

- s'extrau suaument el DNA amb un volum igual de fenol a T ambient durant 10 minuts
- després de centrifugar a 3.000 g i T ambient durant 5 minuts, es torna a extraure la fase aquosa amb igual volum de fenol/alcohol isoamflic/cloroform (25/1/24)
- se centrifuga de nou i es fa una tercera extracció de la fase aquosa amb el mateix volum de cloroform/alcohol isoamflic (24/1)
- es precipita el DNA amb 2 volums d'etanol (fred) a -20 °C durant tota la nit
- després de centrifugar i rentar amb etanol al 70% es deixa eixugar el sediment
- es digereix amb RNasa A pancreàtica (Sigma) 200 µg/ml en un medi que conté:

NaCl	15	mM
citrat sòdic	1.5	mM

pH 7.5

a 37 °C durant 1 hora

- s'hi afegeix proteïnasa K 200 µg/ml i s'incuba durant 1 hora a 37 °C per tal d'eliminar la RNasa
- es torna a repetir el cicle d'extraccions: fenol, fenol/IAC, IAC
- es precipita amb 2 volums d'etanol a -20 °C durant tota la nit

2.9. EXTRACCIÓ I PRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES

2.9.1. Extracció amb àcid perclòric 0.74 N

L'extracció amb àcid perclòric (PCA) 0.74 N permet obtenir conjuntament la histona H1 i les proteïnes no histones del grup de les HMGs. El protocol utilitzat és el següent:

- els nuclis aïllats en presència d'inhibidors de la proteòlisi (sec.2.2) se soniquen a 60 W durant 30 seg. en un volum mínim de PCA 0.74 N que conté bisulfit sòdic 50 mM i es deixen a 4 °C durant 1-2 hores
- se centrifuga a 32.000 g durant 15 minuts per tal d'eliminar les proteïnes insolubles i el DNA
- es repeteix l'extracció amb PCA 0.74 N del sediment i es combinen els dos sobrenedants
- les proteïnes es precipiten amb àcid tricloroacètic (TCA) a una concentració final del 20%
- es renta el precipitat amb acetona lleugerament acidificada (HCl 0.1 N) i acetona i s'eixuga al buit

2.9.2. Extracció amb àcid clorhídric 0.3 N

En presència de HCl 0.3 N s'insolubilitzen la gran part de proteïnes no histones, i el DNA, i les histones romanen en solució (Johns, 1964). El mètode emprat es descriu a continuació:

- el sediment obtingut després de l'extracció amb PCA 0.74 N se sonica a 60 W durant 30 seg. en un petit volum de HCl 0.3 N i es deixa a 4 °C durant 1 hora
- després de centrifugar a 32.000 g durant 15 minuts es precipita el sobrenedant amb TCA que quedi al 20% a 4 °C durant tota la nit
- es renta i s'eixuga el precipitat com a l'apartat anterior

2.9.3. Extracció amb SDS 0.1%

Les proteïnes no histones insolubles en PCA 0.74 N i HCl 0.3 N es dissolen en tampó de mostres de gel de SDS segons el següent protocol:

- el sediment que s'obté després de l'extracció amb HCl 0.3 N es renta amb acetona acidificada (acetona/HCl 0.1 N) i se centrifuga a 32.000 g durant 15 minuts
- es renta dues vegades més amb acetona i es recull el sediment per centrifugació
- s'elimina l'acetona, deixant eixugar al buit, i es dissol directament en tampó de mostres de SDS que conté colorant. Aquest serveix com a indicador de pH.

Tampó de mostres de SDS

Tris-HCl	62.5	mM
SDS	2	%
glicerol	10	%
2-mercaptoetanol	5	%
pH 6.8		

2.10. TÈCNIQUES ELECTROFORÈTIQUES

2.10.1. Electroforesi de DNA

Per a la anàlisi de la integritat del DNA s'ha utilitzat el sistema electroforètic en gels desnaturalitzants d'agarosa (Maniatis et al., 1982).

L'agarosa es prepara al 0.8% en:

NaCl	50	mM
EDTA	1	mM

La solució tampó de la cubeta és:

NaOH	30	mM
EDTA	1	mM

El gel es deixa equilibrar en aquest tampó almenys durant 30 minuts.

El tampó de mostres conté:

NaOH	50	mM
EDTA	1	mM
glicerol	2.5	%
blau de bromofenol	0.025	%

L'electroforesi es desenvolupa a un voltatge de 7.5 V/cm.

La tinció amb el colorant fluorescent bromur d'etidi i la destinció del gel es fan de la manera següent:

- es renta el gel amb Tris-HCl 1 M
NaCl 1.5 M
pH 7.6

durant 20 minuts per neutralitzar el gel (3 vegades)

- es fan 3 rentats de 10 minuts amb H₂O
- es tenyeix amb bromur d'etidi (0.5 µg/ml) durant 45 minuts a T ambient
- es destenyeix en fer 2 rentats de 15 minuts amb H₂O

La posició de les bandes es determina gràcies a un transil.luminador.

2.10.2. Electroforesis de proteïnes

Les electroforesis es fan en gels de poliacrilamida/ acètic/urea (Panyim i Chalkey, 1969) i poliacrilamida/SDS (Laemli, 1970).

Els gels d'urea tenen un pH acídic, de manera que les proteïnes bàsiques queden carregades positivament i migren cap al pol negatiu.

El SDS és un detergent amb càrrega negativa que disgrega i envolta les proteïnes. Aquestes queden carregades negativament i migren cap al pol positiu, amb una velocitat que depèn únicament del seu pes molecular.

Els gels acídics són més adequats per preservar la integritat del polímer ja que la poli(ADP-ribosa) es pot trencar més fàcilment sota condicions bàsiques.

A) ELECTROFORESI D'UREA/ACÈTIC

Es preparen les següents solucions "stock":

- solució A - acrilamida (Fluka)	60 % (p/v)
bis-acrilamida (Fluka)	0.4 % (p/v)
- solució B - àcid acètic glacial	43.2 % (v/v)
temed	4 % (v/v)

Aquestes dues solucions es guarden a 4 °C i a la foscor.

- solució C - urea (Fluka)	2.5 M
persulfat amònic	0.25 %

Es prepara immediatament abans d'usar.

Els gels es fan en plaques de 0.8 mm d'espessor i totes les solucions es filtren en Millipore (0.45 µm).

Per a gels de 20 cm la gelificació s'aconsegueix barrejant en fred i seguint aquest ordre:

solució B	4 ml
solució A	8 ml
solució C	20 ml

La barreja es desgasifica durant 15-20 minuts.

La concentració final en el gel és:

àcid acètic glacial	0.9	N
urea	4.5	M
acrilamida	15	%
bis-acrilamida	0.09	%
persulfat amònic	0.12	%
temed	0.4	%

Les mostres es dissolen en:

urea	8	M
2-mercaptoetanol	5	%
HCl	0.1	M

El colorant és el verd de metilè.

La solució tampó de l'electroforesi és àcid acètic glacial 0.9 N.

Es fa una pre-electroforesi fins que la intensitat és constant i l'electroforesi es desenvolupa a 140 V.

B) ELECTROFORESI DISCONTINUA DE SDS

Es preparen les dissolucions següents per al gel separador:

- solució A - acrilamida (Fluka)	29.2	% (p/v)
bis-acrilamida (Fluka)	0.8	% (p/v)
- solució tampó - Tris-HCl	1.5	M
SDS	0.4	%
pH 8.8		
- persulfat amònic -	10	%

Els gels es fan igualment en plaques de 0.8 mm d'espessor i la solució d'acrilamida es filtra en Millipore de 0.45 μ m.

Un gel de 20 cm es prepara en barrejar:

solució A	16	ml
solució tampó	12.5	ml
H ₂ O	20	ml
² es desaireja durant 20 minuts		
persulfat amònic	100	μ l
temed	12	μ l

En el cas del gel empilador (stacking) les solucions són:

- solució A - acrilamida	10	%
bis-acrilamida	0.5	%
- solució tampó - Tris-HCl	0.5	M
pH 6.8		
- persulfat amònic -	10	%
- SDS -	10	%

La gelificació s'aconsegueix barrejant:

solució A	3	ml
solució tampó	2.4	ml
H ₂ O	4.4	ml
persulfat amònic	100	μl
SDS	100	μl
temed	5	μl

Les mostres es dissolen en:

Tris-HCl	62.5	mM
SDS	2	%
glicerol	10	%
2-mercaptoetanol	5	%

El colorant és, en aquest cas, el blau de bromofenol.

Per tal de destruir els ponts disulfur, les mostres s'incuben a 100 °C durant 1 minut.

El tampó d'electroforesi és:

glicina	0.192	M
Tris-HCl	25	mM
SDS	0.1	% (p/v)
el pH queda ajustat a 8.4		

L'electroforesi es desenvolupa a 180 V.

C) TINCIÓ I DESTINCIÓ

El colorant utilitzat per a la detecció de les proteïnes separades per electroforesi és el Coomassie brillant blue R-250 (Merck). Aquest colorant es prepara segons la recepta següent (Lennox et al., 1982):

metanol	5	parts
H ₂ O	16	parts
àcid acètic glacial	1	part
coomassie blue	0.1	%

La tinció es fa a temperatura ambient durant 1 hora.

La destinció es fa amb canvis reiterats de la barreja anterior sense el colorant.

2.10.3. Electroforesi de poli(ADP-ribosa)

Per a l'estudi de la complexitat del polímer s'ha utilitzat l'electroforesi en gel de poliacrilamida, tal com ha estat descrit per Alvarez-González, 1985.

El gel es prepara de la manera següent:

acrilamida	19	%
bis-acrilamida	1	%
EDTA	2	mM
urea	7	M
Tris-borat pH 8.3	100	mM
persulfat amònic	0.45	%
temed	3.4	mM

La solució tampó de la cubeta conté:

Tris-borat	50	mM
EDTA	1	mM

El tampó de mostres és:

urea	50	%
NaCl	25	mM
EDTA	4	mM
pH 7.5		

Els colorants són: xilenecianol 0.02 %
blau de bromofenol 0.02%

Es fa una pre-electroforesi durant 1-2 hores a 400 V. L'electroforesi es desenvolupa a un voltatge de 400 V fins que el blau de bromofenol ha migrat 9 cm de l'origen en gels de 20 cm de longitud. En aquest punt es prepara el gel per a la fluorografia.

2.11. FLUOROGRAFIA

La determinació dels acceptadors de la poli(ADP-ribosa) i la anàlisi de la complexitat del polímer s'ha fet per detecció fluorogràfica a partir dels gels de poliacrilamida, seguint el mètode de Laskey i Mills (1975). Aquest mètode utilitza com a líquid de centelleig el PPO (2.5 difeniloxalat), que converteix l'energia de la partícula en llum visible, la qual forma una imatge en un film sensible als raigs X.

La pre-exposició de la pel·lícula a un flash ràpid augmenta en gran mesura la sensibilitat de la fluorografia i encara permet una interpretació quantitativa de la imatge de la pel·lícula, ja que corregeix la relació no lineal entre la radioactivitat de la mostra i l'absorvència de la imatge del film.

El protocol seguit és:

- se submergeix el gel destenyit en aproximadament 20 volums de DMSO (dimetilsulfòxid) durant 30 minuts
- es canvia el DMSO i es deixa el gel 30 minuts més en el DMSO fresc
- se submergeix el gel en 4 volums de PPO al 22.2 % (p/v) en DMSO durant 3 hores
- el PPO es precipita dins el gel amb 20 volums de H₂O durant 1 hora
- s'eixuga el gel al buit
- es posa en contacte amb la pel·lícula prèviament il·luminada amb el flash i s'exposa a -70 °C
- es deixa impressionar durant 15 o 30 dies, segons el nombre de comptes que té la mostra

2.12. ALTRES MÈTODES ANALÍTICS

La determinació del DNA s'ha fet segons el mètode de Burton (1956) que es basa en la reacció colorimètrica entre la desoxiribosa i la difenilamina. El DNA s'extrau i es digereix amb PCA 0.5 N a 95 °C durant 20 minuts. El DNA estàndard és de lletó de vedella (Sigma) digerit en les mateixes condicions.

Per determinar la quantitat de proteïna s'ha seguit el protocol descrit per Lowry et al. (1951), que té com a base la reacció entre les proteïnes i el reactiu de Folin-Cicalteau, en un medi alcalí i en presència de coure. Després d'extraure i digerir el DNA amb PCA 0.5 N es renta el sediment dues vegades amb TCA al 20 %, dues més amb etanol i dues amb éter per tal d'eliminar els lípids. Les proteïnes es dissolen amb NaOH 1 N i es valoren utilitzant albúmina del sèrum boví (Calbiochem) com a estàndard.

RESULTATS

3.1. OBTENCIÓ DE CÈL.LULES EN DIFERENTS ESTADIS DE L'ESPERMATOGÈNESI

La dissociació controlada amb tripsina del teixit testicular permet obtenir una suspensió de cèl.lules individualitzades. La separació d'aquesta suspensió proporciona diverses poblacions cel.lulars que corresponen a diferents estadis de l'espermatogènesi. Els dos mètodes emprats per separar les cèl.lules han estat:

- sedimentació a força de gravetat unitat (sec. 2.1.2)
- elutriació (sec. 2.1.3)

Els espermatozoides madurs s'han recollit directament del conducte deferent.

La separació de les cèl.lules es fa en funció del seu volum i és comparable en els dos mètodes esmentats.

En el cas de la separació per sedimentació a força de gravetat unitat s'utilitza un gradient continu de glicerol (1.5%, 3% i 6%) diluït en PBS, tampó fosfat lliure de Mg^{++} i Ca^{++} . La concentració de les diferents cèl.lules de cada fracció es mesura en determinar la D.O. a 600 nm. El perfil que es mostra a la fig. 3.1 representa la distribució de les cèl.lules testiculars i dels espermatozoides madurs en funció de la seva velocitat de sedimentació a força de gravetat unitat.

Les fraccions que s'obtenen corresponen a:

- estadis I i II- cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques amb velocitat de sedimentació que depèn del seu volum ($4 \geq$ mm/h.). En aquesta fracció s'hi troben també cèl.lules multinucleades. Els eritròcits sedimenten en la mateixa regió, però la seva presència es pot eliminar dessagnant bé l'animal.
- estadi III - espermàtides rodones, amb una velocitat de sedimentació en la regió de 2-4 mm/h. Aquesta fracció pot estar contaminada per espermàtides allargades (màxim d'un 20%).
- estadi IV - espermàtides allargades que tenen una velocitat entre 1-2 mm/h. i cossos residuals.
- estadi V - espermatozoides testiculars amb una velocitat de 0.5-1 mm/h.

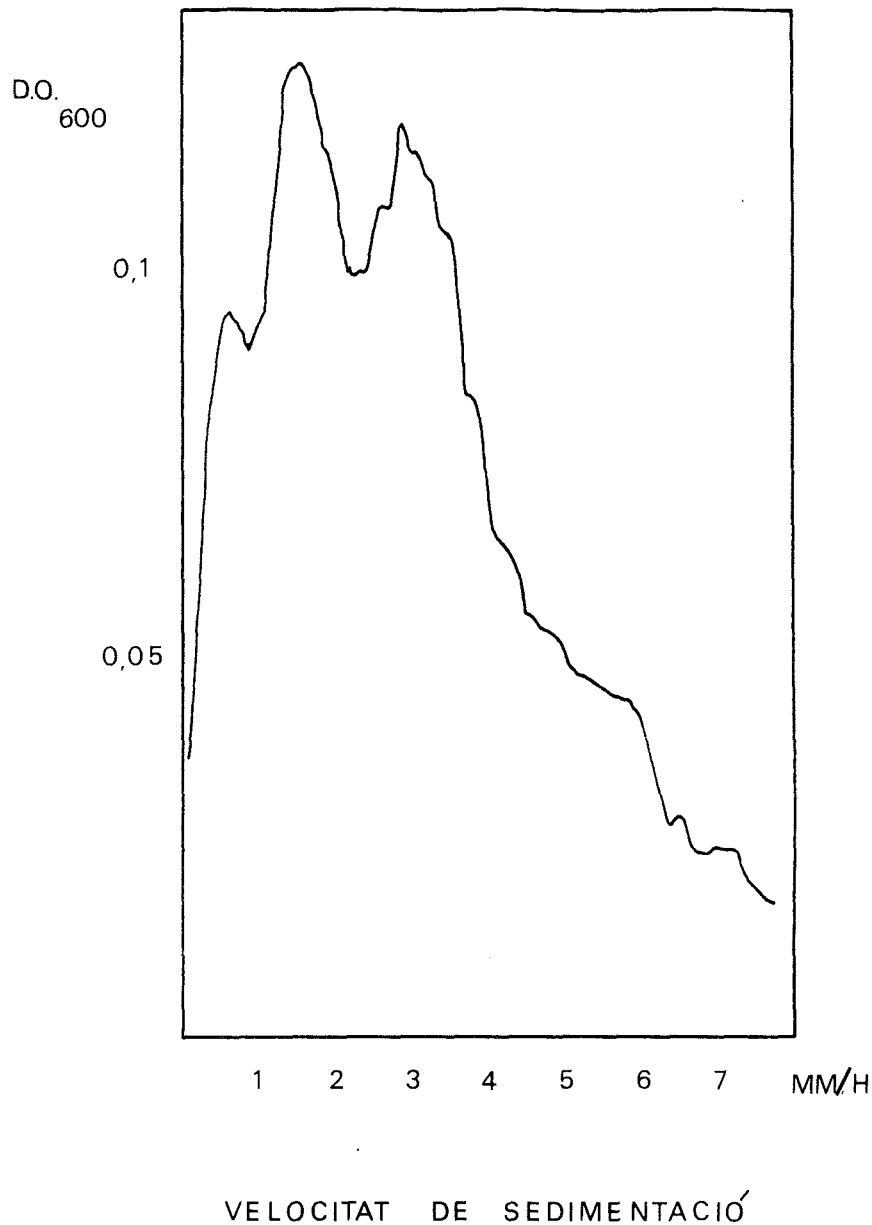


Fig.3.1- Distribució de les cèl.lules testiculars del gall en funció de la seva velocitat de sedimentació a força de gravetat unitat. Les cèl.lules s'han separat durant 5 hores a través d'un gradient de glicerol de l'1.5-3-6% en PBS.

- 0.5-1 mm/h - espermatozoides testiculars
- 1 - 2 mm/h - espermàtides allargades
- 2 - 4 mm/h - espermàtides rodones
- ≥ 4 mm/h - cèl. premeiòtiques i meiòtiques