

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



Dedicat a : en Roderic, la Neus  
la Nati, en Manel

i als meus pares

Cap horitzó no em tempta com aquest  
de ratlles lleus que traço jo mateix  
i no em limita ni m'encercla. Clavo,  
volenterós, les ungles a la nit  
per obrir carreranyes a tots els somnis.

Miquel Martí i Pol

## Agraïments

Al Dr. Cristóbal Mezquita, director d'aquesta tesi, pels seus consells i orientacions.

Als amics i companys del laboratori de Fisiologia, Neus Agell, Nati Rocamora, Jacint Boix, Joaquim Roca, Montserrat Pau, Vicença Ustrell i Jovita Mezquita, pel seu suport i desinteressada col.laboració. Aquest és també, d'alguna manera, el seu treball.

Als Dr. Myron i Elaine Jacobson -del Department of Biochemistry, Texas College of Osteopathic Medicine, North Texas State University at Forth Worth- i al Dr. Felix Althaus -de l'Institut für Pharmakologie und Biochemie de la Universitat de Zürich- pel seu interès i amabilitat en ensenyar-me la metodologia d'HPLC i proporcionar-me la possibilitat de dur a terme les anàlisis en els seus laboratoris.

Al Dr. Rafael Alvarez-González i a Hilda Mendoza-Alvarez per la seva hospitalitat i per la revisió crítica d'aquest treball.

A Rosa-Anna Guigó, per la correcció de la redacció i a Roderic Guigó, per la col.laboració en la realització de les gràfiques.

<u>INTRODUCCIÓ</u> .....	1
1.1. ADP-RIBOSILACIÓ EN EL METABOLISME DEL NAD.....	2
1.1.1. Anabolisme del nicotinamida-adenin-dinucleòtid...	2
1.1.2. Catabolisme del nicotinamida-adenin-dinucleòtid..	6
1.2. POLI(ADP-RIBOSILACIÓ).....	8
1.2.1. Estructura i propietats de la poli(ADP-ribosa)...	8
1.2.2. Metabolisme de la poli(ADP-ribosa).....	10
a) Poli(ADP-ribosa) polimerasa.....	10
b) Fosfodiesterases, poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa i ADP-ribosil proteïna liasa...	15
1.2.3. Proteïnes acceptadores de la poli(ADP-ribosa)...	17
1.2.4. Poli(ADP-ribosilació) i estructura de la cromatina.....	20
1.2.5. Poli(ADP-ribosilació) i diferenciació.....	23
1.2.6. Metabolisme de la poli(ADP-ribosa) i reparació del DNA.....	26
1.2.7. Poli(ADP-ribosilació) i altres respostes cel.lulars al DNA danyat.....	32
1.2.8. Metabolisme de la poli(ADP-ribosa) i expressió gènica.....	34
1.2.9. Poli i oligo(ADP-ribosilació) extranuclear.....	36
1.2.10. Oligo i poli(ADP-ribosilació) vírica.....	37
1.3. MONO(ADP-RIBOSILACIÓ).....	38
1.4. L'ESPERMATOGÈNESI COM A MODEL DE DIFERENCIACIÓ.....	40

<u>MATERIALS I MÈTODES</u> .....	46
2.1. SEPARACIÓ DE CÈL.LULES TESTICULARS DE GALL.....	46
2.1.1. Obtenció de cèl.lules testiculars.....	46
2.1.2. Separació de cèl.lules testiculars per sedimentació a força de gravetat unitat.....	48
2.1.3. Separació de cèl.lules per elutriació.....	50
2.2. AÏLLAMENT DE NUCLIS.....	52
2.4. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT POLI(ADP-RIBOSA) POLIMERASA.....	54
2.5. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS <u>IN VIVO</u> DE POLI(ADP-RIBOSA).....	55
2.5.1. Síntesi de dihidroxiboronil Bio-Rex.....	55
2.5.2. Preparació del matrex Gel PBA-60.....	56
2.5.3. Preparació de la barreja d'enzims SVPD i BAP....	57
2.5.4. Mesura de la poli(ADP-ribosa).....	57
2.6. DETERMINACIÓ DEL NAD.....	59
2.6.1. Mètode enzimàtic.....	59
2.6.2. Purificació per cromatografia d'afinitat en DHB-Bio Rex i HPLC de bescanvi aniònic.....	61
2.7. ANÀLISI DE LA SEDIMENTACIÓ DELS NUCLEOIDES.....	62
2.8. PURIFICACIÓ DE DNA.....	63
2.9. EXTRACCIÓ I PRECIPITACIÓ DE PROTEÏNES.....	64
2.9.1. Extracció amb àcid perclòric 0.74 N.....	64
2.9.2. Extracció amb àcid clorhídric 0.3 N.....	64
2.9.3. Extracció amb SDS 0.1%.....	65

2.10. TÈCNIQUES ELECTROFORÈTIQUES.....	66
2.10.1. Electroforesi de DNA.....	66
2.10.2. Electroforesis de proteïnes.....	67
a) Electroforesi d'urea/acètic.....	67
b) Electroforesi discontinua de SDS.....	68
c) Tinció i destinció.....	70
2.10.3. Electroforesi de poli(ADP-ribosa).....	71
2.11. FLUOROGRAFIA.....	72
2.12. ALTRES MÈTODES ANALÍTICS.....	73
<u>RESULTATS</u> .....	74
3.1. OBTENCIÓ DE CÈL.LULES EN DIFERENTS ESTADIS DE L'ESPERMATOGÈNESI.....	74
3.2. ESTUDI DE L'ACTIVITAT POLI(ADP-RIBOSA) POLIMERASA.....	78
3.2.1. Estudi de la incorporació d'ADP-ribosa en nuclis de cèl.lules testiculars i espermatozoides.....	78
3.2.2. Recanvi de grups ADP-ribosil a les diferents cèl.lules testiculars.....	80
3.2.3. Recanvi a les espermàtides allargades després del tractament amb l'agent mutagen DMS.....	82
3.2.4. Recanvi als eritròcits.....	84
3.3. DETERMINACIÓ QUANTITATIVA I QUALITATIVA DE LA POLI(ADP-RIBOSA).....	86
3.3.1. Quantificació dels nivells <u>in vivo</u> de poli(ADP-ribosa).....	87
3.3.2. Estudi de la complexitat del polimer.....	92
3.4. QUANTIFICACIÓ DEL NAD.....	95

3.5. EFECTE D'AGENTS QUE DANYEN EL DNA SOBRE LA POLI(ADP-RIBOSILACIÓ) .....	98
3.5.1. Efecte dels raigs X.....	98
3.5.2. Efecte de la bleomicina.....	100
3.5.3. Efecte del MNNG.....	110
3.6. IDENTIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES ACCEPTADORES DE LA POLI(ADP-RIBOSA) <u>IN VITRO</u> .....	113

<u>DISCUSSIÓ</u> .....	121
------------------------	-----

4.1. POLI(ADP-RIBOSILACIÓ) I DIFERENCIACIÓ CEL.LULAR.....	121
4.2. POLI(ADP-RIBOSILACIÓ) I ESTRUCTURA DE LA CROMATINA.....	124
4.3. POLI(ADP-RIBOSILACIÓ) I METABOLISME DELS ÀCIDS NUCLEICS.....	130
4.4. L'ESPERMATOGÈNESI, UN MODEL PER A L'ESTUDI DE LA POLI(ADP-RIBOSILACIÓ) .....	137

<u>CONCLUSIONS</u> .....	140
--------------------------	-----

<u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	143
---------------------------	-----



## INTRODUCCIÓ

Fa aproximadament uns 20 anys del descobriment de la poli(ADP-ribosa), únic homopolímer que s'uneix de manera covalent a les proteïnes cromosòmiques. Des d'aleshores s'han fet detallats estudis de l'estructura, metabolisme, enzimologia, com també de les funcions fisiològiques relacionades amb el polímer. Nombroses evidències suggereixen que la poli(ADP-ribosa) es troba àmpliament distribuïda als eucariotes i està involucrada en la regulació de la proliferació cel·lular, síntesi de proteïnes i metabolisme dels àcids nucleics.

Així mateix, també hi ha força dades que indiquen que la mono(ADP-ribosilació) és una manera comuna de modificar covalentment les proteïnes i la seva funció.

L'ADP-ribosilació és l'única reacció bioquímica en la qual el NAD, un coenzim respiratori, és utilitzat com a donador de grups ADP-ribosil.

La importància dels nucleòtids de piridina NAD i NADP com a coenzims de les reaccions d'oxidació-reducció cel·lulars pot observar-se fàcilment en considerar la utilització d'aquests compostos per les deshidrogenases i reductases que ocupen posicions crítiques de les vies metabòliques. El fet que el NAD sigui el més abundant dels coenzims ha suggerit que la funció d'aquest nucleòtid no es limita a les oxidacions biològiques. L'altre paper important del NAD és servir de substrat per a la modificació de les proteïnes per ADP-ribosilació (fig.1.1).

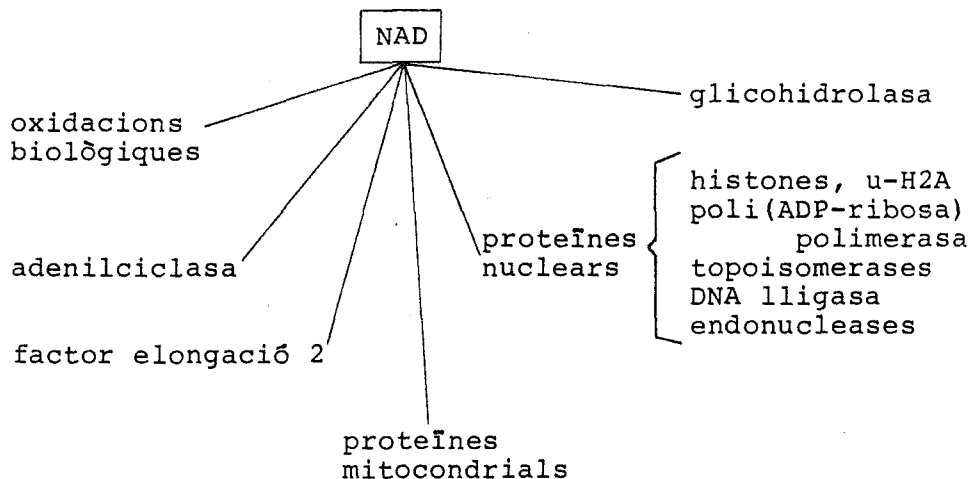


Fig.1.1- Esquema que mostra algunes de les múltiples reaccions que utilitzen NAD.

## 1.1. ADP-RIBOSILACIÓ EN EL METABOLISME DEL NAD

### 1.1.1. Anabolisme del nicotinamida-adenin-dinucleòtid

Durant els últims anys s'ha demostrat que la nicotinamida és essencial per a l'activitat de molts enzims com a component dels coenzims nucleotídics de piridina. El descobriment dels coenzims nucleotídics data de la primera dècada d'aquest segle quan Harden i Young (1904) van trobar que un extracte de llevat perdia la seva habilitat per fermentar glucosa a alcohol etílic quan es dialitzava, i que l'activitat es recuperava per l'addició del material dialitzable. Els mateixos autors van observar que el sistema enzimàtic responsable de la fermentació alcohòlica contenia una fracció termolàbil, denominada zimasa i que presumiblement contenia els enzims responsables del procés, i una fracció termoestable necessària per l'activitat de la zimasa. Aquest últim compost es va anomenar cozimasa i va ésser classificat com a coenzim, terme general per denominar substàncies de baix pes molecular i que són essencials per a l'activitat enzimàtica.

Els estudis per determinar la identitat química de la cozimasa varen ésser iniciats per Von Euler, el qual va determinar la presència d'adenosina 5-fosfat en aquest compost. Poc temps després, Warburg va descobrir que els eritròcits de mamífer contenen un factor termoestable i dialitzable necessari per a l'oxidació de la glucosa 6-fosfat a 6-fosfogluconat. El 1935, Warburg i Christian van aïllar aquest cofactor dels eritròcits i van establir que contenia una molècula d'adenina, dues unitats de pentosa, tres equivalents d'àcid fosfòric i una molècula de l'amida de l'àcid nicotínic. Poc temps després, l'any 1937, es va descobrir que l'àcid nicotínic era efectiu en la prevenció i tractament de la pelagra, una malaltia originada per la deficiència en la dieta d'aquesta vitamina (vegeu Sebrell, 1981). El descobriment de la nicotinamida en el compost de Warburg va permetre a Von Euler determinar la presència de nicotinamida en la seva preparació (Von Euler et al., 1936) i basant-se en el treball realitzat per aquest autor, Schlenck i associats es va establir l'estructura química de la cozimasa (Von Euler i Schlenck, 1937) (fig.1.2).

La Unió Internacional de Bioquímica ha adoptat els termes nicotinamida adenin-dinucleòtid (NAD) i nicotinamida adenin-dinucleòtid fosfat (NADP) per designar aquests coenzims respectivament. Les seves formes reduïdes s'anomenen NADH i NADPH.

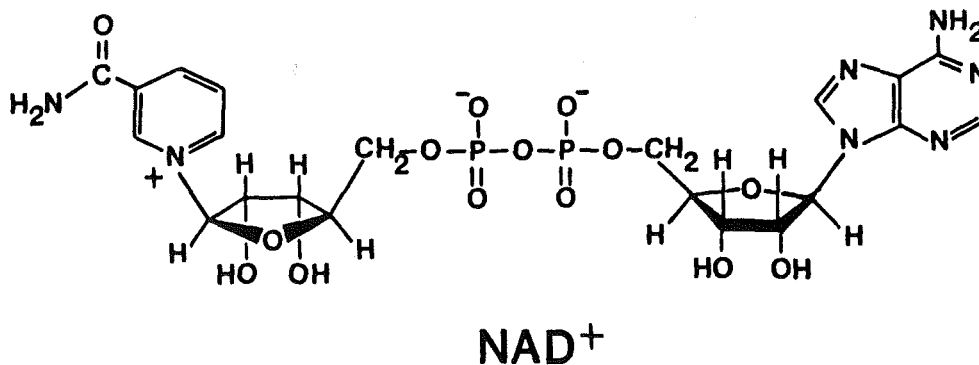


Fig.1.2- Estructura química del NAD.

A les últimes tres dècades s'han trobat gran nombre de deshidrogenases que requereixen NAD o NADP o ambdós en plantes, animals i microorganismes. El NAD és, probablement, el coenzim respiratori més abundant a la natura i serveix com a transportador d'electrons en els sistemes d'oxidació-reducció tant anaerobis com aerobis.

Sota condicions acídiques les formes oxidades dels nucleòtids de piridina són més estables que les formes reduïdes. Les formes reduïdes experimenten una ràpida anomerització de la configuració  $\beta$  cap a una barreja de formes  $\alpha$  i  $\beta$  en solucions acídiques (Jacobson et al., 1973). No obstant això, sota condicions alcalines, les formes reduïdes són més estables que les oxidades, ja que l'enllaç N-glicosílic entre l'anell de nicotinamida i la ribosa es trenca per generar ADP-ribose i nicotinamida. És important assenyalar que només la configuració  $\beta$  del NAD és activa a les reaccions d'oxidació-reducció catalitzades per deshidrogenases i no hi ha cap evidència de l'existència natural de la configuració  $\alpha$ .

En el seu paper com a cofactor de les reaccions d'oxidació-reducció, una molècula de NAD és utilitzada catalíticament, els electrons es mouen cap i des de l'anell de piridina, i no hi ha síntesi o trencament net del NAD. Contràriament, l'ADP-ribosilació provoca una ruptura de la molècula de NAD per donar nicotinamida i un residu d'ADP-ribose. Sense un esdeveniment sintètic compensador els nivells de NAD decreixerien. A moltes cèl.lules, la nicotinamida produïda pel trencament del NAD s'incorpora de nou al "pool" d'aquest nucleòtid.

Les principals vies metabòliques per a la síntesi de NAD als organismes eucariotes es presenten a la fig.1.3.

Hi ha dos camins ben coneguts que condueixen a la síntesi de NAD, malgrat que no es troben a tots els sistemes eucariotes. La síntesi "de novo" del NAD involucra la conversió del triptòfan a àcid quinolínic, el qual es pot convertir en NAD via l'àcid nicotínic mononucleòtid pels enzims quinolinat fosforibosil transferasa, NMN:adenil transferasa i NAD sintetasa glutamina hidrolitzant. L'altre camí, anomenat de "salvament", utilitza anells de piridina preformats, tant nicotinamida com nicotinat. La via de l'àcid nicotínic, proposada per Preiss i Handler (1958a,b) té com a enzim responsable la nicotinat fosforibosil transferasa i la via de la nicotinamida, proposada per Dietrich et al. (1966), té la nicotinamida fosforibosil transferasa.

El triptòfan és una aminoàcid que es troba habitualment a la dieta, malgrat que els diferents animals varien considerablement en la seva habilitat per convertir el triptòfan en l'anell de piridina del NAD (Nishizuka i Hayaishi, 1971b). Als mamífers només el fetge i el ronyó semblen tenir la capacitat d'utilitzar-lo, ja que contenen l'enzim quinolinat fosforibosil transferasa. Per tant, si el triptòfan és l'única font de l'anell de piridina, aquests dos òrgans assumeixen la responsabilitat de mantenir els nivells de NAD a tots els altres teixits de l'organisme. La NMN: adenil transferasa va ésser descoberta per Kornberg als eucariotes inferiors (Kornberg, 1950) i posteriorment s'ha trobat també als eucariotes superiors (Ferro i Kuehl, 1975). En canvi, la NAD sintetasa s'ha trobat només a teixits de mamífer tals com el fetge de rata (Preiss i Handler, 1958). A causa que aquests enzims no són sintetitzats a tots els teixits, els camins de "salvament" per a la síntesi de NAD funcionen com a principal font de NAD als eucariotes superiors.

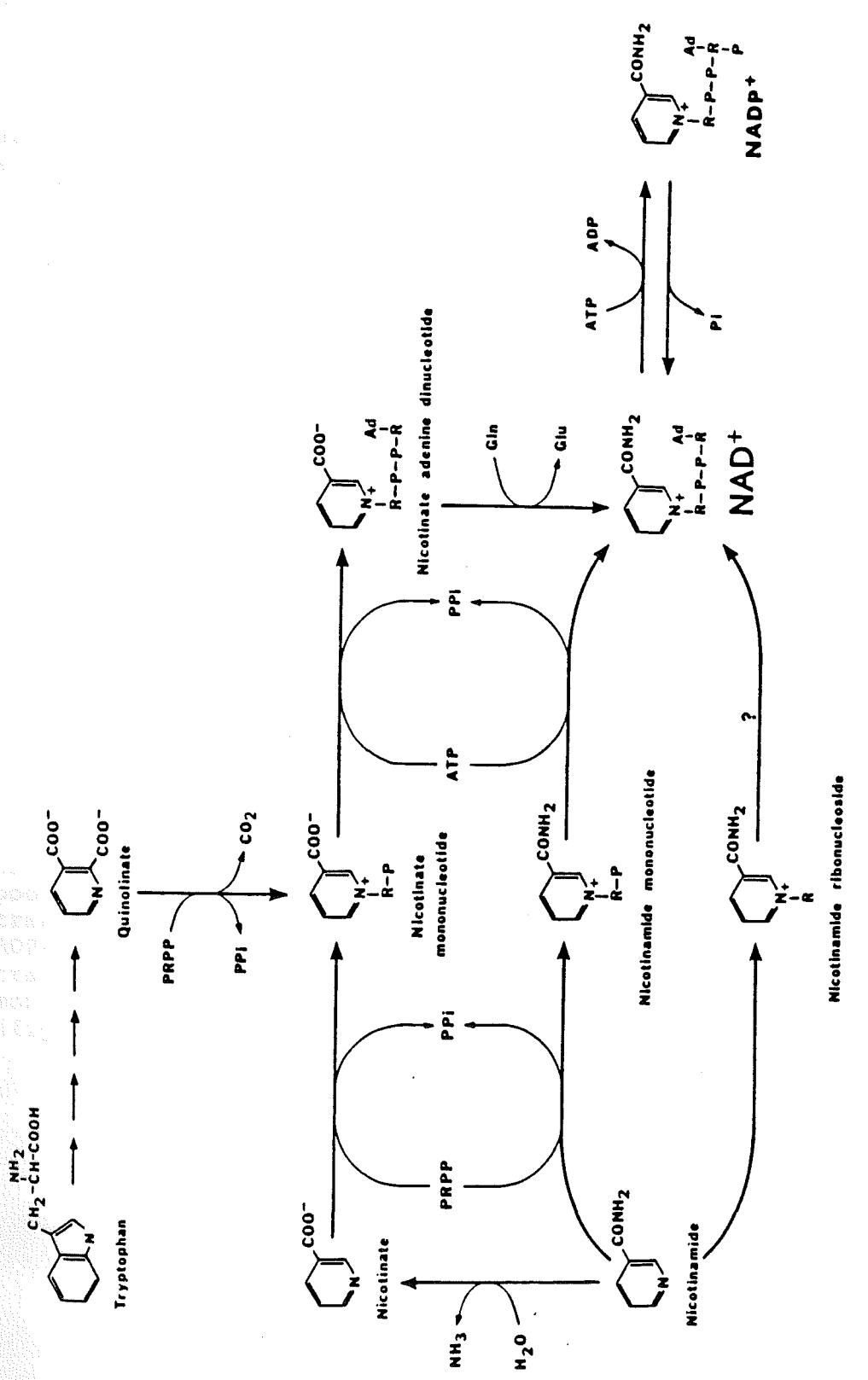


Fig.1.3- Camins metabòlics per a la síntesi del NAD als eucariotes.

### 1.1.2. Catabolisme del nicotinamida-adenin-dinucleòtid

Malgrat que la funció biològica dels nucleòtids de piridina com a molècules transferidores d'electrons és essencial per a pràcticament totes les formes de vida, aquest no és l'únic paper metabòlic d'aquestes biomolècules. El NAD pot ésser utilitzat com a substrat per moltes altres classes d'enzims que consumeixen NAD ja que aquest conté dos enllaços que tenen una elevada energia lliure d'hidròlisi negativa. Per exemple, l'enllaç fosfoanhídric s'usa com a font d'energia quan es trenca per donar nicotinamida mononucleòtid (NMN) i AMP en E.Coli i altres procariotes durant la síntesi dels enllaços fosfodièster del DNA, catalitzat per la DNA lligasa (Olivera i Lehman, 1967; Zimmerman et al., 1967). En canvi, en la reacció equivalent que té lloc als eucariotes s'utilitza ATP com a font d'energia.

L'enllaç N-glicosílic és també considerat d'alta energia ja que la seva energia lliure d'hidròlisi és aproximadament de  $-8.2$  Kcal/mol a pH 7 i  $25$  °C (Zatman et al., 1953). L'energia alliberada pel trencament d'aquesta unió produeix la necessària força termodinàmica per a la modificació covalent de les proteïnes per ADP-ribosilació, amb la concomitant pèrdua de nicotinamida que es pot utilitzar per tornar a sintetitzar NAD (Kaplan et al., 1952). Hi ha dues classes diferents d'enzims que catalitzen la hidròlisi del NAD en ADP-ribosa i nicotinamida. Una és la de les NAD-glicohidrolases, que transfereixen el residu d'ADP-ribosa a l'aigua, la millor coneguda de les quals es troba a la membrana plasmàtica, i per tant no accessible al pool intracel·lular de NAD. L'altra és la de les ADP-ribosil transferases, que modifiquen les proteïnes per ADP-ribosilació post-traduccionament. Les ADP-ribosil transferases poden, així mateix, ésser classificades en mono(ADP-ribosil) transferases i poli(ADP-ribosa) polimerasa (fig.1.4).

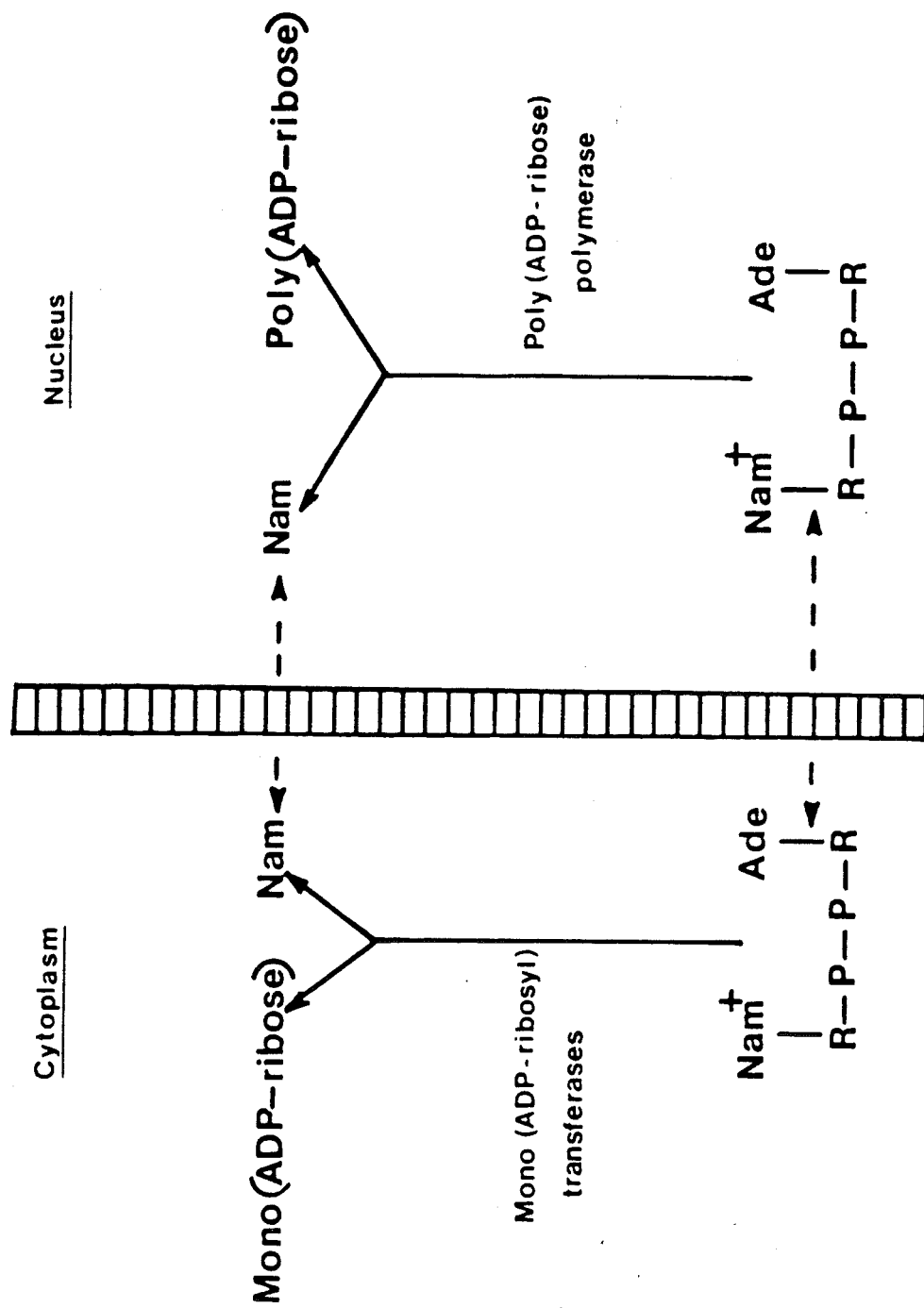


Fig.1.4- Camins metabòlics per a la degradació del NAD als eucariotes.



## 1.2. POLI(ADP-RIBOSILACIÓ)

### 1.2.1. Estructura i propietats de la poli(ADP-ribosa)

La formació de la poli(ADP-ribosa) es va demostrar per primera vegada als nuclis de fetge de porc (Chambon et al., 1963) i fetge de rata (Fujimura et al., 1965). Després d'incubar nuclis aïllats amb NAD i ATP es recuperava 5' fosforibosil, procedent del NAD, i 5'AMP, procedent de l'ATP, dins del material insoluble en àcid. Posteriors investigacions van demostrar que el NAD era el substrat i que el NAM i l'ATP actuaven com a precursors: quan es va utilitzar NAD marcat radioactivament en posicions diferents, les anàlisis van revelar que totes les parts de la molècula, a excepció de la nicotinamida, eren incorporades dins del producte (Chambon et al., 1966; Nishizuka et al., 1967; Reeder et al., 1967). A finals dels anys 60 els autors esmentats anteriorment van obtenir evidències que indicaven que el nou compost era un homopolímer d'unitats d'ADP-ribosa unides entre si mitjançant un enllaç (1''→2') α-glicosílic entre ambdues riboses (fig 1.5).

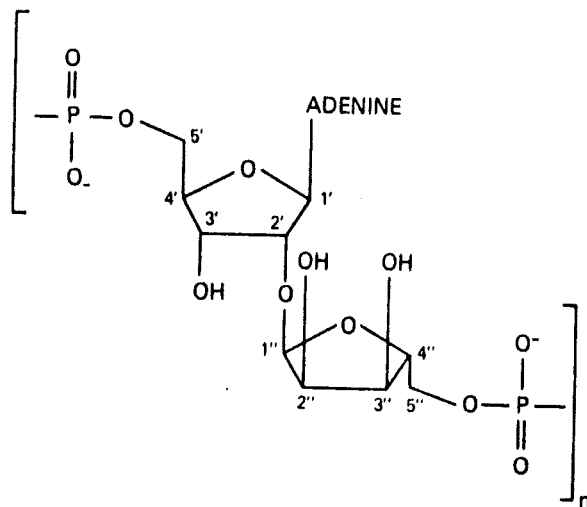


Fig.1.5- Estereoquímica de l'enllaç ribosa-ribosa en la poli(ADP-ribosa).

El 1979 Miwa et al. van demostrar que la poli(ADP-ribosa), sintetitzada a partir de nuclis de lletó de vedella i digerida amb fosfodiesterasa de verí de serp, era una molècula ramificada. Van suggerir que la freqüència de ramificació era, aproximadament, d'un residu d'ADP-ribosa per cada 40-50 residus d'alt pes molecular. Els enllaços ribosa-ribosa de les porcions ramificades són, a l'igual que a les linears, del tipus (1'→2') $\alpha$ -glicosílic (Miwa et al., 1981). Poc temps després es va demostrar l'existència de poli(ADP-ribosa) in vivo (Sims et al., 1980). El polímer aïllat de la natura també conté ramificacions (Juarez-Salinas et al., 1982).

Pel que fa referència a la longitud del polímer s'ha descrit que varia des de tres fins a alguns centenars d'unitats d'ADP-ribosa (Hayaishi i Ueda, 1977) i pot dependre, entre altres coses, de les condicions experimentals. Els mètodes més emprats per mesurar aquesta longitud han estat les electroforesis en gels de poliacrilamida, la filtració en gel, la cromatografia de paper i la centrifugació en gradient de densitat. Minaga i Kun (1983 a,b) han suggerit, a partir de la proporcionalitat entre l'absorvència i l'espectre de dicroïsme circular, una probable conformació helicoidal de la poli(ADP-ribosa) lliure, és a dir, sense estar unida a proteïnes.

Gràcies a l'obtenció d'anticossos contra la poli(ADP-ribosa), Ikai et al. (1980a,b) han demostrat immunohistoquímicament la presència d'aquest compost al nucli de diferents teixits. Els mateixos anticossos es troben de manera natural als malats de lupus eritematós sistèmic (Kanai et al., 1977), una malaltia autoimmune que es caracteritza per l'aparició d'anticossos de considerable diversitat. Recentment, Kanai et al. (1985) han produït un anticòs monoclonal contra el polímer, però aquest anticòs reacciona també amb el DNA de cadena senzilla i el zDNA.

### 1.2.2. Metabolisme de la poli(ADP-ribosa)

Els camins de biosíntesi i degradació de la poli(ADP-ribosa) unida a proteïnes involucren principalment tres enzims: la poli(ADP-ribosa) polimerasa, la poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa i l'ADP-ribosil proteïna liasa (fig.1.6).

#### a) POLI(ADP-RIBOSA) POLIMERASA

La poli(ADP-ribosa) polimerasa, també anomenada poli(ADP-ribosa) sintetasa, és l'enzim que catalitza la formació d'un polímer d'ADP-ribosa a partir del NAD cap a una molècula acceptadora. Una preparació de l'enzim, aparentment homogènia, és capaç de sintetitzar els tipus de reaccions següents:

- 1- hidròlisi del NAD
- 2- Iniciació:  $\text{NAD} + \text{acceptador} \longrightarrow \text{ADP-ribosa-acceptador} + \text{Nm}$   
(carboxil èster)
- 3- elongació:  $n\text{NAD} + \text{ADP-ribosa-acceptador} \longrightarrow (\text{ADP-ribosa})_n\text{-ADP-ribosa-acceptador} + n\text{Nm}$   
(1' → 2' - α-glicosílic)
- 4- ramificació:  $\text{NAD} + (\text{ADP-ribosa})_n\text{-ADP-ribosa-acceptador} \longrightarrow \text{ADP-ribosa}-(\text{ADP-ribosa})_n\text{-acceptador} + \text{Nm}$   
ADP-ribosa ————  
(1' → 2' α-glicosílic)
- 5- automodificació

La poli(ADP-ribosa) polimerasa, o l'activitat de l'enzim, s'ha trobat a gairebé totes les cèl.lules eucariotes examinades fins a l'actualitat (Ueda et al., 1982), incloent-hi animals, plantes, plasmòdium (Okolie i Onyezile, 1983) tetrahymena i llevat (Miwa et al., 1983). Entre els teixits animals, els granulòcits madurs de rata i home són els primers exemples als quals falta activitat enzimàtica (Ikai et al., 1980 a,b). Notables excepcions són, també, les cèl.lules epidèrmiques terminalment diferenciades i les cèl.lules de l'epiteli intestinal (Ueda et al., 1983).

Pel que fa a la localització de l'enzim, Ueda et al. (1968) van descriure que la major part de l'activitat, el 80-90 % de l'activitat total, estava associada a la cromatina. La localització nuclear de l'enzim també ha estat confirmada per immunohistoquímica (Ikai et al., 1982; Ikai i Ueda, 1983).



L'enzim s'ha purificat extensament de molts teixits (Ueda et al., 1982), com per exemple, fetge de rata, lletó de vedella, lletó de porc (Okayama et al., 1980; Niedergang et al., 1979; Yoshihara et al., 1978), testicle de ratolí (Agemori et al., 1982), cèl.lules de tumor d'Ehrlich Ascites (Kristensen i Hotlund, 1978) i cèl.lules HeLa (Jump i Smulson, 1980). Es una proteïna globular amb una lleugera asimetria i que consta d'un únic polipèptid de pes molecular 110.000 a 130.000. El seu alt contingut en lisina determina una proteïna bàsica, amb un punt isoelèctric entre 9-10. Té una dependència de DNA pràcticament absoluta, s'activa per polications ( $Mg^{++}$ , histones, poliamines) i requereix agents reductors de grups SH.

La propietat més destacable, dependència de DNA, ha estat investigada en detall (Ohgushi et al., 1980; Benjamin i Gill, 1980; Yoshihara i Kamiya, 1982): doble cadena, presència de "nicks" o extrems 5' i 3' terminals i una longitud de 8-10 parells de bases són els requeriments estructurals identificats per l'activació. Els estudis de Berger i Petzold (1986) indiquen que els oligòmers defosforilats són activadors més efectius de l'enzim que els 5' fosforilats i que els oligòmers 3' fosforilats es troben en una situació intermèdia respecte a la seva habilitat per activar l'enzim. No es coneix el paper de la histona H1 en aquesta activació. No obstant això, és possible que la histona alteri les propietats d'unió de l'enzim (Berger, 1985). En alguns laboratoris l'enzim ha estat purificat associat a fragments de DNA, anomenats sDNA, els quals eliminen la necessitat de DNA exogen per aconseguir l'estimulació (Hashida et al., 1979; Niedergang et al., 1979). Recents estudis indiquen que la poli(ADP-ribosa) polimerasa protegeix un segment de DNA de doble cadena de 60-90 parells de bases de la digestió amb nucleasa (Ittel et al., 1985), la qual cosa suggereix que una molècula de l'enzim unida al DNA cobreix un fragment de 60-90 pb de longitud.

Utilitzant una tècnica de proteòlisi limitada Kameshita et al. (1984) han demostrat que la poli(ADP-ribosa) polimerasa de lletó de vedella conté tres dominis separables: el primer de 54 KDa té el lloc per a la unió del substrat, el segon de 46 KDa el lloc per on s'uneix al DNA i el tercer de 22 KDa conté els llocs d'automodificació, és a dir acceptadors de la poli(ADP-ribosa) (fig.1.7).

Estudis de reconstitució i ADP-ribosilació de la poli(ADP-ribosa) polimerasa fragmentada proteolíticament indiquen que el DNA juga un paper crític en la reconstitució de l'activitat catalítica com també en la poli(ADP-ribosilació) de fragments de l'enzim (Kameshita et al., 1986).

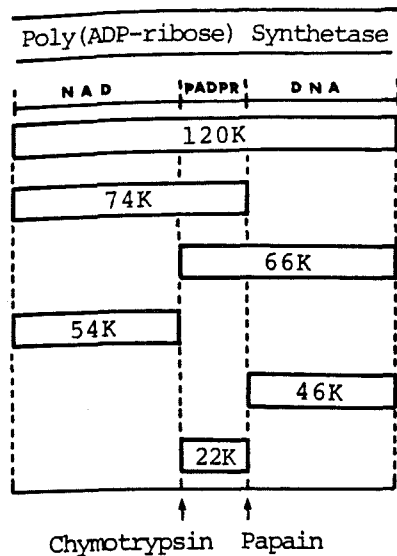


Fig.1.7- Fragments proteolítics de la poli(ADP-ribose) polimerasa de lletó de vedella (Kameshita et al., 1985).

S'ha demostrat que l'automodificació té lloc a aproximadament 15 residus de la molècula (Kawaichi et al., 1980). Aquesta múltiple modificació fa decreïxer l'afinitat pel DNA activador (de Murcia et al., 1983; Zahradka i Ebisuzaki, 1982), cosa que suposa una parcial inactivació de l'enzim (Kawaichi et al., 1980).

Basant-se en anàlisis d'enzims diferentment automodificats, Ferro i Olivera (1982) han proposat la idea del "punt de repulsió", mentre que Zahradka i Ebisuzaki (1982) proposen un "mecanisme de llançadora". Segons aquests últims autors l'auto(ADP-ribosilació) de l'enzim actiu provoca una repulsió de càrregues entre aquest i el DNA associat, que causa una dissociació de l'enzim i l'autoinactivació (Kawaichi et al., 1981; Zahradka i Ebisuzaki, 1982).

La síntesi de poli(ADP-ribose) és inhibida per un ampli espectre d'inhibidors (Ueda et al., 1982). La fig.1.8 mostra els principals inhibidors de la poli(ADP-ribosilació) que s'utilitzen. Aquests inclouen: nicotinamida i els seus anàlegs (Purnell i Whish, 1980), metilxantines i nucleòtids que contenen adenina (Levi et al., 1978) entre altres. Un punt important és que els anàlegs de la nicotinamida, com també altres inhibidors de la síntesi de poli(ADP-ribose), són inhibidors de les mono(ADP-ribosil) transferases, i per tant s'ha d'anar en compte en interpretar l'efecte causat per aquests inhibidors (Cleaver, 1984). Malgrat això, s'ha de destacar que aquests inhibidors no afecten significativament l'activitat de la poli(ADP-ribose) glicohidrolasa i/o NAD-glicohidrolasa.

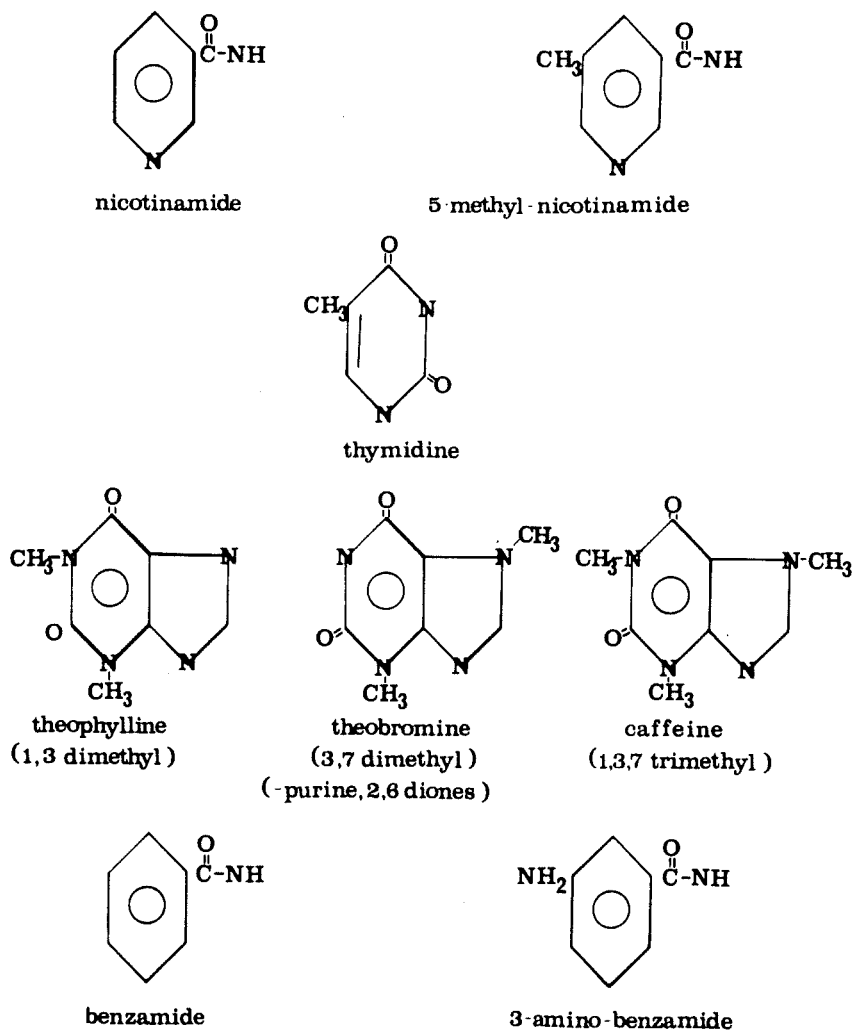


Fig.1.8- Inhibidors de la poli(ADP-ribosa) polimerasa nuclear (Shall, 1982).

b) FOSFODIESTERASES, POLI(ADP-RIBOSA) GLICOHIDROLASA I ADP-RIBOSIL PROTEÏNA LIASA

Els polímers d'ADP-ribosa són degradats per dues classes d'enzims diferents: les fosfodiesterases (Miwa et al., 1975a; Gill i Meren, 1978) amb activitat pirofosfatasa de verí de serp, fetge de rata i tabaco, que hidrolitzen el pont pirofosfat, i la poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa (Miwa et al., 1981, 1982), que trenca l'enllaç  $\alpha$ -glicosílic del polímer per generar mono(ADP-ribosa) (fig.1.9).

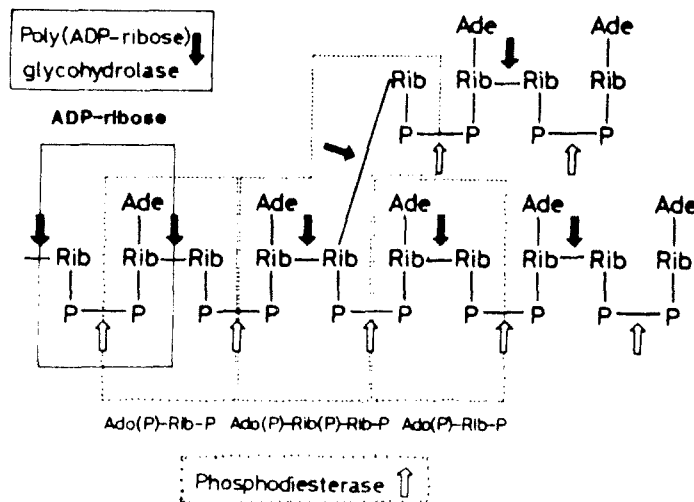


Fig.1.9- Acció dels enzims que hidrolitzen la poli(ADP-ribosa) i els seus productes de digestió (Miwa i Sugimura, 1982).

La poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa sembla ésser el principal responsable del recanvi del polímer in vivo, per raó de la seva afinitat i especificitat per a la poli(ADP-ribosa) (Miwa et al., 1975b). Recentment, Tanuma et al. (1986b) han identificat dues activitats (formes I i II) que degraden (ADP-ribosa) exo-glicosídicament en cèl.lules HeLa. La forma I s'extrau del nucli només per sonicació a alta força iònica, mentre que la forma II és soluble al citosol. Les dues formes actives difereixen en el comportament cromatogràfic, la  $K_m$  per a la (ADP-ribosa) (forma I  $2.3 \mu M$  i forma II  $0.5-5 \mu M$ ), en el pH (6.7 i 7.3 respectivament) i requeriments de sal per a l'activitat òptima, malgrat que ambdues formes mostren propietats característiques de (ADP-ribosa) glicohidrolasa, tals com sensibilitat a ADP-ribosa i AMPc (Tavassoli et al., 1983) i demanda de grups sulfidril. Les formes I i II tenen uns pesos moleculars aparents de 72.000 i 53.000 respectivament, com es determina per gel filtració (Tanuma et al., 1986b).



Els mateixos autors han identificat una (ADP-ribosa) glicohidrolasa al nucli de fetge del conill d'Indies (Tanuma et al., 1986a) i una altra al citosol d'eritròcits humans, que correspondria a la forma II (Tanuma et al., 1986c).

La mono(ADP-ribosa) residual unida a la proteïna no és substrat per a la poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa i és alliberada per l'ADP-ribosa proteïna liasa (Okayama et al., 1978; Oka et al., 1984; Smith et al., 1985). L'activitat de l'enzim, de 80.000 D de pes molecular (Oka et al., 1984), és altament específica per als èsters carboxílics de la mono(ADP-ribosa). La reacció de trencament té lloc per eliminació, i no per hidròlisi, al carbó 3'' de la ribosa i el seu producte és 5'-ADP-3''-deoxipent-2''-enofuranosa i el seu possible tautomerisme (Komura et al., 1983; Oka et al., 1984).

Aquest enzim juga un paper clau en el recanvi de grups ADP-ribosil a la cèl.lula ja que representa el pas limitant (Benjamin i Gill, 1980; Wielckens et al., 1982). Williams et al (1984a) han descrit una malaltia d'acumulació de substàncies als lisosomes que es manifesta per un progressiu deteriorament neurològic i insuficiència renal (Williams et al., 1984b). A jutjar per la seva estructura, que representa la regió d'unió de les histones-ADP-ribosil, el defecte primari dels pacients sembla ésser una anormalitat genètica de l'ADP-ribosil proteïna liasa.

### 1.2.3. Proteïnes acceptadores de la poli(ADP-ribosa)

Un gran nombre de proteïnes s'han identificat com a acceptadores de la poli(ADP-ribosa) in vitro (Adamietz, 1982), algunes de les quals es troben a la taula I.

Enzyme	Acceptor	
	Protein	Amino acid
<u>Nuclear enzymes</u>		
Poly(ADP-ribose) synthetase	core histones (H2B)	glutamate
	linker histone (H1)	glutamate, COOH-terminus
	Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> -dependent endonuclease	unknown
	Poly(ADP-ribose) synthetase	unknown
	RNA polymerase $\alpha$ I	unknown
	A24 protein	unknown
	high-mobility group proteins	unknown
	actin	unknown
	RNases	unknown
	SV40 T antigen	unknown
	heterogeneous nuclear RNA-associated protein	unknown
	nuclear matrix proteins	unknown
	adenovirus T antigen and core proteins	unknown
	polyoma virus minichromosome proteins	unknown
	topoisomerase I	unknown
	stress-induced protein	unknown
Nucleolar enzyme	nucleolar proteins	unknown
<u>Extranuclear enzymes</u>		
Microsomal enzyme	histones	unknown
Mitochondrial enzyme	"M-band" proteins	unknown
Reovirus enzyme	capsid proteins	unknown

Taula I- Proteïnes acceptadores de la poli(ADP-ribosa)  
(Ueda i Hayaishi, 1985).

Malgrat que les histones estan ben caracteritzades com a acceptadores (Okayama et al., 1978; Burzio, 1982; Adamietz, 1982), s'ha descrit que aquestes, i de manera especial les histones del core, es troben principalment modificades per oligòmers curts o fins i tot monòmers (Adamietz et al., 1978; Ogata et al., 1980a,b; Ueda et al., 1983).

Entre les no histones un dels principals acceptadors és la poli(ADP-ribosa) polimerasa (Jump i Smulson, 1980; Ogata et al., 1981; Surowy i Berger, 1983). S'ha demostrat que l'automodificació de l'enzim condueix a la seva inactivació (Berger et al., 1983). Altres proteïnes acceptadores *in vitro* són les HMGs (Reeves et al., 1981), el conjugat u-H2A (Okayama i Hayaishi, 1978), les topoisomereses I (Ferro i Olivera, 1984) i II (Darby et al., 1985), una endonucleasa dependent de  $Ca^{++}$  i  $Mg^{++}$  (Yoshihara et al., 1975), la fosforilasa kinasa (Tsuchiya et al., 1985), la deoxinucleotidil transferasa terminal (Tanaka et al., 1986), la RNA pol II (Taniguchi et al., 1985), les DNA polimerases  $\alpha, \beta$  i la DNA lligasa II (Yoshihara et al., 1985).

A causa de la sensibilitat a l'àlcali i  $NH_2OH$  neutre, la major part de les unions proteïna-ADP-ribosa semblen ésser èsters carboxílics (Burzio et al., 1982). Aquest tipus d'unió s'ha identificat en dues classes d'acceptadors, la histona H1 i l'H2B de fetge de rata (Burzio et al., 1982). La histona H1 accepta ADP-ribosa en quatre llocs, Glu-2, Glu-14, Glu-116 i Lys-213 dels extrems C i N terminals (Riquelme et al., 1979; Ogata et al., 1980b) i la histona H2B en una única posició, Glu-2 (Burzio et al., 1979; Ogata et al., 1980a). En tots els casos el residu ADP-ribosil s'uneix a un grup carboxil, tant  $\gamma$ -Glu com  $\alpha$ -carboxil(lys COOH terminal) i es forma un enllaç tipus èster (O-glicosílic) (fig.1.10).

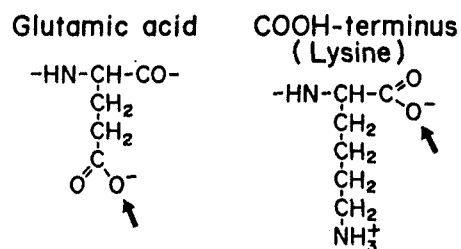


Fig.1.10- Aminoàcids acceptadors de la poli(ADP-ribosa) (Ueda i Hayaishi, 1985).

A part de la sensibilitat a la hidroxilamina neutra dels enllaços èster, existeix una petita proporció de poli(ADP-ribosil) proteïnes resistents a  $\text{NH}_2\text{OH}$  i/o àlcali resistents (Hilz i Stone, 1976; Adamietz, 1982). En vista del fet que les cadenes d'ADP-ribosa unides químicament o enzimàtica (amb un enzim específic d'arginina) a proteïnes bàsiques poden ésser elongades per la poli(ADP-ribosa) polimerasa (Ueda et al., 1979; Tanigawa et al., 1984), la majoria d'enllaços resistents a  $\text{NH}_2\text{OH}$  semblen ésser iniciats per mono(ADP-ribosil) transferases (Moss i Vaughan, 1978; Lee i Iglewski, 1984; Tanigawa et al., 1984).

#### 1.2.4. Poli(ADP-ribosilació) i estructura de la cromatina

El DNA del nucli de les cèl.lules eucariotes es troba complexat amb diverses macromolècules, com RNA de mides diferents i gran varietat de proteïnes. Hi ha dos grups ben determinats de proteïnes: les histones, que són molt bàsiques i es troben en una relació fixa amb el DNA, i les no histones, grup més heterogeni de proteïnes àcídiques o no tan bàsiques com les histones i que es troben en quantitats molt variables segons els teixits.

Entre les histones, l'H2A, H2B, H3 i H4 es troben en una proporció equimolecular, mentre que, de l'H1 se'n troba, en general, la meitat que de cada una de les altres. L'associació del DNA amb les histones dóna lloc al nucleosoma, subunitat bàsica de la cromatina eucariota (Kornberg, 1977; McGhee i Felsenfeld, 1980). Al nucleosoma el DNA està enrotllat damunt un octàmer central d'histones, compost per dues molècules de cada una de les histones H2A, H2B, H3 i H4 (Kornberg i Thomas, 1974; Hjelm et al., 1977). Per estudis d'entrecreuament s'ha vist l'existència de tetràmers formats per dues molècules d'H3 i dues d'H4, alhora que l'H2A i H2B interaccionen amb facilitat per donar dímers H2A-H2B (Kornberg, 1977). Sembla que la interacció del tetràmer amb els dímers es realitza mitjançant l'extrem C-terminal de l'H2B (Burlingame et al., 1985).

La histona H1 es troba per fora del nucleosoma interaccionant amb el fragment de DNA internucleosòmic (McGhee i Felsenfeld, 1980). En presència d'una molècula d'H1 s'estabilitzen dues voltes completes de DNA, equivalents a 165 pb, damunt de l'octàmer. L'estructura que es forma s'anomena cromatosoma (Simpson, 1978; Allan et al., 1980).

Les funcions de la cromatina tals com replicació, transcripció, reparació... són regulades per alteracions dinàmiques de la seva estructura per diferents processos, un dels quals pot ésser la modificació de les proteïnes nuclears. No està clar, però, com afecta la poli(ADP-ribosilació) aquesta estructura ja que diferents estudis indiquen tant un relaxament (Niedergang et al., 1985) com una condensació (Wong et al., 1982) de la cromatina que conté proteïnes ADP-ribosilades.

D'una banda, estudis realitzats per Smulson et al. a principis dels anys 80 en cromatina de cèl.lules HeLa semblaven indicar una correlació directa entre la concentració de NAD, el nivell d'agregació de la cromatina i la longitud de les cadenes de poli(ADP-ribosa). Almenys histones ADP-ribosilades i la poli(ADP-ribosa) polimerasa estaven presents al material complexat. Experiments amb

nucleasa micrococcal, tant a nivell nuclear com d'oligonucleosoma, demostraven una resistència a la digestió dels dominis de cromatina poli(ADP-ribosilats) en comparació a les regions no modificades. Els esmentats autors trobaven in vitro la formació d'un dímer d'H1 unit per 15-16 unitats d'ADP-ribosa a unes concentracions de NAD que afavorien l'agregació de la cromatina (Butt i Smulson, 1980; Butt et al., 1980; Wong et al., 1982).

Basant-se en els seus estudis Butt i Smulson (1982) proposen una representació en forma de diagrama de la interacció de l'H1 en l'estructura de la cromatina a partir d'un model originari de Thoma et al. (1979) (Fig.1.11).

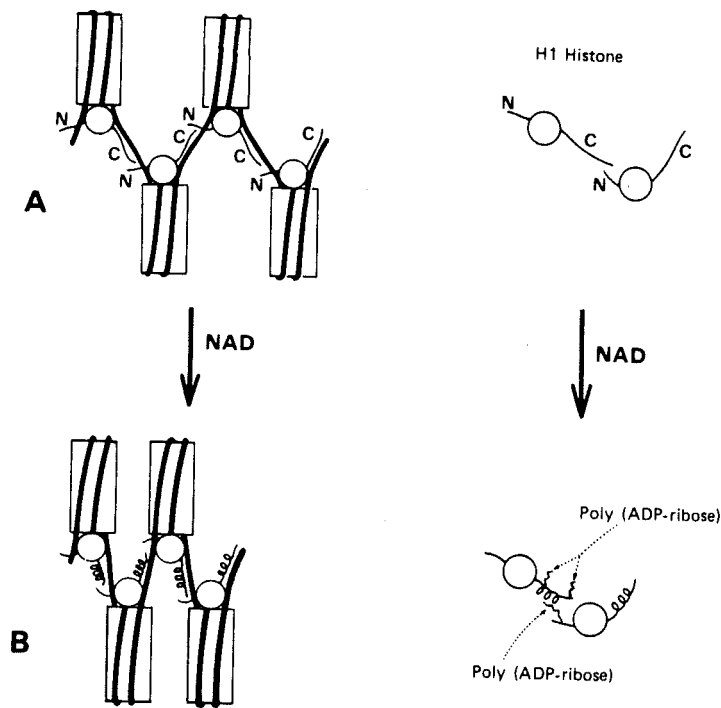


Fig.1.11- Diagrama que mostra l'organització dels cromatosomes i la interacció de l'H1 (Butt i Smulson, 1982)

A- estructura relaxada

B- estructura condensada

El gràfic de la dreta mostra la interacció dependent de poli(ADP-ribosa) entre dues molècules d'H1.

Una disposició en zig-zag dels cromatosomes és representativa de la cromatina relaxada, tal com s'observa al microscopi electrònic a baixa força iònica (Thoma et al., 1979). En el solenoide compacte els cromatosomes cilíndrics han d'estar empaquetats en forma d'espiral (McGhee et al., 1980).

Quatre llocs possibles per acceptar ADP-ribosa han estat identificats a l'H1 (Riquelme et al., 1979; Ogata et al., 1980) i es troben distribuïts entre els extrems C i N terminals. Els autors esmentats anteriorment proposen que la poli(ADP-ribosilació) de les regions C i N terminals de les histones donaria lloc als canvis següents: a) es promourien les interaccions electrostàtiques entre extrems C i N terminals de molècules d'H1 veïnes. Aquestes regions podrien ésser "cross-linked" via la construcció d'un dímer d'H1 a altes concentracions de NAD; b) un canvi en l'estructura secundària de l'extrem C terminal de l'H1 provocaria una alteració de la seva interacció amb el DNA internucleosomal. A més, les interaccions electrostàtiques entre l'H1 i les histones del nucleosoma podrien incrementar. El resultat de la modificació seria, doncs, una condensació de l'estructura.

D'altra banda, el grup de Poirier et al. ha identificat, en cromatina de pàncrees de rata, la histona H1 com a principal acceptadora de poli(ADP-ribosa) in vitro amb concentracions de NAD superiors a 10  $\mu$ M (Aubin et al., 1982 a,b). Poirier et al. (1982) han demostrat un efecte de relaxament de l'estructura de la cromatina per la poli(ADP-ribosa) polimerasa exògena. El mateix efecte s'ha vist per l'enzim endogen (Aubin et al., 1983).

Més recentment, aquests autors descriuen un efecte de la hiper(ADP-ribosilació) de l'H1 en les propietats de solubilització dels oligonucleosomes en presència de  $Mg^{++}$  i alta força iònica, de manera que augmenta la seva solubilitat (Fréchette et al., 1985). La solubilització dels oligonucleosomes poli(ADP-ribosilats) podria ésser explicada suposant un comportament similar per a la histona H1 al proposat per Ferro i Olivera (1982) per a la poli(ADP-ribosa) polimerasa automodificada. D'acord amb el seu argument l'enzim auto(ADP-ribosilat) perd l'afinitat per al seu DNA associat ja que és repel·lit a causa de l'acumulació de càrregues negatives. Per tant, una força de repulsió similar podria ésser creada en l'H1 amb la generació de formes intermèdies modificades de manera diferent depenent del temps (Poirier et al., 1985). La cromatina adoptaria, doncs, una conformació relaxada.

### 1.2.5. Poli(ADP-ribosilació) i diferenciació

Una estreta correlació entre la diferenciació condrocítica de les cèl.lules mesenquimals de membre d'embrió de pollastre i l'eliminació de l'activitat poli(ADP-ribosilant) va ésser confirmada per Caplan et al. (1979) després d'assajar el contingut de poli(ADP-ribosa) i per Nishio et al. (1983) utilitzant inhibidors de la poli(ADP-ribosa) polimerasa.

Una baixada en la poli(ADP-ribosilació) durant la diferenciació ha estat observada en molts altres tipus cel.lulars, tals com cèl.lules de l'epiteli intestinal (Porteous et al., 1979), cèl.lules murines eritroleucèmiques de Friend (Morioka et al., 1979), granulòcits (Ikai et al., 1980), preadipòcits de ratolí induïts a la diferenciació (Pekala et al., 1981) o promielòcits leucèmics humans de la línia HL60 (Kanai et al., 1982).

Els neutròfils no contenen poli(ADP-ribosa), tal com s'ha demostrat per tècniques immunohistològiques, i no es detecta activitat enzimàtica als seus nuclis aïllats. En canvi, els precursors dels neutròfils, mieloblasts i promieloblasts, contenen ADP-ribosa, a més d'activitat poli(ADP-ribosa) polimerasa. S'ha proposat que la presència de polímer podria ésser un marcador per a la maduració de les cèl.lules mieloides (Ikai et al., 1982).

Francis et al. (1983) demostren que tres inhibidors específics de l'enzim, com són la 5-metilnicotinamida, 3-metoxibenzamida i 3-aminobenzamida, inhibeixen la diferenciació de les cèl.lules humanes progenitores de granulòcits/macròfags cap al linatge de macròfags. En estudiar el paper de la poli(ADP-ribosa) polimerasa en la diferenciació dels monòcits/macròfags, els esmentats autors han demostrat també que la màxima inhibició de la diferenciació dels macròfags només té lloc quan l'inhibidor és afegit dins de les primeres 24 hores de cultiu. Per tant, ells suggereixen que es requereix la poli(ADP-ribosilació) en un dels primers esdeveniments de la diferenciació de les cèl.lules precursors de granulòcits/macròfags. Un reordenament del DNA podria, doncs, estar involucrat en la diferenciació dels progenitors de granulòcits/macròfags cap al camí de monòcits/macròfags. De la mateixa manera, l'exposició de les cèl.lules HL60 a la 3-aminobenzamida facilita els marcadors fenotípics dels granulòcits, mentre que inhibeix els de la diferenciació dels macròfags (Damji et al., 1986).

Els estudis de Lucas et al. (1984) han posat de manifest que en inhibir l'activitat poli(ADP-ribosa) polimerasa amb nicotinamida s'indueix la maduració morfològica i funcional de les cèl.lules leucèmiques



promielocítiques in vitro. Aquesta observació, juntament amb el fet que l'activitat de l'enzim 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 et al. (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 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 et al. (1984) demostren que l'àcid retinoic, un inductor de la diferenciació, fa decreïxer l'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa 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 et al. (1982) observen un increment, més que un decrement, en la poli(ADP-ribosilació) durant la diferenciació de mioblasts embrionaris de pollastre en cultiu a causa, probablement, d'un increment dels trencaments del DNA. A més mostren una inhibició de la diferenciació per inhibidors de la poli(ADP-ribosa) polimerasa.

Johnstone i Williams (1982) també descriuen l'efecte inhibitori de la diferenciació que provoquen els inhibidors de l'enzim en els limfòcits perifèrics humans estimulats per mitogen, possiblement a través d'impedir la unió de les cadenes de DNA. Els inhibidors de la polimerasa actuen només quan s'afegeixen al principi de l'activació induïda per mitogen, temps en el qual el requeriment de l'enzim coincideix amb una ràpida unió de les ruptures de simple cadena presents al DNA dels limfòcits quiescents.

Més recentment, Farzaneh et al. (1985) han demostrat la naturalesa dinàmica dels trencaments del DNA que es formen en el genoma de les cèl.lules de múscul d'au i limfòcits humans quiescents. La inhibició de l'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa bloqueja el lligament de les cadenes de DNA en ambdós tipus de cèl.lules i condueix a l'acumulació d'un nombre més elevat de ruptures.

Yoshikawa i Masaki (1985) han trobat que l'activitat de l'enzim declina just després del naixement en nuclis de múscul normal de pollastre. Tanmateix, en múscul distròfic aquesta activitat decreix 5 setmanes després de l'eclosió de l'ou. També han observat un decrement retardat en la quantitat de polímer en aquest múscul. Una possible explicació suggerida dels alts nivells d'activitat en el múscul distròfic seria un retard en la inactivació o degradació de les molècules d'enzim durant la diferenciació. No es pot excloure, però, la seva activació o síntesi, ni la producció de més llocs assequibles per iniciar la síntesi de polímer a les proteïnes cromosomals. També s'ha de considerar la possibilitat d'un augment de trencaments en el DNA del múscul distròfic, la qual cosa provocaria un increment de l'activitat poli(ADP-ribosilant).

### 1.2.6. Metabolisme de la poli(ADP-ribosa) i reparació del DNA

Al llarg de molts anys s'ha vist que la síntesi de poli(ADP-ribosa) in vitro depèn absolutament de la presència de DNA (Hayaishi i Ueda, 1979). Janakidevi i Koh (1974) varen ésser els primers a indicar el requeriment de l'enzim pel DNA trencat. No obstant, el possible significat de la fragmentació del DNA en la poli(ADP-ribosilació) va ésser reconegut en primer lloc per Miller (1975), quan va demostrar l'increment de l'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa mesurada in vitro en presència de DNasa I.

Benjamin i Gill (1980) han relacionat de manera quantitativa l'activitat de la polimerasa i els trencaments del DNA. Diferents tipus de fragmentació del DNA estimulen la síntesi de poli(ADP-ribosa) en graus diferents. Aquests autors mostren que fragments de restricció de DNA de doble cadena amb extrems protuberants són els més efectius en l'estimulació de l'enzim.

L'observació que l'activitat de l'enzim incrementa marcadament amb la formació de trencaments en el DNA va acompanyada d'un descens dels nivells cel·lulars de NAD (Whish et al., 1975; Smulson et al., 1975, 1977; Juarez-Salinas et al., 1979; Berger et al., 1979). Així mateix, inhibidors molt variats de la poli(ADP-ribosa) polimerasa eviten la depleció de NAD (Skidmore et al., 1979; Durkacz et al., 1980).

Jacobson et al. (1980) han demostrat que la baixada en els nivells de NAD que té lloc després de tractar les cèl·lules amb carcinògens és deguda a una activació de la poli(ADP-ribosa) polimerasa i no a la inhibició de la biosíntesi de NAD o a l'activació d'altres enzims que consumeixen aquest nucleòtid, tals com la NAD glicohidrolasa, la NAD pirofosfatasa o la NAD kinasa.

Els estudis de Shall i col·laboradors han posat de manifest que els inhibidors de la polimerasa a concentracions no citotòxiques no només retarden la reparació del DNA danyat, sinó que, a més, incrementen la citotoxicitat dels agents que danyen aquest DNA (Durkacz et al., 1980; Nduka et al., 1980). L'efecte de baixar els nivells de NAD per depleció nutricional de nicotinamida és similar al que produeixen els inhibidors de l'enzim. Es a dir, la privació de NAD al medi de cultiu cel·lular interfereix en la capacitat de reparació de les escissions produïdes al DNA per un agent mutagen com és el dimetil sulfat (Durkacz et al., 1980).

Tanmateix, les quantitats de poli(ADP-ribosa) que s'observen després de danyar el DNA no responen a la caiguda total del "pool" de nucleòtid. Això va suggerir a Juarez-Salinas et al. (1979) que la síntesi i el recanvi del polímer estaven estretament lligats i que aquest recanvi havia d'ésser molt ràpid. El tractament de cèl.lules intactes amb N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), un potent agent carcinogènic que indueix trencaments al DNA, provoca un increment de més de 100 vegades dels nivells intracel.lulars de poli(ADP-ribosa) i el recanvi és, efectivament, molt ràpid. S'ha vist que la depleció del "pool" de NAD (Davies et al., 1980; McCurry i Jacobson, 1981), com també l'acumulació de poli(ADP-ribosa) (Wielckens et al., 1982) poden ésser bloquejats utilitzant inhibidors de la síntesi del polímer. A més a més, gràcies a aquests inhibidors s'ha demostrat que la vida mitjana del polímer és aproximadament 6 minuts o menys en cèl.lules humanes després del tractament amb raigs uv (Jacobson et al., 1983) i menys de 1 minut en fibroblasts de ratolí tractats amb MNNG (Jacobson et al., 1985).

A partir d'experiments in vitro s'ha calculat que per cada trencament del DNA generat per raigs X es consumeixen unes 3000 molècules de NAD, al mateix temps que els seus residus ADP-ribosil s'uneixen transitòriament a polímers ja units a proteïna durant un període d'incubació de 5 minuts (Benjamin i Gill, 1980).

Moltes altres dades, obtingudes utilitzant diferents classes d'agents que danyen el DNA, donen també suport a la relació entre el metabolisme de la poli(ADP-ribosa) i la reparació per escissió de l'àcid nucleic. Aquests agents inclouen tractaments amb raigs X (Benjamin i Gill, 1978; Szumi et al., 1984; Tamulevicus et al., 1984), radiació uv (Cohen i Berger, 1981; Collins, 1985), radiació (Skidmore et al., 1979; Jonsson et al., 1985; Kjellén et al., 1986) i agents alquilants tals com metil-nitrosourea o MNU (Nduka et al., 1980), DMS (Durkacz et al., 1981; Adamietz i Rudolph, 1984) i metil-nitro-nitrosoguanidina o MNNG (Juarez-Salinas et al., 1979; Jacobson et al., 1985; Poirier et al., 1985). S'ha de destacar que agents citotòxics que no tenen cap efecte en la integritat del DNA no afecten tampoc els nivells intracel.lulars de NAD o el metabolisme de la poli(ADP-ribosa).

L'efecte dels inhibidors de la polimerasa en l'augment de l'intercanvi de cromàtides germanes (SCE) sembla estar relacionat amb la persistència de trencaments en el DNA (Shall, 1982). D'altra banda s'han trobat nivells anormalment baixos de NAD o d'activitat de la poli(ADP-ribosa) sintetasa en alguns casos de síndrome de Cockayne (Fujiwara et al., 1982), anèmia de Fanconi (Berger et al., 1982; Klocker et al., 1983) o síndrome de Bloom (Kanai et al., 1981). Contràriament, Shiraishi et al. (1983)

han descrit un augment de les SCE en presència de benzamida tant en cèl.lules de pacients amb el síndrome de Bloom com en la línia cel.lular limfoblastoide d'adults normals. No troben, però, un decrement significatiu de l'activitat enzimàtica o de la quantitat de poli(ADP-ribosa) a les cèl.lules dels pacients amb el síndrome en comparació als individus normals.

Sembla, doncs, que hi ha força evidències en favor de la participació de la poli(ADP-ribosa) en la reparació del DNA. Moltes de les dades obtingudes indiquen que canvis en el metabolisme del polímer són coincidents amb la reparació per escissió. Tanmateix, malgrat que es requereixen els mecanismes de poli(ADP-ribosilació) i reparació per a la recuperació del DNA danyat, s'ha de considerar la possibilitat que no existeixi cap connexió entre els dos processos.

La reparació per escissió del DNA es pot dividir en quatre etapes (fig. 1.12):

- 1- incissió prop de la lesió feta al DNA
- 2- eliminació dels nucleòtids modificats o danyats
- 3- resíntesi de DNA
- 4- unió dels "nicks" del DNA

Diferents estudis indiquen que la velocitat d'eliminació de les lesions del DNA observades durant la síntesi no programada de DNA en presència d'inhibidors de la poli(ADP-ribosa) polimerasa no es modifica o s'incrementa lleugerament (Durrant et al., 1981; Cleaver et al., 1983). Respecte a la replicació, no s'ha vist cap efecte (Cleaver et al., 1983; Jacobson et al., 1983) o, en tot cas una tènue estimulació (Althaus et al., 1980; Berger i Sikorski, 1980; Durrant et al., 1981; Miwa et al., 1981; Sims et al., 1982).

Durkacz et al (1980) han demostrat que el DMS indueix trencaments al DNA i que, cinc hores després de treure el DMS, el DNA té la mateixa mida que l'àcid nucleic no danyat, tal com s'estima per gradients alcalins de sacarosa. En presència d'inhibidors específics de la polimerasa s'impedeix la unió dels trencaments del DNA induïts pel DMS. Per tant, Shall i col.laboradors han suggerit que la síntesi de poli(ADP-ribosa) és important en l'etapa d'unió del DNA reparat. Ells també han descrit que l'activitat de la DNA lligasa II és regulada per poli(ADP-ribosilació), malgrat que no mostren si el propi enzim és o no modificat (Creissen i Shall, 1982).

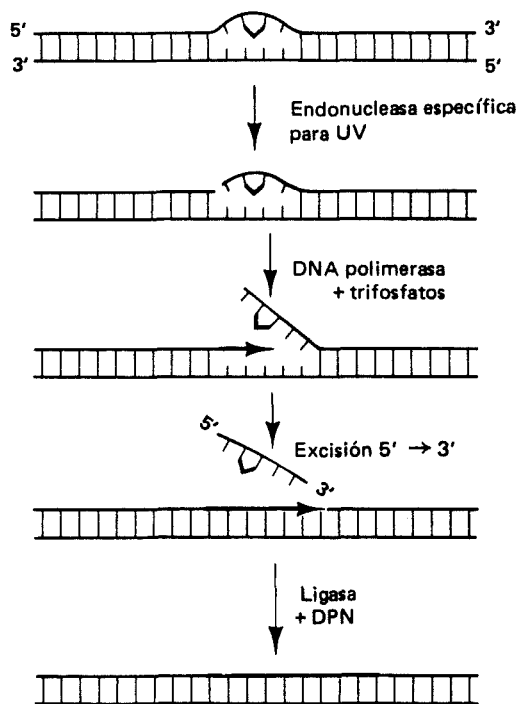


Fig.1.12- Esquema de la reparació per excissió  
(Hanawalt, 1972)

Lönn i Lönn (1985) han demostrat l'acumulació dels intermediaris de replicació de 10 Kb en cèl.lules de melanoma humà tractades amb 3-aminobenzamida (3AB). És a dir, en presència de l'inhibidor els fragments de 10 Kb no es lliguen per donar lloc a DNA d'alt pes molecular. L'existència de polinucleosomes relaxats quan estan ADP-ribosilats (Aubin et al., 1983) pot afavorir l'etapa de lligació. En prevenir la poli(ADP-ribosilació) la 3AB evitaria el relaxament dels nucleosomes i, per tant, probablement reduiria la unió del DNA.

La possibilitat que la poli(ADP-ribosilació) estimuli el lligament del DNA és també considerada per Ueda et al.(1983). Aquesta estimulació pot ésser vista com una activació de la DNA lligasa, una modulació de la interacció DNA-histona o una unió de la DNA lligasa als llocs lesionats per afavorir la lligació eficient del DNA. Una altra possibilitat, encara que menys probable, és la inhibició de la proteòlisi dels nucleosomes, ja que s'ha identificat la poli(ADP-ribosa) com un inhibidor de proteases neutres de la cromatina dels macròfags (Inagaki et al., 1980). El

principal acceptador de la poli(ADP-ribosa) en limfòcits perifèrics humans tractats amb MNNG és només la poli(ADP-ribosa) polimerasa i no s'ha apreciat cap tipus de modificació en la DNA lligasa. D'altra banda, l'addició de polímer lliure o la formació *in situ* de polímer unit a la polimerasa no té cap efecte o estimula lleugerament l'activitat de la lligasa. Basant-se en els seus resultats Ueda et al. proposen el següent mecanisme d'acció de la poli(ADP-ribosa) en la reparació: Quan es lesiona el DNA amb estructura polinucleosomal per diferents agents i té lloc un trencament de les cadenes, l'enzim amb alta afinitat per als extrems d'aquest DNA s'activa i comença a sintetitzar llargs polímers units a ell mateix. Aquestes estructures atrauen la DNA lligasa, i possiblement la DNA polimerasa, i els facilita les seves funcions de reparar eficientment l'àcid nucleic (fig. 1.13). En aquest esquema la poli(ADP-ribosa) polimerasa té un paper clau, no només com a detector del trencaments del DNA, sinó també com a senyal d'unió de la lligasa.

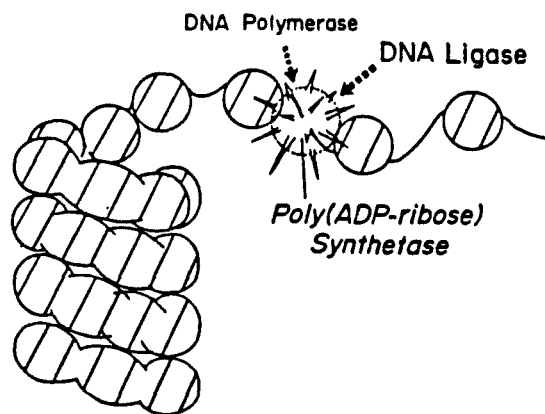


Fig.1.13- Possible paper de la poli(ADP-ribosa) polimerasa en la reparació del DNA (Ueda et al., 1983).

Les punxes de l'enzim representen molècules de poli(ADP-ribosa).

Recentment, però, ha estat publicat que el tractament de cèl.lules HeLa danyades per agents alquilants amb 3-aminobenzamida, un inhibidor de l'enzim, incrementa el nombre de trencaments del DNA, però no afecta la velocitat d'unió de les cadenes (Moran i Ebisuzaki, 1985). Walker et al. (1984) i Cleaver (1984) han trobat que la mida dels fragments de reparació no s'incrementa quan la 3-aminobenzamida és present durant la reparació de cèl.lules tractades amb agents alquilants. Aquests resultats indiquen que s'obté un nombre més elevat de fragments, però no més llargs, quan la poli(ADP-ribosa) polimerasa és inhibida. Si

una major freqüència de trencaments fos deguda a un fracàs en la unió, aleshores aquest seria necessàriament el pas limitant. En contrast, Moran i Ebisuzaki (1985) han vist que la velocitat d'eliminació dels trencaments no és afectada per la presència de l'inhibidor, malgrat que la freqüència de ruptures és incrementada per la 3AB. Totes aquestes dades suggereixen que la incissió, i no pas la unió, és afectada per ADP-ribosilació a les cèl.lules que es recuperen del DNA danyat.

Yoshihara et (1975) han demostrat que l'ADP-ribosilació d'una endonucleasa dependent de  $Ca^{++}$  i  $Mg^{++}$  de fetge de rata i plasma seminal de toro (Yasuharu et al., 1984) provoca una inhibició de l'enzim. Així doncs, Cleaver (1984) ha proposat que l'increment de la replicació en el procés de reparació de les cèl.lules alquilades tractades amb 3AB podria venir d'una incissió incrementada de l'endonucleasa, encara que aquesta no actuaria necessàriament als llocs danyats.

Una hipòtesi alternativa ha estat presentada per Wintersberger i Wintersberger (1985). Aquests autors suggereixen que l'activació de la poli(ADP-ribosa) polimerasa pel DNA danyat serveix per fer créixer ràpidament i de manera transitòria el nivell cel.lular de NAD. S'ha descrit també un descens del nivell d'ATP concomitant amb el de NAD a les cèl.lules tractades amb agents mutàgens (Goodwin et al., 1978; Sims et al., 1983). El resultat és un alentiment de les reaccions que requereixen energia, en particular la replicació del DNA, la qual cosa dóna més temps a les cèl.lules per reparar aquest DNA. D'altra banda, la unió de l'enzim als llocs on hi ha trencaments pot reduir el nombre de ruptures sense protegir i prevenir la transcripció inespecífica (Slattery et al., 1983) i la recombinació. Aquest podria ésser un altre exemple de reacció de les cèl.lules en una situació de "stress". L'extensió d'aquesta reacció pot dependre de l'estat fisiològic de la cèl.lula (fase del cicle cel.lular, velocitat de divisió,...). A més a més, els diferents tipus de trencaments o forats produïts per diversos agents que danyen el DNA poden explicar la gran variabilitat en el grau d'activació de la polimerasa en els diferents sistemes cel.lulars.

Sembla, doncs, que la formació de polímer facilita ordinàriament el procés de reparació per escissió del DNA. Tanmateix, l'activació exhaustiva de l'enzim pot exhaurir el "pool" intracel.lular de NAD i, per tant, interferir en l'actuació dels enzims dependents de NAD del metabolisme intermediari. Aquest efecte s'ha anomenat la "resposta suïcida" de les cèl.lules amb un DNA extensivament danyat (Berger, 1985). L'eliminació programada dels limfòcits, i pot ésser que d'altres cèl.lules, amb DNA danyat pot representar una nova funció fisiològica per al ciclatge de NAD dependent de poli(ADP-ribosa) (Carson et al., 1986).



### 1.2.7. Poli(ADP-ribosilació) i altres respostes cel.lulars al DNA danyat

S'han fet molts estudis per tal d'examinar el possible paper del metabolisme de la poli(ADP-ribosa) en altres respostes cel.lulars al DNA danyat. Els estudis inclouen mecanismes relacionats amb la carcinogènesi, tals com mutagènesi i transformació maligna. Les respostes biològiques estan interrelacionades amb la reparació per escissió del DNA, malgrat que els tractes entre elles no es coneixen gaire bé. Aquestes respostes cel.lulars al DNA danyat requereixen replicació de l'àcid nucleic i divisió cel.lular per expressar-se.

Alguns dels inhibidors de la polimerasa potencien els efectes terapèutics de drogues antitumorals, tal com s'espera per la seva interferència en la reparació del DNA (Berger et al., 1982; Kawamitsu et al., 1982; Sakamoto et al., 1983). D'altres, però, promouen l'oncogènesi química sota condicions diferents (Takahashi et al., 1982; Okamoto i Yamamoto, 1983).

Al llarg del cicle cel.lular els inhibidors de la poli(ADP-ribosa) sintetasa allarguen la fase S i bloquegen la divisió cel.lular després de danyar el DNA (Kidwell et al., 1982; Das et al., 1984; Jacobson et al., 1985b). Quan s'utilitzen dosis no letals de MNNG en cèl.lules C3H10T1/2 en cultiu en combinació amb l'inhibidor metoxibenzamida (MBA) s'observa un dramàtic increment en la proporció de transformació maligna. Incrementant la dosi de MNNG es produeix un bloqueig total de la divisió cel.lular en absència de poli(ADP-ribosilació). La presència de MBA provoca l'aparició d'un nombre addicional de trencaments del DNA després del MNNG, tant en cèl.lules quiescents com en divisió (Jacobson et al., 1985 a,b). Aquests resultats suggereixen als esmentats autors que es requereix la poli(ADP-ribosilació) per a la normal progressió del cicle cel.lular després del dany fet al DNA en cèl.lules en divisió, encara que no sembla ésser necessària per a la reparació del DNA en cèl.lules que no es divideixen.

Els estats cel.lulars pro-oxidants -concentracions incrementades d'oxigen actiu i peròxids orgànics i radicals- poden promoure el creixement neoplàsic de cèl.lules iniciades. Aquests estats pro-oxidants poden ésser causats per diferents classes d'agents, molts dels quals són promotors o carcinògens complets. En un estat pro-oxidant la demanda de detoxificació d'oxigen actiu i radicals orgànics s'incrementa i els nivells de nucleòtids de piridina oxidats augmenten. Per tant, l'estimulació de la polimerasa per als trencaments induïts al DNA per l'oxigen actiu, juntament amb el ràpid subministrament de NAD, pot tenir com a conseqüència la poli(ADP-ribosilació) de les proteïnes

cromosomals i d'aquesta manera alterar l'estructura de la cromatina i modular l'expressió gènica (Cerutti, 1985) (Fig.1.14). El promotor de tumors forbol-12- miristat-13-acetat (PMA) incrementa la poli(ADP-ribosilació) en fibroblasts d'embrió de ratolí C3H10T1/2 i humans 3229 via la formació d'oxigen actiu. En contrast amb la poli(ADP-ribosilació) induïda per l'agent metilant MNNG, es requereix nova síntesi de RNA i proteïnes i l'acumulació de polímer té lloc en absència de trencaments detectables en el DNA (Singh et al., 1985). El PMA augmenta la poli(ADP-ribosilació) de les proteïnes nuclears solubles en 0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en els fibroblasts C3H10T1/2. La modificació de les histones pot canviar l'estructura i funció nucleosomal i jugar un paper en la modulació induïda pel PMA de l'expressió gènica en l'etapa de promoció (Singh i Cerutti, 1985).

D'altra banda s'ha vist que els inhibidors de la polimerasa 3-aminobenzamida, 5-metilnicotinamida i timidina, provoquen un increment de la iniciació de la carcinogènesi hepàtica produïda per la dietilnitrosamina (DEN) en rates (Takahashi et al., 1984).

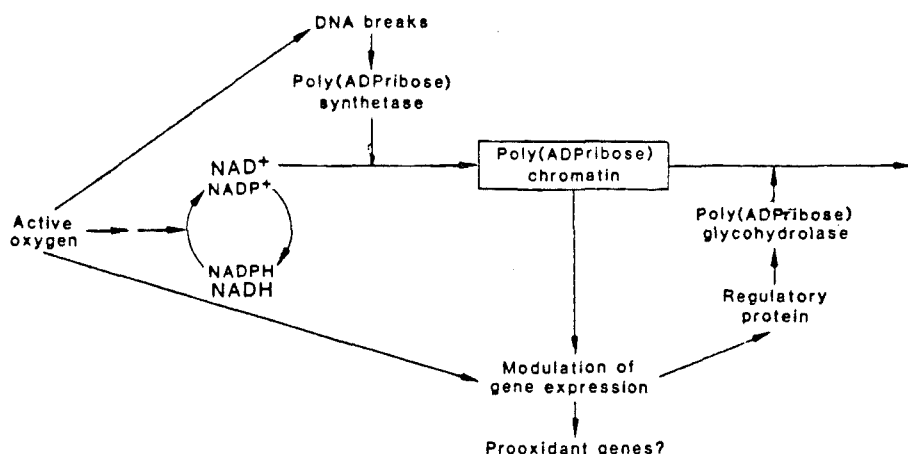


Fig.1.14- Modulació induïda per oxigen actiu de l'expressió gènica (Cerutti, 1985).

### 1.2.8. Metabolisme de la poli(ADP-ribosa) i expressió gènica

L'expressió gènica requereix una reorganització de la cromatina i per tant és possible que el metabolisme de la poli(ADP-ribosa) hi jugui també un paper. La supressió general de la síntesi de macromolècules com DNA, RNA i proteïnes (Okamoto, 1981; Taniguchi et al., 1982; Sims et al., 1983) després de danyar el DNA es pot explicar per la depleció dels "pools" de NAD i ATP (Sims et al., 1983). Sembla que en exhaurir-se el NAD cel.lular perquè s'incrementa la poli(ADP-ribosilació) es perjudica els sistemes generadors d'ATP i, per tant, s'afecten els processos dependents d'energia incloent-hi la síntesi de RNA.

Una relació més directa entre la poli(ADP-ribosilació) i la síntesi de RNA va ésser suggerida per Müller i Zahn (1976), els quals van trobar la modificació de la RNA polimerasa I DNA-dependent en oviducte de guatlla i el seu decrement després de l'administració de progesterona. En analogia amb la mono(ADP-ribosilació) de la RNA polimerasa de E.coli per al fag T4, es va postular una modulació de l'especificitat transcripcional per poli(ADP-ribosilació). L'activitat de la RNA polimerasa II de llavor de blat es redueix en un 40% quan l'enzim és poli(ADP-ribosilat) in vitro per la poli(ADP-ribosa) polimerasa de lletó de vedella (Taniguchi et al., 1985).

Entre els molts factors que s'han aïllat i suggerit que intervenen en el control de la transcripció s'ha vist que el factor anomenat TFIIC elimina la transcripció inespecífica (induïda per ruptures) que realitza la RNA polimerasa II en sistemes in vitro. La purificació i anàlisi d'aquest factor indica la seva identitat amb la poli(ADP-ribosa) polimerasa (Slattery et al., 1983). L'enzim impedeix la transcripció ja que s'uneix als llocs on hi ha els trencaments. L'activitat "de neteja" de la polimerasa resideix en una àrea restringida que es coneix com el domini d'unió al DNA de la molècula enzimàtica (Ohtsuki et al., 1984). Kurl i Jacob (1985) han caracteritzat un factor que evita la transcripció inespecífica de rDNA clonat. Aquest factor es correspon amb la poli(ADP-ribosa) polimerasa respecte al pes molecular, dependència de DNA per a la seva activitat i capacitat per experimentar auto(ADP-ribosilació).

Una altra possible connexió entre la poli(ADP-ribosilació) i el control transcripcional és la modificació de grups específics de proteïnes cromosomals. La poli(ADP-ribosilació) de la proteïna A-24 (Okayama i Hayaishi, 1978) i de les proteïnes HMGs 14 i 17 (Reeves et al., 1981; Poirier et al., 1982; Tanuma i Johnson, 1983) pot afectar les funcions proposades per elles en l'expressió

dels gens ribosomals (Constantini i Johson, 1981) o en els nucleosomes transcripcionalment actius ((Weisbrod et al., 1980), respectivament. Una estreta correlació entre la supressió de la poli(ADP-ribosilació) de les HMGs 14 i 17 i la síntesi de RNA en virus de tumor de mama regulada per glucocorticoides en cèl.lules de ratolí en cultiu (Tanuma et al., 1983) sembla confirmar aquest punt de vista. S'ha proposat també una distribució preferencial de la poli(ADP-ribosa) sintetasa a la cromatina transcripcionalment activa (Mullins et al., 1977; Levy-Wilson, 1981; Hough i Smulson, 1984).

El processament dels trànscrips també s'ha relacionat amb la poli(ADP-ribosilació). Constantini i Johnson (1981) han trobat una acumulació desproporcionada de rRNA de 18S i 28S a les cèl.lules de ronyó de rata normal després del tractament amb àcid pinolínic o 5-metilnicotinamida, un inhibidor de la poli(ADP-ribosa) polimerasa. Sembla que aquest augment de rRNA és el resultat d'una inestabilitat dels precursors de 28S i/o 32S. La poli(ADP-ribosilació) d'una gran varietat de RNases (Leone et al., 1981) i de proteïnes associades al RNA nuclear heterogeni (hnRNA) (Kostka i Schweiger, 1982) pot estar involucrada en aquest fenomen.

Juarez-Salinas et al. (1984) han proposat que la poli(ADP-ribosa) pot estar implicada en la resposta cel.lular a l'"stress", a causa dels canvis observats en el metabolisme del polímer després del tractament de les cèl.lules amb hipertèrmia i altres tipus d'agents que també indueixen resposta a l'"stress". La hipertèrmia provoca la síntesi d'una petita col.lecció de proteïnes, conegudes com proteïnes del "heat shock" (Ashburner i Bonner, 1979), encara que evita la transcripció i síntesi de la majoria d'elles. L'activitat de la poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa sembla ésser regulada negativament després del "heat shock", la qual cosa suposa l'elevació dels nivells de poli(ADP-ribosa) quan hi ha una exposició a la hipertèrmia (Jacobson et al., 1985c).

### 1.2.9. Poli i oligo(ADP-ribosilació) extranuclear

L'activitat trobada a la fracció microsomal de cèl.lules HeLa (Roberts et al., 1975) s'assembla a la de la poli(ADP-ribosa) polimerasa nuclear i representa, probablement, molècules naixents de l'enzim que està present als ribosomes. De la mateixa manera, la polimerasa identificada al complex matriu-membrana interna de les mitocòndries de fetge de rata (Burzio et al., 1981) sembla l'enzim nuclear. En canvi, l'activitat enzimàtica trobada per Kun et al. (1975) també a les mitocòndries de fetge de rata difereix de l'enzim nuclear en la seva insensibilitat a timidina i DNA. Anàlisis posteriors han revelat que aquesta activitat es localitza a les "bandes M" o al complex membrana interna/DNA/RNA (Kun i Kirsten, 1982). S'ha suggerit un paper de l'oligo(ADP-ribosilació) en la regulació de la replicació del DNA mitocondrial.

Dues altres activitats similars a la de la poli(ADP-ribosa) sintetasa nuclear s'han trobat a les mitocòndries dels oòcits de *Xenopus laevis* (Burzio et al., 1979) i a la fracció postmitocondrial de cèl.lules de ronyó de hamster (Furneaux i Pearson, 1977). L'activitat poli(ADP-ribosilant) descrita a la fracció microsomal de cèl.lules de fetge d'embrió de pollastre amb glucocorticoides (Kitamura et al., 1980) no ha estat, fins al moment, ben caracteritzada.

### 1.2.10. Oligo i poli(ADP-ribosilació) vírica

S'ha vist que alguns virus animals contenen proteïnes oligo o poli(ADP-ribosilades) i/o activitats enzimàtiques d'ADP-ribosilació. El primer exemple, reovirus, va ésser presentat per Carter et al. (1980). Aquests autors van demostrar que un grup de proteïnes de la càpsida externa  $\mu_1$ , i viii, eren modificades per oligo(ADP-ribosa) amb una longitud mitjana de la cadena d'1.5 residus (Carter et al., 1980; Carter et al., 1982). També s'ha trobat activitat enzimàtica en virions purificats (Carter et al., 1982). Estudis fets amb inhibidors indiquen que l'oligo(ADP-ribosilació) podria jugar un paper en la replicació vírica (Carter et al., 1982).

La poli(ADP-ribosilació de l'antigen T del virus SV40 va ésser descrita per Goldman et al. (1981). Un altre virus oncogènic, l'adenovirus 5, té com a acceptadors les proteïnes del core V i VII per extractes nuclears preparats a partir de cèl.lules infectades (Goding et al., 1983). En aquest cas la 3-aminobenzamida, un inhibidor de la polimerasa, no té efecte en la replicació vírica.

Prieto-Soto et al. (1983) han posat de manifest que les histones H2A i H2B, com també diverses proteïnes no-histones associades als minicromosomes del polioma virus, són poli(ADP-ribosilades) per un enzim endogen.

La poli(ADP-ribosilació) i els trencaments del DNA induïts per l'agent mutagen MNNG s'ha estudiat als minicromosomes del SV40 en cèl.lules CV-1 de mico permeabilitzades i infectades amb el virus (Poirier et al., 1985). Tant les ruptures com l'activitat enzimàtica augmenten proporcionalment a les dosis incrementades de MNNG. Això suggereix una relació causa-efecte entre les dues reaccions. La principal proteïna acceptadora als minicromosomes és la histona H2B. En canvi, l'H2B, l'H2A, l'H1 i l'A24 són poli(ADP-ribosilades) a la cromatina nuclear de les mateixes cèl.lules.

### 1.3. MONO (ADP-RIBOSILACIÓ)

Les mono(ADP-ribosil) transferases (vegeu Collier, 1982; Gill, 1982; Moss i Vaughan, 1982; Thompson i Iglewski, 1982) catalitzen la modificació covalent de les proteïnes en els aminoàcids següents: arginina (Moss i Richardson, 1978; Moss i Vaughan, 1977), asparragina (Manning et al., 1984) i diftamida (Iglewski et al., 1977; Van Ness et al., 1980). La diftamida és un residu d'histidina hipermodificat trobat en el factor 2 d'elongació d'eucariotes (EF2), en tots els sistemes examinats, incloent-hi plantes (Brown i Bodley, 1979). La formació no enzimàtica d'un adducte ADP-ribosil (base de Schiff) específic de lisina és també una reacció de mono(ADP-ribosilació) (fig. 1.15).

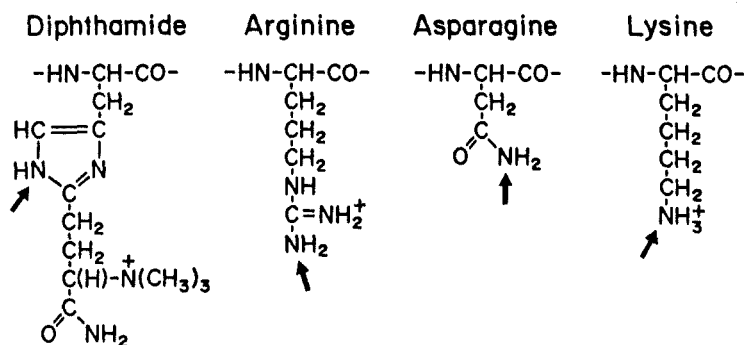


Fig.1.15- Aminoàcids acceptadors de la mono(ADP-ribosa) (Ueda i Hayaishi, 1985).

L'ADP-ribosilació de l'EF2 per la toxina diftèrica amb la inactivació resultant del factor i la inhibició de la síntesi proteica va ésser el primer exemple d'aquesta modificació covalent (Collier, 1967; Honjo et al., 1971). Moltes altres mono(ADP-ribosil) transferases s'han identificat als sistemes procariotes. Per exemple, la toxina de *Pseudomonas* també mono(ADP-ribosila) el factor EF2 en el residu de diftamida (Iglewski i Kabat, 1975).

Altres toxines bacterianes que també mono(ADP-ribosilen) proteïnes eucariòtiques inclouen la toxina colèrica (Gill i Meren, 1978; Gill, 1982), toxina de *Bordetella pertussis* (Katada i Ui, 1982 a,b) i l'enterotoxina d'*E.coli* (Moss i Vaughan, 1982), la qual

estimula l'activitat de l'adenil ciclase per mono(ADP-ribosilació) de les proteïnes estimuladores o inhibidores que s'uneixen al GTP i que regulen la síntesi d'AMP cíclic a partir d'ATP. També s'ha vist que la transducina, un component de la rodopsina en els segments externs dels bastons de la retina, és mono(ADP-ribosilada) per la toxina de pertussis i per la toxina del còlera (Abood et al., 1982; Gilman, 1984; Van dop et al., 1984). D'aquesta manera s'incrementa l'activitat fosfodiesterasa del GMP cíclic de la rodopsina. Les cadenes polipeptídiques de la transducina són molt similars als components de les proteïnes que s'uneixen al GTP del complex adenil ciclase.

Mono(ADP-ribosil) transferases endògenes s'han descrit també als sistemes eucariòtics. Per exemple, s'han trobat quatre activitats diferents als eritròcits de diferents espècies (Moss i Vaughan, 1978; Moss et al., 1980; Moss i Stanley, 1981; Yost i Moss, 1983; Moss et al., 1985). Així mateix s'ha vist la modificació en fetge de rata (Moss i Stanley, 1981), fetge boví (Ritcher et al., 1983) i fetge de gallina (Tanigawa et al., 1984). Un enzim endogen que modifica el EF2 in vitro ha estat estudiat per Lee i Iglewski (1984).

Hayaishi et al. (1984) i Smith et al. (1985) han detectat activitats enzimàtiques que eliminen l'ADP-ribosa monomèrica unida a proteïnes. Aquests resultats proporcionen evidències que la modificació covalent de les proteïnes per regular activitats d'alguns enzims via la mono(ADP-ribosilació) és un procés reversible, similar a la fosforilació o acetilació.

Malgrat que s'ha demostrat que algunes toxines bacterianes alteren el metabolisme cel·lular de l'hoste per aquest tipus de modificació, no es coneix la funció fisiològica de les reaccions de mono(ADP-ribosilació) endògenes dels eucariotes.



#### 1.4. L'ESPERMATOGÈNESI COM A MODEL DE DIFERENCIACIÓ

L'espermatogènesi és el procés de diferenciació que condueix a la formació de la cèl.lula germinal masculina, l'espermatozoide (fig.1.16 i 1.17). La seva duració depèn bàsicament de la temperatura, que és de 42 °C en el cas del gall. Els espermatozoides es formen al testicle, òrgan que a l'esmentat animal es troba a la cavitat abdominal.

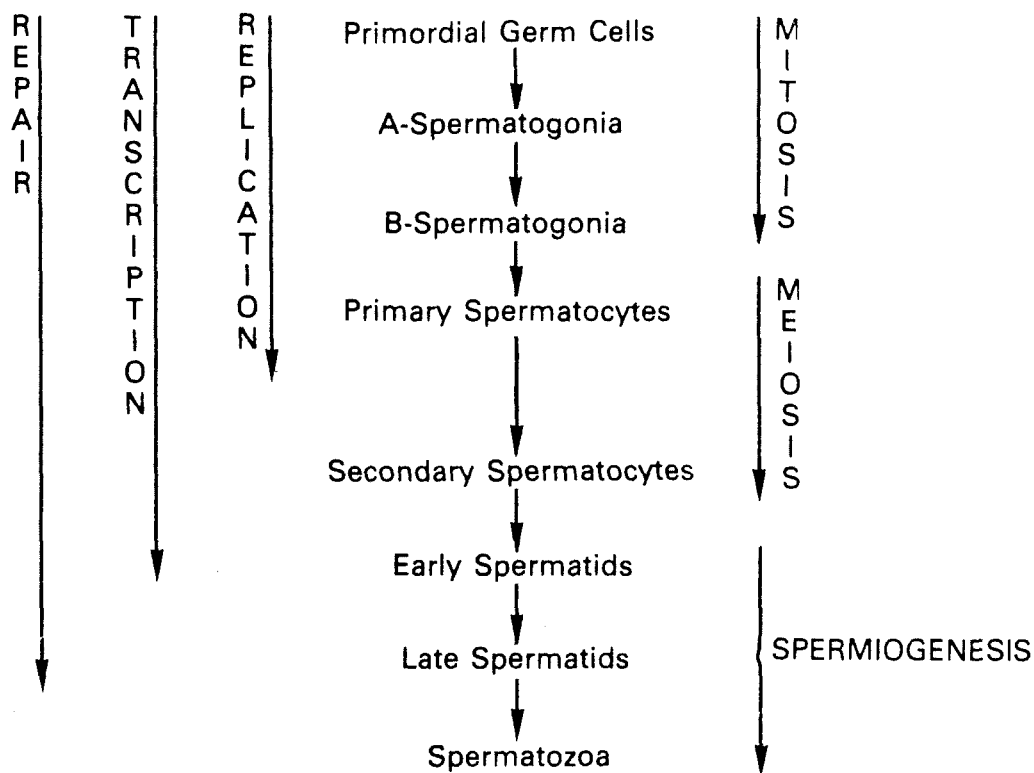


Fig.1.16- Estadis de la diferenciació de la línia germinal masculina.

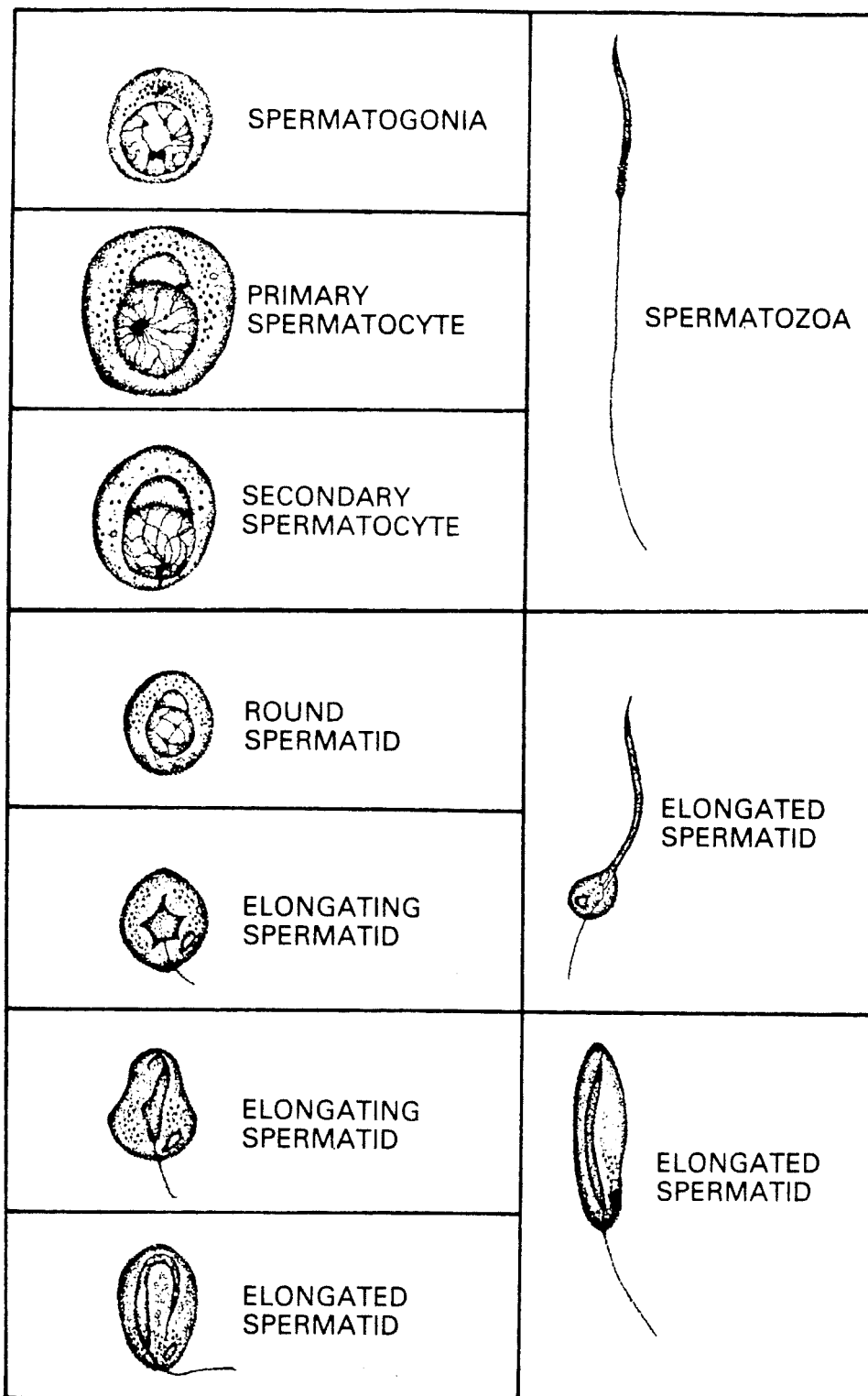


Fig.1.17- Cèl.lules germinals en diferents estadis de l'espermatogènesi del gall.