



Unidad de Cirugía Experimental
Unidad de Radiofarmacia
Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca"



Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina
Universidad de Murcia

Tesis Doctoral

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POLI-ADP-RIBOSA POLIMERASA EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

M^a Teresa Martínez Martínez

2008

Quiero expresar mi agradecimiento:

Al Dr. José Yélamos, por la confianza que ha depositado en mí al dirigirme esta tesis, por sus acertados consejos que la han hecho posible, por su apoyo permanente, y sobre todo por su trato personal, su dedicación y amistad.

Al Dr. Teodomiro Fuente, que a lo largo de nuestra formación como especialistas se preocupó de inculcarnos la inquietud por la investigación y el método científico.

Al Dr. Pablo Ramírez, que desde el principio impulsó y fomentó la colaboración entre el Centro de Cirugía Experimental y la Unidad de Radiofarmacia del Hospital Virgen de la Arrixaca, fruto de la cual es este trabajo.

Al Dr. Pascual Parrilla valedor indiscutible de la investigación, tanto básica como clínica en el área de Ciencias de la Salud, e impulsor de la misma como herramienta principal de progreso científico.

Al Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, por su cercanía y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A todos mis compañeros de la Unidad de Radiofarmacia del Hospital Virgen de la Arrixaca sin cuya ayuda, comprensión y apoyo nunca hubiera podido culminar esta tarea.

A todos los componentes de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Virgen de la Arrixaca. La ayuda, amabilidad, paciencia y dedicación científica que me han prestado ha sido inestimable.

A toda mi gente, por estar ahí.

El trabajo mostrado en la presente tesis, se ha desarrollado en el marco del siguiente proyecto de investigación:

1.- Rutas de señalización nuclear mediadas por poli-ADP-ribosa polimerasas en el sistema inmune. Ministerio de Educación y Ciencia. BIO2005-01393.

ÍNDICE

RESUMEN.	1
I. INTRODUCCIÓN.	5
LA POLI-ADP-RIBOSA	7
LA FAMILIA PARP	9
• PARP DEPENDIENTE DE DNA	11
• TANKIRASAS	12
• PARPS TIPO CCCH	13
• MACROPARPS	13
• OTROS PARPS	14
PARP-1 y PARP-2	15
• Estructura de PARP-1 y PARP-2	15
• Actividad enzimática de PARP-1 y PARP-2	17
HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE PARP-1 y PARP-2	20
• Inhibición <i>trans</i> -dominante	20
• Ratones deficientes en PARP	21
• Inhibidores farmacológicos de PARP	24
▲ Inhibidores clásicos	25
▲ Nuevos inhibidores de PARP	27
▲ Inhibidores de PARP de dedos de cinc	29
▲ Inhibidores selectivos de PARP-2	30
FUNCIONES BIOLÓGICAS DE PARP	31
• Detección de daño en el DNA y reparación	31
• Muerte celular	33
• Modulación de la estructura de la cromatina	36
• Control de la transcripción	36
• El aparato mitótico	38
• Control de la división celular	39
• Telómeros	41
FISIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA DE PARP	42

• Respuesta inflamatoria	42
• Carcinogénesis	44
• Edad	45
• Función neuronal	46
PARP Y QUIMIOTERAPIA.	47
MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP.	48
Detección de eventos radiactivos. El centelleo líquido.	49
El detector. Fundamento del funcionamiento.	50
Consideraciones en el análisis radioisotópico.	51
• Quench o extinción.	51
• Procesamiento de las muestras y elección de cóctel de centelleo.	51
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	52
III. MATERIAL Y MÉTODOS.	55
1. AISLAMIENTO DE POBLACIONES CELULARES DE RATÓN.	57
1.1. Ratones.	57
1.2. Obtención de timocitos.	57
1.3. Obtención de esplenocitos totales.	58
1.4. Aislamiento de linfocitos T a partir de esplenocitos totales.	58
1.5 Aislamiento de linfocitos B a partir de esplenocitos totales.	59
2. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA.	60
2.1. Aislamiento de células mononucleares.	60
2.2. Purificación de linfocitos T humanos.	60
2.3. Células Jurkat.	61
3. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD Y RECuento CELULAR.	62
4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP.	62
4.1. Activación celular con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.	62
4.2. Activación celular con Ionomicina y PMA.	63

4.3. Determinación de la actividad enzimática de PARP en muestras celulares estimuladas con Ionomicina y PMA a concentraciones crecientes de inhibidor.	65
4.4. Determinación de la actividad enzimática de PARP en muestras celulares estimuladas con peróxido de hidrógeno.	66
4.5. Permeabilización de las muestras celulares.	67
4.6. Medida de la actividad enzimática de PARP en células permeabilizadas.	67
5. CARACTERÍSTICAS DEL PROCEDIMIENTO DE MEDIDA.	69
5.1. Límite de detección.	69
5.2. Exactitud.	70
Test de dilución.	70
5.3. Precisión.	70
5.4. Especificidad.	71
6. MEDIDA DE RADIATIVIDAD POR CENTELLO LÍQUIDO. QUENCHING	71
7. ANALISIS ESTADÍSTICO	71
IV.RESULTADOS.	73
1. CARACTERÍSTICAS DEL PROCEDIMIENTO DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP.	75
1.1. Limite de detección.	75
1.2. Exactitud.	75
1.3. Precisión.	77
1.4. Especificidad.	77
2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CATALÍTICA DE PARP EN CELULAS DE RATÓN.	78
2.1 Influencia de la concentración de <i>primer</i> (oligonucleótido: 5'-GGAATTCC) sobre la activación celular de PARP en ratones Parp-1 ^{+/+} .	78

2.2. Variación de la actividad enzimática de PARP en linfocitos T de línea tumoral Jurkat en presencia de la concentración de inhibidores de dicha actividad.	79
2.3. Actividad enzimática de PARP en timocitos de ratones Parp-1 ^{+/+} , Parp-1 ^{-/-} y Parp-2 ^{-/-}	81
2.4. Actividad enzimática de PARP en esplenocitos totales de ratones Parp-1 ^{+/+} , Parp-1 ^{-/-} y Parp-2 ^{-/-} .	83
2.5. Actividad enzimática basal de esplenocitos T de ratones Parp-1 ^{+/+} , Parp-1 ^{-/-} y Parp-2 ^{-/-} .	85
2.6. Actividad enzimática basal de esplenocitos B de ratones Parp-1 ^{-/-} y Parp-2 ^{-/-} frente a ratones Parp-1 ^{+/+} .	86
2.7. Actividad enzimática de PARP basal y estimulada con <i>primer</i> en timocitos de ratones Parp-1 ^{+/+} , Parp-1 ^{-/-} y Parp-2 ^{-/-}	87
2.8. Actividad enzimática de PARP basal y estimulada con <i>primer</i> en esplenocitos totales de ratones Parp-1 ^{+/+} , Parp-1 ^{-/-} y Parp-2 ^{-/-} .	88
2.9. Actividad enzimática basal de PARP en timocitos, esplenocitos, linfocitos T y linfocitos B de ratones Parp-1 ^{+/+} .	89
2.10. Actividad enzimática basal de PARP en timocitos, esplenocitos, linfocitos T y linfocitos B de ratones Parp 1 ^{-/-} .	90
2.11. Actividad enzimática basal media de PARP en timocitos, esplenocitos, linfocitos T y linfocitos B de ratones Parp-2 ^{-/-} .	91
2.12. Actividad basal media de PARP en timocitos, esplenocitos, esplenocitos T y esplenocitos B en todos los genotipos estudiados.	92
2.13 Medida de la actividad enzimática de PARP en esplenocitos T de ratones Parp-1 ^{+/+} , tras estimulación con anticuerpos de superficie anti-CD3 y anti-CD28.	93
3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP EN LINFOCITOS T HUMANOS.	94
3.1. Actividad basal de PARP en linfocitos T humanos.	95
3.2. Estimulación de la actividad enzimática de PARP en células tumorales T (Jurkat) con Ionomicina y PMA.	96

3.3. Variación de la actividad enzimática de PARP en linfocitos T humanos, procedentes de sujetos control, estimulados con Ionomicina y PMA.	97
3.4. Comparación de la variación de la actividad enzimática de PARP entre linfocitos T humanos (control) y tumorales (Jurkat) en función del tiempo de estimulación con Ionomicina y PMA.	98
3.5. Variación de la actividad enzimática de PARP en linfocitos T humanos en función del tiempo de estimulación con Ionomicina y PMA, en presencia de inhibidores de la misma (PJ34).	99
V.DISCUSIÓN.	100
VI.CONCLUSIONES.	107
VII.BIBLIOGRAFÍA.	110
VIII. ANEXOS.	142
<u>ANEXO I</u> : COMPOSICIÓN DE LAS DISOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS	144
<u>ANEXO II</u> : ABREVIATURAS	149
<u>ANEXO III</u> : PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA PRESENTE MEMORIA	152

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i>	Familia de PARP. Estructura de los dominios de los 17 miembros de la superfamilia de PARP	10
<i>Figura 2.</i>	Estructura de PARP-1.....	11
<i>Figura 3.</i>	Activación en pocillo de placa de linfocitos T de bazo de ratón con anti-CD3 y con anti-CD3 y anti-CD28, a 37 ° C y 5% de CO ₂ , a tiempos de incubación variables.	63
<i>Figura 4.</i>	Activación celular con PMA+I a distintos tiempos de incubación en presencia o no de inhibidores de la actividad enzimática de PARP a la concentración precisa.	64
<i>Figura 5.</i>	Determinación de la actividad enzimática de PARP en muestras celulares estimuladas con PMA + Ionomicina en función de la concentración de inhibidor presente.	66
<i>Figura 6.</i>	Actividad enzimática de PARP de tres suspensiones celulares de linfocitos T de línea celular tumoral humana (Jurkat), timocitos de ratones Parp-1 ^{+/+} , y linfocitos T de bazo de ratones Parp-1 ^{+/+} a concentraciones crecientes de las mismas.	76
<i>Figura 7.</i>	Actividad enzimática de PARP en timocitos y esplenocitos de ratones Parp-1 ^{+/+} en función de la concentración de <i>primer</i>	79
<i>Figura 8.</i>	Variación de la actividad enzimática de PARP en linfocitos T procedentes de línea tumoral humana Jurkat en función de la concentración de PJ34 presente.....	80
<i>Figura 9.</i>	Variación de la actividad enzimática de PARP en linfocitos T procedentes de línea tumoral Jurkat en función de la concentración de ANI presente.....	81

<i>Figura 10.</i>	Actividad enzimática basal de PARP en timocitos de ratones Parp-1 ^{-/-} y Parp-2 ^{-/-} respecto a ratones Parp-1 ^{+/+}	82
<i>Figura 11.</i>	Actividad enzimática de PARP tras estimulación con <i>primer</i> , en timocitos de ratones Parp-1 ^{+/+} , Parp-1 ^{-/-} y Parp-2 ^{-/-}	83
<i>Figura 12.</i>	Actividad enzimática basal de PARP en esplenocitos totales de ratones Parp-1 ^{-/-} , Parp-2 ^{-/-} y Parp-1 ^{+/+}	84
<i>Figura 13.</i>	Actividad enzimática de PARP estimulada con <i>primer</i> en esplenocitos totales de ratones Parp-1 ^{-/-} , Parp-2 ^{-/-} y Parp-1 ^{+/+}	85
<i>Figura 14.</i>	Actividad enzimática basal de PARP en linfocitos T de bazo de ratones Parp-1 ^{+/+} , Parp-1 ^{-/-} y Parp-2 ^{-/-}	86
<i>Figura 15.</i>	Actividad basal media de PARP en esplenocitos B de ratones Parp-1 ^{-/-} y Parp-2 ^{-/-} , frente a la de sus correspondientes controles Parp-1 ^{+/+}	87
<i>Figura 16.</i>	Actividad enzimática de PARP basal y tras activación con <i>primer</i> de timocitos de ratones Parp-1 ^{+/+} , Parp-1 ^{-/-} y Parp-2 ^{-/-}	88
<i>Figura 17.</i>	Actividad enzimática de PARP basal y tras <i>primer</i> en esplenocitos de ratones Parp-1 ^{+/+} , Parp-1 ^{-/-} y Parp-2 ^{-/-}	89
<i>Figura 18.</i>	Actividad enzimática basal de PARP en timocitos, esplenocitos, esplenocitos T y esplenocitos B de ratones Parp-1 ^{+/+}	90
<i>Figura 19.</i>	Actividad basal media de PARP en timocitos, esplenocitos totales, esplenocitos T y esplenocitos B, de ratones Parp-1 ^{-/-}	91
<i>Figura 20.</i>	Actividad enzimática de PARP en timocitos, esplenocitos, linfocitos T y linfocitos B de ratones Parp-2 ^{-/-}	92
<i>Figura 21.</i>	Actividad enzimática de PARP de timocitos, esplenocitos, esplenocitos T y esplenocitos B de los tres genotipos estudiados.....	93

<i>Figura 22.</i>	Actividad enzimática de PARP en linfocitos T en presencia de CD3, CD3/CD28, PMA+I, H ₂ O ₂ y DNA activado.	94
<i>Figura 23.</i>	Actividad enzimática basal de linfocitos T procedentes de línea tumoral frente a linfocitos T primarios humanos.....	95
<i>Figura 24.</i>	Variación de la actividad enzimática de PARP en células tumorales T (Jurkat), en función del tiempo de estimulación con PMA+I.	96
<i>Figura 25.</i>	Variación de la actividad enzimática de PARP en linfocitos T humanos (control) en función de tiempo de estimulación con PMA+I.	97
<i>Figura 26.</i>	Comparación entre la actividad PARP en linfocitos T humanos procedentes de sujetos control y de línea tumoral (Jurkat) tras estimulación con Ionomicina+PMA.....	98
<i>Figura 27.</i>	Variación de la actividad de PARP en linfocitos T tras estimulación con PMA+I en presencia de PJ34 a distintos tiempos de incubación.	99

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i>	Características fenotípicas de los ratones Parp-1 ^{-/-}	22
<i>Tabla 2.</i>	Características fenotípicas de células y ratones Parp-2 ^{-/-} frente a Parp-1 ^{-/-}	23
<i>Tabla 3.</i>	Inhibidores de poli-ADP-ribosa polimerasas.	30
<i>Tabla 4.</i>	Proporción de los diferentes componentes utilizados para la medida enzimática de PARP en muestras permeabilizadas.	68
<i>Tabla 5.</i>	Actividad enzimática media de PARP para diez replicados del control negativo expresada en cuentas por minuto.	75
<i>Tabla 6.</i>	Coefficiente de variación intraensayo de tres suspensiones celulares obtenido a partir de la medida de la actividad PARP en 10 replicados de cada una de ellas expresado como el cociente entre la desviación estándar y el promedio de dichas medidas en tanto por cierto.	77
<i>Tabla 7.</i>	Actividad enzimática de PARP en una suspensión de 10 ⁶ timocitos de ratones Parp-1 ^{+/+} en presencia de PJ34 frente a control negativo.....	78

RESUMEN

Existen numerosas evidencias de que la enzima Poli-ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP-1) desempeña un importante papel en la modulación de la expresión génica durante el desarrollo y en respuesta a señales celulares específicas, ejerciendo su acción a diferentes niveles. PARP-1 pertenece a una familia de enzimas (PARP) que, usando NAD⁺ como sustrato, sintetizan y transfieren homopolímeros de ADP-ribosa en residuos de ácido glutámico en proteínas aceptoras principalmente involucradas en la estabilidad de la cromatina y en el metabolismo del DNA. La actividad de PARP-1, responsable de casi el 90% de la poli-ADP-ribosilación en las células, podría modular la expresión génica a través de la poli-ADP ribosilación de otras proteínas o por asociación física con proteínas relevantes como son los factores de transcripción.

En este trabajo nos hemos centrado en poner a punto un método cuantitativo de medida de la actividad poli-ADP-ribosa polimerasa en células permeabilizadas utilizando ³H-NAD⁺ como sustrato. Durante su caracterización, el método ha demostrado tener una buena sensibilidad, precisión, especificidad y exactitud. Una vez optimizado, dicho método se ha empleado en el estudio de las reacciones de poli-ADP-ribosilación mediadas por las enzimas PARP en células del sistema inmune.

El estudio de la actividad PARP en timocitos procedentes de ratones deficientes para PARP-1 (Parp-1^{-/-}) y de ratones Parp-2^{-/-} frente a los timocitos procedentes de ratones no modificados genéticamente pone de manifiesto que la actividad de poli-ADP-ribosilación mediada por PARP-2 no sería responsable de la mayor susceptibilidad a apoptosis detectada en los timocitos de los ratones Parp-2^{-/-}, aunque el incremento significativo de la actividad PARP en ausencia de PARP-2 sí que podría, de alguna forma, afectar al fenotipo observado. Dicho incremento de actividad nos sugiere también un efecto de PARP-2 en una posible regulación negativa de la actividad enzimática de PARP-1.

Por otra parte los estudios de estimulación de linfocitos T con PMA+ionomicina y anticuerpos anti-CD3 solos y en combinación con anticuerpos anti-CD28, nos han permitido demostrar la activación de PARP en linfocitos T tras la respuesta a estímulos que no producen daño aparente en el DNA.

Sin duda alguna, la aplicación de la metodología optimizada en este trabajo puede ser de gran ayuda en el campo de la investigación de las reacciones de poli-ADP-ribosilación y a nivel clínico, si finalmente los ensayos clínicos con inhibidores de PARP en diferentes patologías resultan de utilidad clínica.

I. INTRODUCCIÓN

LA POLI-ADP-RIBOSA.

Más de 40 años después de su descubrimiento, la poli-ADP-ribosa (PAR) emerge como una modificación post translacional clave no sólo en procesos fisiológicos como el mantenimiento de la integridad del DNA o la regulación de la transcripción de genes, sino también en el balance de vida/muerte celular en condiciones fisiopatológicas (Schreiber et al., 2006), llegando, incluso, a ser considerada el tercer tipo de ácido nucleico (D'Amours et al., 1999).

PAR es un homopolímero lineal o ramificado de tamaño variable, formado por la repetición de unidades de ADP-ribosa que se unen entre sí mediante enlaces O-glicosídicos entre los carbonos 1''→2'. Las ramificaciones sobre la cadena lineal se producen mediante enlaces O-glicosídicos 2''→1'' entre dos unidades de ribosa (Álvarez-González y col., 1999; Kraus y Lis, 2003). Presenta variabilidad tanto en su longitud (200 unidades de ADP-ribosa *in vitro*) como en la extensión de sus ramificaciones (aproximadamente 1 ramificación cada 20-50 unidades de ADP-ribosa) (D'Amours et al., 1999), sin conocerse hasta el momento la repercusión de dicha heterogenicidad en sus funciones. Cada residuo contiene un medio de adenina capaz de unirse a bases o a hidrógenos, además de dos grupos fosfato con cargas negativas (Amé et al., 2000), a través de los cuales interacciona intramolecularmente como modificación covalente específica de lugar, como matriz de unión a proteínas o como bloque estérico (D'Amours, 1999).

Las enzimas responsables de la formación de PAR, son las poli-ADP-ribosa polimerasas (PARP) (Schreiber et al., 2006), las cuales forman el polímero a través de tres actividades enzimáticas básicas (Álvarez-González y col., 1999): (1) iniciación o mono-ADP-ribosilación del sustrato: el primer monómero de ADPr se une al grupo carboxilo de un residuo aminoácido mediante un enlace tipo éster (2) elongación del polímero mediante la incorporación de las unidades de ADP-ribosa mediante enlaces O-glicosídicos 1''→2', y (3) ramificación del mismo de forma irregular, por enlaces O-glicosídicos 2''→1'', normalmente cada 20-50 unidades de ADPr en la cadena lineal (Álvarez-González y col., 1999; Kraus y Lis, 2003).

El polímero de ADP-ribosa tiene una vida media corta, las cadenas sintetizadas en respuesta a daño en el DNA son degradadas en 1-2 minutos (Lindahl y col., 1995) mientras que los polímeros existentes en condiciones fisiológicas suelen presentar unas 7.7 horas de vida media (D'Amours y col., 1999). La degradación de PAR se inicia inmediatamente después del inicio de su síntesis y finaliza minutos después del fin de ésta (D'Amours, 1999, Tulin and Spradling, 2003), indicando un nivel muy fino de regulación. La degradación del polímero es llevada a cabo por dos enzimas diferentes, la poli-ADP-ribosa glicohidrosilasa (PARG) y la ADP-ribosa liasa (ARL). PARG tiene actividad exoglicosidasa y endoglicosidasa, responsables de la hidrólisis de los enlaces glicosídicos tanto de los extremos como del interior del polímero (D'Amours y col., 1999; Amé y col., 2000; Davidovic y col., 2001). La ADP-ribosa-liasa hidroliza el enlace éster entre la proteína modificada y el primer monómero de ADP-ribosa (D'Amours y col., 1999; Kraus y Lis, 2003). Junto a la proteína nuclear PARG (110 kDa), se ha descrito una isoforma mitocondrial más corta de 65 kDa y otras isoformas de PARG menos habituales, cuyas funciones y localizaciones en el citoplasma todavía no se conocen bien (Meyer-Ficca y col., 2004). A pesar de que PARP-1 está presente de 5 a 20 veces más que la PARG, parece la proporción adecuada para mantener los niveles de pADPr en el núcleo celular (Álvarez-González, 1999, D'Amours, 1999, Davidovic, 2001).

Recientes investigaciones han identificado una ruta de degradación de pADPr alternativa mediada por una proteína de 39 kDa que no tiene relación estructural con PARG, ARH3 (ADP-ribosil arginina hidrolasa-3) pero que desempeña la actividad de hidrólisis de PAR (Oka y col., 2006), confiriendo mayor complejidad al metabolismo de la poli-ADP-ribosa.

Los niveles constitutivos del polímero son relativamente bajos en células sin estimular, sin embargo, al producirse daño en el DNA, la actividad enzimática sube, aumentando entre 10 y 500 veces con respecto a su nivel basal. La automodificación resultante de la actividad enzimática regula la propia actividad catalítica de la enzima y su unión al DNA. Se han propuesto diferentes mecanismos que podrían explicar la regulación de la actividad de PARP, siendo el mejor caracterizado el modelo “*shuttling*” (D'Amours y col., 1999). Este modelo implica que, durante la automodificación de PARP, la enzima va adquiriendo

gradualmente carga negativa de los grupos fosfato presentes en el polímero, de forma que se crea una electro-repulsión entre PARP modificado y el DNA, produciendo la inactivación y disociación de la proteína con el DNA. Posteriormente, las enzimas PARG y ADP-ribosa-liasa hidrolizan el polímero presente en la enzima, permitiéndole estar preparada para un nuevo ciclo de automodificación en respuesta al daño en el DNA. Este modelo se ha demostrado durante la poli-ADP-ribosilación de histonas y durante la descondensación de la cromatina (D'Amours y col., 1999).

En cuanto a las otras dianas de la poli-ADP-ribosilación, se ha visto que presentan un motivo de unión que frecuentemente se solapa con un dominio funcional, lo que explicaría que la poli-ADP-ribosa altere las propiedades funcionales de sus dianas (Schreiber et al., 2006). Para el caso de proteínas como las histonas, p53, XRCC-1 se habla de un motivo de unión de 20 aminoácidos (aa) (Pleschke et al., 2000, Gagne et al., 2003). Recientemente se ha visto un nuevo lugar de unión, el “macrodominio” formado por 190 aa presente en proteínas como macroH2A, o el doble macrodominio de PARP9 (Karras et al., 2005).

A la vista de las investigaciones realizadas parece que la producción de poli-ADP-ribosa responde varios propósitos: (1) Contribución a la relajación de las fibras de cromatina, aumentando el acceso a roturas en el DNA a través de la poli-ADP-ribosilación de los extremos N o C terminal de las histonas H1 y H2B o la interacción selectiva de estas proteínas con PARP-1 libre o unido a PAR (Poirier y col., 1982, Realini C.A. y col., 1992). (2) Transmisión de la extensión del daño en el DNA de manera que la célula prepara una respuesta acorde a la severidad del daño. (3) Reclutamiento de SSBR/BER en el lugar de la lesión. Esta última comprobada por el hecho que la inhibición de PARP inhibe el reclutamiento de XRCC1 al lugar del daño, y afecta al proceso de reparación, mediado por mecanismos SSBR/BER (Mortusewicz O. y col., 2007).

LA FAMILIA PARP.

La polimerización de ADP ribosa corre a cargo de las enzimas PARP, familia de 17 enzimas caracterizados por un dominio catalítico común. El dominio PARP varía entre los

miembros de la familia, de hecho el residuo catalítico (Glu 988 de PARP-1) se sustituye por un residuo no conservado en miembros como TiPARP, PARP9/BAL1, PARP10, PARP13 y PARP16, cuestionando la actividad ribosiladora de estas enzimas. Hasta el momento sólo la enzima PARP-9/BAL1 es inactiva frente a tiPARP y PARP-10 con actividad catalítica demostrada (Ma Q y col., 2001, Yu M y col., 2005, Aguiar R.C. y col., 2005). Es pronto para concluir si dichas variaciones en los dominios son mutaciones o aportan funciones específicas (Schreiber et al., 2006).

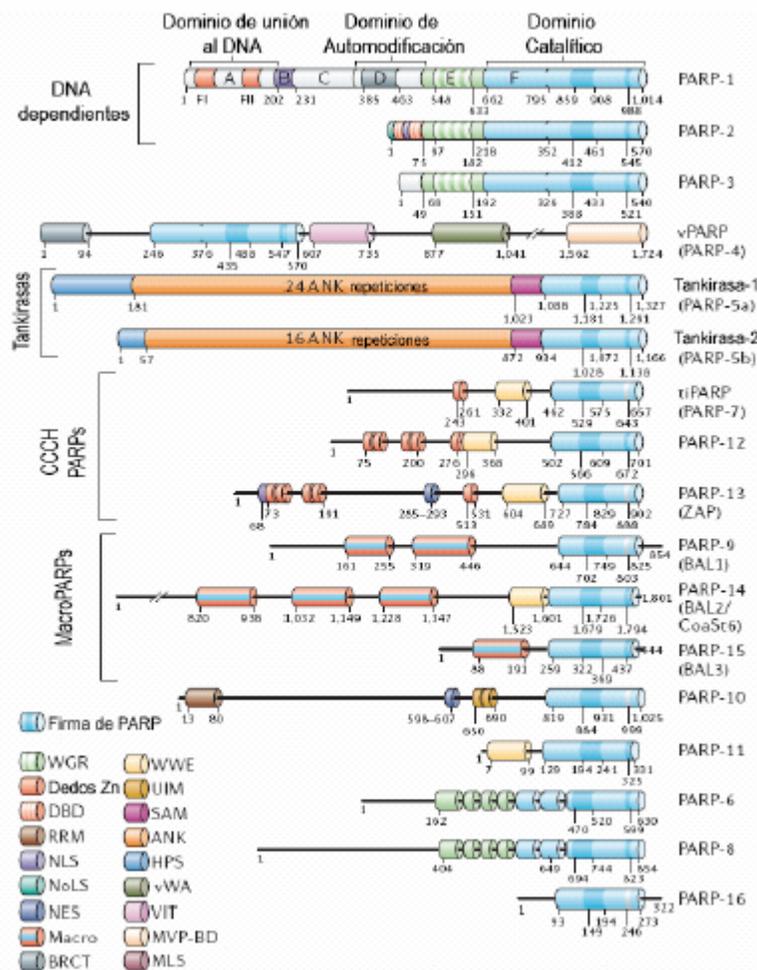


Figura 1. Familia de PARP. Estructura de los dominios de los 17 miembros de la superfamilia de PARP. La caracterización de la familia PARP se ha realizado utilizando el dominio catalítico de PARP-1 para la búsqueda exhaustiva de proteínas no redundantes en

PARP-1 (EC 2.4.2.30) es el fundador y miembro de la familia mejor conocido. Se trata de una proteína nuclear de 113 kDa presente en la mayoría de células eucariotas y ausente en levaduras (D'Amours y col., 1999), que fue descrita por primera vez hace más de 40 años por Chambon y colaboradores (Chambon y col., 1963).

PARP-2 es una proteína nuclear de 62 kDa que fue descubierta hace pocos años como resultado de la presencia de una actividad de poli-ADP-ribosilación residual tras daño en el DNA en fibroblastos embrionarios derivados de ratones deficientes en PARP-1 (Ame y col., 1999). Realmente, la sospecha de la existencia de esta nueva enzima PARP fue apoyada por el descubrimiento de un gen que codificaba un polipéptido de 72 kDa relacionado con PARP en *Arabidopsis thaliana* (Lepiniec y col., 1995). Posteriormente, en 1998, se vio que tanto *Arabidopsis thaliana* como plantas de maíz, presentaban dos proteínas PARP estructuralmente diferentes pero que con actividades de poli-ADP-ribosa dependientes de DNA (Babiychuk y col., 1998, Mahajan y col., 1998). Seguidamente, una actividad de poli-ADP-ribosilación residual tras daño en el DNA se observó en fibroblastos embrionarios derivados de ratones deficientes en PARP-1 (Shieh y col., 1998), sugiriendo que tanto en mamíferos como en plantas, estaba presente otro miembro de la familia PARP distinto a PARP-1. Finalmente, en 1999, Amé y colaboradores clonaron el cDNA de este nuevo miembro de la familia PARP (Ame y col., 1999).

- **TANKIRASAS.**

Las Tankirasas 1 y 2 se encuentran asociadas con las proteínas teloméricas (Smith y col., 1998; Cook y col., 2002; Sbodio y col., 2002). Estas dos proteínas tienen alto grado de homología (superior al 85%) y sólo difieren en el dominio amino terminal HPS. Las tankirasas 1 y 2 interactúan con las mismas proteínas (TRF1, IRAP, Glut4, Grb14, TAB 182 y NuMa.) y posiblemente tienen funciones que se solapan en la homeostasis del telómero y en el tráfico de vesículas (en concreto en el transporte de glucosa) (Smith y de Lange, 2000; Chang y col., 2005; Seimiya, 2006). Estas proteínas presentan múltiples localizaciones subcelulares: telómeros, poros nucleares, vesículas de Golgi y material pericentriolar durante la mitosis.

- **PARPS TIPO CCCH.**

Los PARPs tipo CCCH son 3: PARP-12, PARP-13 y tiPARP/ PARP-7. Comparten estructuralmente una organización de dominios similar: estructura de dedos de zinc tipo CX₈-CX₅-CX₃, un dominio WWE (motivo de interacción de proteínas que contiene conservado dos residuos de triptófano y un residuo de ácido glutámico) y un dominio catalítico (Schreiber y col., 2006).

El gen de tiPARP (PARP-7) está inducido por 2, 2, 7, 8, tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD). La sobreexpresión de tiPARP puede estar relacionada con el detrimento de ciertas funciones neurológicas (comportamiento, aprendizaje y memoria) (Schreiber y col., 2006)

PARP-13 existe en dos isoformas que se diferencian en que una de ellas es más corta porque no posee el dominio PARP (ZAP) y han sido relacionadas con infección retroviral (Gao y col., 2002).

La función de PARP-12 no se conoce hasta el momento pero se sabe que está estrechamente relacionada con PARP-13.

- **MACROPARPS.**

Constituyen este grupo las isoformas PARP-9/BAL1, PARP-14/BAL2/CoasSt6 y PARP-15/BAL1, las cuales se caracterizan porque además del dominio catalítico PARP, poseen de 1 a 3 macro dominios. El macro dominio también está presente en la variante de la histona H2A que está implicada en la inhibición transcripcional e inactivación del cromosoma X. El macro dominio de PARP-9 pueden unir ADP-ribosa y PAR (Karras y col., 2005), mientras que el macro dominio de macroH2A1.1 une O-actil-ADP-ribosa (Kustatscher y col., 2005). Las tres isoformas de macroPARPs están localizadas en la misma región del cromosoma 3q21. Se piensa que actúan como cofactores de la transcripción, y mientras que PARP-9 parece tener una actividad inhibidora (Aguiar y col., 2005), PARP-14 activa a STAT6, un activador de la transcripción en células T estimuladas con interleukina-4

(Goenka y col., 2006). También se ha visto que la sobreexpresión de PARP-9 promueve la migración de células B de linfoma (Aguiar y col., 2000).

- **OTROS PARPS.**

Dentro de este apartado se incluyen aquellos miembros de la familia PARP que no se han podido clasificar dentro de las otras 4 subfamilias.

La proteína PARP-3 está asociada con los centriolos hijos dentro de los centrosomas (Augustin y col., 2003). Aunque su actividad es apenas detectable, se ha visto que interfiere en la maduración de los centriolos, en la fase G1-S del ciclo celular. PARP-3 interacciona con PARP-1 en el centrosoma lo que sugiere una relación entre los mecanismos de supervivencia a través de la reparación de daño en el DNA y los puntos de control de la fidelidad mitótica (Kanai y col., 2003).

La proteína vPARP es la más grande de la familia con un tamaño de 192.6 KDa. Esta proteína se asocia con proteínas “vault” (bóveda) y su función no está bien definida, pero se cree que participa en el transporte celular y que puede estar relacionada con la resistencia a drogas en algunas líneas celulares (Kickhoefer y col., 1999; Scheffer y col., 2000; Liu y col., 2004). vPARP está localizada en el núcleo y asociada al huso mitótico durante la mitosis. También, se ha visto que interacciona con TEP1, una proteína asociada a la telomerasa, (también presente en *vaults*) aunque la interrupción del gen de TEP1 o/y vPARP no altera la función del telómero. Los ratones PARP-4/vPARP^{-/-} presentan unas proteínas vault normales si bien son susceptibles de tumores inducidos en colon reafirmando así su papel en la respuesta a genotóxicos (Raval-Fernandes S y col., 2005).

La proteína PARP-10 está implicada en la regulación de la cromatina (poli-ADP-ribosila la histona H2A) y en la transformación celular mediada por la proto-oncoproteína nucleolar c-Myc, (en la que no necesita su actividad PARP) (Yu y col., 2005). Se encuentra localizado en el citoplasma y en el núcleo.

Hasta el momento, no se han encontrado dominios conocidos en PARP-6, PARP8, PARP-11 y PARP-16 (excepto un dominio WWE en PARP-11), por tanto, ha sido imposible especular sobre sus funciones.

PARP-1 Y PARP-2.

Tal y como se indicó anteriormente, en 1999 se aisló un cDNA que codificaba una proteína de 62kDa con gran homología con el dominio catalítico del PARP-1. Dicha proteína fue bautizada como PARP-2. La presencia de actividad catalítica en este nuevo enzima ha hecho que tanto PARP-1 como PARP-2 hayan sido objeto de un amplio estudio por su papel en la supervivencia y muerte celular, así como en diversos procesos fisiológicos.

- **Estructura de PARP-1 y PARP-2.**

PARP-1, está compuesta por 1014 aminoácidos divididos en seis dominios estructurales, de los cuales sólo cuatro están perfectamente descritos funcionalmente. El dominio A, dominio de unión al DNA (DBD, *DNA Binding Domain*) de 46 kDa, situado en el extremo amino terminal (N), contiene dos estructuras de dedos de zinc (FI y FII) a través de los cuales se produce la interacción de PARP-1 con el DNA dañado, estimulando su actividad catalítica (Lindahl y col., 1995; Caldecott y col., 1996). Este dominio también está implicado en homo (Bauer y col., 1990; Schreiber y col., 2002) y heterodimerización con otras proteínas nucleares incluyendo a PARP-2 (Schreiber y col., 2002). El dominio B, donde se encuentra la secuencia de localización nuclear (NLS, *Nuclear Localization Sequence*), por tanto, es el responsable de la localización nuclear de PARP-1. Además, este dominio está interrumpido por una secuencia aminoacídica DEVD reconocida por la caspasa-3 y -7, y sobre la cual se realiza el corte proteolítico ejercido por estas enzimas en la muerte celular apoptótica. Este proceso es uno de los eventos más tempranos de la apoptosis y es utilizado como marcador de dicha muerte celular (Kaufmann y col., 1993; Lazebnik, 1994). Los dominios C y E, son los que están peor descritos hasta el momento y su función específica es desconocida. El dominio C contiene los motivos HTH (*Helix Turn Helix*), descritos como dominios de unión entre proteínas y el DNA (Brennan y Mathews,

1989; Gradwohl y col., 1990). Se ha sugerido que la estructura HTH podría mediar la unión de PARP-1 al DNA intacto, aunque parece claro que esta unión es ineficiente para inducir la actividad catalítica de la enzima (D'Amours y col., 1999). El dominio D, dominio de automodificación de 22 kDa que contiene la mayoría de los residuos de ácido glutámico involucrados en la automodificación de PARP-1 por poli-ADP-ribosilación. Además contiene un motivo de cremallera de leucina (LZ, *Leucine Zipper*), responsable de interacciones proteína-proteína en reacciones de homo y heterodimerización. Este dominio también contiene un motivo BRCT (*Breast cancer susceptibility protein C-terminus*, BRCA1 C-terminal) de 95 aminoácidos débilmente conservados, a través del cual PARP-1 podría interactuar con diferentes proteínas, entre las que se incluyen los factores de transcripción NF- κ B, Ying Yang 1 (YY1) y Oct-1, la enzima humana conjugadora de ubiquitina hUBC9 (Nash y col., 1997; Masson y col., 1998), y otras enzimas asociadas con el DNA y su reparación como histonas, XRCC1 (*X-Ray Repair Cross-Complementing 1*) y DNA polimerasa β (Nie y col., 1998; Griesenbeck y col., 1999). El dominio F es el dominio catalítico de 46 kDa localizado en el extremo carboxilo terminal (C) y responsable de la actividad enzimática de PARP-1. Presenta una estructura terciaria formada por lámina β -hélice α -loop-lámina β -hélice α , donde se une el NAD⁺, similar a la de otras mono-ADP-ribosil transferasas. Los aminoácidos que ocupan las posiciones 859-908 en humanos, están filogenéticamente bien conservados (100% en los vertebrados y un 92% en todas las especies) (Kraus y Lis, 2003), y comprenden la denominada "firma de PARP-1" mediante la cual se ha podido establecer una familia de proteínas PARP actualmente formada por 17 miembros (Schreiber y col., 2006) (Ver apartado 1.1). Aunque la función biológica de muchos de los miembros de la familia todavía no se conoce, es posible sugerir que las reacciones de poli-ADP-ribosilación pueden estar relacionadas con múltiples funciones en las células.

PARP-2 es una proteína de 559 aminoácidos que se divide en tres dominios basándose en su función bioquímica aunque hasta el momento, sólo a dos de ellos se les ha podido asignar una función específica. El primer dominio, situado en el extremo amino terminal (Nt), comprende aminoácidos del 1-65 y contiene el dominio de unión al DNA (DBD), secuencias de localización nuclear (NLS) (Ame y col., 1999) y secuencias de localización

nucleolar (NoLS), además de estar implicado en la interacción con otras proteínas nucleares como la proteína telomérica TRF2 (Dantzer y col., 2004) y el factor nucleolar B23 (Meder y col., 2005). Este dominio no tiene homología con ningún PARP descrito anteriormente y, en lugar de contener estructuras de dedos de zinc como PARP-1 es rico en aminoácidos básicos (27% lisina o arginina) (Ame y col., 1999). Sin embargo, presenta homología con el dominio SAP (Aravind y col., 2000) encontrado en varias proteínas nucleares como APE-1 y Ku70 implicadas en la organización cromosómica y en la reparación del DNA. Además, contiene un sitio de reconocimiento por caspasa-3 localizado en la secuencia aminoacídica ⁵⁸DNRD⁶¹ (conservada en humanos y ratón), que separa el dominio DBD y el dominio E (Menissier de Murcia, 2003). El segundo dominio, dominio E (homólogo al dominio E de PARP-1) comprende los aminoácidos 65-198 y actúa como un dominio de automodificación y heterodimerización (Schreiber y col., 2002). Además, este dominio presenta dos sitios potenciales de reconocimiento por caspasa-8: ¹¹⁶Leu-Glu-Asp-Asp¹¹⁹ (LEDD) y ¹⁸³Leu-Gln-Met-Asp¹⁸⁶ (LQMD), los cuales están conservados en humanos (Benchoua y col., 2002). La secuencia aminoacídica LQMD marca la separación entre el dominio E y el tercer dominio y, se ha visto que esta secuencia es muy similar al sitio de reconocimiento por caspasa-8 en la proteína pro-apoptótica Bid (Li y col., 1998). El tercer dominio, dominio F (corresponde al dominio F en PARP-1) localizado en el extremo carboxilo terminal (Ct), comprende los aminoácidos del 199-559 y contiene el sitio catalítico de la enzima que está muy conservado: sitio donador de ADP-ribosas que incluyen los aminoácidos 401-450 y sitio aceptor que incluye el glutamato catalítico en la posición 534, constituyendo la “firma de PARP” (Ame y col., 1999). Este dominio posee una homología del 69% con el dominio catalítico de PARP-1 (Amé y col., 2004), pero la determinación de la estructura tridimensional del fragmento catalítico de PARP-2 ha puesto de manifiesto diferencias en la vecindad del sitio aceptor, lo cual podría reflejar diferencias en las proteínas que son ADP-ribosiladas por las dos enzimas (Oliver y col., 2004).

- **Actividad enzimática de PARP-1 y PARP-2.**

PARP-1 y PARP-2 se activan en respuesta al daño en el DNA inducido por diferentes agentes genotóxicos como la radiación ionizante, agentes alquilantes o radicales libres,

catalizando la reacción de poli-ADP-ribosilación de proteínas aceptoras. Para ello toma NAD^+ como sustrato, rompe el enlace glicosídico entre la nicotinamida y la ADPribosa, y libera unidades de este azúcar que une covalentemente al grupo γ carboxilo de los residuos de glu de proteínas diana, incluyendo a ellas mismas (automodificación, la más frecuente, con más del 90% de PAR encontrado (Huletsky et al., 1989, D'Amours et al., 1999)), histonas, factores de transcripción y otras proteínas nucleares (heteromodificación), modificándolas de forma transitoria (de Murcia y Shall, 2000). La poli-ADP-ribosilación está mediada principalmente por PARP-1, mientras que PARP-2 es responsable sólo del 5-10% de la actividad total de PARP en extractos celulares estimulados por roturas en el DNA (Amé y col., 1999, Schreiber y col., 2002). Estas proteínas se unen o bien a roturas del DNA de cadena sencilla (PARP-1) o bien a *gaps* (PARP-1 y PARP-2) y son enzimáticamente activadas, siendo la activación para PARP-1, aproximadamente de 500 veces por encima de sus niveles basales (Oliver y col., 2004). En este sentido, tanto PARP-1 como PARP-2 actuarían como moléculas de señalización a nivel nuclear. Recientemente, se han obtenido evidencias de otros estímulos diferentes al daño en el DNA tales como hormonas esteroideas, estrés e infección, que son también capaces de activar PARP-1 en sitios específicos de los cromosomas (Tulin y Spradling, 2003; Gordon-Shaag y col., 2003). Actualmente se ha demostrado que la poli-ADP-ribosilación también actúa en cascadas de señalización reguladas por kinasas (ERKs), que median procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación celular. Estos trabajos revelan una vía alternativa de activación de PARP, la cual no implica unión o daño al ADN (Cohen-Armon, 2007, Cohen-Armon et al., 2007, Valdor et al., 2007)

La K_m de la enzima por su sustrato, NAD^+ , varía en función del tipo de estimulador del daño en el DNA y del estado de automodificación de la enzima. Los valores de K_m de PARP-1 purificada varían desde 20 μM a 80 μM y la K_{cat} disminuye un 25% después del primer minuto de reacción, debido a la disminución de la afinidad de PARP-1 por el DNA (D'Amours y col., 1999). Estudios de la medida *in vitro* de la actividad catalítica de PARP-1 humano y de PARP-2 murino, bajo las mismas condiciones cinéticas donde la única variable es el sustrato NAD^+ , ponen de manifiesto que la afinidad de PARP-2 por NAD^+ es 2.6 veces menor que la de PARP-1 (se obtiene una K_m de 130 μM para PARP-2 frente a una

K_m de 50 μM para PARP-1), y que la actividad catalítica de PARP-2 es 18 veces menor que la de PARP-1 (el ratio de K_{cat}/K_m de PARP-2 es 323 $\text{S}^{-1} \text{M}^{-1}$ frente a un ratio 6000 $\text{S}^{-1} \text{M}^{-1}$ para PARP-1), un valor en consonancia con la actividad residual de 5-10% encontrada en los extractos de células Parp-1-/- estimuladas por la rotura de DNA (Amé y col., 1999; Schreiber y col., 2002).

El “reciclaje” y las síntesis “de novo” son las dos grandes vías de obtención de NAD^+ en el organismo (Rongvaux et al., 2003). Existen varias rutas de recuperación, una de ellas parte de ácido nicotínico que se convierte en ácido nicotínico mononucleótido (NaMN) (a través de la ruta Preiss-Handler), ácido nicotínico adenina dinucleótido (NaAD) y finalmente NAD^+ . Otra emplea la nicotinamida como precursor, con nicotinamida mononucleótido (NMN) de intermediario. La tercera ruta emplea la nicotinamida ribosa (NR) como precursor de NAD^+ conectándose a la ruta de recuperación a través de nicotinamida mononucleótido (NMN) (Bieganowski and Brenner, 2004). La ruta “de novo” parte del triptófano que pasa a ácido quinolínico, conectándose a continuación con la ruta de recuperación a través del NaMN. Parece claro que la disponibilidad de NAD^+ afecta a las funciones de los enzimas PARP. Estudios *in vitro* han demostrado que la concentración de NAD^+ afecta a la longitud de PAR sintetizado por PARP-1 (Álvarez González y Mendoza Álvarez, 1995), además de a la regulación de los efectos del enzima en la estructura de la cromatina y en la transcripción (Kim et al., 2004).

NAD^+ sirve de sustrato en procesos celulares en lo que ADP-ribosa se transfiere a un aminoácido (mono o poliADP-ribosilación mediada por PARP) o a un grupo acetilo generando 2'-o-acetil-ADP-ribosa, esta segunda reacción ocurre durante la desacetilación de residuos de lisina, proceso mediado por SIRT. En la mayoría de los tejidos de mamíferos, la nicotinamida producida en la hidrólisis de NAD^+ mediada por el PARP-1 y el SIRT-1 es el precursor más relevante de NAD^+ y por tanto el principal regulador de las funciones de PARP-1 (Rongvaux et al., 2003). Se cree que PARPs y SIRT-1 pueden competir por un pool común de NAD^+ que podría estar comprometido en situaciones de daño en el DNA severo (Zhang, 2003).

La nicotinamida se convierte en NMN a través de la NAMPT (nicotinamida fosforribosiltransferasa). La producción de NAD⁺ a partir de NMN y ATP se cataliza por la familia de NMN adenililtransferasas (Magni et al., 2004). Ya que los PARP son fundamentalmente enzimas nucleares, necesitan una fuente de NAD⁺ nuclear. La forma predominante de NMNAT en mamíferos es la NMNAT-1, proteína nuclear (Schweiger et al., 2001). Aunque existen otras formas extranucleares parece claro que esta isoforma es capaz de regular los procesos nucleares dependientes de NAD⁺. Faltan estudios para relacionar PARP-1 con NMNAT-1 aunque estudios preliminares indican que se modulan el uno al otro (Ruggieri et al., 1990; Schweiger et al., 2001).

HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO DE PARP-1 y PARP-2.

Desde su descubrimiento en 1963 por Chambon y colaboradores, la fisiología y fisiopatología de PARP ha sido ampliamente estudiada, utilizando herramientas farmacológicas y genéticas. Fármacos como la benzamida y la 3-aminobenzamida han permitido ver la implicación de estas enzimas en la reparación del DNA, la supervivencia celular, la expresión génica, la diferenciación celular o la carcinogénesis. Posteriormente estos descubrimientos han sido corroborados con el desarrollo de ratones deficientes en PARP (Cosi y col., 2002).

- **Inhibición *trans*-dominante.**

Es una de las primeras estrategias desarrollada para determinar el papel fisiológico de PARP-1 en respuesta celular frente a agentes que dañan el DNA. Esta inhibición consiste en la sobreexpresión del dominio DBD de la proteína, de forma que impide la unión de PARP-1 al DNA por inhibición competitiva. Esto parece no afectar al nivel endógeno de PARP-1 pero sí a su activación catalítica, disminuyendo los niveles del polímero hasta un 90% en cultivos celulares (Küpper y col., 1995 y 1999; Schreiber y col., 1995). Aunque esta estrategia se ha llevado a cabo tanto *in vitro* como *in vivo*, existe el inconveniente de no poder controlar las interacciones que pueden producirse entre el fragmento DBD y otras proteínas nucleares, y por tanto, sus posibles efectos biológicos (Aoufouchi y col., 1999).

- **Ratones deficientes en PARP.**

La generación de líneas de ratones deficientes en PARP-1 o PARP-2 (Parp-1^{-/-} o Parp-2^{-/-}) ha sido uno de los grandes avances en el estudio de la función biológica de estas proteínas. Hasta el momento, se han generado tres líneas de ratones Parp-1^{-/-} frente a una única línea de ratones Parp-2^{-/-}. Las líneas de ratones Parp-1^{-/-} se han generado mediante inserción por recombinación homóloga en el exón 2 (Wang y col., 1995), en el exón 4 (Ménissier de Murcia y col., 1997) y en el exón 1 (Masutani y col., 1999a) de un casete del gen *neo*, de resistencia al antibiótico neomicina, que carece del promotor y de la secuencia ATG correspondiente a la metionina inicial y que tiene un codón de terminación (TGA) y un sitio sintético de poli-adenilación. El fondo genético de los animales obtenidos es para cada grupo: 129/Sv x C57BL/6, 129/SvJ x C57BL/6 y 129/SJ x ICR respectivamente. A pesar de las diferencias en el fondo genético o en los puntos de interrupción del gen Parp-1, las tres líneas de ratones Parp-1^{-/-} presentan un fenotipo similar.

A partir de la interrupción del gen Parp-1 ha sido posible el descubrimiento de la proteína PARP-2 (Shieh y col., 1998; Ame y col., 1999), y por consiguiente, la interrupción de su gen. La línea de ratones Parp-2^{-/-} se ha generado mediante inserción por recombinación homóloga en el exón 9 (en la posición correspondiente al residuo I₂₈₅ del gen *parp-2*) de un casete del gen *hygromycin* que es un gen de resistencia a higromicina. El fondo genético de la línea generada es 129/Sv x C57BL/6. Aunque existe una gran diferencia entre las actividades enzimáticas de PARP-1 y PARP-2, los ratones deficientes en PARP-2 presentan algunas características de fenotipo comunes con los ratones Parp-1^{-/-}.

Tabla 1. Características fenotípicas de los ratones Parp-1^{-/-}

Fenotipo Parp-1 ^{-/-}	Referencias
Viabiles, fértiles	Wang y col., 1995 Menissier de Murcia y col., 1997 Masutani y col., 1999a
Afectada la capacidad de reparar el daño en el DNA	Wang y col., 1995 y 1997 Menissier de Murcia y col., 1997
Inestabilidad genómica frente a estímulos genotóxicos	Trucco y col., 1998 Simbulan-Rosenthal y col., 1999a Masutani y col., 1999 ^a Conde y col., 2001
Acumulación G2/M	Menissier de Murcia y col., 1997 Simbulan-Rosenthal y col., 1999a
Inestabilidad cromosómica dependiente del daño en el DNA no asociado a disfunción centromérica	
Acortamiento de la longitud de los telómeros y alta frecuencia de fusiones teloméricas y de roturas cromosomas/cromátidas	D'Adda di Fagagna y col., 1999 Samper y col., 2001
Longitud normal de los telómeros, baja frecuencia de fusiones teloméricas y alta frecuencia de roturas cromosomas/cromátidas	
Protección frente a diabetes inducida por estreptozotocina	Pieper y col., 1999a Burkart y col., 1999 Masutani y col., 1999a González y col., 2002
Protección frente a artritis inducida por peroxinitrito	Szabó y col., 1998
Protección frente a Parkinson inducido por MPTP	Mandir y col 1999
Protección frente a isquemia cerebral focal	Eliasson y col 1997 Endres y col 1997 Tokime y col 1998 Nakajima y col 2005
Resistente a shock séptico inducido por LPS	Kühnle y col., 1999 Oliver y col., 1999
Atenúa la severidad de la pancreatitis aguda	Mota y col., 2005

Tabla 2. Características fenotípicas de células y ratones Parp-2^{-/-} frente a Parp-1^{-/-}

Función	Fenotipo Parp-2 ^{-/-}	Fenotipo Parp-1 ^{-/-}	Refs.
Inestabilidad genómica	Hipersensibilidad a radiaciones ionizantes (>2Gy) y agentes alquilantes	Hipersensibilidad a radiaciones ionizantes (>2Gy) y agentes alquilantes	Menissier, dM et al., 2003
	Aumento de sensibilidad a bajas dosis de radiación	Sensibilidad normal a bajas dosis de radiación (<2Gy)	Chalmers, A et al., 2004
Reparación DNA	Reclutamiento de XRCC1 a SSB. Reparación de SSB retardada	No hay reclutamiento de XRCC1 a SSB. Reparación de SSB retardada	Scheiber V et al., 2002; Trucco C et al., 1998; Fisher A. E. et al., 2007
	Letalidad embrionica en ratones Parp-1 ^{-/-} Parp-2 ^{-/-}	Letalidad embrionica en ratones Parp-1 ^{-/-} Parp-2 ^{-/-}	Menissier, dM et al., 2003
	Letalidad embrionica en ratones Parp-2 ^{-/-} Atm ^{-/-}	Letalidad embrionica en ratones Parp-2 ^{-/-} Atm ^{-/-}	Menissier de Murcia J et al., 2001; Huber A et al., 2004
	Impedimento de reorganización TCR V _α a J _α	No hay efecto en el desarrollo de timocitos	Yélamos J et al., 2006
Integridad de la heterocromatina centromérica	Segregación incorrecta de cromosoma inducida espontáneamente y por daño en DNA	No determinada	Menissier, dM et al., 2003
Estabilidad de telómeros	Longitud normal de telómeros y actividad de telomerasa normal pero aumento espontáneo de la frecuencia de telómeros sin extremos detectables	Longitud de telómeros normal. No hay disfunción espontánea de telómero.	Dantzer F et al., 2004;
		Aumento de la fusión extremo-extremo de cromosomas y extremos de telómeros sin señal inducidos por daño en DNA	Gómez M et al., 2006
Estabilidad de cromosoma X	Inestabilidad de cromosoma X en hembras Parp-1 ^{+/-} Parp-2 ^{-/-}	Estabilidad de cromosoma X en ratones Parp-1 ^{-/-} Parp-2 ^{+/+}	Menissier, dM et al., 2003
Muerte celular	Liberación AIF mitocondrial y necrosis inducidos por daño en DNA.	No hay liberación de AIF inducida por daño en DNA	Moubarak R. S. et al., 2007
	No hay protección frente a pancreatitis inducida por ceruleina y pancreatitis asociada a daño pulmonar.	Protección frente a pancreatitis aguda inducida por ceruleina y daño pulmonar asociado	Mota R. A. et al., 2005
	Sobreexpresión de Noxa y Puma en timocitos CD4 ⁺ CD8 ⁺ .Alta susceptibilidad a apoptosis	Desarrollo normal de timocitos	Yélamos J et al., 2006
Diferenciación	Espermatogénesis dañada	Espermatogénesis normal	Dantzer F et al., 2006
	Adipogénesis dañada	No determinado	Bai P et al.
	Timopoyesis dañada	Timopoyesis normal	Yélamos J et al., 2006
Inflamación	Efectos nulos o menores en inflamación sistémica	Inflamación sistémica reducida	Mota R. A. et al., 2005; Kofler J et al., 2006

A partir de estos ratones se han obtenido líneas celulares inmortalizadas con las que se ha podido estudiar a nivel celular las funciones fisiológicas de PARP-1 y de PARP-2. El único inconveniente del estudio con ratones *Parp-1^{-/-}* o *Parp-2^{-/-}* es el no poder distinguir si los resultados obtenidos son debidos a una pérdida de la proteína en sí misma (con una actividad estructural, arquitectónica, modulación de otras proteínas mediante interacción física, etc) o debidos a una pérdida de la actividad enzimática.

- **Inhibidores farmacológicos de PARP.**

El interés suscitado por los inhibidores farmacológicos de PARP se debe a las múltiples posibilidades terapéuticas que ofrecen. Los inhibidores de PARP han sido propuestos para restaurar la sensibilidad de tumores resistentes a agentes alquilantes como la temozolomida (TMZ) o inhibidores de la topoisomerasa I, fármacos utilizados durante el tratamiento de tumores como quimioterapia estándar (Tentori y col., 2005; Jagtap y Szabó, 2005). Otra aplicación potencial de estos inhibidores en el tratamiento del cáncer es la relacionada con la intensificación de los efectos antitumorales de la radioterapia (Chalmers, 2004). Además, proporcionan protección frente los efectos perjudiciales ejercidos por ciertas drogas anticancerígenas, las cuales causan estrés oxidativo y por consiguiente, sobreactivación de PARP (Tentori y col., 2005). Por otra parte, estos inhibidores ejercen efectos de protección frente a determinadas enfermedades agudas y crónicas en modelos de animales.

La mayoría de los inhibidores de PARP son activos en el centro catalítico del enzima y en general actúan como sustitutos del NAD⁺ de manera competitiva. En función de las condiciones del ensayo, muchos inhibidores pueden actuar como inhibidores mixtos, actuando como inhibidores competitivos en el lugar catalítico e inhibidores reversibles en el complejo enzima-sustrato. (Cosi y col., 2002). Los nuevos inhibidos son en su mayoría de tipo competitivo, sin embargo su selectividad por los distintos miembros de la familia está por determinar.

▲ Inhibidores clásicos.

La mayoría de los inhibidores descritos actúan sobre el dominio de unión a la nicotinamida, comportándose como inhibidores competitivos. Entre los clásicos, la nicotinamida, la 3-aminobenzamida y la benzamida han sido ampliamente utilizados por no presentar toxicidad *in vitro* y presentar una buena tolerancia *in vivo*. Estas herramientas han sido utilizadas para estudio del papel fisiológico del PARP y para conocer su utilidad como coadyuvantes en la quimio y radioterapia, a pesar de ser compuestos relativamente débiles y poco específicos, por lo que para conseguir un efecto adecuado se hace necesaria la administración de altas dosis (IC_{50} nicotinamida 210 μ M, IC_{50} benzamida 22 μ M, IC_{50} 3-AB = 33 μ M) (Banasik y col., 1992; Szabó y Dawson, 1998)). La búsqueda de inhibidores con más potencia condujo a las dihidroisoquinolinas, con valores de IC_{50} inferiores a 0.5 μ M (Suto y col., 1991).

La nicotinamida es un inhibidor débil que a concentraciones milimolares interfiere en la síntesis de NAD⁺ y sirve como sustrato para los enzimas metabólicos del NAD⁺. Pero la administración de este compuesto a nivel celular no siempre produce una acción inhibidora, con frecuencia estimula la ADP ribosilación (Bredehorst y col., 1980) e incluso actúa con scavenger de radicales libres en algunos modelos experimentales (Halliwell y col., 1985, Ledoux y col., 1988).

La benzamida presentada por Shall como inhibidor de PARP (Amstad y col., 1992) es un análogo a la nicotinamida, sin anillo de nitrógeno y con solubilidad limitada en agua debido a su estructura hidrofóbica. Para superar esta limitación se desarrollaron derivados con sustituyentes polares en la posición 3 del anillo. La presencia del grupo carbamilo en la molécula era esencial para tener actividad. La introducción de un anillo de nitrógeno adicional era bien tolerada y la actividad descendía considerablemente o incluso completamente tras la alquilación o la reducción del anillo de nitrógeno (Purnell y col., 1980). Estos nuevos compuestos mantenían la actividad inhibidora mejorando la solubilidad en agua. Se caracterizaron como inhibidores competitivos y 2 de ellos, 3-amino y 3 metoxibenzamida, con una K_i de menos de 2 μ M (Cosi y col., 2002). Desde

entonces estos compuestos han sido ampliamente utilizados para probar las funciones fisiológicas de PARP, añadiendo más información a la relación estructura-actividad y a la selectividad de los derivados de la benzamida.

La benzamida y 3-aminobenzamida en concentraciones cercanas a 5 mM inhiben el metabolismo de la glucosa y la síntesis de DNA en células lipoideas (Milam y col., 1984), inhiben débilmente las actividades de AMPc fosfodiesterasa, carboxipeptidasa A y quimotripsina e inhiben la nicotinamida N-metiltransferasa.

Estudios cuantitativos que comparan la actividad inhibidora de la benzamida y sus derivados contra PARP, mono(ADP-ribosa) transferasa y NAD⁺ glicohidrolasa *in vitro*, indicaban que estos compuestos inhiben PARP selectivamente en concentraciones micromolares. La benzamida era 3-4 ordenes de magnitud más potente como inhibidor que la mono ADP ribosa transferasa y la NAD⁺glicohidrolasa. Sin embargo, para la nicotinamida, 5-bromo-deoxiuridina o la teofilina se necesitaban concentraciones de 3 a 5 veces más altas para conseguir el mismo nivel de inhibición.

Las evidencias obtenidas a través de ratones y células K.O. PARP-1 son coherentes con los resultados obtenidos utilizando inhibidores tipo benzamida y refuerzan la idea de que la benzamida protege del daño celular a través de la inhibición selectiva de PARP-1 (Cosi y col., 2002).

A partir de los derivados 3 sustituidos de las benzamidas, Suto y colaboradores (Suto y col., 1991) desarrollaron una serie de análogos rígidos, las dihidroisoquinolinonas y demostraron que la orientación del grupo carbamilo en la conformación anti o sin era crucial en facilitar interacciones puente de hidrógeno entre el inhibidor y el dominio de unión al NAD⁺. Las dihidroisoquinolinonas sustituidas en 5 con el grupo carboxamida en posición anti en el lugar activo, demostraron gran potencia *in vitro* con IC₅₀ inferior a 0.5 µM. En esta línea se ha llegado a herramientas muy potentes en la ayuda a antitumorales como PD128763 60 veces más potente que la 3-AB (Sebolt-Leopold y Scavone, 1992).

La 1,5-dihidroxiisoquinolina demostró ser un agente más potente contra la neurotoxicidad mediada por NMDA-NO, en concordancia con los resultados *in vitro* que la perfilaban como un inhibidor más potente que la benzamida (Banasik y col., 1992). Sin embargo no se vió correspondencia *in vivo* en varios estudios, viendo incluso menos efecto protector contra neurotoxicidad inducida por MPTP (Cosi y col., 1996).

Los estudios desarrollados por Banasik (Banasik y col., 1992) evaluaron la influencia de 170 compuestos en la actividad de PARP ayudando a clarificar la relación estructura actividad: la presencia de un grupo carbamil NH₂ no sustituido es esencial para la actividad inhibidora, un grupo carbamil buen dador de electrones es importante para la unión del inhibidor al PARP a través del punto de unión al NAD⁺ y esta capacidad se puede aumentar por conjugación con un anillo aromático rico en electrones o un anillo lactámico o una imida. La orientación del grupo carbamilo es crucial para facilitar las uniones puente de hidrógeno entre inhibidor y dominio de unión de NAD⁺ (Suto y col., 1991, Li y col., 1992).

▲ Nuevos inhibidores de PARP.

Los descubrimientos anteriormente descritos y el mejor conocimiento del dominio catalítico del PARP (Ruf y col., 1996) han permitido el desarrollo de nuevos inhibidores de mayor potencia. Del grupo de isoquinolinas hay dos prototipos, la 3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxil]-1(2H)-isoquinolina (DPQ) y la 1,11b-dihidro-[2H]benzopirano[4,3,2-de]isoquinolin-3-ona (GPI-6150). Estos compuestos parecen ser útiles en tratamiento de patologías como el daño tisular, muerte cerebral, isquemia cerebrovascular, enfermedades neurodegenerativas, SIDA, diabetes o artritis. GPI-6150 ejerce un efecto protector significativo a una dosis de 20-40 mg/kg en casos de derrames, daño cerebral traumático, neurodegeneración, *shock* circulatorio, diabetes *mellitus* y varias enfermedades inflamatorias (LaPlaca y col., 2001; Mazzon y col., 2001; Mazzon y col., 2002a; Mazzon y col., 2002b; Feng y LeBlanc, 2002; Zhang, 2002). El primero pertenece a un grupo de compuestos que inhiben la actividad de PARP recombinante humano con IC₅₀ de 0.056 a

100 μM , el segundo es el prototipo de una serie de compuestos heterocíclicos con IC_{50} de 0.046 a 5 μM . (Takahashi y col., 1999).

N-(6-oxo-5,6-dihidrofenantridin-2-il)-2-(N,N-dimetilamino)acetamida (PJ34) es el prototipo de una clase de nuevas fenantridinonas sustituidas con gran potencia inhibidora (IC_{50} = 0.3-1 μM para inhibición de PARP en timocitos). Parecen beneficiosas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la producción de mediadores de la inflamación y la muerte celular. Recientemente se ha visto que PJ34 protege a las neuronas *in vitro* contra la deprivación de glucosa y oxígeno y también se ha visto la protección contra daño isquémico cerebral al administrar PJ34 intravenosa bolus antes de oclusión arterial (Abdelkarim y col., 2001). A una dosis de 3-30 mg/kg confiere protección en modelos *in vivo* de derrames, infarto de miocardio, *shock* circulatorio, diabetes, colitis, artritis, uveítis y fallo crónico en corazón (Jagtap y Szabó, 2005).

Los derivados 2-aril de 1H-benzimidazol-4-carboxamidas, son reconocidos como inhibidores útiles como coadyuvantes de agentes citotóxicos o radioterapia en terapia antitumoral. De hecho, hay constancia de desarrollo preclínico de 2-aril-1H-benzimidazol-4-carboxamida como agentes que modifican la resistencia a quimioterápicos en terapias tumorales (13th International Symposium on ADP ribosylation, 2001).

El NU-1085 (2-(4-hidroxifenil)benzimidazol-4-carboxamida) y el NU-1025 (8-hidroxi-2-metilquinazolin-4-(3H)ona) se ha visto que potencian la citotoxicidad de topotecan y temozolomida en líneas celulares tumorales humanas. (Delaney y col., 2000).

Las series de indoles con grupo lactámico tricíclicos son potentes inhibidores (concentraciones nanomolares) con propiedades físicas y características *in vivo* favorables. Estos nuevos compuesto son todos inhibidores de tipo mixto, actuando como inhibidores competitivos en el lugar de unión al NAD^+ y en el complejo NAD -enzima en un lugar diferente al de unión al NAD^+ (13th International Symposium on ADP ribosylation, 2001). La industria farmacéutica ha desarrollado derivados tricíclicos con K_i para inhibición de PARP de 0.7 a 1 nM, nuevos compuestos basados en ftalazinona con IC_{50} 30-100 nM para

PARP-1, nuevos derivados de ácido hidroxímico insaturado y nuevos derivados de bis-benzamidas. A pesar de que se ha mejorado la capacidad de inhibición de PARP a través de estos nuevos compuestos, muchos de los nuevos inhibidores presentan la limitación de escasa hidrosolubilidad haciendo su futura aplicación *in vivo* limitada.

Recientemente Li y colaboradores (Li y col., 2001) han descrito la síntesis de 5[H]-fenantridin-6-onas con una hidrosolubilidad aceptable y IC_{50} de 0.01 μ M.

Los nuevos derivados de isoindolinonas están en estudio, parecen apropiados para el tratamiento de daños tisulares relacionados con la inflamación y la reperfusión.

Nuevas piperazinas en fase de desarrollo parecen útiles en el tratamiento de desórdenes relacionados con inflamación, degeneración neuronal y cáncer.

▲ **Inhibidores de PARP de dedos de cinc.**

Propuestos por Kun y colaboradores (Bauer y col., 1990), estos inhibidores actúan selectivamente en uno de los dos dedos de cinc en el dominio de unión al DNA.

Son compuestos C-nitroso-sustituidos derivados de la oxidación de ligandos con grupos amino. Estos compuesto oxidan uno de los dedos de cinc del PARP, resultando en una inactivación de la enzima sin afectar a las uniones de la enzima a DNA. Algunos de estos compuestos como la 3-nitrosobenzamida, tienen actividad citostática e inducen apoptosis en células tumorales, además de inhibir infección por VIH-1 en linfocitos humanos (Rice y col., 1993). El compuesto iodo-nitrobenzamida (INO2BA) está bajo investigación por Octamer para el tratamiento del cáncer y del SIDA. Este compuesto ha sido probado *in vivo* en monos mostrando buena tolerancia y sin efectos tóxicos secundarios y ha sido aprobado por la FDA para la administración oral en Fase I en experimentos clínicos.

▲ Inhibidores selectivos de PARP-2.

Aunque existe una alta homología entre los dominios catalíticos de PARP-1 y PARP-2, y probablemente muchos inhibidores afectan a las dos enzimas, se están realizando progresos para desarrollar inhibidores más selectivos de las dos isoformas de PARP. Así, recientemente se ha desarrollado el compuesto FR261529, 2-(4-Clorofenil-) 5-quinoxalinacarboxamida), que es un inhibidor que protege *in vitro* frente a daño celular inducido por ROS (especies reactivas de oxígeno) y frente a daño dopaminérgico en neuronas inducido por METH (*Methamphetamine*) en un modelo *in vivo* de Parkinson (Iwashita y col., 2004), y es más potente para PARP-2 que para PARP-1 ($IC_{50} = 7 \mu\text{M}$, $IC_{50} = 33 \mu\text{M}$), indicando que la quinoxalinas y sus derivados serían la primera clase de inhibidores que tienen algún grado de selectividad para PARP-2. Posteriormente, han sido identificadas los derivados de las quinazolinonas y derivados de quinoxalinas como inhibidores potentes y selectivos de PARP-1 y PARP-2, respectivamente (Iwashita y col., 2005).

Tabla 3. Inhibidores de poli-ADP-ribosa polimerasas (Banasik y col., 1992, Cosi, 2002)

Compuesto	IC_{50} (μM)
Nicotinamida	210
Benzamida	22
3-AB	33
5-AIQ	12
NU1025	0.40
PD128763	<0.50
DPQ	1.90
TIQ-A	0.45
DIQ	0.39
GPI-6150	0.15
6(5H)-fenantridinona	0.30
2-nitro-6(5H)-fenantridinona	0.35
PJ34	0.02
4-amino-1,8-naftalimida	0.18

FUNCIONES BIOLÓGICAS DE PARP.

- **Detección de daño en el DNA y reparación.**

Tanto PARP-1 como PARP-2 desempeñan un papel clave en la reparación del DNA y el mantenimiento de la integridad genómica (Schreiber y col., 1995, Shall y de Murcia., 2000, Smulson y col., 2000, Bürkle y col., 2001, Ziegler y Oei, 2001, Schreiber y col., 2002, Ménissier de Murcia y col., 2003), si bien es cierto que con bajos niveles de daño en el DNA el PARP-1 actúa como un factor de supervivencia implicado en la detección de daño y reparación mientras que altos niveles de daño hacen que PARP-1 promueva la muerte celular (Bürkle 2001a). PARP-1 y PARP-2 son estimuladas por la presencia de roturas en el DNA que proceden de la rotura directa del esqueleto azúcar-fosfato o de la rotura de bases, las cuales son reparadas por los procesos de reparación de roturas de cadena sencilla (SSBR, *Single Strand Break Repair*) o de reparación por excisión de bases (BER, *Base Excision Repair*) respectivamente (Ame y col., 1999). Se ha demostrado que PARP-1 y PARP-2 pueden heteromodificarse y dimerizarse *in vitro* recíprocamente (Meder y col., 2005) y que interaccionan con las mismas proteínas nucleares implicadas en estos procesos de reparación, tales como XRCC1 (*X-Ray Repair Cross-Complementing 1*), β -polimerasa de DNA, y la DNA ligasa III (Schreiber y col., 2002), sugiriendo que ambas proteínas forman parte del mismo complejo de reparación del DNA.

Las células deficientes en PARP-2 o en PARP-1 son altamente sensibles a agentes genotóxicos y muestran un retraso en el reordenamiento SSB (Menissier de Murcia, 1997; Schreiber y col., 2002). Por tanto, la ausencia de PARP-2 es tan dramática como la de PARP-1 aunque la actividad de PARP-2 sea 10 veces menor que la de PARP-1 en respuesta al daño en el DNA. Esto se podría explicar o bien porque en ausencia de cualquiera de los dos PARPs no se forma el heterodímero PARP-1/PARP-2 necesario para la eficiencia del proceso de reparación, o bien porque intervienen separadas en pasos distintos del proceso de SSBR/BER. Esta última hipótesis, viene apoyada por el hecho de que, a diferencia de PARP-1, PARP-2 no es requerida para el reclutamiento de XRCC1 a los sitios del DNA dañados (Schreiber y col., 2002), además de que PARP-2 no reconoce roturas en el DNA

de cadena sencilla como PARP-1 sino que reconoce *gaps* o estructuras *flap*, probablemente por las diferencias en sus dominios de unión al DNA (Schreiber y col., 2006).

PARP-1 también está implicado en la reparación de daños de cadena doble (DSBR), mediante el sistema de reparación no homóloga. PARP-1 poli-ADP-ribosila la proteína de reparación DNA-PK regulando su funcionamiento (Chalmers y col., 2004). El saber si PARP-1, PARP-2 y PAR participan directamente en la reparación de DSBs es una cuestión abierta, aunque se especula que la descondensación rápida y local de la cromatina en DSBs (Roturas de cadena doble) podría ser atribuida a la producción de PAR mediada localmente por PARP-1 (Schreiber y col., 2006).

Otro mecanismo clave en la reparación, es la capacidad de PARP-1 de modificar transitoriamente a proteínas involucradas en la estructura de la cromatina, principalmente histonas y las proteínas HMG (*High Mobility Group*), produciendo el relajamiento y apertura de la cromatina y favoreciendo el acceso de determinadas proteínas implicadas en la reparación a los sitios del DNA dañados (D'Amours y col., 1999). Recientes estudios muestran como PARP-1 poli-ADP-ribosila preferentemente a la histona H1, mientras que PARP-2 modifica preferentemente a la histona H2B (Schreiber y col., 2004).

Por tanto, los pasos implicados en el proceso de reparación serían los siguientes: i) detección de la rotura de DNA por PARP-1; ii) traducción y amplificación de la señal del daño: la poli-ADP-ribosilación de las histonas H1 y H2B o la interacción selectiva de estas proteínas con PAR libre o unido a PARP contribuye a la relajación de la fibra de cromatina e incrementa el acceso de enzimas de reparación a las roturas del DNA; iii) reclutamiento de los factores SSBR/BER al sitio de la lesión; iv) la Polinucleótido kinasa (PNK), estimulada por XRCC1, convierte los extremos del DNA en grupos 5'-fosfato y 3'-hidroxilo. El tamaño del parche de reparación está controlado por PARP-2; v) la DNA polimerasa β estimulada por PARP-1 rellena el hueco; vi) el paso de ligación, que es llevado a cabo por la DNA ligasa III, cuya estabilidad es controlada por XRCC1.

- **Muerte celular.**

PARP ha sido implicado en los dos principales mecanismos de la muerte celular: apoptosis y necrosis, aunque la mayoría de estudios están referidos principalmente a PARP-1.

La apoptosis, también llamada muerte celular programada, es un proceso biológico que juega un papel esencial en el desarrollo precoz, la homeostasis celular, desórdenes neurodegenerativos y en cáncer. La apoptosis puede ocurrir en respuesta a estímulos tales como el daño genotóxico, la retirada de factores de crecimiento, o tras la activación de receptores específicos como CD95 o el receptor de TNF. Se caracteriza por cambios en la membrana plasmática (translocación de fosfatidilserina de su cara interna a la externa), reducción celular, condensación de la cromatina y fragmentación del DNA, hasta que, finalmente, la célula se fragmenta en pequeñas vesículas que son degradadas por los macrófagos circulantes sin llegar a ser una amenaza para los tejidos y órganos de alrededor (Oliver y col., 1999).

PARP-1 es uno de los primeros sustratos identificados de las caspasas (*cysteine aspartyl-specific proteases*), las principales ejecutoras de la apoptosis. Se encuentran constitutivamente expresadas en las células como pro-enzimas inactivas (zimógenos), y son activadas por roturas proteolíticas (Cryns y Yuan, 1998, Thornberry y Lazebnik, 1998). Durante la apoptosis, PARP-1 es cortada por las caspasas 3 y 7 en dos fragmentos de 89 y 24 kDa (Kaufmann y col., 1993, Tewari y col., 1995, Germain y col., 1999). Estas caspasas reconocen la secuencia DEVD que se encuentra en la secuencia de localización nuclear (Lazebnik y col., 1994), y rompen la enzima separando el dominio de unión al DNA del dominio catalítico, produciendo así su inactivación. Los fragmentos generados por la acción de las caspasas contribuyen a la inactivación de la enzima intacta, ya que inhiben su homodimerización y su unión al DNA (Kim y col., 2000a, b, D'Amours y col., 2001). Según estos resultados, la existencia de esta retroinhibición, sugiere que la rotura de PARP-1 es vital para el apropiado funcionamiento de la maquinaria apoptótica, preservando la energía celular necesaria para determinados pasos de la apoptosis que requieren ATP. Pero se han obtenido resultados algo contradictorios en ratones deficientes en PARP-1 ya que presentan patrones de desarrollo normal, lo que indicaría que PARP-1 no tiene un papel

activo en apoptosis (Wang y col., 1995). La rotura de PARP-1 mediada por caspasas está bien documentada, pero poco es sabido sobre la posible rotura de PARP-2. Recientemente, se ha visto que PARP-2 es cortada por la caspasa 8, considerada como una caspasa iniciadora, responsable principal de la vía extrínseca de apoptosis mediada por receptores de muerte situados en la membrana celular. En la apoptosis de neuronas inducida por isquemia, la caspasa-8 se transloca al núcleo y rompe a PARP-2 en la secuencia LQMD de forma similar a PARP-1, separando los dominios de unión al DNA y el catalítico e inactivando la enzima (Benchoua y col., 2002). Además, se ha visto que tras daño restaurado en el DNA, PARP-2 también es cortada por la caspasa-3 en la secuencia aminoacídica $^{58}\text{DNRD}^{61}$ dejándola inactiva, de manera que se evita la reparación innecesaria y se facilita la desintegración nuclear durante la apoptosis (Menissier de Murcia y col., 2003).

Datos recientes indican que PARP-1 también juega un papel central en la ruta de apoptosis mediada por AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) que es independiente de caspasas (Yu y col., 2002, Wang y col., 2003, Hong y col., 2004). La síntesis de PAR resultante de la activación de PARP-1 es necesaria para que AIF se transloque de la mitocondria al núcleo, donde induce la fragmentación a gran escala del DNA y la condensación de la cromatina en la periferia nuclear (Wang y col., 2002, Modjtahedi y col., 2006). El mecanismo exacto por el cual la activación de PARP dirige la liberación de AIF no ha sido descrito. Apenas se conoce la implicación de PARP-2 en esta ruta, pero hay indicios para pensar que la activación de PARP-2 no induce la translocación de AIF ya que en neuronas *Parp-1^{-/-}* no se ha detectado translocación de AIF (Yu y col., 2002).

La necrosis o muerte celular no programada, se diferencia de la apoptosis en la desintegración de la membrana plasmática, dejando escapar el contenido celular a los tejidos de su alrededor originando una respuesta inflamatoria. La concentración de NAD^+ y ATP celular son determinantes para que la muerte se produzca por uno u otro mecanismo, especialmente en células sometidas a estrés oxidativo (Virág y Szabó, 2002). En este sentido PARP-1, como consumidor de NAD^+ , ha sido descrito como un interruptor entre la apoptosis y la necrosis. De esta forma, el estrés oxidativo originado en diferentes patologías induce la sobreactivación de PARP-1 que produce la depleción de las reservas de NAD^+ y

ATP, dando lugar a la disfunción y necrosis celular. Este mecanismo de muerte celular ha sido asociado a diferentes patologías relacionadas con procesos inflamatorios e isquémicos (Szabó y Dawson, 1998b; Pieper y col., 1999b; Virág y Szabó, 2002).

Durante mucho tiempo, ha habido controversia sobre el papel de PARP en la señalización producida por el daño en el DNA, especialmente en la muerte celular inducida por el daño en el DNA. En 2002, Virág y Szabo propuso una teoría (Virág y Szabo, 2002) basada en el hecho de que las células que están expuestas a agentes que dañan el DNA pueden participar en tres rutas dependiendo de la intensidad del estímulo. En la primera ruta, PARP activado por estímulos moderadamente genotóxicos, facilita la reparación del DNA, al menos parcialmente por su interacción con las enzimas de reparación del DNA como XRCC1 y DNA-PK. Como resultado, el daño en el DNA es reparado y las células sobreviven. En la segunda ruta, un daño más severo del DNA induce muerte celular por apoptosis, eliminando las células con daño en el DNA. En la tercera ruta, la síntesis de PAR por PARP-1 en respuesta a un daño extenso en el DNA puede promover la muerte celular por necrosis, que se produce como resultado de una depleción de NAD⁺ y ATP celular y como consecuencia de un fallo energético en la célula (Decker y Muller 2002, Bouchard y col., 2003). Según esto, la inhibición farmacológica o genética de PARP en células sometidas a un daño moderado o severo dirige a las células hacia la segunda ruta. En el primer caso, esta inhibición suprime la reparación del DNA conduciendo a las células a morir por apoptosis vía p53, y en el segundo caso, preserva el ATP y las células mueren por apoptosis en lugar de por necrosis.

El por qué el PARP-1 escoge apoptosis o necrosis en respuesta a un estímulo genotóxico no está claro, aunque se cree que el tipo y la duración del estímulo junto con el tipo de célula influyen (Virag y col., 2005). Además el pool de ATP celular influye ya que la apoptosis depende de ATP, por tanto, aquellas células que se hayan quedado sin ATP por una activación de PARP-1 morirán por necrosis. Estudios recientes indican que el estado metabólico celular es un factor determinante en cómo los niveles de ATP son afectados por la activación del PARP-1 (Zong y col., 2004, Ying y col., 2005).

- **Modulación de la estructura de la cromatina.**

El PARP-1 y PAR regulan la estructura de la cromatina independientemente de la presencia o ausencia de daño en el DNA. Existen estudios que muestran la influencia de PAR en la regulación epigenética de la estructura de la cromatina y la expresión génica en condiciones fisiológicas en las que hay integridad en el DNA. (Slattery y col., 1983) Varios estudios soportan la idea de que PARP-1 facilita la condensación y descondensación de la cromatina dependiendo de la señal fisiológica. Por otra parte, dichos estudios demuestran que la descondensación y la activación transcripcional requieren de la presencia de PAR (Mi Young Kim y col., 2005). Parece que la apertura de la estructura de la cromatina ocurre en la rotura del ADN gracias a la retirada de las histonas tras su poliADPribosilación y tras su asociación no covalente con el PARP-1 poliADPribosilado (Poirier y col., 1982, Realini y col., 1992).

PARP-1 es fundamental en la organización de los dominios de la cromatina. En *D. megalogaster* se ha visto que PARP-1 es un factor esencial en la organización de la cromatina durante todo el ciclo vital (Tulin y col., 2002). Existe una cooperación entre PARP-1, PARG y la proteína SIR-2 que promueve el silencio de dominios específicos de cromosomas. Síntesis locales de PAR abren la cromatina de manera temprana facilitando el acceso de SIR2 a las histonas. PARG acude a reciclar las moléculas poliADPribosiladas y regulando la función de SIR-2, controlando la localización subcelular de SIR-2 (Tulin y col., 2006).

- **Control de la transcripción.**

El papel de PARP-1 y PAR en la regulación transcripcional de genes específicos se ha demostrado en diferentes contextos fisiológicos como ensayos de transcripción *in vitro*, ensayos de genes reporteros, RNAi y delección génica *in vivo* (D'Amours et al., 1999, Hassa y Hottinger, 2002, Kraus y Lis, 2003). A partir de esto estudios se conocen dos mecanismos a través de los que el PARP-1 regula la transcripción: i) la alteración de la estructuras de la cromatina a través de la modificación de histonas y proteína HMGs, en donde PARP-1

puede modificar mediante poli ADP-ribosilación proteínas nucleares que forman parte de la cromatina, generando una repulsión electrostática entre el DNA y las proteínas, de manera que la cromatina se relaja permitiendo el acceso del complejo de inicio de la transcripción al DNA, y ii) actuando como un activador o represor a través de la interacción física con factores de transcripción y/o uniéndose a secuencias reguladoras o promotoras de distintos genes (Schreiber y col., 2006). Determinados factores de transcripción como TFIIF, TBP (*TATAbox binding protein*), YY1, SP-1, NF- κ B, p53, TEF-1 y en menor medida CREB son sustratos de PARP-1 (Rawling y Álvarez-González, 1997; Oei y col., 1998; Malanga y col., 1998; Butler y Ordahl, 1999) pudiendo ser poli ADP-ribosilados modificando así su capacidad de unión al DNA. Además, se ha demostrado interacciones directas entre PARP-1 y algunos factores de transcripción como OCT-1, estabilizando y aumentando su unión al DNA (Nie y col., 1998), AP-1 (Andreone y col., 2003), AP-2 (Kannan y col., 1999), B-MYB (Cervellera, 2000), E2F-1 (Simbulan-Rosenthal y col., 1999b), y NF- κ B (Hassa y col., 2001), de manera que se une a ellos, aumentando la activación de estos factores. PARP-1, también puede regular la transcripción mediante la unión directa a ciertas secuencias promotoras de genes como Reg (Akiyama y col., 2000) y Cxcl1 (Nirodi y col., 2001).

Numerosos estudios han demostrado como PARP-1 tiene un efecto dual en la regulación de la transcripción, comportándose como un inhibidor o como un estimulador de la misma (Simbulan-Rosenthal y col., 2000, Ha y col., 2002, Chiarugi, 2002, Kraus y Lis, 2003, Carrillo y col., 2004).

La modulación de la transcripción de PARP-1 tiene generalmente efecto estimulante sobre estos factores y cofactores sin necesidad de actividad PARP, es el caso de la estimulación de NF- κ B (factor de transcripción que regula genes de respuesta inflamatoria e inmune) aparentemente en ausencia de actividad PARP (Hassa y col, 2003, Oliver y col, 1999). Por el contrario, la actividad PARP-1 es crucial en otros procesos de transcripción como el aumento de transcripción de los genes controlados por TEF1 en células musculares (Butler y col., 1999).

Cómo PARP-1 se puede activar en ausencia de rotura en DNA sigue siendo un punto a estudiar. Se sabe por ejemplo que se activa en neuronas tras movilización de calcio intracelular contribuyendo a la neuroprotección (Visochek y col., 2005). En *Aplysia californica* hay un aumento de actividad de PARP-1 durante el establecimiento de la memoria a largo plazo, posiblemente para favorecer la transcripción de los genes implicados en el aprendizaje (Cohen Armon y col., 2004). Estructuras de DNA especiales como burbujas, cruciformes, horquillas se consideran activadores potenciales (Lonskaya y col., 2005, Pion y col., 2005). Alternativamente modificaciones post-transcripcionales de PARP-1 pueden funcionar como inductores de actividad.

Otros miembros de la familia están relacionados con la regulación de la transcripción sin saber todavía si su actividad es necesaria. Es el caso del PARP-2 que interacciona con factor de transcripción del tiroides (TTF-1) y regula la expresión de la proteína B surfactante en pulmones (Maeda y col., 2006). TTF1 es un factor de transcripción que pertenece a la familia Nkx-2, que desempeña un papel crítico en la morfogénesis, diferenciación celular del epitelio respiratorio, y en la expresión génica en pulmón, regulando la expresión de genes que se expresan selectivamente en células del epitelio respiratorio, incluyendo los genes que codifican las proteínas surfactantes-A, B, C y D (Sftpa, Sftpb, Sftpc y Sftpd) (Whitsett y col., 1998). PARP-1 y PARP-2 muestran una similar capacidad de co-activación independiente de la actividad enzimática, interaccionando con TTF-1 para activar la expresión del gen Sftpb pero no modifica la expresión de Sftpa, Sftpc y Sftpd. Así, se demuestra que PARP-1 y PARP-2 poseen papeles potenciales de complementariedad en la transcripción génica del epitelio respiratorio.

- **El aparato mitótico.**

Se sabe que al menos 6 enzimas de la familia PARP tienen relación con varios componentes del aparato mitótico (Smith, 2001, Amé y col., 2004). PARP-1 y PARP-2 se localizan en los centrómeros (Earle y col., 2000, Saxena y col., 2002), mientras que PARP-1, PARP-3 y tankirasas están asociados a centrosomas (Smith and Delarge, 1999, Kaminker y col., 2001, Agustín y col., 2003, Kanai y col., 2004).

La presencia de los enzimas PARP y PARG en el aparato mitótico sugiere que la regulación del metabolismo de PAR interviene en el control de las funciones mitóticas. Soportando esta idea está el hecho de que la concentración de PAR en la célula aumenta dramáticamente en la metafase y la anafase-telofase mitótica (Bakondi y col., 2002). Chang y col (Chang y col., 2005) sugieren que esta alta concentración de PAR está implicada en el ensamblaje y estructura del huso mitótico, a pesar de no conocerse todavía el rol exacto.

- **Control de la división celular.**

Los centrómeros son los lugares de formación del cinetocoro y de sujeción de los microtúbulos que median la división fiel de las cromátidas hermanas durante la división celular mitótica (Choo, 1997). La localización subcelular de PARP-1 y PARP-2 en los centrómeros nos da una pista del posible papel fisiológico de la poli ADP-ribosilación en la regulación de la división celular. La primera observación importante fue que PARP-1 y PARP-2 se encuentran localizados en los centrómeros de mamíferos donde interactúan con las proteínas constitutivas del cinetocoro CENP-A, CENP-B y con la proteína facultativa de control del huso mitótico BUB3 durante la mitosis, y dicha interacción está asociada con la actividad del centrómero (Saxena y col., 2002a; Saxena y col., 2002b). Además, estas tres proteínas centroméricas son aceptores de polímeros de ADP-ribosa tras el daño en el DNA (Saxena y col., 2002a). Por tanto, la poli ADP-ribosilación de BUB3 tras γ -irradiación, implica a PARP-1 y a PARP-2 en el sistema de control del huso durante el daño en el DNA, y la detección de poli-ADP-ribosilación en al menos dos proteínas constitutivas centroméricas, CENP-A y CENP-B, sugiere un posible mecanismo mediante el cual PARP-1 y PARP-2 relajan las estructuras de la cromatina del centrómero altamente condensadas, permitiendo el acceso a las enzimas de reparación del DNA al sitio dañado.

Pero las localizaciones de PARP-1 y PARP-2 no se encuentran sincronizadas, mientras que los niveles de PARP-2 son evidentes en los centrómeros durante la prometafase, aumentan durante la metafase, disminuyen en la anafase y llegan a ser indetectables en la telofase, PARP-1 permanece en la cromatina condensada durante la metafase y la anafase temprana. Esta asociación dinámica de PARP-2 con los centrómeros es semejante a la descrita para las proteínas del control del ensamblaje del huso como son Z74W10, MAD1, MAD2,

BUB1, BUBR1 y BUB3 (Chen y col., 1996; Li y Benezra, 1996; Chen y col., 1998; Chen y col., 1999; Jablonski y col., 1998; Martínez-Exposito y col., 1999), mostrando patrones similares de distribución del ciclo celular. Asimismo, BUB3 y PARP-2, tienen una localización común en la región más externa del centrómero y ambas proteínas se acumulan en el centrómero tras el tratamiento de drogas que detienen las células en mitosis, tales como demecolcina y paclitaxel. Esto, plantea un papel de PARP-2 en la modulación de la actividad del control del huso, y por tanto en la transición de la metafase a la anafase (Saxena y col., 2002b).

Además, a diferencia de lo que ocurre en ratones *Parp-1^{-/-}*, la interrupción del gen *Parp-2* en ratones provoca una mis-segregación cromosómica dependiente de daño en el DNA que está asociada con el cinetocoro defectuoso, lo cual indica que PARP-2 tiene una función crucial como guardián de la integridad de la heterocromatina pericéntrica (Saxena y col., 2002b).

Todos estos resultados, por un lado, indican posibles papeles diversos de PARP-1 y PARP-2 en la modificación de la estructura y en las funciones reguladoras del centrómero en mamíferos, concretamente durante el daño del DNA inducido por γ - irradiación. Por otro lado, sugieren que PARP-1 y PARP-2 funcionan normalmente como heterodímeros y que sus papeles podrían ser redundantes. Lo cual podría explicar la ausencia de un grave fenotipo asociado al centrómero en ratones *Parp-1^{-/-}*.

La asociación PARP-1 y PARP-3 con centrosomas (Augustin y col., 2003) parece estar relacionada con la división celular aunque su significado todavía no está muy claro.

La poliADPribosilación de la tankirasa 1 parece ser crucial en la formación y mantenimiento de “spindle bipolarity”. La actividad PARP de la tankirasa-1 parece ser requerida para una separación normal del telómero antes de la anafase.

Todos estos estudios indican la importancia del PAR y los enzimas PARP en la regulación de la segregación cromosómica.

- **Telómeros.**

Los telómeros, regiones de DNA no codificantes ubicadas en los extremos de los cromosomas de eucariotas, consisten en secuencias de DNA altamente conservadas, repetidas en tandem (TTAGGG)_n (varias kb en humanos y cientos de kb en ratones) que protegen a los cromosomas y evitan que esas repeticiones sean reconocidas y procesadas como roturas del DNA (Blackburn, 2001; de Lange, 2002). Han sido descritas varias proteínas de unión a las secuencias repetidas que son esenciales para la función de los telómeros, tales como TRF1, un regulador negativo de la longitud telomérica (Van Steensel y de Lange, 1997), y TRF2, que está implicada en la formación de una estructura en forma de lazo llamada “T-loop” que impide su unión a los extremos de otros cromosomas, previniendo la fusión telomérica (van Steensel y col., 1998, Griffith y col., 1999). Los telómeros sufren pérdidas progresivas de sus secuencias repetitivas durante cada división celular, a menos que la telomerasa, una transcriptasa reversa especializada sintetiza las secuencias repetitivas de los telómeros, estabilizando la longitud de los mismos (de Lange, 2002).

Trabajos realizados en células derivadas de ratones *Parp-1^{-/-}* muestran un acortamiento en la longitud de los telómeros y una alta frecuencia de fusiones teloméricas, dando lugar a una inestabilidad cromosómica (d’Adda di Fagagna y col., 1999), mientras que estudios posteriores, obtienen una longitud telomérica normal y una baja frecuencia de fusiones teloméricas, probablemente como resultado del defecto de reparación del DNA asociado a la deficiencia de PARP-1 y no a una disfunción telomérica (Samper y col., 2001). Sin embargo, recientemente se ha visto que PARP-1, también interacciona con TRF2, regulando su actividad de unión al DNA telomérico (Gómez y col., 2006). Estos autores sugieren que tras daño en el DNA, PARP-1 sería activado y reclutado a los telómeros erosionados, donde catalizaría la poli ADP-ribosilación de TRF2, disociándola de los telómeros y permitiendo el acceso de proteínas de reparación del DNA al sitio dañado. Además, la pérdida de la función de PARP-1 conduce a una disfunción telomérica y anomalías cromosómicas en fibroblastos endoteliales murinos sometidos a agentes que producen daño en el DNA. Por tanto, PARP-1 estaría implicado en la protección de

telómeros erosionados mediante la regulación de TRF2, y por consiguiente, en la estabilidad telomérica.

La posible participación PARP-2 en el mantenimiento de la integridad genómica de los telómeros ha sido mostrada porque esta proteína interacciona físicamente con TRF2 con alta afinidad y regula negativamente su actividad de unión al DNA telomérico. Esta regulación es llevada a cabo a través de dos vías: i) por heteromodificación covalente de TRF2, en la que se produce una repulsión electrostática entre TRF2 y el DNA debido a los polímeros de ADP-ribosa cargados negativamente presentes en TRF2, y ii) unión no covalente del polímero de ADP-ribosa a TRF2, donde el polímero sintetizado por PARP-2 compite con el DNA telomérico por el sitio de unión a TRF2, liberando la proteína telomérica del DNA (Dantzer y col., 2004). La ausencia de PARP-2 en células derivadas de ratones *Parp-2^{-/-}* aunque no afecta ni a la longitud de los telómeros ni a su actividad, presentan una alta frecuencia de roturas espontáneas en los cromosomas y en las cromátidas, además de un incremento de terminaciones carentes de repeticiones T₂AG₃ (Dantzer y col., 2004). Por tanto, todos estos resultados sugieren un papel funcional de la actividad de PARP-2 en el mantenimiento de la integridad telomérica.

FISIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA DE PARP.

- **Respuesta inflamatoria.**

PARP-1 está implicado en la fisiopatología de la respuesta inflamatoria. Esto ha sido demostrado por la resistencia de ratones deficientes en PARP-1, así como ratones silvestres tratados con inhibidores farmacológicos en procesos inflamatorios, como la diabetes inducida por estreptocina, shock séptico inducido por LPS y daño por isquemia/reperfusión (Oliver y col., 1999, Burkat y col., 1999, Mabley y col., 2001, Virág y Szabó, 2002) mientras que ratones con depleción selectiva de la isoforma de 110 KDa PARG $\Delta 2-3\Delta 2-3$ muestran un aumento de susceptibilidad (Cortés y col., 2004).

PARP-1 está implicado a varios niveles. Primero, PARP-1 funciona como co-activador de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, dando lugar a la síntesis de mediadores pro-

inflamatorios (Hassa y col., 2003, Hassa y col., 2005). Ente ellos, la enzima inducible óxido nítrico sintetasa (iNOS) produce óxido nítrico y posteriormente, peroxinitrilos y radicales hidroxilos reactivos que, causan daño en el DNA de la célula diana. A continuación, el resultado de la activación de PARP-1 induce muerte celular independiente de caspasas, lo que implica la liberación de la flavoproteína AIF de la mitocondria (Yu y col., 2002, Modjtahedi y col., 2006) donde induce la fragmentación a gran escala del DNA y la condensación de la cromatina en la periferia nuclear (Wang y col., 2002, Modjtahedi y col., 2006). Por último, al no estar implicadas las caspasas en este proceso, tanto PARP-1 como PARP-2 quedarían intactas para ser activadas por los fragmentos de DNA, causando masivamente la síntesis de PAR, y depleción de NAD^+ y ATP y, en última instancia, la muerte celular (Yu y col., 2002). Una sobreactivación de PARP-1 similar que está asociada con la liberación de AIF, ha sido mostrado que tiene un importante papel en muerte celular de miocardio y neuronas, terminando en isquemia y reperfusión (Jagtap y Szabo, 2005). Los inhibidores de PARP o interrupción genética de PARP-1 o PARP-2 en ratones impiden estos efectos tóxicos (Jagtap y Szabo, 2005). Estas investigaciones indican que PARP y AIF serian potencialmente interesantes dianas terapéuticas en el tratamiento de muchos desordenes inflamatorios, neurológicos y cardiacos.

Muy poco se sabe sobre el papel de PARP-2 en la respuesta inflamatoria. Sólo dos estudios han mostrado que la inhibición de PARP-2 atenúa la inflamación, en un modelo de colitis crónica en el que se utiliza un oligonucleótido antisentido químicamente modificado denominado ISIS 110251 (Popoff y col., 2002), y en un modelo de isquemia cerebral focal utilizando ratones *Parp-2^{-/-}* (Kofler y col., 2006). La reducción selectiva de PARP-2 debido a ISI 110251 en el modelo de colitis crónica, produce una disminución de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y de la actividad de iNOS, atenuando la inflamación. Sin embargo, el mecanismo por el cual la deficiencia de PARP-2 proporciona protección frente a isquemia cerebral todavía no se conoce, pero se plantean tres hipótesis iniciales basadas en lo que ocurre con PARP-1 (Kofler y col., 2006): i) La depleción de NAD^+ y el consumo masivo de ATP, ha sido propuesto como el principal mecanismo por el cual la sobreactivación de PARP-1 después de una isquemia y reperfusión lleva a la célula a la depleción energética y la muerte celular (D'Amours y col., 1999, Endres y col., 1997). En células *Parp-2^{-/-}* la actividad de PARP total es sólo reducida en un 10-15%, y se cuestiona si

esta reducción tan pequeña puede tener suficiente efecto sobre el estado de energía de la célula. Después de una isquemia cerebral focal, los niveles de NAD^+ eran comparables en ratones $\text{Parp-1}^{-/-}$ o animales tratados con un inhibidor específico de PARP (Endres y col., 1997), sugiriendo que la depleción de PARP era debido principalmente a la activación de PARP-1, y no a las otras isoformas. Sin embargo, carecemos de la información de los niveles de NAD^+ después de estímulos genotóxicos en células $\text{Parp-2}^{-/-}$. ii) Recientemente, ha sido mostrado que la activación de PARP-1 causa la translocación de AIF y la activación de la ruta de apoptosis independiente de caspasas (Yu y col., 2002, Hong y col., 2004; Komjáti y col., 2004). La translocación de AIF no es detectable en neuronas corticales $\text{Parp-1}^{-/-}$ (Yu y col., 2002) sugiriendo que la activación de PARP-2 no induce la translocación de AIF. Sin embargo, no existen evidencias directas para descartar que la neuroprotección mediada por la delección PARP-2 implique la translocación de AIF. iii) El tercer mecanismo por el cual PARP-1 contribuye al daño celular o isquemia es la regulación positiva de genes pro-inflamatorios mediante la co-activación de NF- κ B (Hassa y Hottiger, 2002). A si mismo, un efecto anti-inflamatorio similar al que ocurre con el tratamiento con ISIS 110251, podría contribuir a la neuroprotección en ratones $\text{Parp-2}^{-/-}$. Sin embargo, otros estudios han puesto de manifiesto que los ratones $\text{Parp-2}^{-/-}$ muestran una respuesta inflamatoria asociada a la pancreatitis aguda similar a la encontrada en los ratones silvestres, mientras que los ratones $\text{Parp-1}^{-/-}$ muestran una respuesta inflamatoria reducida (Corral J. y col., 2005).

- **Carcinogénesis.**

La carcinogénesis es un proceso de múltiples pasos que implica aberraciones en una gran variedad de procesos celulares, incluido el mantenimiento genómico, el control del ciclo celular, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. (Mi Young Kim y col., 2005). PARP-1 y la poli-ADP-ribosilación han sido relacionados con todos estos procesos (Masutani y col., 2003).

A pesar de que los ratones $\text{Parp-1}^{-/-}$ no muestran propensión al desarrollo de tumores de forma espontánea, sí tienen un mayor índice de formación tumoral en modelos cancerosos transgénicos o inducidos químicamente (Masutani y col., 2005), como es el caso de ratones

tratados con agentes alquilantes (azoxymetano y N-nitrosobis(2-hidroxiopropil)amina) en los que se ha visto una mayor incidencia de tumores en colon e hígado que en ratones Parp-1^{+/+} (Tsutsumi y col., 2001, Nozaki y col., 2003). Aún así, la incidencia de tumores en respuesta a otros agentes que dañan el DNA no difiere entre ratones Parp-1^{+/+} y Parp-1^{-/-} (Masutani y col 2005), lo que sugiere que la naturaleza del daño en DNA dicta la contribución específica de PARP-1 en la prevención del cáncer.

Otros modelos de estudios en ratones sugieren importantes interacciones funcionales entre PARP-1 y otros factores de mantenimiento genómico en la prevención de carcinogénesis. Ratones Parp-1^{-/-} con inmunodeficiencia combinada severa tiene mayor incidencia de linfoma de células T (Morrison y col., 1997). La depleción simultánea de PARP-1 y p53 ha generado resultados dispares en 2 modelos de ratones. Tong y colaboradores (Tong y col., 2001) mostraron que la deficiencia en PARP-1 debida a la delección bialelica del exon 2 en el gen de PARP-1 acelera espontáneamente la formación de tumores en ratones p53^{-/-} en comparación con ratones Parp-1^{+/+} p53^{-/-}. En contraste, Conde y colaboradores (Conde y col., 2001) mostraron que la deficiencia en la delección bialélica del exon 4 del gen de Parp-1 aumenta la latencia en la formación de tumores de ratones p53^{-/-} en relación con ratones Parp-1^{+/+} p53^{-/-}. La razón de esta discordancia no está clara, pero parece estar relacionada con factores genéticos. Ambos estudios, están de acuerdo, sin embargo, que las células de PARP-1^{-/-} p53^{-/-} muestran más estabilidad genómica que PARP-1^{+/+} p53^{-/-}, apuntando a una cooperación entre p53 y PARP-1 en la integridad genómica.

De manera global, los datos indican que la función normal de PARP-1 es importante en la prevención del cáncer en respuesta a daño en DNA. Parece que PARP-1 y PARP-2 cooperan con otros factores de mantenimiento de genoma para mantener la integridad y prevenir la formación espontánea de tumores. (Mi Young Kim y col., 2005).

- **Edad.**

La acumulación de daños macromoleculares, especialmente daño en el genoma está relacionado con el proceso de envejecimiento. Por la implicación demostrada en la respuesta celular a varios daños en el genoma, PARP-1 y otros PARP han sido relacionados

con la edad y la longevidad (Burkle y Beneke, 2004, Burkle y col., 2005). El primer estudio a este respecto relacionaba la síntesis de PAR en células mononucleares sanguíneas de diferentes especies mamíferas con la longevidad de dichas especies (Grube y Burkle, 1992). Estudios posteriores hablan de la importancia de la interacción física y funcional de PARP-1 con WRN, un miembro de la familia de las RecQ helicasas que forma parte del complejo de replicación de DNA en respuesta al daño en DNA y en la prevención de defectos cromosómicos y cáncer (Lebel y col., 2003). Por otra parte, se ha visto que PARP-1 y otros PARP, como las tankirasas o el PARP-2, intervienen en la longitud y estructuras del telómero (Cook y col., 2002, Dantzer y col., 2004, Dynek y Smith, 2004; O'Connor y col., 2004), cuyo mantenimiento del telómero es importante para la prevención de la senescencia (ver apartado 5.7).

- **Función neuronal.**

PARP-1 ha sido relacionado con la patología neuronal y más recientemente con la función neuronal también. La mayoría de los estudios están centrados en la necrosis inducida por PARP-1 ante daños neuronales, incluyendo excitotoxicidad isquemia-reperusión y heridas traumáticas (Szabo y Dawson, 1998, Cole y Pérez Polo, 2004). Los daños neuronales liberan cantidades significativas de radicales libres derivados de oxígeno y nitrógeno (superoxido, radicales hidroxilo, oxido nitrico) particularmente neurotóxicos (Cole y Pérez Polo, 2004) que generan una reacción en cadena consistente en daño en DNA, activación de PARP-1 y necrosis. La inhibición química o depleción genética de PARP-1 en mamíferos bloquea estos efectos neurotóxicos (Mandir y col., 2000, Cole y Pérez Polo, 2004).

En contraste la mutación con pérdida de función de PARG en *Drosophila* promueve la neurodegeneración progresiva acortando la vida en animales adultos (Hanai y col., 2004). Esto sugiere la importancia de PAR en el mantenimiento de la función neuronal normal. Estudios recientes también sugieren la importancia de PARP-1 en el aprendizaje y memoria (Satchell y col., 2003, Cohen-Armon y col., 2004). Los autores especulan sobre la importancia de la poli-ADP-ribosilación de proteínas nucleares regula la expresión génica implicada en la memoria a largo plazo.

PARP Y QUIMIOTERAPIA.

En la década de los ochenta, la 3-aminobenzamida demostró potenciar los efectos citotóxicos del dimetilsulfato (Durkacz y col., 1980) en combinación con la bleomicina en carcinoma mamario de ascitos de Ehrlich (Kawamisu y col., 1982). Los inhibidores de PARP parecen potenciar la actividad antiproliferativa de la temozolomida, las radiaciones ionizantes, el irinotecan o el topotecan, tanto en cultivos de células humanas como en xenotrasplante en ratones (Curtin NJ, 2005). Tras varias décadas de desarrollo, se ha llegado a inhibidores más potentes y con propiedades farmacocinéticas más favorables, como el AG14361 y su derivado AG014669, actualmente en fase II de ensayos clínicos con la temozolomida para tratamiento de melanomas malignos (Calabrese y col., 2004).

La potenciación de los efectos citotóxicos de los anticancerígenos por inhibición farmacológica de PARP-1 se observa igualmente en las células Parp-1^{-/-} (Schreiber y col 2006). Aún así, queda por dilucidar hasta qué punto la inhibición de otros PARPs contribuye a los efectos mencionados (Curtin NJ, 2005). En este sentido, nuevos desarrollos apuntan a inhibidores específicos de PARP-5 como buenas dianas anticancerígenas por su acción en la función de la telomerasa (Seimiya y col., 2005).

Los inhibidores de PARP muestran una gran potencia y selectividad en la muerte de células deficientes en BRCA1 o BRCA2, relacionadas con el cáncer de mama (Farmer y col., 2005, Bryant y col., 2005). Asimismo la inhibición de PARP sensibiliza a las células no neoplásicas deficientes en BRCA-2, lo que permite pensar en los inhibidores de PARP como un potencial tratamiento profiláctico en mujeres heterocigóticas para el gen BRCA2 (Hay y col., 2005).

Los inhibidores de PARG no han sido estudiados en profundidad en combinación con agentes antineoplásicos. Existe una primera aproximación, la combinación de (N-bis-(3-fenil-propil)-9-oxo-fluoreno-2,7-diamida) con temozolomida para el tratamiento de cáncer resistente a este último fármaco (Tentori y col., 2005). Por tanto, PARG se perfila como una nueva diana en quimioterapia.

Por otra parte, se ha visto que ratas con dieta deficiente en niacina presentan valores de NAD⁺ en médula ósea claramente disminuidos, con la consiguiente reducción de poli-ADP-ribosa (Kirkland, 2003). Dichos animales presentan alta sensibilidad a la etilnitrosourea, particularmente reflejada en la inducción de leucemias.

En contraste, ratas con altos niveles de niacina o nicotinamida en la dieta incrementan el NAD⁺ y los niveles de poli-ADP-ribosa en ratas expuestas y no expuestas a etilnitrosourea, con la particularidad de que en el segundo caso, la inducción de cáncer por etilnitrosourea es más lenta (Kirkland, 2003).

A la vista de los resultados y ya que el NAD⁺ interviene en varios procesos fisiológicos, es posible que los efectos preventivos de la niacina se deban a su influencia en las enzimas de la ADP-ribosilación y de otras reacciones dependientes de NAD⁺.

MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP.

Se emplean métodos indirectos que, basándose en la cantidad de producto sintetizado o de sustrato consumido, permiten obtener una estimación de la actividad enzimática de PARP.

La síntesis de PAR se puede determinar por *western blot* (Scheiber y col., 2002), o por inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos específicos anti-PAR. Estas técnicas son útiles para la monitorización cualitativa o semicuantitativa *in situ* de diferencias significativas en la actividad enzimática (Grube y col., 1991). Para estudios cuantitativos se recurre a la determinación de la incorporación de sustrato. Para ello se emplea NAD⁺ marcado, bien con un radioisótopo como tritio (Grube y col., 1991, Muiras y col., 1998) o fósforo-32 (www.trevigen.com) o bien con biotina (Zhang y col., 1993). En ambos casos el PARP activado transforma el NAD en nicotinamida y ADP-ribosa marcada que se polimeriza y se une a proteínas. En el caso de muestras radiactivas, la cuantificación de la incorporación de polímero a las proteínas celulares se hará en centelleo líquido y en el caso de la biotina, el producto se detecta con estreptavidina-peroxidasa.

El método basado en NAD⁺ marcado con tritio se describió por primera vez por Althaus y col, en el estudio de la repercusión del metilsulfonato y la luz ultravioleta en la actividad PARP de hepatocitos murinos (Althaus y col., 1982). Posteriormente se ha aplicado en otros estudios; daño celular por oxidación en macrófagos murinos y linfocitos humanos (Schraufstatter y col., 1986), daño celular por peroxinitrito en macrófagos y miocitos murinos (Szabó y col., 1996), daño celular por peroxinitrito en timocitos (Virág y col., 1998) o relación longevidad-actividad de PARP (Muiras y col., 1998), en todos ellos, el método parece adecuado para la determinación de la actividad enzimática de PARP.

Detección de eventos radiactivos. El centelleo líquido.

En el año 1896 H Becquerel, estudiando la fluorescencia y los rayos X, descubre la radiactividad natural. A partir de ahí, el matrimonio Curie centra sus investigaciones en la búsqueda de nuevas sustancias radiactivas, aislando el polonio a partir de la pechblenda. Hoy se conocen aproximadamente 1850 núclidos de los cuales, únicamente 280 son estables. Aunque existen radionúclidos de origen natural como ²³⁵U, ²³²Th o ¹⁴C, la mayoría tienen un origen artificial, generándose a partir del bombardeo de núcleos estables con partículas como neutrones, protones, deuterones o partículas alfa.

La utilización de radioisótopos no sólo tiene una aplicación, más que reconocida, en la clínica diaria, sino también en la investigación. Numerosos radioisótopos han sido ampliamente utilizados en el estudio de rutas metabólicas, biodistribución o farmacocinética.

La detección y cuantificación de las sustancias radiactivas se basa en la interacción de la radiación ionizante con los medios materiales, que tiene como consecuencia una deposición parcial o total de su energía en el medio, originando procesos de excitación, ionización o calor en la mayor parte de sustancias. A lo largo de los años, y en paralelo con el desarrollo científico y tecnológico se han implementado diversos sistemas de detección aplicados a la medicina, la industria química o la investigación básica, como en el caso de los detectores de centelleo líquido.

El contaje por centelleo líquido es una técnica analítica consistente en la incorporación uniforme de un analito radiomarcado a un medio líquido capaz de convertir la energía cinética de las emisiones nucleares en luz. Su desarrollo comienza en los años cincuenta cuando Kallman (Kalman H, 1950) y Reynolds (Reynolds G T y col., 1950), de forma independiente, describen el uso de un tubo fotomultiplicador para el recuento de emisores radiactivos beta de baja energía en una matriz llamada disolución de centelleo. Actualmente es la técnica más extendida para la medida de estos radioisótopos así como para medir emisiones de rayos X débiles, partículas alfa e incluso gamma de baja energía.

El detector. Fundamento del funcionamiento.

Un contador de centelleo líquido se compone de dos tubos fotomultiplicadores enfrentados entre sí y separados por un espacio en el que irá la muestra a analizar. Los eventos detectados en coincidencia temporal por ambos fotomultiplicadores son procesados y transformados en cpm ó dpm.

Previamente a la medición, la muestra debe ser procesada en el interior de un vial con un líquido centelleador. En general, el líquido centelleador está compuesto de un disolvente y dos o más solutos centelleadores. La función del disolvente es, además de disolver los solutos centelleadores, facilitar la distribución homogénea de la muestra en el centelleador y transmitir su energía de excitación al soluto. Los solutos transforman la energía en luz, con longitud de onda adaptada a la sensibilidad del fotomultiplicador.

El elemento radiactivo de la muestra se desintegra emitiendo una partícula beta negativa que transfiere su energía cinética a la solución de centelleo, excitando sus moléculas. Dichas moléculas emiten luz para desexcitarse y volver a su estado de reposo. Esta luz llega al fotocátodo y se traduce en electrones que por efecto del tubo fotomultiplicador amplifican la señal eléctrica de origen, para, finalmente, convertirse en una señal digital.

Consideraciones en el análisis radioisotópico.

- **Quench o extinción.**

Se trata de una reducción en la eficiencia de detección que se refleja no sólo en una disminución en la eficiencia de recuento sino también en una degradación del espectro hacia zonas de bajas energías. Se distinguen tres tipos de quench, el fotónico, basado en la pérdida de energía por transferencia incompleta de la misma de las partículas beta a las moléculas de solvente, el químico, debido a factores como el pH o la presencia de moléculas que interfieren en el proceso, y el óptico que produce atenuación en los fotones generados. La extinción química absorbe las partículas beta antes de transformarse en fotones mientras que el óptico, actúa sobre los fotones en el medio.

Debido a la trascendencia de este fenómeno en el análisis de una muestra, se hace necesaria su corrección, normalmente mediante el método de patrón externo, a través de una fuente gamma externa incluida en el propio contador.

- **Procesamiento de las muestras y elección de cóctel de centelleo.**

Las muestras se combinan con las soluciones centelleadoras según la composición, el estado y la polaridad de la muestra (Simon R Cherry y col., 2003). En ocasiones las muestras marcadas no son líquidas o presentan una solubilidad limitada, incluso pueden estar depositadas en papel de filtro que se resuspende en el cóctel para el contaje. Las posibles limitaciones de manipulación y procesamiento de las muestras se superan con la gran variedad de cócteles de centelleo existentes en el mercado, clasificados en dos grandes grupos: los cócteles emulsificantes, también conocidos como acuosos y los orgánicos o lipofílicos. Los disolventes tradicionales como el tolueno y el xileno han dado paso a nuevas generaciones de disolventes como el diisopropilnaftaleno, el fenilxilitano o el 2,5-difeniloxazola que permite el recuento de muestras acuosas con alta eficiencia de contaje.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Numerosos estudios implican a PARP en diversos procesos patológicos, como el daño por isquemia-reperfusión, el shock séptico, cáncer o enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis o la esclerosis múltiple. Estudios preclínicos muestran que la modulación farmacológica de la actividad de PARP es una herramienta útil como adyuvante en el tratamiento de células tumorales con diferentes grados de sensibilidad a los antineoplásicos de unión al DNA. Actualmente se están desarrollando ensayos clínicos para valorar la sinergia entre inhibidores de PARP y antineoplásicos en ciertos tumores. El estudio del grado de activación del enzima en estos y otros procesos ayudaría a conocer en mayor profundidad no sólo su comportamiento, sino los mecanismos fisiopatológicos en los que está implicado, contribuyendo así al desarrollo de futuras terapias.

Los objetivos de este trabajo son:

1. Optimización de un método de medida radioisotópico cuantitativo que permita determinar *in vitro* la actividad enzimática de PARP tanto en situaciones basales como de estimulación o inhibición.
2. Determinación, mediante dicho procedimiento, de la actividad enzimática de PARP en células del sistema inmune de ratones tanto normales como modificados genéticamente para PARP-1 ó PARP-2.
3. Estudiar el grado de activación de PARP en linfocitos T humanos, primarios y procedentes de una línea celular T (Jurkat), en presencia de estimuladores e inhibidores de la actividad enzimática de PARP.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. AISLAMIENTO DE POBLACIONES CELULARES DE RATÓN.

1.1. Ratones.

Se utilizaron ratones procedentes de Estrasburgo, Francia (cortesía del Dr. de Murcia), que tienen inactivado mediante recombinación homóloga el gen *Parp-1* (**Parp-1^{-/-}**) (Ménissier-de Murcia y col.,1997), y ratones que tienen inactivado el gen *Parp-2* (**Parp-2^{-/-}**) (Ménissier-de Murcia y col., 2003). Los ratones recibidos son de la cepa 129Sv x C57BL/6. Los ratones *Parp-1^{-/-}* se han cruzado en el laboratorio del Dr. Yélamos con ratones C57BL/6J, de forma que la descendencia al completo es heterocigota para *Parp-1* (*Parp-1^{+/-}*), estos ratones se cruzan entre ellos (evitando cosanguinidad) y el 25% de la descendencia aproximadamente es *Parp-1^{-/-}*. Esta camada, denominada F1, se vuelve a cruzar con ratones C57BL/6J (*Parp-1^{+/+}*) repitiendo los cruces anteriormente descritos, hasta llegar a la camada F5, y a partir de esta se considera que los ratones *Parp-1^{-/-}* están en un fondo genético C57BL/6J. El mismo proceso se ha realizado con los ratones *Parp-2^{-/-}*. De esta forma, todos los ratones utilizados en estos experimentos se encuentran en fondo genético C57BL/6J. Todos los ratones fueron genotipados y suministrados por la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

1.2. Obtención de timocitos.

Los timocitos se obtuvieron de timos procedentes de ratones de edad comprendida entre 8 y 10 semanas. Se extrajo el timo de los ratones, previo sacrificio de los mismos en atmósfera de CO₂, y se procedió a su disgregación, con el émbolo de una jeringuilla, sobre tamiz de 100 µm de tamaño de malla (BD Biosciences, Bedford, USA) ajustado a la boca de un tubo de 50 ml (BD Biosciences), mantenido en hielo, hasta conseguir una suspensión celular en 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640 frío (BioWhittaker, Veviers, Bélgica). La suspensión celular se hizo pasar por una pipeta Pasteur provista de filtro para retener agregados celulares y a continuación se centrifugó a 500 x g, durante 5 minutos, a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5818 (Eppendorf GA, Hamburgo, Alemania) para eliminar el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en disolución fría tampón

fosfato (PBS) (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, Francia) y se le efectuó recuento celular. Se mantuvo en hielo hasta su utilización.

1.3. Obtención de esplenocitos totales.

Los esplenocitos se obtuvieron de bazos procedentes de ratones de edad comprendida entre 8 y 10 semanas. Se extrajo el bazo de los ratones, previo sacrificio de los mismos en atmósfera de CO₂, y se procedió a su disgregación, con el émbolo de una jeringuilla, sobre un tamiz de 100 µm de tamaño de malla (BD Biosciences) ajustado a la boca de un tubo de 50 ml (BD Biosciences), mantenido en hielo, hasta conseguir una suspensión celular en 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640 frío (BioWhittaker). Tras la centrifugación (Eppendorf 5810) a 500 x g, 5 minutos a 4° C y eliminación del sobrenadante, se procedió a lisar los hematíes, resuspendiendo el botón celular en 1 ml de tampón de lisis (ACK, BioWhittaker), durante 3 minutos, en hielo. Seguidamente, se resuspendió el botón celular en 9 ml de una disolución fría tampón fosfato (PBS) (Biomérieux) para restablecer la osmolaridad y se hizo pasar por una pipeta Pasteur provista de filtro de fibra de nylon para retener agregados celulares. A continuación, se realizó el recuento celular y se mantuvieron las muestras en hielo hasta su utilización.

1.4. Aislamiento de linfocitos T a partir de esplenocitos totales.

Para el aislamiento de linfocitos T se recurrió a la utilización del *kit* “Pan T cell Isolation Kit” (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se tomaron 25x10⁶ células de la anterior suspensión celular de esplenocitos totales. Una vez centrifugada la muestra a 500 x g, a 4°C durante 10 minutos (Eppendorf 5810) se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 110 µl de PBS-S (PBS1x/SBF 0.5%/EDTA 2mM) para aislamiento de linfocitos T. A continuación, se añadió a la suspensión celular, mantenida a 4°C, 25 µl de cóctel de anticuerpos biotinilados (anti-CD11b/Mac-1 (rat IgG2b), anti-CD45R/B220 (rat IgG2a), anti-DX5 (rat IgM) y anti-TER-119 (rat IgG2b)) agitando la mezcla. Tras 10 minutos de incubación se añadieron 75µl de PBS-S y 50 µl de *Anti-Biotin Micro Beads* (bolas magnéticas conjugadas con un anticuerpo monoclonal (Bio3-18E7.2, IgG1 de ratón) anti-biotina) prolongando la

misma 15 minutos adicionales. A continuación, se lavó la suspensión anterior dos veces, con un volumen de PBS-S, 10-20 veces el inicial, y se centrifugó a 500 x g, a 4°C, durante 10 minutos, para eliminar el sobrenadante. Se resuspendió el botón celular en 500 µl de PBS-S y se pasó por columna MS (Miltenyi Biotec) colocada sobre un separador magnético MACS (Miltenyi Biotec) para recoger el volumen eluido en un criotubo (fracción de células no marcadas) que representa la fracción de células T. Se volvió a eluir la columna con 500 µl de PBS-S, 3 veces más, recogiendo el volumen eluido. Todos los reactivos utilizados durante la purificación estaban a 4°C y las células constantemente en hielo. El grado de pureza de las células obtenidas fue, en todos los casos, superior al 96% determinada por citometría de flujo mediante marcadores propios de los linfocitos T.

1.5 Aislamiento de linfocitos B a partir de esplenocitos totales.

Para el aislamiento de linfocitos B a partir de esplenocitos totales se recurrió a la utilización de anticuerpos monoclonales específicos acoplados a bolas magnéticas. Se tomaron 25×10^6 células de la suspensión celular de esplenocitos totales. Una vez centrifugada la muestra 5 minutos, a 4°C y 500 x g (Eppendorf 5810) se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular con los anticuerpos anti-linfocitos B (Imag anti-mouse CD 45R/B220 particles DM (RA3-6B2) de BD Biosciences), en la proporción de 50 µl de anticuerpos por 10×10^6 células. Tras incubación a 4°C durante 30 minutos, se añadieron 500 µl de buffer DPBS-S (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma, Sant Louis, Missouri, USA) frío por cada 10×10^6 células. Seguidamente, las muestras se pusieron en contacto con el imán durante 6 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se aspiró el sobrenadante, se hicieron tres lavados con 1 ml de DPBS-S y, tras el último, se resuspendieron las células en 1 ml de DPBS-S frío. A continuación se realizó el recuento de las mismas en hemocitómetro de Neubauer y se mantuvo la suspensión en hielo hasta su utilización.

2. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA.

2.1. Aislamiento de células mononucleares.

Las células mononucleares de sangre periférica humana se aislaron a partir de sangre venosa heparinizada procedente de donantes adultos y sanos, mediante un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Para ello, unos 20 ml de sangre de cada extracción, fueron diluidos con suero salino (NaCl al 0,9 %) (B Braun, Melsungen, Alemania) y posteriormente, la sangre fue añadida sobre un volumen de ficoll (en proporción 1:2), densidad 1.077 g/ml, en un tubo Falcon de fondo cónico (Becton Dickinson). Después de una centrifugación a 500 x g en una centrífuga Eppendorf 5810 (Eppendorf) (sin aceleración ni frenado), durante 30 minutos, a temperatura ambiente, se obtuvieron cinco capas: la inferior que contenía los hematíes, sobre ella una capa blanca de leucocitos polimorfonucleares, la capa de ficoll, un anillo blanco de células mononucleares y el plasma. La suspensión mononuclear fue recogida cuidadosamente con una pipeta Pasteur de plástico (Startdted) y posteriormente, se lavó con 10 ml de medio RPMI 1640 (BioWhittaker), centrifugando a 450 x g durante 5 minutos. Se repitieron dos lavados más y finalmente, el sedimento celular fue resuspendido en 2 ml de medio RPMI completo.

2.2. Purificación de linfocitos T humanos.

La purificación de linfocitos se efectuó por un método de separación de linfocitos T y B, que utiliza la observación empírica consistente en que los linfocitos B tienen la propiedad de adherirse a la fibra de nylon, mientras que los linfocitos T no presentan dicha propiedad (Danilovs J et al., 1980; Darke C and Dyer P, 1983).

Previamente al aislamiento de células mononucleares, se procedió a la preparación de la columna de filtración y para ello, 300 mg de fibra de nylon (Fluka, Buchs, Suiza) se colocaron en una jeringa de 10 ml, procurando que la columna quedase bien desilachada y vaporosa (esta cantidad era suficiente para la separación de 40 millones de células en 1 ml). Posteriormente, la fibra se lavó alternativamente con 10 ml de HCl (Merk, Darmstadt, Alemania) 0.2 N y 10 ml de agua destilada, vertiendo el líquido a chorro a través de la jeringa. Esta operación se repitió cinco veces hasta terminar con agua destilada.

Seguidamente, la columna fue aclarada con 50 ml de medio RPMI y posteriormente con 10 ml de RPMI más suero de ternera fetal (Gibco, Grand Island, NY, USA) al 40 %. Finalmente, se hizo un último lavado con medio RPMI incompleto, seguidamente se rellenó hasta que el medio superó un poco el nivel de la fibra, se sellaron los extremos con papel Parafilm y se incubó a 37 °C durante 10 minutos, evitando el reseque o contaminación de la columna.

Una vez preparada la columna, se eliminó el exceso de medio presionando la jeringa con el embolo hasta 2,5 ml, se selló de nuevo el extremo inferior, se añadió la suspensión de linfocitos y se tapó el extremo superior para la incubación de la columna a 37 °, durante 30 minutos.

Finalmente, se recuperaron las células no adherentes (principalmente linfocitos T), manteniendo la columna vertical y pasando 10 ml de medio RPMI incompleto atemperado. El grado de pureza de las células obtenidas se analizó mediante citometría de flujo tras la tinción con anti-CD4-PE y anti-CD8-FITC, obteniendo una pureza del 80 % de las células positivas para estos marcadores propios de linfocitos T.

2.3. Células Jurkat.

La línea celular Jurkat, línea tumoral de linfocitos T humanos, procedente de la colección de cultivos americanos (ATCC, Manassas, VA), fue cultivada en medio RPMI completo, en un incubador (Forma Scientific) a 37 °C y con una atmósfera del 5 % de CO₂. Las células fueron expandidas y mantenidas en frascos de cultivo de 175 cm² (Becton Dickinson), en crecimiento exponencial de 3 x 10⁵ células/ml de medio, evitando su sobre crecimiento. El día previo a la realización de experimentos de activación, las células fueron mantenidas en medio RPMI completo con FCS al 1%, reduciendo en lo posible, la activación de las rutas de señalización.

3. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD Y RECUENTO CELULAR.

Se tomaron muestras de la suspensión celular para comprobar al microscopio (Olympus CX 40, Olympus Optical Co Ltd, Tokio, Japón) la viabilidad celular mediante tinción con azul Tripán (Sigma) Las células vivas se reconocen por su evidente refringencia, conservan íntegra su membrana externa, mientras que si la membrana está dañada, el colorante se introduce en el citoplasma y se tiñe de color azul.

La concentración celular se calculó mediante recuento en hemocitómetro de Neubauer.

4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP.

El daño o la rotura en las cadenas de ADN induce la activación de PARP, que cataliza la adición de ADP-ribosa a determinadas proteínas nucleares utilizando NAD⁺ intracelular como sustrato. Se ha determinado la actividad enzimática de PARP en muestras celulares a partir del consumo de NAD⁺ en situación basal (actividad enzimática de PARP **endógena**), en presencia de agentes que provocan activación celular y agentes que dañan el ADN (actividad enzimática de PARP **inducida**), en presencia o no de inhibidores de PARP-1.

4.1. Activación celular con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.

Para la activación con anti-CD3 y anti-CD28, fijamos, previamente, los anticuerpos en pocillo de placa de cultivo de seis pocillos (Becton Dickinson). Se cubrió toda la superficie de un pocillo con 1.5 ml de tampón tris-ClH, 0.1 M, pH=8.2, de un segundo pocillo con 1.5 ml de disolución de anti-CD3 a una concentración de 5 µg/ml en tampón tris-ClH 0.1 M pH=8.2, y de un tercero con 1.5 ml de disolución de anti-CD3 y anti-CD28 en tampón tris-ClH 0.1 M pH=8.2, a una concentración de 5 µg/ml cada uno de ellos. Se incubaron durante dos horas a 37°C, se aspiraron los pocillos y se lavaron con DBPS (Sigma) quedando el anticuerpo pegado a la placa.

A continuación se añadió una alícuota, con 3×10^6 células de la suspensión de linfocitos T procedentes del bazo de ratón a estudiar en medio RPMI-S (BioWhittaker), a cada uno de los tres pocillos anteriores. Uno como muestra de referencia, el segundo como muestra

activada con anti-CD3 y el tercero como muestra activada con anti-CD3+anti-CD28. Previa agitación en pocillo, se incubó la placa a 37°C y 5% de CO₂, durante el tiempo prefijado en cada caso (Figura 3).

Finalizada la incubación, se aspiraron las células de cada pocillo, se pasaron a tubos eppendorf de 1.5 ml mantenidos en frío y se centrifugaron a 500 x g, a 4°C, durante 5 minutos. Una vez aspirado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón DPBS-S (Sigma) y se mantuvieron a 4°C. Se reservaron 50 µl para recuento celular en cámara Neubauer.

2 horas 37 °C		t (prefijado) 37 °C	
Pocillo 1	tampón	3x10 ⁶ células	referencia
Pocillo 2	anti-CD3	3x10 ⁶ células	activadas
Pocillo 3	anti-CD3+anti-CD28	3x10 ⁶ células	activadas

Figura 3. Activación en pocillo de placa de linfocitos T de bazo de ratón con anti-CD3 y con anti-CD3 y anti-CD28, a 37 °C y 5% de CO₂, a tiempos de incubación variables.

4.2. Activación celular con Ionomicina y PMA.

En pocillo de placa de cultivo de seis pocillos (Becton Dickinson), se incubó una muestra celular conteniendo 10⁶ células en un mililitro de medio RPMI (BioWhittaker), a 37°C durante 120 minutos, como referencia de la actividad enzimática PARP en estas condiciones. En paralelo, se incubaron en pocillo a 37°C muestras semejantes a las que se añadió posteriormente 12-miristato, 13-acetato de forbol (PMA, Sigma) e Ionomicina (en forma de sal cálcica, Sigma), a una concentración final en pocillo de 10 µg/ml y 1 mg/ml

respectivamente. La adición se efectuó a los 60 minutos del inicio de la incubación (60 minutos de activación), a los 90 minutos del inicio de la incubación (30 minutos de activación) y a los 105 minutos del inicio de la incubación (15 minutos de activación), tal como se representa en la figura 4. Como medida de la actividad inespecífica de PARP en estas condiciones, tanto de la muestra de referencia como de las muestras activadas con PMA + Isonomicina, duplicados de cada una de ellas se sometieron al proceso descrito pero en presencia de inhibidores de la actividad de PARP a la concentración adecuada del mismo (Figura 4).

Finalizada la incubación, se aspiraron las células de cada pocillo, se pasaron a tubos de ensayo mantenidos en frío y se centrifugaron a 500 x g, a 4°C, durante 5 minutos. Una vez aspirado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón DPBS-S y se mantuvieron a 4°C. Se reservaron 50 µl para recuento celular en cámara Neubauer.

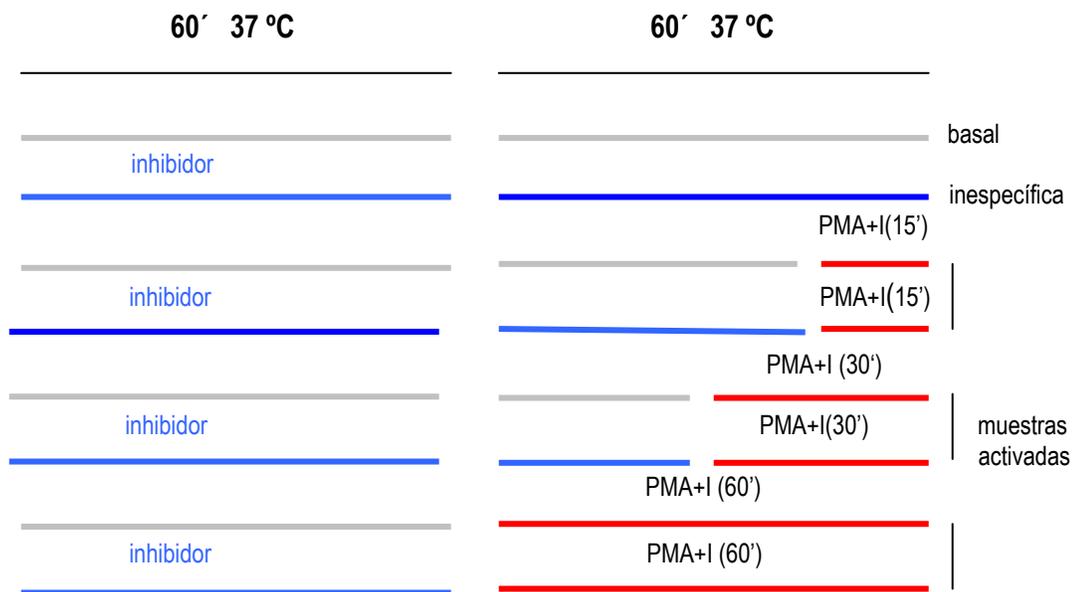


Figura 4. Activación celular con PMA+I, a distintos tiempos de incubación en presencia o no de inhibidores de la actividad enzimática de PARP a la concentración adecuada.

4.3. Determinación de la actividad enzimática de PARP en muestras celulares estimuladas con Ionomicina y PMA a concentraciones crecientes de inhibidor.

Se trabajó con muestras de la población celular objeto de estudio, en una proporción de 10^6 células en 1 ml de medio RPMI-S, por pocillo. Se incubaron las muestras a estudiar durante 60 minutos a 37°C en presencia de PJ34 (N-(6-oxo-5,6-dihidro-fenantridin-2-il)-N,N-dimetilacetamida HCl)(Alexis, Carlsbad, CA, USA) a concentraciones 0.3 μ M, 3 μ M y 30 μ M respectivamente y en presencia de ANI (4-amino-naftalimida)(Alexis) a concentraciones 2.3 μ M, 23 μ M y 50 μ M. Paralelamente se incubaron, sin inhibidor, dos muestras una como control basal y otra como control de estimulación.

Transcurrido este periodo de incubación se añadió, a las muestras con inhibidor y al control positivo, PMA e Ionomicina para obtener una concentración final en pocillo de 10 μ g/ml y 1 mg/ml respectivamente, y se continuó la incubación durante 15 minutos. A la muestra basal se añadió un volumen igual de RPMI-S (Figura 5).

Finalizada la incubación, se aspiraron las células de cada pocillo, se pasaron a tubos mantenidos a 4°C y se centrifugaron a 1.500 x g, 5 minutos a 4°C. Una vez aspirado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 ml DPBS-S, a 4°C. Se reservaron 50 μ l para recuento celular.

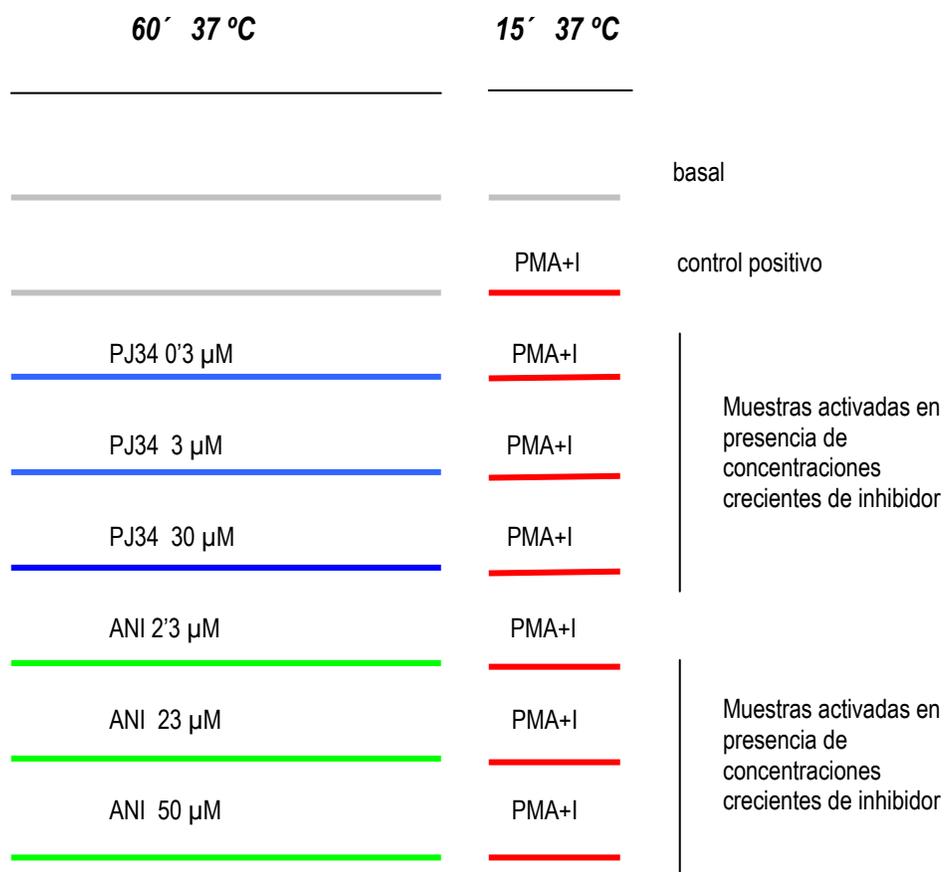


Figura 5. Determinación de la actividad enzimática de PARP en muestras celulares estimuladas con PMA + Ionomicina en función de la concentración de inhibidor presente.

4.4. Determinación de la actividad enzimática de PARP en muestras celulares estimuladas con peróxido de hidrógeno.

Como en la estimulación con Ionomicina y PMA, se incubó, en pocillo de placa de cultivo de seis pocillos (Becton Dickinson), una muestra celular conteniendo 10^6 células en un mililitro de medio RPMI (BioWhittaker), a 37°C durante 120 minutos, como referencia de la actividad enzimática PARP en estas condiciones. En paralelo, simultáneamente, se incubó en pocillo a 37°C una muestra semejante a la que se añadió peróxido de hidrógeno a una concentración final 1 mM. La adición se efectuó a los 105 minutos del inicio de la incubación (15 minutos de activación).

Finalizada la incubación, se aspiraron las células de cada pocillo, se pasaron a tubos de ensayo mantenidos en frío y se centrifugaron a 500 x g, a 4°C, durante 5 minutos. Una vez aspirado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón DPBS-S y se mantuvieron a 4°C.

4.5. Permeabilización de las muestras celulares.

Para la permeabilización celular previa a la medida de la actividad enzimática de PARP, se siguió una modificación del método descrito por ML Muiras y col. (Muiras ML y col., 1998).

Se centrifugó la suspensión celular deseada a 500 x g durante 5 min a 4°C (Eppendorf 5810). El botón celular resultante se resuspendió en tampón hipotónico de permeabilización frío (10mM Tris-HCl pH=7.8, 1mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 30 mM de 2-mercaptoetanol; Sigma) suplementado con digitonina (Sigma, concentración final 0.015% (w/v)) a una densidad de 3x10⁶ células/100 µl de tampón. Tras incubación en hielo durante 1 minuto, se añadieron 4 ml de tampón de permeabilización a cada muestra, que se centrifugó a 3.000 x g, durante 10 minutos a 4°C (Eppendorf 5810) para, finalmente, resuspender de nuevo el botón celular en tampón hipotónico a una densidad de 10⁶ células/ 53 µl de tampón.

4.6. Medida de la actividad enzimática de PARP en células permeabilizadas.

Para la determinación de la actividad enzimática basal de PARP, a cada alícuota de 53 µl de la suspensión celular permeabilizada (10⁶ células), por duplicado, mantenida en hielo, se le añadieron 34 µl de la mezcla de reacción (Tris HCl 100 mM pH=7.8, Sigma, NAD⁺ 1mM Sigma, Cl₂Mg 120 mM Sigma, 8.5 kBq de ³H-NAD American Radiolabeled Chemicals Inc., St.Louis, Missouri, USA) y 13 µl de buffer de permeabilización hasta completar un volumen final de reacción de 100 µl. Paralelamente, se prepararon duplicados del control positivo (Enzima PARP, Trevigén, Gaihersburg MD, USA), negativo y NSB (actividad no específica) tal como se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Proporción de los diferentes componentes utilizados para la medida enzimática de PARP en muestras permeabilizadas.

Componentes	Control positivo	Control negativo	NSB	Muestras
Mezcla de reacción (μl)	34	34	34	34
Buffer permeabilización(μl)	61	66	8	13
Inhibidor de PARP (μl)	-	-	5	-
PARP (μl)	5	-	-	-
Células permeabilizadas (μl)	-	-	53	53

A continuación, tras homogenización por agitación, se procedió a la incubación a 37°C durante 10 minutos. Para frenar la reacción, se sumergieron las muestras en hielo y se les añadió, a cada una de ellas, 40 μl de ácido tricloroacético TCA (Panreac, Barcelona, España) al 50% (p/v), frío. Tras incubar a 4°C durante 3 horas, las muestras se centrifugaron a 13.000 x g durante 10 minutos (Eppendorf 5415R) y se lavó el botón celular resultante tres veces, con 1 ml de TCA al 5% frío. Tras eliminar el sobrenadante, se añadieron 500 μl de dodecil sulfato sódico (Sigma) al 2% en NaOH 0.1N (Sigma); después de agitar se dejó incubar durante la noche a 37 °C.

Las muestras se transfirieron a tubos de centelleo (*Pony vial*, PerkinElmer), se les añadieron 4 ml de cóctel de centelleo (*Optiphase Hisafe III*, Perkin Elmer, Wallac, Turku, Finlandia) a cada una y se homogenizaron por agitación.

Para la medida de la actividad enzimática de PARP en muestras celulares activadas antes de su permeabilización (anti-CD3, anti-CD28, PMA e Ionomicina, H₂O₂), sometidas o no a la acción de inhibidores de PARP, se mantuvieron los componentes y las proporciones recogidas en la tabla 4.

Para determinar la capacidad de activación de PARP celular en presencia de un *primer* con secuencia palindrómica, capaz de activar PARP (Grube K. Y col., 1991) (oligonucleótido 5'-GGAATTCC-3', Genset, París, Francia), se sustituyeron los 13 μl de buffer de permeabilización añadidos a las muestras celulares por 13 μl de ClNa 15 mM

conteniendo 2.5 μg de “*primer*”, para conseguir una concentración final de 25 $\mu\text{l/ml}$ en este último.

Para determinar la capacidad de activación de PARP celular en presencia de DNA activado (DNA activado con 1 mg/ml de nucleasas de salmón; Trevigén # 4667-50-06), se añadieron 10 μg de dicho DNA a los 13 μl de buffer de permeabilización adicionados a las muestras celulares.

En estos dos últimos casos se mantuvieron las mismas proporciones de la suspensión celular permeabilizada 53 μl y de la mezcla de reacción 34 μl (Tris HCl 100 mM pH=7.8 Sigma, NAD⁺ 1 mM Sigma, Cl₂Mg 120 mM Sigma, 8.5 kBq de ³H-NAD American Radiolabeled Chemicals Inc.) para obtener 100 μl de volumen final de reacción.

5. CARACTERÍSTICAS DEL PROCEDIMIENTO DE MEDIDA.

El procedimiento de medida descrito es un método indirecto en el que no se mide un analito concreto sino la actividad catalítica de una enzima en función del consumo de sustrato radiactivo expresado en cpm, no en unidades de concentración propiamente dichas. Esta peculiaridad nos impide disponer de patrones semejantes a la muestra analizada que nos sirvan como estándares. Por ello, sus características no son cuantificables de forma similar a un procedimiento analítico convencional lo que nos ha obligado a adaptar la metodología establecida para el cálculo de las mismas.

5.1. Límite de detección.

Se entiende como la cantidad más pequeña de analito distinguible del cero de concentración; en nuestro caso, actividad enzimática. Se establece como tres veces la desviación estándar del valor que se obtiene para el control negativo.

Se han medido diez replicados de un control negativo, por el método descrito, se ha obtenido la actividad media y su desviación estándar. El triple de este último valor se considera, en las unidades de actividad descritas (cpm), el límite de detección del método.

5.2. Exactitud.

La exactitud de un método representa la calidad de concordancia que existe entre la medida obtenida y su *verdadero* valor o el valor esperado. Se relaciona, por tanto, con los errores sistemáticos del procedimiento. Este parámetro se puede determinar, fundamentalmente, a través de varios procedimientos como el ensayo de linealidad o el cálculo del *recovery*.

En nuestro caso determinaremos la exactitud a través del ensayo de linealidad. No es posible realizar el ensayo de *recovery* ya que nuestro método no permite incorporar a la célula cantidades conocidas y crecientes de enzima PARP para el cálculo de la capacidad de recuperación del método.

Test de dilución.

Esta prueba permite calcular la linealidad de las medidas obtenidas para una muestra de actividad determinada, tras diluciones sucesivas de la misma, mediante el coeficiente de correlación y la ordenada en el origen obtenidos por regresión lineal de dichas medidas frente al número de células.

Aplicaremos el procedimiento a tres suspensiones celulares distintas, dentro de nuestro rango de medida.

5.3. Precisión.

Se define como la concordancia, en un rango determinado de concentraciones, entre medidas repetidas de una determinada muestra obtenidas en las mismas condiciones. Se expresa habitualmente por el coeficiente de variación.

Se determina el valor obtenido para diez replicados de una muestra determinada. El coeficiente de variación se expresa como el cociente entre la desviación estándar y el promedio de dichas medidas, expresado en tanto por ciento.

Determinaremos el coeficiente de variación intraensayo a partir de las medidas obtenidas para diez replicados de una muestra analizada en un mismo experimento. Utilizaremos tres tipos de muestras celulares diferentes.

5.4. Especificidad.

Mediremos la actividad de una muestra celular determinada en presencia de inhibidores de la actividad enzimática de PARP a fin de valorar la radiactividad no debida a PARP en nuestro procedimiento de medida.

6. MEDIDA DE RADIATIVIDAD POR CENTELLO LÍQUIDO. QUENCHING.

La actividad catalítica de PARP se ha determinado a través de la medida de la actividad de tritio (^3H , $E_{\max} \beta^-$ 0.018 MeV, 12.3 años) en forma de $^3\text{H-NAD}^+$, sustrato incorporado por el enzima a las proteínas celulares analizadas. Para la cuantificación de la actividad de tritio se recurrió al centelleo líquido, técnica de elección para contaje de radionúclidos β^- de baja energía basada en la conversión de la energía de las partículas β^- en energía luminosa mediante un soluto centelleador. En este caso, las muestras se introdujeron en tubos de contaje, se mezclaron con la disolución centelleadora (cóctel de centelleo) Optiphase Hisafe 3 (Perkin Elmer) de alta eficiencia de contaje y altos niveles de aceptación de muestra, particularmente agua y solutos de elevada fuerza iónica y, se midieron en un contador de centelleo líquido 1409 DSA (Wallac, Turku, Finlandia) durante 10 minutos.

Se efectuó la corrección de la extinción (*quenching*) por el método de patrón externo automático que incorpora el contador (sistema DOP, con fuente de ^{152}Eu) para optimizar la eficacia de contaje y mejorar la comparación de actividad entre las distintas muestras.

7. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como la media aritmética \pm desviación estándar (SD). La evaluación estadística de los mismos se realizó, mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y aplicación posterior del *test* de Tukey, para comparaciones múltiples de

muestras independientes en poblaciones normales. En el caso de poblaciones no normales, usamos el *test* de Kruskal-Wallis y la U-Mann Whitney para muestras independientes y el *test* de rangos de Wilcoxon para muestras dependientes. Todos los *test* realizados fueron bilaterales con un nivel de confianza exigido del 95%. Para los cálculos estadísticos usamos el SPSS 12.0.

IV. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DEL PROCEDIMIENTO DE MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP.

1.1. Limite de detección.

En la tabla 5 se presenta el valor obtenido para diez replicados de un control negativo mediante el procedimiento de medida descrito para determinar la actividad enzimática PARP (apartado 4.6) El límite de detección obtenido para la medida de actividad enzimática de PARP mediante este procedimiento es de **399 cpm**.

Tabla 5. Actividad enzimática media de PARP para diez replicados del control negativo expresada en cuentas por minuto.

control negativo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	media± des. stand
cpm	113	441	384	384	99	375	145	402	367	393	310 ±133

1.2. Exactitud.

Para verificar la exactitud del método realizamos el test de dilución para la determinación de la linealidad.

Se utilizaron tres suspensiones celulares, previamente permeabilizadas, la primera de linfocitos T procedentes de la línea celular tumoral humana Jurkat, la segunda de timocitos de ratones Parp-1^{+/+} y la tercera de linfocitos T procedentes de bazo de ratones Parp-1^{+/+}, con una densidad celular, cada una de ellas, de 8x10⁶ células/53 µl de tampón de permeabilización.

Con tampón de permeabilización, se efectuaron diluciones ½ de las suspensiones anteriores para obtener, de cada una de ellas, densidades de 4, 2, 1, y 0.5x10⁶ células en 53µl de tampón. En la figura 6, se muestra la actividad enzimática de PARP obtenida para

cada una de las suspensiones citadas, expresada en cpm. El coeficiente de correlación lineal fue en los tres casos superior a 0.998.

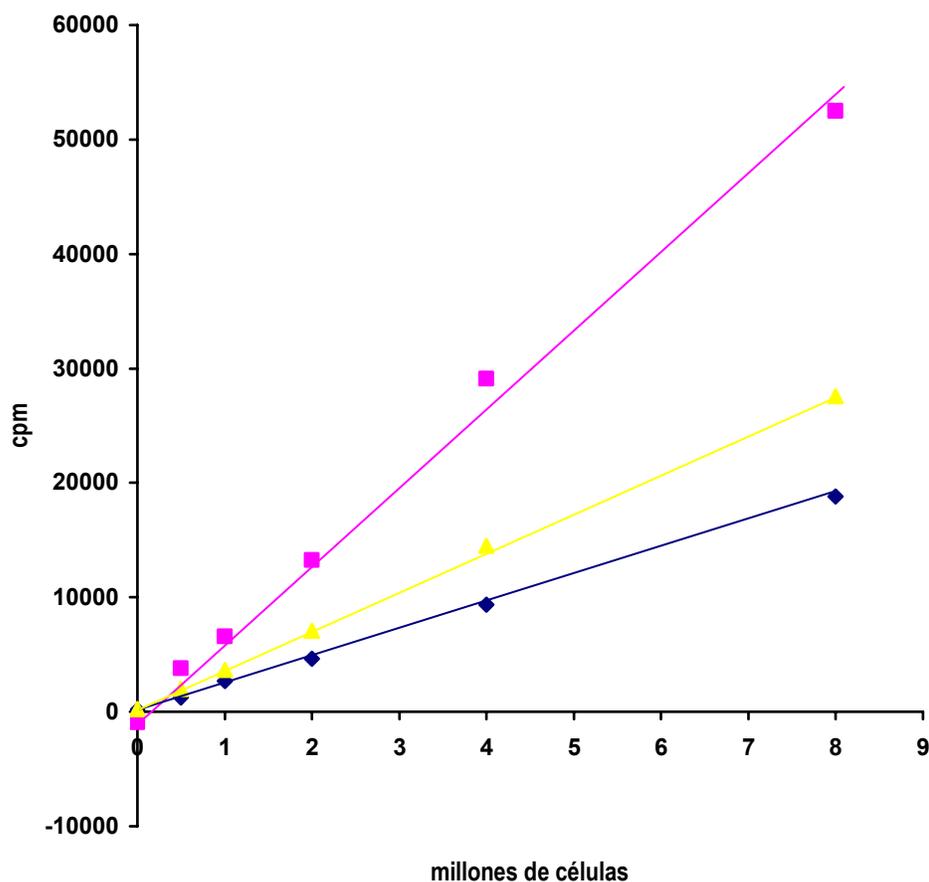


Figura 6. Actividad enzimática de PARP, expresada en cpm, de tres suspensiones celulares de linfocitos T de línea celular tumoral humana (Jurkat) (■), linfocitos T de bazo de ratones Parp-1^{+/+} (▲) y timocitos de ratones Parp-1^{+/+} (◆) a concentraciones crecientes de las mismas.

1.3. Precisión.

Se determinó, en una misma serie de medidas, la actividad enzimática media de PARP en diez replicados de una suspensión de 10^6 linfocitos T de línea celular tumoral humana (Jurkat) previamente permeabilizados. Se efectuó la misma determinación sobre una suspensión de 10^6 esplenocitos T de ratón Parp-1^{+/+} y sobre una tercera suspensión de 10^6 linfocitos T procedentes de timo de ratón Parp-1^{-/-}. En la tabla 6 se muestra la actividad enzimática media de PARP, su desviación estándar y el coeficiente de variación para cada una de las suspensiones anteriores, expresadas en cpm por millón de células.

Tabla 6. Coeficiente de variación intraensayo de tres suspensiones celulares, obtenido a partir de la medida de actividad PARP en 10 replicados de cada una de ellas, expresado como el cociente entre la desviación estándar y el promedio de dichas medidas en tanto por ciento.

Tipo celular	actividad enzimática de PARP (cpm/ 10^6 células)										media	desv. estándar	C.V. %
Linfocitos Jurkat	6332	6348	7132	6543	6802	7182	5906	6129	6582	6065	6502	434	6.7
Esplenocitos T Parp-1 ^{+/+}	2047	2524	2218	2791	1951	2846	2826	2633	2139	2347	2442	351	14.4
Timocitos T Parp-1 ^{-/-}	968	978	770	962	1073	778	825	923	797	895	897	102	11.4

1.4. Especificidad.

Se determinó la actividad enzimática de PARP, expresada en cpm, de una suspensión de 10^6 células (timocitos) de ratones Parp-1^{+/+} por el procedimiento descrito (apartado 4) en presencia de inhibidores de la actividad enzimática de PARP (PJ34 a una concentración de 30 μ M).

Tabla 7. Actividad enzimática de PARP en una suspensión de 10^6 timocitos de ratones Parp-1^{+/+} en presencia de PJ34 frente a control negativo.

muestra	actividad enzimática de PARP (cpm/ 10^6 células)										media	desv estándar
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
actividad no específica	448	148	405	456	497	496	307	383	536	401	408	113
control negativo	113	441	384	384	99	375	145	402	367	393	310	133

No se encuentran diferencias significativas ($p= 0.095$) entre la media de la actividad no debida a PARP (actividad no específica, determinada con timocitos en presencia de PJ34) y la media de la actividad del control negativo, lo que confirma la especificidad del procedimiento.

2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD CATALÍTICA DE PARP EN CELULAS DE RATÓN.

En este apartado se incluyen las medidas de actividad catalítica de PARP correspondientes a las distintas células del sistema inmune obtenidas de bazo y timo de ratones de la cepa C57BL/6J en los distintos genotipos estudiados.

Se presentan las medidas correspondientes a la actividad basal de PARP, la actividad de PARP en presencia de estímulos fisiológicos y la reserva celular de PARP o máxima cantidad activable de la enzima en cada uno de los genotipos.

2.1 Influencia de la concentración de *primer* (oligonucleótido: 5'-GGAATTCC) sobre la activación celular de PARP en ratones Parp-1^{+/+}.

En la figura 7 se presenta la variación de la actividad enzimática de PARP en timocitos y esplenocitos permeabilizados de ratón Parp-1^{+/+} (10^6 células por muestra), en función de la concentración de *primer* (5'-CGGAATTCCG) presente en los 100 μ l del volumen de

reacción. En ambos casos la actividad enzimática de PARP aumenta con la concentración de *primer* hasta alcanzar valores máximos para una concentración de coactivador de 25 $\mu\text{g/ml}$, a partir de la cual la actividad estimulada de PARP se estabiliza.

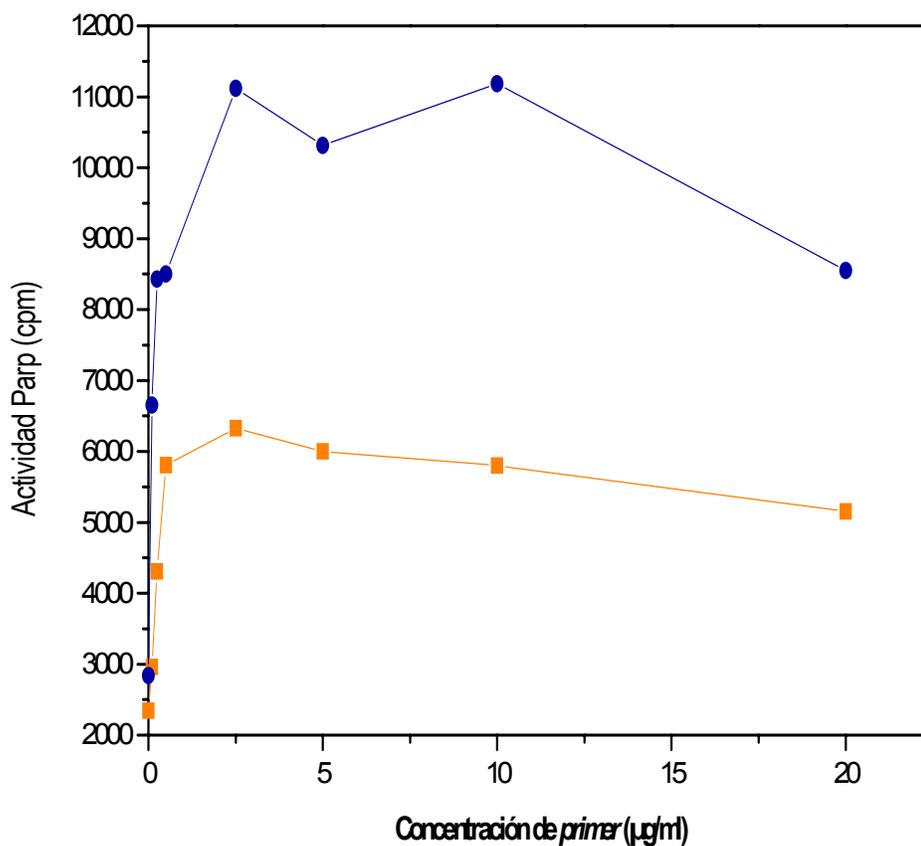


Figura 7. Actividad enzimática de PARP en timocitos (■) y esplenocitos (●) de ratones Parp-1^{+/+} (10^6 células) en función de la concentración de *primer*.

2.2 Variación de la actividad enzimática de PARP en linfocitos T de línea tumoral Jurkat en presencia de la concentración de inhibidores de dicha actividad.

En las figuras 8 y 9 se presenta como varía la actividad enzimática basal de PARP de células T procedentes de línea celular tumoral Jurkat en presencia de concentraciones crecientes de drogas inhibidoras de la actividad PARP (PJ34 y ANI). En ambos casos se aprecia como la actividad enzimática media de dicho enzima disminuye con el aumento

de la concentración de inhibidor presente en el medio, hasta alcanzar valores de actividad de fondo.

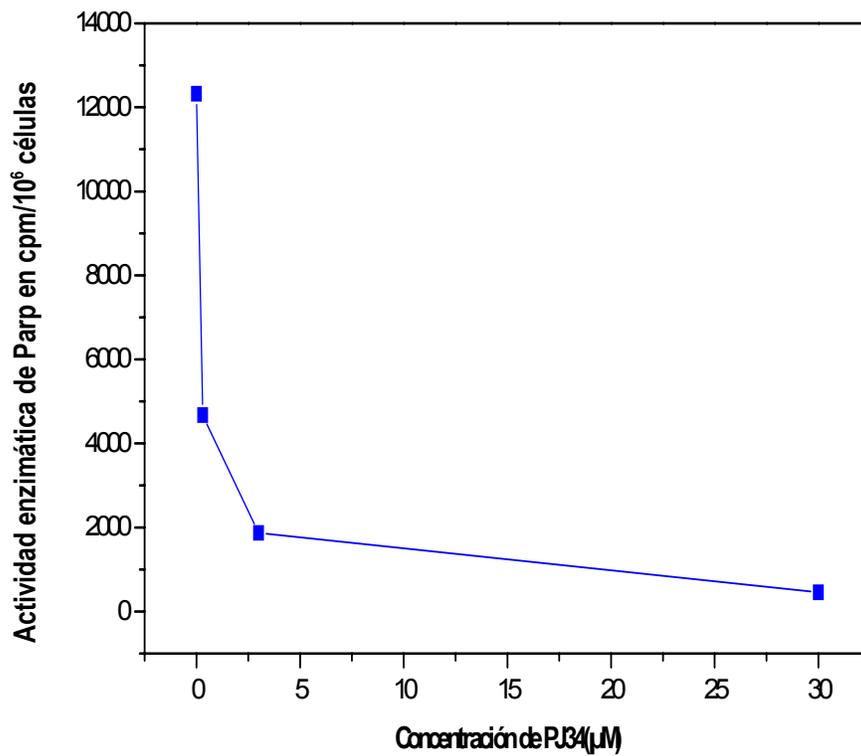


Figura 8. Variación de la actividad enzimática de PARP en linfocitos T procedentes de línea tumoral humana Jurkat en función de la concentración de PJ34 presente.

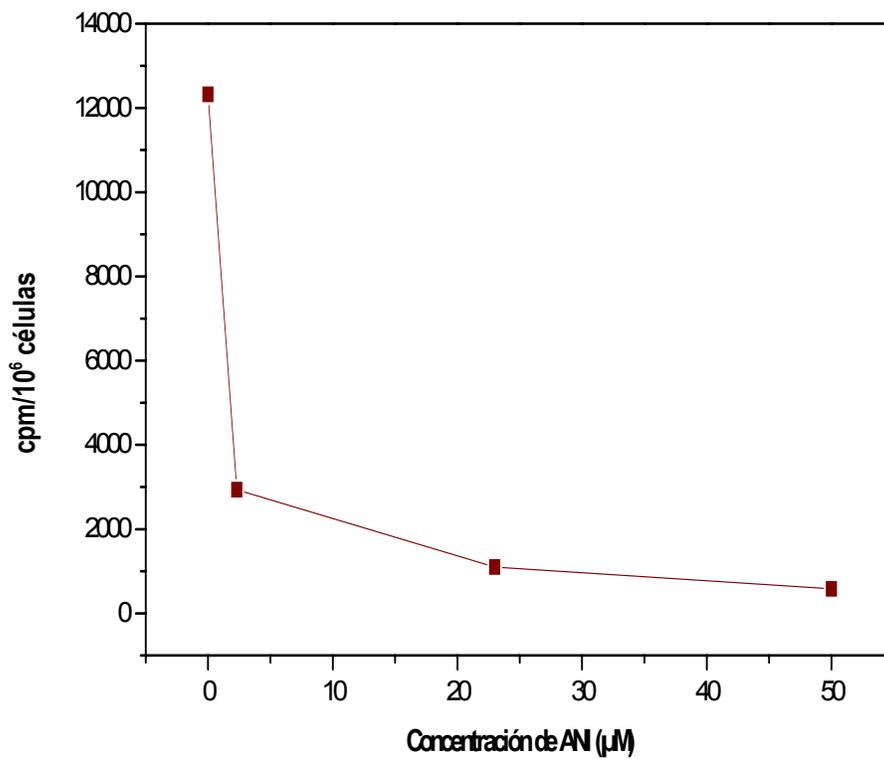


Figura 9. Variación de la actividad enzimática de PARP en linfocitos T procedentes de línea tumoral Jurkat en función de la concentración de ANI presente.

2.3. Actividad enzimática de PARP en timocitos de ratones $\text{Parp-1}^{+/+}$, $\text{Parp-1}^{-/-}$ y $\text{Parp-2}^{-/-}$.

En la figura 10 se presenta la actividad enzimática basal media de PARP en timocitos de ratones $\text{Parp-1}^{-/-}$ y $\text{Parp-2}^{-/-}$ frente a la actividad de ratones $\text{Parp-1}^{+/+}$, expresada en cpm por millón de células. Los ratones $\text{Parp-1}^{-/-}$ muestran una actividad enzimática de PARP menor que la de los ratones control ($\text{Parp-1}^{+/+}$) (* $p < 0.0001$) y la de los ratones $\text{Parp-2}^{-/-}$ (* $p < 0.001$); sin embargo los timocitos de ratones $\text{Parp-2}^{-/-}$ muestran valores de actividad basal de PARP superiores a sus correspondientes controles, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas ($p = 0.453$).

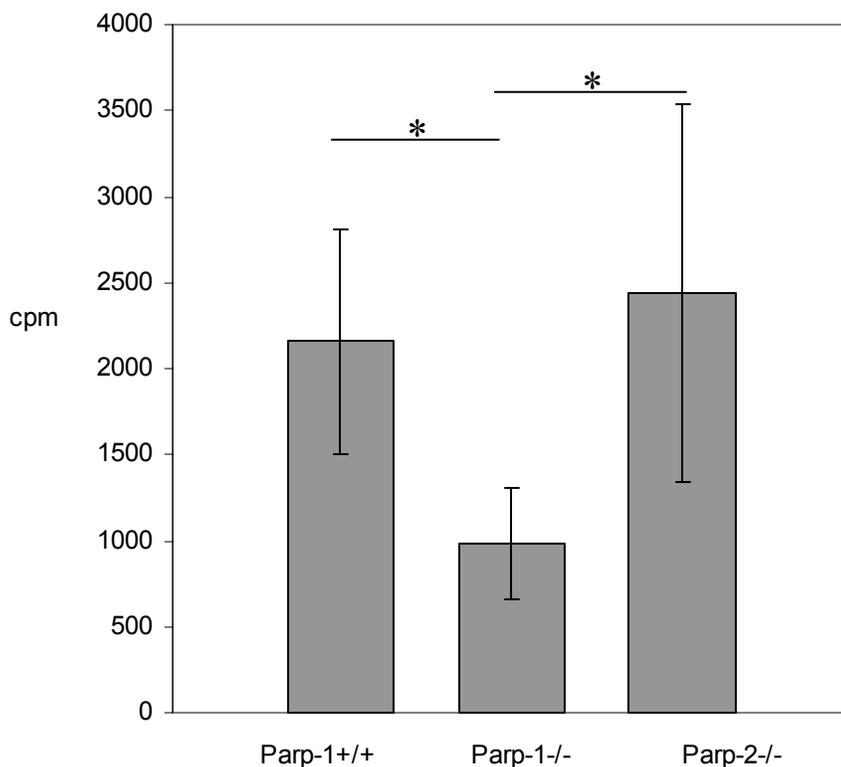


Figura 10. Actividad enzimática basal de PARP en timocitos de ratones Parp-1^{-/-} (n=20) y Parp-2^{-/-} (n=20) respecto a ratones Parp-1^{+/+} (n=25), expresada en cpm/10⁶ células.

La figura 11 representa la actividad enzimática de PARP, expresada en cpm por millón de células, en timocitos de ratones Parp-1^{+/+}, Parp-1^{-/-} y Parp-2^{-/-} estimulada con *primer* (oligonucleótido: 5'-GGAATTCC). Cuando las células permeabilizadas se estimulan con *primer* a la concentración de 25 µg/ml, la actividad enzimática de PARP de los ratones Parp-1^{-/-} presenta valores significativamente inferiores que la actividad enzimática de los ratones Parp-1^{+/+} (*p< 0.0001) y Parp-2^{-/-} (*p<0.0001). Por otra parte, los timocitos de ratones Parp-2^{-/-} presentan, en presencia de *primer*, una actividad enzimática de PARP superior a la de sus respectivos controles (*p=0.013).

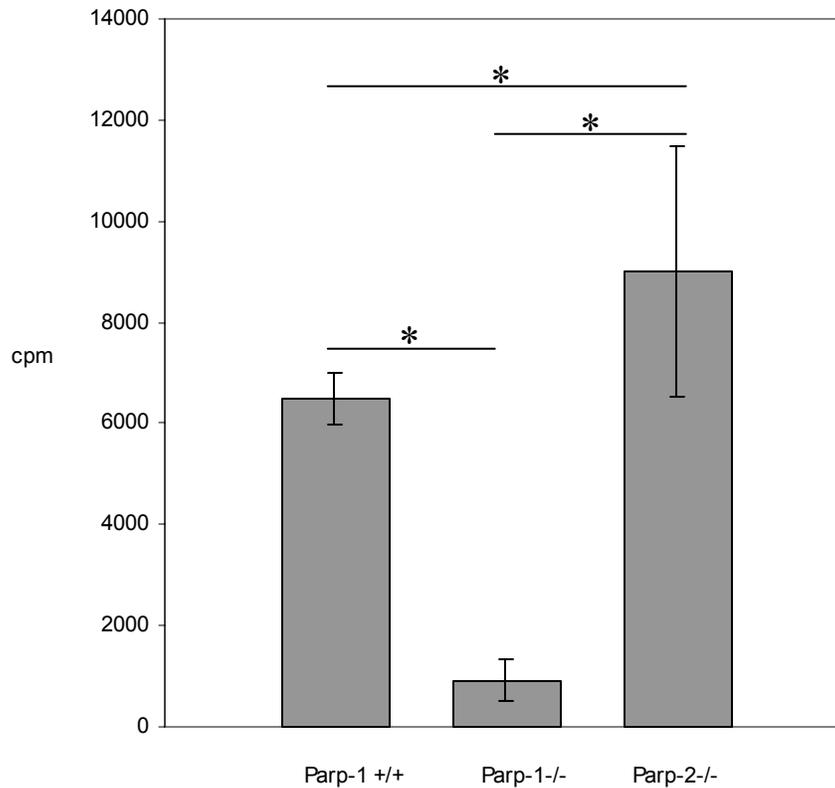


Figura 11. Actividad enzimática de PARP tras estimulación con *primer*, en timocitos de ratones Parp-1^{+/+} (n=9), Parp-1^{-/-} (n=4) y Parp-2^{-/-} (n=4), expresada en cpm/10⁶ células.

2.4. Actividad enzimática de PARP en esplenocitos totales de ratones Parp-1^{+/+}, Parp-1^{-/-} y Parp-2^{-/-}.

La figura 12 representa la actividad enzimática basal de PARP en esplenocitos totales de ratones Parp-1^{-/-} y Parp-2^{-/-} frente a la actividad de ratones control Parp-1^{+/+}, expresada en cpm por millón de células. La actividad enzimática de PARP en esplenocitos totales de ratones Parp-1^{-/-} presenta valores significativamente inferiores que la actividad enzimática de PARP en ratones Parp-1^{+/+} (*p<0.0001) y Parp-2^{-/-} (*p<0.0001). Sin embargo, no se

encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad de los ratones $\text{Parp-2}^{-/-}$ y la de sus respectivos controles $\text{Parp-1}^{+/+}$ ($p=0.998$).

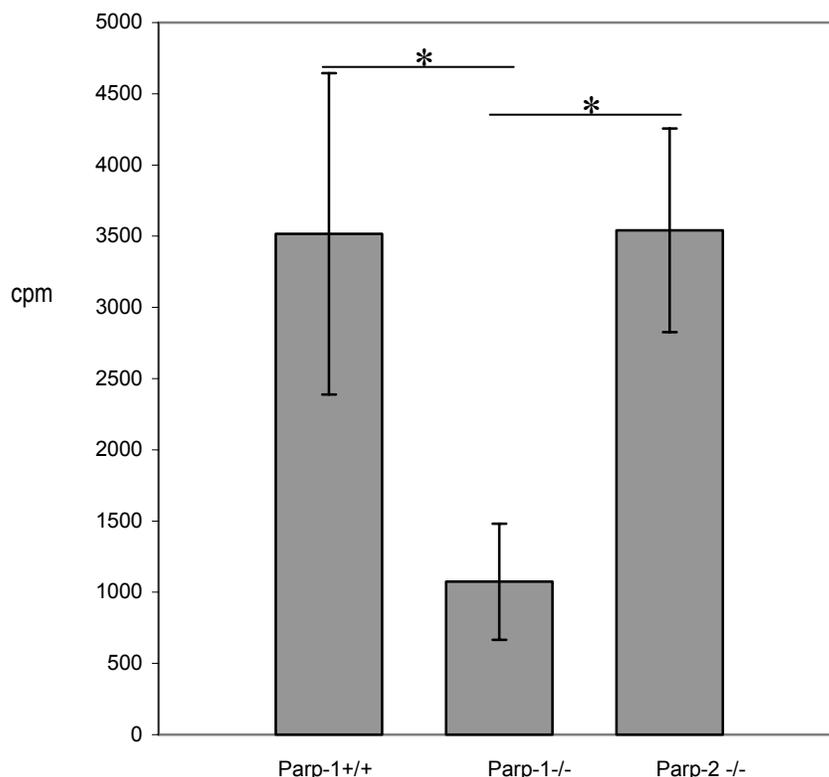


Figura 12. Actividad enzimática basal de PARP en esplenocitos totales de ratones $\text{Parp-1}^{-/-}$ ($n=17$), $\text{Parp-2}^{-/-}$ ($n=7$) y $\text{Parp-1}^{+/+}$ ($n=25$), expresada en $\text{cpm}/10^6$ células.

La figura 13 muestra la actividad enzimática de PARP estimulada con *primer* en esplenocitos de ratones $\text{Parp-1}^{-/-}$ y $\text{Parp-2}^{-/-}$ frente a la actividad de ratones control $\text{Parp-1}^{+/+}$, expresada en cpm por millón de células. La actividad enzimática de PARP estimulada con *primer* en esplenocitos totales de ratones $\text{Parp-1}^{-/-}$ fue significativamente menor que la actividad enzimática de PARP en ratones $\text{Parp-1}^{+/+}$ ($*p < 0.0001$) y $\text{Parp-2}^{-/-}$ ($*p < 0.0001$). Se observa, asimismo, que la actividad enzimática en esplenocitos totales de ratones $\text{Parp-2}^{-/-}$, en presencia de *primer*, fue mayor que la de los respectivos ratones control $\text{Parp-1}^{+/+}$ ($*p=0.023$).

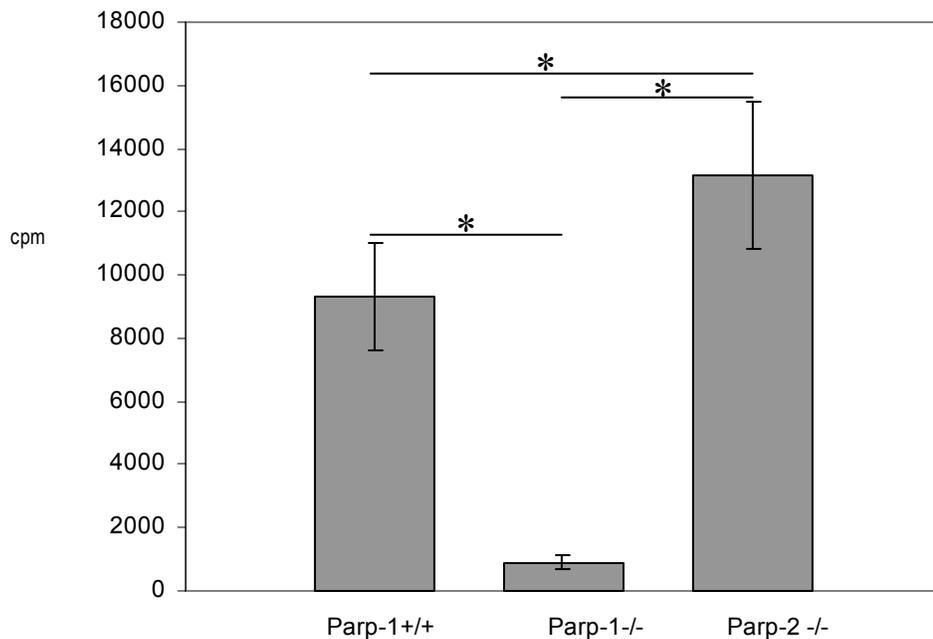


Figura 13. Actividad enzimática de PARP estimulada con *primer* en esplenocitos totales de ratones Parp-1^{-/-} (n=5), Parp-2^{-/-} (n=4) y Parp-1^{+/+} (n=5), expresada en cpm/10⁶ células.

2.5. Actividad enzimática basal de esplenocitos T de ratones Parp-1^{+/+}, Parp-1^{-/-} y Parp-2^{-/-}.

En la figura 14 se representa la actividad enzimática basal de linfocitos T de bazo de ratones Parp-1^{-/-} y Parp-2^{-/-} frente a la de ratones Parp-1^{+/+}, expresada en cpm por millón de células. La actividad enzimática basal de PARP en linfocitos T procedentes de ratones Parp-1^{-/-} fue significativamente inferior a la actividad de PARP en ratones Parp-1^{+/+} (*p=0.002) y Parp-2^{-/-} (*p=0.002); sin embargo, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre la actividad correspondiente a linfocitos T de los ratones Parp-2^{-/-} y los Parp-1^{+/+} (p=0.969).

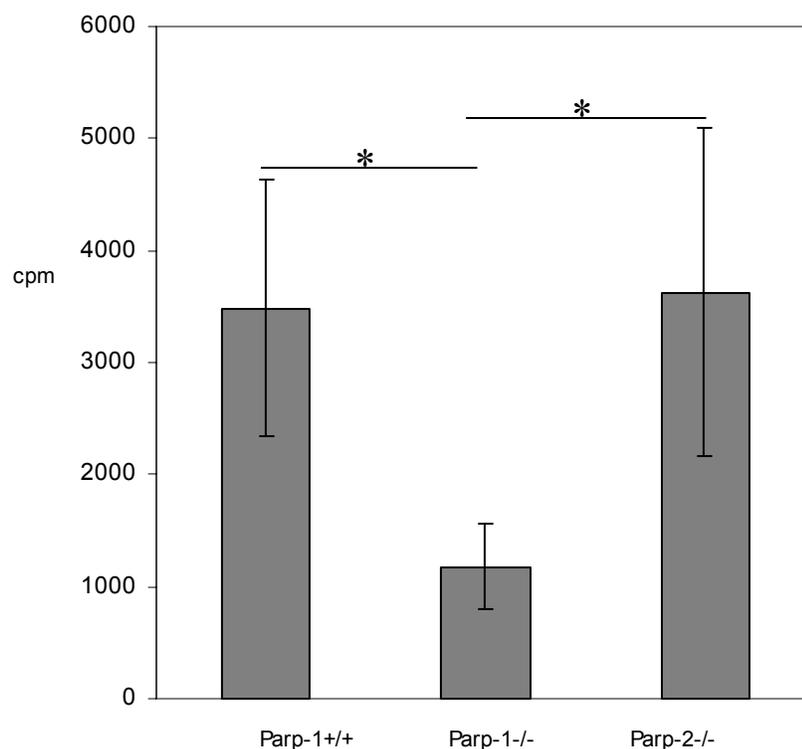


Figura 14. Actividad enzimática basal de PARP en linfocitos T de bazo de ratones Parp-1^{+/+} (n=8), Parp-1^{-/-} (n=7) y Parp-2^{-/-} (n=6), expresada en cpm/10⁶ células.

2.6. Actividad enzimática basal de esplenocitos B de ratones Parp-1^{-/-} y Parp-2^{-/-} frente a ratones Parp-1^{+/+}.

La figura 15 representa la actividad enzimática media basal de esplenocitos B de ratones Parp-1^{-/-} y Parp-2^{-/-} frente a la de ratones Parp-1^{+/+}, expresada en cpm por millón de células. La actividad enzimática basal de PARP en linfocitos B de ratones Parp-1^{-/-} es significativamente inferior a la actividad enzimática basal de PARP tanto de ratones Parp-1^{+/+} (*p<0.0001) como de Parp-2^{-/-} (*p<0.0001). Los esplenocitos B de ratones Parp-2^{-/-} presentan una actividad basal media similar a la de sus correspondientes controles Parp-1^{+/+} (p=0.963) aunque no es estadísticamente significativo.

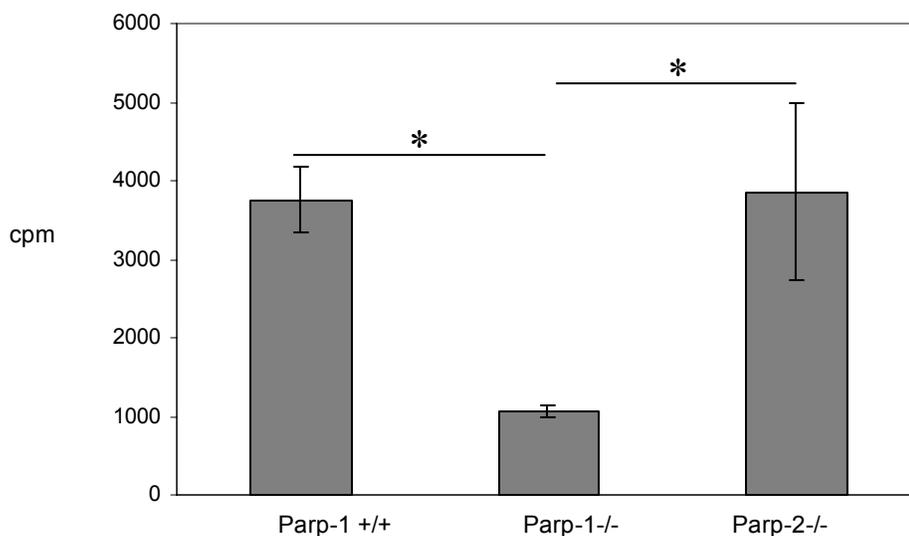


Figura 15. Actividad basal media de PARP en esplenocitos B de ratones Parp-1^{-/-} (n=6) y Parp-2^{-/-} (n=10), frente a la de sus correspondientes controles Parp-1^{+/+} (n=6), expresada cpm.

2.7.- Actividad enzimática de PARP basal y estimulada con *primer* en timocitos de ratones Parp-1^{+/+}, Parp-1^{-/-} y Parp-2^{-/-}.

En la figura 16 se muestra la actividad enzimática media de PARP, basal y estimulada con *primer* (oligonucleótido: 5'-GGAATTCC), de timocitos de ratones Parp-1^{+/+}, Parp-1^{-/-} y Parp-2^{-/-}, expresada en cpm por millón de células. Cuando se estimulan las células con *primer* la actividad enzimática de PARP aumenta significativamente, respecto a sus respectivos basales, en los ratones control Parp-1^{+/+} (*p=0.043). En los ratones Parp-2^{-/-} se observa, asimismo, un aumento de la actividad PARP aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (p=0.068). Por el contrario los ratones Parp-1^{-/-} no presentan diferencias entre su actividad enzimática de PARP basal y en presencia de *primer* (p=0.751).

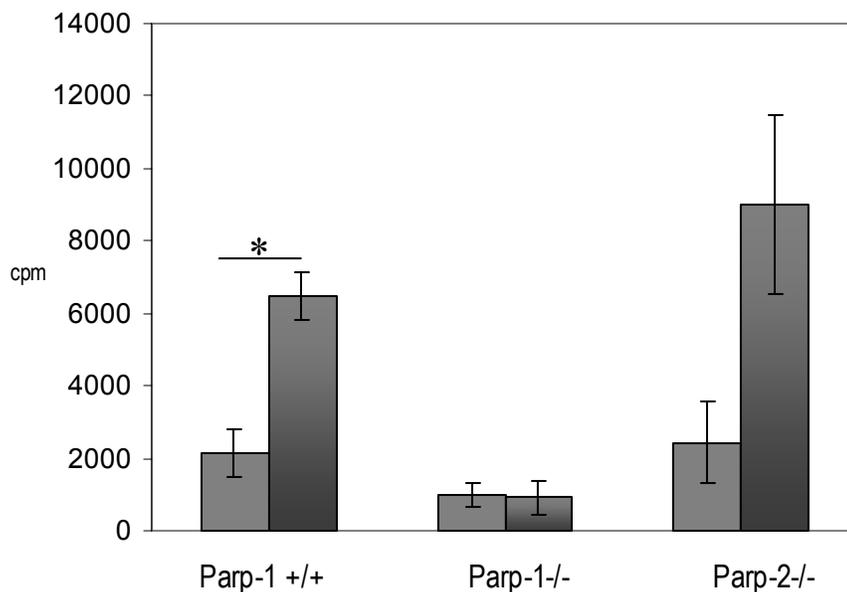


Figura 16. Actividad enzimática de PARP basal y tras activación con *primer* de timocitos de ratones Parp-1^{+/+} (n=25;9), Parp-1^{-/-} (n=20;4) y Parp-2^{-/-} (n=20;4), expresada en cpm/10⁶ células.

2.8. Actividad enzimática de PARP basal y estimulada con *primer* en esplenocitos totales de ratones Parp-1^{+/+}, Parp-1^{-/-} y Parp-2^{-/-}.

En la figura 17 se presenta la actividad enzimática media de PARP basal y tras estimulación con *primer* (oligonucleótido: 5'-GGAATTCC) en esplenocitos totales de ratones Parp-1^{+/+}, Parp-1^{-/-} y Parp-2^{-/-}, expresada en cpm por millón de células. Cuando estimulamos las células con *primer* la actividad enzimática basal media de PARP aumenta significativamente en los ratones Parp-1^{+/+} (*p=0.043). En ratones Parp-2^{-/-} se observa un aumento de la actividad de PARP en presencia de *primer* respecto a sus correspondientes valores basales, aunque no es estadísticamente significativo (p=0.068); por el contrario, en ratones Parp-1^{-/-} no se aprecian diferencias entre ambas situaciones (p=0.686).

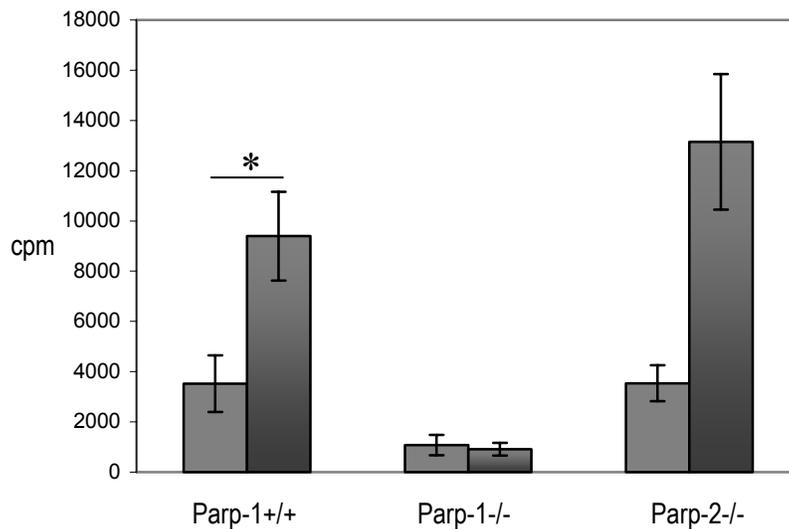


Figura 17. Actividad enzimática de PARP basal y tras *primer* en esplenocitos de ratones Parp-1^{+/+} (n=25;5), Parp-1^{-/-} (n=17;5) y Parp-2^{-/-} (n=7;4), en cpm/10⁶ células.

2.9. Actividad enzimática basal de PARP en timocitos, esplenocitos, linfocitos T y linfocitos B de ratones Parp-1^{+/+}.

En la figura 18 se representa la actividad enzimática basal media de PARP en timocitos, esplenocitos, esplenocitos T y esplenocitos B de ratones Parp-1^{+/+}, expresada en cpm por millón de células. Los timocitos de ratones Parp-1^{+/+} tienen una actividad enzimática basal significativamente menor que los esplenocitos totales (*p<0.0001), que los esplenocitos T (*p=0.004) y que los esplenocitos B (*p=0.002). Sin embargo, en este mismo genotipo, no se encontraron diferencias significativas en la actividad enzimática basal media de PARP entre esplenocitos totales y esplenocitos T (p=1.0), entre esplenocitos totales y esplenocitos B (p<0.944) y entre esplenocitos T y B (p=0.951).

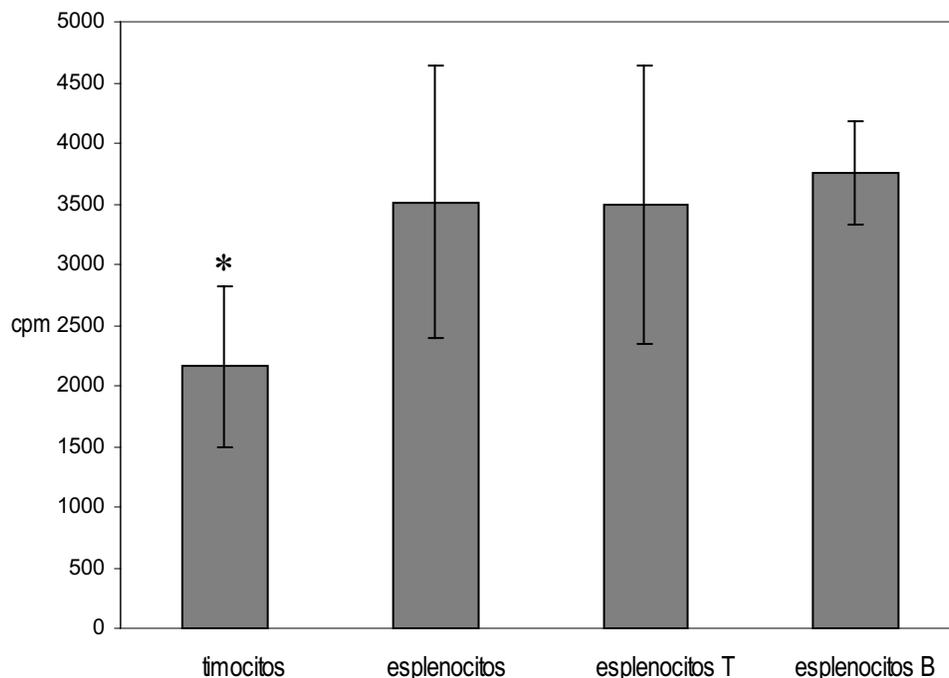


Figura 18. Actividad enzimática basal de PARP en timocitos (n=25), esplenocitos (n=25), esplenocitos T (n=8) y esplenocitos B (n=6) de ratones Parp-1^{+/+}, expresadas en cpm/10⁶ células.

2.10. Actividad enzimática basal de PARP en timocitos, esplenocitos, linfocitos T y linfocitos B de ratones Parp 1^{-/-}.

La figura 19 representa la actividad enzimática basal media de PARP en timocitos, esplenocitos, esplenocitos T y esplenocitos B de ratones Parp 1^{-/-}, expresada en cpm por millón de células. No se encontraron diferencias significativas entre la actividad enzimática PARP de timocitos y la actividad enzimática PARP de esplenocitos totales (p=0.852), esplenocitos T (p=0.577) y esplenocitos B (p=0.960). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las actividad enzimática PARP de esplenocitos totales y la de linfocitos T (p=0.909) y B (p=1.0), ni diferencias de actividad PARP entre esplenocitos T y B (p=0.931).

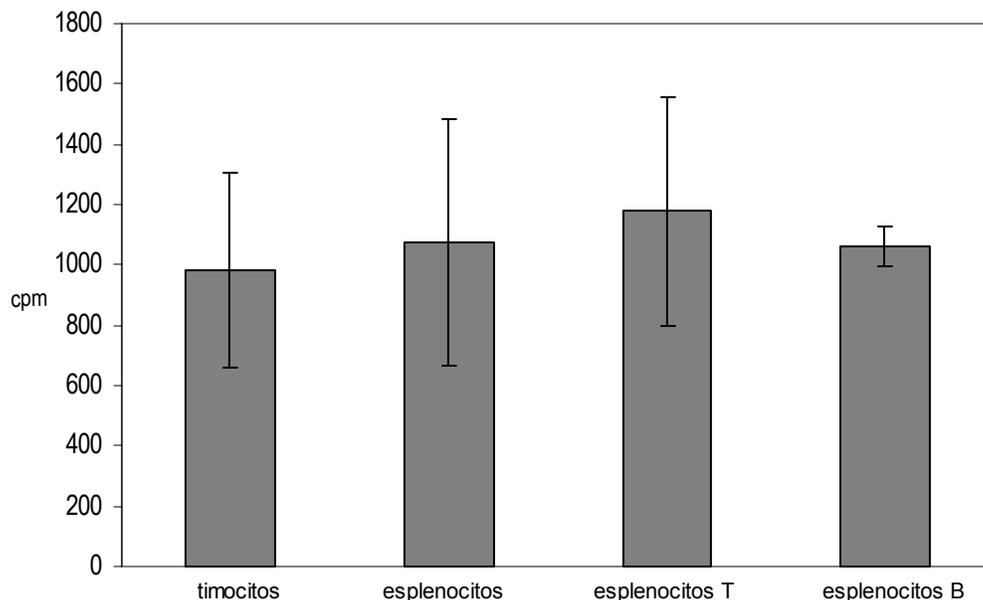


Figura 19. Actividad basal media de PARP en timocitos (n=12), esplenocitos totales (n=5), esplenocitos T (n=7) y esplenocitos B (n=4), de ratones *Parp-1^{-/-}* en cpm/10⁶ células.

2.11. Actividad enzimática basal media de PARP en timocitos, esplenocitos, linfocitos T y linfocitos B de ratones *Parp-2^{-/-}*.

En la figura 20 viene representada la actividad enzimática basal media de PARP en timocitos, esplenocitos, linfocitos T y linfocitos B de ratones *Parp-2^{-/-}*, expresada en cpm por millón de células. En este genotipo los timocitos parecen presentar una actividad enzimática de PARP menor que los distintos tipos de esplenocitos estudiados, aunque, dicha diferencia, sólo fue significativa en el caso de los esplenocitos B (*p=0.016). En el mismo estudio, no se encontraron diferencias significativas entre la actividad basal de PARP de los distintos esplenocitos estudiados. No se encontraron diferencias significativas entre la actividad enzimática PARP de timocitos y la actividad enzimática PARP de esplenocitos totales (p=0.157) y esplenocitos T (p=0.146). Tampoco se encontraron diferencias entre las actividad enzimática PARP de esplenocitos totales y la de esplenocitos T (p=0.999) y B (p=0.940), ni entre la actividad PARP de linfocitos T y B (p=0.978).

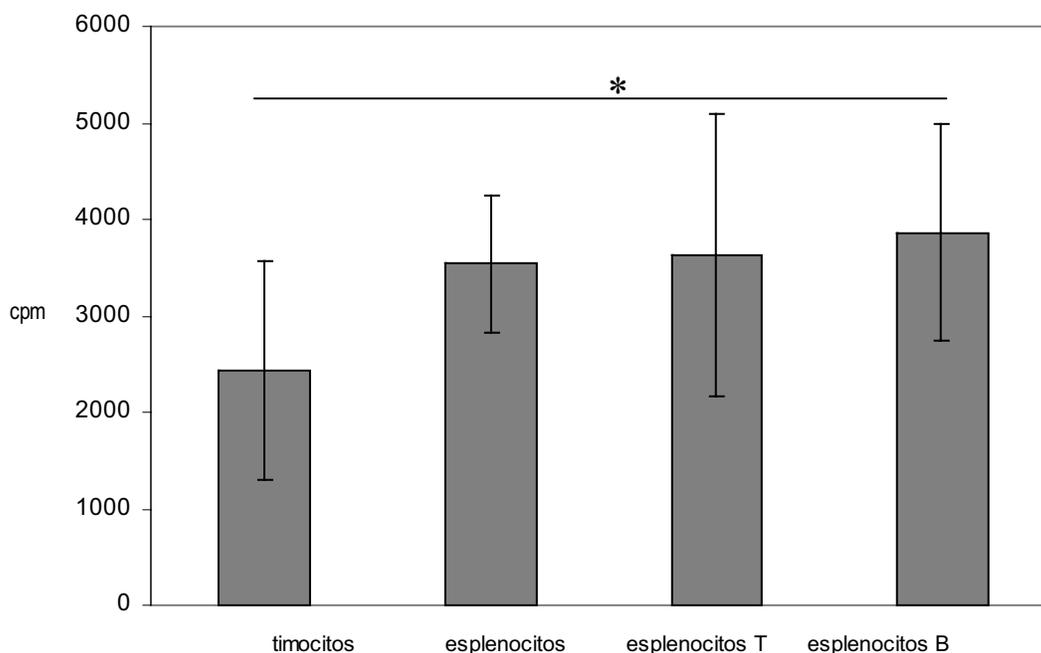


Figura 20. Actividad enzimática de PARP en timocitos (n=20), esplenocitos (n=7), linfocitos T (n=6) y linfocitos B (n=10) de ratones *Parp-2^{-/-}*, en cpm/10⁶ células.

2.12. Actividad basal media de PARP en timocitos, esplenocitos, esplenocitos T y esplenocitos B en todos los genotipos estudiados.

En la figura 21 se presenta conjuntamente la actividad enzimática basal media de PARP de timocitos, esplenocitos totales, esplenocitos T y esplenocitos B de todos los genotipos estudiados.

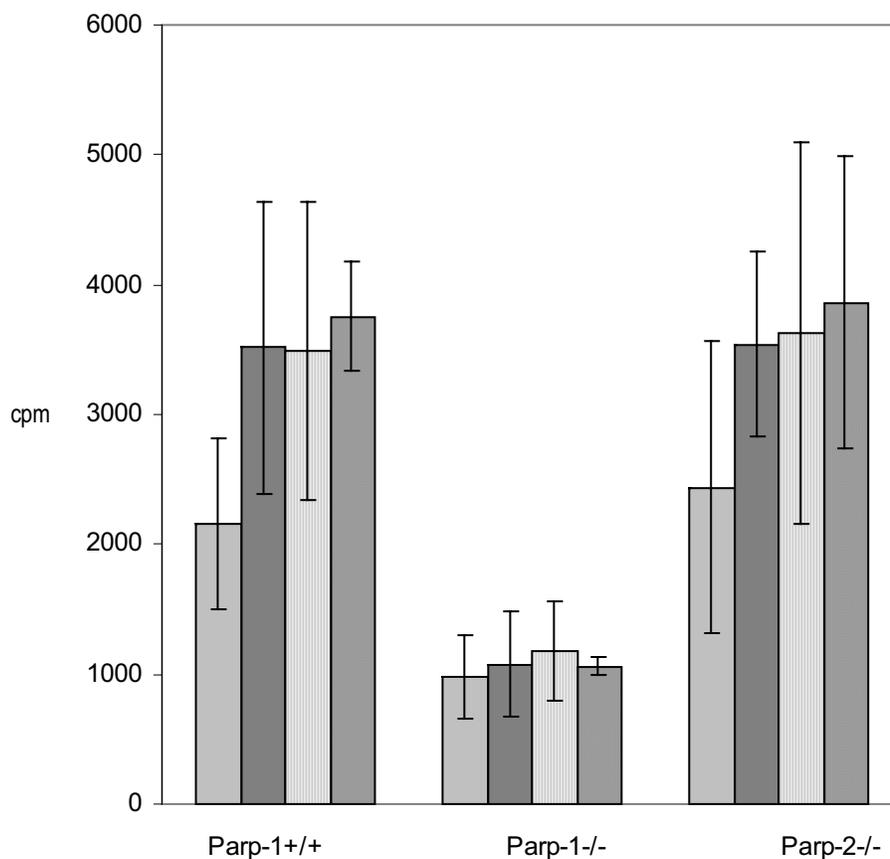


Figura 21. Actividad enzimática de PARP de timocitos (□), esplenocitos (■), esplenocitos T (▤) y esplenocitos B (▨) de los tres genotipos estudiados, representada en cpm/10⁶ células.

2.13. Medida de la actividad enzimática de PARP en esplenocitos T de ratones Parp-1^{+/+}, tras estimulación con anticuerpos de superficie anti-CD3 y anti-CD28.

En la figura 22 se presenta la medida de la actividad enzimática de PARP, expresada en cpm, en muestras celulares de ratones Parp-1^{+/+} (10⁶ células) mantenidas a 37° C, en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD3+anti-CD28, a diferentes tiempos de incubación.

La actividad basal de PARP en linfocitos T aumenta en presencia de anti-CD3 y anti-CD3+anti-CD28 a lo largo del período de incubación. Se han estimulado simultáneamente las mismas muestras con DNA activado, H₂O₂ y PMA+Ionomicina como referencias de estimulación positiva de actividad PARP.

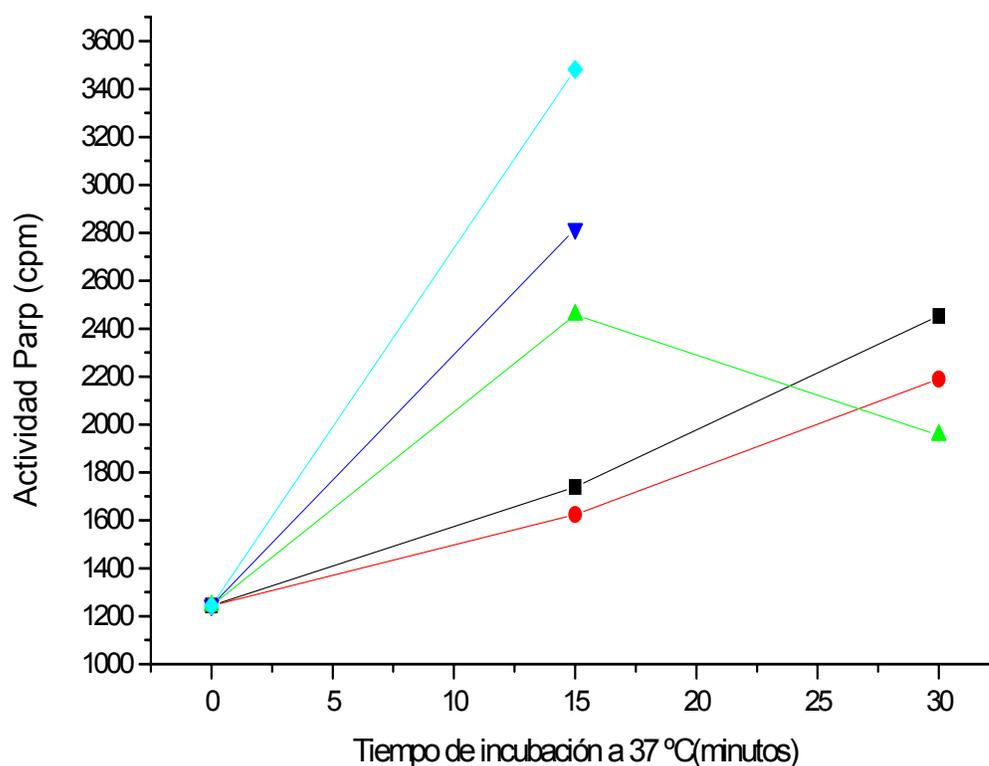


Figura 22. Actividad enzimática de PARP en linfocitos T en presencia de CD3 (■), CD3/CD28 (●), PMA+I (▲), H₂O₂ (▼) y DNA activado (◆).

3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP EN LINFOCITOS T HUMANOS

En este epígrafe se presentan las medidas de actividad enzimática de PARP obtenidas en linfocitos T humanos permeabilizados procedentes de distintas muestras celulares. Se ha

determinado la actividad enzimática de PARP en células tumorales T (Jurkat) y linfocitos T primarios humanos, tanto en reposo como tras activación.

3.1. Actividad basal de PARP en linfocitos T humanos.

En la figura 23 se presenta la actividad enzimática basal de PARP en linfocitos T procedentes de línea celular tumoral humana (Jurkat) frente a los valores obtenidos en linfocitos T procedentes de sangre periférica de sujetos sanos (control). Se puede observar que la actividad basal media en linfocitos T de línea tumoral, expresada en cpm por millón de células, es superior (* $p=0.01$) a la actividad basal media de PARP que presentan los linfocitos T humanos periféricos.

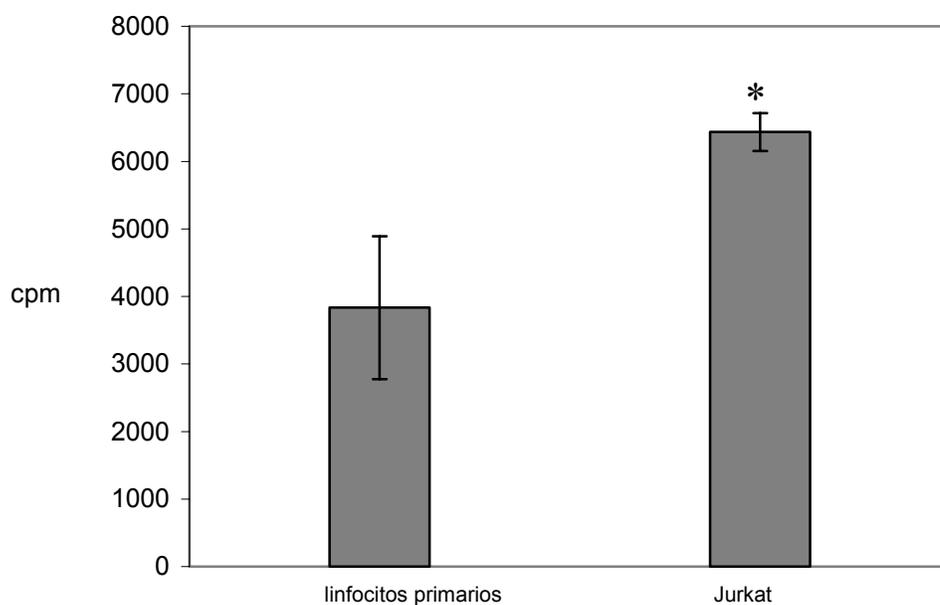


Figura 23. Actividad enzimática basal de linfocitos T (10^6 células) procedentes de línea tumoral (n=2) frente a linfocitos T primarios humanos (n=2).

3.2. Estimulación de la actividad enzimática de PARP en células tumorales T (Jurkat) con Ionomicina y PMA.

En la figura 24 se muestra como varía la actividad de PARP en linfocitos T procedentes de línea celular tumoral humana (Jurkat), estimuladas con Ionomicina y PMA, en función del tiempo de estimulación. Se observa cómo aumenta la actividad enzimática de PARP con el tiempo en presencia de estos activadores. Simultáneamente, se activó un replicado de las muestras anteriores con H_2O_2 durante 15 minutos, como control positivo de estimulación de PARP, en el que se aprecia aumento significativo de dicha actividad respecto a sus respectivos valores basales.

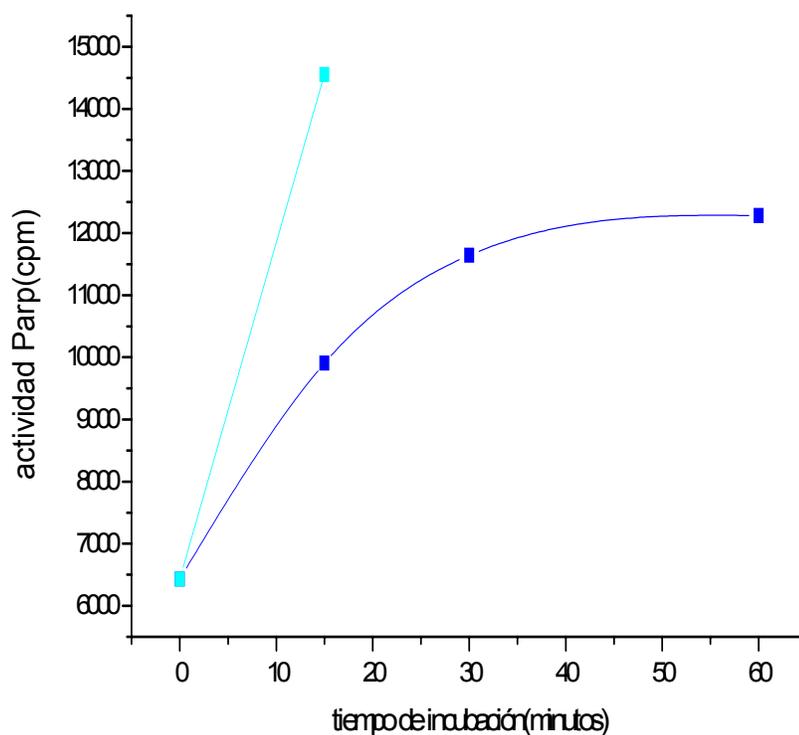


Figura 24. Variación de la actividad enzimática de PARP en células tumorales T (Jurkat), en función del tiempo de estimulación con PMA+I (■), expresada en cpm/millón de células, frente a control positivo con H_2O_2 (■).

3.3. Variación de la actividad enzimática de PARP en linfocitos T humanos, procedentes de sujetos control, estimulados con Ionomicina y PMA.

En la figura 25 se muestra como varía la actividad enzimática de PARP de linfocitos T procedentes de individuos sanos, con Ionomicina y PMA, en función del tiempo de estimulación. Se observa cómo aumenta la actividad enzimática basal de PARP en presencia de Ionomicina y PMA conforme aumenta el tiempo de estimulación. Simultáneamente se activó un replicado de la muestra con H_2O_2 como control positivo de activación de PARP.

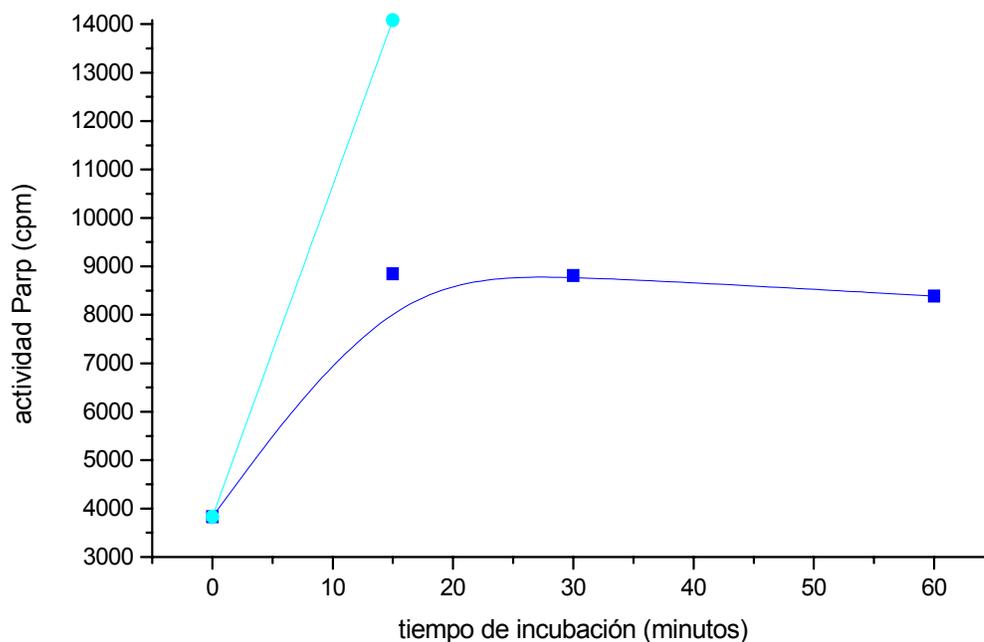


Figura 25. Variación de la actividad enzimática de PARP en linfocitos T humanos en función de tiempo de estimulación con PMA+I (■), expresada en cpm/millón de células, frente a control positivo con H_2O_2 (◆).

3.4. Comparación de la variación de la actividad enzimática de PARP entre linfocitos T humanos (control) y tumorales (Jurkat) en función del tiempo de estimulación con Ionomicina y PMA.

En la figura 26 se muestra como varía la actividad enzimática de PARP de linfocitos T procedentes de línea celular tumoral humana (Jurkat) frente a linfocitos T procedentes de sujetos control, en función del tiempo de estimulación con Ionomicina y PMA. En ambos casos se aprecia un aumento de la actividad enzimática de PARP con el tiempo de estimulación.

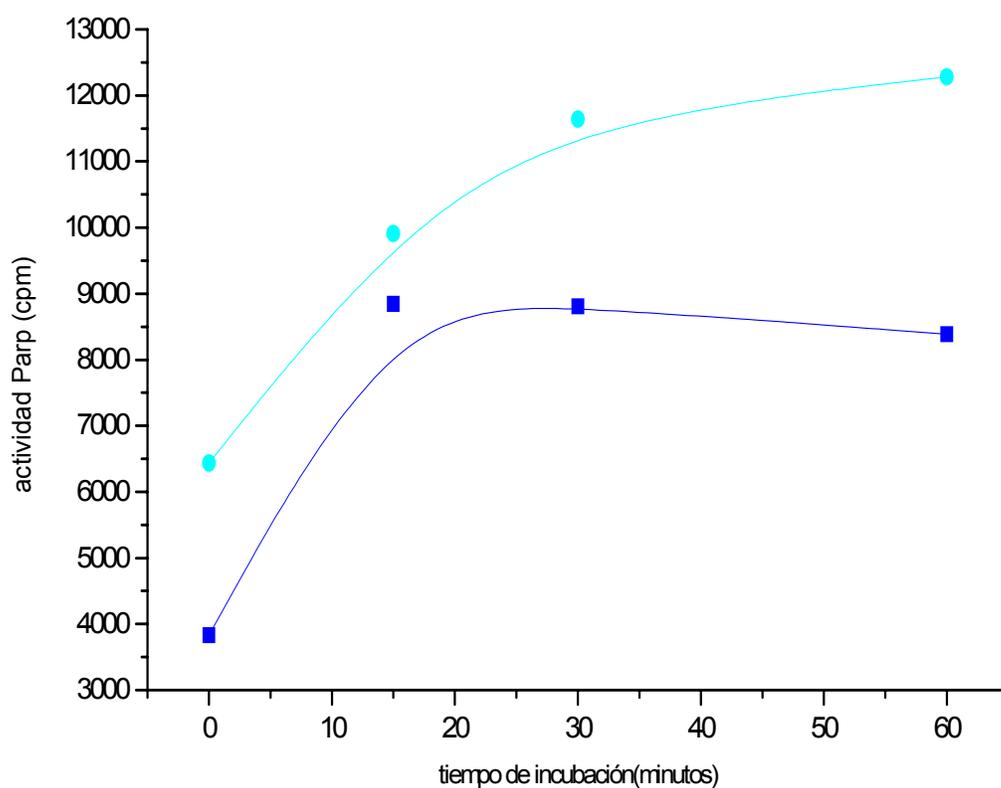


Figura 26. Comparación entre la actividad PARP en linfocitos T humanos procedentes de sujetos control (■) y de línea tumoral (Jurkat) (●) tras estimulación con Ionomicina+PMA.

3.5. Variación de la actividad enzimática de PARP en linfocitos T humanos en función del tiempo de estimulación con Ionomicina y PMA, en presencia de inhibidores de la misma (PJ34).

En la figura 27 se muestra como varía la actividad de PARP en células T procedentes de línea tumoral humana Jurkat y en linfocitos T de sujetos sanos (control) en función del tiempo de estimulación con Ionomicina + PMA, en presencia de PJ34 a una concentración de 30 μ M. A esta concentración de inhibidor la actividad de PARP disminuye, en ambos tipos celulares, en función del tiempo de incubación, hasta valores indetectables, pues no hay diferencias significativas con la actividad inespecífica de PARP.

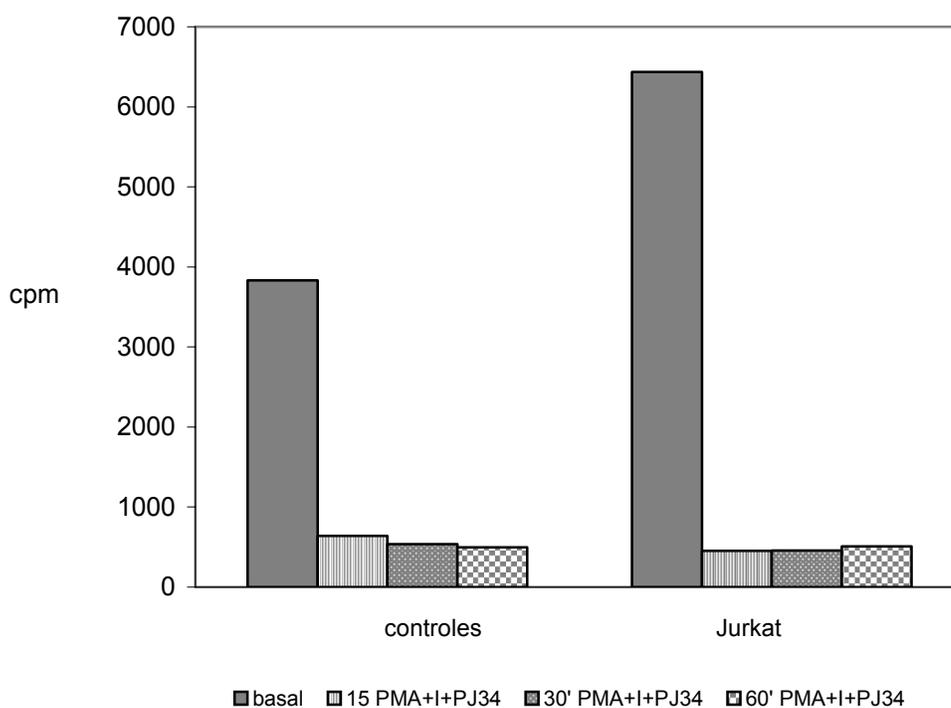


Figura 27. Variación de la actividad de PARP en linfocitos T tras estimulación con PMA+I en presencia de PJ34 a distintos tiempos de incubación (15, 30 y 60 minutos), en cpm por millón de células.

V.DISCUSIÓN

Las reacciones de poli-ADP-ribosilación son mediadas en gran parte por PARP-1, el miembro mejor conocidos de la familia PARP que junto con PARP-2 son los únicos miembros de esta familia cuya actividad enzimática es dependiente del daño en el DNA (Menissier de Murcia y col., 2003; Ame y col., 1999, 2004; Schreiber y col., 2002, Schreiber y col., 2006). Utilizando extractos celulares, se ha demostrado que la poli-ADP-ribosilación estimulada por DNA roto está mediada por PARP-1, mientras que PARP-2 es sólo responsable del 10-15% del total de la actividad poli-ADP-ribosa polimerasa en estas condiciones experimentales (Schreiber et al., 2002). Sin embargo, cada vez van apareciendo nuevos datos que nos indican que la actividad enzimática de PARP-1 puede ser estimulada independientemente de daño en el ADN, por ciertas estructuras del ADN (Kun et al., 2002), polinucleosomas (Kim et al., 2004), además de por metabolismo de calcio y Erk2 fosforilada en neuronas y cardiomiocitos (Homburg et al., 2000; Cohen-Armon et al., 2007).

En este trabajo, nos hemos centrado en poner a punto un método cuantitativo de medida de la actividad poli-ADP-ribosa polimerasa en linfocitos T y B permeabilizados utilizando $^3\text{H-NAD}^+$ que va a ser incorporado a las proteínas nucleares por la actividad enzimática PARP. Otros métodos dirigidos a la identificación de la formación de polímero de ADP-ribosa, como consecuencia de la actividad de las enzimas PARP, utilizando anticuerpos frente a ese polímero y técnicas de *western-blot* ó inmunofluorescencia no permiten cuantificar la actividad enzimática en la forma que puede hacerlo la incorporación de un componente radioactivo a las proteínas celulares como consecuencia de la actividad enzimática.

La principal ventaja de la utilización de una técnica radiactiva es sin duda su alta sensibilidad, pues el número de desintegraciones detectadas (cpm) es directamente proporcional al número de moléculas radiactivas incorporadas, lo que permite en nuestro caso, la cuantificación, a nivel prácticamente molecular, del polímero radiactivo incorporado a las proteínas nucleares. Esta alta sensibilidad se confirma con el límite de detección de la técnica, 399 cpm, indicándonos así que nos movemos en el rango de las centésimas de nanomol de NAD^+ .

El procedimiento presenta, asimismo, una buena precisión con un coeficiente de variación inferior al 15% y una buena exactitud pues la linealidad muestra un coeficiente de regresión cercano a la unidad y ordenadas en el origen en el rango del control negativo. Todo ello confirma la existencia de un error sistemático mínimo en las medidas realizadas.

Finalmente, dado que es, aunque cuantitativo, un procedimiento indirecto de medida, es fundamental verificar que las desintegraciones obtenidas son debidas exclusivamente a la actividad enzimática de PARP y no a la incorporación de $^3\text{H-NAD}^+$ por otros mecanismos. Hemos comprobado que, en presencia de inhibidores de la actividad enzimática de PARP, dicha actividad disminuye con el aumento de la concentración de inhibidor presente en el medio. A la concentración de inhibidor adecuada la medida de actividad enzimática de PARP no muestra diferencias estadísticamente significativas respecto a la del control negativo. Todo ello confirma la ausencia significativa de actividad no PARP en nuestras medidas.

Una vez puesto a punto el método cuantitativo de medida, el siguiente objetivo que nos planteamos fue aplicar dicho método a determinar la actividad enzimática de PARP en timocitos procedentes de ratones $\text{Parp-1}^{-/-}$ y ratones $\text{Parp-2}^{-/-}$ y comparar dicha actividad con la actividad presente en timocitos de ratones control. Esta determinación era importante, puesto que hemos observado que los ratones $\text{Parp-2}^{-/-}$, pero no los ratones $\text{Parp-1}^{-/-}$, presentan una reducción en el número de timocitos $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+(\text{DP})$ como consecuencia de una mayor susceptibilidad a apoptosis (Yélamos et al., 2006). La pregunta que nos planteamos es si ese fenotipo estaba asociado con la actividad de poli-ADP-ribosilación mediada por PARP-2 ó por el contrario estaba más relacionada con interacciones moleculares con otras proteínas ó con el DNA. Al cuantificar la actividad enzimática presente en los timocitos $\text{Parp-2}^{-/-}$, observamos que dicha actividad no estaba disminuida con respecto a la actividad observada en timocitos de ratones control, mientras que la actividad en los timocitos $\text{Parp-1}^{-/-}$ sí que estaba significativamente disminuida. Este dato nos sugiere que, *a priori*, la actividad enzimática de PARP no sería la responsable del fenotipo observado, aunque es importante destacar que hemos observado un incremento significativo de la actividad PARP en ausencia de PARP-2 que sí que podría, de alguna

forma, afectar al fenotipo observado. Este incremento de actividad nos sugiere también un efecto de PARP-2 en una posible regulación negativa de la actividad enzimática de PARP-1 por mecanismos que sería interesante investigar.

Aprovechando las posibilidades que nos brinda el método utilizado, pudimos comprobar que las diferencias encontradas en la actividad enzimática de PARP en timocitos procedentes de ratones *Parp-1^{-/-}* y ratones *Parp-2^{-/-}* respecto a sus diferentes ratones control se repetían en el caso de los esplenocitos. Verificamos, al cuantificar la actividad enzimática presente en los esplenocitos *Parp-2^{-/-}*, que dicha actividad tampoco estaba disminuida con respecto a la observada en esplenocitos de ratones control, mientras que la actividad en los esplenocitos *Parp-1^{-/-}* sí estaba disminuida y de forma estadísticamente significativa. Estos valores de actividad en ratones *Parp-2^{-/-}* sugieren, como en el caso de los timocitos, el efecto de PARP-2 en una posible regulación negativa de la actividad enzimática de PARP-1.

A continuación medimos la actividad enzimática de esplenocitos T y B con el fin de estudiar si existían diferencias en su contribución a la actividad esplenocitaria total. Aunque se mantienen las diferencias de actividad encontradas entre los distintos genotipos estudiados, no se encuentran diferencias significativas entre la actividad enzimática de linfocitos T y B ni entre sí ni con la actividad de esplenocitos totales en un mismo genotipo.

Otro aspecto fundamental que nos ha permitido explorar la puesta a punto de la técnica de medida cuantitativa de la actividad PARP ha sido analizar la actividad PARP en respuesta a diferentes estímulos en linfocitos T. La estimulación de los linfocitos T conduce a la activación de diferentes cascadas de señalización mediadas por kinasas, fosfatasas, flujos de calcio y otros mediadores a nivel de la membrana plasmática y el citoplasma, que conducen finalmente a la translocación de factores de transcripción del citoplasma al núcleo y por consiguiente, a la modulación de la actividad transcripcional dependiente de estos factores de transcripción (Crabtree & Clipstone, 1994). Todos estos procesos, deben estar regulados de forma muy precisa para asegurar una correcta función efectora del linfocito T. Aunque los mecanismos de señalización que tienen lugar a nivel de la membrana y el citoplasma se conocen relativamente bien, los mecanismos de modulación que tienen lugar

a nivel nuclear son mucho menos conocidos. Los cambios transcripcionales están estrechamente regulados por una gran variedad de mecanismos, entre los que se incluyen las interacciones entre redes complejas de factores de transcripción y regiones del DNA reguladas en cis, junto con cambios epigenéticos en la estructura de la cromatina mediados por reacciones de acetilación, fosforilación, metilación y ubiquitinación (Ansel y col 2006). En los últimos años se han aportado evidencias importantes de las reacciones de poli-ADP-ribosilación mediadas por la enzimas PARP en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo y en respuesta a señales celulares específicas, ejerciendo su acción a diferentes niveles (Kraus and Lis 2003; Schreiber 2006).

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan la primera evidencia experimental de la activación de PARP durante la estimulación de los linfocitos T humanos con PMA+ ionomicina, tratamiento que mimetiza la señalización mediada a través del TCR en presencia de coestimulación. La especificidad de esta activación viene dada por el hecho de la inhibición en la formación de poli-ADP-ribosa (PAR) en presencia de inhibidores farmacológicos de PARP en una forma dependiente de la dosis de fármaco utilizada. En este estudio, la presencia de PAR es aparente desde los 15 primeros minutos de estimulación celular hasta los 60 minutos, alcanzando un máximo a los 45 minutos, tiempo a partir del cual el polímero parece empezar a ser degradado. Recientemente, hemos demostrado que la activación temprana de los linfocitos T por PMA + ionomicina no induce fosforilación en la histona H2AX (Valdor et al., 2007). La fosforilación de H2AX es un indicador temprano de roturas en la doble cadena del ADN (DSB) (Rogakou et al., 1998). Este resultado nos sugiere que la activación de PARP tras la estimulación de los linfocitos T tiene lugar en ausencia aparente de daño en el ADN. Este dato está en consonancia con estudios previos en los que se ha demostrado que la actividad PARP puede ser estimulada independientemente de daño en el ADN, por ciertas estructuras del ADN (Kun et al., 2002), polinucleosomas (Kim et al., 2004), además de por metabolismo de calcio y Erk2 fosforilada en neuronas y cardiomiocitos (Homburg et al., 2000; Cohen-Armon et al., 2007). Estos últimos trabajos nos sugieren que el estado fosforilado de Erk2, el cual tiene lugar en la activación de células T (Cantrell, 1996), podría ser el responsable de la activación de PARP observada en los linfocitos T.

En relación con el resultado anterior, también hemos puesto de manifiesto una activación de PARP en respuesta a la estimulación con anticuerpos dirigidos a la molécula CD3 sola así como tras la estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. La estimulación simultánea con anti-CD3 y anti-CD28 induce unas rutas de señalización similares a las inducidas tras la estimulación con PMA + ionomicina.

En resumen, en este trabajo hemos optimizado un método cuantitativo de medida de la actividad enzimática de las enzimas poli-ADP-ribosa polimerasas que hemos aplicado inicialmente a células del sistema inmune como son los linfocitos T, en diferentes estadios de diferenciación, y los linfocitos B. Esta optimización nos ha permitido demostrar la activación de PARP en linfocitos T tras la respuesta a estímulos que no producen daño aparente en el DNA así como observar una posible regulación de la actividad enzimática dependiente de PARP-1 por PARP-2 en timocitos y esplenocitos. Sin duda alguna, la aplicación de la metodología optimizada en este trabajo puede ser de gran ayuda en el campo de la investigación de las reacciones de poli-ADP-ribosilación y a nivel clínico, si finalmente los ensayos clínicos utilizando inhibidores de PARP en diferentes patologías resultan de utilidad clínica.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados del presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

Primera: El método de medida utilizado es adecuado para la determinación cuantitativa de la actividad enzimática de PARP en células permeabilizadas, tanto en situaciones basales como de estimulación o inhibición.

Segunda: La alta sensibilidad del método permite la detección a nivel molecular del polímero incorporado. El límite de detección indica que las muestras estudiadas están en el rango de centésimas de nanomol de sustrato $^3\text{H-NAD}^+$.

Tercera: La especificidad que presenta el método de medida permite asegurar que la actividad de tritio detectada, procedente del consumo de $^3\text{H-NAD}^+$ y su incorporación a proteínas celulares, se debe exclusivamente a la actividad enzimática de PARP celular.

Cuarta: el método presenta una precisión, linealidad y exactitud tales que minimizan los posibles errores aleatorios y sistemáticos del procedimiento y garantizan la medida de la actividad enzimática de PARP presente con un elevado rendimiento.

Quinta: La actividad enzimática de PARP no parece ser la responsable del aumento de susceptibilidad a la apoptosis observado en timocitos $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ (DP) de ratones $\text{Parp-2}^{-/-}$; aunque no descartamos que el incremento de la actividad PARP en ausencia de PARP-2 pueda, de alguna forma, afectar al fenotipo observado.

Sexta: El incremento de actividad PARP en ausencia de PARP-2 detectado en timocitos y esplenocitos nos sugiere un efecto de PARP-2 en una posible regulación negativa de la actividad enzimática de PARP-1.

Séptima: La medida de la actividad enzimática de PARP en linfocitos T tras su estimulación con PMA+ ionomicina demuestra la capacidad de activación de PARP en ausencia aparente de daño en el DNA celular.

Octava: El aumento de actividad enzimática PARP en linfocitos T de ratón $\text{Parp-1}^{+/+}$, en presencia de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD3 + anti-CD28, corrobora un papel importante de PARP-1 en la activación de los linfocitos T en ausencia de daño en el DNA.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Abdelkarim GE et al. Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in in vitro and in vivo models of stroke. *Int J Mol Med.* 2001 Mar;7(3):255-60.
- Aceves M et al.. A new pharmacological effect of salicylates: inhibition of NFAT-dependent transcription. *The Journal of Immunology.* 2004.173:5721-5729.
- Aguiar RC, Yakushijin Y, Kharbanda S, Salgia R, Fletcher JA and Shipp MA. BAL is a novel risk-related gene in diffuse large B-cell lymphomas that enhances cellular migration. *Blood.*2000. 96:4328-4334.
- Aguiar RC, Takeyama K, He C, Kreinbrink K and Shipp MA (2005). B-aggressive lymphoma (BAL) family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity. *J. Biol. Chem.* 280:33756-33765.
- Akiyama T, Takasama S, Nata K, Kobayashi S, Abe M, Shervani NJ, Ikeda T, Nakagawa K, Unno M, Matsuno S, and Okamoto H. Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing β -cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcriptional by autopoly(ADP-ribosilation). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. 98, 48-53.
- Álvarez González y Mendoza Álvarez. Dissection of ADP-ribose polymer synthesis into individual steps of initiation, elongation, and branching. *Biochimie.* 1995;77(6):403-7.
- Álvarez-González R, Watkins TA, Gill PK, Reed JL, and Mendoza-Álvarez H. Regulatory mechanisms of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol. Cell. Biochem.* 1999. 193, 19-22.
- Althaus y col, 1982. ADP-ribosyltransferase activity in cultured hepatocytes. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol 257, N°10, issue of may 25 pp5528-5535.
- Amé et al. A bidirectional promoter connects the poly(ADP-ribose) polymerase 2 (PARP-2) gene to the gene for RNase P RNA. structure and expression of the mouse PARP-2 gene. *J Biol Chem.* 2001 Apr 6;276(14):11092-9.
- Amé JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Hoger T, Ménissier-de Murcia J and de Murcia G.1999. PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* 274:17860-17868.
- Ame, J.C., Spenlehauer, C., and de, M.G. The PARP superfamily. *Bioessays.* 2004, 26 (8): 882-893.
- Amstad y col.Mechanism of c-fos induction by active oxygen. *Cancer Res.* 1992 Jul 15;52(14):3952-60.

- Andreone TL, O'Connor M, Denenberg A, Hake PW and Zingarelli B. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates activation of activator protein-1 in murine fibroblasts. *Journal of Immunology*. 2003. 170, 2113-2120.
- Ansel, K.M. et al. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu.Rev.Immunol*. 2006. 24 607-656.
- Aoufouchi S, Yélamos J, and Milstein C. Inhibition of apoptosis of a PARP^{-/-} cell line transfected with PARP DNA-binding domain mutants. *J Mol Biol*. 1999. 290, 943-949.
- Augustin A, Spenlehauer C, Dumond H, Ménissier-De Murcia J, Piel M, Schmit AC, Apiou F, Vonesch JL, Kock M, Bornens M, and De Murcia G. PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J. Cell Sci*. 2003. 116:1551-1562.
- Babiychuk E, Cottrill PB, Storozhenko S, Fuangthong M, Chen Y, O'Farrell MK, Van Montagu M, Inzé D and Kushnir S. Higher plants possess two structurally different poly(ADP-ribose) polymerases. *The plant Journal*.1998. 15:635-645.
- Bai P et al. PARP-2 controls adipocytedifferentiation and adipose tissue function through the regulation of the activity of RXR/PPARgamma heterodimer. *J. Biol. Chem*. 2006. (in press)
- Bakondi E, Bai P, Szabo E, Hunyadi J, Gergely P, Szabo C, and Virág, L. Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate. *J. Histochem. Cytochem*. 2002. 50, 91-98.
- Banasik M, Komura H, Shimoyama M, Ueda K. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferases. *J. Biol. Chem*. 1992. 267, 1569-1575.
- Bauer PI, Buki KG, and Kun E. Macromolecular association of ADPribosyltransferase and its correlations with enzymatic activity. *Biochem. J*. 1990. 170, 17-26.
- Bauer PI, Chen HJ, Kenesi E, Kenessey I, Buki KG, Kirten E, Hakam A, Hwang JI, and Kun E. Molecular interactions between poly(ADP-ribose) polymerase(PARP-1) and topoisomerase I (Topo I): identification of topology of binding. *FEBS Lett*. 2001. 506, 239-242.
- Benchoua A, Couriaud C, Guegan C, Tartier L, Couvert P, Friocourt G, Chelly J, Menissier-de Murcia J and Onteniente B. Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose) polymerase-2. *J. Biol. Chem*. 2002. 277:34217-34222.
- Beneke R, Geisen C, Zevnik B, Bauch T, Muller WU, Kupper JH, Moroy T. DNA excision repair and DNA damage induced apoptosis are linked to Poly(ADP-

- ribosyl)ation but have different requirements for p53. *Mol. Cell Biol.* 2000. 20, 6695-6703.
- Berger NA. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat. Res.* 1985. 101, 4-15.
 - Berry DM, Williams K, and Meckling-Gill, KA. All trans retinoic acid induces apoptosis in acute promyelocytic NB4 cells when combined with isoquinolinediol, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Leuk. Res.* 2000.24, 307-316.
 - Bhatia M, Kirkland JB, and Meckling-Gill KA. Modulation of poly(ADPribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukaemia cells. *Biochem. J.* 1995.308, 131-137.
 - Bieganowski P, Brenner C. The reported human NADsyn2 is ammonia-dependent NAD synthetase from a pseudomonad. *J Biol Chem.* 2003 Aug 29;278(35):33056-9. Epub 2003 May 30.
 - Blackburn, E.H. Switching and signaling at the telomere. *Cell.* 2001.106 (6): 661-673.
 - Bouchard VJ y col. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp Hematol.* 2003 Jun;31(6):446-54. Review.
 - Boulares AH, Zoltoski AJ, Contreras FJ, Yakovlev AG, Yoshihara K, and Smulson ME. Regulation of DNAS1L3 endonuclease activity by poly(ADPribosyl) ation during etoposide-induced apoptosis. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage in endonuclease activation. *J. Biol Chem.* 2001. 277, 372-378.
 - Bredehorst R y col. Increase of mono(ADP-ribose) protein conjugate levels in rat liver induced by nicotinamide administration. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 1980. Apr;361(4):559-62.
 - Brennan RG, and Mathews BW. The helix-turn-helix DNA binding motif. *J. Biol. Chem.* 1989. 264, 1903-1906.
 - Broda R, Pochwalski K and Radoszewski T .Calculation of liquid-scintillation detector efficiency *Appl. Radiat. Isot.* 1988. 39 159–64
 - Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ and Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature.* 2005. 434:913-7.
 - Burkat V, Wang ZQ, Radons JR, Heller B, Herceg Z, Stingl L, Wagner EF and Kolb H. Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozotocin. *Nat. Med.* 1999. 5, 314-319.

- Burkle A. Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays*. 2001. 23, 795-806.
- Burkle y col. Ageing and PARP. *Pharmacol Res*. 2005 Jul;52(1):93-9. Review.
- Burkle A Beneke S Muiras ML Poly(ADP-ribosyl)ation and aging. *Exp Gerontol*. 2004 Nov-Dec;39(11-12):1599-601. Review.
- Butler AJ, and Ordahl CP. Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol*. 1999.19, 296-306.
- Calabrese CR, Almassy R, Barton S, Batey MA, Calvert AH, Canan-Koch S, Durkacz BW, Hostomsky Z, Kumpf RA, Kyle S, Li J, Maegley K, Newell DR, Notarianni E, Stratford IJ, Skalizky D, Thomas HD, Wang LZ, Webber SE, Williams KJ, Curtin NJ Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst*. 2004. 96:56-67.
- Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, and Shall S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res*. 1996. 24, 4387-4394.
- Calkhoven CF, and Ab G. Multiple steps in the regulation of transcription factor level and activity. *Biochem J*.1996. 317, 329-342.
- Canitrot Y, de Murcia G, Sales B. Decreased expresión of topoisomerase libeta in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cells. *Nucl Acids Res*. 1998. 26, 5134-5138.
- Cantrell, D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu.Rev.Immunol*.1996.14 259-274.
- Carrillo A, Monreal Y, Ramirez P, Marin L, Parrilla P, Oliver FJ and Yelamos J. Transcription regulation of TNF-alpha-early response genes by poly(ADP-ribose) polymerase-1 in murine heart endothelial cells. *Nucleic Acids Res*. 2004. 32:757-766.
- Carrillo A, Monreal Y, Ramirez P, Suarez E, Parrilla P, Menissier-de Murcia J, de Murcia G, Alvarez-Vallina L and Yelamos J. Establishment of an immortalized PARP-1^{-/-} murine endothelial cell line: a new tool to study PARP-1 mediated endothelial cell dysfunction. *J Cell Biochem*. 2005. 94:1163-1174.
- Cervellera MN, and Sala A. Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J Biol Chem*. 2000. 275, 10692-10696.
- Chalmers A et al. PARP-1, PARP2 and the cellular response to low doses of ionizing radiation. *Int J Radiat.Oncol.Biol.Phys*.2004. 58, 410-419.

- Chalmers AJ. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and ionizing radiation: sensor, signaller and therapeutic target. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2004.16:29-39.
- Chambon P, Weill JD, and Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1963. 11, 39-43.
- Chang P, Coughlin M, Mitchison TJ . Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function. *Nat. Cell Biol.* 2005. 7:1133-1139.
- Chang WJ, and Alvarez-González R. The sequence-specific DNA binding of NF- κ B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly(ADPribose) polymerase 1. *J. Biol. Chem.* 2001. 276, 47664-47670.
- Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, Zacharowski K, Stewart KN, Mota- Filipe H, and Thiernemann C. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int.* 2000.58, 658-673.
- Chen CF, Wang D, Hwang CP, Liu HW, Wei J, Lee RP, and Chan HI. The protective effect of niacinamide on ischemia-reperfusion-induced liver injury. *J. Biomed. Sci.* 2001. 8, 446-452.
- Chen L. et al. Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA. *Nature.* 1998. 392 (6671): 42-48.
- Chen WF. Capacity of thymic stromal cell in the induction of T cell development.s2-1 p51. *The First FIMSA Congress.* 1996.Adelaide, Australia.
- Chen YC y col. Elevation of apoptotic potential by anoxia hyperoxia shift in NIH3T3 cells. *Mol Cell Biochem.* 1999 Jul;197(1-2):147-59.
- Chiang SK and Lam TT. Post-treatment at 12 or 18 hours with 3- aminobenzamide ameliorates retinal ischemia-reperfusion damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000. 41, 3210-3214.
- Chiarugi A. Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The“suicide hypothesis” revisited. *TIPS.* 2002. 23, 122-129.
- Choi YW, Lee JC and Ross SR. Requirement for the simian virus 40 small tumor antigen in tumorigenesis in transgenic mice. *Mol. Cell Biol.* 1988. 8, 3382-3390.
- Choo KH Centromere DNA dynamics: latent centromeres and neocentromere formation. *Am J Hum Genet.*1997.61:1225-1233.
- Cohen-Armon, M. et al. Long-term memory requires polyADP-ribosylation. *Science.* 2004. 304 (5678): 1820-1822.

- Cohen-Armon, M. et al. DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol.Cell.* 2007, 25 (2): 297-308.
- Cohen-Armon, M. PARP-1 activation in the ERK signaling pathway. *Trends Pharmacol Sci.* 2007 Nov;28(11):556-60.
- Cole K y Pérez Polo JR. Neuronal trauma model: in search of Thanatos. *Int J Dev Neurosci.* 2004 Nov;22(7):485-96. Review.
- Conde C, Mark M, Oliver FJ, Huber A, de Murcia G, and Menissier-de Murcia J. Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. *EMBO J.* 2001. 20, 3535-3543.
- Cook, B.D. et al. Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol.Cell Biol.* 2002. 22 (1): 332-342.
- Corral J, Yélamos J, Hernández-Espinosa D, Monreal Y, Mota R, Arcas I, Miñano A, Parrilla P, Vicente V. Role of lipopolysaccharide and cecal ligation and puncture on blood coagulation and inflammation in sensitive and resistant mice models. *Am J Pathol.* 2005 Apr;166(4):1089-98.
- Cortés U y col. Depletion of the 110-kilodalton isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase increases sensitivity to genotoxic and endotoxic stress in mice. *Mol Cell Biol.* 2004 Aug;24(16):7163-78.
- Cosi C y col. Benzamide, an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, attenuates methamphetamine-induced dopamine neurotoxicity in the C57B1/6N mouse. *Brain Res.* 1996 Oct 7;735(2):343-8.
- Cosi C. New inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase and their potencial therapeutic targets. *Expert Opin. Ther. Patents.* 2002. 12, 1047-1071.
- Crabtree, G.R. and Clipstone, N.A. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu.Rev.Biochem.* 1994.,63:1045-1083.
- Cryns V and Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev.* 1998 12:1551-1570.
- Curtin NJ. PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med.* 2005 Mar 15;7(4):1-20. Review.
- Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Threadgill M, Caputi AP, and Thiemermann C. Effects of 5-aminoiso-quinolinone, a watersoluble, potent inhibitor of the activity of poly(ADP-ribose) polymerase, in a rodent model of lung injury. *Biochem. Pharmacol.* 2002. 63, 293-304.

- d'Adda di Fagagna F, Hande MP, Tong WM, Lansdorp PM, Wang ZQ, and Jackson SP. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nat. Genet.* 1999. 23, 76-80.
- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, and Poirier GG. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J.* 1999. 342, 249-268.
- D'Amours D, Sallmann FR, Dixit VM, and Poirier GG. Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteasas: implications for apoptosis. *J. Cell Sci.* 2001. 114, 3771-3778.
- Danilovs, J. A., A. Auayoub, and P. I. Terasaki. 1980. B lymphocyte isolation by thrombin/ nylon wool. In *Histocompatibility Testing. 1980. UCLA Tissue Typing Lab, Los Angeles.* 287.
- Dantzer F et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. 103, 14854-14859.
- Dantzer F, Nasheuer HP, Vonesch JL, de Murcia G, and Menissier de Murcia J. Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res.* 1998. 26, 1891-1898.
- Dantzer F, Giraud-Panis MJ, Jaco I, Amé JC, Schultz I, Blasco M, Koering CE, Gilson E, Menissier de Murcia J, de Murcia G and Schreiber V. Functional interaction between poly(ADP-ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol. Cell Biol.* 2004. 24:1595-1607.
- Darke C and Dyer P. HLA-DR antigens and properdin factor B allotypes in responders and non-responders to the Rhesus-D antigen. *Tissue Antigens.* 1983 Apr;21(4):333-5.
- Davidovic L, Vodenicharov M, Affar EB, and Poirier GG. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp. Cell Res.* 2001. 268, 7-13.
- d'Adda di F.F. et al. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nat. Genet.* 1999, 23 (1): 76-80.
- Decker y Muller. Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002 Sep;3(3):275-83. Review.
- Delaney y col. Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly(adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines. *Clin Cancer Res.* 2000 Jul;6(7):2860-7.
- de Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene.* 2002. 21:532-540.

-
- De Murcia G., and Shall S. In From DNA Damage and Stress Signaling to Cell Death: Poly ADP-Ribosylation Reactions, eds New York: *Oxford University Press*, 2000. pp 283.
 - De Murcia, J.M. et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997. 94 (14): 7303-7307.
 - Ducrocq S, Benjelloun N, Plotkine M, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue. Poly(ADP-ribose) synthase inhibition reduces ischemic injury and inflammation in neonatal rat brain. *J. Neurochem.* 2000.74, 2504-2511.
 - Durkacz BW y col. (ADP-ribose)n participates in DNA excision repair. *Nature.* 1980 Feb 7;283(5747):593-6.
 - Dynek JN y Smith S. Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis. *Science.* 2004 Apr 2;304(5667):97-100.
 - Earle E y col. Poly(ADP-ribose) polymerase at active centromeres and neocentromeres at metaphase. *Hum Mol Genet.* 2000 Jan 22;9(2):187-94.
 - Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao A, Pieper ZQ, Wang TM, Dawson TM, Snyder SH, and Dawson VL. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat. Med.* 1997. 3, 1089-1095.
 - Endres M, Wang ZQ, Namura S, Waeber C and Moskowitz MA . Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997. 17:1143-51.
 - Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC and Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005. 434:917-921.
 - Feng Y and LeBlanc MH . Drug-induced hypothermia begun 5 minutes after injury with a poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase inhibitor reduces hypoxic brain injury in rat pups. *Crit Care Med.* 2002. 30:2420-2424.
 - Fisher, A.E. et al. Poly(ADP-ribose)polymerase I accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose)glycohydrolase. *Mol. Cell. Biol.* 2007. 27, 5597-5605.
 - Gagné J.P. et al. A proteomic approach to the identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as a new family of poly(ADP-ribose)-binding proteins. *Biochem J.* 2003 Apr 15;371(Pt 2):331-40.

- Gagné J.P. et al. The expanding role of poly(ADP-ribose) metabolism: current challenges and new perspectives. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2006. 18 (2): 145-151.
- Gao, G.F. and Jakobsen, B.K. Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the Tcell receptor. *Immunol. Today.* 2000. 21 (12): 630-636.
- Gao G, Guo X and Goff SP. Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein. *Science.* 2002. 297:1703-1706.
- García-Soriano F, Pacher P, Southan GJ, Salzman AL, and Szabo, C. Rapid reversal of the diabetes endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Cir. Res.* 2001a. 89, 684-691.
- García-Soriano F, Virág L, Jagtap P, Szabo E, Mabley JG, Liaudet L, Marton A, Hoyt DG, Murthy KGK, Salzman AL, Southan GJ, and Szabo, C. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nat. Med.* 2001b. 7, 108-113.
- García-Soriano F, Virág L, and Szabo C. Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J. Mol. Med.* 2001c. 79, 437-448.
- García-Soriano F, Liaudet L, Szabo E, Virág L, Mabley J, Pacher P, and Szabo C. Resistance against acute septic peritonitis in poly(ADP-ribose) polymerase deficient mice. *Shock.* 2002. 17, 286-292.
- Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixin VM, Salvesen GS, and Poirier GG. Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J. Biol Chem.* 1999. 274, 28379-28384.
- Ghibelh L, Nosseri C, Coppola S, Maresca V, and Dini L. The increase in H₂O₂-induced apoptosis by ADP-ribosylation inhibitors is related to cell blebbing. *Exp. Cell Res.* 1995. 221, 470-477.
- Goenka S and Boothby M. Selective potentiation of Stat-dependent gene expression by collaborator of Stat6 (CoaSt6), a transcriptional cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006. 103:4210-4215.
- Gomez M, Wu J, Schreiber V, Dunlap J, Dantzer F, Wang Y and Liu Y. PARP1 Is a TRF2-associated poly(ADP-ribose) polymerase and protects eroded telomeres. *Mol Biol Cell.* 2006. 17:1686-1696.
- Gonzalez C, Menissier de Murcia J, Janiak P, Bidouard JP, Beauvais C, Karray S, Garchon HF, and Levi-Strauss M. Unexpected sensitivity of nonobese diabetic mice with a disrupted poly (ADP-ribose) polymerase-1 gene to streptozotocin-induced spontaneous diabetes. *Diabetes.* 2002. 51, 1470-1476.

- Gordon-Shaag A, Yosef Y, Abd El-Latif M, Oppenheim A. The abundant nuclear enzyme PARP participates in the life cycle of simian virus 40 and is stimulated by minor capsid protein VP3. *J. Virol.* 2003. 77, 4273-4282.
- Gradwohl G, Ménissier-de Murcia J, Molinete M, Simonin F, Koken M, Hoeijmakers JHJ, and de Murcia G. The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. 87, 2990-2994.
- Griesenbeck J, Ziegler M, Tomilin N, Schweiger M, Oei SL. Stimulation of the catalytic activity of poly(ADP-ribosyl) transferase by transcription factor Yin Yang 1. *FEBS Lett.* 1999. 443, 20-24.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H and de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell.* 1999. 97:503-514.
- Grube K y col. Direct stimulation of poly(ADP ribose) polymerase in permeabilized cells by double-stranded DNA oligomers. *Analytical Biochemistry.* 1991. 193: 236-239.
- Grube K y Burkle A. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 15;89(24):11759-63.
- Guo TL, Miller MA, Datar S, Shapiro M, and Shenker BJ. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase rescues human T lymphocytes from methylmercury induced apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998. 152, 397-405.
- Ha HC, Hester LD, and Snyder, SH. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. 99, 3270-3275.
- Halliwell B y col. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med.* 1985;8(2):89-193. Review.
- Hanai S y col. Loss of poly(ADP-ribose) glycohydrolase causes progressive neurodegeneration in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jan 6;101(1):82-6. Epub 2003 Dec 15.
- Hasko G, Mabley JG, Németh ZH, Pacher P, Deitch EA and Szabó Csaba. Poly(ADP-ribose) polymerase is a regulator of chemokine production: relevance for the pathogenesis of shock and inflammation. *Molecular Medicine.* 2002. 8, 283-289.
- Hassa PO y Hottinger MO. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci.* 2002. Sep;59(9):1534-53. Review.

- Hassa PO, Covic M, Hasan S, Imhof R, and Hottiger MO. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF- κ B coactivator function. *J. Biol. Chem.* 2001. 276, 45588-45597.
- Hassa PO, Buerki C, Lombardi C, Imhof R, and Hottiger MO. Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J. Biol. Chem.* 2003. 278, 45145-45153.
- Hauschildt S, Scheipers P, Bessler W, Schwartz K, Ullmer A, Flad HD, and Heine H. Role of ADP-ribosylation in activated monocytes/macrophages. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997. 419, 249-252.
- Hay y col. Efficient deletion of normal Brca2-deficient intestinal epithelium by poly(ADP-ribose) polymerase inhibition models potential prophylactic therapy. *Cancer Res.* 2005 Nov 15;65(22):10145-8.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 1994. 2nd ed. pp. 124.
- Homburg, S. et al. A fast signal-induced activation of Poly(ADP-ribose) polymerase: a novel downstream target of phospholipase c. *J. Cell Biol.* 2000. 150 (2): 293-307.
- Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL. Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends. Pharmacol. Sci.* 2004. 25, 259-264.
- Huber A et al. PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA repair (Amst).* 2004. 3, 1103-1108.
- Huletsky et al The effect of poly(ADP-ribosyl)ation on native and H1-depleted chromatin. A role of poly(ADP-ribosyl)ation on core nucleosome structure. *J Biol Chem.* May 1989 25;264(15):8878-86.
- Iwashita A, Mihara K, Yamazaki S, Matsuura S, Ishida J, Yamamoto H, Hattori K, Matsuoka N and Mutoh S V . A new poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, FR261529 [2-(4-chlorophenyl)-5-quinoxalinecarboxamide], ameliorates methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004. 310:1114-24.
- Iwashita A, Hattori K, Yamamoto H, Ishida J, Kido Y, Kamijo K, Murano K, Miyake H, Kinoshita T, Warizaya M, Ohkubo M, Matsuoka N and Mutoh S . Discovery of quinazolinone and quinoxaline derivatives as potent and selective poly(ADP-ribose) polymerase-1/2 inhibitors. *FEBS Lett.* 2005. 579:1389-93.

- Jablonski S. A. y col. The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma*. 1998 Dec;107(6-7):386-96.
- Jagtap P, Soriano FG, Virág L, Liaudet L, Mabley J, Szabo E, Hasko G, Marton A, Lorigados CB, Gallyas F, Sumegi B, Hoyt DG, Baloglu E, VanDuzer J, Salzman AL, Southan GJ, and Szabo C. Novel phenanthridinone inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase: potent cytoprotective and anti-shock agents. *Crit. Care Med.* 2002. 30, 1071-1082
- Jagtap P and Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev. Drug Discov.* 2005. 4:421-440.
- Jijon GB, Churchill T, Malfair D, Wessler A, Jewell LD, Parsons HG, and Madsen KL. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates inflammation in a model of chronic colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000. 279, G641-G651.
- Jung JS, Park MY, Lee RH, Jun JS, and Kim YK. Protection against hydrogen peroxide induced injury in renal proximal tubule cell lines by inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Kidney Blood Press Res.* 2000. 23, 14-19.
- Kallmann H. Scintillation counting with solutions. *Phys. Rev.* 1950. 78: 621–2
- Kaminker y col TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem.* Sep 2001. 276(38):35891-9. Epub 2001 Jul 13.
- Kanai M, Tong WM, Sugihara E, Wang ZQ, Fukasawa K and Miwa M. Involvement of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and poly(ADP-Ribosylation) in regulation of centrosome function. *Mol. Cell Biol.* 2003. 23:2451-2462.
- Kanai M y col. Involvement of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and poly(ADP-Ribosylation) in regulation of centrosome function. *Mol Cell Biol.* Apr 2003;23(7):2451-62.
- Kannan P, Yu Y, Wankhade S, and Tainsky MA. Poly(ADP-ribose) polymerase is a coactivator for AP2-mediated transcriptional activation. *Nucleic. Acids Res.* 1999. 27, 866-874.
- Karras GI, Kustatzcher G, Buhecha HR, Allen MD, Pugieux C, Sait F, Bycroft M and Ladurner AG. The macro domain is an ADP-ribose binding module. *EMBO J.* 2005. 24:1911-1920.
- Katoh, M. and Katoh, M. Identification and characterization of human TIPARP gene within the CCNL amplicon at human chromosome 3q25.31. *Int.J.Oncol.* 2003, 23 (2): 541-547.

- Kaufmann SH, Desnoyer S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993. 53, 3976-3985.
- Kawamisu H y col. Inhibitors of poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase potentiate the antitumor activity of bleomycin against Ehrlich ascites carcinoma. *J Pharmacobiodyn.* 1982.Nov;5(11):900-4.
- Khandoga A, Enders G, Biberthaler P, Krombach F. Poly(ADP-ribose) polymerase triggers the microvascular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2002. 283, G553-560.
- Kickhoefer VA, Siva AC, Kedersha NL, Inman EM, Ruland C, Streuli M and Rome LH. The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol.* 1999. 146:917-928.
- Kim, M.Y. et al. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell.* 2004 .119 (6): 803-814.
- Kim, M.Y., Zhang, T., and Kraus, W.L..Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev.* 2005.19(17): 1951-1967.
- Kim JW, Kim K, Kang K, and Joe CO. Inhibition of homodimerization of poly(ADP-ribose) polymerase by its C-terminal cleavage products produced during apoptosis. *J. Biol Chem.* 2000a. 275, 8121-8125.
- Kim JW, Won J, Sohn S, and Joe CO. DNA-binding activity of the N terminal cleavage product of poly(ADP-ribose) polymerase is required for UV mediated apoptosis. *J. Cell Sci.* 2000b.113, 955-961.
- Kirkland JB. Niacin and carcinogenesis. *Nutr Cancer.* 2003;46(2):110-8. Review.
- Koch-Nolte F, and Haag F. Mono(ADP-ribosyl) transferases and related enzymes in animal tissues: emerging gene families. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997. 419, 1-13.
- Kofler J, Otsuka T, Zhang Z, Noppens R, Grafe MR, Koh DW, Dawson VL, de Murcia JM, Hurn PD and Traystman RJ. Differential effect of PARP- 2 deletion on brain injury after focal and global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006. 26:135-41.
- Komjati K, Mabley JG, Virag L, Southan GJ, Salzman AL and Szabo C . Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition protect neurons and the white matter and regulates the translocation of apoptosis-inducing factor in stroke. *Int J Mol Med.* 2004.13:373-382.
- Kraus WL, and Lis JT. PARP goes transcription. *Cell.* 2003.113, 677-683.

- Kühnle S, Nicotera A, Wendel A, and Leist M. 1999. Prevention of endotoxin-induced lethality, but not of liver apoptosis in poly (ADP-ribose) polymerase deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. 263, 433-438.
- Kun E, Kirsten E, Ordahl CP. Coenzymatic activity of randomly broken or intact double-stranded DNAs in auto and histone H1 trans-poly(ADP-ribosylation), catalyzed by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1). *J. Biol. Chem.* 2002. 277, 39066-39069.
- Kuo ML, Chau YP, Wang JH, and Shiah SG. Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase block nitric oxide-induced apoptosis but not differentiation in human leukemia HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. 219, 502-508.
- Kupper JH, Muller M, Jacobson MK, Tatsumi-Miyajima J, Coyle DL, Jacobson EL, and Burkle A. Trans-dominant inhibition of poly(ADP-ribosylation) sensitizes cells against gamma-irradiation and N-methyl-N'-nitrosoguanidine but does not limit DNA replication of a polyomavirus replicon. *Mol. Cell. Biol.* 1995.15: 3154-3163.
- Kupper JH, Muller M, and Ivo Wolf. NAD⁺ consumption in carcinogen-treated hamster cells overexpressing a dominant negative mutant of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999. 265: 525-529.
- Kustatscher G, Hothorn M, Pugieux C, Scheffzek K and Ladurner AG. Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nature Struct. Mol. Biol.* 2005.12:624-625.
- LaPlaca MC, Zhang J, Raghupathi R, Li JH, Smith F, Bareyre FM, Snyder SH, Graham DI and McIntosh TK. Pharmacologic inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase is neuroprotective following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 2001. 18:369-76.
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, and Earnshaw WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature (Lond).* 1994. 371, 346-347.
- Lebel y col. Genetic cooperation between the Werner syndrome protein and poly(ADP-ribose) polymerase-1 in preventing chromatid breaks, complex chromosomal rearrangements, and cancer in mice. *Am J Pathol.* May 2003;162(5):1559-69.
- Ledoux y col. Mechanisms of nicotinamide and thymidine protection from alloxan and streptozocin toxicity. *Diabetes.* 1988 Aug;37(8):1015-9.
- Leist M, Single B, Kunstle G, Volbracht C, Hentze H, and Nicotera P. Apoptosis in the absence of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1997. 233, 518-522.

- Leppard JB, Dong Z, Mackey ZB, Tomkinson AE. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol. Cell Biol.* 2003. 23, 5919-5927
- Lepiniec L, Babiyshuk E, Kushnir S, Van Montagu M and Inzé D . Characterization of an Arabidopsis thaliana cDNA homologue to animal poly (ADP-ribose) polymerase. *FEBS Lett.* 1995. 364:103-108.
- Li Y y Benezra R. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science.* 1996 Oct 11;274(5285):246-8.
- Li Y y col. Induction of apoptosis in breast cancer cells by TPA. *Oncogene.* 1998 Dec 3;17(22):2915-20.
- Li JH y col, 2001. PARP inhibitors. *IDrugs.* 2001 Jul;4(7):804-12.
- Liaudet L, Szabo A, Soriano FG, Zingarelli B, Szabo C, and Salzman AL. Poly(ADP-ribose) synthetase mediates intestinal mucosal barrier dysfunction after mesenteric ischemia. *Shock.* 2000.14, 134-141.
- Liaudet L, Pacher P, Mabley JG, Virág L, Soriano FG, Hasko G, and Szabo C. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002.165: 372-377.
- Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, and Klungland A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem. Sci.* 1995. 20, 405-411.
- Liu Y, Snow BE, Kickhoefer VA, Erdmann N, Zhou W, Wakeham A, Gomez M, Rome LH and Harrington L. Vault poly(ADP-ribose) polymerase is associated with mammalian telomerase and is dispensable for telomerase function and vault structure in vivo. *Mol. Cell Biol.* 2004.24:5314-5323
- Lonskaya y col Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *J Biol Chem.* 2005 Apr 29;280(17):17076-83.
- Ma Q y col. TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase: a novel response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Nov 30;289(2):499-506.
- Ma, Q. Induction and superinduction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-rho-dioxininducible poly(ADP-ribose) polymerase: role of the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator transcription activation domains and a labile transcription repressor. *Arch.Biochem.Biophys.* 2002.404 (2): 309-316.

- Mabley JG, Jagtap P, Perretti M, Getting SJ, Salzman A, Virág L, Szabo E, Soriano FG, Liaudet L, Abdelkarim GE, Hasko G, Marton A, Southan GJ, and Szabo C. Anti-inflammatory effects of a novel potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase. *Inflamm. Res.* 2001. 50, 561-569.
- Maeda y col, PARP-2 interacts with TTF-1 and regulates expression of surfactant protein-B. *J Biol Chem.* 2006 Apr 7;281(14):9600-6.
- Magni G et al. Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Curr Med Chem.* 2004 Apr;11(7):873-85. Review.
- Mahajan, P.B. and Zuo, Z. Purification and cDNA cloning of maize Poly(ADP)-ribose polymerase. *Plant Physiol.* 1998. 118 (3): 895-905.
- Malanga M, Pleschke JM, Kleczkowska HE, and Althaus FR. Poly(ADPribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding fuctions. *J. Biol. Chem.* 1998. 273, 11839-11843.
- Mandir AS, Poitras MF, Berliner AR, Herring WJ, Guastella DB, Feldman A, Poirier GG, Wang ZQ, Dawson TM, and Dawson VL. NMDA bur not- NMDA Excitotoxicity is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Neurosci.* 2000. 20, 8005-8011.
- Martin DR, Lewington AJ, Hammerman MR, and Padanilam BJ. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates ischemic renal injury in rats. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000. 279, R1834-R1840.
- Martínez-Exposito MJ y col. Retention of the BUB3 checkpoint protein on lagging chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jul 20;96(15):8493-8.
- Masanao Miwa and Mitsuko Masutani. PolyADP-ribosylation and cancer. *Cancer Sci.* 2007 Oct;98(10):1528-35. Epub 2007 Jul 23. Review.
- Masson M, Niedergng C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J and de Murcia G. XRCC1 is specifically associated ith poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell Biol.* 1998. 18:3563-3571.
- Masutani M, Nozaki T, Nishiyama E, Shimokawa T, Tachi Y, Suzuki H, Nakagama H, Wakabayashi K, and Sugimura T. Function of poly(ADPribose) polymerase in response to DNA damage: Gene-disruption study in mice. *Mol. Cell. Biochem.* 1999a. 193, 149-152.
- Masutani M, Suzuki H, Kamada N, Watanabe M, Ueda O, Nozaki T, Jishage K, Watanabe T, Sugimoto T, Nakagama H, Ochiya T, and Sugimura T. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocininduced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999b. 96, 2301-2304.

- Masutani M, Nozaki T, Nakamoto K, Nakagama H, Suzuki H, Kusuoka O, Tsutsuni M, Sugimura T. The response of Parp knockout mice against DNA damaging agents. *Mutat Res.* 2000. 462, 159-166.
- Masutani M, Nozaki T, Watanabe M, Ochiya T, Hasegawa F, Nakagama H, Suzuki H, and Sugimura T. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in trophoblastic cell differentiation during tumorigenesis. *Mutat. Res.* 2001. 477, 111-117.
- Masutani y col Poly(ADP-ribose) and carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003 Dec;38(4):339-48. Review.
- Masutani y col.Poly(ADP-ribosyl)ation in relation to cancer and autoimmune disease. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Apr;62(7-8):769-83. Review.
- Mazzon E, Serraino I, Li JH, Dugo L, Caputi AP, Zhang J and Cuzzocrea S. GPI 6150, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, exhibits an anti-inflammatory effect in rat models of inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2001.415:85-94.
- Mazzon E, Dugo L, De SA, Li JH, Caputi AP, Zhang J and Cuzzocrea S .Beneficial effects of GPI 6150, an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Shock.* 2002a.17:222-7.
- Mazzon E, Dugo L, Li JH, Di Paola R, Genovese T, Caputi AP, Zhang J and Cuzzocrea S. GPI 6150, a PARP inhibitor, reduces the colon injury caused by dinitrobenzene sulfonic acid in the rat. *Biochem Pharmacol.* 2002b. 64:327-37.
- Meder VS, Boeglin M, de Murcia G and Schreiber V . PARP-1 and PARP-2 interact with nucleophosmin/B23 and accumulate in transcriptionally active nucleoli. *J. Cell Sci.* 2005. 118:211-222.
- Meisterernst M, Stelzer G, and Roeder RG. Poly(ADP-ribose) polymerase enhances activator-dependent transcription in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 1997. 94: 2261-2265.
- Ménissier-de Murcia J et al. Early embryonic lethality in PARP-1 Atm double-mutant mice suggest a functional synergy in cell proliferation during development. *Mol. Cell.Biol.* 2001.21, 1828-1832.
- Ménissier-de Murcia J, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, and de Murcia G. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. 94, 7303-7307.
- Ménissier-de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F, Schreiber V, Amé JC, Dierich A, LeMeur M, Sabatier L, Chambon P and de Murcia G . Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J.* 2003. 22:2255-2263.

- Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Coyle DL, Jacobson EL and Jacobson MK . Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Exp. Cell Res.* 2004.297:521-532.
- Milam KM y col. Inhibitors of poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis: effect on other metabolic processes. *Science.* 1984 Feb 10;223(4636):589-91.
- Min SK, Kim SY, Kim CH, Woo JS, Jung JS, and Kim YK. Role of lipid peroxidation and poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidant-induced membrane transport dysfunction in opossum kidney cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2000. 166, 196-202.
- Miyamoto T, Kakizawa T, Hashizume K. Inhibition of nuclear receptor signalling by poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol. Cell Biol.* 1999. 19, 2644-2649.
- Mi Young Kim y col. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: “PAR-laying” NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes and development.* 2005. 19:1951-1967.
- Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F and Kroemer G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol.* 2006.16:264-272.
- Molinete M, Vermeulen W, Burkle A, Menissier de Murcia J, Kupper HK, Hoeijmakers JH, and de Murcia G. Overproduction of the poly(ADP-ribose) polymerase DNA-binding domain blocks alkylation-induced DNA repair synthesis in mammalian cells. *EMBO J.* 1993. 12, 2109-2117.
- Monreal Y, Ménessier-de Murcia J and Yélamos J. Anti-Poly-ADP-ribose polymerase-2 (PARP-2) mouse mAb 4G8. *Hybridoma.* 2006. 25:102.
- Morrison y col 1997. Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis. *Nat Genet.* Dec;17(4):479-82.
- Mortusewicz Oliver, Jean-Christophe Amé, Valérie Schreiber, and Heinrich Leonhardt Feedback-regulated poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acids Res.*, Advance Access published on November 3, 2007.
- Mota RA, Sánchez-Bueno F, Saenz L, Hernandez-Espinosa D, Jimeno J, Tornel PL, Martínez-Torrano A, Ramirez P, Parrilla P and Yelamos J. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates the severity of acute pancreatitis and associated lung injury. *Lab. Invest.* 2005. 85:1250-62.
- Moubarak R.S. et al. Sequential Activation of poly(ADP-ribose) polymerase I, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol.Cell.Biol.*2007. 27, 4844-4862.

- Muiras M L, Muller M, Schachter F and Bürkle A. Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians. *J. Mol. Med.* 1998 76:346-354.
- Nakajima H, Kakui N, Ohkuma K, Ishikawa M and Hasegawa T. A newly synthesized poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, DR2313 [2-methyl-3,5,7,8-tetrahydrothiopyrano[4,3-d]-pyrimidine-4-one]: pharmacological profiles, neuroprotective effects, and therapeutic time window in cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005. 312:472-481.
- Nash RA, Caldecott KW, Barnes DE and Lindahl T. XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry* 1997. 36:5207-5211.
- Nie J, Sakamoto S, Song D, Qu Z, Ota K, and Taniguchi T. Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase. *FEBS Lett.* 1998. 424, 27-32.
- Nirodi C, NagDas S, Gygi SP, Olson G, Aebersold R, and Richmond A. A role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in the transcriptional regulation of the melanoma growth stimulatory activity (CXCL1) gene expression. *J. Biol. Chem.* 2001. 276, 9366-9374.
- Nozaki y col. Parp-1 deficiency implicated in colon and liver tumorigenesis induced by azoxymethane. *Cancer Sci.* 2003 Jun;94(6):497-500.
- Nguewa P A et al. Pharmacological Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell death:exploitation in cancer chemotherapy.*Molecular Pharmacology.* 2003.Vol 64:1007-1014.
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S and Huang DC Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 1998. 17:384-395.
- Oei SL, Griesenbeck J, Schweiger M, and Ziegler M. Regulation of RNA polymerase II-dependent transcription by poly(ADP-ribosil)ation of transcription factors. *J. Biol. Chem.* 1998. 27, 31644-31647.
- Oka S, Kato J and Moss J . Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J. Biol. Chem.* 2006.281:705-713.
- Oliver AW, Amé JC, Roe SM, Good V, de Murcia G and Pearl LH . Crystal structure of the catalytic fragment of murine poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Nucleic Acids Res.* 2004. 32: 456-464.
- Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz C, de Murcia G, and Ménissier-de Murcia J. Importance of Poly(ADP-ribose) Polymerase and its cleavage in Apoptosis. *J Biol Chem.* 1998. 273, 33533-33539.

- Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, and de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF- κ B activation in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J.* 1999.16, 4446-4454.
- Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Komjati K, Mabley JG, and Szabo C. The role of poly(ADP-ribose) polymerase in the development of chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002b.40, 1006-1016.
- Pieper AA, Brat DJ, Krug DK, Watkins CC, Gupta A, Blackshaw S, Verma A, Wang ZQ, and Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999a. 96, 3059-3064.
- Pieper AA, Verma A, Zhang J and Zinder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci.* 1999b. 20, 171-181.
- Pieper et al. Poly(ADP-ribosyl)ation basally activated by DNA strand breaks reflects glutamate-nitric oxide neurotransmission. *PNAS.* 2000. Vol 97, n° 4:1845-1850.
- Pinnola, A. et al. Nucleosomal core histones mediate dynamic regulation of poly (ADP-Ribose) polymerase 1 protein binding to chromatin and induction of its enzymatic activity. *J.Biol.Chem.* 2007 Nov 2;282(44):32511-9.
- Pion E, Ullmann GM, Amé JC, Gérard D, de Murcia G, Bombarda E. DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation. *Biochemistry.* 2005 Nov 8;44(44):14670-81.
- Pion E, Bombarda E, Stiegler P, Ullmann GM, Mély Y, de Murcia G, and Gérard D. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dimerizes at a 5' recessed DNA end in vitro: a fluorescence study. *Biochemistry.* 2003. 42, 12409-12417
- Pleschke et al. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem.* 2000. Dec 29;275(52):40974-80.
- Poirier, G.G. et al. Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1982. 79(11): 3423-3427.
- Popoff I, Jijon H, Monia B, Tavernini M, Ma M, McKay R and Madsen K. Antisense oligonucleotides to poly(ADP-ribose) polymerase-2 ameliorate colitis in interleukin-10-deficient mice. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 2002. 303:1145-1154.
- Pochwalski K, Broda R and Radoszewski T. Standardization of pure beta emitters by liquid-scintillation counting. *Appl. Radiat. Isot.* 1988. 39: 165-72
- Purnell MR, and Whish WJD. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem. J.* 1980.185, 775-777.

- Ryszard Broda et al. Radionuclide metrology using liquid scintillation counting. *Metrologia*. 2007. 44 S36-S52
- Raval-Fernandes S y col., Increased susceptibility of vault poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice to carcinogen-induced tumorigenesis. *Cancer Res*. 2005 Oct 1;65(19):8846-52.
- Rawling JM, Álvarez-González R. 1997. TFIIF, a basal eukaryotic transcription factor, is a substrate for poly(ADP-ribosylation). *Biochem. J*. 324, 249-253.
- Realini C.A. y col. Histone shuttling by poly(ADP-ribosylation). *J Biol Chem*. 1992 Sep 15;267(26):18858-65.
- Reynolds G T, Harrison F B and Salvine G Liquid scintillation counters. *Phys. Rev*. 1950. 78, 488
- Rice WG, Schaeffer CA, Graham L Bu M, McDougal JS, Orloff SL, Villinger F, Young M, Oroszlan S, Fesen MR, Pommier Y, Mendelejev J, Kun E. The site of antiviral action of 3-nitrosobenzamide on the infectivity process of human immunodeficiency virus in human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. 90, 9721-9724.
- Richardson DS, Allen PD, Keslsey SM, and Newland AC. Effects of PARP inhibition on drug and fas-induced apoptosis in leukaemic cells. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1999.457, 267-279.
- Rodríguez-Gago MA, de Heredia A, Ramírez P, Parrilla P, Aparicio P, Yélamos J. Human anti-porcine $\gamma\delta$ T-cell xenoreactivity is inhibited by human FasL expression on porcine endothelial cells. *Transplantation*.2001.72: 503-509.
- Rogakou EP et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998 Mar 6;273(10):5858-68.
- Rolli V, Ruf A, Augustin A, Schulz GE, Ménissier-de Murcia J, and de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase: structure and function. In From DNA damage and stress signaling to cell death: poly ADP-ribosylation reactions., G de Murcia y S Shall, eds. New York: *Oxford University Press*. 2000. pp. 35-79.
- Rongvaux et al 2003.Reconstructing eukaryotic NAD metabolism. *Bioessays*. 2003 Jul;25(7):683-90. Review.
- Rouleau M, McDonald D, Gagne P, Ouellet ME, Droit A, Hunter JM, Dutertre S, Prigent C, Hendzel MJ and Poirier GG. PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery. *J. Cell Biochem*.2007 Feb 1;100(2):385-401.

-
- Rouleau M y col. Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains:access granted. *Journal of Cells Science*. 2004. 117:815-825.
 - Ruf A, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G, and Schulz GE. Structure of the catalytic fragment of poly(ADP-ribose) polymerase from chicken. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. 93, 7481-7485.
 - Ruf A, Rolli V, de Murcia G, and Schulz GE. The mechanism of the elongation and branching reaction of poly (ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis. *J. Mol. Biol.* 1998. 278, 57-95.
 - Ruggieri et al .Evidence for an inhibitory effect exerted by yeast NMN adenyltransferase on poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Biochemistry*. 1990 Mar 13;29(10):2501-6.
 - Samper E, Goytisolo FA, Menissier-de Murcia J, Gonzalez-Suarez E, Cigudosa JC, de Murcia G and Blasco MA. Normal telomere length and chromosomal end capping in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice and primary cells despite increased chromosomal instability. *J Cell Biol*. 2001.154:49-60.
 - Satchell y col . A dual role for poly-ADP-ribosylation in spatial memory acquisition after traumatic brain injury in mice involving NAD⁺ depletion and ribosylation of 14-3-3 gamma. *J Neurochem*. 2003. May;85(3):697-708.
 - Saxena A, Saffery R, Wong LH, Kalitsis P, and Choo KH. Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *J. Biol. Chem*. 2002. 277, 26921-26926
 - Saxena A, Saffery R, Wong LH, Kalitsis P and Choo KH. Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated. *J. Biol. Chem*. 2002a. 277:26921-26926.
 - Saxena A, Wong LH, Kalitsis P, Earle E, Shaffer LG and Choo KH. Poly(ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres and interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb and Bub3, but not Cenpc. *Hum Mol Genet*. 2002b.11:2319-29.
 - Sbdio JI, Lodish HF and Chi NW. Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1(telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). *Biochem. J*. 2002. 361:451-459.
 - Scheffer GL, Schroeijers AB, Izquierdo MA, Wiemer EA and Scheper RJ. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Curr. Opin. Oncol*. 2000.12:550-556.
 - Schraufstatter y col, 1986. Oxidant injury of cells. *J Clin Invest*.Vol 77:1312-1320.

- Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Gowans B, Grunwald D, de Murcia G, de Murcia JM. A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. 92, 4753-4757.
- Schreiber V, Amé JC, Dollé P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Ménissier-de Murcia J and de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J. Biol. Chem.* 2002. 277:23028-23036.
- Schreiber V, Dantzer F, Amé JC and de Murcia G Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev. Mol. Cell Biol.* 2006.7:517-528.
- Schreiber V et al. PARP-2: Structure-Function relationship. En Poly(ADP-ribosyl)ation, editado por Alexander Bürkle. 2004. Eureka.
- Schweiger M et al. Characterization of recombinant human nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase (NMNAT), a nuclear enzyme essential for NAD synthesis. *FEBS Lett.* 2001 Mar 9;492(1-2):95-100.
- Scott, G.S. et al. The therapeutic effects of PJ34 [N-(6-oxo-5,6- dihydrophenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide.HCl], a selective inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, in experimental allergic encephalomyelitis are associated with immunomodulation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2004. 310 (3): 1053-1061.
- Sebolt-Leopold JS, and Scavone SV. Enhancement of alkylating agent activity in vitro by PD 128763, a potent poly(ADP-ribose) synthetase. *Int. J. Radiat Oncol. Biol. Phys.* 1992. 22, 619-621.
- Seimiya H. The telomeric PARP, tankyrases, as targets for cancer therapy. *Br. J. Cancer.* 2006. 94:341-345.
- Seimiya H. y col. Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2005 Jan;7(1):25-37.
- Shall S and de Murcia G. poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat. Res.* 2000.460, 1-15.
- Sherif F El-Khamisy et al. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research.* 2003.Vol 31 N° 19:5526-5533.
- Shieh WM, Ame JC, Wilson MV, Wnag AZ, Koh DW, Jacobson MK, and Jacobson EL. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADPribose polymers. *J. Biol. Chem.* 1998. 273: 30069-30072.

- Shiokawa D, Maruta H, and Tanuma S. Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase suppress nuclear fragmentation and apoptotic-body formation during apoptosis in HL-60 cells. *FEBS Lett.* 1997. 413, 99-103.
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Hilz H, Hickey R, Malkas L, Applegren N, Wu Y, Bers G, and Smulson ME. The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA-replication complex. *Biochemistry.* 1996.35, 11622-11633.
- Simbulan-Rosenthal CM, Haddad BR, Rosenthal DS, Weaver Z, Coleman A, Luo R, Young HM, Wang ZQ, Ried T, Smulson ME. Chromosomal aberrations in PARP-/- mice: genome stabilization in immortalized cells by reintroduction of poly(ADP-ribose) polymerase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999a. 96, 13191-13196.
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo R, and Smulson ME. Poly(ADP-ribose) polymerase upregulates E2F-1 promoter activity and DNA pol alpha expression during early S phase. *Oncogene.* 1999b.18, 5015-5023.
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Iyer S, Boulares AH, and Smulson ME. Involvement of PARP and poly(ADP-ribosylation) in the early stages of apoptosis and DNA replication. *Mol Cell Biochem.* 1999c 193, 137-148.
- Simbulan-Rosenthal CM, Ly DH, Rosenthal D, Konopka G, Luo R, Wang ZQ, Schultz PG, and Smulson ME. Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. 97, 11274-11279.
- Simon R Cherry, James A Sorensen, Michael E Phelps. *Physics in nuclear medicine.* 3a edición. Ed. Saunders.2003.
- Simonin F, Poch O, Delarue M, and de Murcia G. Identification of potential active-site residues in the human poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* 1993. 268, 8529-8535.
- Szabo C y Dawson VL. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci.* 1998 Jul;19(7):287-98
- Szabo C y col.. DNA strand breakage, activation of poly(ADP-ribose)synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity in macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1996. Vol 93:1753-1758.
- Slattery E y col. Purification and analysis of a factor which suppresses nick-induced transcription by RNA polymerase II and its identity with poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem.* 1983 May 10;258(9):5955-9.

- Smith and de Lange. Cell cycle dependent localization of the telomeric PARP, tankyrase, to nuclear pore complexes and centrosomes. *J Cell Sci.* 1999 Nov;112 (Pt 21):3649-56.
- Smith S and de Lange T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr. Biol.* 2000 10:1299-1302.
- Smith S, Giriati I, Schmitt A and de Lange T . Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science.*1998. 282:1484-1487.
- Smith S. The world according to PARP. *Trends Biochem. Sci.* 2001.**26**: 174-179.
- Smulson ME, Simbulan-Rosenthal CM, Boulares AH, Yakovlev A, Stoica B, Iyer S, Luo R, Haddad B, Wang ZQ, Pang T, Jung M, Dritschilo A, and Rosenthal DS. Roles of poly(ADP-ribosilation and PARP in apoptosis, DNA repair, genomic instability and functions of p53 and E2F-1. *Adv. Enzyme Regul.* 2000. 40, 183-215.
- Stevensner T, Ding R, Smulson M, and Bohr VA. Inhibition of genespecific repair of alkylation damage in cells depleted os poly(ADP-ribose) polymerase. *Nucleic Acids Res.* 1984. 22, 4620-4624.
- Strieter RM, Kunkel SL, Arenberg DA, Burkick MD, Polverini PJ. Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), a member of C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. 210, 51-57.
- Stroes E, Hijmering M, van Zandvoort M, Wever R, Rabelink TJ, van Faassen EE. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* 1998. 438, 161-164
- Suzuki H, Quesada P, Farina B, Leone E. In vitro poly(ADP-ribosyl)ation of seminal ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 1986. 261, 6048-6055
- Suto MJ y col. Dihydroisoquinolinones: the design and síntesis of a new series of potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Anticancer Drug Des.* 1991 May; 6(2):107-117.
- Szabó C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation and ischemia-reperfusion injury. *Shock.* 1996. 6, 79-88.
- Szabó C, Saunders C, O'Connor M, and Salzman AL. Peroxynitrite causes energy depletion and increases permeability via activation of poly (ADPribose) synthetase in pulmonary epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1997a. 16, 105-109.
- Szabó C, Lim LH, Cuzzocrea S, Getting SJ, and Zingarelli B.. Inhibition of poly(ADP-ribose) synthetase attenuates neutrophil recruitment and exerts antiinflammatory effects. *J. Exp. Med.* 1997b. 186, 1041-1049.

- Szabó C, Virág L, Cuzzocrea S, Scott GS, Hake P, O'Connor MP, Zingarelli B, Salzman A, and Kun E. Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly(ADP-ribose) synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998a. 95, 3867-3872.
- Szabó C, and Dawson VL. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci*. 1998b.19, 287-298.
- Szabó C, Hake P, Salzman AL, and Szabo C. 3-Aminobenzamide, an inhibitor of poly(ADP-ribose) synthetase, improves hemodynamics and prolongs survival in a porcine model of hemorrhagic shock. *Shock*. 1998c.10, 347-353.
- Szabo G, Bahrle S, Stumpf N, Sonnenberg K, Szabo E, Pacher P, Csont T, Schulz R, Dengler TJ, Liaudet L, Jagtap PG, Southan GJ, Vahl CF, Hagl S, and Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition reduces reperfusion injury after heart transplantation. *Cir. Res*. 2002. 90, 100-106.
- Takahashi y col. The effect of reperfusion on neuroprotection using an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase. *Neuroreport*. 1999 Jul 13;10(10):2017-22.
- Tanaka Y, Yoshihara K, Tohno Y, Kojima K, Kameoka M, and Kamiya T. Inhibition and down-regulation of poly(ADP-ribose) polymerase results in a marked resistance of HL-60 cells to various apoptosis-inducers. *Cell Mol Biol*. 1995.41, 771-781.
- Tanuma S, Enomoto T, and Ymada MA. Changes in the level of poly ADP-ribosylation during a cell cycle. *Exp. Cell. Res*. 1978. 117, 421-430.
- Tentori L, Turriziani M, Rranco D, Serafino A, Levati L, Roy , Bonmassar E, and Graziani G. Treatment with temozolomide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors induces early apoptosis and increases base excision repair gene transcripts in leukemic cells resistant to triazone compounds. *Leukemia*. 1999. 13, 901-909.
- Tentori L and Graziani G. Chemopotentiality by PARP inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Res*. 2005. 52:25-33.
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvensen GS, and Dixit VM. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*. 1995. 81, 801-809.
- Thiernemann C, Bowes J, Myint FP, and Vane JR. Inhibition of the activity of poly(ADP-ribose) synthetase reduces ischemia-reperfusion injury in the heart and skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. 94, 679-683.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998. 281, 1312-1316.

- Tong WM, Cortes U, Wang ZQ. Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian angel protecting the genome and suppressing tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Nov 30; 1552(1) :27-37. Review.
- Trucco C, Oliver FJ, de Murcia G, and Menissier de Murcia J. DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase deficient cell line. *Nucleic Acids Res*. 1998. 26, 2644-2649.
- Tsutsumi y col. Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. *Carcinogenesis*. 2001 Jan;22(1):1-3.
- Tulin A, Stewart D, and Spradling A. 2002. The Drosophila gene encoding Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is required to modulate chromatin structure during development. *Genes and Dev*. 16, 2108-2119.
- Tulin A, and Spradling A. Chromatin loosening by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) at Drosophila puff loci. *Science*. 2003. 299, 560-562.
- Tulin y col., Drosophila poly(ADP-ribose) glycohydrolase mediates chromatin structure and SIR2-dependent silencing. *Genetics*. 2006 Jan;172(1):363-71.
- Ullrich, O, Diestel, A, Eyupoglu, IY, y Nitsch, R. Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nat. Cell Biol*. 2001. 3, 1035-1042.
- Valdor, R, Schreiber, V, Saenz, L, Martínez, T, Muñoz-Suano, A, Dominguez- Villar, M, Ramírez, P, Parrilla, P, Aguado, E, García-Cózar, F, Yélamos, J. Regulation of NFAT by poly(ADP-ribose) polymerase activity in T cells. *Molecular immunology*. 2007 (En Prensa).
- Van Gool L, Meyer R, Tobiasch E, Cziepluch C, Jauniaux JC, Mincheva A, Lichter P, Poirier GG, Burkle A, Kupper JH. Overexpression of human poly(ADP-ribose) polymerase in transfected hamster cells leads to increased poly(ADP-ribosylation) and cellular sensitization to gamma irradiation. *Eur. J. Biochem*. 1997. 244, 15-20.
- Van Steensel B and de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*. 1997.385:740-743.
- Van Steensel B, Smogorzewska A and de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* .1998.92:401-413.
- Virág L y col. Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis:te role of caspases and poly(ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. *Immunology*. 1998.94:345-355
- Virág L y col. Poly(ADP-ribosylation) in asthma and other lung diseases. *Pharmacol Res*. 2005. Jul;52(1):83-92. Review.

- Virág L, and Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 2002.54, 375-429.
- Virág L, Bai P, Bak I, Pacher P, Mabley JG, Liaudet L, Bakondi E, Gergely P, Kollai M, Szabo C. Effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition on inflammatory cell migration in a murine model of asthma. *Med. Sci. Monit.* 2004. 10, BR77-83.
- Visochek, L. et al. PolyADP-ribosylation is involved in neurotrophic activity. *J.Neurosci.*, 2005. 25 (32): 7420-7428.
- Vyas DR. Multiprotein complex formation at the β myosin heavy chain distal muscle CAT element correlates with slow muscle expression but not mechanical overload responsiveness. *J. Biol. Chem.* 2001. 276, 1173-1184.
- Wang H, Shimoji M, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL. Apoptosis inducing factor and PARP-mediated injury in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2003. 991, 132-139.
- Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y and Xue D). Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2002. 298:1587-1592.
- Wang ZQ, Auer B, Stingl L, Heinrich B, Haidacher D, Schweiger M, and Wagner EF. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosylation) develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev.* 1995. 9, 509-520.
- Wang ZQ, Stingl L, Morrison C, Jantsch M, Los M, Schulze-Osthoff K, and Wagner EF. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev.* 1997.11, 2347-2358.
- Watson AJ, Askew JN, and Benson RS. Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibition prevents necrosis induced by H₂O₂ but not apoptosis. *Gastroenterology.* 1995. 109, 472-482.
- Wesierska-Gadek J, and Schmid G. Overexpressed poly(ADP-ribose) polymerase delays the release of rat cells from P53-mediated G(1) checkpoint. *J. Cell Biochem.* 2000. 80, 85-103.
- Whitsett JA and Glasser SW. Regulation of surfactant protein gene transcription. *Biochim Biophys Acta.* 1998. 1408:303-311.
- Wurzer G, Hecceg Z, Wesierska-Gadek J. Increased resistance to anticancer therapy of mouse cells lacking the poly(ADP-ribose) polymerase attributable to up-regulation of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein. *Cancer Res.* 2000.60, 4238-4244.
- Yamamoto H, Uchigata Y, and Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature.* 1981.294, 284-286.

- Yélamos J, Monreal Y, Saenz L, Aguado E, Schreiber V, Mota R, Fuente T, Minguela A, Parrilla P, De Murcia G, Almarza E, Aparicio P and Ménissier-de Murcia J. PARP-2 deficiency affects the survival of CD4+CD8+ double-positive thymocytes. *EMBO J*. 2006. 25:4350-4360.
- Yélamos J, Buendia AJ, Ortega N, Monreal Y, Gallego MC, Sanchez J, Ramirez P, Parrilla P, Caro MR Aparicio P and Salinas J. Genetic and pharmacological inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase-1 interferes in the chlamydial life cycle. *Biocheml Biophysl Res Commun*. 2004. 324:840-848.
- Yélamos J, and Oliver FJ. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the inflammatory response. *Inmunología*. 2002.21, 219-227.
- Ying y col. NAD+ as a metabolic link between DNA damage and cell death. *J Neurosci Res*. 2005 . Jan 1-15;79(1-2):216-23.
- Yu M, Schreek S, Cerni C, Schamberger C, Lesniewicz K, Poreba E, Vervoorts J, Walsemann G, Grotzinger J, Kremmer E, Mehraein Y, Mertsching J, Kraft R, Austen M, Luscher-Firzlaff J and Luscher B. PARP-10, a novel Myc-interacting protein with poly(ADP-ribose) polymerase activity, inhibits transformation. *Oncogene* 2005. 24:1982-1993.
- Yu SW; Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, and Dawson VL: Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*. 2002. 297, 259-263.
- Yu SW, Wang H, Dawson TM, Dawson VL. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol Dis*. 2003. 14, 303-317.
- Zhang Z, Hildebrandt EF, Simbulan-Rosenthal CM, Anderson MG. Sequence-specific binding of poly(ADP-ribose) polymerase-1 to the human T cell leukemia virus type-I tax responsive element. *Virology*. 2002 Apr 25;296(1):107-16.
- Zhang C, Rosenbaum DM, Shaikh AR, Li Q, Rosenbaum PS, Pelham DJ, Roth S. Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002 Sep;43(9):3059-66.
- Zhang J. Are poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 and deacetylation by Sir2 linked? *Bioessays*. 2003 Aug;25(8):808-14.
- Ziegler M, and Oei, SL. A cellular survival switch: poly(ADP-ribosil)ation stimulates DNA repair and silences transcription. *Bioessays*. 2001.23, 543-548.
- Zingarelli B, Cuzzocrea S, Zsengel Z, Salzman AL, and Szabo C. Protection against myocardial ischemia and reperfusion injury by 3- aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase. *Cardiovasc. Res*. 1997. 36, 205-215.

- Zong y col . Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.* 2004.Jun 1;18(11):1272-82.

VII. ANEXOS

ANEXO I: COMPOSICIÓN DE LAS DISOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

PBS (pH 7.2): Phosphate Buffer Salines (BioMérieux)

Componentes	mg/l
KH ₂ PO ₄	210
NaCl	7650
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	724

PBS-S: PBS (Phosphate Buffer Salines) suplementado

Al tampón PBS 1x se le añade

Componentes	concentración
SBF (F7524 Sigma)	0.5%
EDTA disódico (Sigma)	2 mM

DPBS: Dulbecco's Phosphate Salines D8662 (Sigma)

Componentes	mg/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	133
MgCl ₂ · 6H ₂ O	100
KCl	200
KH ₂ PO ₄	200
NaCl	8000
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	1150

DPBS-S: Dulbecco's Phosphate Salines suplementado completo

Al tampón DPBS 1x se le añade

Componentes	concentración
SBF (F7524 Sigma)	0.5%
EDTA disódico (Sigma)	2 mM

Disolución azul Tripán (Sigma)

Componentes	g/l
Azul Tripán	4.0
NaCl	8.1
KH ₂ PO ₄	0.6

Tampón de lisis ACK (BioWhittaker)

Componentes	mol/l
NH ₄ Cl (Sigma)	150 mM
EDTA disódico dihidratado (Sigma)	0.1 mM
KCO ₃ H (Sigma)	10 mM

Tampón hipotónico de permeabilización

Componentes	concentración
Tris- HCl, pH=7.8 (Sigma)	10 mM
MgCl ₂ (Sigma)	4 mM
EDTA (Sigma)	1 mM
2-mercaptoetanol (Sigma)	30 mM

Mezcla de reacción

Componentes	mol/l
Tris- HCl, pH=7.8 (Sigma)	100 mM
NAD ⁺ (grado V, Sigma)	1 mM
MgCl ₂ (Sigma)	120 mM
H ³ -NAD ⁺ (American Radiolabeled Chemicals. Inc.)	8.5 kBq

Estimuladores de la actividad enzimática de PARP

Compuesto	concentración
PMA (12-miristato, 13-acetato de forbol) (Sigma)	10µg/ml
Ionomicina (sal cálcica) (Sigma)	1mg/ml
Peróxido de hidrógeno (Sigma)	1 mM
Primer (oligonucleótido : 5'-GGAATTCC-3') (Genset SA)	50µg/ml
Anti-CD28 (Hamster, anti-ratón) Clon 37.51 (Pharmingen, BD)	0.5 mg/ml
Anti-CD3e (CD3 ε chain) (Hamster,anti-ratón) Clon145-2C11(Pharmingen, BD)	0.5 mg/ml

RPMI 1640 (BioWhittaker)

Componentes	
Sales inorgánicas	mg/l
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	100.00
KCl	400.00
MgSO ₄ .7H ₂ O	100.00
NaCl	6000.00
NaHCO ₃	2000.00
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1512.00
Otros componentes	mg/l
Glucosa	2000.00
Glutaciona (reducida)	1.00
Rojo Fenol· Na	5.31
Aminoácidos	mg/l
L-Arginina	200.00
L-Asparragina.H ₂ O	50.00
Ácido L-Aspartico	20.00
L-Cistina	50.00
Ácido L-Glutamico	20.00

Glicina	10.00
L-Histidina	15.00
Hidroxi L-Prolina	20.00
L-Isoleucina	50.00
L-Leucina	50.00
L-Lisina.HCl	40.00
L-Metionina	15.00
L-Fenilalanina	15.00
L-Prolina	20.00
L-Serina	30.00
L-Treonina	20.00
L-Triptófano	5.00
L-Tirosina	20.00
L-Valina	20.00
Vitaminas	mg/l
Ácido p-Aminobenzoico	1.00
d-Biotina	0.20
D(+)-Ca Pantotenato	0.25
Cloruro de Colina	3.00
Ácido Fólico	1.00
i-Inositol	35.00
Nicotinamida	1.00
Piridoxina.HCl	1.00
Riboflavina	0.20
Tiamina·HCl	1.00
Vitamina B ₁₂	0.005

RPMI-S (Medio RPMI suplementado completo)

Medio RPMI 1640 suplementado con los siguientes componentes a las concentraciones finales:

Componentes	concentración
SBF (BioWhittaker)	20%
Penicilina/Estreptomicina (BioWhittaker) 50U/ml penicilin; 50 µg/ml estrepto	1%
L-Glutamina (BioWhittaker) 200 mM	4 mM
Aminoácidos no esenciales(Sigma)	1%
Piruvato sódico(Sigma)	1 mM
HEPES(Sigma)	50 mM
2-Mercaptoetanol (Sigma)	0.01%

RPMI-I (Medio RPMI suplementado incompleto)

Medio RPMI 1640 suplementado con diversos componentes con las siguientes concentraciones finales:

Componentes	concentración
SBF (BioWhittaker)	10.00%
Penicilina/Estreptomicina (BioWhittaker) 50U/ml penicilin; 50 µg/ml estrepto	1.00%
L-Glutamina (BioWhittaker) 200 mM	2 mM

Tabla de aceptación de muestras del cocktail centelleador Optiphase Hisafe III, Perkin Elmer.

Volúmenes en ml por 10 ml de cocktail utilizado

soluto	100°C	20°C	30°C
Agua desionizada	11.50	11.0	10.50
TCA10%	6.00	5.50	5.00
HEPES 0.05M	11.0	10.50	10
NaOH 0.1M	2.50	2.0	2.0
NaCl 0.15 M	9.50	7.50	7.0
Tris-HCl 0.05M	10.50	5.50	5.0
Amonio 1.0M	6.25	5.50	5.0

ANEXO II: ABREVIATURAS

3-AB 3-Aminobenzamida

ADN ácido desoxirribonucleido

ADPRT ADP-ribosa transferasa

AIF *Apoptosis Inducing Factor*

5-AIQ 5-aminoisoquinolina

ANI 4-amino-1,8-naftalimida

AP-1 Proteína activadora-1

AP-2 Proteína activadora-2

ARH ADP-ribosil arginina hidrolasa

ARL ADP-ribosa liasa

ATP adenosín trifosfato

BER *Base Excision Repair*

BH3 *Bcl-2-homology domain 3*

B-MYB *B myeloblastosis oncogene*

BRCT *BRCA1 (Breast cancer susceptibility protein) C-terminus*

BUB3 *BUB3 budding uninhibited by benzimidazoles 3*

cDNA DNA complementario

CENP-A y B *centromere protein A and B*

CPM cuenta por minuto

DBD *DNA binding domain* (Dominio de unión al DNA)

DIQ 5-hidroxi-1(2H)-isoquinolina

DNA ácido desoxirribonucleico

DP doble positivo

DPM desintegración por minuto

DPQ 3,4-dihidro-5-(4-(1-piperidinil)butoxi)-1(2H)-isoquinolina

DSBR Reparación de daños de cadena doble

DSBs Roturas de doble cadena del DNA

E2F-1 *E2F transcription factor 1*

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

ERK2 *extracellular signal-regulated kinase 2*

¹⁵²**Eu** europio-152

FITC Isotiocianato de fluoresceína

GPI-6150 1,11b-dihidro-(2H)benzopiradol(4,3,2-de)isoquinolin3ona

H₂O₂ peróxido de hidrógeno

HCl Ácido clorhídrico

HEPES N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanofulfónico)

HMG *High Mobility Group*

HTH *Helix Turn Helix* (Hélice giro hélice)

INOS Óxido nítrico sintetasa inducible

K_{cat} constante catalítica

K_m constante de Michaelis-Menten

LPS Lipopolisacárido

LZ *Leucine Zipper* (cremallera de leucina)

MHC Complejo mayor de histocompatibilidad

MPTP 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina

MRC *multiprotein Replication complex*

NaCl Cloruro sódico

NAD Nicotinamida adenina dinucleótido

NaOH Hidróxido de sodio

NF-κB Factor nuclear-kappa B

NLS Señal de localización nuclear

NMN nicotinamida mononucleótido

NMNAT nicotinamida mononucleótido adeniltransferasas

NSB actividad no específica

NU1025 8-hidroxi-2-metilquinazolina-4-ona

Oct-1 Factor de transcripción octámero

pADPr Polímero de ADP-ribosa

PARG Poli-ADP-ribosa glicohidrolasa

PARP Poli-ADP-ribosa polimerasa

PARS ADP-ribosa sintetasa

PBS Solución tamponadora de Fosfatos

PD128763 3,4-dihidro-5-metoxiisoquinolin-1(2H)-ona

PJ-34 N-(6-oxo-5,6-dihidro-fenantridin-2-il)-N,N-dimetilamino)acetamida.HCl

PMA Forbol éster

RNA Ácido ácido

SBF Suero bovino fetal

SDS Dodecilsulfato sódico

SSBR *Single Strand Break Repair*

TBP *TATAbox binding protein*

TCA ácido tricloroacético

TCDD Tetraclorodibenzo-p-dioxina

TCR Receptor de célula T

TEP *Telomerase-associated protein*

TIQ-A tieno(2,3-c)isoquinolin-5-ona

TFIIF *transcription factor IIF*

TMZ Temozolomida

TNF Factor de necrosis tumoral

TRF1 y 2 *Telomeric repeat binding factor-1*

XRCC1 *X-Ray Repair Cross-Complementing 1*

ANEXO III: PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DE LA PRESENTE MEMORIA

ARTÍCULOS

- **Teresa Martínez**, Diego Benítez, Teresa Zafra, Francisco Pastor. Método isotópico para la determinación de la enzima Poli-ADP-Ribosa Polimerasa (PARP-1) en muestras biológicas. *Química Clínica* 2005; 24(6) 149-157.
- Valdor, R, Schreiber, V, Saenz, L, **Martínez, T**, Muñoz-Suano, A, Dominguez-Villar, M, Ramírez, P, Parrilla, P, Aguado, E, García-Cózar, F, Yélamos, J. Regulation of NFAT by poly(ADP-ribose) polymerase activity in T cells. *Molecular immunology*. (2007), (En Prensa).

COMUNICACIONES A CONGRESOS

- Jornadas Españolas de Radiofarmacia.

Diego Benítez, **Teresa Martínez**, Ana Carrillo, Teresa Zafra. Actividad enzimática de PARP (poli(ADPribosa)Polimerasa) en pacientes tratados con compuestos antitumorales de platino. II Barcelona, 2004.

- XXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Nuclear.

T. Martínez, J Yélamo, D. Benítez, T Zafra y T. Fuente. Procedimiento isotópico para determinación de PARP-1 en muestras biológicas. Barcelona, 2004. *Rev. Esp. Med. Nucl.* 2004; 23, Supl 1:9-33.

- XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Nuclear.

T Zafra, J Yélamos, F Pastor, **T Martínez**, T Fuente. Determinación isotópica de Poli(ADP-Ribosa) polimerasa en timocitos permeabilizados de ratón. Maspalomas, 2005. *Rev Esp Med Nucl* 2005; 24 Supl 1:27-60.

- XXX Congreso de la SEBBM.

Rut Valdor, Luis Saenz, Valérie Schreiber, **Teresa Martínez**, Teodomiro Fuente, Pablo Ramírez, Pascual Parrilla, José Yelamos. Regulación de NFAT por la actividad Poli-ADP-Ribosa polimerasa en células T. Málaga 12-15 de septiembre de 2007.

