

Método isotópico para determinación de la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP-1) en muestras biológicas.

T. Martínez, D. Benítez, T. Zafra, F. Pastor

Resumen

Objetivo: La enzima PARP-1 es una proteína que detecta roturas en las cadenas de ADN y participa en su reparación. Sin embargo, en la respuesta inmune inflamatoria, el daño generado da lugar a un aumento de activación del PARP-1, consumo desproporcionado de NAD⁺ / ATP, agotamiento energético celular y necrosis. Nuestro objetivo ha sido validar un procedimiento isotópico que permita medir actividad enzimática de PARP en muestras biológicas a partir del consumo de (adenina-2,8-³H)-NAD⁺ tritiada. **Material y Método:** Se utilizaron linfocitos B provenientes del bazo de doce ratones Wild Type. Seis expresaban normalmente PARP-1 endógeno, como grupo control, y seis eran knock-out (K.O.) para PARP-1. A las células permeabilizadas en tampón hipotónico, se les añade oligonucleótido (5'-GGAATTCC) como coenzima y ³H-NAD⁺ como sustrato. Activadas 10 min a 37°C, se centrifugan, lavan con TCA e incuban 20 horas a 37°C en SDS, antes de medir su radiactividad. **Resultados:** Se encontraron diferencias significativas (p<0.001) entre la medida de actividad enzimática de PARP en ambos grupos. La actividad enzimática media de PARP en los ratones K.O. para PARP-1 fue un 38% de la del grupo control. **Conclusión:** El método descrito parece detectar de forma adecuada diferencias de actividad enzimática de PARP-1 en las muestras objeto de estudio.

Palabras clave: Reparación ADN, actividad enzimática de PARP.

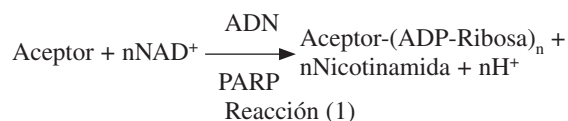
Summary. An isotopic method for the measurement of PARP-1 in biological samples

Objective: The enzyme PARP-1 is a DNA nick-sensor protein which takes part in DNA repair. However, in some cases as immune inflammatory response, this injury in DNA chains causes over-activation of PARP-1, over-consume of NAD⁺, depletion of ATP, and consequently cell dysfunction or necrosis. The aim of this work is to validate a method of determining PARP activity through the measurement of the consume of the radioactive substrate (adenine-2,8-³H)-NAD⁺. **Materials and methods:** The assay is performed in type B lymphocytes from 12 Wild Type mice [6 mice control group and 6 mice "knock out" (K.O.) for PARP-1]. After isolation from the spleen, cells were made permeable and suspended in hypotonic buffer, mixed and added palindromic oligonucleotide (coenzyme) and ³H-NAD⁺ (substrate). After 10 minutes at 37 °C, cells were centrifuged, washed with TCA and incubated 20 h at 37°C with SDS, after which radioactivity assays were run. **Results:** The difference between these two groups is statistically significant (p<0.001). The activity in K.O. cells were 38% of the activity of control cells. **Conclusion:** The method is suitable to detect differences in enzyme activity in the studied samples.

Key Words: DNA repair, poly(ADP-ribose) polymerases

INTRODUCCIÓN

Se ha descrito recientemente que la enzima Poli(ADP-Ribosa) polimerasa (PARP-1) es una proteína de unión al ADN muy abundante en células somáticas, que detecta específicamente roturas en el ADN celular y participa en determinados procesos que conducen a su reparación (1). Así, roturas en las cadenas sencillas de ADN inducen la activación del PARP que, utilizando NAD⁺ como sustrato y ADN como cofactor, cataliza la adición de ADP-ribosa a enzimas reparadoras del ADN, histonas y factores de transcripción (2,3). El esquema básico de la reacción es el siguiente:



Aunque está claro el papel del PARP en la reparación del ADN, el mecanismo por el que se produce no es del todo conocido (4). Parece que la ADP-ribosilación de las histonas

les confiere carga negativa que, en estas condiciones, favorecen la exposición del ADN dañado a las enzimas reparadoras (5,6). Aunque el PARP está implicado en la regulación de otros procesos, como mantenimiento de la estructura de la cromatina, transcripción, replicación del ADN, necrosis, apoptosis, etc. su función reparadora del ADN se considera primordial.

Asimismo, se ha sugerido que dicha enzima podría jugar un papel destacado en la respuesta inmune inflamatoria, caracterizada por una expresión exacerbada de determinados genes proinflamatorios (4). En este caso, el daño generado en el ADN da lugar a un aumento de activación del PARP-1, consumo desproporcionado de NAD⁺ y ATP y el consiguiente agotamiento energético que conduce a la alteración celular y su necrosis posterior. Numerosas situaciones fisiopatológicas, que desencadenan procesos inflamatorios en células del siste-

Listado abreviaturas no estandarizadas

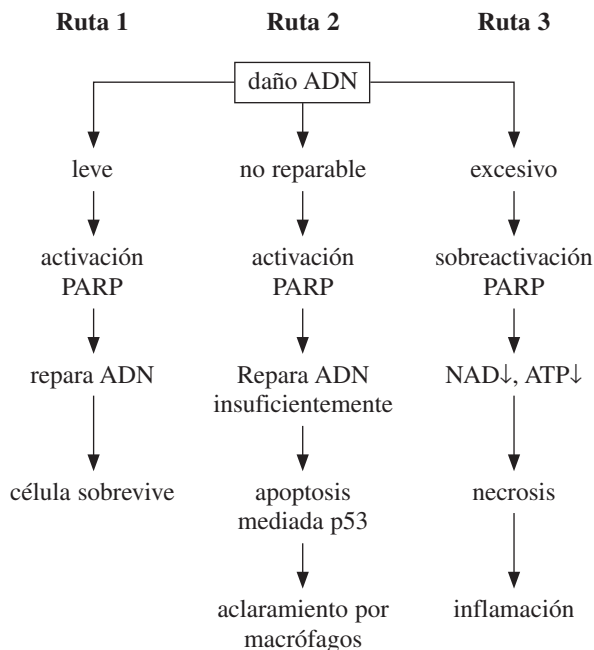
PARP-1 = Enzima poli-ADP-ribosa polimerasa
TCA = ácido tricloroacético
SDS = dodecil sulfato sódico
PBS = Tampón fosfato salino
EDTA = Ácido Etileno Diamino Tetracético
dpm = desintegraciones por minuto

Unidad de Radiofarmacia. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia

ma inmune, estimulan la producción de radicales libres a partir de la activación de óxido nítrico y provocan rotura de ADN por oxidación, dando lugar a los procesos descritos (7-10).

Por un lado el PARP protege a la célula al facilitar la reparación del ADN dañado pero por otro, una excesiva activación del mismo puede llevar a la caída de la reserva celular de NAD⁺/ATP lo que produce la muerte de la célula.

Las consecuencias de la actividad del PARP se han englobado en el siguiente esquema, según el cual, las células expuestas a agentes que dañan el ADN pueden seguir tres caminos según la intensidad del estímulo:



Si el PARP se activa por un estímulo genotóxico débil, facilita la reparación del ADN, deteniendo el ciclo celular e interactuando con enzimas reparadoras del ADN. La célula sobrevive tras la reparación del material genético, sin riesgo de conservar genes mutados.

Un daño más intenso del ADN que, aún sin ser excesivo, impida su reparación, inducirá la muerte celular por apoptosis (11-13). En esta situación las caspasas dividen el PARP en dos fragmentos inactivándolo (14). Esta ruta permite que las células cuyo ADN sea irreparable, puedan ser eliminadas de forma segura (es decir, sin depleción de NAD⁺/ATP, como ocurre en la tercera ruta, en la que la necrosis llevaría a la liberación de componentes celulares que producirían inflamación, con el consiguiente peligro para células cercanas).

El daño extenso del ADN que abre la tercera ruta puede producirse por un fuerte estrés oxidativo (radicales hidroxilo, peroxinitrito, anión nitrosilo). La activación del PARP predomina sobre la activación de las caspasas mediada por la apoptosis, que tiene una cinética más lenta. Esta hiperactivación del PARP lleva, como hemos dicho, a la depleción de NAD⁺/ATP, con lo que se inhibe la apoptosis, proceso dependiente de ATP, y se llega a la necrosis celular (15-18).

OBJETIVO

Determinar la actividad enzimática de PARP en linfocitos B obtenidos del bazo de ratones *Wild type* normales y deficientes

para PARP-1, mediante un procedimiento basado en la medida del ³H-NAD⁺ que consumen en presencia de un oligonucleótido activador.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Se utilizaron muestras de bazo provenientes de doce ratones *Wild type*. Seis de ellos, que expresaban normalmente PARP endógeno, como grupo control y seis, de la misma cepa genética que los anteriores, a los que, mediante recombinación homóloga, se les había inactivado el gen que expresa PARP-1 (*Knock out* para PARP-1).

El bazo del ratón sacrificado (depositado en colador de malla fina sobre una placa Petri) se disgrega con ayuda de una jeringa. Se transfiere el homogeneizado a un tubo de ensayo y tras decantar los fragmentos grandes se centrifuga el sobrenadante a 500xg. Se resuspende el botón celular resultante, en 1 mL de disolución hipotónica 0'144 M de NH₄Cl (Sigma®) en tampón Tris 17 mM (pH=7'2), durante 4 minutos para lisar hematíes y a continuación se reestablece la osmolaridad con 9 mL de PBS frío. Se centrifuga la muestra durante 5 minutos a 200xg (para evitar la formación de agregados de proteínas) y el botón celular se resuspende e incuba 30 minutos con 100 µL de una solución en PBS (Sigma) de anticuerpos magnéticos anti-linfocitos B (anti CD-19). Se aíslan por imantación los linfocitos B, y una vez decantado el sobrenadante se resuspende el botón linfocitario en 5 mL de PBS frío. Se repite el proceso dos veces para depurar linfocitos y se recuenta el número de células presentes.

Permeabilización de muestras

Se centrifuga la suspensión celular de linfocitos B en PBS a 0°C, durante 5 min a 1.000xg y se resuspende el botón linfocitario resultante en tampón hipotónico de permeabilización (10mM Tris-HCl pH 7.8, 1mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 30 mM de 2-mercaptoetanol) suplementado con digitonina (concentración final de 0,015% (w/v); Sigma) a una densidad de 3 x 10⁶ células/100 µL. Se mantiene en hielo durante 1 minuto y a continuación se añaden 4 mL de tampón hipotónico de permeabilización a cada muestra. Las células se centrifugan a 1.000xg, durante 10 minutos a 0°C, y se resuspenden de nuevo en tampón hipotónico a una densidad de 10⁶ células/ 53 µL.

Se toman en tubo *ependorf* tres alícuotas de 53 µL de la suspensión celular anterior, una para verificar el número de células y otras dos para medida de actividad enzimática de PARP.

Medida de la actividad enzimática de PARP

A cada alícuota de 53 µL de la suspensión celular anterior, mantenida en hielo, se le añade 5 µg de "primer" activador de PARP (oligonucleótido 5'-GGAATTCC) disuelto en 13 µL de ClNa 15 mM.

A continuación se añade a cada alícuota 34 µL de la mezcla de reacción, que consta de:

- 100mM Tris-HCl pH 7.8
- 18.5 kBq de (adenina-2,8-³H)-NAD⁺
- 1 mM NAD⁺
- 120 mM de MgCl₂

para completar un volumen final de reacción de 100 µL.

Se agita para homogeneizar y se incuba a 37 °C durante 10 minutos. A continuación, para frenar la reacción, se sumerge en hielo la suspensión celular y se le añade 40 µL de ácido tricloroacético (TCA) frío al 50% (p/v). Se incuban a 4°C durante 3 horas.

Posteriormente se centrifuga la muestra a 5.000xg durante 10 minutos, se elimina el sobrenadante y se lava el botón celular con 500 µL de TCA al 5% frío. Se centrifuga a 5.000xg durante 5 minutos, se repite el lavado 2 veces y tras eliminar el TCA sobrenadante se añaden 500 µL de dodecil sulfato sódico (SDS) al 2%/ NaOH 0,1 N y se deja incubar durante la noche a 37°C.

Se transfiere cada muestra a un vial de centelleo, se le añade 4 mL de cóctel (Optiphase Hisafe 3, Perkin-Elmer), y tras agitar durante 2 minutos se cuenta cada una de ellas 10 minutos en un contador de centelleo líquido (Modelo 1.409 DSA, Wallac).

RESULTADOS

En la figura 1 se presenta la actividad enzimática de cada uno de los seis ratones *Wild type* manipulados genéticamente, que no expresan PARP-1, frente a la actividad enzimática de su correspondiente control expresada en desintegraciones por minuto (dpm) por millón de células presentes en la muestra.

En el análisis estadístico de los resultados se aplicó una *t* de Student para datos no apareados y muestras independientes. Se encontraron diferencias significativas ($P > 0,001$) entre la actividad enzimática de PARP expresada por los ratones control y los ratones manipulados genéticamente (*Knock out* para PARP-1).

La actividad enzimática media de PARP en los ratones que no expresan PARP-1 fue un 38% de la actividad enzimática media de los ratones control.

DISCUSIÓN

Como hemos visto, dependiendo del grado de daño del ADN y por tanto del grado de activación de PARP (y de depleción de NAD⁺/ATP), la célula puede morir por apoptosis/necrosis, o sobrevivir en caso de que pueda repararse el ADN. En situaciones de generación masiva de radicales libres, como la isquemia-reperfusion, el PARP depleciona los niveles de ener-

gía, y la célula muere por necrosis. Sin embargo, en otras situaciones, como el envejecimiento, en las que se forman menos radicales libres, la activación del PARP es menor, el ADN puede repararse y la célula sobrevive. De igual modo, en enfermedades inflamatorias crónicas, la activación del PARP no llega a agotar del todo los niveles de NAD⁺/ATP y las células quedan en una situación intermedia entre la reparación del ADN y la supervivencia o la muerte celular por apoptosis o necrosis (dependiendo de la reserva de ATP).

Numerosos estudios que utilizan ratones deficientes (*Knock out*) en PARP-1 o animales tratados con inhibidores farmacológicos del PARP demuestran que la inactivación del PARP-1 mejora la respuesta a la inflamación; mantiene los niveles de NAD⁺/ATP en células sometidas a un estrés oxidativo permitiéndoles funcionar normalmente, o en células cuyo ADN está muy dañado preserva ATP y permite la apoptosis, evitando la muerte por necrosis (19,20). Así, aunque la inhibición del PARP también detiene la reparación del ADN debida a un daño menor, permanece, sin embargo, la activación de la maquinaria apoptótica.

La participación de PARP en estos procesos justifica el interés que entraña disponer de métodos de medida que nos permitan conocer su grado de activación en los mismos y establecer su relación con la supervivencia celular en dichas situaciones (21,22). Describimos un método isotópico modificado (1) para medir actividad enzimática de PARP en linfocitos B provenientes de bazo de ratón mediante la medida del NAD⁺ tritiado que consumen en presencia de un oligonucleótido activador (23) del PARP linfocitario. Las modificaciones metodológicas introducidas, nos permiten medir actividad de PARP en células frescas procedentes de tejidos, optimizar el consumo de NAD / ³H-NAD del método original, y simplificar la obtención del resultado final por medida directa de la radiactividad en el disgregado celular.

El método descrito parece perfectamente válido para detectar variaciones en la actividad enzimática de PARP en células del sistema inmunológico. Los ratones manipulados genéticamente muestran un significativo descenso de la actividad de PARP debido a la deficiencia genética que les impide la expresión de PARP-1. Su actividad de PARP se debe a la expresión de otros miembros de esta superfamilia de proteínas que presentan dicha actividad catalítica, principalmente PARP-2 (24). De hecho la ausencia total de actividad de PARP es incompatible con la vida a nivel embrionario tal como se ha comprobado en ratones deficientes para PARP-1 y PARP-2 (25).

Por otra parte al ser un método general, basado en el consumo de NAD⁺ tritiado por una población celular permeabilizada, este método, según se describe, puede utilizarse para detectar actividad enzimática de PARP en células frescas provenientes de cualquier muestra biológica.

Correspondencia:
Teresa Martínez
Unidad de Radiofármacos
Hospital Virgen de la Arrixaca
Ctra. Madrid-Cartagena s/n
30120 El Palmar (Mucia)
Correo electrónico:
teodomiro.frente@carm.es

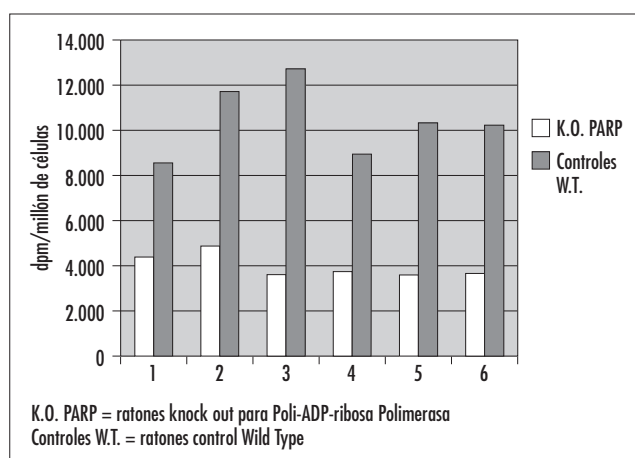


Figura 1 Actividad enzimática de cada uno de los seis ratones *Wild type* manipulados genéticamente, que no expresan Poli-ADP-ribosa Polimerasa (PARP-1), frente a la actividad enzimática de su correspondiente control expresada en dpm por millón de células (linfocitos B, provenientes de bazo) presentes en la muestra.

BIBLIOGRAFÍA

- Muiras ML, Müller M, Schächter F, Bürkle A. Increased poly (ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians. *J Mol Med* 1998; 76: 346-54.

2. De Murcia J, Ménessier de Murcia J. Poly (ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 172-6.
3. Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A. Post-translational modification of poly (ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 405-11.
4. Yélamos J, Oliver FJ. Role of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in the inflammatory response. *Inmunología* 2002; 21(4): 219-27.
5. Satoh MS, Poirier GG, Lindahl T. Dual effect for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage. *Biochemistry* 1994; 33: 7099-106.
6. Lin W, Ame JC, Aboul-ela N, Jacobson EL, Jacobson MK. Isolation and characterization of the cDNA encoding bovine poly (ADP-ribose) glycohydrolase. *J Biol Chem* 1997; 272: 11895-901.
7. Szabó C (ed): *Cell Death: The Role of PARP*. Boca Ratón: CRC Press, 2000.
8. Murthy KGK, Xiao CY, Mabley JG, Chen M, Szabó C. Activation of poly (ADP-ribose) polymerase in circulating leukocytes during myocardial infarction. *Shock* 2004; 21(3): 230-4.
9. Patcher P, Mabley JG, García Soriano F, Liaudet L, Szabó C. Activation of poly (ADP-ribose) polymerase contributes to the endothelial dysfunction associated with hypertension and aging. *Int J Mol Med* 2002; 9: 659-64.
10. Patcher P, Liaudet L, García Soriano F, Mabley JG, Szabó E, Szabó C. The Role of poly (ADP-ribose) polymerase. Activation in the Development of Myocardial and Endothelial Dysfunction in Diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 514-21.
11. Zhao-Qi Wang, Stingl L, Morrison C, Jantsch M, Los M, Schulze-Osthoff K et al. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes & Development* 1997; 11: 2347-58.
12. Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruíz-Ruíz MC, de Murcia G, Ménessier de Murcia J. Importance of poly (ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an unclavable mutant. *J Biol Chem* 1998; 273: 33533-9.
13. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S et al. Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274(33): 22932-40.
14. Decker P, Isenberg D, Muller S. Inhibition of Caspase-3-mediated poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). Apoptotic cleavage by human PARP autoantibodies and effect on cells undergoing apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275(12): 9043-6.
15. Cardinal JW, Allan DJ, Cameron DP. Poly (ADP-ribose) polymerase activation determine strain sensitivity to streptozotocin-induced cell death in inbred mice *J Mol Endocrinol* 1999; 22: 65-70.
16. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and allox induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 1981; 294: 284-6.
17. Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL. DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and the smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1753-8.
18. Chiarugi A. Poly (ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The "suicide hypothesis" revisited. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 122-9.
19. Virág L, Szabó C. The Therapeutic Potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54 (3): 375-429.
20. Cosi C. New inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase and their potential therapeutic targets. *Expert Opin. Ther. Patents* 2002; 12(7): 1047-71.
21. Sallmann FR, Vodenicharov MD, Zhao-Qi Wang, Poirier GG. Characterization of sPARP-1. *J Biol Chem* 2000; 275(20): 15504-11.
22. Bakondi E, Bai P, Szabó E, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C et al. Detection of poly (ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate. *J Histochem-Cytochem* 2002; 50(1): 91-8.
23. Berger NA, Petzold SJ. Identification of minimal size requirements of DNA for activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemistry* 1985; 24(16): 4352-5.
24. Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays* 2004; 26: 1-12.
25. Ménessier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F, et al. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J* 2003; 22: 2255-63.