

043
US
CDR
P1

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

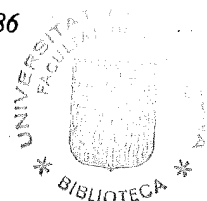
Memòria presentada per optar al grau de Doctor en Ciències Biològiques, realitzada per Montserrat Coromines i Guiu, sota la direcció del Dr. Cristóbal Mezquita i Plà, en el Departament de Fisiologia i Bioquímica de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

V.P.

Montserrat Coromines i Guiu

Cristóbal Mezquita i Plà

Barcelona, 10 de Novembre del 1986



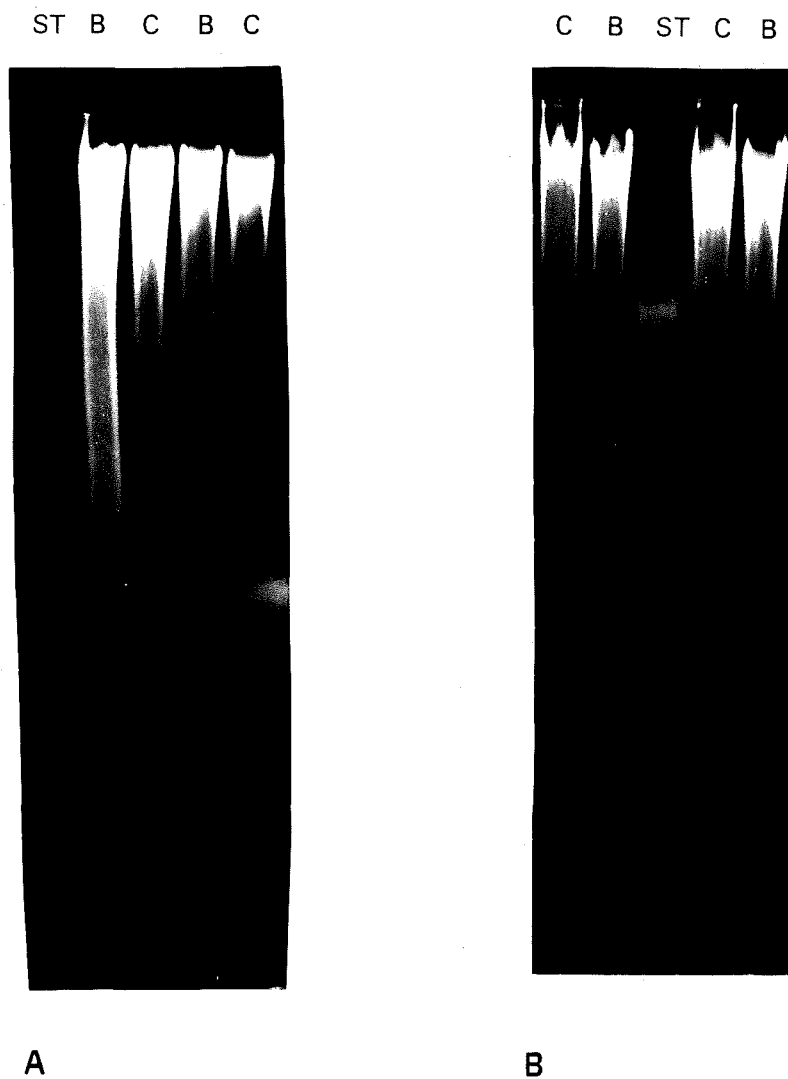


Fig.2.23- Patr6 electrofor6tic del DNA en gels desnaturalitzants d'agarosa al 0.8% despr6s del tractament amb bleomicina.

C: control, B: bleomicina, St: est6ndard

- A) esperm6tides allargades
- B) espermatozoides

3.5.3. Efecte de la N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina

Les condicions escollides per al tractament amb la N-metil-N-nitro-nitrosoguanidina (MNNG) han estat les utilitzades normalment per la majoria d'autors. La dosi de MNNG emprada és la que s'aplica a les cèl.lules quiescents (Jacobson et al., 1983).

Les cèl.lules en diferents fases de l'espermatogènesi s'han separat per elutriació i s'han recollit els espermatozoides del conducte deferent. Aquests diferents tipus cel.lulars s'han resuspès en PBS i incubat durant 20 minuts a T ambient amb 68 μ M MNNG.

L'acció de l'agent mutagen sobre els nivells de poli(ADP-ribosa) i NAD s'ha determinat a partir del sediment i sobrenedant de TCA al 20% respectivament, tal com s'ha descrit a l'apartat anterior.

Les diferents cèl.lules testiculars responen al tractament amb MNNG incrementant els nivells de poli(ADP-ribosa) d'1.5 a 2 vegades, a excepció dels espermatozoides madurs, en els quals no s'observa cap variació (fig. 3.24).

El MNNG fa decreixer molt lleugerament els nivells de NAD a les cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques (estadis I i II), espermàtides rodones (estadi III) i espermàtides allargades (estadi IV). L'agent mutagen no provoca, però, cap tipus de canvi en el contingut de NAD dels espermatozoides madurs (fig. 3.25).

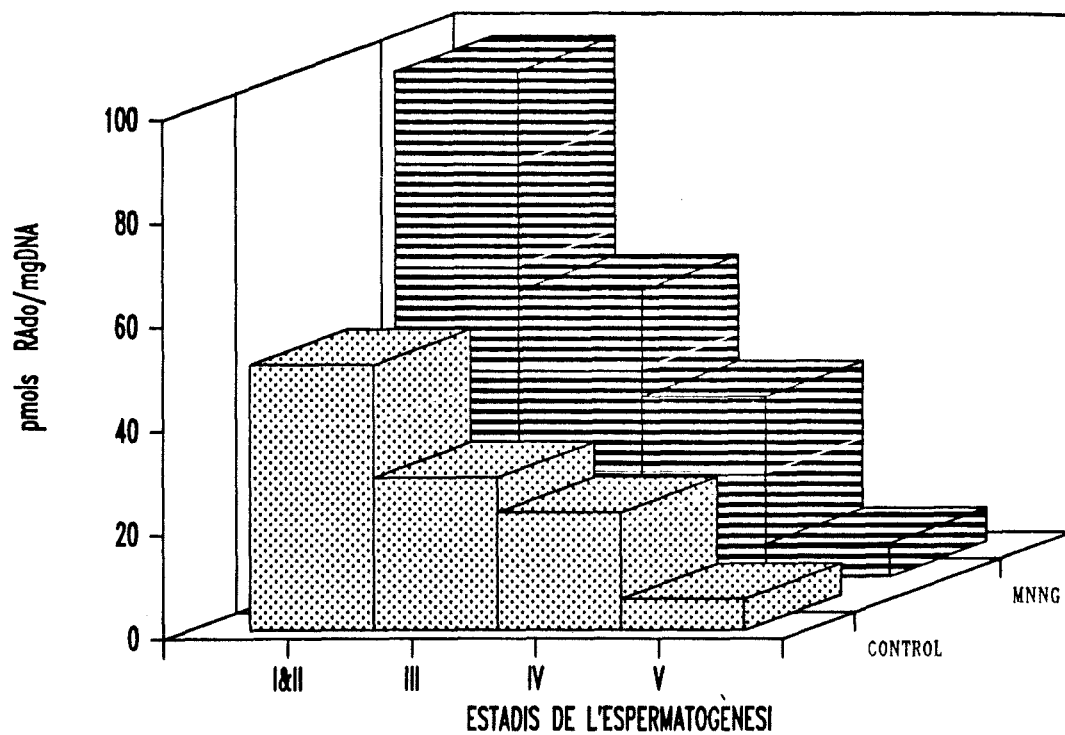


Fig.3.24- Efecte del MNNG sobre els nivells de ribosiladenosina de les diferents cèl.lules testiculars.

(·) cèl.lules control
 (≡) cèl.lules tractades amb MNNG

I-II - cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques
 III - espermatides rodones
 IV - espermatides allargades
 V - espermatozoides

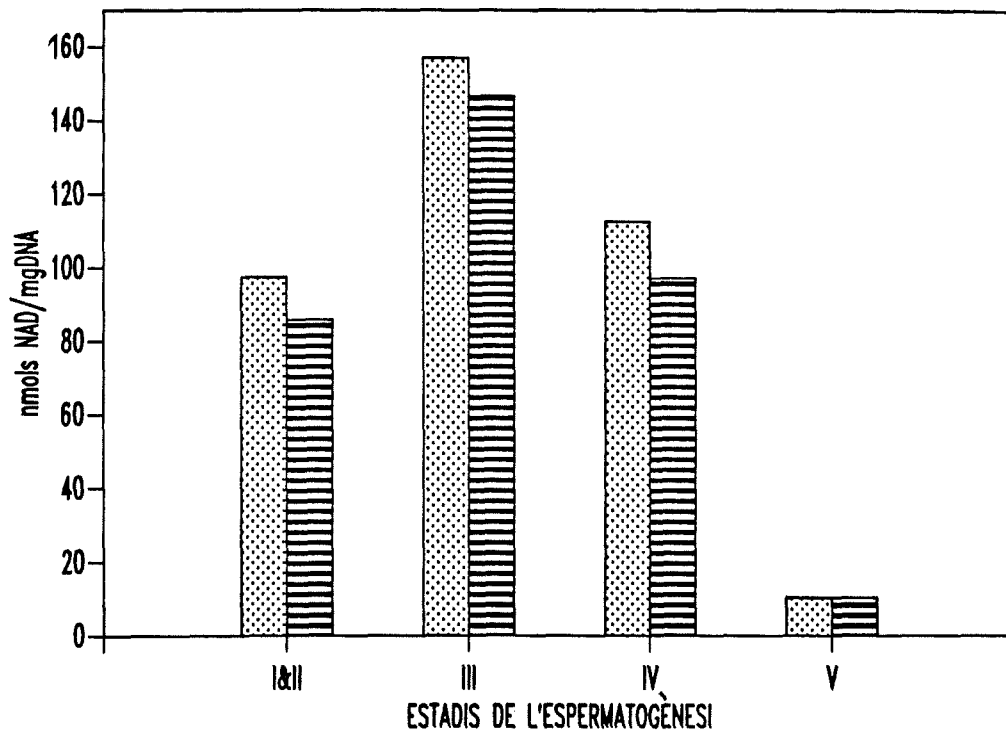


Fig.3.25- Efecte del MNNG sobre el contingut de NAD al llarg de l'espermatogènesi.

(·) cèl.lules control
 (≡) cèl.lules tractades amb MNNG

I-II - cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques
 III - espermatides rodones
 IV - espermatides allargades
 V - espermatozoides

3.6. IDENTIFICACIÓ DE LES PROTEÏNES ACCEPTADORES DE LA POLI(ADP-RIBOSA) IN VITRO

La determinació de les proteïnes acceptadores de la poli(ADP-ribosa) in vitro s'ha fet després de purificar els nuclis testiculars amb sacarosa 2 M (sec. 2.3) i de separar-los mitjançant elutriació.

Les condicions de separació amb l'elutriador han estat lleugerament modificades respecte a les de les cèl.lules, i les fraccions s'han identificat pel microscopi de contrast de fases. A 4.000 rpm s'obtenen els nuclis següents:

- flux = 6 ml/min - nuclis d'espermàtides allargades amb un 10% de nuclis rodons petits.

- flux = 11 ml/min - nuclis d'espermàtides rodones amb un 20% de nuclis allargats.

- flux = 25 ml/min - nuclis rodons de major volum.

Els espermatozoides madurs no s'han considerat a causa que no es detecta incorporació d'ADP-ribosa procedent del $-^{14}\text{C}$ -NAD en aquestes cèl.lules (sec. 3.2).

Els diferents nuclis s'han incubat amb $-^{14}\text{C}$ -NAD $5\ \mu\text{M}$ a $37\ \text{C}$ durant diferents períodes de temps, tenint en compte la cinètica d'incorporació d'ADP-ribosa dels diferents tipus cel.lulars: 2 minuts per a les cèl.lules premeiòtiques, meiòtiques i espermàtides rodones i 30 minuts en el cas de les espermàtides allargades. El PMSF $0.4\ \text{mM}$ ha estat present durant la incubació per tal de prevenir la proteòlisi.

Les proteïnes s'han extret en primer lloc amb àcid perclòric (PCA) $0.74\ \text{N}$, que conté bisulfit sòdic. Les insolubles en aquest àcid s'han extret posteriorment amb HCl $0.3\ \text{N}$ i la resta de proteïnes s'ha dissolt directament en tampó de mostres de SDS, després de rentar-les amb acetona i deixar-les eixugar (sec. 2.10).

Les proteïnes que s'extrauen amb PCA $0.74\ \text{N}$ són la histona H1 i les HMGs 1, 2 i 17, mentre que, a l'extracte de HCl $0.3\ \text{N}$, s'hi troben la resta d'histones i la protamina. La integritat d'aquesta última proteïna a les espermàtides més avançades indica l'absència de proteòlisi durant el procés. Al gel de SDS s'observen altres proteïnes nuclears que se separen d'acord amb el seu pes molecular.

Les bandes que han incorporat ADP-ribosa s'han identificat mitjançant fluorografia a partir dels gels del 15% poliacrilamida/acètic/urea i 10% poliacrilamida/SDS (fig. 3.26a,b, 3.27a,b i 3.28).

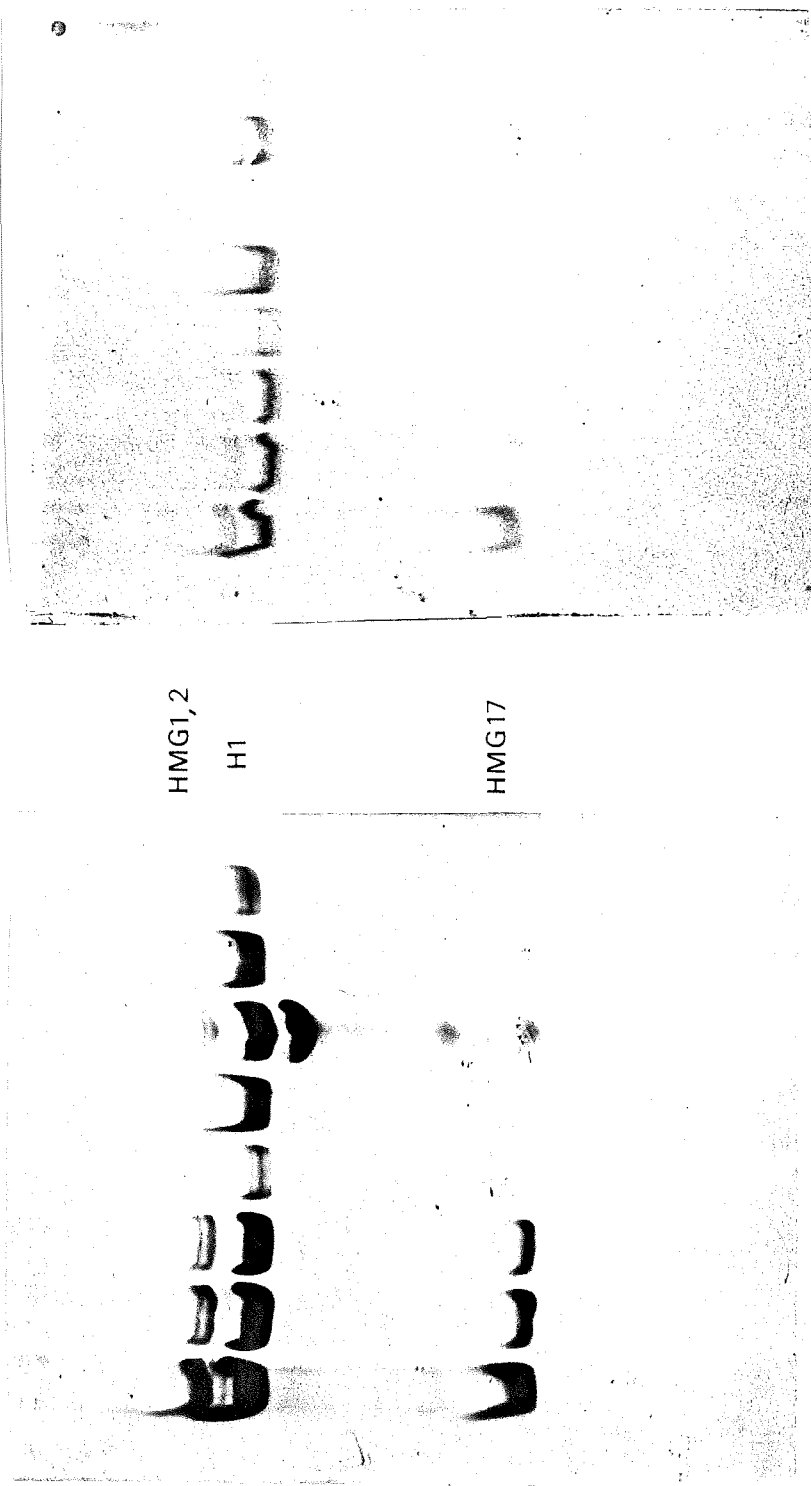


Fig. 3.26a- A) Electroforesi d'urea/acètic de les proteïnes solubles en PCA 0.74 N dels diferents nuclis testiculars (I-II- cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques, III- espermatides rodones, espermatides allargades).

B) Fluorografia del gel d'urea/acètic que mostra les proteïnes ADP-ribosilades presents a l'extracte de PCA 0.74 N.

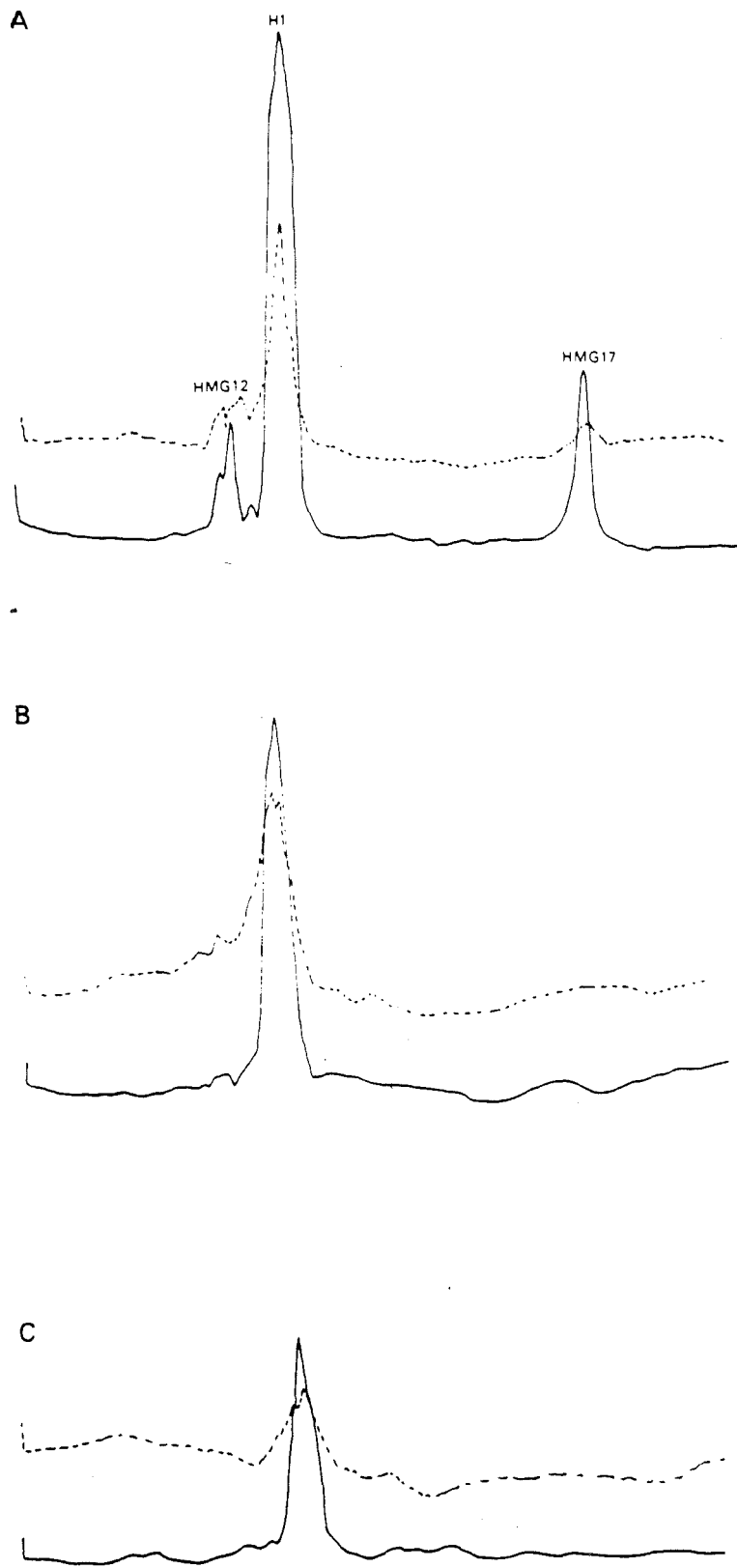


Fig.3.26b- Perfils densitomètrics corresponents als gels d'ure/acètic (—) i a les fluorografies (--) de les proteïnes solubles en PCA 0.74 N.

- A) cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques
- B) espermatides rodones
- C) espermatides allargades

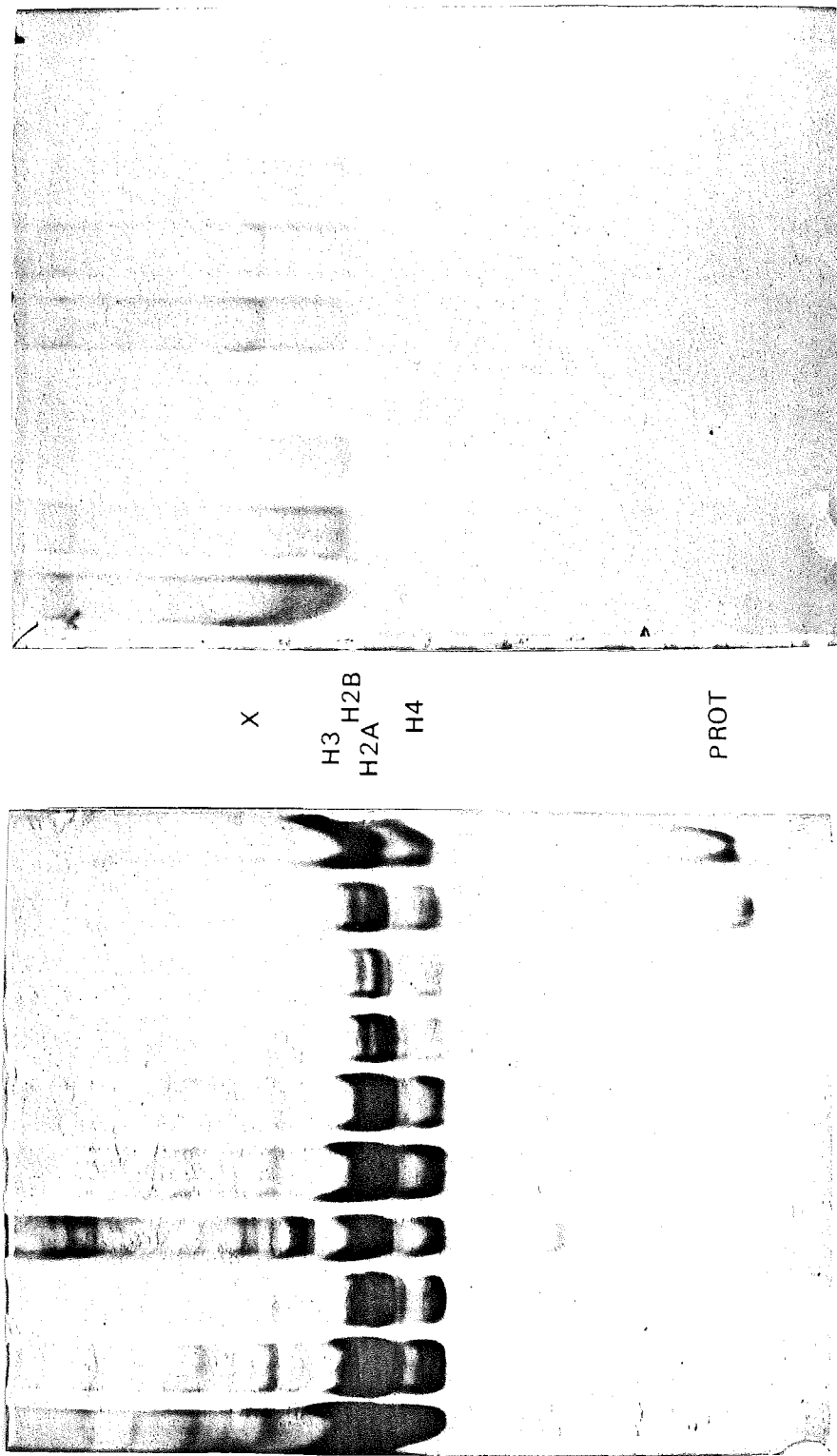


Fig. 3.27a- A) Electroforesi d'urea/acètic de les proteïnes solubles en HCl 0.3 N dels diferents nuclis testiculars (I-II- cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques, III- espermatides rodones, espermatides allargades).

B) Fluorografia del gel d'urea/acètic que mostra les proteïnes ADP-ribosilades presents a l'extracte de HCl 0.3 N.

La separació de cèl.lules per elutriació es fa en funció d'un flux definit en sentit contrari a la centrifugació. A 3.000 rpm les fraccions estan enriquides en:

- flux = 3 ml/min - espermatozoides testiculars i residus subcel.lulars.

- flux = 11 ml/min- espermàtides allargades (amb una contaminació màxima d'un 5-10% d'espermàtides rodones) i cossos residuals.

- flux = 19 ml/min- espermàtides rodones (la contaminació per espermàtides allargades pot arribar a un màxim d'un 20%).

- flux \leq 37 ml/min- cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques, principalment en paquitè. En aquesta fracció s'hi troben també cèl.lules multinucleades que poden venir de la fusió d'espermàtides rodones. La contaminació per eritròcits pot ésser evitada en dessagnar bé l'animal.

La caracterització per microscòpia de contrast de fases permet determinar la puresa i homogeneïtat de les poblacions cel.lulars obtingudes. A la fig. 3.2 es pot veure una microfotografia de les diferents cèl.lules testiculars separades per elutriació i dels espermatozoides procedents del tub seminífer.

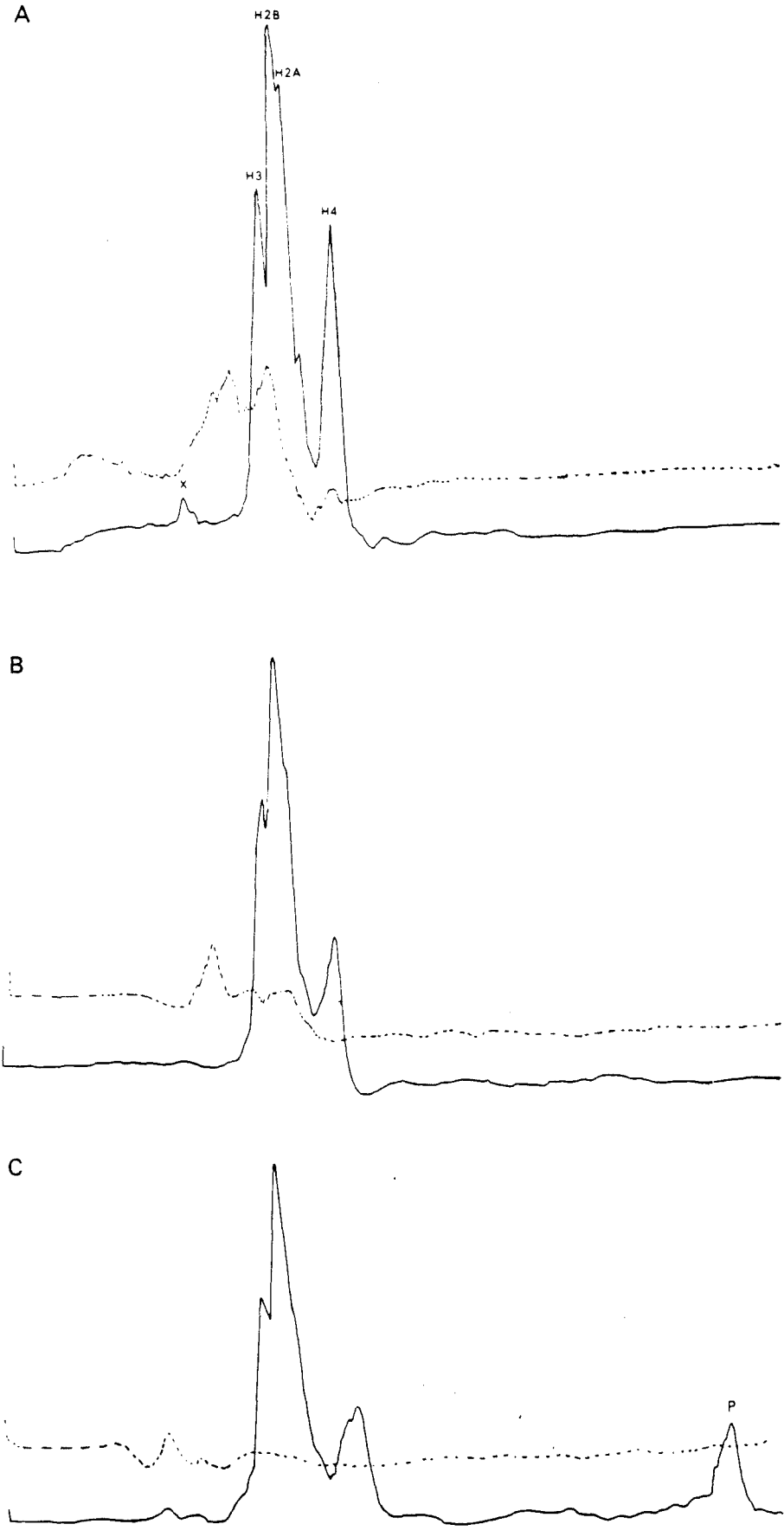


Fig. 3.27b- Perfils densitomètrics corresponents als gels d'urea/acètic (—) i a les fluorografies (--) de les proteïnes solubles en HCl 0.3 N.

- A) cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques
- B) espermàtides rodones
- C) espermàtides allargades

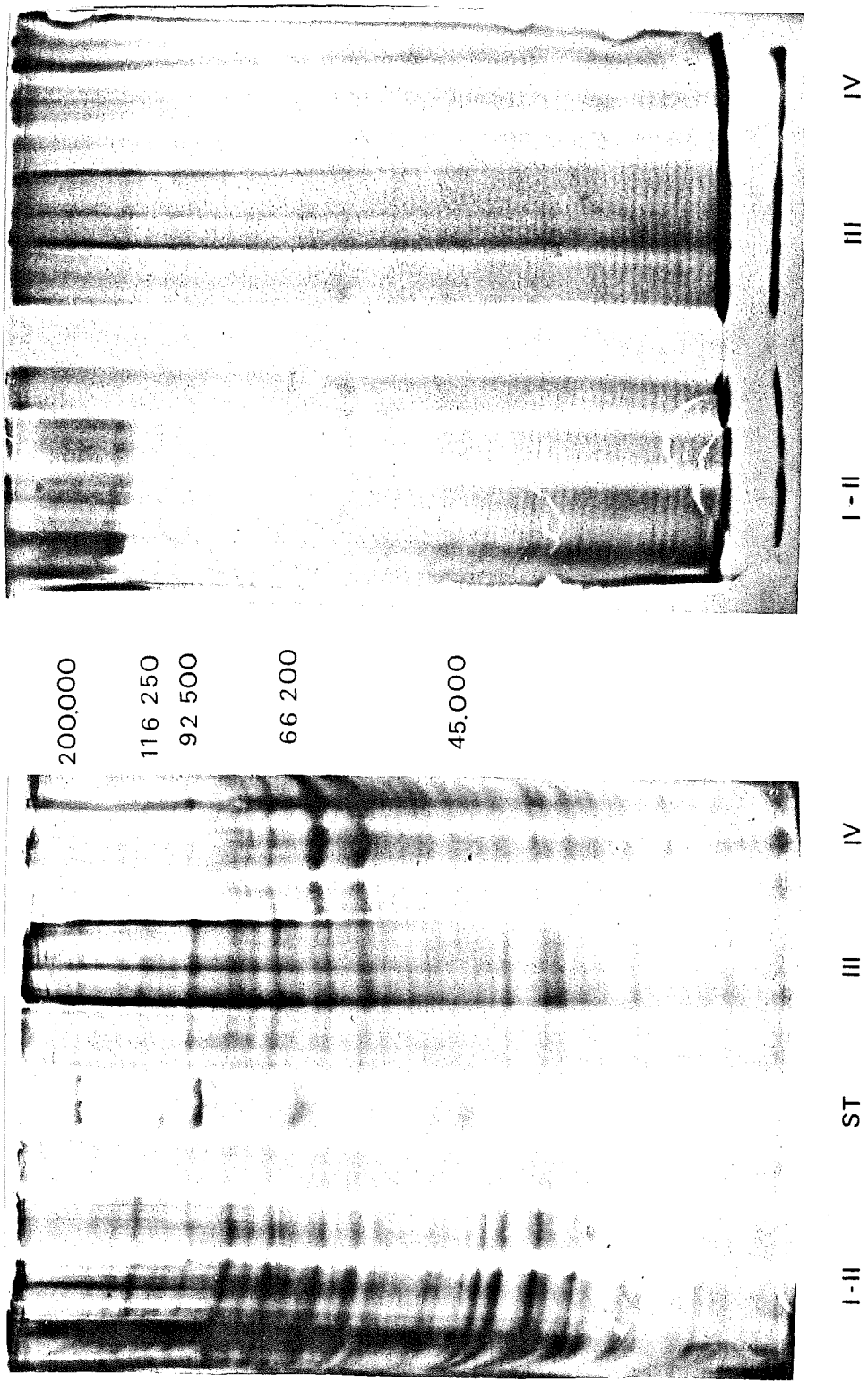


Fig.3.28- A) Electroforesi de les proteïnes solubilitzades amb SDS dels diferents nuclis testiculars (I-II- cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques, III- espermàtides rodones, IV- espermàtides allargades).

B) Fluorografia del gel de SDS que mostra les proteïnes que han incorporat ADP-ribosa marcada amb ^{14}C -NAD.

A l'extracte de PCA 0.74 N dels nuclis premeiòtics i meiòtics aïllats amb sacarosa 0.25 M (sec.2.3) després de separar les cèl.lules per sedimentació a força de gravetat unitat apareix una banda a la fluorografia que no s'observa en el gel d'urea/acètic. Aquesta banda pot correspondre, per la seva mobilitat, al dímer d'H1 prèviament descrit per Wong et al. (1983) (fig.3.29).

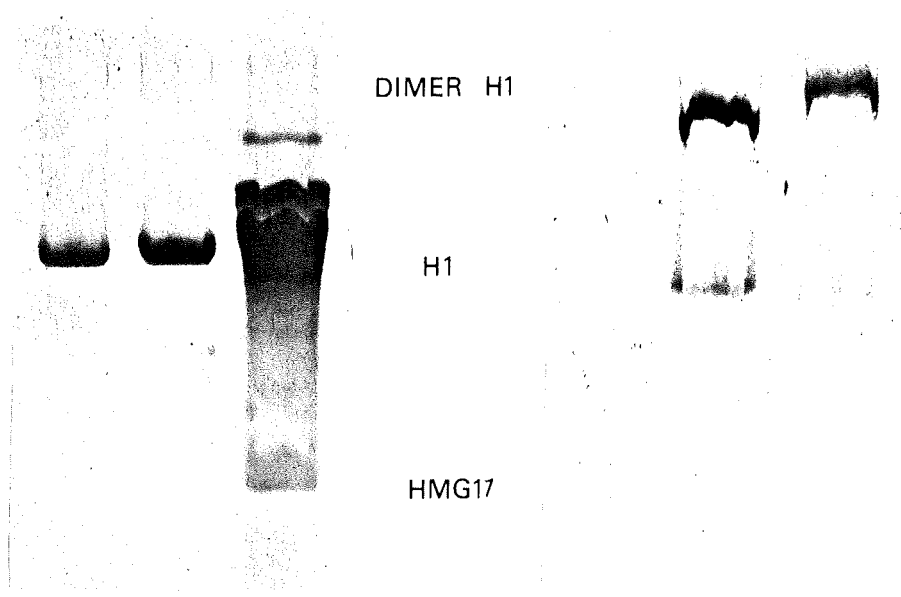


Fig.3.29- A) Electroforesi d'urea/acètic de les proteïnes solubles en PCA 0.74 N dels nuclis premeiòtics i meiòtics

B) Fluorografia del gel d'urea/acètic que mostra les proteïnes ADP-ribosilades presents a l'extracte de PCA 0.74 N dels nuclis premeiòtics i meiòtics.

Les proteïnes ADP-ribosilades in vitro al llarg de l'espermatogènesi són, doncs, les següents:

1- Entre les proteïnes solubles en PCA 0.74 N s'observen marcades les bandes que corresponen a l'H1 a les cèl.lules testiculars, i a les HMG1 i HMG2 a les cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques.

L'HMG17 només es detecta en aquesta última fracció, tant en el gel com a la fluorografia. A les cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques també s'observa una banda que pot correspondre al dímer d'H1.

2- A l'extracte de HCl 0.3 N apareix marcada una zona difícil d'atribuir i que pot correspondre tant a l'H3 com a l'H2B i l'H2A.

La protamina, proteïna bàsica que apareix a l'estadi d'espermàtides allargades, no es veu modificada.

El canvi més destacable al llarg de l'espermatogènesi sembla correspondre a la modificació de la banda X. Aquesta banda conté conjugats d'ubiquitina, com per exemple la u-H2A (Agell, 1986) i una proteïna minoritària anomenada X', encara no identificada. El marcatge d'aquesta banda augmenta durant el procés de diferenciació.

3- A la resta de proteïnes, que se solubilitzen amb SDS, es detecta una banda marcada que correspon a una proteïna de pes molecular aproximat 120.000 D a la fracció de cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques. Aquesta banda pot ésser, per raó del seu pes molecular, la pròpia poli(ADP-ribosa) polimerasa. No s'ha de descartar, però, que aquesta banda pugui correspondre a alguna de les topoisomereses I o II.

A causa que la poli(ADP-ribosa) és làbil sota condicions alcalines i el pH dels gels de SDS és 8.8, el marcatge que s'observa en forma d'escala a la fluorografia pot representar mides diferents del polímer.

DISCUSSIO

4.1. POLI(ADP-RIBOSILACIÓ) I DIFERENCIACIÓ CEL·LULAR

Les anàlisis realitzades en aquest estudi mostren que l'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa i el recanvi de residus ADP-ribosil in vitro (sec.3.2) i els nivells de polímer in vivo (sec.3.3) decreixen, respecte al DNA, durant la transició de cèl·lules genèticament actives premeiòtiques, meiòtiques i espermatides rodones a espermatides més avançades i espermatozoides, genèticament inactius.

D'altra banda, els nivells de NAD respecte a DNA o proteïna trobats al llarg de l'espermatogènesi són similars a les cèl·lules en diferents estadis, a excepció d'una baixada als espermatozoides (sec.3.4). Aquests resultats semblen indicar que el NAD, substrat de la modificació, no és el responsable de les diferències observades en la poli(ADP-ribosilació) durant l'esmentat procés.

Un descens en la poli(ADP-ribosilació) s'ha descrit també durant la diferenciació de molts altres sistemes cel·lulars. Les cèl·lules de l'epiteli intestinal (Porteous et al., 1979), els granulòcits mieloides, els neutròfils (Ikai et al., 1982) o les cèl·lules epidèrmiques terminalment diferenciades (Ueda et al., 1983) són alguns dels exemples en els quals no s'ha detectat poli(ADP-ribosa) per tècniques immunohistològiques. Així mateix, els neutròfils no presenten activitat enzimàtica als seus nuclis aïllats (Ikai et al., 1982).

Gràcies al mètode fluorescent desenvolupat per Jacobson et al. (1984) per a determinar poli(ADP-ribosa) hem pogut detectar que els espermatozoides madurs del gall contenen ADP-ribosa polimèrica amb un 2% de ramificació (sec.3.3). Aquest mètode permet quantificar, a nivell de picomols, compostos que contenen adenina i que deriven del polímer. No obstant això, els nuclis aïllats dels espermatozoides no presenten activitat poli(ADP-ribosa) polimerasa, cosa que, per altra banda, ja s'havia descrit als espermatozoides de rata, tant intactes com sonicats (Burzio et al., 1981). Es pot pensar, doncs, que l'enzim és absent o inactiu als espermatozoides i que el polímer detectat en aquestes cèl·lules s'ha sintetitzat ja en fases prèvies.

Diferents estudis semblen indicar que una reducció de l'ADP-ribosilació de les proteïnes nuclears és important per a la diferenciació de molts tipus cel·lulars. En inhibir l'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa amb nicotinamida s'indueix la maduració morfològica i funcional de les cèl·lules leucèmiques promielocítiques in vitro (Lucas et al., 1984). De la mateixa manera, l'àcid retinoïc, un inductor de la diferenciació, fa decreïxer l'activitat

enzimàtica a les cèl.lules de teratocarcinoma, com també la supressió de la síntesi de poli(ADP-ribosa) per inhibidors de l'enzim indueix la seva diferenciació (Ohashi et al., 1984).

Malgrat que s'ha proposat la presència de polímer com a marcador per a la maduració de moltes cèl.lules (Ikai et al., 1982), una qüestió important encara per resoldre és si la pèrdua d'activitat poli(ADP-ribosa) polimerasa i la consegüent pèrdua d'ADP-ribosilació de les proteïnes nuclears és resultat de la diferenciació o si és un esdeveniment que precedeix i al mateix temps fa possible aquesta diferenciació.

La participació dels trencaments del DNA en alguns processos de diferenciació cel.lular pot ésser la base molecular del requeriment de la poli(ADP-ribosa) polimerasa en la citodiferenciació. Així, l'increment en la poli(ADP-ribosilació), observat durant la diferenciació de mioblasts embrionaris de pollastre en cultiu (Farzaneh et al., 1982) o bé en limfòcits perifèrics humans estimulats per mitogen (Johnstone i Williams, 1982) es pot correlacionar amb la naturalesa dinàmica dels trencaments del DNA en el genoma d'aquestes cèl.lules (Farzaneh et al., 1985).

L'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa dels hepatòcits incrementa ràpidament quan s'estableixen en cultiu primari, la qual cosa provoca una ràpida desaparició del NAD. En canvi, l'activitat que degrada poli(ADP-ribosa) no canvia, aparentment, en incrementar el temps de cultiu, tot i que al cap de 60 min d'inhibir la poli(ADP-ribosa) polimerasa amb nicotinàmida s'observa un descens d'aproximadament el 50% en la incorporació d'ADP-ribosa (Althaus et al., 1982). Aquesta activitat que degrada el polímer la realitza, probablement, la poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa ja que la hidròlisi per la fosfodiesterasa sembla ésser insignificant (Purnell et al., 1980). A més, en general s'accepta que el recanvi de grups ADP-ribosil in vivo es deu sobretot a la glicohidrolasa, per raó de la seva afinitat i especificitat per la poli(ADP-ribosa) (Miwa et al., 1975b).

En el cas de la diferenciació de la línia germinal espermatogènica hem utilitzat benzamida per tal d'estudiar el recanvi de residus ADP-ribosil (sec.3.2). Aquest compost és un anàleg de la nicotinàmida que inhibeix l'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa in vitro a concentracions milimolars (Shall, 1975; Oikawa et al., 1980). La benzamida penetra ràpidament a les cèl.lules i arriba a concentracions que suprimeixen de manera efectiva la formació de polímer. En no afectar la seva degradació es pot utilitzar per estudiar els descens en la incorporació d'ADP-ribosa com a mesura del recanvi (Wielckens et al., 1982).

L'elevada activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa i l'alt recanvi de residus ADP-ribosil detectats a les cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques poden estar relacionats amb qualsevol de les funcions que presenten aquestes cèl.lules genèticament actives.

Les espermatides més avançades, genèticament inerts, on no tenen lloc ruptures i unions fisiològiques del DNA, mostren una baixa activitat poli(ADP-ribosa) polimerasa i no presenten recanvi de residus ADP-ribosil. Aquesta absència de recanvi juntament amb la presència d'una activitat enzimàtica residual poden determinar els nivells de polímer trobats al final de l'espermioogènesi. La quantitat de poli(ADP-ribosa) detectada a les espermatides allargades és remarcable si es té en consideració la dràstica reducció de les proteïnes nuclears que té lloc durant l'espermioogènesi (el contingut de proteïnes nuclears de les espermatides més avançades és la meitat del que existeix en estadis previs).

La baixada d'activitat poli(ADP-ribosa) polimerasa al final de l'espermioogènesi pot ésser una conseqüència del reemplaçament de les histones per la protamina. Segons Tanaka et al. (1979) en absència d'histones es produeix una inhibició de l'activitat enzimàtica. La falta de recanvi pot contribuir també a una autoinhibició de l'enzim a través de la seva pròpia (ADP-ribosilació) (Kawaichi et al., 1981).

No s'ha de descartar, però, que la disminució en l'activitat enzimàtica sigui el resultat d'una proteòlisi elevada provocada, en part, per la presència de l'acrosoma, una vesícula que conté gran quantitat d'enzims proteolítics. Si bé la proteòlisi pot ésser un mecanisme fisiològic d'eliminació de proteïnes nuclears al final de l'espermioogènesi, la utilització de diferents tipus d'inhibidors de proteases, com també una anàlisi elctroforètica, permeten controlar els possibles artefactes durant els mètodes experimentals. Els descens en els nivells de polímer in vivo semblen indicar una activitat diferencial de la poli(ADP-ribosa) polimerasa a les cèl.lules en diferents estadis de diferenciació.

Una activitat semblant a la de la poli(ADP-ribosa) nuclear s'ha descrit a les mitocòndries d'òcits de *Xenopus laevis* (Burzio et al., 1979) i fetge de rata (Burzio et al., 1981), òrgànuls cel.lulars on també es troba DNA. Una part del polímer detectat a les cèl.lules intactes (sec.3.3) pot venir, doncs, d'aquestes estructures subcel.lulars. A més, la impermeabilitat de la membrana interna de la mitocòndria al NAD i NADH pot suposar la no detecció d'incorporació d'ADP-ribosa a partir de $-^{14}\text{C}$ -NAD procedent d'aquests òrgànuls.

4.2. POLI(ADP-RIBOSILACIÓ) I ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

Els canvis en l'ADP-ribosilació de les proteïnes nuclears s'han relacionat tant amb la condensació com amb la relaxació de la cromatina (Stone et al., 1977; Wong et al., 1982; Poirier et al., 1982). Ambdós fenòmens tenen lloc a l'espermioogènesi, procés durant el qual el complex nuclihistona és reemplaçat pel complex nucliprotamina altament condensat (Mezquita, 1985).

La cromatina dels espermatòcits en estadis previs al paquitè és homogènia i dispersa (Rattner et al., 1980). Al paquitè les fibres de cromatina de 30 nm s'estenen perpendicularment als elements laterals del complex sinaptinèmic formant "loops". Durant aquest estadi, després de l'aparellament dels cromosomes homòlegs, una endonucleasa meiòtica produeix una sèrie de "nicks" programats al DNA. L'accessibilitat de l'endonucleasa a les seqüències de DNA que experimenten trencaments depèn de l'estructura particular de la cromatina en els dominis que contenen aquestes seqüències. La dissolució del complex sinaptinèmic té lloc, en general, al diplotè (Rasmussen, 1975) i durant la transició entre aquests estadis esdevé una marcada descondensació de la cromatina.

L'estructura de la cromatina de les espermatides rodones primitives és similar a l'observada a les cèl.lules somàtiques. En canvi, les espermatides en procés de diferenciació cap a espermatozoides tenen una cromatina amb característiques úniques:

- 1- Les regions eucromàtiques i heterocromàtiques són reemplaçades per una cromatina d'apariència uniforme.
- 2- La transició de nucli-histona a nucli-protamina va acompanyada d'un relaxament de l'estructura de la cromatina, de manera que s'observen els canvis següents:
 - exposició de llocs d'unió al DNA, posat de manifest per l'alta capacitat d'unió a actinomicina D i RNA polimerasa in vitro (Mezquita i Teng, 1977a).
 - hiperacetilació de la histona H4 i ràpid recanvi dels seus grups acetil (Oliva i Mezquita, 1982).
 - augment dels conjugats ubiquitina-proteïnes nuclears (Agell, 1986).
 - increment de les relacions HMG1/histones del nucleosoma i HMG2/histones del nucleosoma (Chiva i Mezquita, 1983)

Tots aquests canvis, juntament amb mecanismes proteolítics, dependents o no d'ubiquitina, poden tenir com a conseqüència un relaxament de la cromatina de manera que facilitin la unió de la protamina als llocs accessibles del DNA. Aquesta mateixa protamina és capaç de desplaçar les histones del nucleosoma in vitro a concentracions fisiològiques (Oliva i Mezquita, 1986).

La poli(ADP-ribosilació) pot contribuir també a aquest procés, ja que pot representar un "mecanisme de llançadora" (shuttle mechanism) per moure les proteïnes cap i des del DNA (Zahradka i Ebisuzaki, 1982). Segons aquest mecanisme la modificació de les proteïnes provoca una repulsió de càrregues entre el polímer i el DNA, la qual cosa provoca la dissociació de la proteïna de l'àcid nucleic. L'absència de recanvi de residus ADP-ribosil al nucli de les espermatides allargades pot estar, doncs, directament relacionat amb el desplaçament de les proteïnes durant la transició nuclihistona-nucliprotamina (fig.4.1).

L'absència d'activitat poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa a les espermatides més avançades pot ésser una conseqüència de la presència de DNA lliure d'estructura polinucleosomal al final de l'espermioogènesi (Mezquita i Teng, 1977a). S'ha suggerit que l'activitat d'aquest enzim pot estar modulada per canvis en l'extensió en la qual el DNA està cobert per proteïnes a la cromatina (Stone et al., 1978). A més, la glicohidrolasa és inhibida per la protamina (Miwa et al., 1974), proteïna que arriba al seu nivell més elevat a l'esmentat estadi de l'espermioogènesi.

A l'espermatozoide madur, en el qual les histones han estat eliminades i reemplaçades per la protamina, el DNA es troba organitzat en una forma altament condensada, inaccessible a la unió amb actinomicina D i resistent a les nucleases (Mezquita i Teng, 1977a; Young i Sweeney, 1979).

Malgrat que no hem detectat activitat poli(ADP-ribosa) polimerasa als seus nuclis aïllats, aquestes cèl.lules contenen polímer ramificat. La participació de l'ADP-ribosilació en la condensació cromosomal durant l'espermioogènesi ha estat proposada per Wong et al. (1977). Altres possibles papers, tals com protecció de la cromatina de l'esperma enfront dels atacs proteolítics i nucleolítics s'han postulat també a altres sistemes cel.lulars (Inagaki et al., 1980; Tanigawa i Shimoyama, 1983). Als macròfags s'ha identificat la poli(ADP-ribosa) com a inhibidor de proteases de la cromatina (Inagaki et al., 1980).

La protamina és un acceptador de poli(ADP-ribosa) als nuclis testiculars de truita in vitro (Wong et al., 1977). Tanmateix no podem determinar, encara, si la protamina pot ésser ADP-ribosilada in vivo i si pot ésser l'acceptadora de l'ADP-ribosa polimèrica detectada a l'esperma madur. En el cas de la identificació in vitro (sec.3.6), la baixa quantitat de proteïna que es troba en el gel pot ésser una raó per no observar marcatge associat a aquesta banda en la corresponent fluorografia.

El fet que l'ADP-ribosilació no afecti en gran mesura la mobilitat de les diferents proteïnes sembla indicar que aquestes es troben modificades per oligòmers curts o fins i tot monòmers, tal com s'ha descrit en d'altres models (Ueda et al., 1983). L'estudi de la complexitat de la poli(ADP-ribosa) indica que aquesta té una longitud, com a mitjana, de 6-10 residus. Tanmateix no podem associar el polímer a cap proteïna en concret com tampoc a cap estadi de l'espermatogènesi ja que s'ha identificat globalment a partir de tots els nuclis testiculars.

La regulació de l'estructura de la cromatina i, per tant, de les seves funcions, mitjançant poli(ADP-ribosilació), es pot aconseguir per dos tipus de mecanismes. Un és la modificació covalent de proteïnes nuclears específiques. En l'altre mecanisme intervenen les reaccions no-covalents entre el polímer d'ADP-ribosa carregat negativament i altres components de la cromatina.

S'han fet molts estudis per tal d'entendre les funcions covalents de la poli(ADP-ribosa). Per exemple, s'ha demostrat que una gran quantitat de proteïnes nuclears són poli(ADP-ribosilades) in vitro. Aquestes inclouen enzims tals com una endonucleasa dependent de Ca i Mg (Yoshihara et al., 1985), les topoisomerases I (Ferro i Olivera, 1984) i II (Darby et al., 1985) i la mateixa poli(ADP-ribosa) polimerasa (Jump i Smulson, 1980; Ogata et al., 1981; Surowy i Berger, 1983) entre d'altres. En general, la modificació sembla conduir a una inactivació de l'enzim. També s'ha suggerit que l'activitat de la DNA ligasa II és regulada per poli(ADP-ribosilació) (Creissen i Shall, 1982; Yoshihara et al., 1985). Aquesta activitat enzimàtica sembla ésser la responsable de la unió dels "nicks" del DNA en els mecanismes de replicació per reparar l'àcid nucleic. No obstant això, no s'ha demostrat si la poli(ADP-ribosa) es troba realment unida a l'enzim. Altres proteïnes nuclears modificades covalentment inclouen les histones del "core" (Poirier i Savard, 1980; Ueda et al., 1983), el conjugat u-H2A (Okayama i Hayaishi, 1978; Cerutti et al., 1985), la histona H1 (Smulson et al., 1980; Poirier et al., 1982) i les proteïnes d'alta mobilitat electroforètica (Reeves et al., 1981).

Malgrat tot, el coneixement dels acceptadors de les cadenes de poli(ADP-ribosa) in vivo és encara molt limitat. D'una banda, només la histona H2B i la poli(ADP-ribosa) polimerasa semblen ésser les principals acceptadores del polímer en cèl.lules intactes després de danyar el DNA (Adamietz i Rudolph, 1984; Kreimeyer et al., 1984). S'ha postulat que la modificació de l'H2B, principal acceptadora entre les histones del "core", pot relaxar l'estructura nucleosomal i com a conseqüència deixar el DNA més accessible als enzims que intervenen en el seu metabolisme (Adamietz i Rudolph, 1984). Tanuma i Johnson (1983) han descrit també que les HMGs es poli(ADP-ribosilen in vivo i que la modificació d'aquestes proteïnes és necessària per a l'acurada expressió gènica a les cèl.lules de tumor mamari de ratolí tractades amb glucocorticoids.

A més s'ha suggerit que dues molècules d'H1 poden ésser entrecreuades mitjançant una cadena de 15-16 residus d'ADP-ribosa (Wong et al., 1983), i donen lloc a l'anomenat dímer d'H1. Així mateix s'han presentat evidències que demostren l'existència de conjugats H1-poli(ADP-ribosa) d'una complexitat superior al dímer en cèl.lules intactes (Smulson et al., 1984). Els conjugats H1-poli(ADP-ribosa) s'han relacionat tant amb mecanismes de condensació com de relaxació de la cromatina (Smulson et al., 1980; de Murcia et al., 1983). Butt i Smulson (1982) han proposat que la modificació de l'H1, i en especial la formació del dímer que detecten als voltants de les ruptures del DNA, manté la continuïtat de les molècules d'aquest DNA en la cromatina fins que l'àcid nucleic és reparat o replicat. Això podria explicar la presència del possible dímer d'H1 només a les cèl.lules premeiòtiques i meiòtiques, ja que són les úniques actives en replicació en condicions fisiològiques.

Quant a l'ADP-ribosilació de la banda X, un dels canvis més destacables de les proteïnes modificades al llarg de l'espermatogènesi (sec.3.6), es pot pensar en un efecte modulador de les funcions postulades per als conjugats d'ubiquitina, tant en el sentit d'afavorir encara més el relaxament de la cromatina a les espermàtides allargades com de participar d'alguna manera en els possibles mecanismes proteolítics dependents d'ubiquitina.

Respecte a les interaccions no covalents del polímer amb altres components de la cromatina, no s'han fet, ara per ara, gaires estudis. L'anàlisi de la mida i complexitat del polímer in vivo pot representar una eina important per tal d'estudiar aquest tipus d'interaccions. En aquest sentit s'ha de destacar el treball d'Alvárez-González (1985) en el qual fracciona les mostres d'ADP-ribosa d'acord amb la seva mida mitjançant dos mètodes: electroforesi en gel de poliacrilamida i cromatografia en gel filtració. Polímers de considerable mida i complexitat se sintetitzen després de danyar el DNA amb MNNG, a la vegada que s'observa un recanvi

de residus ADP-ribosil relativament alt (Alvarez-González, 1985). L'esmentat autor suggereix que aquests polímers altament complexos, més que estar units de manera covalent a les proteïnes, poden formar part dels conjugats H1-poli(ADP-ribosa) descrits anteriorment per altres autors (Kidwell et al., 1982; Wong et al., 1983) interaccionant de manera no covalent.

La mida màxima, com a mitjana, del polímer després de danyar el DNA és de 200 residus i el nombre de punts de ramificació per molècula es troba entre 6 i 7 (Alvarez-González, 1985). Si es té en compte que el solenoide, estructura altament ordenada de la cromatina amb els nucleosomes condensats, té de 6 a 8 nucleosomes per volta (Finch et al., 1976; Suau et al., 1979) i que la histona H1 es localitza a les regions internucleosomals cap al centre del solenoide, es pot postular que la presència de molècules de poli(ADP-ribosa), amb 6 o 7 ramificacions per molècula, unida de manera covalent o no-covalent a l'H1 pot ésser la responsable de l'estabilització transitòria del solenoide (Alvarez-González, 1985).

Recentment s'ha descrit una modulació en sentit oposat de la superestructura de la cromatina mitjançant la síntesi i degradació de poli(ADP-ribosa). La poli(ADP-ribosilació) de nucleosomes pancreàtics in vitro causa una relaxació de la cromatina a partir de la hipermodificacio de l'H1. D'altra banda, la degradació per la poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa de les unitats d'ADP-ribosa unides a l'H1 li retorna la seva estructura condensada nadia (de Murcia et al., 1986). Segons els esmentats autors és difícil imaginar la degradació dels residus ADP-ribosa units a dues molècules d'H1, és a dir, formant part del dímer (Stone et al., 1977), a causa que la glicohidrolasa actua de manera exoglicosilica a partir de l'AMP terminal. Si es considera la localització proposada per a la histona H1 en el filament nucleosomal (Thoma et al., 1979) és més probable que les càrregues negatives unides als extrems C i N d'aquesta histona redueixin la seva afinitat pel DNA (Burzio et al., 1980) i conseqüentment provoquin el desplegament de l'estructura solenoidal.

Sembla, doncs, que tant les interaccions covalents com les no covalents entre el polímer i altres components de la cromatina poden ésser importants en la regulació de les seves funcions, en vista de l'existència de polímers d'ADP-ribosa amb dues càrregues negatives per residu i de mida considerable en cèl.lules intactes sota condicions diferents.

4.3. POLI(ADP-RIBOSILACIÓ) I METABOLISME DELS ÀCIDS NUCLEICS

Les diferents funcions de la cromatina durant l'espermatogènesi, a l'igual que els canvis estructurals que tenen lloc durant aquest procés, poden ésser potencialment regulades per ADP-ribosilació de les proteïnes nuclears. De manera molt general aquests canvis són:

- 1- La replicació del DNA té lloc als espermatogonis i abans de la meiosi als espermatòcits en estadi de preleptotè. Els espermatòcits experimenten la meiosi i produeixen espermatides, que no es divideixen més, però es diferencien en espermatozoides madurs.
- 2- Un interval de ruptura programada del DNA seguit d'una síntesi reparadora esdevé a les cèl.lules meiòtiques al paquitè.
- 3- Els espermatogonis, espermatòcits i les espermatides primitives són actius en transcripció nuclear, mentre que les espermatides en procés de diferenciació i els espermatozoides són totalment inactius.
- 4- Les espermatides més avançades són genèticament inactives en replicació i transcripció. Tanmateix, aquestes cèl.lules són capaces de reparar el seu dany genètic abans que esdevingui la condensació final de la cromatina.

Una de les propietats més destacables de la poli(ADP-ribosa) polimerasa és la seva estimulació sempre que es produeixen trencaments del DNA, tant fisiològics com induïts per agents mutàgens (Ueda i Hayaishi, 1985). Més concretament, l'enzim participa en processos en els quals tenen lloc ruptures i unions del DNA.

La modulació o regulació de la síntesi de DNA per ADP-ribosilació de les proteïnes nuclears pot ocórrer per diferents mecanismes. Ara bé, la influència de la poli(ADP-ribosilació) en la síntesi de DNA varia segons els sistemes cel.lulars estudiats. Fins al moment s'han descrit treballs que indiquen que la modificació inhibeix (Burzio i Koide, 1972), estimula lleugerament (Althaus et al., 1980; Sims et al., 1982) o no té cap efecte (Cleaver et al., 1983; Jacobson et al., 1983) sobre la replicació.

S'ha suggerit, però, que la poli- (ADP-ribosilació) està involucrada en la recombinació meiótica (Koide, 1982). L'alt contingut d'ADP-ribosa polimèrica, juntament amb l'elevada activitat de l'enzim i el recanvi de residus ADP-ribosil, poden estar relacionats amb l'interval d'activitat de ruptura i reparació del DNA al paquítè. D'altra banda, l'endonucleasa present a les cèl.lules meiótiques i responsable d'aquesta activitat pot provocar l'increment dels nivells de poli(ADP-ribosa) detectat als nuclis en relació a la quantitat mesurada a les corresponents cèl.lules intactes a causa de la seva activació durant el procés d'aïllament de nuclis (sec.3.3).

L'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa durant l'espermatogènesi mostra una correlació inversa amb l'activitat de l'ornitin descarboxilasa, enzim que intervé en la síntesi de poliamines. La baixa activitat que presenten les espermàtides més avançades pot tenir relació amb els alts nivells de poliamines d'aquestes cèl.lules genèticament inactives (Oliva et al., 1982). Una correlació inversa similar s'ha descrit durant el cicle de creixement de les cèl.lules del tumor d'Ehrlich ascites (Bredehorst et al., 1979). S'ha suggerit que les poliamines només estimulen l'activitat de la poli(ADP-ribosa) polimerasa a les cèl.lules que estan sintetitzant DNA, mentre que poden ésser inhibidores a les que no es troben realitzant aquesta funció (Perella, 1982; Wallace et al., 1984).

Respecte al possible paper de la poli(ADP-ribosilació) en la transcripció del DNA es pot postular qualsevol de les hipòtesis considerades a la sec. 1.2.8. D'una banda modula algunes activitats enzimàtiques, com per exemple la de la RNA polimerasa II (Taniguchi et al., 1985), i de l'altra intervé directament en el control de la transcripció en unir-se als llocs on hi ha trencaments i així evita la transcripció inespecífica (Slattery et al., 1983).

La pèrdua de recanvi de residus ADP-ribosil a les espermàtides allargades, el mateix fenomen que s'observa als eritròcits, es pot correlacionar amb les seves característiques funcionals. La quiescència genètica d'aquests tipus de cèl.lules podria estar d'acord amb el paper postulat per a l'ADP-ribosilació de les proteïnes no-histones com a condició necessària per a l'expressió de certs gens (Tanuma i Johnson, 1983; Tanuma et al., 1983).

A partir de molts estudis, s'ha suggerit un paper indispensable de la poli(ADPr-ibosilació) en els mecanismes de reparació per escissió (Shall, 1982; Ueda i Hayaishi, 1985). En aquest treball hem estudiat l'efecte dels raigs X, el N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) i la bleomicina sobre la poli(ADP-ribosilació). Malgrat que els seus mecanismes d'acció molecular són diferents, els raigs X i el MNNG són agents mutàgens, mentre que la bleomicina és un

antibiòtic antitumoral que s'utilitza en combinació amb altres agents antineoplàsics i radioteràpia per al tractament de determinats càncers humans (Friedman, 1978).

Per mitjà de tots aquests agents hem vist una estimulació de l'activitat enzimàtica o dels nivells de poli(ADP-ribosa) a les cèl.lules en diferents estadis de l'espermatogènesi, amb l'excepció dels espermatozoides madurs. Així mateix hem observat un lleuger descens en els nivells de NAD excepte en els espermatozoides. Hem vist també que la bleomicina provoca un augment de les escissions del DNA a totes les cèl.lules, si bé no produeix cap efecte en la integritat de l'àcid nucleic als espermatozoides.

A causa que tant els raigs X com el MNNG són a la vegada agents que danyen el DNA i inhibidors de la seva síntesi, l'increment de la poli(ADP-ribosilació) pot estar relacionat amb un o ambdós d'aquests efectes. El MNNG és un carcinogen del tipus N-alquil-N-nitrós del qual s'ha demostrat que produeix alquilació en el DNA in vivo (Lijinsky, 1976), encara que no es coneix la naturalesa del dany rellevant per a la carcinogènesi.

L'aplicació clínica de l'antibiòtic glicopeptídic bleomicina és limitada a causa dels seus efectes tòxics (Kraus et al., 1973). La bleomicina s'uneix de manera preferencial al DNA i la interacció dona lloc a una fragmentació d'aquest àcid nucleic (Sausville et al., 1978; Gillani et al., 1981). Escissions de simple i doble cadena induïdes per la bleomicina s'han trobat tant al DNA de bacteries com al de mamífers (Kuo i Hsu, 1978).

L'activitat biològica de la bleomicina té lloc a dues parts ben definides de la molècula. La part queladora de metalls és capaç de formar un complex actiu amb Fe(II) i oxigen molecular que genera radicals lliures responsables del trencament del DNA. L'anell bitioazol de l'altra part contribueix a la unió de la bleomicina al DNA. Es pensa que la unió al DNA i el seu trencament són els dos passos essencials del procés citotòxic (Hénichart et al., 1985).

L'estimulació de la poli(ADP-ribosilació) està probablement relacionada amb el procés de reparació de les lesions induïdes al DNA, tal com s'ha demostrat en d'altres sistemes (Shall, 1982). S'han fet molts estudis utilitzant diferents classes d'agents que danyen el DNA (Benjamin i Gill, 1978; Juarez-Salinas et al., 1979; Cohen i Berger, 1981; Jacobson et al., 1985) i tots mostren la relació entre el metabolisme de la poli(ADP-ribosa) i la reparació per escissió de l'àcid nucleic. Tanmateix, els agents citotòxics que no tenen cap efecte sobre la integritat del DNA no alteren tampoc els nivells intracel.lulars de NAD o el metabolisme de la poli(ADP-ribosa) (Shall, 1984).

Inhibidors molt variats de la poli(ADP-ribosa) polimerasa eviten la depleció de NAD que es produeix quan hi ha un increment del nombre de trencaments del DNA (Juarez-Salinas et al., 1979; Durkacz et al., 1980).

L'activació exhaustiva de l'enzim pot exhaurir el "pool" intracel·lular de NAD i per tant interferir en l'actuació dels enzims dependents de NAD del metabolisme intermediari, i produir l'anomenada "resposta suïcida" de les cèl·lules amb un DNA extensivament danyat (Berger, 1985; Berger et al., 1986). S'ha descrit també que el descens dels nivells d'ADTP que es produeix de manera concomitant amb el de NAD a les cèl·lules tractades amb agents mutàgens (Sims et al., 1983) té com a resultat un alentiment de les reaccions que requereixen energia, en particular la replicació del DNA, la qual cosa dona més temps a les cèl·lules per reparar el seu àcid nucleic (Wintersberger i Wintersberger, 1985).

Els nivells de NAD de les cèl·lules són tres ordres de magnitud superiors als dels residus ADP-ribosa en forma polimèrica. Fins i tot un increment de 100 vegades de la poli(ADP-ribosa) pot consumir només una petita fracció del NAD cel·lular (Wielckens et al., 1982b). Un alt recanvi de residus ADP-ribosil durant la reparació que superi la síntesi de NAD pot conduir, però, a la depleció de NAD abans descrita.

El tractament dels fibroblasts de ratolí amb MNNG provoca un increment de més de 100 vegades dels nivells intracel·lulars de poli(ADP-ribosa) i el recanvi és, efectivament, molt ràpid (Juarez-Salinas et al., 1979). La vida mitjana del polímer als ementats fibroblasts tractats amb MNNG és inferior a 1 minut (Jacobson et al., 1985).

En el cas de la diferenciació de la línia germinal espermatogènica tant el MNNG com la bleomicina produeixen només un lleuger increment de l'ADP-ribosilació (sec. 3.5). Això va acompanyat d'un petit descens dels nivells de NAD. Cap d'aquests dos efectes es detecta, però, als espermatozoides madurs. Es pot postular, doncs, que les cèl·lules germinals han desenvolupat uns mecanismes molt eficients de protecció del missatge genètic com també uns sistemes de reparació molt eficaços.

Els mecanismes de protecció poden incloure les poliamines i més al final de l'espermioogènesi la mateixa protamina, ja que és una proteïna molt bàsica que compacta fortament el DNA. Les poliamines són unes molècules carregades positivament, el contingut de les quals augmenta durant el procés de diferenciació (Oliva et al., 1982).

No s'han de descartar, però, altres hipòtesis. Recentment s'ha demostrat que els hepatòcits de rata són remarcablement resistents a la depleció "suïcida" de NAD postulada per Berger et al. (1986) després del tractament amb MNNG. En canvi, s'ha observat una reducció del 40% dels nivells de nucleòtid en els fibroblasts de ratolí tractats amb el mateix agent mutagen (Alvarez-González et al., 1986). Una gran capacitat per sintetitzar de nou NAD s'ha suposat, doncs, que té lloc als hepatòcits quan se'ls sotmet a agents que danyen el DNA, de manera que s'evita la típica "resposta suïcida" observada a altres cèl.lules. Aquesta capacitat pot estar relacionada amb el paper central del fetge en el manteniment dels nivells de NAD en proporcionar nicotinamida per a la biosíntesi de NAD a altres òrgans (Collins i Chaykin, 1972). Durant l'espermatogènesi les cèl.lules de Sertoli podrien ésser una possible font de NAD per a les espermatides.

En el cas dels agents que provoquen estats pro-oxidants, en incrementar la demanda de destoxicació d'oxigen i radicals lliures, es produeix un ràpid subministrament de NAD a partir de NADH, cosa que pot suposar el manteniment dels nivells de nucleòtid (Cerutti, 1985). Aquest mecanisme es pot postular per a la bleomicina.

L'increment de la poli(ADP-ribosilació) està probablement relacionat amb la reparació de les ruptures induïdes en el DNA per la bleomicina que es detecten a les cèl.lules en diferents estadis amb l'excepció dels espermatozoides (sec. 3.5). Diversos agents mutàgens fan el seu efecte sobre les espermatides al final de l'espermioogènesi (Sega, 1974). La major exposició del DNA que es troba a les espermatides més avançades (Mezquita i Teng, 1977a) pot suposar, doncs, una major vulnerabilitat d'aquestes cèl.lules enfront dels agents físics i químics capaços d'alterar l'àcid nucleic. Les espermatides més avançades de rata són capaces de reparar el seu dany genètic abans de la condensació final de la cromatina (Lähdetie et al., 1983). A més, s'ha detectat activitat DNA ligasa a les espermatides de be al final de l'espermioogènesi (David et al., 1982). La hiperacetilació de la histona H4 juntament amb el ràpid recanvi dels seus grups acetil que es troba a les espermatides més avançades (Oliva i Mezquita, 1982) pot contribuir també a una exposició del DNA ràpida i reversible, que facilitaria l'acció dels enzims que intervenen en la reparació.

Al final de l'espermioogènesi té lloc una condensació massiva de la cromatina. El complex DNA-protamina que es troba al cap dels espermatozoides presenta un grau de condensació similar al que existeix al cap dels bacteriòfags, inaccessible a la unió amb actinomicina D (Mezquita i Teng, 1977a) i resistent a les nucleases i la bleomicina (Young i Sweeney, 1979). L'activitat de la

poli(ADP-ribosa) polimerasa no es detecta als espermatozoides madurs del gall ni tampoc es pot estimular amb tractaments com el dimetilsulfat (Corominas i Mezquita, 1985), els raigs X, el MNNG o la bleomicina. Aquest antibiòtic no provoca tampoc ruptures detectables al seu DNA. S'ha suposat que la inaccessibilitat del DNA garanteix la preservació del missatge genètic enfront de les agressions del medi ambient (Subirana, 1975; Mezquita i Teng, 1977a).

La intervenció de la poli(ADP-ribosilació) en el procés de reparació per escissió del DNA es pot donar per qualsevol dels mecanismes ja esmentats (sec.1.2.6). Aquesta modificació pot servir tant per alterar de manera transitòria l'estructura de la cromatina per fer-la més accessible a la maquinària enzimàtica que intervé en la reparació (Aubin et al., 1983; Ueda et al., 1983) com per modular l'activitat dels enzims que formen part d'aquesta maquinària (Creissen i Shall, 1982; Moran i Ebisuzaki, 1985).

Recentment Carson et al. (1986) han proposat una relació entre els trencaments del DNA, el metabolisme del NAD i la mort cel.lular programada en limfòcits humans. S'ha postulat que aquesta mort cel.lular programada induïda per l'acumulació de trencaments en el DNA juga una paper fisiològic en els animals multicel.lulars (Cohen i Duke, 1984). Un dany massiu al DNA dels procariotes sovint provoca una resposta de reparació "SOS" que preserva la viabilitat cel.lular a expenses d'una incrementada taxa de mutació. Contràriament, el mateix grau de dany al DNA de les cèl.lules somàtiques dels organismes superiors desencadena la "resposta suïcida".

Des d'un punt de vista evolutiu l'eliminació de cèl.lules somàtiques amb un nombre elevat de ruptures del DNA pot afavorir, de fet, la capacitat reproductiva. Per exemple, els radicals lliures generats pels fagòcits poden produir la transformació maligna de les cèl.lules normals adjacents, però només dins uns estrets marges (Weitzman et al., 1985). Segons Carson et al. (1986) aquest fenomen es pot explicar parcialment per l'habilitat de les espècies d'oxigen tòxic per danyar el DNA i accelerar el recanvi de NAD. Per tant, un nombre baix de ruptures del DNA es repara de manera eficient. Ara bé, un increment en la formació de trencaments accelera la formació de poli(ADP-ribosa) i pot induir una depleció letal de NAD i ATP a causa que les cèl.lules tenen una capacitat limitada per resintetitzar NAD a partir de nicotinamida (fig.4.2).

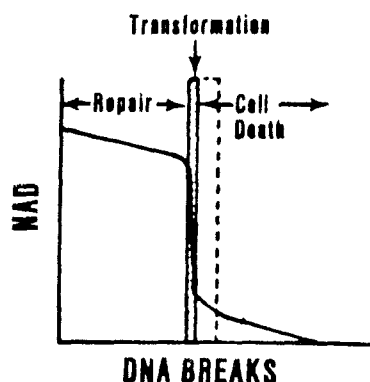


Fig.4.2- Possible relació entre els trencaments del DNA, el metabolisme del NAD i la mort cel.lular programada (Carson et al., 1986).

Es pot postular també aquest model per a les cèl.lules germinals masculines del gall. Un nombre petit de ruptures del DNA estimula lleugerament la poli(ADP-ribosilació) sense produir un descens important del NAD. Aquest pot ésser el cas dels efectes produïts pels agents estudiats. En haver-hi pocs trencaments aquests poden ésser reparats de manera eficient. Malgrat suposar que les diferents cèl.lules espermatogèniques experimenten una "resposta suïcida" quan el seu DNA és extensament danyat, es pot pensar en l'existència d'uns mecanismes de protecció molt eficaços en vista de la importància de la preservació del missatge genètic.

4.4. L'ESPERMATOGÈNESI, UN MODEL PER A L'ESTUDI DE LA POLI(ADP-RIBOSILACIÓ)

Els canvis estructurals i funcionals que experimenta la cromatina de les cèl.lules germinals fan que l'espermatogènesi esdevingui un model molt adequat on es puguin integrar els possibles papers proposats per a la poli(ADP-ribosilació)

Els mètodes de separació de cèl.lules utilitzats permeten distingir poblacions amb característiques morfològiques i funcionals ben diferenciades. A més, gràcies al desenvolupament de tècniques analítiques adequades, com per exemple la determinació dels nivells de polímer i NAD, ha estat possible estudiar com varia la modificació durant l'espermatogènesi, tant en condicions fisiològiques com després de danyar el DNA.

La diferenciació de la línia germinal espermatogènica va acompanyada d'un descens global de la poli(ADP-ribosilació), com també d'una disminució de la reversibilitat del procés. El tractament de les cèl.lules amb agents que lesionen el DNA estimula l'activitat de l'enzim responsable de la modificació a les diferents cèl.lules amb l'excepció dels espermatozoides. Tanmateix, no és possible establir, encara, com varia el grau de modificació d'una determinada proteïna acceptadora al llarg de l'esmentat procés de diferenciació.

A la fig. 4.3 es mostren, de manera molt general i esquemàtica, algunes de les funcions proposades per a la poli(ADP-ribosilació) que es poden donar durant l'espermatogènesi.

D'una banda, la modificació pot participar en la condensació de la cromatina (a través, per exemple, de la formació del dímer d'H1), com també en la seva relaxació, i així afavorir el desplaçament de les histones per la protamina.

D'altra banda, l'activació de la poli(ADP-ribosa) polimerasa quan es produeixen trencaments en el DNA, tant fisiològics com induïts, pot contribuir a la regulació del metabolisme de l'àcid nucleic i, de manera més específica, intervenir en els processos de reparació del DNA.

No s'ha d'oblidar, tampoc, la regulació de l'activitat de diferents enzims mitjançant la seva unió amb poli(ADP-ribosa).

El fet que la poli(ADP-ribosa) pugui tenir mides i estructures molt diverses permet suposar que els efectes de la poli(ADP-ribosilació) són diferents segons la proteïna que accepta el polímer i el seu grau de modificació.

La gran quantitat d'energia que inverteix la cèl.lula en modificar les seves proteïnes nuclears per ADP-ribosilació, amb la formació de polímers més o menys complexos, suggereix que aquesta modificació participa en processos biològics importants.