

ADP — RIBOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS

CARLOS MANSO

Centro de Metabolismo e Endocrinologia - INIC. Faculdade de Medicina de Lisboa.

O coenzima I, nicotinamida-adenina-nucleótido (NAD) é bem conhecido como cofactor de numerosas reacções enzimáticas de oxidação-redução (Fig. 1). Ele é o principal aceitador de protões, tanto no citoplasma como nas mitocôndrias, onde desempenha um papel importante na fosforilação oxidativa, de que resulta a formação de fosfatos de alta energia (ATP). Contudo, recentemente, verificou-se que apenas 10% do NAD actua em tais processos, sendo os outros 90% utilizados em reacções muito mais complexas e ainda não perfeitamente compreendidas, mas cuja importância parece ser grande.

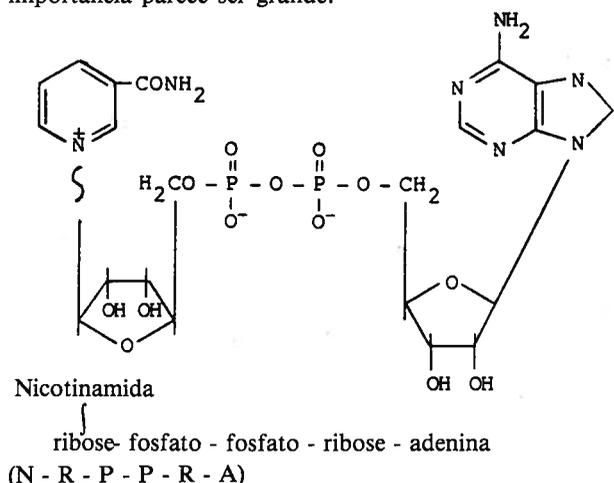
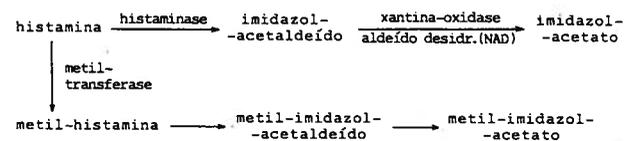


Figura 1: Estrutura do NAD (} = ligação de alta energia nicotinamida-ribose: 8,2 kcal/mole).

INTERACÇÃO DO NAD COM A HISTAMINA

Na década de 60 surgiram diversos trabalhos sobre o destino da histamina. Esta seria degradada directamente ou após formação de metil-histamina, por uma histaminase, seguida da acção da xantina oxidase ou de uma aldeído desidrogenase na presença de NAP:



Verificou-se na altura que as mulheres grávidas excretam grandes quantidades de histidina, possivelmente por falta de descarboxilase que a transforma em histamina, mas não se sabe o significado deste fenómeno. Todavia, foi descrito um processo metabólico diferente para a histamina: a sua interacção com NAD, em resultado da nicotinamida ser substituída por histamina (H):

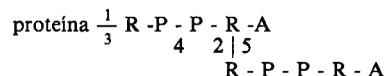


Demonstrou-se um antagonismo entre a nicotinamida e a histamina em cobaias, pois a nicotinamida tinha um efeito inibidor na libertação de histamina na anafilaxia. Por outro lado, a concentração de NAD diminui nos processos anafiláticos. Sugeriu-se uma possível importância destas reacções no sistema nervoso e nas reacções de hipersensibilidade.

MONO E POLI ADP - RIBOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS

Muito mais interesse despertou a descoberta da reacção entre o NAD e algumas proteínas de que resulta a libertação de nicotinamida e a união de ADP - ribose à proteína, através de um grupo carboxilo (COO⁻) de ácido glutâmico ou de lisina (Fig. 2).

Temos assim um processo denominado ADP ribosilação de proteínas. Ao que parece, a união do primeiro monómero de ADP-R faz-se por um enzima iniciador (ADP ribose transferase),¹ que utiliza a ligação de alta energia para fazer a união da ribose à proteína, ao passo que as ligações seguintes estão a cargo da poli ADP-R sintase.² Três enzimas degradativas intervêm: ADP-R-proteína hidrolase, cliva o monómero de ADP-R ligado à proteína;³ fosfodiesterase, cliva a ligação entre os dois fosfatos;⁴ poli ADP-R glico-hidrolase,⁵ cliva as uniões entre os diversos monómeros de ADP-R e é o enzima mais importante na degradação:



Discute-se a diferença entre a mono ADP ribosilação e a poli ADP ribosilação. Hoje, admite-se que a primeira seja o resultado da acção de toxinas bacterianas, ao passo que a segunda parece ter grande importância fisiológica. Foi inicialmente descrita no núcleo e mais tarde noutros organelos.

POLI ADP RIBOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS NUCLEARES

A poli ADP-R sintase do núcleo encontra-se associada à cromatina e pode ligar até 65 resíduos de ADP-R. As principais proteínas nucleares aceitadoras são as histonas H₁ e H_{2B} a endonuclease e a própria poli ADP-R sintase.

No que respeita ao significado da poli ADP ribosilação de proteínas nucleares, diversas hipóteses têm surgido: regulação do ciclo de crescimento celular (o consumo de NAD é máximo na fase H₂ do ciclo celular. As proteínas da matriz nuclear (lamínas) também são ribosiladas, aumentando a poli ADP ribosilação 20% na fase S e 40% na fase G₁. A ribosilação da endonuclease inactiva este enzima, do que resulta incapacidade de gerar clivagens do ADN, em que as polimerases possam actuar. Todavia, há factos que fazem crer que a principal importância da poli ADP ribosilação consista na reparação do ADN.

Em fibroblastos humanos expostos a radiação ultravioleta aparecem clivagens nas faxas de ADN. Nestas condições, há um aumento rápido de ADP-ribose até 15 vezes, acompanhado de depleção de NAD. O enzima é ativado proporcionalmente ao número de clivagens cromossómicas, ao mesmo tempo que diminui a síntese de ARN.

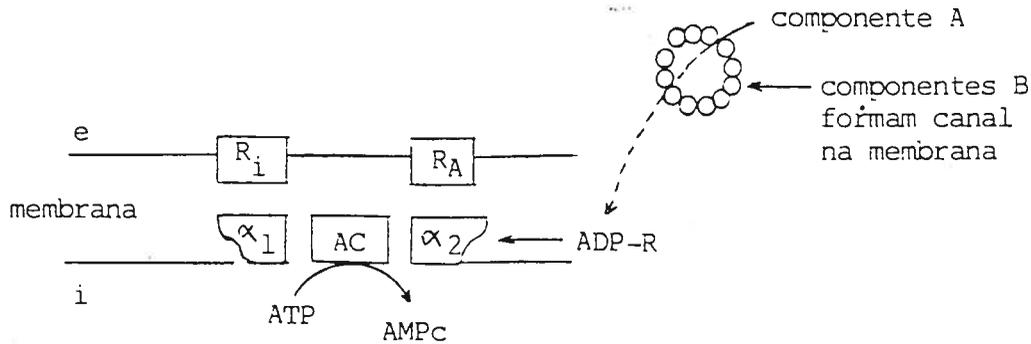


Figura 3: ADP ribosilação do componente α_1 da adenilciclase pelo colagénio.

B. Toxina da difteria e da *Pseudomonas aeruginosa*

Estas toxinas actuam sobre o factor de alongamento 2 do ribossoma, causando a sua ADP ribosilação e paragem da síntese proteica. A ADP ribosilação dá-se por união a um derivado da histidina na proteína, a diftamida, 2-(3-carboxiamido-3-[trimetilamónio]-propil)-histidina. É de notar que a toxina da difteria também é composta de fragmentos A, activo, e de fragmentos B que formam um canal na membrana celular, por onde penetra o fragmento A.

C. Ribosilação da polimerase da *E. coli*

Um fago invade o *Bacilo coli* e vai induzir enzimas que causam ribosilação do polipéptido α da polimerase do ARN, numa arginina, interferindo com a divisão da bactéria.

D. Diabetes experimental

A estreptozotocina e a aloxana causam clivagens cromosómicas que estimulam a poli ADP-R transferase. Há depleção de NAD, pelo que baixa a fosforilação oxidativa. Não há formação de energia nas mitocôndrias. O ATP diminui e os ilhéus morrem. Captadores de radical hidroxil, como a dimetilureia e inibidores da poli ADP ribosilação como a nicotinamida, contrariam os efeitos deletérios destes compostos, e protegem contra a indução de diabetes experimental.

E. A insulina inibe a ribosilação de uma proteína da membrana do hepatocito

O mecanismo de acção da insulina ainda é mal conhecido. Admite-se que actue sobre receptores de membrana, activando uma tirosina-quinase de cuja acção resultam efeitos múltiplos.

Ela inibe a adenilciclase estimulada por glucagina e activa uma fosfodiesterase da membrana do hepatocito. Estas acções dependem de uma proteína reguladora, Nin, que interaccua com GTP e parece ser semelhante às proteínas G.

O pré-tratamento da Nin com glucagina impede a sua activação pela insulina.

A toxina da cólera ribosila a subunidade desta proteína, sendo este efeito impedido pela insulina.³¹

Embora seja ainda prematuro especular sobre este conjunto de interacções, elas não deixam de ser interessantes e talvez o futuro venha a demonstrar qualquer tipo de relação entre a insulina, a glucagina e a ADP-ribosilação.

BIBLIOGRAFIA

- HAYAISHI, O.: Poly ADP-ribose and ADP-ribosylation of proteins. *TIBS*, 1976; 1: 9.
- PURNELL, M.; STONE, P.; WHISH, W.: ADP-ribosylation of nuclear proteins. *Biochem Soc. Trans.*, 1980; 8: 215.
- YAN, S.: An unexpected twist in the reversal of ADP-ribosylation. *TIBS*, 1984; 9: 331.
- ADLER, R.: Histamine catabolism in vitro and in vivo. *Fed. Proc.*, 1965; 24: 757.
- ALIVISATOS, S.: Enzymatic interactions of histamine with pyridine coenzymes. *Fed. Proc.*, 1965; 24: 769.
- ALIVISATOS, S.; UNGAR, F.; LUKACS, L.; MANTIA, L.: Imidazololytic processes. III Enzymic conversion of coenzyme I to a histamine dinucleotide. *J. Biol. Chem.*, 1960; 235: 1742.
- ADOLPH, K.; SONG, M.: Variations in ADP-ribosylation of nuclear scaffold proteins during the HELA cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1985; 126: 840.
- KAWAICHI, M.; UEDA, K.; HAYAISHI, O.: Initiation of poly (ADP-ribosyl) histone sintesis by poly (ADP-ribose) sintetase. *J. Biol. Chem.*, 1980; 255: 816.
- AGEMORI, M.; KAGAMIYAMA, H.; HISHIKIMI, M.; SHIZUTA, Y.: Purification and properties of poly (ADP-ribose) synthetase from mouse testicle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982; 215: 621.
- WALLACE, H.; GORDON, A.; KEIR, H.; PEARSON, C.: Activation of ADP-ribosyltransferase in polyamine-depleted mammalian cells. *Biochem. J.*, 1984; 219: 211.
- SUROWY, C.; BERGER, N.: Diadenosine-tetraphosphate stimulates processing of ADP-ribosylated poly ADP-ribose polymerase. *J. Biol. Chem.*, 1983; 258: 279.
- LARSEN, A.; OSTVOLD, A.; HOLTLUND, J.; KRISTENSEN, T.; LALAND, S.: The inhibitory effect of Zn^{2+} on poly (ADP-ribose) polymerase activity and its reversal. *Biochem J.*, 1982; 203: 511.
- WIELKENS, K.; GEORGE, E.; PLESS, T.; HILZ, H.: Stimulation of poly (ADP-ribosyl) ation during Ehrlich ascites tumor cell starvation and suppression of concomitant DNA fragmentation by benzamide. *J. Biol. Chem.*, 1983; 258: 4098.
- JACOBSON, E.; ANTON, K.; SALINAS, H.; JACOBSON, M.: Poly (ADP-ribose) metabolism in ultraviolet irradiated human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 1983; 258: 103.
- TANIGUCHI, T.; AGEMORI, M.; KAMESHITA, I.; NISHIKIMI, M.; SHIZUTA, Y.: Participation of poly (ADP-ribosyl) action in the depression of RNA synthesis caused by treatment of mouse lymphoma cells with methylnitrosourea. *J. Biol. Chem.*, 1982; 257: 4027.

16. BREDEHORST, R.; WIELKENS, K.; ADAMIETZ, P.; THIESSEN, E.; HILZ, H.: Mono (ADP-ribosylation) and poly (ADP-ribosylation) of proteins in developing liver and in hepatomas. *Eur. J. Biochem.*, 1981; 120: 267.
17. GATTI, R.; HALL, K.; Ataxia-telangiectasia: search for a central hypothesis. In «Chromosome mutation and neoplasia», *J. German, Ed. Alan Liss, Inc.*, New York, 1983; 23.
18. AMOS, H.; MANDELL, K.; GAY, R.: Deprivation of nicotinamide leads to enhanced glucose transport in chick embryo fibroblasts. *Fed. Proc.* 1984; 43: 2265.
19. FARZANEH, F.; ZALIN, R.; BRILL, D.; SHALL, S.: DNA strand breaks and ADP-ribose transferase activation during cell differentiation. *Nature*, 1982; 300: 362.
20. HAMMERMAN, M.; HANSEN, V.; MORRISSEY, J.: ADP ribosylation of canine renal brush border membrane vesicle proteins is associated with decreased phosphate transport. *J. Biol. Chem.*, 1982; 257: 12380.
21. BERGER, N.; BERGER, S.; CATINO, D.: Abnormal NAD levels in cells from patients with Fanconi anemia. *Nature*, 1982; 299: 271.
22. GARTEMANN, A.; BREDEHORST, R.; WIELKENS, K.; STRATLING, W.; HILZ, H.: Mono and poly-ADP-ribosylation of proteins in mouse kidney after castration and testosterone treatment. *Biochem J.*, 1981; 198: 37.
23. GILL, D.; KING, C.: The mechanism of action of cholera toxin in pigeon erythrocyte lysates. *J. Biol. Chem.*, 1975; 250: 6424.
24. GILL, D.; MEREU, R.: ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylated cyclase. *Proc. Nat. Ac. Sc.*, 1978; 75: 3050.
25. SCHLEIFER, L.; KAHN, R.; HANSKI, E.; NORTHRUP, J.; STERNWEISS, P.; GILLMAN, A.: Requirements for cholera toxin dependent ADP-ribosilation of the purified regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.*, 1982; 257: 20.
26. KANDEL, J.; COLLIER, R.; CHUNG, D.: Interaction of fragment. A from diphtheria toxin with nicotinamide adenine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, 1974; 249: 2088.
27. OPPENHEIMER, N.; BODLEY, J.: Diphtheria toxin, site and configuration of ADP-ribosylation of diptamide in elongation factor 2. *J. Biol. Chem.*, 1981; 256: 8579.
28. HEYNINGEN, S.: Diphtheria toxin: which route into the cell? *Nature*, 1981; 292: 293.
29. YAMAMOTO, H.; UCHIGATA, Y.; OKAMOTO, H.: Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*, 1981; 294: 284.
30. SANDLER, S.; WELSH, M.; ANDERSON, A.: Streptozotocin induced impairment of islet B-cell metabolism and its prevention by a hydroxyl radical scavenger and inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase. *Acta Pharmacol Toxicol.*, 1983; 53: 392.
31. HEYWORTH, C.; WHETTON, A.; WONG, S.; MARTIN, R.; HOUSLAY, M.: Insulin inhibits the cholera toxin catalyzed ribosylation of a M-25000 protein in rat liver plasma membranes. *Biochem. J.*, 1985; 228: 593.