

Degradação Seletiva de Proteínas e suas Implicações no Câncer

Papel do sistema ubiquitina-proteasoma e enzimas caspases

Humberto Miguel Garay

Aluno de Doutorado do Programa de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Juliano Alves

Aluno de Doutorado do Programa de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas - USP

João Marcelo Ochiucci

Aluno de Iniciação Científica do Depto. de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas - USP

José Ernesto Belizário

Professor Assistente do Depto. de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas - USP
jebeliza@usp.br

Ilustrações cedidas pelos autores

As proteínas são responsáveis pela forma e pela função das células. Elas são sintetizadas e destruídas por mecanismos distintos em resposta a uma diversidade de sinais externos e internos, que incluem a secreção de hormônios e a restrição alimentar. A degradação de proteínas determina o início ou o término de eventos bioquímicos que controlam a proliferação, a diferenciação e a morte celular por apoptose. Por esse motivo, o aumento de suscetibilidade ou de resistência à degradação pode levar ao ganho ou à perda de atividade biológica de proteínas, influenciando diretamente nos processos que elas estão envolvidas. Os cientistas já identificaram dezenas de proteínas que se tornaram oncogênicas (isto é: provocaram a transformação celular) após sofrerem modificações em seqüências, domínios e regiões que controlam a sua estabilidade ou destruição. Elucidar os mecanismos moleculares pelos quais as proteínas aumentam sua suscetibilidade ou sua resistência à degradação é o grande desafio da biologia contemporânea pós-genoma. As pesquisas nessa área têm por objetivo não apenas entender como as proteínas são destruídas, mas quando falhas nesse processo dão origem a células imortais, isto é, ao câncer. Neste artigo serão revisados, primeiramente, os recentes avanços na elucidação das bases bioquímicas e genéticas que são envolvidas na transformação de uma célula normal em célula tumoral. Em seguida, serão revisadas as recentes descobertas sobre os mecanismos bioquímicos de reconhecimento e de degradação de proteínas intracelulares pela via ubiquitina-proteasoma e a

importância dos aminoácidos prolina, ácido glutâmico, serina e treonina (região PEST) como sinais para degradação rápida de certas proteínas. Finalmente, será discutida a utilização de bancos de dados de genoma humano e de proteoma - em construção, e como os programas de computador para armazenamento, manipulação e mineração de seqüência de genes provenientes de amostras de tecido tumoral, poderão ajudar os cientistas, principalmente os bioinformáticos, na descoberta de novos oncogenes e métodos de prevenção e tratamento do câncer.

1. Biologia da Célula Tumoral

Nas últimas décadas, com a introdução de novas tecnologias de seqüenciamento do DNA, expressão e análise computacional de genes, foi possível que se vislumbrassem várias pistas que poderão levar a um melhor entendimento da biologia da célula tumoral. O câncer é considerado uma doença genética - isto é, ele pode ser transmitido para uma célula normal através da transferência de genes tumorais ou oncogenes (Hahn & Weinberg, 2002). Oncogenes são cópias de genes normais que sofreram mutações, e dessa forma, quando transcritos, provocam a síntese de proteínas que apresentam perda ou ganho de função biológica. Mutações são causadas por modificações nas bases de DNA, em particular, nas posições O6 e N7 da guanina. A carcinogênese é um processo que pode ser dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão, e pode durar de 1 a 30 anos. Durante esse

tempo, ocorre um acúmulo de mutações no genoma celular, em especial, em genes que garantem a ordem dos eventos do ciclo celular e a mitose, ou executam reparo de eventuais erros na replicação do DNA, ou ainda, que promovem e mantêm o estado de diferenciação celular (Hanahan & Weinberg, 2000, Hahn & Weinberg, 2002).

Na maioria dos casos, os oncogenes capazes de induzir a transformação celular funcionam aos pares, e seus produtos são fatores de crescimento, receptores da membrana plasmática, fatores de transcrição e enzimas quinases de vias de sinalização intracelular implicadas no controle positivo ou negativo do ciclo celular (Hanahan & Weinberg, 2000, Evan & Vousden, 2001). Em geral, as mutações encontradas em oncogenes alteram os nucleotídeos, os quais codificam os aminoácidos de importância crítica para sua ativação ou o arranjo tridimensional da sua estrutura molecular. A deformação de elementos estruturais impede que a proteína estabeleça interações proteína-proteína e proteína-DNA e, conseqüentemente, exerça adequadamente a sua função biológica. Por exemplo, formas mutantes da proteína RAS permanecem constantemente ativadas devido à substituição de um aminoácido indispensável na interação RAS-GAP. GAP é uma proteína que estimula a hidrólise de GTP, uma molécula que ativa RAS. A estimulação contínua da cascata de enzimas serina-treonina-quinases: Raf-MEK-ERK-MAPK, induzida pela forma mutante de RAS, faz com que os eventos bioquímicos de controle positivo do ciclo celular tornem-se constantes e a proliferação celular ininterrupta (Hahn & Weinberg, 2002).

Por outro lado, as deleções de éxons em genes, ou ainda, o seu silenciamento (metilação das bases nitrogenadas), são ocorrências comuns em genes que codificam os fatores supressores de tumor que atuam no controle negativo do ciclo celular. Nesse caso, a desregulação de crescimento e divisão celular acontece porque a célula deixa de checar os erros e as falhas que provocariam bloqueio no ciclo celular, reparo no DNA e indução de morte

celular por apoptose. O exemplo mais estudado é o gene que codifica o fator supressor de tumores chamado p53, cuja função principal é a transcrição de genes de reparo e da apoptose (Hanahan & Weinberg, 2000, Evan & Vousden, 2001).

Recentemente houve uma explosão de trabalhos que mostraram vias alternativas de estimulação da proliferação celular e indução de câncer. Os novos oncogenes identificados têm papel no reparo do DNA, apoptose, reconhecimento célula-célula, mecanismo de adesão célula-matriz extracelular, angiogênese, metástase e degradação de proteínas. O que chamou maior atenção dos investigadores foi a descoberta que para a transformação de células humanas é necessária ativação de telomerase, o que causa a sua imortalização, e a inativação das vias do p53 e RB (Hahn & Weinberg, 2002).

2. O Ciclo Celular

O crescimento e a divisão celular de células somáticas dependem de uma série complexa de reações bioquímicas que ocorrem em um período de 24 a 48 horas, denominado ciclo celular. O ciclo celular compreende os processos de duplicação do DNA e divisão nuclear (mitose), e dele resulta a produção de uma nova célula. Para iniciar um ciclo, a célula em repouso (fase Go) precisa ser estimulada por fatores de crescimento (exemplos, PDGF, EGF, insulina), hormônios esteróides e citocinas produzidas por elas mesmas ou células ao seu redor. Esses fatores ligam-se aos seus receptores de membrana, deflagrando uma série de reações químicas que causam, em última instância, a ativação de fatores de transcrição (exemplos: c-myc, c-jun, c-fos), os quais promovem a síntese de RNA, mensageiros de dezenas de enzimas que promovem a síntese do ácido deoxiribonucléico (DNA), tais como diidrofolato redutase, DNA polimerases e topoisomerases. Essa cascata de eventos químicos e morfológicos ocorre de uma maneira ordenada e sucessiva, fazendo com que a célula avance da fase Go para as fases G1-S-G2 e para a mitose (Malumbres & Barbacid, 2001).

A execução das reações e dos eventos de cada fase do ciclo celular é mediada por dezenas de fatores, cuja síntese e destruição ocorrem em momentos determinados. Os principais são os seguintes: ciclinas A, B e D, enzimas quinases dependentes de ciclinas: CDK-1, 2, 4 e 6, fosfatases: cdc-25 A, B e C, proteínas inibidoras de CDKs: p21, p27, p57, p16, p18, e fatores de transcrição: c-myc, E2F, Rb e p53. Os complexos formados por CDK/ciclina/inibidor de CDK são inativos e a sua ativação requer eliminação, por degradação, do inibidor de CDK associado a ele (por exemplo: p21, p27), um evento que ocorre durante as transições de fases. A ativação dos complexos CDK-4/ciclina D, CDK-4/ciclina-6, CDK-2/ciclina A, CDK-2/ciclina E aumenta a atividade quinase dessas enzimas e provoca a fosforilação progressiva de RB. Isto causa a dissociação do complexo E2F/RB, permitindo que E2F inicie a transcrição de genes da fase S. Mais tarde, a ativação do complexo CDK-1/ciclina B promove a fosforilação de várias proteínas nucleares, a condensação dos cromossomas, a formação do fuso e o início da mitose. A atividade enzimática do complexo cessa após a degradação da ciclina B, e esse evento marca o fim do ciclo celular (Malumbres & Barbacid, 2001). (Figura 1)

As reações e eventos do ciclo celular são interrompidos em momentos específicos nas transições das fases Go/G1 (ponto de restrição R1), fases G1/S e G2/mitose. Durante esses períodos críticos denominados "pontos de checagem", a célula decide se inicia o ciclo (ponto de restrição R1) ou se avança para a fase seguinte, continuando o processo de proliferação, ou se sai do ciclo, iniciando o processo de diferenciação celular, se estiver passando pela mitose, ou ainda, entra em apoptose.

Esse mecanismo de checagem é dependente de reações em cascatas mediada por enzimas quinases e fosfatases. Os exemplos mais estudados de vias de checagem e de reparo são: a via ATM, a via Chk1/Chk2 e a via cdc-25/14-3-3. Em resposta à ativação de uma dessas vias, são sintetizadas as enzimas que fazem reparo, recombinação, junção ou permutação de nucleotídeos e que estão

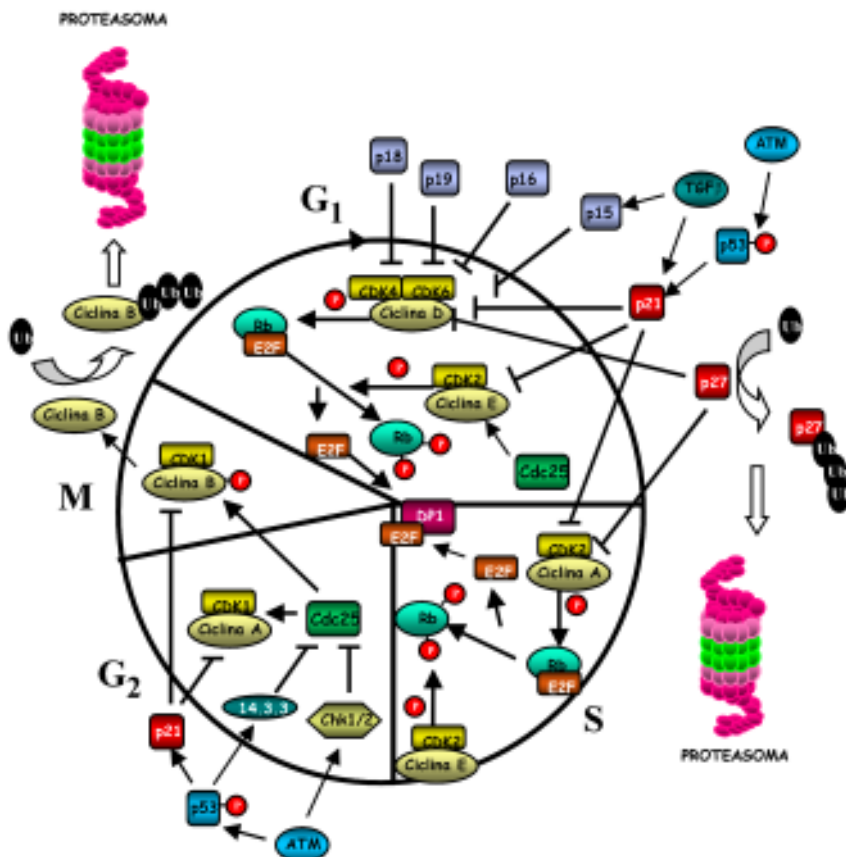


Figura 1 - Esquema representativo mostrando as interações entre as proteínas das vias de sinalização de controle positivo e negativo do ciclo celular. Notar no esquema que durante as transições (pontos de checagem) das fases G₀, G₁, S, G₂ e Mitose, a ativação destas proteínas reguladoras é dependente da fosforilação/defosforilação mediada por enzimas quinases e fosfatases, enquanto a inativação é mediada pelo sistema proteossoma que degrada seletivamente proteínas marcadas com ubiquitina.

envolvidas nos processos de reconhecimento e de correção de erros e falhas no DNA em síntese. São exemplos importantes a GADD45, poli-(ADP-ribose) polimerase (PARP), MSH2 e MLH1. Na maioria das vezes, a ativação das vias de checagem é iniciada pelo fator supressor de tumores p53, que atua na transcrição de dezenas de genes, incluindo o gene da proteína p21. A p21 bloqueia o ciclo celular e inibe a atividade de enzimas CDKs, que são responsáveis pelo controle positivo do ciclo celular. O bloqueio do ciclo celular é transitório e precisamente regulado (Malumbres & Barbacid, 2001, Hoeijmakers, 2001, Hahn & Weinberg, 2002).

Estudos recentes mostraram que a degradação de várias proteínas reguladoras do ciclo celular, em especial as proteínas p21, p27, ciclinas A e B, Rb, E2F, MDM2 e p53, é mediada pelo sistema ubiquitina-proteossoma, caso a decisão seja a proliferação celular; e pela família caspase de

enzimas proteases, caso a decisão seja a apoptose. Como era lógico pressupor, esse mecanismo de regulação mostrou também que pode ser alterado em células neoplásicas para impedir a deflagração dos sinais que ativam a apoptose. Vários exemplos serão apresentados nesse texto em favor dessa hipótese.

3. A morte celular por apoptose

A morte celular programada ou apoptose é um processo fisiológico de morte celular pelos quais as células que perderam suas funções ou apresentam defeitos são eliminadas do organismo. Durante a embriogênese, a morte por apoptose de células embrionárias precursoras é essencial para o acabamento final de órgãos e membros. Além disso, a apoptose atua na seleção e depleção de clones de células do sistema imunológico e de células em excesso, deixando em perfeito equilíbrio

as populações de células dos tecidos durante a vida adulta dos mamíferos (Earnshaw et al., 1999). Desta forma, estão implicadas em muitas doenças aberrações genéticas que alteram o processo da apoptose, incluindo-se aí o câncer, as doenças auto-imunes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas.

Vários oncogenes que causam, em células malignas, desregulação no seu ciclo celular atuam ora estimulando, ora inibindo a apoptose, dependendo do estágio de desenvolvimento do tumor (Evan & Vousden, 2001). Mutações oncogênicas, que levam ao aumento da expressão dos genes c-myc, E2F, E1A (proteína viral) e Ras, ou à perda da expressão do gene Rb, desencadeiam a apoptose. Mas esse fenômeno não é aparente em populações de células malignas porque elas contêm mutações que inativam os oncogenes p53 e MDM2, ou mutações que aumentem a expressão de genes Bcl-2, ou ainda, mutações que acarretem a produção excessiva dos fatores de crescimento: IGF-1, PDGF, NGF e IL-3. A ligação desses fatores de crescimento aos seus receptores provoca a ativação da cascata de enzimas, quinases, entre elas, a fosfoinositol-3-quinase (IP3), Ras, Raf e a proteína serina-treonina quinase B/Akt, como também a do fator de transcrição NF-κB. Esses fatores atuam em reações ou vias de sobrevivência e resistência à apoptose (Evan & Vousden, 2001).

Em vários estudos ficou evidenciado que as células, quando enfrentam situações fisiológicas e patológicas adversas, tais como, infecção por microorganismos, estresse oxidativo e outras formas moderadas de injúria, somente permanecem vivas se os efeitos pró-apoptóticos gerados nessas situações forem contrabalanceados pelos efeitos anti-apoptóticos, mediados pelas vias de sobrevivência. Esse mecanismo de sinalização dual exerce um papel chave no controle da proliferação e morte celular (Evan & Littlewood, 1998). Assim, para o processo de proliferação ter sucesso, é preciso que a célula ative as duas vias de sinalização: a de sobrevivência, que atua suprimindo a maquinaria da apoptose, e a de proliferação, que desencadeia o crescimento celular. Esta intercomunica-

ção entre ciclo celular e a apoptose é sem dúvida o fator determinante nas variações de sensibilidade à apoptose entre as células tumorais. Este suposto sistema regulador tem servido como base estrutural para unir a genética e a terapia do câncer.

A apoptose é caracterizada por eventos morfológicos e bioquímicos que ocorrem de uma forma ordenada na célula em degeneração. Esses eventos são regulados por genes preservados em vários organismos, incluídas leveduras, parasitas, plantas e insetos. Mais de 200 genes já foram identificados e classificados com base em domínios específicos, como exemplos: DED, DD e CARD (Aravind & Koonin, 2001). Essas seqüências conservadas de aminoácidos estão relacionadas com a função específica que a proteína exerce no processo, como, por exemplo: ligante, receptor, adaptador, inibidor, protease, quinase, etc. Os estudos de cristalografia, ressonância magnética nuclear e difração de raios X têm mostrado em detalhe como os complexos padrões de interação entre essas proteínas, através de seus diferentes domínios, atuam nas vias de sinalização positiva e negativa da apoptose (Fesik, 2000).

A apoptose é desencadeada por duas vias principais. Na primeira via, o sinal vem do lado externo e por isso é denominada via extrínseca. Na segunda, o sinal vem de dentro da célula, e por isso é denominada via intrínseca. A via extrínseca é iniciada através da ativação de receptores de membrana, denominados receptores de morte celular. A via intrínseca é iniciada pela liberação de fatores mitocondriais. Em ambos os casos, o resultado imediato é a ativação de enzimas proteases da família caspase (Figura 2).

As caspases são expressas na forma de pró-enzimas (ou zimógeno) e podem ter uma massa molecular entre 30-60 kDa. A clivagem desse precursor ocorre pela ação de uma caspase iniciadora, que cliva a proteína em duas regiões específicas, para gerar uma subunidade grande de 20 kDa (cadeia α externa) e uma pequena de 10 kDa (cadeia β interna). A forma ativa da enzima possui duas subunidades grandes e duas pequenas, i.e., um tetrâmero $\alpha_1\beta_1\beta_2\alpha_2$, en-

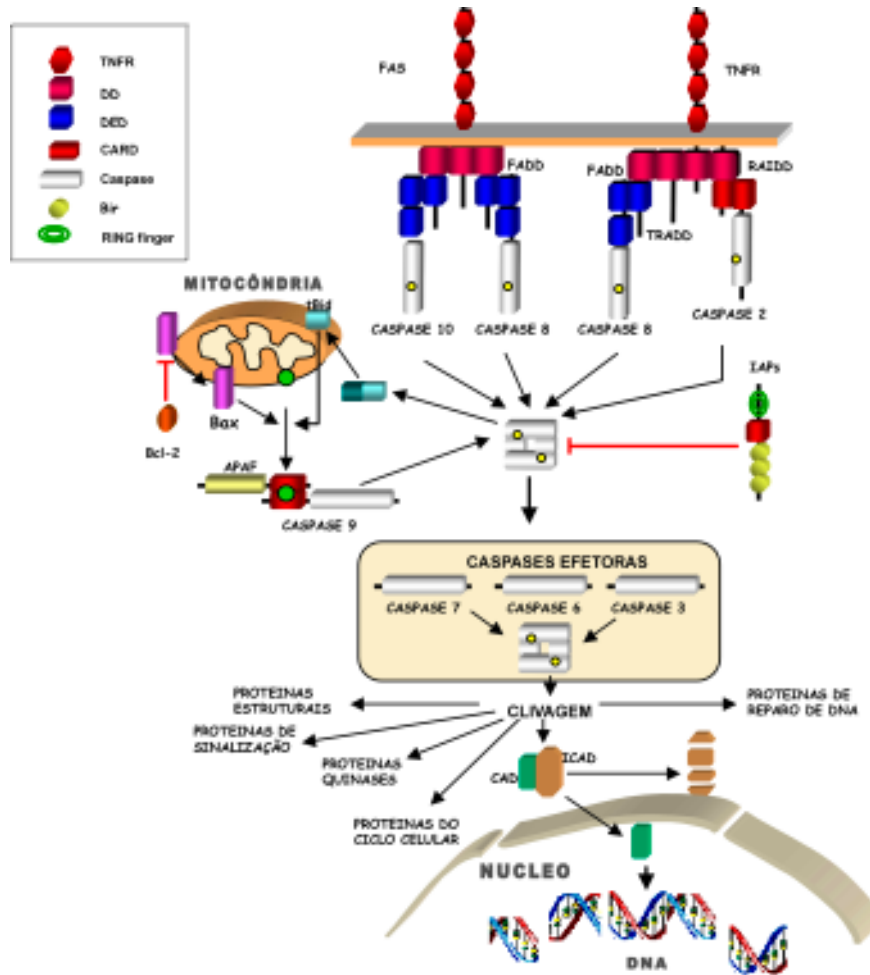


Figura 2 - Esquema representativo das vias de sinalização da apoptose e a ativação em cascata das caspases iniciadoras (2, 8, 9, 10) e efetoras (3, 6, 7) que causam a degradação de proteínas intracelulares. A via extrínseca de ativação da apoptose ocorre com a interação de citocinas aos seus receptores de membrana e conseqüente ativação da caspase-8, 2 ou 10. Na via intrínseca, os eventos químicos e físicos mediados pela proteínas da família BCL-2/BAX provoca a liberação do citocromo c, que provoca a ativação da caspase-9. Na quadra da direita são apresentados os símbolos que representam os principais domínios ou “motifs” das proteínas envolvidas na apoptose.

tre as quais formam-se os dois sítios ativos da enzima (Earnshaw et al., 1999).

As caspases foram divididas em três grupos com base na função que elas exercem no processo. No grupo I, estão incluídas as caspases pró-inflamatórias: caspases -1, -4, -5 e -13, envolvidas no processamento e na geração das citocinas IL-1 e IL-18. No grupo II, as caspases iniciadoras: -2, -8, -9 e -10, atuam na iniciação da cascata de ativação das caspases executoras -3, -6 e -7. Essas caspases fazem parte do grupo III e são responsáveis pela clivagem de dezenas de proteínas vitais ao metabolismo e à estrutura da célula (Earnshaw et al., 1999).

As caspases também foram classificadas em relação à especificidade

na clivagem de peptídeos sintéticos em testes *in vitro* (Thornberry et al., 1997, Garcia-Calvo et al., 1998). Segundo esses estudos, o grupo I é formado pelas caspases -1, -4 e -5, que são as enzimas que têm preferência pela seqüência WEHD. O peptídeo DExD é reconhecido pelas caspases -3, -7 e -2, os principais membros do grupo II. O grupo III é formado pelas caspases -6, -8 e -9, enzimas que clivam preferencialmente peptídeos que contenham a seqüência (LV)ExD. Hoje sabemos que seqüências adjacentes ao sítio de caspases, tanto à direita como à esquerda, também influenciam na clivagem do substrato, como será discutido abaixo.

A ativação das caspases iniciadoras -8, -2 e -10 inicia-se com a

ligação das citocinas da família TNF, Fas ou TRAIL aos seus receptores de membrana, identificados pelas siglas: TNFR1, Fas, DR-3, DR-4 ou DR-5 (Ashkenazi & Dixit, 1998). Esses receptores contêm, em sua estrutura polipeptídica, o domínio DD (death domain), que permite sua associação às proteínas adaptoras FADD e TRADD, que também possuem domínio DD. Esse complexo, por sua vez, interage com a pró-caspase-8 através do domínio DED (death effector domain), para juntos formarem um complexo supramolecular denominado apoptosoma. Dentro desta estrutura multimérica, ocorre a aproximação e a oligomerização de moléculas de pró-caspase-8, as quais promovem sua clivagem e ativação. Uma vez ativa, a caspase-8 inicia a cascata de ativação das pró-caspases executoras; caspases -3, -6 e -7.

A ativação de caspases pela via intrínseca requer a liberação do citocromo *c* armazenado nas mitocôndrias (Adams & Cory, 2001). A saída de citocromo *c* é dependente de uma série de eventos elétricos e químicos, sendo os mais estudados: a queda do potencial de transição de permeabilidade iônica, abertura de megaporos e a ruptura pontual de uma região da membrana externa. Esses eventos são modulados pela interação de proteínas inibidoras de apoptose da família Bcl-2 (principais membros: Bcl-2-W, Bcl-xl, MCL-1) e por proteínas indutoras de apoptose da família Bax (principais membros: Bad, Bid e Bak), capazes de interagir com elementos estruturais da membrana externa das mitocôndrias, como, por exemplo, as porinas que são poros de transição de permeabilidade para várias moléculas, incluídas a H₂O e Ca²⁺. Essa classificação em indutoras ou supressoras tem como base a presença do domínio BH, que é dividido em BH-1, -2, -3 e -4. Esses domínios provocam a homodimerização de moléculas similares e a formação de poros que permeiam a passagem do citocromo *c* da mitocôndria para o citosol. Por outro lado, a formação de heterodímeros do tipo Bcl-2/Bax evita a formação dessa estrutura e, conseqüentemente, a morte celular (Adams & Cory, 2001).

No citoplasma, as moléculas de citocromo *c* interagem, via domínio CARD, com os complexos formados pela pró-caspase-9 e Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). A união dessas proteínas forma um apoptosoma de aproximadamente 700 kDa, permitindo a aproximação e a oligomerização de moléculas de pró-caspase-9 e sua auto-clivagem e ativação. A caspase-9 livre pode recrutar e ativar as caspases executoras -3, -6 e -7 e as caspases iniciadoras -8, -2 e -10.

Encontradas nos diversos compartimentos celulares, as caspases executoras podem atuar sobre as proteínas estruturais, proteínas de sinalização, fatores de transcrição e várias enzimas envolvidas na síntese e reparo do RNA e DNA. Na tabela I, estão apresentadas algumas das dezenas de proteínas-substrato de caspases. Segundo uma revisão recente, o número de proteínas substratos de caspases é de aproximadamente 280 proteínas (Fischer et al., 2003). A função e os efeitos causados à célula após a clivagem foram também sumarizados no artigo. Em vários casos, a clivagem resulta na inativação das proteínas, mas há também outros casos em que a proteína clivada é ativada. Um exemplo em que a clivagem resulta na ativação é o da ativação da própria caspase. Um outro exemplo é o da proteína ICAD/DFF45 (Enari et al., 1998), um inibidor da nuclease CAD (caspase activated deoxyribonuclease), a enzima responsável pela fragmentação do DNA durante a apoptose. Em células não apoptóticas, CAD está presente como um complexo inativo com ICAD (inibitor of caspase activated deoxyribonuclease). Após a indução da apoptose, ICAD é inativada pelas caspases -3 e -7, deixando CAD livre para funcionar como uma nuclease.

As caspases clivam várias proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto, incluindo gelsolina, fodrina, Gas-2, proteína quinase de adesão focal (FAK), proteína quinase p21, isoformas da proteína quinase C e MEKK-1. A destruição da rede de microtúbulos provoca o arredondamento e o deslocamento da célula do tecido. Várias alterações típicas na morfologia do núcleo apoptótico são

dependentes da ação da caspase-6, a caspase que degrada as lâminas A, B e C do envoltório nuclear. O rompimento dessa estrutura parece facilitar o acesso e degradação das fitas de DNA na região internucleosomal pela nuclease CAD.

A clivagem de substratos de caspases ocorre de uma maneira tempo-dependente e pode anteceder ou proceder à morte por apoptose. Contudo, ainda não se sabe ao certo se a clivagem de uma proteína-chave poderia servir de catalisador do processo, i.e., o processo não se desencadearia sem a sua degradação. Várias linhas de evidências mostraram que a apoptose de células que encontraram defeitos ou erros na replicação do DNA durante a proliferação é dependente da degradação da Rb, fatores inibidores de CDK, p21 e p27 e da proteína MDM2, um inibidor da atividade de p53 (Levkau et al., 1998, Belizário et al., 1991, Belizário et al., 1999, Hiesh et al., 1999). Este postulado foi confirmado em alguns estudos com mutantes das proteínas MDM2 e Rb, nos quais os aminoácidos DEVD - o sítio preferencial de clivagem pela caspase-3 - foram substituídos por aminoácidos neutros. Como era esperado, na ausência de degradação dessas proteínas, as células resistiram à apoptose induzida por vários agentes fisiológicos e farmacológicos (Tan et al., 1997, Fattman et al., 2001). Não há, entretanto, evidências de que uma pressão seletiva na população de células malignas de um tecido tumoral produza células cujas proteínas apresentem mutações em sítios de clivagem de enzimas caspases como um fenômeno geral de resistência à apoptose.

4. O sistema ubiquitina-proteasoma

O sistema ubiquitina-proteasoma é responsável pela degradação de proteínas intracelulares, cuja organização genética e funcional está preservada em certas bactérias, leveduras e organismos multicelulares. Na célula, a proteólise é essencial não apenas para a eliminação seletiva de proteínas defeituosas, como também de proteínas que atuam como reguladores de processos bioquímicos, tais como a prolifera-

ção, diferenciação, biogênese de organelas, resposta imunológica e inflamatória (Ciechanover, 1998, Weissman, 1997, Goldberg et al., 2001). Doenças genéticas, neurodegenerativas e tumores malignos são induzidos quando certos componentes desse sistema de degradação estão ausentes ou desregulados (Ciechanover, 1998).

Diferentemente do processo de degradação mediado por proteases presentes nos lisossomas, a degradação de proteínas por esse sistema requer a energia de ATP e envolve dois passos distintos e sucessivos. No primeiro passo, uma proteína chamada ubiquitina, de peso molecular de 8,5 kDa, é covalentemente adicionada à proteína-alvo. No segundo, a proteína-alvo é degradada após ser desenovelada e fragmentada ao atravessar uma estrutura em forma cilíndrica oca denominada proteassoma (Figura 3).

O proteassoma é constituído de uma parte central que contém 4 unidades que formam um anel, sendo que cada anel é formado por 7 cadeias α e 7 cadeias β distintas. Essa estrutura pode ser representada pela fórmula $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$. O coeficiente de sedimentação do proteassoma é igual a 20S. As subunidades β possuem atividade proteolítica e, dessa forma, atuam diretamente na degradação de proteínas. Essas proteases têm especificidade distintas; a primeira possui atividade similar à tripsina, a segunda similar à quimiotripsina e a terceira, similar à glutamil peptidil hidrolases. Durante a resposta imunológica, o sistema ubiquitina-proteassoma é ativado pelo interferon- γ . Essa citocina induz a síntese de três subunidade β , LMP2, LMP7 and MECL-1, que favorecem a geração de peptídeos da classe I do sistema histocompatibilidade humana (MHS).

Nas extremidades inferior e superior dessa estrutura de 20S, estão acopladas duas estruturas reguladoras de massa molecular igual a 19S. Essas unidades contêm enzimas ATPases, que promovem o desenovelamento das proteínas que sofreram a degradação. A união dessas três estruturas 19S-20S-19S dá origem a um complexo supramolecular de coeficiente de sedimentação 26S e,

aproximadamente, 1500-2000 kDa (Weissman, 1997, Ciechanover, 1998).

A conjugação da ubiquitina ao substrato é feita em um mecanismo de três etapas e requer a participação de três classes de enzimas denominadas E1, E2 e E3. Primeiro, a molécula de glicina da porção C-terminal da ubiquitina forma uma ligação tio-éster com o resíduo de cisteína da enzima ativadora de ubiquitina E1. Essa reação requer a hidrólise de ATP. Até o momento, apenas uma enzima E1 de 117 kDa foi identificada no genoma humano. Em seguida, a ubiquitina ativada é transferida para uma enzima conjugadora de ubiquitina ou E2, também conhecidas por UBCs (ubiquitin-conjugating enzymes). Mais de 25 genes de E2 estão presentes no genoma humano. Em seguida, a E2 transfere a ubiquitina para uma enzima ubiquitina ligase ou E3 (Ubiquitin-protein ligases). As E3 ligam-se ao substrato de uma maneira específica e promovem a transferência da ubiquitina da E2 para o grupamento ϵ -amino de uma lisina na proteína-substrato. Reações su-

cessivas podem ocorrer, levando à formação de substrato com cadeias lineares ou de múltiplas seqüências de ubiquitina (Weissman, 1997, Ciechanover, 1998).

A família de enzimas E3 ligases é a mais abundante na célula humana; são mais de 600 genes preditos; entretanto, até o momento, somente cinco classes principais foram descritas (Ciechanover, 1998, Joazeiro & Weissman 2000). Em geral, as E3s são identificadas pela presença dos domínios Ringer Finger (RF), F-box e WD40, que atuam no recrutamento e na apresentação de proteínas-substrato ao proteassoma (Ciechanover, 1998, Vodermaier, 2001). Ao contrário do que se pensava, as E3 ligases podem reconhecer mais de uma proteína, inclusive proteínas não ubiquitinadas.

No primeiro grupo, estão as enzimas da família E3 α /E3 β . Essas E3 reconhecem proteínas que contenham na porção N-terminal um aminoácido básico (exemplo: Arg, Lys, His) ou um aminoácido hidrofóbico volumoso (exemplo: Phe, Leu, Trp, Tyr, Ile). Essa regra de reconhecimento é denominada "N-

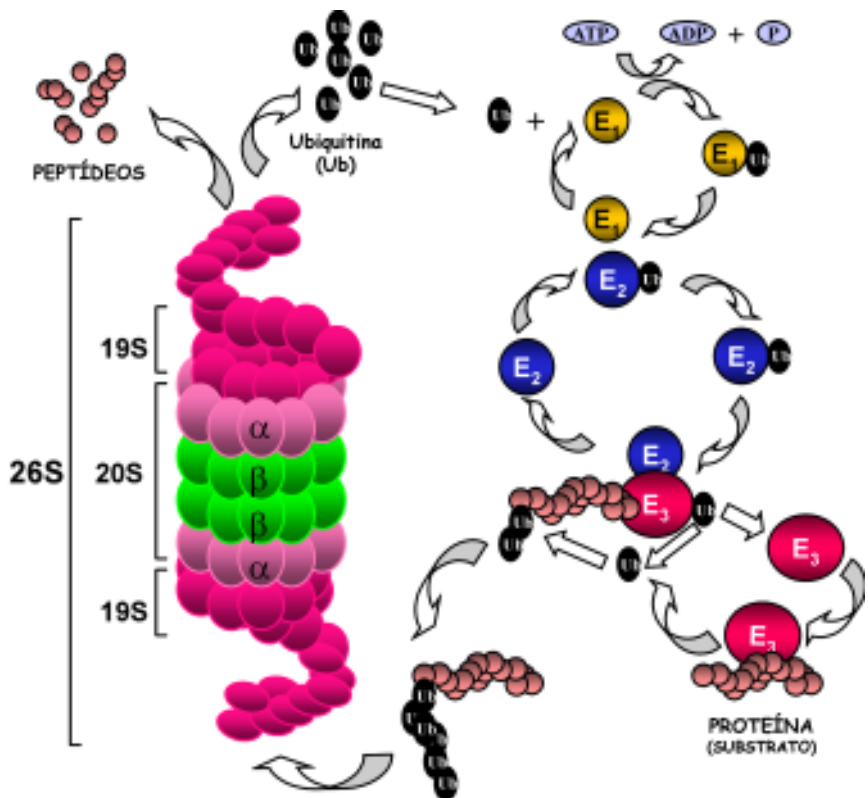


Figura 3 - Esquema representativo mostrando as etapas de ubiquitinação e reconhecimento de uma proteína-substrato pelas enzimas E1, E2 e E3. As proteínas ubiquitinadas são degradadas ao passarem por dentro do proteassoma por enzimas proteolíticas específicas, gerando peptídeos entre 7-12 aminoácidos.

end rule” ou regra do aminoácido N-terminal (Varshavky, 1992).

O segundo grupo de enzimas E3 tem como membro principal a proteína E6-AP (E6 associated oncoprotein), que foi identificada em um complexo formado com a proteína E6 do papiloma vírus. O complexo recruta e promove a degradação da proteína p53. A degradação de p53 também é promovida pela E3 denominada MDM2 (ver adiante). Essas proteínas, embora de tamanho variados, apresentam um domínio comum na porção carboxi-terminal denominado HECT (homology to the E6-AP carboxyl terminus). Um grande número de proteínas com o domínio HECT já foi identificado.

O terceiro grupo de E3 ligases atuam na degradação de proteínas envolvidas no controle da entrada e saída da mitose. Alguns exemplos de substratos dessas E3 ligases são as ciclinas A e B, securina, cdc5, cdc6, entre outras. A E3 mais estudada nesse grupo é o complexo denominado ciclosoma (C) ou APC (anaphase promoting complex). O complexo pode ter até 10 subunidades (exemplos: cdc16, 20, 26, 27, Apc4, 5, 6) cuja síntese e degradação ocorre de uma maneira dependente dos eventos do ciclo celular (Zacharia & Nasmyth, 1999).

O grupo quatro tem como exemplo mais estudado o complexo “Skp1-cullin-F-Box” ou SCF (Pray et al., 2002). A parte central do complexo é formado pelas proteínas Cul1 (culina 1) e Roc1 (proteína “Ringer finger”) e Skp1. A Skp1 é um dos membros da família de proteínas F-Box. Essas proteínas ligam-se especificamente às proteínas-substratos de E3 ligase. As E3 ligases da família SCF atuam na degradação de componentes do ciclo celular que controlam a transição G1/S. Entre eles estão os inibidores de enzimas CDKs, p21 e p27, e as ciclinas A e E. Em geral, essas proteínas são fosforiladas pelos complexos CDK/ciclina antes de serem reconhecidas pelas proteínas F-Box do complexo E3 (King et al., 1996). Recentemente foi demonstrado que o complexo SCF também pode participar na ubiquitinação das proteínas β -catenina e I κ B (Winston et al., 1999).

O quinto grupo de E3 possui vários membros cuja característica principal é a presença do domínio “Ring Finger” (RF). O domínio RF, definido como uma seqüência linear de extensão e estrutura variável, que pode ser representada pela seguinte fórmula: Cx2Cx(9-39)Cx(1-3)Hx(2-3)C/Hx2Cx(4-48)Cx2C, onde C corresponde aos resíduos de cisteína e H aos resíduos de histina, e X a qualquer outro aminoácido. A principal propriedade química da região RF é a captura de duas moléculas de zinco. Não obstante, a maioria das proteínas com domínio RF apresenta atividade E3 e auxilia na transferência de ubiquitina de uma molécula E2 para a proteína-substrato (Joazeiro & Weissman, 2000; Freemont, 2000). Exemplos de moléculas E3 com domínio RF são as proteínas MDM2, BRCA e Siah-1. Um outro exemplo de proteína com domínio RF e atividade E3 é a proteína VHL, responsável pela síndrome von Hippel Lindau (pVHL). A proteína VHL pode se associar às elonginas B, C e culina2, dando origem ao complexo VBC, que tem as mesmas características dos complexos APC e SCF.

Survivin, XIAP-1, IAP-1 e c-IAP-2 fazem parte da família IAPs (inibitor-of-apoptosis), que atuam como inibidores da ativação das enzimas caspases, e que também apresentam, na porção C-terminal, o domínio RF (Deveraux & Reed, 1999). Além disso, essas proteínas são identificadas por apresentarem, na porção N-terminal, uma seqüência de aminoácidos chamada de domínio BIR. O domínio BIR é representado pela expressão: Cx2Cx6Wx3Dx5Hx6C. A presença de resíduos de cisteína e histidina pressupõe uma possível estrutura ligadora de zinco, mas não se sabe ao certo se outras propriedades do domínio BIR seriam responsáveis pela inibição da atividade enzimática das caspases. Por outro lado, está bem estabelecido que o domínio RF tem papel no processo de ubiquitinação de várias caspases (Huang et al., 2000; Joazeiro & Weissman, 2000). A ubiquitinação é uma evidência experimental que sugere a degradação de caspases via ubiquitina-proteasoma, mas isto ainda não foi amplamente estudado.

5. A degradação seletiva de proteínas e suas implicações no câncer

A falha na ubiquitinação e conseqüente ausência de degradação pelo sistema ubiquitina-proteasoma pode modificar a atividade de oncogenes e facilitar o desenvolvimento de tumores malignos. Mutações e deleções que interferem na degradação foram encontrados nos seguintes pro-oncogenes: β -catenina, p53, c-Jun, E2F, ciclinas A, B, D e E e p27 (Loda et al., 1997, Rubinfeld et al., 1997, Gstaiger et al., 2001).

A proteína β -catenina é um dos componentes de uma via de sinalização que promove a ativação dos fatores de transcrição LEF e TCF. Esses fatores atuam na proliferação de linfócitos T, e, em particular, na indução da síntese dos genes da ciclina D e c-myc. Foi verificado que certas mutações na β -catenina aumentam sua estabilidade e o tempo de sinalização de proliferação celular na célula mutante. A estabilidade da proteína β -catenina também é modificada por mutações encontradas em um outro gene que participa dessa via de sinalização, o gene APC (adenomatous polyposis coli). O APC é um fator supressor de tumores e tem papel chave na indução de polipose e adenoma do cólon intestinal (Fodde et al., 2001). Além disso, a mutação de β -catenina também interrompe a via de sinalização da proliferação mediada pela E-caderina da membrana celular e das proteínas da matriz extracelular (Rubinfeld et al., 1997).

Recentemente descobriu-se que a agressividade de carcinoma do cólon retal, carcinoma da mama e carcinoma da próstata está associada ao aumento da degradação da p27, o inibidor de CDKs que controla o ciclo celular (Loda et al., 1997). O mecanismo pelo qual isto acontece ainda não está bem definido, mas estudos recentes mostraram que a proteína Skp2, uma F-box proteína, envolvida no reconhecimento da proteína p27, parece ter um papel chave na oncogênese (Gstaiger et al., 2001). GSTAIGER e colaboradores mostraram que o gene dessa proteína é superexpressado em displasias da epiderme e no carcinoma epitelial da boca. Mais importante

ainda, eles mostraram que fibroblastos normais, que expressam os genes H-Ras mutados, e o Skp2, adquiriram as propriedades biológicas de uma célula tumoral nos testes *in vitro* e *in vivo*. Quando essas células eram injetadas em camundongos *nude*, observou-se também a rápida formação de tumores malignos (Gstaiger et al., 2001).

Em aproximadamente 90% dos cânceres da cervix é detectada a expressão das proteínas E6 e E7 de papiloma vírus tipos 16 e 18 (Evan & Voudsden, 2001). Como discutido, as proteínas E6 são homólogas a uma classe de proteínas E3, denominada E6-AP, as quais atuam no recrutamento e ubiquitinação da p53. A produção excessiva de proteína E6 em células infectadas pelo papiloma e a subsequente degradação de p53, via ubiquitina-proteasoma, são eventos iniciais na transformação tumoral mediada por esses vírus (Huibregtse et al., 1995).

Várias proteínas E3, incluindo MDM2, BRCA, Siah-1, Cb1 e PML, foram envolvidas direta ou indiretamente na transformação celular (Freemont, 2000). Foi observado que uma mutação pontual no domínio RF da BRCA1 – uma proteína envolvida no reparo do DNA, predispõe as mulheres portadoras desta mutação ao câncer de mama e de ovário (Baer & Ludwig, 2002). Outro exemplo é a proteína VHL, responsável pela síndrome von Hippel Lindau. Mutações no gene da VHL bloqueiam sua ação E3, responsável pela inativação do fator HIP (hipoxia inducing factor). Com o aumento de estabilidade do HIP, é possível o desenvolvimento de certos tumores malignos em indivíduos portadores dessa síndrome (Tyers & Jorgensen, 2000).

Survivina, uma E3 da família IAP de inibidores de caspases, parece ter um papel relevante na indução de câncer. Foi observado que sua expressão é aumentada na transição G2/M do ciclo celular quando ela se liga aos fusos de microtúbulos do aparato mitótico. Esta associação previne a apoptose induzida pelo taxol. Sabe-se também que a superexpressão de IAP é um marcador de prognóstico ruim de evolução da doenças em pacientes portadores de neuroblastoma, cânceres do colo uterino e gástrico (Deveraux & Reed, 1998).

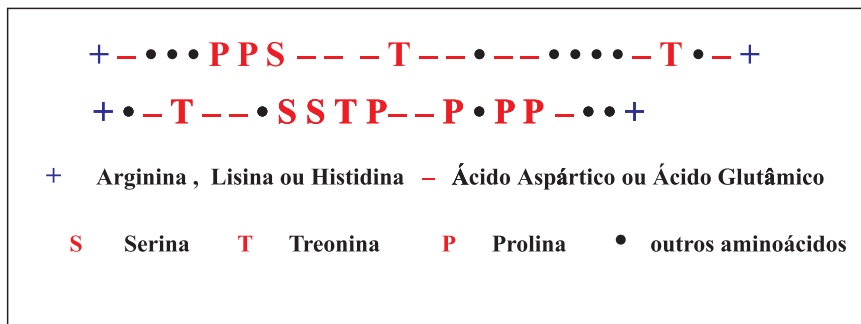
6. A região PEST como um sinal que promove a degradação rápida de proteínas

Além da ubiquitinação, a presença de certas regiões e seqüências na estrutura primária das proteínas pode funcionar como um sinal que define o seu tempo de meia-vida dentro da célula. Várias seqüências de aminoácidos foram identificadas como “sinais proteolíticos” para a degradação por enzimas lisosomais (exemplo, catepsina), calpains e sistema ubiquitina-proteasoma (Dice, 1990, Rechsteiner & Rogers, 1996).

Correlacionando as taxas de degradação de dezenas de proteínas e as suas seqüências de aminoácidos, ROGERS, WELLS e RECHSTEINER (1986) mostraram que as proteínas, com um tempo médio de degradação inferior a 2 horas, apresentam um grupo conservado de aminoácidos. Essa região, que pode ter de 10 a 50 aminoácidos, é rica em prolina (P), ácido glutâmico (E), serina (S) e treonina (T), e flanqueada na extremidade N e C-terminal, por um aminoácido positivo, como a arginina,

lisina ou histidina. A região PEST, como foi chamada, tem um número e a ordem de aminoácidos variável, bem como a sua extensão (Figura 4). Ela pode estar presente 5 vezes em uma proteína de 300 aminoácidos. Devido às características químicas desses aminoácidos de carga negativa, a região PEST aumenta a retenção de moléculas de H₂O e íons Ca²⁺ (Rechsteiner & Rogers, 1996). Além disso, os aminoácidos serina e treonina das proteínas contendo a região PEST são alvos de fosforilação por várias enzimas quinases. Como as regiões PEST nunca são seqüências repetitivas e idênticas, acredita-se que a estrutura secundária, em forma de laço (loop), sirva como local de ligação de outras proteínas ou enzimas, em particular, E3 ligases, mas isto ainda não foi definido.

Após essa descoberta, vários grupos mostraram que a deleção ou a substituição de aminoácidos da região PEST aumenta a estabilidade da proteína, isto é, impede a sua rápida degradação. Em geral, a função biológica da proteína sem o PEST é dramaticamente aumentada (Rechsteiner & Rogers, 1996).



MCL1 (350 aa)	104 RAAPLEEMEAPAADAIMSPEEELDGYEPEPLGK 136	6.19
CASP9 (416 aa)	294 HGFEVA STSPEDES PGSNPEPDAT PFEGLR 324	12.40
IF116B (682 aa)	170 KTSL SAPPNSSSTENPK 186	10.62

Figura 4 - Diagrama representativo de uma região PEST. Nesta seqüência aleatória de aminoácidos estão intercalados os aminoácidos designados pelos seus símbolos alfabéticos citados ou figuras representativas (- , + , •). As proteínas MCL1, caspase-9 e IF116B são exemplos de proteínas que apresentam regiões PEST com um índice PEST indicado.

A região PEST está presente em várias proteínas diretamente envolvidas na etiologia do câncer. Exemplos mais relevantes são MYC, RAS, FOS, JUN, PTEN, p53, EIA, ciclinas A, B, inibidores de CDKs, p21 e p27, β -catenina e NF-kB (Rechsteiner & Rogers, 1996).

A PTEN é um fator supressor de tumores, cujo gene aparece deletado ou mutado em gliomas e cânceres do endométrio. A proteína PTEN atua como enzima fosfatase e, sob sua ação, o fosfolípido PIP₃ (fosfoinositol-3-fosfato) é desfosforilado, tornando-se inativo. O PIP₃ atua na ativação da enzima quinase B (PKB), mais conhecida por Akt. A Akt exerce uma função anti-apoptótica, promovendo a fosforilação e inativação da caspase-9 e BAD, um dos membros da família BAX de proteínas pró-apoptóticas (Cardone et al., 1998). Mutações no gene PTEN, que causam gliomas e câncer do endométrio, geralmente ocorrem na região PEST. A oncogênese, nesse caso, é, em parte, produzida pela produção excessiva de PIP₃ (fosfoinositol) e a ativação contínua da via

Akt de sobrevivência celular. De fato, estudos de mutações sítio-dirigidas mostram que a ausência da região PEST provoca a desestabilização da estrutura secundária da proteína e compromete sua atividade enzimática (Georgescu et al., 1999).

7. A região PEST e o sítio de clivagem de enzimas caspases

Através da consulta de vários bancos de dados do genoma humano (exemplo: National Center For Biotechnology Information, NCBI) e o uso do programa PESTFind (Rechsteiner & Rogers, 1996) e um programa similar desenvolvido em nosso laboratório realizamos um estudo para identificar a presença da região PEST dentro do sítio de clivagem em uma amostragem de proteínas-substrato de enzimas caspases. A motivação para este estudo veio de uma descoberta inicial feita durante a análise da presença de região PEST na família de enzimas caspases. Nesse grupo particular de proteínas notou-se que o sítio de

clivagem (exemplo; DEVD) encontrava-se dentro da região PEST em 10 de um total de 12 enzimas caspases analisadas. Desta forma, a hipótese é que o sítio de reconhecimento de caspase não seja de apenas 4 aminoácidos, mas uma região estendida de 20 a 30 aminoácidos, i.e., a região PEST.

Em seguida, foram analisadas todas as proteínas-substrato de caspases descritas na literatura. Nesse grupo de 144 proteínas, a presença do sítio de clivagem dentro da região de PEST foi detectada em 63% (90/144) da amostragem de proteínas. No restante, 37% (54/144) das proteínas-substrato de caspases, o sítio de clivagem foi encontrado em um local distante da região PEST (Tabela 1). Estas proteínas foram agrupadas em 8 categorias, de acordo com as funções que exercem em diferentes processos biológicos como apoptose, ciclo celular, doenças neurodegenerativas, ou localização celular (Tabela 1). Algumas dessas proteínas foram identificadas no quadro. Elas podem atuar como citocinas, receptores de membrana, fatores de

Tabela 1 - Relação de proteínas-substratos de caspases contendo o sítio de clivagem da região PEST

Categoria Exemplos	Sítio de caspase dentro do PEST		
	Sim	Não	Total
Proteínas Estruturais e do citoesqueleto			
Gelsolina, citoqueratina, catenina, actina, filamina, Gas-2, Foldrina, Plectina, Tau, Vimentina, Rabaptina	14	5	19
Proteínas Nucleares			
Laminas A, B, C, NuMa, HnRNPs, MDM2, SAF-A, RNA helicase, SATB-1 LAP2a, Nup153	6	4	13
Proteínas do Metabolismo de DNA			
PARP, RFC140, DNA topoisomerase, MCM3, PKcs-DNA, DNA helicase, RAD51, BRCA1, acinus	6	8	15
Proteínas Quinases			
PKC (ϵ , δ , τ), PKC-related quinase, CaMK IV, Mst1, Fyn, FAK, MEKK1, Raf1, Akt, Wee1, Src, RIP quinase, P58FYN	15	9	26
Proteínas da tradução de sinais e transcrição gênica			
Pro-interleucinas 1, 16, 18, D4-GDI, PP2A, cPLA2, STAT1, NF-kB, SREBP-1 3 2, calpastatina, PLC- δ , Cb-1, Erb-2, NRF2, PDE 6, 5A e 10A, MAX, Calcineurina A, Fatores de Transcrição AP-2A, ROCK1, GATA-1, TIAM	17	13	32
Proteínas Reguladores do Ciclo Celular e Apoptose			
p21, p27, pRB, CDC27, nedd4, ciclina A, Bcl-xL, FLIP, Bid, Bax, BAD, ICAD, XIAP, hIAP, HSP90, Caspases 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, TRAF	20	9	29
Proteínas envolvidas em doenças Neurodegenerativas			
Huntingtina, Atrofinina-1, Presenilina-1, 2, APLP2, ataxina-3, Calsenilina, APP, LEDGF, Receptor Androgênio	9	1	10
Outras categorias			
PA28 γ , O-Glicosidade, receptor AMPA, GRASP65, Cálcio-ATPase, GRASP-1	3	5	9
Totais	90	54	144
Porcentagens	63%	37%	100%

transcrição, enzimas quinases, proteases, proteínas do citoesqueleto, citoplasmáticas, nucleares, e várias outras funções não especificadas.

A presença do sítio de clivagem de caspases dentro da região PEST deve ter uma finalidade biológica que ainda não se conhece. Uma hipótese é que essa região determinaria a degradação rápida da proteína pela via ubiquitina-proteasoma. De fato, estudos já mostraram que as IAP funcionam como E3 ligases, promovendo a ubiquitinação de caspases (Huang et al., 2000). Estudos em andamento no nosso laboratório mostraram que a substituição de certos aminoácidos (S199A, T201A) da região PEST da caspase-7 impedem a sua autoativação. É possível, portanto, que a região PEST funcione como um sítio de regulação de ativação de caspase. Possivelmente, o PEST funcionaria como um elemento estrutural de reconhecimento que induz a ativação intra ou intermolecular da proforma da enzima.

Em resumo, os dados apresentados nesse estudo revelaram várias pistas ou hipóteses a serem confirmadas através de trabalhos de bancada que envolvem a mutação sítio-dirigida de genes e a produção de proteínas modificadas para realização de ensaios funcionais. Acredita-se que esses ensaios possam revelar fatos importantes sobre o potencial oncogênico

das proteínas que contenham regiões PEST ainda não reveladas em estudos convencionais de investigação científica (Figura 5). Ressalte-se que existe uma predição de que, pelo menos, um terço das proteínas codificadas pelo genoma humano, isto é, 10 mil proteínas de um universo de 30 mil proteínas possuam regiões PEST (Rechsteiner & Rogers, 1996).

8. Perspectivas

Os bancos de dados gerados por seqüenciamento de genes provenientes de tecido normal e tumoral são excelentes provedores de informações para os estudos que visem à análise de possíveis alterações funcionais de proteínas devido a defeitos nos mecanismos que levam à sua destruição. Esta análise tem sido facilitada pelo conhecimento de sítios, regiões e seqüências de reconhecimento de degradação de proteínas, bem como pela identificação de dezenas de famílias de proteínas e enzimas envolvidas nos diferentes processos de proteólise via ubiquitina-proteasoma e a proteólise mediada por enzimas caspases. A identificação destas modificações poderia ajudar a predir falhas nas interações com os elementos da maquinaria de degradação celular; desenvolver estratégias de inibição ou de ativação dos processos; e, finalmente, propor novas

alternativas profiláticas e terapêuticas.

Entender a origem e a progressão do câncer através da análise de seqüências, regiões e domínios na estrutura das proteínas que servem de sinalização e reconhecimento para sua degradação é o grande desafio do momento. Para vencer esse desafio é preciso ter a cooperação de vários grupos de cientistas especializados em seqüenciamento e clonagem de genes, expressão de proteínas recombinantes e, em especial, a cooperação de uma nova classe de pesquisador, o bioinformata, cuja principal ferramenta é o computador. Cabe a esse profissional a análise de conjuntos de dados em grande escala e a formulação de hipóteses que serão executadas por seus colegas. Essa forma inovadora de pesquisa é decisiva para entender a biologia da célula em toda a sua complexidade.

9. Referências Bibliográficas

- Adams JM, Cory S (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Bioch Sci* 26(1): 61-66.
- Aravind L, Dixit VM, Koonin V (2001). Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. *Science* 291: 1279-84.
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
- Baer R, Ludwig T (2002). The BCRA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Curr Op Genet Dev* 12: 86-91.
- Belizário JE, Dinarello CA (1991). Interleukin-1- β , interleukin-6, TNF- α and TGF- β 1 increase cell resistance to TNF- α by growth arrest in the G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res* 51: 2379-85.
- Belizário JE; Sherwood SW; Beçak W (1999). Induction of apoptosis by tumor necrosis factor and butyrolactone, a chemical inhibitor of cyclin dependent kinases. *Braz J Med Res* 32: 473-82.
- Cardone MH, Roy N, Stennincke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998).

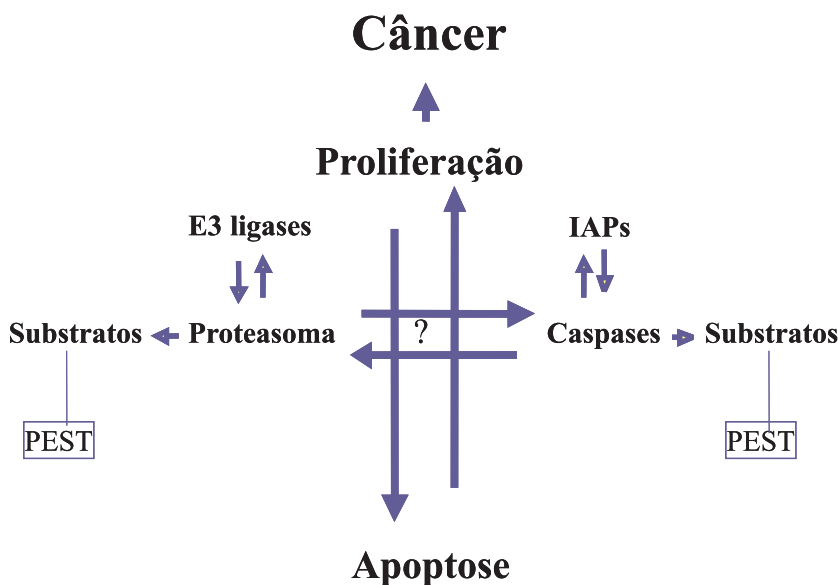


Figura 5. O esquema mostra possíveis etapas na regulação da proliferação e morte celular que quando alteradas por degradação seletiva e inapropriada, ou, a ausência de degradação, pode levar a produção de proteínas oncogênicas. Uma condição específica que pode levar a estas disfunções é a alteração por mutações ou deleção de aminoácidos da região PEST, um elemento chave para o reconhecimento e eliminação de proteínas oncogênicas pelas enzimas caspases e sistema ubiquitina-proteasoma.

- Regulation of cell death protease caspases-9 by phosphorylation. *Science* 282: 1318-1321.
- Ciechanover A (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17: 7151-7160.
- Deveraux QL, Reed JC (1999). IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes & Develop.*, 13: 239-52.
- Dice JF (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* 15(8): 305-9.
- Earnshaw W, Martins LM, Kaufmann S (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68: 383-424.
- Enari M; Sakahira H; Hokoyama H; Okama K; Iwamatsu A; Nagata S (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391: 43-50.
- Evan G, Littlewood T (1998). A matter of life and cell death. *Science* 281: 1317-1322.
- Evan G, Vousden KH (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342-348.
- Fattman CL, Delach S, Dou QP, Johnson DE (2001). Sequential two-step cleavage of the retinoblastoma protein by caspase 3 and 7 during etoposide-induced apoptosis. *Oncogene* 20: 2918-26..
- Fesik SW (2000). Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell* 103: 273-282.
- Fodde R, Smits R, Clevers H (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature Rev* 1: 55-67.
- Freemont PS (2000). Ubiquitination: ring for destruction. *Curr Biol* 10: R84-87.
- Fisher U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Diff* 10: 76-100.
- Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry, NA (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 273: 32608-32613, 1998.
- Georgescu M-M, Kirsch KH, Akagi T, Shishido T, Hanafusa H (1999). The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxy-terminal region. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10182-87.
- Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J, Krek W (2001). Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *PNAS* 98: 5043-5048.
- Hahn W, Weinberg RA (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Rev.* 2: 231-341.
- Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Hsieh J-K, Chan FSG, O'connor DJ, Mitnacht S; Zhon S, Lu X (1999). RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell* 3: 181-193.
- Hoeijmakers JHL (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374.
- Huang H-K, Joazeiro CAP, Bonfoco E, Kamada S, Levenson JD, Hunter T (2000). The inhibitor of apoptosis cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes *in vitro* monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem* 275:26661-64.
- Joazeiro CAP, Weissman AM (2000). Ring finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102: 549-552.
- King RW, Deshaies RJ, Peters J-M, Kirschner MW (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274: 1652-1658.
- Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM, Ross JM (1998). Cleavage of p21 and p27 mediates apoptosis in endothelial cell through activation of cdk2: role of a caspases cascade. *Mol Cell* 1: 553-563.
- Loda M, Cukor B, Tam S W, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M (1997). Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinases inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Med* 3(2): 231-234.
- Malumbres M, Barbacid M (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature* 1: 222-231.
- Murray GM, Kirschner MW (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 349: 132-38.
- Pray TR, Parlato F, Huang J, Wong BR et al., (2002). Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Drug Resistance Updates* 5: 249-258.
- Rechsteiner M, Rogers SW (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-71.
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-8.
- Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polaskis P (1997). Stabilization of β -catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275: 1790-1792.
- Sadis S, Atienza Jr C, Finley D (1995). Synthetic signals for ubiquitin-dependent proteolysis. *Mol Cell Biol*, 15: 4086-4094.
- Stennicke HR, Salvesen GS (1997). Biochemical characterization of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem* 41: 25719-25723.
- Tan X, Martin SJ, Green DR, Wang JYJ (1997). Degradation of retinoblastoma protein in tumor necrosis factor- and CD95-induced cell death. *J Biol Chem* 272: 9613-9616.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Raper, DM, Timkey T, Garcia-Calvo, M., et al. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. *J Biol Chem* 272: 17907-17911.
- Tyers M, Jorgensen P (2000). Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Curr Opin Genet Dev* 10: 54-64.
- Varshavsky A (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci. USA* 93: 12142-49.
- Vodermaier HC (2001). Cell cycle: waiters serving the destruction machinery. *Curr Biol* 11: R834-37.
- Weisman AM (1997). Regulating protein degradation by ubiquitination. *Immunol Today* 190: 189-197.
- Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW. (1998). The SCF-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in I κ B and β -catenin and stimulates I κ B ubiquitination *in vitro*. *Genes Dev* 13: 270-283. 🌱