

JULIANA BRANDSTETTER VILAR

**MECANISMOS DE REPARO DE DNA ENVOLVIDOS COM LESÕES INDUZIDAS
POR AGENTE ALQUILANTE (NIMUSTINA) EM CÉLULAS HUMANAS E SUA
ASSOCIAÇÃO COM A RESISTÊNCIA DE GLIOMAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Carlos Frederico Martins Menck

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

VILAR, J. B. **Mecanismos de reparo de DNA envolvidos com lesões induzidas por agente alquilante (Nimustina) em células humanas e sua associação com a resistência de gliomas.** 2014. 185 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A quimiorresistência de tumores constitui um dos maiores obstáculos que levam comumente ao fracasso da terapia. Os mecanismos relevantes que contribuem para a resistência celular incluem: bombas de efluxo; alterações na interação entre a droga e o seu alvo e mudanças nas respostas celulares, em particular uma habilidade aumentada de reparar os danos induzidos no DNA e defeitos nas vias apoptóticas. A capacidade de reparar os danos no DNA e a evasão da apoptose são de grande importância, uma vez que a maioria dos quimioterápicos tem sua ação baseada na indução de citotoxicidade pela capacidade de gerar lesões no DNA. Desta forma, uma importante estratégia para melhorar a quimioterapia é o desenvolvimento de abordagens mais seletivas e mecanismos que contornem a resistência tumoral. Neste trabalho, através de um estudo sobre os genes e suas respectivas vias envolvidas no reparo, capacidade de sobrevivência e sinalização de danos induzidos pela nimustina (ACNU) - um agente cloroetilante comumente utilizado em tratamentos quimioterápicos de tumores sólidos - identificamos genes potencialmente alvos para uma terapia adjuvante. Demonstramos que células de glioma p53mt tem menor capacidade de reparo de ICLs induzidos por esta droga do que células p53wt. Também, que a via de NHEJ (“*Non Homologous End Joining*”) não é uma via preferencial de reparo dessas lesões, mas que a via de NER (“*Nucleotide Excision Repair*”) (ou especificamente os produtos gênicos XPA, XPC e XPF) é bastante importante. Curiosamente, na ausência de XPA, NHEJ assume uma participação no reparo dessas lesões, provavelmente devido a um aumento no número de DSBs e saturação das outras vias de reparo. Da mesma forma, verificamos que a DNA polimerase POLH (XPV), envolvida em TLS (“*Translesion Synthesis*”), também participa na tolerância dessas lesões. Neste contexto, encontramos evidências de que a polimerase TLS (especificamente POLH e POLK) apresentam-se superexpressas em amostras de gliomas, podendo desta forma concorrerem tanto para a tumorigênese quanto para a resistência observada nestes tipos tumorais. Por fim, realizamos o silenciamento gênico através da tecnologia de RNAi, que reprimem os genes pela eliminação do transcrito mRNA correspondente, prevenindo a síntese protéica. Os genes-alvo escolhidos para o silenciamento foram, desta forma, XPC, XPF, POLH e POLK. O silenciamento gênico de XPC, XPF e POLH demonstraram-se capazes de sensibilizar significativamente células de glioma, permitindo-nos sugerir estas proteínas como elementos importantes na quimioresistência de gliomas ao ACNU e colocando a inibição dessas moléculas como uma estratégia importante na sensibilização de gliomas ao ACNU e potencialmente a outros agentes quimioterápicos com o mesmo mecanismo de ação.

Palavras-chave: Respostas aos Danos no DNA. NER. TLS. ICL. ACNU. Gliomas.

ABSTRACT

VILAR, J. B. **Mechanisms of DNA repair involved with lesions induced by alkylating agent (Nimustine) in human cells and its relationship with glioma chemoresistance.** 2014. 185 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The chemoresistance of tumors is one of the most important obstacles that commonly lead to the failure of therapy. The main mechanisms that contribute to cellular resistance include efflux pumps; changes in the interaction between the drug and its target and changes in cellular responses, in particular an increased ability to repair induced DNA damages and defects in apoptotic pathways. The ability to repair DNA damage and evasion of apoptosis are of great importance, since most chemotherapy has its action based on the induction of cytotoxicity by the ability to generate DNA lesions. Thus, an important strategy for improving chemotherapy is the development of more selective mechanisms that circumvent tumor resistance approaches. In this work, through a study of genes and pathways involved in the repair, survival and damage signaling induced by nimustine (ACNU) - a chloroethylating agent commonly used in treatments of solid tumors - we aimed to identify target genes for a potentially adjuvant therapy. We demonstrated that glioma cells p53mt have less ability to repair ICLs induced by this drug than p53wt cells. Also, that the NHEJ (“*Non Homologous End Joining*”) pathway is not the main route of repair of these lesions, but that the NER (“*Nucleotide Excision Repair*”) pathway (or specifically the gene products XPA, XPC and XPF) is very important. Interestingly, in the absence of XPA, NHEJ takes place in the repair of those lesions, probably due to an increase in the number of DSBs and saturation of other repair pathways. Likewise, we found that DNA polymerase involved in TLS (“*Translesion Synthesis*”) POLH (XPV) also participates in tolerance of such lesions. We also found evidence that TLS polymerases (specifically POLH and POLK) are overexpressed in gliomas samples and could play a role in the tumorigenesis and in the resistance observed in these tumor types. Finally, we performed gene silencing through RNAi technology, which repress genes by eliminating the corresponding mRNA transcript, preventing protein synthesis. The target genes selected for silencing were XPC, XPF, POLH and POLK. The knockdown of XPC, XPF and POLH proved to significantly sensitize glioma cells, suggesting these proteins as important elements in the chemoresistance of gliomas and highlighting the inhibition of these molecules as an important strategy in the sensitization of gliomas to ACNU and probably to other chemotherapeutic agents with the same mechanisms of action.

Keywords: Dna damage responses. NER. TLS. ICL. ACNU. Gliomas.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

Esta tese aborda um tema que acabei por conhecer de duas maneiras: a primeira, teórica e experimental, encontrei nos livros, artigos, conferências, entre professores renomados e hipóteses testadas em laboratórios. Paralelamente, também o conheci em seus bastidores - em suas esferas social, emocional e psicológica - que abrigam, conjuntamente, a mesma diversidade do seu componente genético/biológico.

Dados sugerem, no entanto, que o que eu de modo particular testemunhei dos bastidores não foi, e continua não sendo, um fato isolado: estima-se que no ano de 2008, 7,6 milhões de mortes no mundo tenham ocorrido devido ao câncer e que 12,7 milhões de novos casos sejam reportados todos os anos. É, notoriamente, a principal causa de morte em países economicamente desenvolvidos e a segunda principal causa de morte em países em desenvolvimento. Nestes, a incidência da doença tem aumentado como resultado do crescimento e envelhecimento populacional, além de uma maior adesão a estilos de vida associados ao câncer, como o tabagismo, sedentarismo e dietas ocidentalizadas (FERLAY et al., 2010).

Apesar dos grandes esforços em todo o mundo no sentido de superar este grande problema de saúde pública, a “*American Cancer Society*” estima que a incidência de câncer nos EUA diminuiu 0,6% por ano nos homens (porém permanece estável nas mulheres), enquanto as taxas de óbitos diminuem menos de 2% ao ano para ambos os sexos (JEMAL et al., 2008). Estas estimativas mostram que ainda resta um longo caminho no entendimento que nos levará a tratamentos mais efetivos e, por conseguinte, à cura do câncer.

A complexidade e variabilidade do câncer como doença há muito é reconhecida. Manifesta-se com diferenças dramáticas em relação ao tempo de iniciação, progressão e impacto patogênico, evidente na gama de tecidos susceptíveis ao crescimento proliferativo aberrante. Esta grande variabilidade está inequivocamente presente em múltiplos níveis: genético, cromossômico, histológico, fisiológico, patológico e em termos de prognóstico (DE PALMA; HANAHAN, 2012).

A perda do controle proliferativo é o que caracteriza primariamente a carcinogênese. Para a formação de um tumor primário, as células cancerígenas devem coordenar um remodelamento do próprio tecido e uma transformação do tecido adjacente, com o objetivo de permitir o crescimento tumoral e invasão local. No nível do organismo, a doença afeta a homeostase global, induzindo alterações metabólicas sistêmicas. É neste estágio sistêmico da doença que, por fim, o paciente depara-se com a morte (MARKERT; LEVINE; VAZQUEZ, 2012).

Os estágios de promoção e progressão da doença dependem, em grande parte, de três fatores: *i*- a habilidade do tumor de desenvolver-se em um ambiente cronicamente inflamado; *ii*- a sua habilidade em evadir o reconhecimento do sistema imune e; *iii*- a habilidade de suprimir a resposta imunológica.

Diversos estudos apontam, tanto em modelos experimentais de câncer em murinos, como em diversos tipos de cânceres em humanos, que o desenvolvimento da doença e a sua resposta à terapia são moduladas pelo microambiente inflamatório e pelo sistema imune. A ligação entre inflamação e câncer é, desta forma, bem documentada: Diversas doenças inflamatórias aumentam o risco de câncer. Reciprocamente, em tumores epidemiologicamente não relacionados a manifestações inflamatórias (como o câncer de mama), as células tumorais podem orquestrar a produção de moléculas pró-inflamatórias e o recrutamento de células que medeiam a inflamação. Este cenário influencia quase todos os aspectos da progressão tumoral, incluindo sua habilidade em metastatizar (MANTOVANI et al., 2010).

As habilidades de evadir o sistema imune e de suprimir a resposta imunológica relacionam-se com o processo pelo qual o sistema imune perde a capacidade de reconhecer células pré-cancerígenas e destruí-las (“imuno-vigilância”) e com a capacidade do tumor em ativamente subverter os componentes imunológicos, utilizando-os em favor próprio (“imunossupressão”).

Evidências que contribuem para a aceitação desses conceitos apoiam-se no fato de que camundongos deficientes em linfócitos são mais susceptíveis tanto à carcinogênese espontânea quanto induzida. Adicionalmente, pacientes imunodeprimidos, em consequência da AIDS (em português - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) ou pós-transplantados, também apresentam maior incidência de diversos tipos de tumor, incluindo tumores de pulmão, tumores linfóides e relacionados a infecções virais, como sacoma de Kaposi (vírus humano da herpes 8) e carcinomas anogenitais (papilloma vírus humano, HPV) (CAVALLO et al., 2011; GRULICH et al., 2007; SHANKARAN et al., 2001).

Entretanto, no governo de todos os aspectos fenotípicos do câncer, desde os elementos macro, como as respostas imuno-fisiológicas, histo-patológicas, entre outras; passando pela intensa comunicação parácrina existente entre os diferentes tipos celulares que ocupam o tumor, até os eventos moleculares iniciais de transformação que levam uma célula normal a tornar-se cancerígena ou, em última instância, a própria resposta tumoral aos tratamentos quimioterápicos e o desenvolvimento da quimioresistência; no controle de todas essas características encontram-se as mudanças no genoma das células, conferindo-lhes vantagens adaptativas. Esta tese preocupa-se, assim, com a investigação dos mecanismos de reparo de DNA, envolvidos na remoção de danos, e respostas celulares induzidas por determinados quimioterápicos.

1.2. Respostas aos Danos no DNA

A informação genética das células é carregada pelo DNA, uma molécula vulnerável e dinâmica, e não uma molécula rígida e estável, como se poderia pensar. Inúmeros agentes físicos e químicos, tanto de origem endógena quanto ambiental, estão continuamente a desafiar a sua integridade (HOOGERVORST; VAN STEEG; DE VRIES, 2005). A replicação nas células de mamíferos é um processo de alta fidelidade que assegura uma transmissão adequada do material genético para as células filhas. Alterações no DNA de células somáticas – desde mutações pontuais, que afetam apenas um par de bases, até grandes deleções ou rearranjos – tendem a aumentar com o tempo e são primariamente responsáveis pelo aumento do risco de câncer (DONEHOWER, 2009; WIJNHOFEN et al., 2007).

O primeiro mecanismo induzível capaz de lidar com os danos no DNA descoberto foi o sistema SOS em *Escherichia coli*. Em *E. coli*, as funções SOS são um sistema regulatório que envolve diversas respostas celulares induzidas pelo tratamento com agentes genotóxicos (AKSENOV, 1999). O regulon SOS é constituído por mais de 20 genes distribuídos por todo o cromossomo da bactéria (FRIEDBERG, 1995). Em condições fisiológicas, a expressão dos genes SOS está bloqueada pela ação do repressor LexA, que reprime os seus genes-alvo pela ligação a um trecho de 20 pb (pares de bases), denominado SOS *box*. Os SOS *boxes* são operadores dos promotores desses genes e, como *lexA* está sujeito também a repressão autógena, possui dois SOS *boxes* adjacentes (MICHEL, 2005).

Muitos agentes genotóxicos são capazes de induzir a resposta SOS, como a radiação UV (ultravioleta), agentes alquilantes, agentes produtores de ligações cruzadas (“*cross-links*”) e até mesmo a privação de timina. Presume-se que o sinal indutor seja regiões de DNA em fita simples geradas na tentativa de replicação de moldes danificados ou pela interrupção da replicação normal. Este sinal ativa a proteína RecA, que também está sob o efeito de LexA. RecA ativada é capaz de promover a auto-clivagem do produto do gene *lexA*, permitindo a desrepressão dos genes que estavam sob o seu controle; quando o sinal indutor cessa, a proteína LexA não é mais clivada, voltando a reprimir novamente a expressão daqueles genes (AKSENOV, 1999).

Embora todas as funções SOS sejam, provavelmente, induzidas por um mecanismo comum, elas não se desreprimem simultaneamente. Essas diferenças na cinética de desrepressão talvez possam ser explicadas por diferentes graus de afinidade do repressor ao operador ao qual ele se fixa. As respostas SOS incluem a recombinação genética (*recA* ou *rwAB*), reparo por excisão (*uvrA*, *uvrB*), inibição da divisão celular (*sulA/sfiA*) e a reparação mutagênica (*umuDC*) (MICHEL, 2005).

Em células de mamíferos, a habilidade das nossas células em responder corretamente às injúrias e manter a integridade do genoma é de fundamental importância para a sua proteção contra

mutações cromossômicas, mutações gênicas, a morte celular e o desenvolvimento de neoplasias. Para manter a integridade genômica e assegurar uma transmissão adequada da informação genética para seus descendentes, a célula é equipada com uma grande variedade de mecanismos de defesas. O conjunto desses mecanismos é denominado “respostas ao dano no DNA” (DDR – “*DNA Damage Response*”) e atuam no sentido de ativação da transcrição gênica, coordenada especialmente por *TP53*, no controle do ciclo celular, através de pontos de checagem (“*checkpoints*”), na indução do reparo do DNA ou na tolerância aos danos e de vias apoptóticas (BARTEK; LUKAS, 2001a, b; LIANG et al., 2009). Esses elementos serão abordados a seguir.

1.2.1 *TP53: O guardião do genoma e suas múltiplas facetas*

Em 1979, a descoberta de P53 como uma proteína capaz de ligar-se ao antígeno T do vírus SV40 e que se encontrava em quantidade aumentada em células tumorais levou os cientistas da época à acreditarem que estavam lidando com uma oncoproteína (DELEO et al., 1979).

Este achado marcou o início de uma era dinâmica na pesquisa do câncer, com grande impacto na clínica. *TP53* foi posteriormente estabelecido como um gene supressor de tumor chave, cuja relevância pode ser ilustrada pelo fato de que aproximadamente 50% dos tumores humanos apresentam mutações neste gene e pelo fato de que o seu *status* pode ter uma forte influência na sensibilidade dos tumores às drogas quimioterápicas e à radioterapia comumente empregadas nas terapias tumorais (FARNEBO; BYKOV; WIMAN, 2010; MEULMEESTER; JOCHEMSEN, 2008; SOUSSI; WIMAN, 2007).

Hoje, *TP53* é considerado um importante marcador tumoral e um potencial alvo terapêutico. A supressão tumoral mediada por *TP53* pode se dar de diferentes formas, dependendo do contexto. Por exemplo, a expressão contínua de oncogenes *in vivo* pode levar células proficientes em *TP53* a passarem de um estado proliferativo a um estado terminal e irreversível denominado “senescência induzida por oncogenes” (LARSSON, 2011). Este mecanismo é capaz de proteger camundongos do desenvolvimento de câncer de próstata e também ocorre em fibroblastos humanos e células epiteliais de mama (ALIMONTI et al., 2010; BARTKOVA et al., 2006; ZEMSKOVA et al., 2005). *TP53* também é capaz de suprimir o desenvolvimento de tumores por iniciar um programa de morte ativa, a apoptose. Seu papel como “guardião do genoma” ainda inclui a coordenação das respostas celulares na presença de agentes genotóxicos, induzindo uma parada no ciclo celular para permitir que a célula tenha tempo de se recuperar das injúrias antes de se dividir e induzindo os programas genéticos que sejam aptos a lidar com os danos – evitando, desta forma, a instabilidade genômica (MEEK, 2009).

Enquanto a perda de *TP53* em células somáticas rende especificamente ao tecido uma susceptibilidade aumentada ao câncer, mutações neste gene em células germinativas- cuja frequência é de apenas 1:5000 indivíduos- podem acarretar em uma prole cujos indivíduos apresentam uma alta probabilidade de desenvolverem diversos tipos de câncer precocemente, ainda na infância. O conjunto das manifestações clínicas desses pacientes foi denominada Síndrome de Li-Fraumeni (SLF), caracterizada geneticamente como uma desordem autossômica dominante. Curiosamente, o espectro de tumores encontrados nesta síndrome familiar difere bastante dos tumores associados com mutações somáticas de *TP53*, tipicamente epiteliais. Os tipos mais comuns em SLF são tumores mais raros, como sarcomas, tumores cerebrais, leucemias e carcinomas da adrenocortical (IWAKUMA; LOZANO; FLORES, 2005; MALKIN, 2011; ROYDS; IACOPEITA, 2006).

TP53 tem outros dois genes homólogos: *P63* e *P73*. Esta família de genes teve mantida suas características estruturais e funcionais conservadas há mais de um bilhão de anos de evolução. Do ponto de vista evolutivo, o gene ancestral desta família pôde ser primeiramente detectado nas anêmonas marinhas. Este gene ancestral é encontrado em quase todos os invertebrados e a primeira duplicação que originou *TP53* e *P63/P73* se deu nos peixes cartilagosos. A partir dos peixes ósseos, no entanto, já é possível encontrar os três genes (BELYI et al., 2009; CASTRO et al., 2008; DOTSCH et al., 2010).

Os genes *TP53*, *P63* e *P73* encontram-se localizados nas regiões cromossômicas 17p13.1, 1p36.32 e 3q28, respectivamente. *P63* e *P73* podem afetar a atividade de *TP53* e também participam na sinalização para a apoptose. Porém, embora compartilhem também uma grande semelhança funcional, até agora se tem poucas evidências de que *P63* e *P73* sejam também supressores tumorais (YANG et al., 2002). Camundongos deficientes nestes genes não apresentam o desenvolvimento precoce de tumores como os animais mutantes em *TP53*, embora apresentem problemas no desenvolvimento, de regeneração tecidual, problemas neurológicos e inflamatórios. (ALLOCATI; DI ILIO; DE LAURENZI, 2012; YANG et al., 1999; YANG et al., 2000).

Em humanos, a proteína *TP53* é um fator de transcrição que contém 393 aminoácidos, 53 KDa, consistindo de cinco domínios estruturais e funcionais (CHO et al., 1994). O *domínio N-terminal ácido* de transativação transcricional é requerido para ativação dos genes induzíveis. O *domínio central* de ligação ao DNA (DBD- “DNA Binding Domain”) facilita a ligação sequência-específica de *TP53* aos elementos responsivos (RE- “Responsive Elements”) a *TP53* no DNA. Neste domínio se encontram mais de 97% das mutações encontradas em humanos. O *domínio de tetramerização* facilita a interação dos monômeros de *TP53* para formar dímeros e a interação entre os dímeros para formar os tetrâmeros. Esta tetramerização é essencial para a habilidade de *TP53* regular positivamente a expressão gênica. Esses três domínios contribuem para a ativação de um

grande número de alvos, incluindo *P21* e proteínas pró-apoptóticas, como *BAX*, *PUMA* e *NOXA* (MIRZAYANS et al., 2012).

Além de induzir a expressão gênica, TP53 também regula negativamente a transcrição de vários genes, incluindo os que codificam para *BCL-2*, *MCL-1* e *SURVIVIN* (supressores da apoptose), além de *MDR-1* (“*Multidrug Resistance*”), que confere um fenótipo multirresistente a drogas. Essa propriedade é associada ao *domínio rico em prolina* localizado entre as regiões dos domínios de transativação e de ligação ao DNA e ocorre indiretamente pela ativação transcricional de proteínas repressoras (AKHTAR et al., 2006; HOFFMAN et al., 2002). Finalmente, o *domínio C-terminal* contém o domínio básico, capaz de interagir com o DNA de uma forma independente da especificidade da sequência (FOORD et al., 1991).

O gene TP53 é composto por 11 exons e 10 introns. Ainda, apresenta duas regiões promotoras, sendo que o segundo promotor localiza-se internamente, no íntron 4. Imprimindo um grau maior de complexidade, doze isoformas da proteína são reconhecidas, obtidas através do uso alternativo do segundo promotor, do *splicing* alternativo e através do uso de um códon alternativo na iniciação da translação (KHOURY; BOURDON, 2010; KHOURY; BOURDON, 2011; MARCEL et al., 2010). Algumas isoformas são ativas para a ligação ao DNA dependente da sequência, portanto aptas para mediar a transativação gênica associada; porém não apresentam a atividade apoptótica mediada pela proteína completa (BOURDON et al., 2005; ROHALY et al., 2005). Assim, por apresentar isoformas com diferentes funções, a expressão de cada uma delas pode resultar em consequências distintas. De fato, as isoformas têm um padrão diferente de expressão entre os diversos tecidos, entre o tumor e o seu tecido normal de origem e entre diferentes tipo tumorais (OKUMURA et al., 2011).

Sob circunstâncias normais, *TP53* selvagem é mantido em concentrações muito baixas na célula e está presente basicamente em sua forma inativa. Em células que estão se proliferando, sua meia vida é limitada a minutos, enquanto na resposta ao estresse pode ser prolongada por horas. Os níveis de *TP53* e sua atividade na célula dependem de fatores intrínsecos e de estímulos extrínsecos. Em condições de estresse, a ativação de *TP53* é governada por uma rede complexa de modificações pós-translacionais, que incluem fosforilação, acetilação, ADP-ribosilação, ubiquitinação e sumoilação. A maior parte dessas modificações ocorrem nas regiões N e C-terminal (REISMAN et al., 2007; OREN; BARTEK, 2007).

A fosforilação e a acetilação são as modificações mais comuns e podem estar correlacionadas. Tanto a fosforilação quanto a acetilação de TP53, além de aumentar a estabilidade proteica e o acúmulo da proteína no núcleo, também aumenta sua afinidade por ligação ao DNA. Muitas quinases têm sido implicadas na fosforilação de TP53 e vários sítios podem ser fosforilado por mais de uma quinase. Por exemplo, a fosforilação na Ser15 é mediada

por ATM/ATR, tanto de forma direta quanto indireta, através de CHK1/CHK2 (BAI; ZHU, 2006; DAS et al., 2008).

A fosforilação do domínio N-terminal induzida por estresse aumenta a estabilidade de TP53 por induzir sua dissociação de seu regulador negativo, MDM2. Por exemplo, a Ser15, Thr18 e Ser20 estão localizadas no sítio de ligação a MDM2 e são fosforiladas em resposta a danos no DNA (LI et al., 2006). Diversas lisinas localizadas na região C-terminal também podem ser acetiladas em resposta ao estresse. Os resíduos acetilados estão em sua maior parte localizados no domínio regulatório, adjacente ao domínio de tetramerização. Duas histonas acetiltransferases (HATs) são capazes de acetilar TP53: p300 e CBP (REISMAN et al. 2012; VOUSDEN; PRIVES, 2009).

Em contrapartida, pouco se sabe sobre as outras formas de modificações translacionais sofridas por TP53. Embora a ubiquitinação seja corriqueiramente utilizada como um marcador proteico para degradação proteossômica, a ubiquitinação da Lys320 de TP53 pela E3 ubiquitina ligase E4F1 compete com a acetilação mediada por CBP e acarreta na ativação de genes ligados à parada no ciclo celular. Outras evidências mostram que a Ser376 e Thr55 são defosforiladas em células expostas a radiação ionizante, indicando que a defosforilação pode contribuir para a ativação de TP53. Da mesma forma, demonstrou-se que a defosforilação de TP53 está associada com o aumento da expressão de P21 juntamente com aumento da atividade da caspase 3 e da indução de apoptose, em células estimuladas com TGF- β (DAS et al., 2008).

Uma gama de mutantes no DBD de TP53, embora não tenham qualquer atividade de transativação, são capazes de induzir a apoptose (HAUPT et al., 1995; KAKUDO et al., 2005). Aliás, curiosamente, a ativação de TP53 é capaz de induzir apoptose mesmo na ausência do núcleo (CHIPUK et al., 2003). De modo contrário, camundongos quiméricos portadores de mutações que não afetam DBD, mas afetam outros domínios, são capazes de induzir senescência, mas incapazes de disparar a apoptose (JOHNSON et al., 2008). Essas evidências apontam para o fato de que o *pool* citoplasmático de TP53 pode induzir apoptose independentemente do mecanismo de transativação.

Estes fatos sugerem um segundo tipo de controle da atividade de TP53: através da sua localização sub-celular. Em células normais (não transformadas), TP53 apresenta uma localização citoplasmática. Com a progressão do ciclo celular, tende a se acumular no núcleo até a fase S, quando retorna ao citoplasma (RYAN et al., 1994; SHAULSKY; BEN-ZE'EV; ROTTER, 1990).

Este tráfego é finamente regulado *via* sinais de importação e exportação nucleares. O domínio regulatório C-terminal contém tanto as sequências do sinal de localização nuclear (NLS- “*Nuclear Localization Signal*”) quanto o sinal de exportação nuclear (NES- “*Nuclear Exportation Signal*”). O NLS é composto basicamente por um cluster de aminoácidos básicos e é iniciado pela

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

