

ÚLOHA UBIKVITIN-PROTEASOMOVÉHO SYSTÉMU V PŘENOSU SIGNÁLU TRANSFORMAČNÍHO RŮSTOVÉHO FAKTORU- β A JEJÍ VÝZNAM PŘI VZNIKU NÁDORŮ

THE ROLE OF UBIQUITIN-PROTEASOME SYSTEM IN TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β SIGNALING AND ITS IMPORTANCE IN TUMORIGENESIS

FUCHS O.

ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVŇÍ TRANSFUZE, PRAHA

Souhrn: Přenos signálu transformačního růstového faktoru- β (TGF- β) a dalších členů této rodiny cytokinů je zprostředkován heteromerním komplexem dvou typů transmembránových receptorů s aktivitou serin/threonin-kinasy na povrchu buňky a jejich vnitrobuněčnými substráty, proteiny Smad. Specifičnost, různost, intenzita a časový průběh přenosu signálu TGF- β jsou určeny aktivací a inaktivací molekul složek signální dráhy zahrnutých v přenosu signálu TGF- β . Tyto klíčové molekuly (receptory pro TGF- β a proteiny Smad) podléhají degradaci v ubikvitin-proteasomovém systému. Inhibitor přenosu signálu TGF- β , proto-onkoprotein SnoN („Ski-related novel gene product“), je také degradován v ubikvitin-proteasomovém systému. Hladina proteinu SnoN je silně zvýšena u karcinomů žaludku, štítné žlázy a plic a u lymfomů. U řady lidských nádorů byla nalezena zvýšená degradace proteinů Smad. Nesmyslné mutace proteinů Smad2 a Smad4 na konservativním argininovém zbytku u kolorektálních karcinomů a u nádorů slinivky břišní zvyšují degradaci proteinů Smad proteasomy. Porucha přenosu signálu TGF- β u nádorových buněk tak může být způsobena neřízenou degradací složek signální dráhy TGF- β v proteasomech a nádorové buňky se tím stávají rezistentní k anti-proliferativnímu účinku TGF- β .

Klíčová slova: transformační růstový faktor-beta (TGF- β), ubikvitin-proteasomový systém, proteiny Smad, Smad ubikvitinligázy Smurf.

Summary: The signaling responses to the transforming growth factor- β (TGF- β) and other members of this cytokine family are mediated by a heteromeric complex of two types of transmembrane serine/threonine kinase receptors at the cell surface and their intracellular substrates, the Smad proteins. The specificity, diversity, intensity, and timing of TGF- β signaling are tightly controlled by activation and inactivation of signal transduction components. These key transducer proteins (TGF- β receptors and Smad proteins) undergo ubiquitin-proteasome-mediated degradation. The inhibitor of TGF- β signaling proto-oncoprotein SnoN (Ski-related novel gene product) is also a substrate for proteasome degradation. It was found that SnoN is amplified in stomach, thyroid and lung carcinoma and lymphoma. The disruption of proper degradation of Smads has been observed in human cancers. Missense mutations of Smad2 and Smad4 at a conserved arginine residue in colorectal and pancreatic cancers increased the turnover rate of Smad proteins via the proteasome pathway. The dysregulated proteasomal degradation is a novel pathway how tumor cells silence TGF- β signaling and thus these cells are resistant to the anti-proliferative activity of TGF- β .

Key words: transforming growth factor-beta (TGF- β), ubiquitin-proteasome system, Smad proteins, Smad ubiquitin ligases Smurf.

Úvod

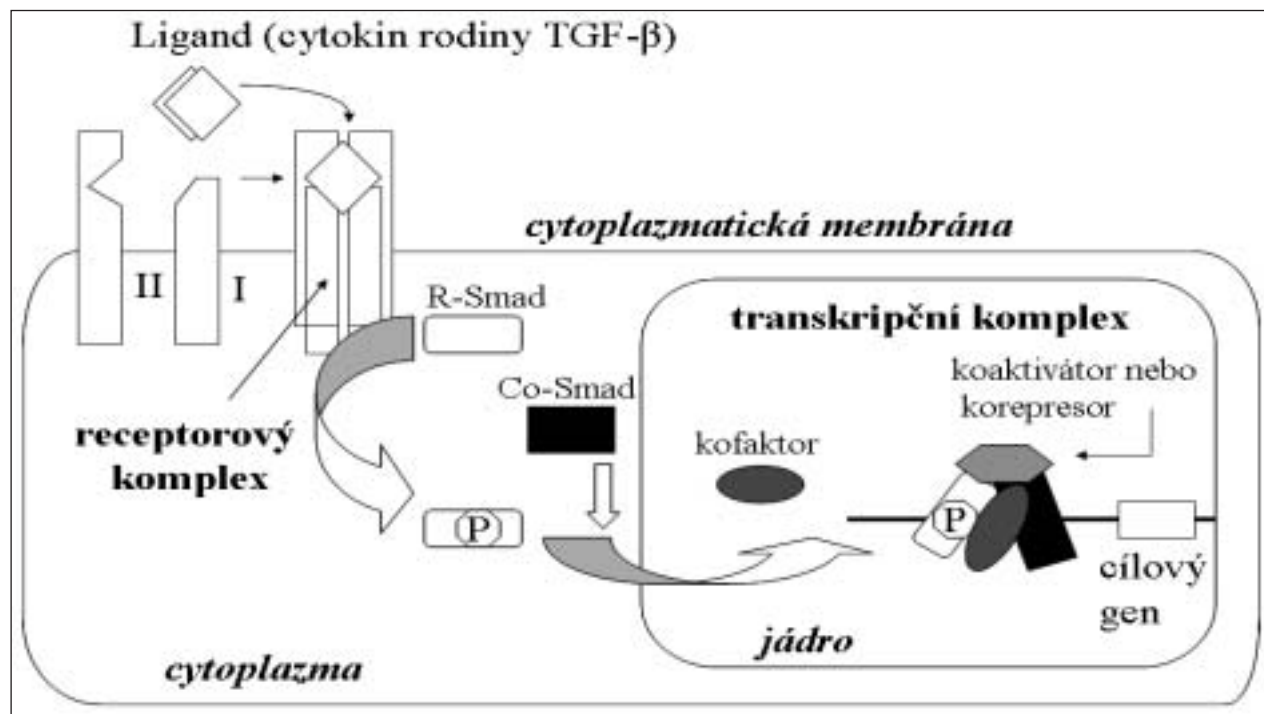
Transformační růstový faktor- β (TGF- β) hraje důležitou úlohu v regulaci proliferace, apoptózy a imunitní odpovědi buněk, v angiogenezi a tvorbě extracelulární matrix (1-6). Tři isomerní formy TGF- β , které jsou kódovány různými geny existují u buněk savců. Signální dráha je pro všechny formy stejná. Poruchy přenosu signálu TGF- β byly nalezeny u řady nemocí včetně nádorů (5,7-11). Působení TGF- β je zprostředkováno heteromerním komplexem receptorů na povrchu

buňky. Komplex se skládá z receptorů II. a I. typu (T β RII a T β RI) a ligandu (TGF- β). T β RII a T β RI jsou proteinkinázy, které fosforylují serinové a threoninové zbytky složek signální dráhy TGF- β při jejich aktivaci (12). Vazba ligandu indukuje tvorbu uvedeného heteromerního komplexu, kde T β RII fosforyluje T β RI v oblasti přilehlé k membráně a obsahující hlavně glycinové a serinové zbytky. Aktivovaný T β RI potom fosforyluje proteiny Smad, označované R-Smad, které jsou řízeny receptory. Vazba proteinů R-Smad na receptory I. typu

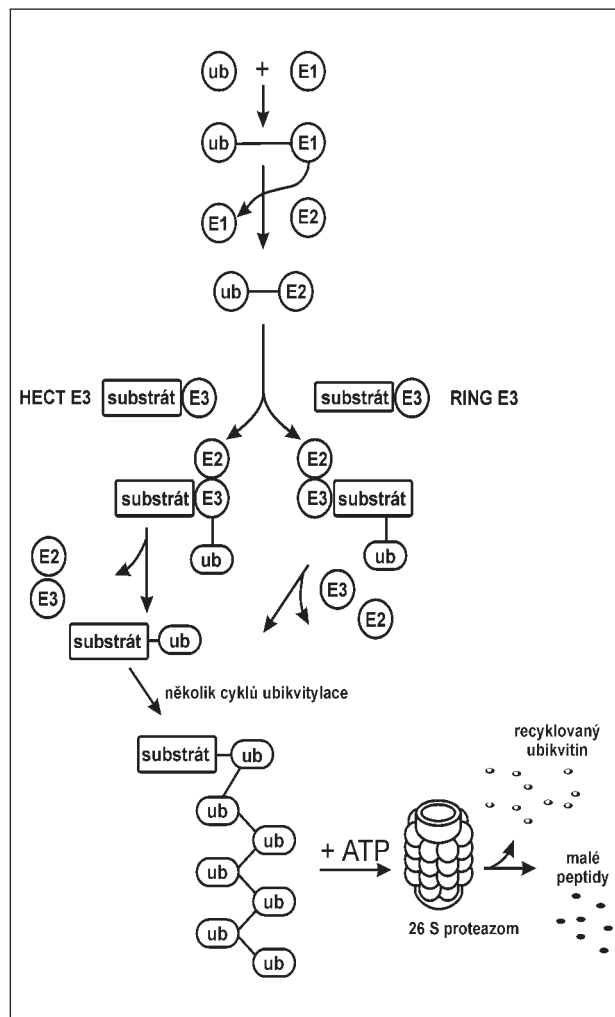
je usnadněna ukotvujícím proteinem SARA („Smad anchor for receptor activation“) (2). Aktivované proteiny R-Smad tvoří heteromerní komplexy se společným proteinem Smad4, který je také označován Co-Smad. Tyto komplexy se hromadí v jádře buněk, kde řídí expresi cílových genů působení TGF- β . Řízení exprese těchto cílových genů závisí na typu buněk, na množství TGF- β a probíhá interakcí s dalšími transkripčními faktory, koaktivátory a korepresory. Vedle proteinů R-Smad a Co-Smad existuje ještě třetí skupina tzv. inhibičních proteinů Smad (Smad6 a Smad7). Protein Smad7 přednostně inhibuje signální dráhu TGF- β a aktivinů (13-15). Smad6 inhibuje signální dráhu kostních morfogenetických proteinů (16,17), které tvoří důležitou skupinu rodiny cytokinů TGF- β a uskutečňují přenos signálu TGF- β přes proteiny Smad1,5 a 8 (R-Smad). Protein Smad7 tvoří stabilní komplexy s aktivovanými T β RI a tím brání fosforylaci proteinů Smad2 a 3 (R-Smad), tvorbě komplexů R-Smad-Smad4 a transportu těchto komplexů do jádra buněk. Smad7 tvoří i komplexy s aktivovanými receptory I. typu pro BMP a inhibuje tak i aktivaci proteinů Smad1,5 a 8 (18). Smad7 také váže E3-ubikvitinligázy Smurf1 („Smad ubiquitination regulatory factor“) a Smurf2 a tím předurčuje aktivované receptory I. typu pro TGF- β i BMP k degradaci proteasomy (18,19). Kromě proteinu Smad7 je degradace v proteasomech regulována i hladina dalšího inhibitoru signální dráhy TGF- β , proto-onkoproteinu SnoN (20,21). Popsaná signální dráha TGF- β , schematicky zobrazená na obr. 1, není jediným možným přenosem signálu TGF- β (4,22-25). TGF- β aktivuje také další signální dráhy, nezávislé na proteinech Smad. Jedná se o signální dráhy proteinokináz MAPK (4,22,23), které jsou aktivovány mitogeny a o signální dráhu GTPázy RhoA (24,25).

Ubikvitin-proteasomový systém je důležitým regulátorem signální dráhy TGF- β . Řada složek signální dráhy TGF- β , které ji stimulují nebo inhibují, je degradována v proteasomech. Poruchy v ubikvitinylaci (používá se i označení ubikvitinace a ubikvitylace) složek signální dráhy TGF- β a v jejich degradaci proteasomy, tedy zvýšená degradace přenašečů signálu TGF- β nebo naopak snížená degradace inhibitorů signální dráhy TGF- β , často vedou k resistenci nádorových buněk na anti-proliferální účinek TGF- β .

Obr.1.: Zjednodušené schema přenosu signálu cytokinů rodiny TGF- β . Bližší popis signální dráhy TGF- β je uveden v textu.



Obr. 2.: Schema ubikvitin-proteasomového systému. Ubikvitinylace a následný rozklad polyubikvitinylovaného proteinu v proteasomech je podrobně popsán v textu.



Ubikvitin a ubikvitinylace

Ubikvitin je malý polypeptid (76 aminokyselinových zbytků), který je přítomen ve všech studovaných eukaryotických buňkách a tkáních. Jeho sekvence je velmi konzervativní a liší se jen ve 3 aminokyselinových zbytcích mezi ubikvitinem buněk kvasinek a člověka. Ubikvitin byl izolován již v roce 1975 skupinou Dr. Goldsteina (26). Ještě v roce 1984 bylo publikováno méně než 100 prací s klíčovým slovem ubikvitin. Výzkum v této oblasti je dnes daleko rozsáhlejší a svědčí o tom asi 1000 publikací s tímto klíčovým slovem v roce 2003.

Ubikvitinylace je post-translační modifikace proteinu, která spočívá v připojení polyubikvitinu k proteinu kovalentní vazbou. Probíhá mechanismem víceúrovňové kaskády, která slouží k označení proteinů pro rozklad v proteasomech (27). Enzym E1, který aktivuje C-konec ubikvitinu za použití ATP, tvoří s ním meziprodukt E1-ubikvitin (obr.2). Cystein v aktivním místě enzymu E1 je přitom vázán thioesterovou vazbou na C-koncový glycin ubikvitinu. Aktivovaný ubikvitin je potom přemístěn z E1 na thiolovou skupinu jednoho z konjugčních enzymů E2 opět za vzniku thioesterové vazby mezi cysteinem v aktivním místě enzymu E2 a C-koncovým glycinem ubikvitinu. Ve třetím stupni se připojí E3-ubikvitinligáza, která specificky rozpozná substrát. C-koncový glycin ubikvitinu je potom kovalentní isopeptidovou vazbou připojen ke druhé aminoskupině vnitřního lyzinového zbytku substrátu. V připojení dalších molekul ubikvitinu hraje úlohu elongační faktor E4 (28). C-koncový glycin každé další molekuly ubikvitinu se váže obvykle na specifický lyzinový zbytek (Lys-48) již před tím navázané molekuly ubikvitinu. Teprve po připojení více molekul ubikvitinu k substrátu dojde k rozpoznání substrátu proteasomem a substrát je degradován.

Zatímco enzym E1, který aktivuje ubikvitin, je jeden a konjugčních enzymů E2 je více než 40, E3-ubikvitinligázy jsou velmi početnou heterogenní skupinou proteinů (přes 500 proteinů), která umožňuje specificky označit polyubikvitinem velké množství různých proteinů. Pro značnou část substrátů určených k degradaci v proteasomech zatím neznáme rozpoznávací znaky pro enzymy E2 a E3 a degradaci proteasomy. Při tomto mechanismu rozpoznání může dojít k regulaci aktivity uvedených enzymů E2 a E3, ale také i k enzymatické modifikaci substrátu (27).

E3-ubikvitinligázy se dělí na tři skupiny podle struktury a rozpoznání substrátu. První skupina se řídí tak zvaným N-koncovým pravidlem, které platí pro degradaci proteinů s krátkou životností, které obsahují destabilizující N-koncové basické a hydrofobní aminokyseliny typu I (arginin, lysin, histidin) nebo typu II (fenylalanin, tryptofan, leucin, isoleucin, tyrosin). Tato N-koncová sekvence, často nazývaná destrukční box nebo degraon, je signálem pro ubikvitinylacii a následnou degradaci v proteasomech (29,30). Další skupiny E3-ubikvitinligáz představují HECT („homologous to the E6-AP COOH terminus“) (31,32) a RING („really interesting new gene“) E3-ubikvitinligázy (33). E6-AP je ubikvitinligáza, protein asociovaný k virovému proteinu E6 lidských papiloma virů, který se podílí na ubikvitinylacii a následné degradaci proteinu p53 v proteasomech (31). Cysteinový zbytek blízko COOH konce E6-AP je důležitý pro tvorbu thioesterové vazby s ubikvitinem jako u enzymů E1 a E2 a hraje podstatnou úlohu i v ubikvitinylacii substrátů. Ubikvitin je přemístěn z konjugčního enzymu E2 k cysteinu E3-ubikvitinligáz skupiny HECT před vazbou na substrát (obr.2). Aktivovaný ubikvitin se přímo váže z konjugčního enzymu E2 na substrát vázaný k E3-ubikvitinligáze skupiny RING (obr.2). E3-ubikvitinligázy skupiny RING obsahují charakteristickou oblast C3H2C3 nebo C3HC4, kde cysteinové (C) a histidinové (H) zbytky váží dva zinkové atomy na molekulu ligázy.

E3-ubikvitinligázy, které se podílejí na označení proteinů Smad, určených k degradaci v proteasomech, náleží do podskupiny HECT a byly pojmenovány Smurf („Smad ubiquitination regulatory factor“).

Objev mechanismu označení proteinů polyubikvitinem (27,34-37) pro rozklad v proteasomech byl v roce 2004 odměněn Švédskou královskou akademií Nobelovou cenou za chemii. Aaron Ciechanover a Avram Hershko z Izraele a Irwin Rose z USA získali tuto cenu, protože jimi popsany mechanismus bude jistě využit k výrobě léků proti mnohým onemocněním a to nejen nádorovým.

E3-ubikvitinligázy Smurf, NEDD4-2 a WWP1 a jejich úloha v degradaci proteinů Smad, receptorů typu I pro TGF-β a BMP, GTPázy RhoA a proto-onkoproteinu SnO

Smurf1 se podílí na specifické ubikvitinylacii proteinů Smad1 a Smad5, které přenášejí signál kostních morfogenetických proteinů (BMP). Konzervativní cysteinový zbytek blízko COOH konce oblasti HECT této E3-ubikvitinligázy tvoří thioesterovou vazbu s ubikvitinem. Ubikvitin je přenesen k uvedenému konzervativnímu cysteinovému zbytku z příslušného konjugčního enzymu E2. E3-ubikvitinligáza-ubikvitin thioester je potom donorem ubikvitinu pro tvorbu amidové vazby se substrátem (Smad1 nebo Smad5). E3-ubikvitinligázy typu HECT obsahují kromě oblasti HECT na C-konci dále doménu WW (38-40) uprostřed a doménu C2 na N-konci. Doména C2 váže fosfolipid v závislosti na iontech Ca^{2+} a tato doména byla poprvé popsána u protein-kinázy C, jako oblast vážící Ca^{2+} . Doména se nachází v řadě proteinů, které účinkují v buněčné signalizaci. Doména WW o velikosti 38-40 aminokyselinových zbytků obsahuje dva charakteristické tryptofanové zbytky (W), podle kterých byla pojmenována. Tyto tryptofanové zbytky jsou odděleny 20-22 aminokyselinami (38-40). Doména WW neobsahuje žádné disulfidické můstky a tvoří trojřetězcovou strukturu antiparalelního β-listu. Doména WW interaguje přednostně s krátkými sekvencemi, bohatými na prolinové zbytky. Doména WW proteinu Smurf1 interaguje specificky s proteiny Smad1 a Smad5 a ne s proteiny Smad2 a Smad3. Sekvence bohatá na prolin (motiv PPXY) v oblasti linkeru molekul Smad hraje úlohu v interakci se Smurf1. Účinek Smurf1 není závislý na indukci pomocí BMP (41). Smurf1 reguluje přenos signálu BMP nejen přes degradaci proteinů Smad1 a Smad5. Smurf1 interaguje také s inhibitory přenosu signálu TGF-β a BMP, proteiny Smad6 a Smad7 a přes tyto proteiny i s receptory I. typu pro TGF-β i BMP a způsobí jejich ubikvitinylacii a následnou degradaci v proteasomech (42,43). E3-ubikvitinligáza Smurf1 je schopna interagovat s membránou přes svou C2 doménu a tím naopak transportovat Smad7 k plazmatické membráně (44).

Smurf1 účinkuje také v ubikvitinylacii guanosintrifosfatázy (GTPázy) RhoA (45,47). RhoA hraje úlohu v přenosu signálu TGF-β, nezávislém na proteinech Smad (24,25). Intenzita této dráhy přenosu signálu TGF-β závisí na typu buněk (24,25). Cílené vyřazení genu pro Smurf 1 u myši neovlivnilo signální dráhu TGF-β a BMP (47). Vedlo však k akumulaci fosforylované MAPKK kinasy MEKK2 a aktivaci kaskády JNK (c-Jun N-koncové kinasy) a ovlivnilo vývoj a homeostázu kostí (47). Vyřazení genů pro Smurf 1 i Smurf2 bylo však pro embrya myši letální a ukazuje na přinejmenším částečně zastupitelnou funkci Smurf1 prostřednictvím Smurf2 (47).

Smurf2 také náleží do E3-ubikvitinligáz podskupiny HECT, obsahuje doménu WW a interaguje s proteiny R-Smad aktivovanými fosforylačními receptory, ale ne s proteinem Co-Smad (Smad4). Smurf2 má největší afinitu ke Smad1 a Smad2 (48-50), ale interaguje i se Smad3 (47,48) a možná i s ostatními R-Smad (Smad5 a 8). Smurf2 se také váže ke Smad7 a to nezávisle na přenosu signálu TGF-β (19). Smad7 pomocí své C-koncové domény (51) zprostředkuje vazbu Smurf2 k receptorům I. typu pro TGF-β a BMP a následuje rozklad komplexu těchto receptorů se Smad7 v proteasomech (19). Smad7 je tedy adaptorovým proteinem pro ubikvitinylacii receptorů I. typu pro TGF-β a BMP. Stabilita Smad7 je určena mírou acetylace jeho lysinových zbytků 64 a 70. Stejně lysinové zbytky jsou

cílem ubikvitinylace a následné degradace v proteasomech (52,53).

Interakce Smurf2 a Smad2 je závislá na fosforylaci Smad2 v C-koncovém motivu SSXS, tedy na aktivaci Smad2 (48). Motiv bohatý na prolinové zbytky v oblasti linkeru proteinu Smad2 je pravděpodobně maskován v nefosforylovaném stavu a je nepřístupný pro interakci s doménou WW E3-ubikvitinligázy Smurf2. Řada jaderných proteinů interagujících s proteiny R-Smad může jednak ovlivňovat afinitu Smurf2 k R-Smad, ale může být i tím předurčena k degradaci v proteasomech. Jedním z těchto proteinů je SnoN („Ski-related novel gene product“). Smad2 působí jako adaptor závislý na TGF-β pro Smurf2 k ubikvitinylaci SnoN (50). O proto-onkoproteinu SnoN pojednáme v samostatném odstavci níže.

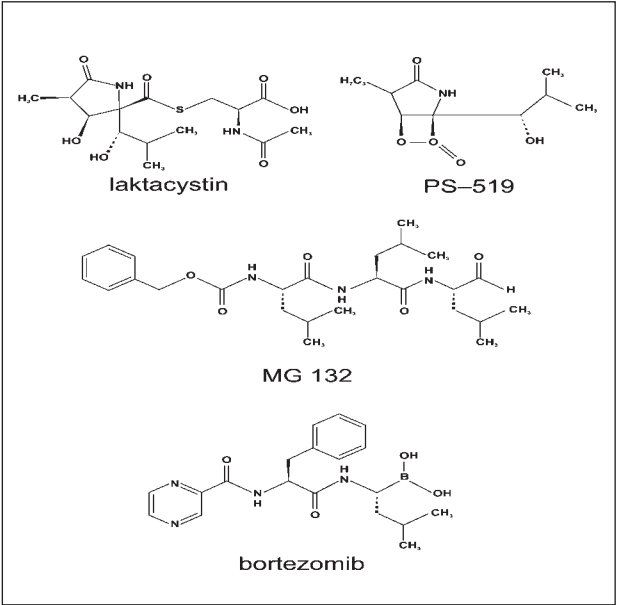
E3-ubikvitinligázy NEDD4-2 („neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2“) a WWP1 se podobají E3-ubikvitinligázám Smurf a obsahují stejné domény (54,55). Podílejí se obdobně jako E3-ubikvitinligázy Smurf na ubikvitinylaci Smad2 a jeho degradaci v proteasomech a přes tvorbu ternárního komplexu obsahujícího Smad4, inhibiční Smad7 a E3-ubikvitinligázu i na ubikvitinylaci Smad4 a jeho následné degradaci v proteasomech. Inhibiční Smad7 zde hraje úlohu adaptéru interakce Smad4 s E3-ubikvitinligázou (54). Smad7 slouží podobně i jako adaptor pro ubikvitinylaci receptorů I. typu pro TGF-β pomocí E3-ubikvitinligázy NEDD4-2 a jejich degradaci v proteasomech (55).

E3-ubikvitinligázy jiných typů, které se podílí na ubikvitinylaci proteinů Smad a proto-onkoproteinu SnoN

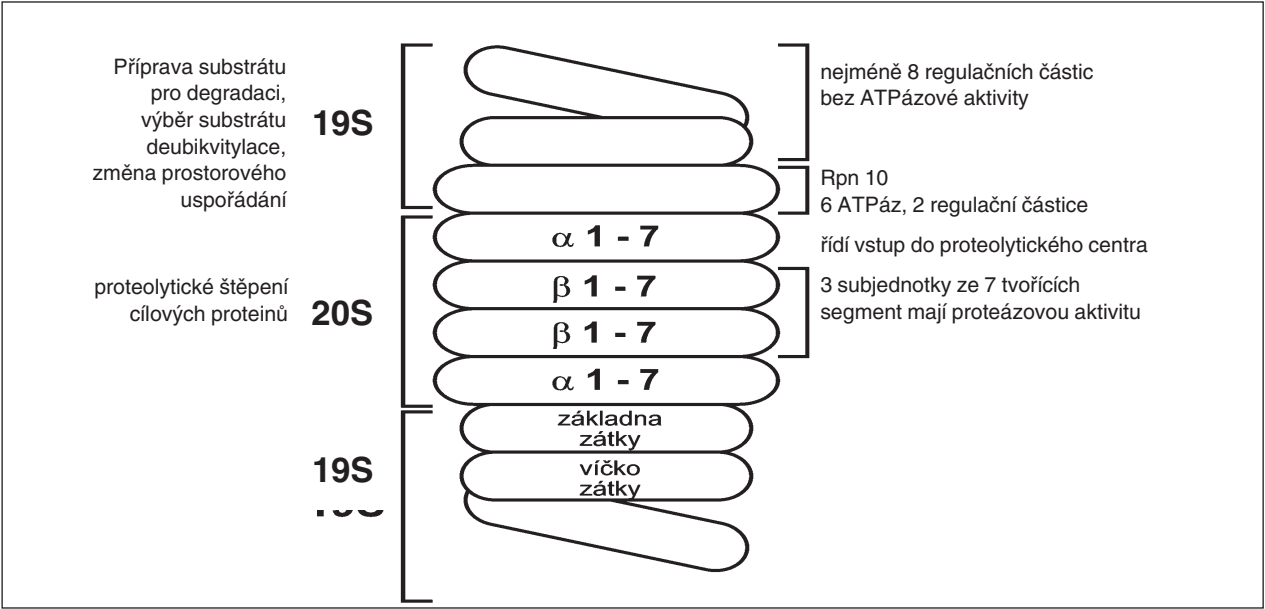
E3-ubikvitinligázový komplex ROC1-SCF^F, který se podílí na ubikvitinylaci Smad3, náleží do skupiny RING E3-ubikvitinligáz (56). Protein ROC1 (také označovaný Rbx1 nebo Hrt1) váže cullin1, který je složkou komplexu SCF. Dalšími proteiny v komplexu jsou Skp1 a Fbw1a (často označován jako βTrCP1), který je důležitý pro specifické působení E3-ubikvitinligáz tohoto typu (56). Interakci této E3-ubikvitinligázy s jadernou aktivovanou formou Smad3 napomáhá přítomnost koaktivátoru transkripce, proteinu p300. Smad3 je s komplexem E3-ubikvitinligázy přenesen z jádra do cytoplazmy a degradován v proteasomech (56). Podobné komplexy E3-ubikvitinligázy typu RING jsou součástí komplexu APC podporujícího anafázi a hrají důležitou úlohu v mitoze neboli jaderném dělení. Během anafáze se obě sesterské chromatidy od sebe synchronizovaně oddělují a jsou taženy mitotickým vře-

ténkem k opačným pólům buňky. Stroschein et al. (57) popsal ubikvitinylaci proto-onkoproteinu SnoN právě komplexem APC a Smad3 účinkoval při této ubikvitinylaci jako adaptorový protein. Na ubikvitinylaci se podílel UbcH5 jako konjugacíční enzym E2. UbcH5 hraje ale úlohu v ubikvitinylaci za účasti RING i HECT E3-ubikvitinligáz (57). E3-ubikvitinligázové komplexy Jab1, SCF^{β-TrCP1} nebo CHIP mají podíl na ubikvitinylaci proteinu Smad4 a jeho následné degradaci v proteasomech (58-61). Jab1 (také označená jako CNS5) je složka signalisomového komplexu COP9, který obsahuje 8 podjednotek s homologií k regulačním podjednotkám proteasomu. Jab1 byl poprvé nalezen jako koaktivátor transkripce genu pro c-Jun. Jab1 se podílí také na degradaci Smad7 (62). CHIP („carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein“) se podílí na funkci chaperonu Hsc70 a je zároveň E3-ubikvitinligázou s U-boxem (61). Tato E3-ubikvitinligáza náleží do skupiny RING, ale postrádá konservativní cysteiny a histidiny, které váží atomy zinku. CHIP interaguje se Smad1 a Smad4, podílí se na jejich ubikvitinylaci a degradaci proteasomy (61).

Obr.4.: Struktura vybraných inhibitorů proteasomů.



Obr.3.: Schema složení proteasomu a popis funkcí jeho podjednotek.



Sumoylace

V letech 1996-1997 byla objevena skupina polypeptidů podobných ubikvitinu, která byla pojmenována SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier) (63,64). Mechanismus post- translační modifikace cílových proteinů sumoylací se podobá ubikvitinylaci (65-68). Enzymy, které účinkují v sumoylaci a odstranění SUMO jsou však jiné než při ubikvitinylaci a deubikvitinylaci. Sumoylace často probíhá na stejném lyzinovém zbytku substrátu jako ubikvitinylace a proto ji inhibuje. Cílem sumoylace jsou proteiny hrající důležitou úlohu v přenosu signálu, transkripci, změně struktury chromatinu, opravě DNA, mitóze, virové infekci a dopravě makromolekul (RNA a proteinů) mezi cytoplazmou a jádrem buňky (65-68).

Sumoylace na rozdíl od ubikvitinylace neoznačuje proteiny pro degradaci v proteasomech, ale reguluje interakce protein-protein, lokalizaci v různých podstrukturách jader, např. v jaderných tělískách („nuclear bodies“), interakci protein-DNA, enzymatickou aktivitu a jak již bylo zmíněno často inhibuje ubikvitinylaci. Skupina SUMO E3-ligáz PIAS („protein inhibitor of activated STAT“), inhibitorů aktivovaných přenašečů signálů a aktivátorů transkripce STAT („signal transducers and activators of transcription“), interaguje se Smad4 a katalyzuje sumoylaci Smad4 (69-72). Sumoylace Smad4 zvyšuje jeho stabilitu a v některých případech i aktivitu koaktivátoru v regulaci transkripce (69-71). Naopak v jiných případech sumoylace Smad4 snížila jeho aktivitu koaktivátoru v regulaci transkripce (72,73). Je pravděpodobné, že sumoylace Smad4 ovlivnila transkripci různých genů různým způsobem podle druhu analyzovaného promotoru. PIAS se také podílí na sumoylaci Smad3 i když zatím neznáme následky této post-translační modifikace (74).

Deubikvitinylace

Kromě ubikvitinylací enzymů se v buňkách eukaryont nachází i značný počet (asi 80) deubikvitinylací enzymů (75). Pomocí studia interakcí protein-protein v dvouhybridním kvasinkovém systému byl identifikován deubikvitinylací enzym Uch37 jako partner proteinů Smad s největší afinitou k inhibičnímu Smad7. Další studium významu tohoto deubikvitinylací enzymu v přenosu signálu rodiny cytokinů TGF-β jistě přinese nové poznatky o regulaci této signální dráhy.

Proteasomy

Proteasom je komplexní bílkovinná částice o sedimentační konstantě 26S a hmotnosti přibližně 2,5 MDa. Proteasomy se nacházejí v cytoplazmě i jádře všech eukaryotických buněk (76). Proteasomy se skládají ze dvou funkčních komplexů proteinů (obr.3). První část nese katalytickou aktivitu a má tvar sudu délky 15 nm a průměru 11 nm. Má sedimentační konstantu 20S a skládá se ze čtyř segmentů. Dva vnitřní segmenty jsou složeny ze sedmi různých β-podjednotek a dva vnější segmenty ze sedmi různých α-podjednotek.

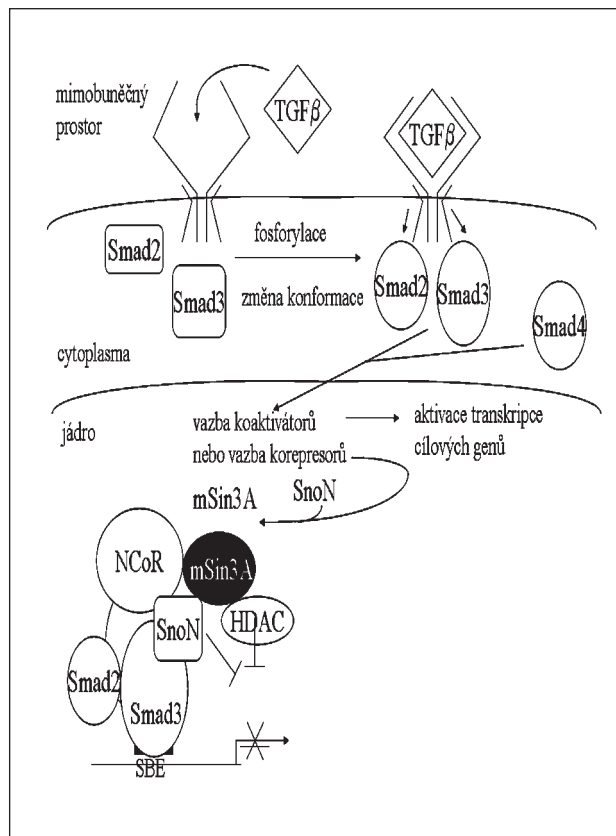
Tři ze sedmi β-podjednotek mají proteolytickou aktivitu podobnou trypsinu, chymotrypsinu a peptidylglutamyl-peptidohydroláze (77-79). Tělo sudu je z obou stran zazátkováno komplexem proteinů o sedimentační konstantě 19 S. Tyto komplexy jsou nezbytné pro správnou degradaci proteinů s navázaným polyubikvitinem. Rozpoznávají a vážou tyto proteiny určené k degradaci a vtahují je dovnitř dutiny proteasomu, kde se nachází katalytická místa s proteázovou aktivitou. Regulační podjednotky o sedimentační konstantě 19 S zařídí rozbalení proteinů určených k degradaci, odštěpení řetězců ubikvitinu a otevření obou segmentů α-podjednotek 20 S proteasomu.

Inhibitory proteasomů

Úloha proteasomů v růstu buněk a apoptóze nabízí atraktivní cíl pro protinádorovou terapii. Různé inhibitory proteasomů byly zkoušeny *in vitro* a *in vivo* v modelových pokusech. Inhibitory proteasomů jsou různé skupiny sloučenin přírodního charakteru (např. laktacystin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glukóza, (-)-epigal-

loylkatechin-3-gallát, eponemycin, epoxymycin a další) nebo syntetické aldehydy peptidů (např. N-benzyloxykarbonyl-leucyl-leucyl-leucinal /MG132/, N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal /ALLN/, N-acetyl-leucyl-leucyl-normethional /ALLM/ a další), vinylsulfontriptyd (4-hydroxy-5-jodo-3-nitrofenylacetyl-leucyl-leucyl-leucinvinylsulfon), dipeptidyl derivát boronové kyseliny (např. bortezomib, nazývaný též Velcade, původně PS-341). Pokusně jsou zkoušeny i další deriváty odvozené od těchto inhibitorů. Jedná se o MG262, který je obdobou MG132, ale obsahuje místo aldehydové skupiny boronát a klasto-laktacystin-β-lakton, který je aktivní složkou vzniklou z laktacystinu a jeho derivát, který nese v poloze C-7 n-propyl místo methylové skupiny (PS-519, také známý jako MLN 519). Struktura některých z těchto inhibitorů proteasomů je ukázána na obr.4. Nízká specifita a velmi rychlý obrát většiny těchto látek neumožňují jejich klinické použití. Do klinického zkoušení se dostaly jen dva inhibitory proteasomů a to bortezomib, patentovaný a vyráběný firmou Millenium Pharmaceuticals pod označením VELCADE™ a společně vyvinutý s Dana-Farber Cancer Institute v Bostonu, u řady nádorových onemocnění, především mnohočetného myelomu (80-82) a PS-519, který společně vyvinuly firmy Millenium Pharmaceuticals Inc. a PAION GmbH, k léčbě ischemie u cévních mozkových příhod (83). Řada z těchto inhibitorů proteasomů byla pokusně použita při studiu vlivu degradace v proteasomech na přenos signálu cytokinů rodiny TGF-β.

Obr.5: Účast proteinu SnoN v korepresorovém komplexu s transkripčními faktory Smad při inhibici transkripce cílových proteinů signální dráhy TGF-β.



Ubikvitinylace a degradace onkogenních mutant proteinů Smad

Ubikvitin-proteasomový systém udržuje nízkou základní hladinu složek signální dráhy cytokinů rodiny TGF-β. Má schopnost i vypnout signální dráhu degradací aktivovaných receptorů a proteinů R-Smad po docílení potřebné transkripční odpovědi. Je také zahrnut v degradaci neaktivních

mutant Smad4 u řady lidských nádorů, zejména u nádorů slinivky břišní, kolorektálních karcinomů a plicních karcinomů a v menší míře u nádorů mléčné žlázy, vaječníků, prostaty, krku, jícnu a žaludku a mutant Smad2 u kolorektálních a plicních karcinomů (5,8,58,84-86). Některé z těchto onkogenních mutací v proteinech Smad4 a Smad2 nebrání jejich aktivaci, tedy fosforylaci v uvedené sekvenci Ser-Ser-X-Ser v C-koncové oblasti proteinu Smad2, oligomerizaci a translokaci do jádra, kde se účastní regulace transkripce (87-89). Smysl měnící mutace v N-koncové blasti MH1 proteinu Smad4 (L43S, G65V, R100T a P130S) vedou ke zvýšené ubiquitinylaci a degradaci v proteasomech onkogenních Smad4 ve srovnání se Smad4 divokého typu (87-89). Podobně záměna argininu za cystein v poloze 133 v oblasti MH1 proteinu Smad2 znamenala zvýšenou ubiquitinylaci a degradaci proteinu onkogenního Smad2 ve srovnání se Smad2 divokého typu (88). Smysl genetického kódu měnící mutace v poloze 515 v doméně MH2 proteinu Smad4, která způsobila záměnu argininu za stop-kodon a tím zkrácený protein Smad4 o 38 aminokyselin u adenokarcinomů slinivky břišní, měla za výsledek zvýšenou ubiquitinylaci a degradaci zkráceného proteinu Smad4 v proteasomech (90). Navíc tato mutace zabránila asociaci zkráceného Smad4 se Smad2 a translokaci do jádra, tedy vazbu k DNA (90). Mutace, měnící smysl genetického kódu, v poloze 407 v doméně MH2 proteinu Smad2 u karcinomu jater, znamenající záměnu glutaminu za arginin a mutace v poloze 369 Smad2 u kolorektálního karcinomu vedoucí k záměně glutaminu za arginin činí Smad2 nestabilní a v prvním případě mutace Q407R způsobila rychlou ubiquitinylaci a degradaci mutovaného Smad2 v proteasomech (91,92). Tato zjištění naznačují, že část onkogenních mutací proteinů Smad4 a Smad2 vede k jejich rychlé ubiquitinylaci a degradaci v proteasomech. Výsledkem je porucha v přenosu signálu TGF- β , deregulace proliferace buněk a podpora tvorby nádoru.

E3-ubikvitinligázy řídí umístění, aktivitu a stabilitu přenašečů signálu TGF- β , zejména Smad2 a T β RI. Jak jsme uvedli výše, Smurf2 interaguje se Smad7, který slouží jako adaptor pro interakci Smurf2 s T β RI, pro ubiquitinylaci T β RI a pro degradaci T β RI v proteasomech (19). Vysoká hladina exprese Smurf2 byla nalezena u karcinomů jícnu vzorků z 80 pacientů a znamenala invazi nádoru, metastáze do lymfatické tkáně a špatnou prognózu pro pacienty s tímto onemocněním (93). Vysoká hladina Smurf2 znamenala i zvýšenou degradaci Smad2 a tedy sníženou hladinu Smad2 u uvedených pacientů a celkovou poruchu přenosu signálu TGF- β (93).

TGF- β funguje jako supresor nádoru v časných fázích tvorby nádoru a naopak podporuje pozdní stadium nádoru a vznik metastáz (5,8,84,86,94,95). V pozdním stadiu nádoru TGF- β neinhibuje růst buněk a indukuje transdiferenciaci epitheliálních buněk na mesenchymální a tím invazi nádoru a zvýšení metastáz. Snížení hladiny Smurf2 a tím současně zvýšení intenzity přenosu signálu TGF- β může u pozdního stadia nádoru naopak podporovat jeho metastáze. Ubikvitinligáza RNF11, protein typu RING, má zvýšenou expresi u invazivních nádorů mléčné žlázy (96). RNF11 interaguje se Smurf2 a zřejmě ji ubiquitinyluje a předurčí k degradaci v proteasomech a tím zesílí přenos signálu TGF- β u těchto invazivních nádorů mléčné žlázy (96).

Protoonkoprotein SnoN

Struktura proto-onkoprotein SnoN („Ski-related novel gene product“) je podobná struktuře proto-onkoproteinu Ski. Ski byl poprvé popsán jako onkoprotein v-Ski ptačího Sloan-Kettering retroviru, který vyvolal onkogenní transformaci kuřecích embryonálních buněk (97). Proto-onkoprotein SnoN je jaderný protein, který obsahuje 728 aminokyselin. N-koncová část obsahuje oblast 270 aminokyselin, která je shodná u všech čtyř savčích forem Sno. Tyto formy proteinu Sno (c-

SnoN, SnoN2, SnoA a SnoI) vznikají alternativním sestřihem odpovídající pre-mRNA. Uvedená oblast 270 aminokyselin je konzervativně zachována i u proteinů c-Ski a v-Ski. C-konec se liší u jednotlivých členů této rodiny proteinů. Exprese Ski a SnoN je nízká a je zvýšena jen v jistých fázích embryonálního vývoje a u některých nádorových buněk (98). Gen pro Sno leží na chromosomu 3q26, tedy v onkogenním lokusu, který je často amplifikován u lidských nádorů (99). Zvýšená exprese SnoN je špatným prognostickým faktorem u karcinomů mléčné žlázy pozitivních na receptor pro estrogen (100). Vedle exprese tu hraje úlohu i lokalizace SnoN, tedy rozdělení mezi jádro a cytoplazmu (100). Exprese SnoN je kontrolována na úrovni stability proteinu SnoN samotným TGF- β (101). Ihned po stimulaci pomocí TGF- β je SnoN degradován (20,21) a to umožní akumulaci Smad3 a Smad2 v jádře a jejich fungování jako transkripční faktory při řízení transkripce cílových genů působení TGF- β . TGF- β také naopak stimuluje expresi genu pro SnoN a tím zvyšuje hladinu mRNA pro SnoN. Umožňuje tím vypnout signální dráhu TGF- β .

SnoN je represorem transkripce cílových genů působení TGF- β prostřednictvím transkripčních faktorů Smad2 a Smad3 (98,102). SnoN tvoří komplex s těmito proteiny Smad a se Smad4. V tomto komplexu, který se váže na DNA, jsou dále přítomny jaderný korepresor N-CoR, mSin3A a histondeacetyláza (HDAC). Tento komplex nahradí komplex Smad2/3 a Smad4 s transkripčním koaktivátorem p300/CBP s aktivitou histonacetylázy a změní tak původně indukci transkripce cílových genů působení TGF- β na represi transkripce těchto genů (obr.5). SnoN neinhiboval transkripci cílových genů působení TGF- β v epitheliálních buňkách plic křečka na rozdíl od linií HaCaT (lidská linie keratinocytů) a HeLa buněk (101). Zdá se tedy, že účinkování SnoN je závislé i na typu buněk (103). Tento předpoklad posiluje i další zjištění, že SnoN +/- myši vyvinou lymfomy v daleko menší frekvenci než normální SnoN+/+ myši (104). SnoN zde působí jako nádorový supresor, zatímco v převážné většině případů působí jako stimulant tvorby nádoru. Má tedy onkogenní nebo antionkogenní účinky podobně jako TGF- β .

Závěr

Ubikvitin-proteasomový systém ovlivňuje přenos signálu cytočinů rodiny TGF- β a důkladnější poznání jeho úlohy v této signální dráze umožní i využití v terapii nádorových onemocnění. Inhibitor proteasomů bortezomib by mohl zvýšit hladinu receptorů a proteinů Smad v případech jejich zvýšeného rozkladu např. při neobvykle vysoké expresi E3-ubikvitinligáz, účastnicích se na jejich ubiquitinylaci, tedy označení pro rozklad v proteasomech. V těchto případech by bylo možno i zablokovat expresi specifických E3-ubikvitinligáz pomocí metody RNA interference (105,106). Dostat malou interferující RNA (siRNA) v dostatečném množství a s dostatečnou účinností specificky do nádorové tkáně však zatím zůstává dosti podstatným problémem.

Naopak v některých případech karcinomů se setkáváme s poruchou ubikvitin-proteasomového systému, např. u karcinomu jícnu (107). Rezistence nádorových buněk na anti-proliferální účinek TGF- β je zde způsobena neschopností TGF- β indukovat rozklad proto-onkoproteinu SnoN (107). Podobný příkladem zvýšení hladiny proto-onkoproteinu SnoN v invazivních karcinomech mléčné žlázy je snížená exprese E3-ubikvitinligázy typu RING, která je součástí komplexu APC podporujícího anafázi a podílí se na ubiquitinylaci SnoN pro jeho degradaci v proteasomech (108). Pokud jsou proteasomy funkční a defekt je jen v ubiquitinylaci, lze použít u některých typů buněk inhibitor syntézy proteinu anisomycin. Anisomycin snižuje hladinu SnoN degradací v proteasomech, která je nezávislá na ubiquitinylaci, aktivaci MAPK, inhibici syntézy proteinu a aktivaci proteinů Smad (109).

Poděkování

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NC/7605-3.

Literatura:

- Piek E, Roberts AB. Suppressor and oncogenic roles of transforming growth factor- β and its signaling pathways in tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 2001; 83: 1-54.
- Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700.
- Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF- β signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci* 2003; 94: 230-234.
- Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-584.
- Fuchs O. Úloha signální dráhy indukované transformačním růstovým faktorem beta při vzniku nádorů. *Klin onkologie* 2002; 15: 7-16.
- Fuchs O, Kubrová O. Signální dráha indukovaná cytokiny rodiny transformačního růstového faktoru beta (TGF β). *Biol listy* 2002; 67: 1-39.
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342: 1350-1358.
- deCaestecker MP, Piek E, Roberts AB. Role of transforming growth factor- β signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1388-1402.
- Kim IY, Kim MM, Kim S-J. Transforming growth factor- β : biology and clinical relevance. *J Biochem Mol Biol* 2005; 38: 1-8.
- Grady WM. Transforming growth factor- β , Smads, and cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3151-3154.
- Danielpour D. Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF- β) in the prostate. *Eur J Cancer* 2005; 41:846-857.
- ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF- β -Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 265-273.
- Whitman M. Feedback from inhibitory SMADs. *Nature* 1997; 389: 549-551.
- Hayashi H, Abdollah S, Qiu J et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signalling. *Cell* 1997; 89: 1165-1173.
- Nakao A, Afrakhte A, Moren T et al. Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature* 1997; 389: 631-635.
- Imamura T, Takase M, Nishihara A et al. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 1997; 389: 622-626.
- Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 1998; 12: 186-197.
- Hanyu AY, Ishidou T, Ebisawa T et al. The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor- β signaling. *J Cell Biol* 2001; 155: 1017-1027.
- Kavak P, Rasmussen RK, Causing CG et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF β receptor for degradation. *Mol Cell* 2000; 6: 1365-1375.
- Sun Y, Liu X Ng-Eaton E et al. SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor β signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12442-12447.
- Wan Y, Liu X, Kirschner MW. The anaphase-promoting complex mediates TGF-beta signaling by targeting SnoN for destruction. *Mol Cell* 2001; 8: 1027-1039.
- Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor- β -mediated transcription. *J Biol Chem* 1999; 274: 37413-37420.
- Yu L, Hebert MC, Zhang YE. TGF- β receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- β responses. *EMBO J* 2002; 21: 3749-3759.
- Denicourt C, Dowdy SF. Another twist in the transforming growth factor β -induced cell-cycle arrest chronicle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15290-15291.
- Bhowmick NA, Ghiassi M, Aakre M. et al. TGF- β -induced RhoA and p160ROCK activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15548-15553.
- Goldstein G, Scheid M, Hammerling U et al. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 11-15.
- Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; 82: 373-428.
- Hoppe T. Multiubiquitylation by E4 enzymes: „one size“ doesn't fit all. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 183-187.
- Bartel B, Wüning I, Varshavsky A. The recognition component of the N-end rule pathway. *EMBO J* 1990; 9: 3179-3189.
- Varshavsky A, Turner G, Du F, Xie Y. The ubiquitin system and the N-end rule pathway. *Biol Chem* 2000; 381: 779-789.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2563-2567.
- Kumar S, Kao WH, Howley PM. Physical interaction between specific E2 and Hect E3 enzymes determines functional cooperativity. *J Biol Chem* 1997; 272: 13548-13554.
- Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 9-20.
- Hershko A, Ciechanover A, Heller H et al. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of proteins with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 1783-1786.
- Hershko A, Heller H, Elias S et al.: Components of ubiquitin-protein ligase system. *J Biol Chem* 1983; 258: 8206-8214.
- Hershko A, Heller H, Eytan E et al. ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1619-1623.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425-479.
- Staub O, Rotin D. WW domains. *Structure* 1996; 4: 495-499.
- Bork P, Sudol M. The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 531-533.
- Macias MJ, Wiesner S, Sudol M. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett* 2002; 513: 30-37.
- Zhu H, Kavak P, Abdollah S et al. A Smad ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 1999; 400: 687-693.
- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G et al. Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 2001; 276: 12477-12480.
- Murakami G, Watabe T, Takaoka K et al. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 2809-2817.
- Suzuki C, Murakami G, Fukuchi M et al. Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem* 2002; 277: 39919-39925.
- Jaffe AB, Hall A. Smurfing at the leading edge. *Science* 2003; 302: 1690-1691.
- Wang H-R, Zhang Y, Ozdamar B et al. Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* 2003; 302: 1775-1779.
- Yamashita M, Ying S-X, Zhang G-M et al. Ubiquitin ligase Smurf1 controls osteoblast activity and bone homeostasis by targeting MEKK2 for degradation. *Cell* 2005; 121: 101-113.
- Lin X, Liang M, Feng XH. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor- β signaling. *J Biol Chem* 2000; 275: 36818-36822.
- Zhang Y, Chang C, Gehling DJ et al. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 974-979.
- Bonni S, Wang H-R, Causing CG et al. TGF- β induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nature Cell Biol* 2001; 3: 587-592.
- Mochizuki T, Miyazaki H, Hara T et al. Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor- β superfamily signaling. *J Biol Chem* 2004; 279: 31568-31574.
- Grönroos E, Hellman U, Heldin C-H, Ericsson J. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol Cell* 2002; 10: 483-493.
- Simonsson M, Heldin C-H, Ericsson J, Grönroos E. The balance between acetylation and deacetylation controls Smad7 stability. *J Biol Chem* 2005; 280: 21797-21803.
- Moren A, Imamura T, Miyazono K et al. Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT-domain ubiquitin ligases. *J Biol Chem* 2005; 280: 22115-22123.
- Kuratomi G, Komuro A, Goto K et al. Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2 (NEDD4-2) negatively regulates transforming growth factor-beta (TGF- β) signaling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF- β type I receptor. *Biochem J* 2005; 386: 461-470.
- Fukuchi M, Imamura T, Chiba T et al. Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 1431-1443.
- Stroschein SL, Bonni S, Wana JL, Luo K. Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev* 2001; 15: 2822-2836.
- Wan M, Cao X, Bai S et al. Jab1 antagonizes TGF- β signaling by inducing Smad4 degradation. *EMBO Rep* 2002; 3: 171-176.
- Wan M, Tang Y, Tytler EM et al. Smad4 protein stability is regulated by ubiquitin ligase SCF β -TrCP1. *J Biol Chem* 2004; 279: 14484-14487.
- Wan M, Huang J, Jhala NC et al. SCF β -TrCP1 controls Smad4 protein stability in pancreatic cancer cells. *Am J Pathol* 2005; 166: 1379-1392.
- Li L, Xin H, Xu X et al. CHIP mediates degradation of Smad proteins and potentially regulates Smad-induced transcription. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 856-864.
- Kim B-C, Lee H-J, Park SH et al. Jab1/CSN5, a component of the COP9 signalosome, regulates transforming growth factor β signaling by binding to Smad7 and promoting its degradation. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 2251-2262.
- Matunis MJ, Coutavas E, Blobel G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 1996; 135: 1457-1470.
- Mahajan R, Delphin C, Guan T et al. A small-ubiquitin related polypeptide involved in targeting Ran-GAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 1997; 88: 97-107.
- Schwartz DC, Hochstrasser M. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 321-328.
- Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 2004; 18: 2046-2059.
- Hay RT. SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 2005; 18: 1-12.
- Melchior F, Schergaut M, Pichler A. SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 612-616.
- Lee PS, Chang C, Liu D, Derynck R. Sumoylation of Smad4, the common Smad mediator of transforming growth factor- β family signaling. *J Biol Chem* 2003; 278: 27853-27863.
- Lin X, Liang M, Liang Y et al. Activation of transforming growth factor- β signaling by SUMO1 modification of tumor suppressor Smad4/DPC4. *J Biol Chem* 2003; 278: 18714-18719.
- Lin X, Liang M, Liang Y et al. SUMO1/Ubc9 promotes nuclear accumu-

- lation and metabolic stability of tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* 2003; 278: 31043-31048.
72. Long J, Matsuura I, He D. et al. Repression of Smad transcriptional activity by PIASy, an inhibitor of activated STAT. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9791-9796.
73. Long J, Wang G, He D, Liu F. Repression of Smad4 transcriptional activity by SUMO modification. *Biochem J* 2004; 379: 23-29.
74. Imoto S, Sugiyama K, Muromoto R et al. Regulation of transforming growth factor- β signaling by protein inhibitor of activated STAT, PIASy through Smad3. *J Biol Chem* 2003; 278: 34253-34258.
75. Wilkinson KD. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 141-148.
76. Wojcik C, DeMartino GN. Intracellular localization of proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 579-589.
77. Fuchs O. Proteasomy. *Biol listy* 1996; 61: 13-27.
78. Groll M, Huber R. Substrate access and processing by the 20S proteasome core particle. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 606-616.
79. Pickart CM, Cohen RE. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 77-187.
80. Twombly R. First proteasome inhibitor approved for multiple myeloma. *J Nat Cancer Inst* 2003; 95: 845.
81. Špička I, Klener P. Inhibitory proteazomu-nová možnost léčby nádorových onemocnění. *Čas Lék čes* 2004; 143: 701-704.
82. Špička I, Kleibl Z, Hájek R. Bortezomibum. *Remedia* 2005; 15: 196-203.
83. Elliott PJ, Zollner TM, Boehncke W-H. Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. *J Mol Med* 2003; 81: 235-245.
84. Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genet* 2001; 29: 117-129.
85. Wong S-F, Lai LC. The role of TGF- β in human cancers. *Pathology* 2001; 33: 85-92.
86. Elliott RL, Blobel GC. Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2078-2093.
87. Moren A, Itoh S, Moustakas P et al. Functional consequences of tumorigenic missense mutations in the amino-terminal domain of Smad4. *Oncogene* 2000; 19: 4396-4404.
88. Xu J, Attisano L. Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor β signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4820-4825.
89. Moren A, Hellman U, Inada Y et al. Differential ubiquitination defines the functional status of the tumor suppressor Smad 4. *J Biol Chem* 2003; 278: 33571-33582.
90. Maurice D, Pierreux CE, Howell M et al. Loss of Smad4 function in pancreatic tumors: C-terminal truncation leads to decreased stability. *J Biol Chem* 2001; 276: 43175-43181.
91. Eppppert K, Scherer SW, Ozcelik H et al. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 1996; 86: 543-552.
92. Dumont E, Lallemand F, Prunier C et al. Evidence for a role of Smad3 and Smad2 in stabilization of the tumor-derived mutant Smad2, Q407R. *J Biol Chem* 2003; 278: 24881-24887.
93. Fukuchi M, Fukai Y, Masuda N et al. High-level expression of the Smad ubiquitin ligase Smurf2 correlates with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 7162-7165.
94. Akhurst RJ, Derynck R. TGF- β signaling in cancer- a double-edged sword. *Trends Cell Biol* 2001; 11: S44-S51.
95. Roberts AB, Wakefield LM. The two faces of transforming growth factor β in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8621-8623.
96. Subramaniam V, Li HX, Wong M et al. The RING-H2 protein RNF11 is overexpressed in breast cancer and is target of Smurf2 E3 ligase. *Br J Cancer* 2003; 39: 1538-1544.
97. Li Y, Turck CM, Teumer JK, Stavnezer E. Unique sequence, ski, in Sloan-Kettering avian retroviruses with properties of a new cell-derived oncogene. *J Virol* 1996; 57: 1065-1072.
98. Luo K. Ski and SnoN: negative regulators of TGF- β signaling. *Curr Opin Genet Develop* 2004; 14: 65-70.
99. Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y et al. SNO is a probable target for gene amplification at 3q26 in squamous-cell carcinomas of the esophagus. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 559-565.
100. Zhang F, Lundin M, Ristimäki A et al. Ski-related novel protein N (SnoN), a negative controller of transforming growth factor- β signaling, is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast carcinomas. *Cancer Res* 2003; 63: 5005-5010.
101. Stroschein SL, Wang W, Zhou S et al. Negative feedback regulation of TGF- β signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 1999; 286: 771-774.
102. Liu X, Sun Y, Weinberg RA, Lodish HA. Ski/Sno and TGF- β signaling. *Cytokine Growth Fac Rev* 2001; 12: 1-8.
103. Sarker KP, Wilson SM, Bonni S. SnoN is a cell type-specific mediator of transforming growth factor- β responses. *J Biol Chem* 2005; 280: 13037-13046.
104. Shinagawa T, Dong HD, Xu M et al. The sno gene, which encodes a component of the histone deacetylase complex, acts as a tumor suppressor in mice. *EMBO J* 2000; 19: 2280-2291.
105. Pray TR, Parlati F, Huang J et al. Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Drug Resist Updat* 2002; 5: 249-258.
106. Sun Y. Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2003; 2: 623-629.
107. Edmiston JS, Yeudall WA, Chung TD, Lebman DA. Inability of transforming growth factor- β to cause SnoN degradation leads to resistance to transforming growth factor- β -induced growth arrest in esophageal cancer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 4782-4788.
108. Park K-H, Choi S-E, Eom M, Kang Y. Downregulation of the anaphase-promoting complex (APC)7 in invasive ductal carcinomas of the breast and its clinicopathologic relationships. *Breast Cancer Res* 2005; 7: R238-R247.
109. Vázquez-Macías A, Ruíz-Mendoza AB, Fonseca-Sánchez MA et al. Downregulation of Ski and SnoN co-repressors by anisomycin. *FEBS Lett* 2005; 579: 3701-3706.