

DERLEME

## Protein Yıkımının Önemi

Azmi YERLİKAYA, Harun DOKUDUR

Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya.

### ÖZET

Yaşayan bir organizmanın birçok hücrel proteini sürekli olarak yıkılmakta ve tekrar sentezlenmektedir. Proteinlerin bu yaşam süreleri birkaç dakika ile birkaç hafta veya daha uzun süreler arasında değişmektedir. Hücre içindeki protein yıkım mekanizmalarının bazı işlevleri şunlardır: 1) Normal şartlar altında, bazı önemli metabolik kontrol noktalarında görev alan enzimlerin yıkılarak ve aktivitelerinin düzenlenerek hücrenin değişen çevre şartlarına ve metabolik ihtiyaçlarına verimli bir şekilde cevap vermesini sağlamak. 2) Proteinlerin besin yetersizliği durumunda enerji ve amino asit kaynağı olarak kullanılmasını sağlamak. 3) Transkripsiyonel veya translasyonel hatalardan kaynaklanan hasarlı veya işlevsiz proteinlerin uzaklaştırılması. Bu derlemede hücre içindeki bazı önemli proteolitik mekanizmaların genel özellikleri, yapıları ve işlevleri hakkında bilgi vermeye çalıştık.

**Anahtar Kelimeler:** Protein yıkımı. Lizozom. Kaspaz. Proteozom.

### The Significance of Protein Degradation

#### ABSTRACT

Many cellular proteins of a living organism are continuously degraded and resynthesized. The lifetime of proteins changes from a few minutes to weeks or more. Several functions of the intracellular protein degradation mechanisms are as follows: 1) To degrade and regulate the activity of enzymes, which play roles in some critical metabolic control points in order for the cell to respond efficiently to environmental changes and metabolic requirements under normal conditions. 2) Under the conditions of nutritional deprivation, to utilize proteins as a source of energy or amino acids. 3) To remove abnormal and nonfunctional proteins that result from transcriptional and translational errors. In this review, we tried to present knowledge about the general properties, structures and functions of several important intracellular proteolytic mechanisms.

**Key Words:** Protein degradation. Lysosome. Caspase. Proteasome.

Bir hücredeki birçok protein sürekli olarak yıkılmakta (degradasyona uğramakta) ve yeniden sentezlenmektedir. Proteinlerin yarı-ömrüleri birkaç dakika ile birkaç hafta veya daha uzun süreler arasında değişmektedir. Hücre içindeki protein yıkım mekanizmalarının bazı işlevleri şunlardır: 1) Normal şartlar altında, bazı önemli metabolik kontrol noktalarında görev alan enzimlerin yıkılarak değişen çevre şartlarına ve metabolik ihtiyaçlara göre aktivitelerinin düzenlenmesi. Önemli birçok enzimatik reaksiyonda görev alan enzimler bilinen en kısa yarı-ömrüleri sahiptirler. Mesela, ornithine decarboxylase (ODC), 30 dk; S-adenosylmethione decarboxylase (SAMDC), 48 dk;

RNA polimeraz I, 78 dk; tyrosine aminotransferase, 120 dk; serine dehidratase ise 240 dk yarılanma ömrüne sahiptir. 2) Proteinlerin besin yetersizliği durumunda enerji ve amino asit kaynağı olarak kullanılmasını sağlamak. 3) Transkripsiyonel veya translasyonel hatalardan kaynaklanan hasarlı veya işlevsiz proteinlerin uzaklaştırılması.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, hücre homeostazinin sağlanmasında protein ve RNA yıkım mekanizmalarının biyosentetik mekanizmalar kadar önemli olduğunu göstermiştir<sup>1-4</sup>.

Proteinler, sıfırıncı-dereceden reaksiyon kinetiğine göre sentezlemelerine rağmen birinci-dereceden reaksiyonlara göre yıkılmaktadır. Bilindiği üzere, sıfırıncı-dereceden reaksiyonlarda reaksiyon hızı reaksiyon esnasında sabittir, zamanla değişmez; fakat, sınırlı miktardaki reaksiyona giren maddelerden bir tanesi bile tükendiğinde reaksiyon aniden durmaktadır. Hiçbir protein uygun bir mRNA, tRNA'lar, ribozomlar ve diğer tüm elzem faktörler olmadan sentezlenemez. Eğer tek bir amino asit eksik olsa bile protein sentezi

Geliş Tarihi: 04.05.2009  
Kabul Tarihi: 14.07.2009

Dumlupınar Üniversitesi,  
Fen Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Bölümü, Kütahya  
E-mail: ayerlikaya@dumlupinar.edu.tr  
Tel: +90 274 265 2031 (3159)

durur, ve hasarlı bir polipeptit ribozomlardan salınır ve daha sonra yıkılarak yok edilir. Protein sentez aparatı tüm zorunlu faktörlerle doyurulmalıdır, aksi takdirde protein sentezi gerçekleşmez. Hücre içindeki protein yıkımı ise sıfırıncı-dereceden değil birinci-derecedendir. Birinci-dereceden reaksiyonlar da ise reaksiyon hızı reaksiyona giren maddelerden (reaktantlar) birinin konsantrasyonuna bağlıdır. Yani, reaksiyona giren madde reaksiyon esnasında tükendikçe, konsantrasyonu azaldığı gibi reaksiyon hızı da orantılı olarak zamanla azalmaktadır. Bir proteinin yıkım hızı radyoaktif (pulse-chase yaklaşımı) veya Western blot yöntemi ile belirlenebilir. Radyoaktif yaklaşımda hücre kültürleri önce kısa bir süre (15- 30 dk) radyoaktif bir amino asit ( $[^3\text{H}]$ -lösin veya  $[^{35}\text{S}]$ -metionin) ile işaretlendikten sonra radyoaktif amino asit besiyerinden normal radyoaktif amino asit içermeyen besiyeri ile değiştirilmek suretiyle uzaklaştırılır ve proteinin yapısına katılmış olan radyoaktif amino asitin kaybolması zamanla takip edilerek protein yarı-ömrü belirlenir. Radyoaktif amino asitlerin kaybolması protein yıkımından kaynaklanmaktadır. Western blot yönteminde ise protein sentezi cycloheximide ile durdurulduktan sonra proteinin hücredeki azalması antikorlar yardımıyla belirlenir. Protein yarı-ömrü protein moleküllerinin yarısının yıkıldığı süre olarak kabul edilir ve aşağıdaki denklem yardımıyla hesaplanır:

$$t_{1/2} = \ln 2/k_d$$

Burada  $t_{1/2}$ , protein yarı-ömrü;  $\ln$ , doğal logaritma;  $k_d$  ise yıkım hızı sabitidir<sup>1</sup>.

Protein/enzim seviyelerinin hücre içindeki miktarı protein sentezi yanında protein yıkım hızına da bağlıdır. Dolayısıyla, bir proteinin yıkım hızını kontrol etmek hücre ekonomisi açısından sentez hızını kontrol etmek kadar önemlidir. Sürekli hal denkleminde de görüldüğü gibi enzim/protein miktarı hem sentez hızı ve hem de yıkım hızı tarafından belirlenmektedir.

$$[P] = k_s/k_d$$

Bu denkleme göre sentez hızını 10 kat arttırdığımızda protein miktarı da 10 kat artar. Aynı şekilde protein yıkım hızını 10 kat azaltırsak protein miktarı benzer şekilde 10 kat artar<sup>1</sup>.

Protein yıkımı, hücre içinde ya da dışında işlev gören proteazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Hasarlı, anormal proteinlerin hücre içinde birikmesini engellemek ve amino asitlerin geri dönüşümü için proteinlerin devamlı yıkılması gerekir. Çeşitli proteinlerin yarı-ömrüleri yarım dakika ile birkaç saat ve hatta birkaç yıl arasında değişir. Hızlı bir şekilde yıkılan proteinler sentez esnasında yanlış amino asidin eklenmesinden dolayı hasarlı (normal üç boyutlu yapısını alamamış) olan veya normal işlevi esnasında bozulan proteinlerdir<sup>3,5</sup>. Genellikle proteinlerin yarı ömürleri N-ucunda bulunan amino asit ile bir korelasyon göstermektedir. Bu olay N-end kuralı olarak bilinir.

Örneğin, N-ucunda metionin, serin, alanin, treonin, valin ve glisin amino asitleri bulunan proteinlerin yarı ömürleri 20 saati aşmaktadır. Fenilalanin, lösin, aspartik asit, lizin ve arginin bulunan amino asitler ise 3 dakika veya daha az kısa ömürlü proteinlerdir<sup>6</sup>. Yine yapılarında PEST sekansı (prolin, glutamik asit, serin ve treonin) içeren proteinler diğer proteinlere göre daha hızlı yıkılmaktadırlar<sup>7,8</sup>. Hasarlı proteinler hem bakteriler hem de ökaryotik hücrelerde sitozolik ATP-bağımlı sistemler tarafından yıkılan kısa ömürlü proteinlerdir. Hücre içinde veya dışında işlev gören proteazlardan bazıları şunlardır: Serin proteazlar (tripsin ve kimotripsin), lizozomlarda bulunan katepsinler, sitozolde bulunan kaspazlar, hücre zarında bulunan veya ekstraselüler sıvıya salgılanan meprinler ve yine hücre içinde bulunan çok büyük yapıda olan ATP-bağımlı proteozom<sup>9</sup>. Bu derlemede hücre içinde bulunan başlıca proteolitik sistemlerin genel özellikleri, yapıları ve işlevleri hakkında bilgi verilmeye çalışılmıştır.

## Lizozomlar

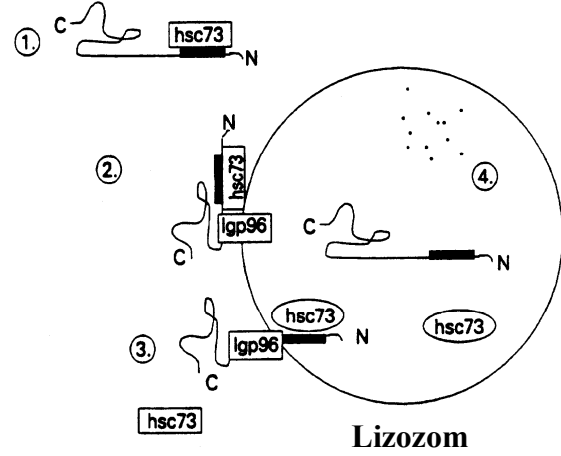
Lizozomlar hidrolitik enzimler içeren membranla çevrili organeller olup hücre içinde makromoleküllerin sindirilmesi için kullanılmaktadır. Yaklaşık 40 çeşit hidrolitik enzim içermektedirler (proteazlar, nükleazlar, lipazlar, glikozidazlar ve fosfolipazlar). Hepsi asit hidrolaz olarak bilinir çünkü optimum aktivite için asidik bir ortama ihtiyaç duyarlar. Membranda bulunan bir  $\text{H}^+$ ATPaz pompası ile sitozolden proton iyonları ( $\text{H}^+$ ) lizozom lümenine taşınarak, pH 5 civarında tutulur. Lizozom enzimleri sitozole sızarsa bile çok az tahribat yaparlar çünkü sitozolik pH 7.2'de inaktive olurlar. Lizozom membranındaki proteinlerin çoğuna çok sayıda karbonhidrat grubu eklenmiştir bunun da onları lizozom lümeninde bulunan proteazlardan koruduğu düşünülmektedir<sup>10</sup>. Lizozomlar bütün ökaryotik hücrelerde bulunmaktadır. Bitkilerdeki ve mantarlardaki vakuoller çok yönlü lizozomlar gibi işlev görmektedir. Vakuoller hücrelerin yaklaşık %30'luk bir bölümünü kaplamaktadır, bazı hücrelerde bu %90'na varmaktadır. Vakuollerin çok değişik görevleri vardır. Sindirim kompartmanı olmasının yanında atık madde deposu, embriyo gelişimi için besin deposu ve hatta bitki yenildiği zaman zararlı maddeler vakuollerden salındığı için predatörlere karşı bir savunma da sağlamaktadır<sup>10</sup>.

## Lizozomal degradasyon

Lizozomlarda yıkılan maddeler lizozomlara üç farklı yoldan ulaşmaktadır. Bu yollardan biri endositozdur. Hücre dışından maddelerin plazma membranının invajinasyonu ile hücre içine alınması ile meydana gelir ve iki çeşit endositoz vardır; pinositoz (sıvıların hücre içine alınması: hücrenin içmesi) ve fagositoz

## Protein Yıkımının Önemi

(katı maddelerin hücre içine alınması: hücrenin yeme-si). Endositoz ile alınan maddeler önce erken endozom (early endosome) denilen küçük düzensiz veziküller (keseler) içine alınır. Bu veziküller içine alınan bazı moleküller çıkarılır ve tekrar plazma membranına geri gönderilir, diğer maddeler ise geç endozom (late endosome) denilen veziküllere iki vezikülün füzyonu (birleşmesi) sonucu teslim edilir. Geç endozomlarda pH 6 civarındadır. Olgun lizozomlar, geç endozom membranındaki bazı proteinlerin kaybolması ve pH'ın daha da düşmesiyle oluşurlar. Lizozomlarda yıkılacak olan maddeler ikinci bir yol olan otofaji ile de lizozomlara ulaşır<sup>10</sup>. Otofaji hücrenin kendisine ait bazı maddelerin veya kısımların elimine edilmesi işlemidir. Karaciğerlerde bir mitokondrinin yaklaşık 10 gün gibi bir ömrü vardır. Bu sürenin sonunda mitokondri lizozom tarafından otofaji ile yok edilmektedir. Bu işlem ER'den elde edilen membran ile organelin etrafının sarılması (otofagozom) ve daha sonra otofagozomun lizozom ile birleşmesiyle sonuçlanır. Lizozomlara ulaşmada kullanılan üçüncü bir yol bazı proteinlerin yüzeyinde bulunan KFERQ sinyal sekansıdır. KFERQ sekansı (K, lizin; F, fenilalanin; E, glutamik asit; R, arginin ve Q ise glutamin amino asitidir) muhtemelen lizozom membranında bulunan spesifik transportör proteinler tarafından tanınarak bu tür proteinlerin lizozom lümenine taşınması ve orada proteazlar tarafından yıkılması sağlanmaktadır. Ökaryotlardaki lizozomal sistem ile çoğunlukla uzun ömürlü hücre zarı ve hücre dışı proteinler hücre içine alındıktan sonra yıkıma uğramaktadır<sup>10</sup>. Lizozomda endositoz ile hücre içine alınan proteinleri yıkan katepsin olarak bilinen yaklaşık 50 hidrolitik proteaz vardır. Ubiquitin-proteozom yolunun aksine lizozomal protein yıkımı özgül (seçici) değildir; fakat besin yetersizliği durumundan yukarıda belirtilen KFERQ özgül sinyal sekansını içeren proteinler lizozoma yönlendirilmekte ve kısa bir süre için hücrenin amino asit ihtiyacı bu proteinlerden sağlanmaktadır. Sitozolik proteinlerin yaklaşık %30'u bu sekansı içermektedir ve besin yetmezliği durumunda (hücre kültürlerinde serum eksikliğinde) bu proteinler lizozomlara hedeflenmektedir. Bu pentapeptit sekansa heat shock proteinlerinden (ısı şok proteini) Hsc73 proteinin bağlandığını ve bu protein aracılığı ile lizozomlara yönlendirildiği bilinmektedir (Şekil 1)<sup>11</sup>. Bu proteinlere ısı şok proteinleri denilmesinin nedeni yüksek ısıda uyarılmalarından dolayıdır. Fakat daha sonra bu proteinlerden bazılarının hücrede normal şartlarda da sürekli ve yüksek miktarda sentezlendikleri görülmüştür. Hsp proteinleri yeni sentezlenen proteinlerin ER veya mitokondriye gönderilmesinde de görev alırlar. Ayrıca stres şartları altında üç boyutlu yapılarını kaybeden proteinlerin katlanmalarına yardımcı olmak veya degradasyon yollarına hedeflenmelerini sağlayarak hücre içinde bu anormal proteinlerin birikmesini engellemede önemli rolleri vardır.



Şekil 1.

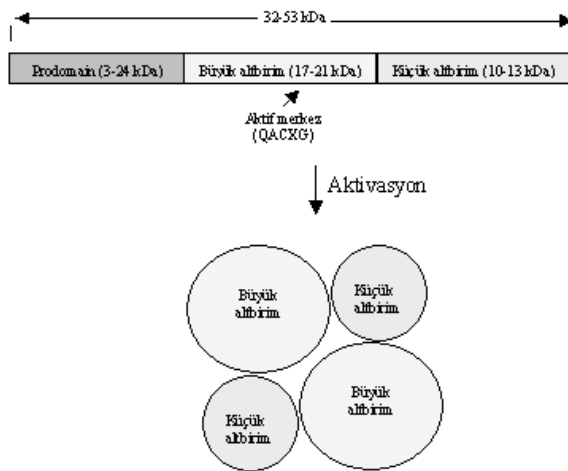
*Hsc73 proteini aracılığı ile lizozomlara protein hedeflenmesi*<sup>11</sup>.

Lizozomal hidrolazlar pre-proenzim olarak sentezlenirler, sentez devam ettiği sırada sinyal sekansı çıkarılır ve ER'da proenzim katlanmaları olur. Golgide asparagin-bağlı (N-linked) glikozilasyona uğrarlar. Yine golgide N-asetil glukozamilfosfotransferaz enzimi ve N-asetilglukozamidaz enzimleri ile mannoz-6-fosfat eklenir. Bu işaretlenmiş olan proenzim golgi membranında bulunan M6P reseptörleri tarafından bağlanır ve endolizozomal sisteme yönlendirilir. Glikozilasyonun bu enzimleri endozom ve lizozomlarda yıkımdan koruduğu varsayılmaktadır<sup>10</sup>. Lizozomal proteazlar endo ve ekzo peptidazlar olarak iki grupta incelenmektedirler. Endoproteazlar çoğunlukla sistin ve aspartik proteazlardır, ekzoproteazlar ise sistin ve serin proteazlardır<sup>12</sup>. Tüm endoproteazların primer yapıları oldukça korunmuş ve benzer sekonder yapıya sahiptirler. Aralarındaki farklar çoğunlukla korunan bölgeler arasında bulunan kısımlara insersiyon ve delesyonlardan kaynaklanmaktadır. Aktif bölgede bulunan sistin amino asitine ek olarak histidin (His), asparagin (Asn) ve glutamin (Gln) aktif bölgeyi oluşturan ve substrat hidrolizine katılan amino asitlerdir<sup>12</sup>.

## Kaspazlar

Kaspazlar hasarlı veya fazla olan hücrelerin çevrelerine zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan programlanmış hücre ölümünü (apoptozis) uyaran proteazlardır. Apoptotik hücrede meydana gelen morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler sistin proteazlar olan kaspazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Tüm kaspazlar amino asit sekansları, yapıları ve substratları yönünden benzerlik göstermektedir. Hepsi proenzim olarak sentezlenmektedir (30-50 kDa). Üç önemli domain içermektedirler; amino ucu domain (prodomain), büyük alt birim ve küçük alt birim. Aktif

merkez, büyük alt birimde yer almaktadır. Aktivasyon bu domainler arasında peptit bağlarının kırılması ve daha sonra büyük ve küçük alt birimler birleşerek heterodimer, heterodimerler de birleşerek iki aktif merkez içeren tetramerik aktif enzimi oluştururlar (Şekil 2). Kaspazlar proteazlar arasında en çok spesifisite gösteren enzimlerdir. Kesinlikle aspartik asitten sonra substratlarını kırmaktadırlar. Aspartik asitin önündeki 4 amino asit (tetrapeptit) kompozisyonu ve bunların üç boyutlu yapısı spesifisitede önemli etkiye sahiptir. Memelilerde şimdiye kadar 12 tane tespit edilmiştir. Apoptozisi uyarmalarına göre kaspazlar iki gruba ayrılırlar: apikal (başlatıcı kaspazlar) ve efektör kaspazlar. Başlatıcı kaspazlar efektör kaspazları aktive eden proteazlardır. Efektör kaspazlar hücre çekirdeğinde (laminler), DNA tamir enzimlerinden PARP, fodrin, Rb, sitoplazmada (aktin) ve hücre iskeletinde bulunan birçok yapısal ve işlevsel proteinleri parçalayan proteazlardır. Apoptoziste görev alan kaspazlar Tablo I'de görülmektedir<sup>13-16</sup>. Efektör kaspazlar katapsin veya kalpein ( $Ca^{+2}$  tarafından aktive edilen hücre hareketinde ve adhezyonda rol alan proteaz) gibi diğer proteazlar tarafından da aktive edilebilmektedir. Kaspaz enzimlerinin aktivasyonuna ve dolayısıyla apoptozis uyarılmasına neden olan dış etkenlerden bazıları UV ışını, gama ışını, radyasyon, ilaçlar ve toksinler sayılabilir<sup>15,17</sup>.



Şekil 2. Kaspaz alt birimlerinden aktif kompleks oluşması<sup>17</sup> dan uyarlandı.

Tablo I. Kaspazların yapısal özellikleri<sup>15</sup>.

Enzim Başlatıcı Kaspazlar	Moleküler Ağırlık (kDa)	Alt birimler
Kaspaz-2	51	19/22
Kaspaz-8	55	18/11
Kaspaz-9	45	17/10
Kaspaz-10	55	17/12
Kaspaz-12	50	20/10
Efektör Kaspazlar		
Kaspaz-3	32	17/12
Kaspaz-6	34	18/11
Kaspaz-7	35	20/12

## Apoptozide kaspazların rolleri

Apoptozis yaklaşık olarak 30-60 dakika sürmektedir. Apoptozis, DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu, membranla çevrili veziküllerin görüldüğü bir seri olaylar dizisini içermektedir. Apoptozis esnasında kaspazlar tarafından yıkılan yaklaşık 40 substrat tespit edilmiş olup bu substratların yıkımı apoptoziste görülen bu olayları tetiklemektedir. Görevlerinden bir tanesi, hücreyi apoptozisten koruyan proteinleri ortadan kaldırmak ve inaktive etmektir. Bu proteinlerden bir tanesi  $I^{CAD}$ 'dir. Bu protein normalde CAD (kaspaz aktiviteli deoksiribonükleaz) proteinine bağlanarak hücre içinde bu enzimi inaktif durumda tutmaktadır. Apoptotik bir uyarı geldiğinde kaspazlar aktive edilir edilmez bu inhibitörü ( $I^{CAD}$ ) yıkarak CAD enzimini serbest bırakmaktadır. Serbest kalan CAD enzimi nükleozomlar arasındaki DNA'yı kırarak 200 bç uzunluğunda DNA fragmentleri oluşturmaktadır. Bu oluşan DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezde DNA merdiveni şeklinde görülmektedir<sup>18</sup>. Kaspazlar ayrıca apoptozisi inhibe eden negatif regülatörleri yıkarak hücre ölümünü tetiklemektedir. En önemli negatif apoptozis inhibitörü Bcl-2'dir. Bcl-2 gibi işlev gören ve benzerlik gösteren diğer bazı apoptozis inhibitörleri Bcl-xL, Bcl-w ve Mcl-1 proteinleridir (antiapoptotik proteinlerdir). Aynı şekilde Bcl-2 proteinine benzerlik gösteren fakat apoptozisi tetikleyen diğer bazı proteinler ise Bax, Bak, Bad ve Bcl-xs proteinleridir (proapoptotik proteinlerdir)<sup>16</sup>.

## Ubiquitin Proteozom Yolu

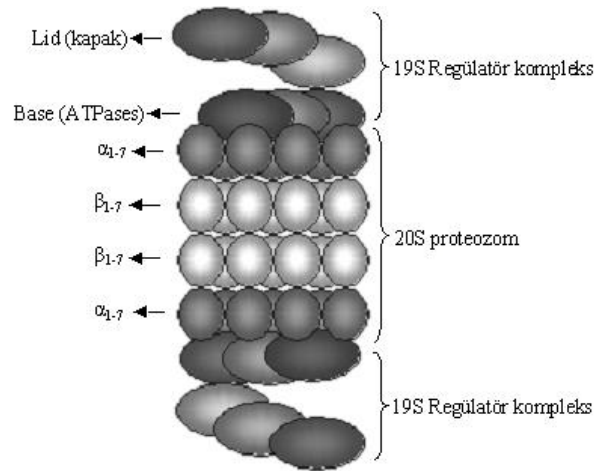
Ubiquitin-proteozom yolu hücre içindeki hasarlı, yanlış katlanmış ve kısa-ömürlü proteinlerin yıkımda önemli roller oynayan bir proteolitik yoldur. Proteinlerin amino asitlere kadar yıkılmasının dışında bazı transkripsiyon faktörlerinin (NF- $\kappa$ B) kısmi yıkılmasında (işlenerek olgulaşmasında) ve aktivasyonundan da sorumludur. Proteozom inhibitörleri MG132 ve lactacystin ile yapılan çalışmalar ubiquitin-proteozom yolunun hücre içindeki proteinlerin %80'den fazlasının yıkımından sorumlu olduğunu göstermektedir. Hedef proteinler yıkılmadan önce ubiquitin ile (76 amino asitlik bir protein) ile işaretlenirler. Daha sonra hedef protein üzerinde bir poliubiquitin zincir oluşturulduktan sonra poliubiquitine olmuş protein 26S proteozoma yönlendirilir. 26S proteozomda işaretlenmiş olan hedef protein peptidlere kadar yıkılırlar<sup>5,9,19-21</sup>. Ubiquitin, yıkılacak olan proteinlere bağlanmadan önce ilk olarak ubiquitin aktive edici enzimde (E1)'e transfer edilir. Aktive edilen ubiquitin daha sonra benzer şekilde E1 enziminden ubiquitin konjugasyon enzimindeki (E2) bir sistin amino asitine aktarılır. Bu E2 enzimleri yıkılacak olan proteinlere ubiquitin molekülünü ubiquitin ligaz (E3) enzimi yardımı ile direkt aktarır veya ubiquitin E3 enzimine aktarıldıktan sonra substrat proteinlere aktarılır<sup>21,22</sup>. Son aşamada,

## Protein Yıkımının Önemi

ubiquitin hedef proteindeki bir lizin amino asidine aktarılır. Daha sonra diğer bir ubiquitin molekülü ilk bağlanmış olan ubiquitin molekülünün 48. pozisyonunda bulunan lizin amino asidine eklenir ve benzer reaksiyonlar tekrar ederek hedef protein üzerinde bir poliubiquitin zinciri sentezlenir<sup>23</sup>.

### 26S proteozom

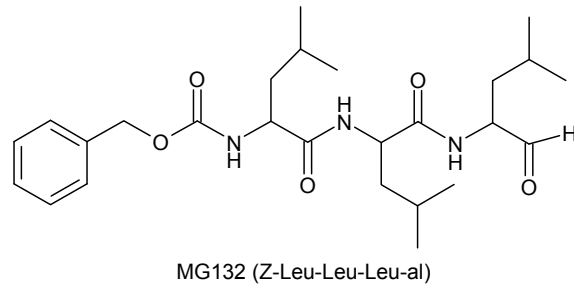
26S proteozom sitoplazmada ve çekirdekte bulunan multikatalitik bir proteazdır. 26S proteozom tüm hayat formlarında bulunan ve yaklaşık 64 alt birimden oluşan büyük bir proteazdır. Görevleri arasında, misfolded (hatalı katlanmış), anormal, hücre döngüsü proteinlerinde siklinler, transkripsiyon faktörlerinin işlenmesi ve yıkımı, hücre döngüsünün durdurulması, immün-cevap ve apoptozis bulunmaktadır. 26S proteozom, 1 tane 20S proteozom ve 2 tane 19S düzenleyici kompleksten oluşan 2.5 MDa ağırlığında bir proteazdır. Ubiquitin-protein konjugatları, 26S proteozomun 19S düzenleyici kompleksi tarafından tanınır, hedef protein çözülür, 20S kor kompleksi içine gönderilir ve burada peptitlere kadar yıkılır. 19S düzenleyici kompleksi iki alt kompleksten oluşmaktadır: Base (20S komplekse yakın kompleks) ve Lid (kapak). Base kompleksinde ATPaz aktivitesi içeren 6 protein ve ubiquitin tanıyan S5a proteini bulunmaktadır. ATPaz enzimlerinin substrat proteinlerin üç boyutlu yapılarının çözülmesi ve proteolitik aktiviteleri içeren 20S kompartımanı içine gönderilmesinden sorumlu olduğu sanılıyor. Protein yıkımı için Lid kompleksine de ihtiyaç vardır. Lid sekiz alt birimden oluşmaktadır. İşlevi tam olarak bilinmemesine rağmen ubiquitine olmuş proteinlerin tanınması ve deubiquitinasyondan sorumludur. 19S kompleks 20S kompleksin her iki ucuna eklenmektedir. Prokaryotik ve ökaryotik 20S kompleksi (700 kDa) 7  $\alpha$  ve 7  $\beta$  alt birimlerinin oluşturduğu 4 tabakalı silindirik bir yapıdır (Şekil 3)<sup>5,19,20,24</sup>.



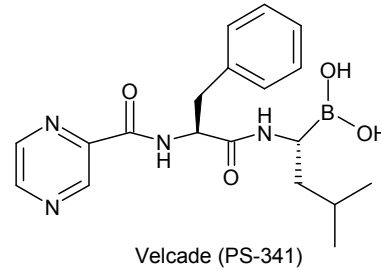
Şekil 3.  
26S proteozomun yapısı.

### 20S proteozomun proteolitik aktiviteleri

20S proteozom kompleksi en az üç farklı proteolitik aktivite göstermektedir: Kimotripsin benzeri aktivite, tripsin benzeri aktivite ve peptidilglutamil-peptid hidroliz aktiviteleri. Beta alt birimleri proenzim olarak sentezlenirler ve proteozom olgunlaşması sırasında 75 amino asit kadar olan pro sekans çıkarılır. Yedi beta alt biriminden üçü ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ve  $\beta_5$ ) enzimatik aktivite göstermekte ve bu alt birimler Gly ve Thr amino asitleri arasında kırılmakta ve enzim bu Thr yan gruplarını substrat peptid bağlarını kırmakta kullandığı için treonin proteazlar olarak ta bilinir. Aktif bölgedeki her bir Thr amino asiti arasındaki mesafe 28 Å kadardır, bu da proteinlerin yaklaşık 8 amino asitlik peptitlere kadar yıkıldığını göstermektedir<sup>20,24</sup>.



MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al)



Velcade (PS-341)

### Şekil 4.

Proteozom inhibitörleri MG132 ve Velcade'in yapısı<sup>29</sup>'dan tekrar çizildi.

### 26S proteozom inhibitörleri

Yukarıda da belirtildiği gibi proteozom inhibitörleri MG132 ve lactacystin ile yapılan çalışmalar hücre proteinlerinin %80-90'nın proteozom tarafından yıkıldığını göstermiştir. Bu proteinler arasında siklinler, Cdk inhibitörleri p21, p27 ve p57, tümör baskılayıcı p53, transkripsiyon faktörleri c-Jun ve c-Fos, NF- $\kappa$ B inhibitörü I $\kappa$ B, poliamin biyosentez enzimleri ODC ve AdoMetDC (S-adenozilmetionin dekarboksilaz) gibi çok farklı mekanizmalarda rol alan proteinler vardır<sup>4,19,25-27</sup>. Proteozom, hücre döngüsü, endositoz, transkripsiyon, organel biyogenezi, spermatogenez, anjiyogenez, apoptozis ve protein sentezi gibi bir çok hücrel olayda görev alan proteinlerin yıkımını veya işlenmesini sağlayarak bu hücrel mekanizmalara direk veya indirek bir şekilde katkıda bulunmaktadır<sup>19-21,28</sup>. Proteozom inhibitörlerinde lactacystin, kovalent olarak Thr amino asitini modifiye ederek geri dönü-

şümsüz olarak proteozomu inhibe eder ve oldukça spesifiktir. MG132, proteozomun her üç proteolitik aktivitesini inhibe etmektedir; bunun yanında yüksek konsantrasyonda katepsin B gibi diğer bazı proteazları da inhibe edebilir, geri dönüşümlü inhibisyon yapar (Şekil 4). Velcade (PS-341), bir dipeptit boronik asit analogudur. Birçok tümör çeşidine (multiple miyeloma, lymphoma, prostat) karşı etkili olduğu görüldüğü için Amerikan Sağlık Bakanlığı tarafından kanser tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır. Velcade oldukça spesifiktir ve proteozomun kimotripsin benzeri aktivitesini geri dönüşümlü olarak inhibe eder (Şekil 4). PSI, kimotripsin benzeri aktiviteyi inhibe eder<sup>29,30</sup>.

### Ubiquitin proteozom yolu ve p53 proteini

p53 proteini proapoptotik bir protein olup tümör baskılayıcı protein olarak bilinir. Kaspaz 3, 7, 8 ve 9 enzimlerini aktive ederek apoptozisi uyarır ve kanser oluşumunu engeller. *In vivo* ve *in vitro* modellerde ubiquitin-proteozom yolu tarafından yıkıldığı bilinmektedir. Ayrıca hücre döngüsünün ilerlemesi ve hücre döngüsünün kontrolünde önemli görevlerinin olduğu gösterilmiştir<sup>20,31</sup>. p53'ün stabilizasyonu (yıkımının durması) birçok hücre kültürü modelinde apoptozise neden olmaktadır. Lopes ve Ark. proteozom inhibitörleri ile muamele edilen Rat-1 ve PC12 hücrelerinde tümör baskılayıcı p53 proteinin hızlı bir şekilde akümüle olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde p53 tarafından uyarılan CDK (siklin bağımlı kinaz) inhibitörü p21 proteini ve Mdm2 proteinlerinin de biriktiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada proteozom inhibitörleri ile uyarılan apoptozisin dominant-negatif p53 proteini ile bloke edildiğini fakat yabani tip p53 proteinin over-ekspresyonu (aşırı ifadesi) ile Rat-1 hücrelerinde apoptozisin uyarılması için yeterli olduğu görülmüştür. Yazarlar, bu hücre ölümüne diğer moleküllerinde katılabileceğini önermelerine rağmen elde ettikleri veriler proteozom inhibisyonu sonucunda p53 proteinin birikmesi ve akabinde hücre döngüsü inhibitörlerinden p21'in transkripsiyonun uyarılmasının apoptozis tetiklenmesinde anahtar bir rol oynadığını göstermektedir<sup>31</sup>. Yeni yayınladığımız makalemizde ise proteozom inhibitörü Velcade'in hem B16F10 melanoma hücrelerinde hem de 4T1 meme kanser hücrelerinde sitotoksik ve anti-proliferatif etki yarattığını rapor ettik. Proteozom inhibisyonu akabinde B16F10 melanoma hücrelerinin 4T1 meme kanser hücrelerine göre daha hassas olduğunu ve bu hassasiyette p53 tümör baskılayıcı proteinin anahtar rol oynadığı sonucuna vardık. Fakat, 4T1 hücreleri daha dirençli olmalarına rağmen yine Velcade ile apoptozise uğradıklarını gözlemledik. Bu da proteozom inhibisyonun 4T1 hücrelerinde p53-bağımsız bir şekilde apoptozis uyardığını da göstermektedir<sup>32</sup>. Kanserli dokularda p53 geninde yaygın bir şekilde mutasyonlara rastlanılmaktadır. Kolon kanserinin %70, akciğer kanserinin %50, ve göğüs kanserle-

rinin %20'inde p53'te mutasyonlar tespit edilmektedir<sup>10,33</sup>. p53 proteini aynı zamanda proapoptotik proteinlerden Bax ve Fas proteinlerinin sentezini uyararak ve Bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerin sentezini engelleyerek DNA hasarları durumunda apoptozisi tetikler<sup>34</sup>.

### Proteozom ve kanser ilişkisi

Proteozom inhibitörleri farklılaşmış ve bölünmeyen hücrelerin aksine spesifik olarak bölünebilen tümör hücrelerinde apoptozis uyarılmaktadır. Örneğin, bölünebilen insan lösemik HL60 hücreleri bölünemeyen (quiescent) HL60 hücrelerine göre proteozom inhibitörleri *N*-carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-norvalinal (LLnV) ve *N*-carbobenzoxy-L-isoleucyl-L- $\gamma$ -t-butyl-L-glutamyl-L-alanyl-L-leucinal (PSI) tarafından apoptozise daha duyarlı oldukları gösterilmiştir<sup>35</sup>. Fakat, bölünmeyen kontak inhibisyonlu (quiescent) hücrelerde proteozom inhibitörü PSI ile apoptozis uyarılmak için aktif bölünen primer endotel hücrelerde kullanılan dozun en az 340-kat daha fazla kullanılması gerekmektedir<sup>36</sup>.

Son zamanlarda yapılan bir diğer çalışma, sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında birçok kanser hastalarının (acute myeloid leukemia, AML, Hodgkin's disease, chronic myeloproliferatif syndrome ve solid tümör hastaları) plazmalarında 20S proteozom miktarının 1000-kat kadar yükseldiğini göstermiştir<sup>37</sup>. Bu çalışmalar, proteozom inhibitörlerinin spesifik olarak çoğalabilen hücrelerde apoptozise neden olduklarını; dolayısıyla, diğer anti-kanser ilaçlara göre daha avantajlı durumda olduklarını ve kanser tedavisinde daha etkili olabileceklerini göstermektedir. Proteozom inhibitörlerinin *in vitro* ve *in vivo* modellerde geniş spektrumlu aktivite göstermelerinden dolayı, son zamanlarda kanser tedavisinde önemli bir hedef molekül olarak proteozoma olan ilgi dramatik bir şekilde artmıştır. Hücre kültürlerinde, Velcade birçok katı ve hematolojik malignan tümör hücrelerinde (miyeloma, lenfoma, akciğer, ovaryum, pankreas, prostat, baş ve boyun kanserlerinde) apoptozisi uyardığı bilinmektedir. Apoptozisin proteozom tarafından yıkılan p53, p21, p27 ve proapoptotik proteinlerinin akümüasyonu aracılığı ile olduğu tahmin edilmektedir<sup>30</sup>. Velcade klinik denemelerde kanser tedavisinde kullanılan ilk proteozom inhibitörüdür. Faz I solid ve hematoloji malignan tümörlerde (özellikle multiple myeloma ve lenfomalar) umut verici bulgular elde edilmiştir ve Velcade üzerinde detaylı çalışmaların yapılması ve ileriki çalışmalarda diğer anti-kanser ilaçlar ile beraber (kombine) denenmesi tavsiye edilmiştir<sup>38,39</sup>.

### Kaynaklar

1. Doherty FJ. ve Mayer RJ. Intracellular protein degradation. IRL Press, Oxford; 1992.
2. Schimke RT. Protein degradation in vivo and its regulation. Circ Res 1976; 38, 1131-7.

## Protein Yıkımının Önemi

3. Voet DD. ve Voet JG. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York; 1995.
4. Yerlikaya A. ve Stanley BA. S-adenosylmethionine decarboxylase degradation by the 26 S proteasome is accelerated by substrate-mediated transamination. *J Biol Chem* 2004; 279, 12469-78.
5. Yerlikaya A. Cellular functions of the 26S proteasome. *Turk J Biol* 2004; 28, 31-38.
6. Varshavsky A. The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93, 12142-9.
7. Rechsteiner M. ve Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 1996; 21, 267-71.
8. Rogers SW. ve Rechsteiner MC. Microinjection studies on selective protein degradation: relationships between stability, structure, and location. *Biomed Biochim Acta*, 1986; 45, 1611-8.
9. Yerlikaya A. Protein sentezi ve yıkımı. In Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B. (eds.), *Moleküler Biyoloji*. Nobel Yayınevi, Ankara; 2007.
10. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K. ve Watson JD. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing, Inc., New York; 1994.
11. Agarraberes FA, Terlecky SR. ve Dice JF. An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *J Cell Biol* 1997; 137, 825-34.
12. Pillay CS, Elliott E. ve Dennison C. Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* 2002; 363, 417-29.
13. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326, 1-16.
14. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88, 355-65.
15. Philchenkov A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med* 2004; 8, 432-44.
16. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157, 1415-30.
17. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6, 1028-42.
18. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A. ve Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391, 43-50.
19. Hilt W. ve Wolf DH. Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci* 1996; 21, 96-102.
20. Hershko A. ve Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67, 425-79.
21. Jentsch S. The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet* 1992; 26, 179-207.
22. Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL. ve Rose IA. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77, 1783-6.
23. Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK. ve Varshavsky A. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 1989; 243, 1576-83.
24. Voges D, Zwickl P. ve Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68, 1015-68.
25. Pagano M. Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *Faseb J* 1997; 11, 1067-75.
26. He H, Qi XM, Grossmann J. ve Distelhorst CW. c-Fos degradation by the proteasome. An early, Bcl-2-regulated step in apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273, 25015-9.
27. Murakami Y, Matsufuji S, Kameji T, Hayashi S, Igarashi K, Tamura T, Tanaka K. ve Ichihara, A. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 1992; 360, 597-9.
28. Hershko A. Ubiquitin-mediated protein degradation. *J Biol Chem* 1988; 263, 15237-40.
29. Burger AM. ve Seth AK. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *Eur J Cancer* 2004; 40, 2217-29.
30. Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. *Cancer Cell* 2004; 5, 417-21.
31. Lopes UG., Erhardt, P., Yao, R. ve Cooper, G.M. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *J Biol Chem* 1997; 272, 12893-6.
32. Yerlikaya A. ve Erin N. Differential sensitivity of breast cancer and melanoma cells to proteasome inhibitor Velcade. *Int J Mol Med* 2008; 22, 817-23.
33. Kandioler D, Dekan G, End A, Pasching E, Buchmayer H, Gnant M, Langmann F, Mannhalter C, Eckersberger F. ve Wolner E. Molecular genetic differentiation between primary lung cancers and lung metastases of other tumors. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996; 111, 827-31.
34. el-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 1998; 8, 345-57.
35. Drexler HC. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94, 855-60.
36. Drexler HC, Risau W. ve Konerding MA. Inhibition of proteasome function induces programmed cell death in proliferating endothelial cells. *Faseb J* 2000; 14, 65-77.
37. Dutaud D, Aubry L, Henry L, Levieux D, Hendil KB, Kuehn L, Bureau JP. ve Ouali A. Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma. *J Immunol Methods* 2002; 260, 183-93.
38. Aghajanian C, Soignet S, Dizon DS, Pien CS, Adams J, Elliott PJ, Sabbatini P, Miller V, Hensley ML, Pezzulli S, Canales C, Daud A. ve Spriggs DR. A phase I trial of the novel proteasome inhibitor PS341 in advanced solid tumor malignancies. *Clin Cancer Res* 2002; 8, 2505-11.
39. Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, Shea TC, Baldwin AS, Stahl S, Adams J, Esseltine DL, Elliott PJ, Pien CS, Guerciolini R, Anderson JK, Depcik-Smith ND, Bhagat R, Lehman MJ, Novick SC, O'Connor OA. ve Soignet SL. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2002; 20, 4420-7.