

İKİNCİ BİR PROTEİN YIKIM SİSTEMİ : UBIQUITİN

Dr. İbrahim PİRİM x

Protein yıkımı bütün hücre tiplerinde meydana gelir. Bunu sağlayan sistem normal olarak proteinlerin yıkımının yanında denatüre olmuş ve yabancı proteinlerin yıkımında da sorumludur. Proteinlerin yıkım oranları homojenlik göstermesine rağmen, yıkımları itibariyle proteinler genel olarak iki gruba bölünebilirler; kısa ve uzun ömürlü (short-lived and long-lived) proteinler. Düzenleyici proteinler ya da enzimler çok çabuk yıkıma maruzdurlar, bu yüzden onların hücre içindeki seviyeleri uyarılara karşı hızlıca değiştirilebilir. Bunun yanında yapısal proteinler çok daha geç yıkıma uğrarlar. Protein yıkımı genel olarak iki ana kısma ayrılabilir (1,2):

- i) Lisosomal protein yıkımı
- ii) Lisosoma bağlı olmayan protein yıkımı

LİSOSOMAL PROTEİN YIKIMI

Hücre içindeki lisosomlar büyük bir hidrolitik enzim gurubunu ihtiva ederler (proteazlar). Bu proteazlar genel hatlarıyla proteinin içi peptid bağlarına etkili endopeptidazlar ile proteinleri amino yada karboksil ucunda kıran exopeptidazlardan ibarettir. Lisosomlar tarafından yıkılacak metaryal bu organellere iki yolla alınır;

1. Lisosomların endosomlarla füsyonu
2. Lisosomların autofagozomlarla füsyonu

Lisosomal protein yıkımı bazı temel bileşenlerce inhibe edilir. Chloroquine, NH₄Cl gibi maddeler organellerdeki pH'yı artırarak veya leupeptin gibi proteaz inhibitörleri lisosomlardaki protein yıkımını engellerler (3)

Genel olarak lisosomal yolla uzun ömürlü proteinlerin yıkıldığı bunun yanında lisosomlara bağlı olmayan ikinci bir sistemle kısa ömürlü proteinlerin hücre içinde yıkıldığı son zamanlarda yapılan deneylerle ispatlanmıştır.

(x) Atatürk Üniv. Tıp Fak. Biyokimya Bölümü Arş. Gör.

LİSOSOMLARA BAĞLI OLMAYAN PROTEİN YIKIM SİSTEMİ

Lisosomlara bağlı olmayan ve kısa hayatlı anormal proteinlerin yıkımında en önemli mekanizma ubiquitin sistemidir. Bu sistemin vazifesi ubiquitin denen küçük bir polipeptidin, yıkılacak proteine bağlanarak onları işaretleyip bir seri enzim ve bu enzimlerin reaksiyonlarını içine alan sisteme anormal proteini yıkım için tanıtmaktır (4).

Ubiquitin Goldstein ve arkadaşları tarafından 1975 yılında keşfedilmiş ve proteinin üç boyutlu yapısı Vijay-Kumar ve çalışma arkadaşlarınca 1985 yılında açığa kavuşturulmuştur (5).

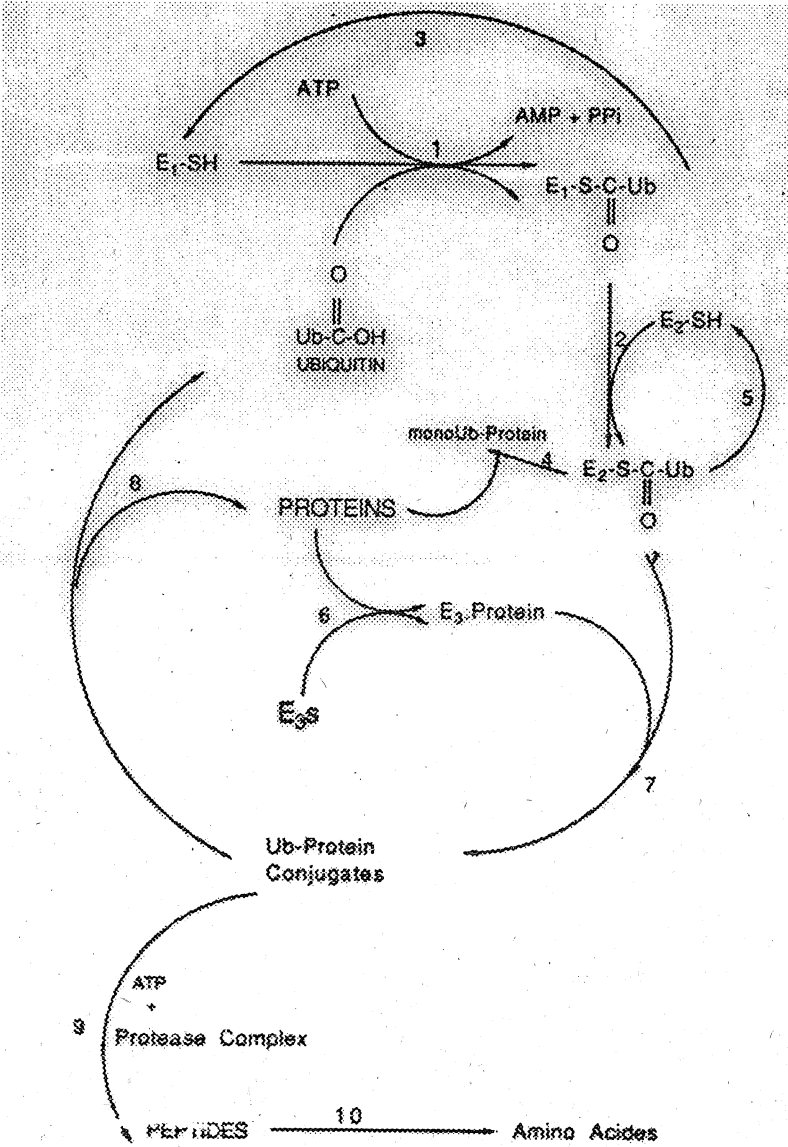
Ubiquitin 76 amino asitlik 8565 dalton molüküler ağırlığa sahip olan bir proteindir. Bu protein bütün ökaryotik hücrelerde mevcut olup türler arasında iyi korunmuştur. Sadece insan ve mayada bulunan türler arasında protein uç amino asitlik bir farklılık gösterir (6). Protein denatürasyona karşı tamamen direnclidir. Ayrıca ubiquitinin en önemli özelliği, çeşitli sebeplerle ortaya çıkan nöronal harabiyet sonucu sinir hücresinde ubiquitin mevcudiyetinin aşırı bir şekilde artışının olmasıdır.

Ubiquitin protein yıkımında görev alması, retikulositlerde ATP ye bağımlı proteolitik sistemin incelenmesi sırasında keşfedilmiştir. Daha sonra ubiquitin mekanizması ayrıntılı olarak çalışılmıştır (7).

UBİQUITİN VE HÜCRE İÇİ PROTEİN YIKIMI

Ubiquitin hücre içinde kısa ömürlü anormal proteinlere ATP ye bağımlı bir reaksiyonla kovalent bağlarla bağlanmaktadır ve bu proteinler hızlı bir şekilde yıkıma uğramaktadır. Bu kovalent bağlanma proteini etiketleyip lizozomlara bağlı olmayan sistem tarafından tanınmasını sağlamaktadır. Bu mekanizmanın ökaryotik hücrelerde ortak bir mekanizma olduğu düşünülmektedir (8).

Ubiquitinin hedef proteine konjugasyonu bir çok basamaklı bir yoldur. İlk önce ubiquitin ubiquitin-adenylate formunu oluşturmak üzere aktif hale getirilir. Bunu ubiquitin aktifleyici enzim (E1) yapar, daha sonra ubiquitin E1 enzimi üzerindeki ikinci bir bağlanma yerine transfer edilerek enzim üzerindeki sistein residüsünün sağladığı sülfür gurubu (-SH) ile ubiquitinin karboksi terminal gurubu arasında tiol ester formunu oluşturur (9-11). İkinci basamakta ubiquitin, ubiquitin taşıyıcı enzim olarak bilinen (E2) enzimin tiol gurubuna aktarılır (12,13). Son basamakta ubiquitin hedef proteine peptid bağıyla bağlanır. Bu bağlanmayı ubiquitin lıgase (E3) denen enzim sağlar (14,15). Ubiquitinlenmiş bu protein sistosol içinde büyük bir moleküler ağırlığa sahip (1000kDa) multikatalitik proteinas kompleksi tarafından ubiquitinlenmiş protein bileşenlerine ayrılır ve ubiquitin tekrar kullanılmak üzere serbest bırakılır (16-18). Bu sistemin işleyişi şekil 1 de şematik olarak izah edilmiştir.



1. Ubiquitin aktivasyon enzimi ile (E1) ubiquitin'in aktif hale getirilmesi.
2. Aktif hale getirilmiş ubiquitin'in, ubiquitin taşıyıcı enzime (E2) transferi
3. E1 enziminin tekrar kullanılmak üzere ayrılması.
4. Ubiquitin'in proteinle birleşmesi.
5. E2 enziminin tekrar kullanılmak üzere ayrılması.
6. Yıkılacak proteine ubiquitin'in transferi için ubiquitin ligas enziminin (E3) iştiraki.
7. Substrat proteine ubiquitin'in birleşmesi.
8. Ubiquitin'in tekrar kullanılması.
9. ATP-bağımlı proteaz tarafından ubiquitinlenmiş proteinin tanınması ve yıkımı.
10. Peptidlere kadar yıkılan proteinin amino acidlerine kadar ayrılması.

Şekil 1.: Lisosomlara bağlı olmayan sistem vasıtasıyla kısa ömürlü proteinlerin, ubiquitin sistemi tarafından yıkımının şematik olarak izahı.

UBİQUITİNİN NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARDAKİ ROLÜ

Ubiquitinlenmiş proteinler dejenere olmuş nöronlar içinde anormal nörofilamentlerin meydana getirdiği hücre içi inklüjin lara bağlandığı tesbit edilmiştir (19,21). Bu inklüjinlar değişik nörodejenaratif hastalıklarda değişik isim almaktadır. Alzheimer hastalığına sipesifik nörofibrilleri tangıls, Parkison hastalığında Lewy badiler ve motor nöron hastalığında inklüjin badiler (22-24). Bütün bu genel olarak hastalığa sepesifik anormal hücre içi flamentlerin ubiquitinlendiği immunohistokimyasal metodlarla son zamanlarda tesbit edilmiş olup, ubiquitin bu yapılara iştirakinin bu anormal yapıları ortadan kaldırmak için görev yaptığı sanılmaktadır (25).

SUMMARY

THE SECOND PROTEIN DEGRADATION SYSTEM CALLED UBIQUITIN

The small (76 residue) basic protein ubiquitin is abundant in all eukaryotes so far examined, but is absent from prokaryotes. Ubiquitin appears to function through covalent attachment to other proteins, a novel posttranslational modification that is turning out to have great biological importance.

Ubiquitin-protein conjugates are found in intracellular filamentous inclusion bodies in degenerating neurones. These accumulations of insoluble proteins include the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease, Lewy bodies in Parkinson's disease and inclusion bodies in motor neurone disease.

KAYNAKLAR

1. Hershko, A. and Ciechanover, A.: The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev. Biochem.* 61: 761-778, 1992.
2. Gropper, R. et al.: The ubiquitin activating enzyme is required for stress induced lysosomal degradation of cellular proteins. *J. Biol. Chem.* 266 (6): 3602-3610, 1991.
3. Duerksen-Hughes, P. et al.: Affinity chromatography using protein immobilised via arginine residues: Purification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Biochemistry* 28: 8530-8536, 1989.
4. Chau, V. et al.: A multi ubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243: 1576-1583, 1989.
5. Vijay-kumar, S. et al.: Three-dimensional structure of ubiquitin at 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3582-3587, 1985.
6. Özkaynak, E. et al.: The yeast ubiquitin genes. *EMBO J.* 6: 1429-1439, 1987.

7. Wilkinson, K.D. et al.: Alcohol-induced conformational changes of ubiquitin. Arch. Biochem. Biophys. 250: 378-383, 1986.
8. Schesinger, D.H. et al.: The complete amino acid sequence of ubiquitin an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. Biochemistry 10 (14): 2214-2218, 1975.
9. Handley, P.: Molecular cloning, sequence and tissue distribution of the human ubiquitin activating enzyme. E1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 258-262, 1991.
10. Hoefer, M. and Cook, J.C.: Purification and partial characterisation of ubiquitin-activating enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS lett. 389 (1): 54-58, 1991.
11. Hersshko, A. and Ciechanover, A.: The ubiquitin system for protein degradation. Annu. Rev. Biochem. 61: 761-778, 1992.
12. Pickart, C. and Rose, I.: Functional-heterogeneity of ubiquitin carrier proteins. J. Biol. Chem. 260 (3): 1573-1581, 1985.
13. Klemperer, N. et al.: A novel arsenite-sensitive E2 of the ubiquitin pathway purification and properties. Biochemistry 28 (14): 6035-6041, 1989.
14. Hershko, A. et al.: The protein substrate binding site of the ubiquitin-protein system. J. Biol. Chem. 261 (26): 1992-1999, 1986.
15. Reiss, Y. et al.: Specificity of binding of NH₂-terminal residue of proteins to ubiquitin protein ligase use of amino acids derivatives to characterise specific binding sites. J. Biol. Chem. 263 (6): 2693-2698, 1988.
16. Hershko, A. et al.: ATP dependent degradation of ubiquitin protein conjugates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 1619-1623, 1984.
17. Hough, R. et al.: purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte. J. Biol. Chem. 262: 8303-8310, 1987.
18. Waxman, L. et al.: Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes one of which degrades ubiquitin conjugates. J. Biol. Chem. 262: 2451, 2457, 1987.
19. Lowie, J. et al.: Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusions. J. Pathol. 155: 9-15, 1988.
20. Mori, H. et al.: Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. Science 235: 1641-1648, 1987.
21. Perry, G. et al.: Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaques neurites of Alzheimer brain. Proc. Natl. Sci. USA. 84: 303-3039, 1987.

22. Cole, G. and Timiras, P.: Ubiquitin protein conjugates in alzheimer's lesions. *Neurosci. Lett.* 79: 207-211, 1987.
23. Lowe, J. et al.: A filamentous inclusions body within anterior horn neurons in MND defined by immunocytochemical localisation of ubiquitin. *neurosci. Lett.* 94: 203-210, 1988.
24. Manetto, V. et al.: Ubiquitin is associated with abnormal cytoplasmic filaments in neuro degenerative disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 4501-4506, 1989.
25. Brion, J. et al.: Heterogenity of ubiquitin immunoreactivity in neurofibrillary tangles. *Neurochem. Int.* 14 (2): 121-129, 1991.