

Ubikitin Sistem

UBIQUITIN SYSTEM

Yıldız GÜNEY*, Ayşe BİLGİHAN**

* Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD,
** Doç.Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, ANKARA

Özet

Ubikitin, yüksek oranda korunmuş, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan, ısıya dayanıklı, 76 amino asitlik bir polipeptittir. ATP bağımlı proteolitik yoldan sorumludur. Ubikitin hedef proteinlere ubikitin aktive edici enzim (E1), ubikitin bağlayıcı enzim (E2) ve tanıyıcı protein (E3) yardımı ile kovalent olarak bağlanır. Poliubikitine proteinler daha sonra 26S proteozom tarafından yıkılırlar. Regülatör proteinlerin ubikitin aracılı yıkımı, hücre siklus progresyonu, sinyal ileti, transkripsiyonel düzenleme ve apoptozis gibi metabolik olayların kontrolünde önemli rol oynar. Ubikitin ayrıca birçok hastalığın patolojisi ile ilişkilidir ve son yıllarda yapılan çalışmaların ışığında insan serumunda ubikitin tayini klinik uygulamalarda yer alabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Ubikitin, Proteozom, İyonize radyasyon, Serum ubikitin

T Klin Tıp Bilimleri 2002, 22:616-619

Summary

Ubiquitin is a highly conserved, heat stable, 76 amino acid polypeptide, though to be present in all eukaryote cell types and is responsible for an ATP-dependent proteolytic pathway. Ubiquitin covalently attaches to target proteins with the help of ubiquitin activating enzyme (E₁), ubiquitin conjugating enzyme (E₂), and recognizing protein (E₃). Polyubiquitinated proteins are then (recognized and) degraded by the 26S proteasome.

Ubiquitin-mediated degradation of regulatory proteins plays important roles in the control of cell cycle progression, signal transduction, transcriptional regulation and apoptosis.

Ubiquitin may additionally be involved in the pathogenesis of various diseases, determination of ubiquitin forms in human serum could be important to find possible clinical applications.

Key Words: Ubiquitin, Proteasome, Ionizing radiation, Serum ubiquitin

T Klin J Med Sci 2002, 22:616-619

Tüm ökaryotlarda, ubikitin sistem önemli nonlizozomal proteolitik bir yoldur (1). Amino asit siklusunun sağlanması ve hatalı istenmeyen proteinlerin uzaklaştırılması için proteinler yıkılır. Yıkılma seçici bir olaydır (1,2). Ökaryotlarda hücre içi proteinlerin yıkımı için iki önemli yol mevcuttur.

1) Uzun ömürlü hücre içi proteinler lizozomlarda ATP'den bağımsız bir yol aracılığıyla yıkılır.

2) Kısa ömürlü veya hatalı proteinler ise sitozolde ATP bağımlı ubikitin (Ub) aracılı sistem ile yıkılır (2).

Ubikitin tüm ökaryotik hücrelerde bulunan ısıya dayanıklı, küçük (8.5 kDa) bir proteindir (3). 76 aminoasit içeren Ub'nin primer yapısı yüksek oranda korunmuştur. Maya ve insan Ub'inde 76 aminoasitten sadece üçü farklıdır (4).

Regülatör proteinlerin Ub aracılı yıkımı birçok metabolik olayda önemli rol oynar (5,6):

- Hücre siklus progresyonu
- Sinyal ileti

- Transkripsiyonel düzenleme
- Reseptör down regülasyonu
- Endositozis
- İmmün yanıt
- Apoptozis bunlara örnek verilebilir.

Ub ayrıca birçok hastalığın patogenezi ile de yakından ilişkilidir. Ub veya Ub konjugatlarının birikimi nörodejeneratif hastalıklar (7), kas hastalıkları (8), beyin iskemisi (9) ve kanserde (10) saptanabilir. Serum Ub düzeyleri parazitik ve allerjik hastalıklarda (11), Alzheimer hastalığında (12), kronik böbrek hastalarında hemodializ tedavisi sırasında (13) artar.

Ub sistemindeki hatalar patolojik olaylara neden olabilir. Bunlardan en çarpıcı olanı malign transformasyondur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, temel biyolojik işlemlerde Ub aracılı protein yıkımının önemi vurgulanmıştır. Hücre siklus progresyonunda, siklus düzenleyici proteinlerin (siklin, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri ve anafaz inhibitörleri) seçici ve programlı

yıkımı önemlidir. Hücre büyümesi ve proliferasyonu tümör baskılayıcılarının, protoonkogenlerinin ve sinyal ileti komponentlerinin Ub aracılı yıkımı ile kontrol edilir (2).

Ubikitin Sisteminin Enzimatik Reaksiyonları

Ub sistemi sitozolik ve nükleer proteinleri ATP ve Ub bağımlı mekanizma ile yıkar. Substrat proteinleri yıkım için poliubikitin zincirine hedeflenmişlerdir. Reaksiyonda E1, E2 ve E3 olmak üzere üç farklı enzim görev alır (2,14). Şekil 1'de bu reaksiyonlar gösterilmiştir.

- 1. Basamak: Ub'nin karboksil (C) terminalindeki glisin kalıntısı E1(aktive edici enzim) tarafından uyarılır. ATP gereklidir. Ub adenilatın ara formu oluşur ve PPI salınır. Bunu takiben Ub E1'deki sistein kalıntısına tiolester bağı ile bağlanır ve AMP açığa çıkar.
- 2. Basamak: Aktive Ub, E2 enziminin sistein kalıntısına transfer edilir.
- 3. Basamak: E3 (Ub protein ligaz) Ub'i hedef proteinin lizin grubuna transfer eder. Ub'nin C

terminalindeki glisin ile substrat proteininin amino grubundaki lizin kalıntısı izopeptit bağı ile bağlanır.

Ubikitin-Protein Konjugat Yıkımı

Poliubikitin zinciri, Ub C terminalinin bir önceki Ub'nin lizin kalıntısına bağlanması ile oluşur. Olay geri dönüşümlüdür. Ub ile lizin kalıntısı arasındaki izopeptit bağı izopeptidaz (Ubikitin bağımlı proteaz-Ubp) tarafından yıkılarak serbest Ub açığa çıkar (10).

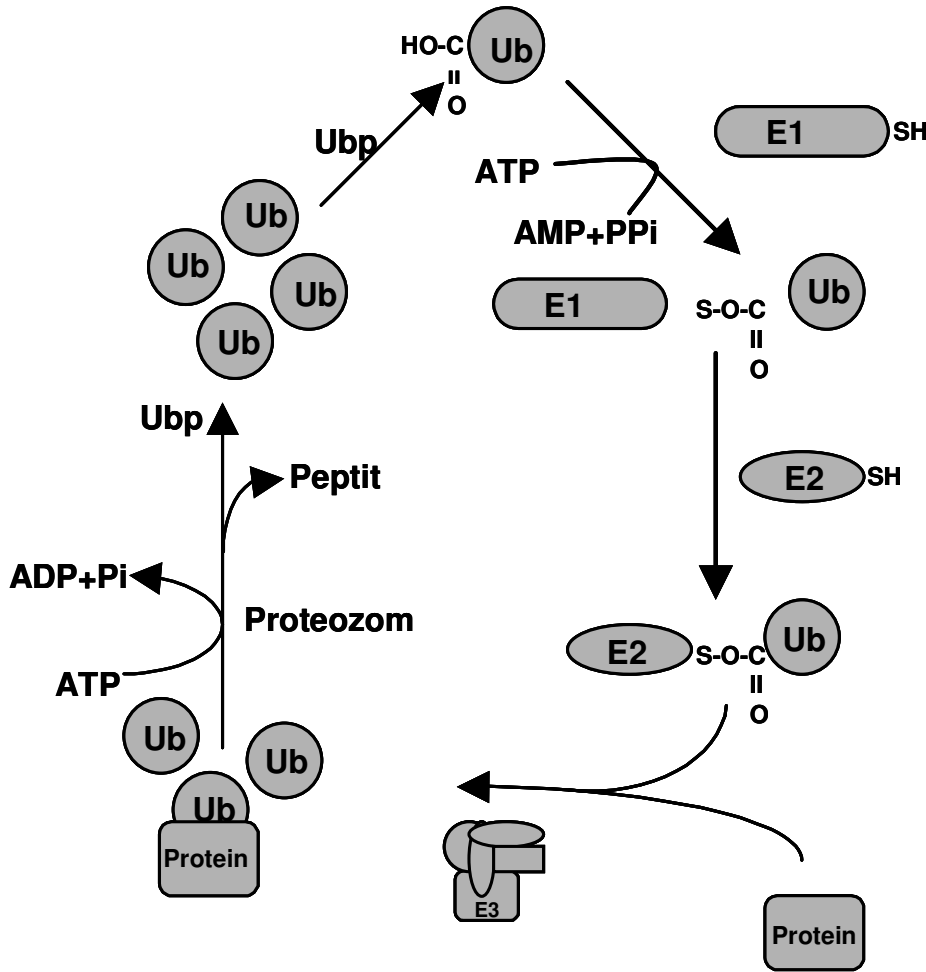
26S Proteozom Kompleksleri

Poliubikitin proteinler 26S proteozomlar için birer substrattır. 26S proteozom üç büyük alt ünit kompleksi içerir. Bunlar 20S proteozom core (çekirdek) partikül ve 2 tane 19S cap (regülatör) partiküldür (14,15).

Ubikitin Sistemi Tarafından Yıkılan Hücresel Proteinler

I. Hücre Siklus Düzenleyicileri

Ubikitin yolunun çok önemli bir fonksiyonu da hücre siklus regülasyonunu sağlamasıdır. Siklinlerin yıkımında



Şekil 1. Ubikitin sisteminin enzimatik reaksiyonları (Ub: Ubikitin, Ubp: Ubikitin bağımlı proteaz)

ubikitinasyon gerçekleşmektedir. Hücre içi proteinlerden olan siklinler siklin-bağımlı kinazları (sbk) aktive ederler. Siklinlerin ubikitinasyonu sonrası ubikitin-siklin kompleks yıkılır ve sbk inaktive olur.

Ökaryotik hücre-siklus regülasyonu siklin-bağımlı kinazların aktivitesindeki dalgalanmalarla düzenlenir (16). Sbk aktivitesi:

- a) Periyodik sentez,
- b) Pozitif regülatör alt ünitelerin ve siklinlerin yıkımı,
- c) Sbk inhibitörlerine bağlı oluşan negatif regülatör seviyelerindeki değişimler,
- d) Reversibl fosforilasyon ile sağlanır (17).

II. Transkripsiyon Faktörleri, Tümör Baskılayıcıları ve Onkoproteinler

Kısa ömürlü regülatör proteinlerdir. Aktiviteleri Ub sistem aracılı proteoliz tarafından kontrol edilir. Bunlar arasında NF- κ B, p53, β -Katenin ve E2 F-1 sayılabilir (18) .

NF- κ B (Nükleer factor kappa B)

Bağışıklık, stres, enflamatuar, gelişme ve akut faz yanıtları ile ilgili gen ekspresyon aktivasyonunu sağlar (9,17). İnaktif NF- κ B heterodimeri sitoplazmada nükleusa translokasyonu inhibe eden inhibitör κ B- α (IB)'ye bağlı olarak bulunur (19,20).

Patojenler (virus-bakteri), radyasyon, bazı kemoterapötik ajanlar, sitokinler (TNF α , IL-1) hücre içi sinyal ileti yoluyla NF- κ B'yi aktive eder. Bu aktivasyon da apoptozis inhibisyonuna neden olur. Ub IB'ye kovalen bağlanır, fosforile olur, fosfo IB hızla 26S proteozom tarafından yıkılır, NF- κ B'nin nükleer translokasyonu gerçekleşir (19,20).

Böylece aktive NF- κ B antiapoptotik etki gösterir. Ub proteozom yolu inhibe edilerek NF- κ B transkripsiyonel faktörün blokajı tümör hücre ölümünü fazla miktarda artırır (21). Pankreas kanser hücrelerinde Ub proteozom yolu PSI (N-carbobenzoxy-L-isoleucyl-L- γ -t-butyl-L-glutamyl-L-alanyl-L-leucinal) ile inhibe edilerek TNF- α 'nın indüklediği programlı hücre ölümü artırılmıştır (20). Russo'nun (22) çalışmasında proteozom inhibisyonu ile radyasyon duyarlılığının artırılması amaçlanmıştır. Radyasyon uyarılı NF- κ B aktivasyonunun inhibisyonu ile apoptozis artmış ve hücre büyümesi, hücre klonlarının yaşam süresi azalmıştır. Sonuçlar PS 341 (proteozom inhibitörü) kullanımının kolorektal kanserlerde radyoduyarlılığı arttıracığını göstermiştir (23,24).

P53

Tümör baskılayıcı, yarı ömrü 25-30 dakika olan, çekirdekte yerleşmiş labil bir proteindir (10,25). Hüresel stres ve DNA hasarı sonrası, P53 stabilize olur. Büyümenin durmasına ve apoptozise öncülük eder . DNA hasarından hemen sonra P53 protein düzeyi artar.

Mutlak P53 protein seviyesi ve cevap süresi hasarın şekline bağlı olarak değişebilir (25). P53'ün kümelenmesi yıkımdan sorumlu Ub sisteminin down regülasyonuna bağlıdır (26).

İyonize radyasyon, önemli sinyal ileti yollarının aktivasyonunu transkripsiyonel, post-transkripsiyonel mekanizmaların regülasyonu ile sağlar. Ökaryotlardaki önemli posttranskripsiyonel yollardan biri, proteinlerin 26S proteozom tarafından yıkımıdır. Bu olay transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin kontrolü altında inflamatuvar yanıtlarının düzenlenmesinden sorumludur (27).

İşnlama ve inflamasyon arasındaki ilişki paradoksaldir. Yüksek doz işnlama pro-inflamatuar, düşük doz işnlama ise inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılır. Farklı dozlarda iyonize radyasyon ECV 304 hücrelerine uygulanarak 26S proteozom aktivitesi incelenmiştir. İnhibitör etkisi endojen proteozom inhibitörü Hsp90'dan bağımsızdır. IB ve 26S proteozom düşük dozlarda (0.25 Gy) artarken, 8-20 Gy gibi yüksek dozlarda NF- κ B aktivasyonu artar (28).

Hastalıklarda Serumda Ubikitin ve Ubikitine Protein Ölçümü

Ubikitin-proteozom yolunda serbest ubikitin (monoubikitin) hüresel proteinlerin konjugasyonu için bulunur. Multiubikitin zinciri ise yıkımı tetikleyen aktif formudur. RIA serbest ubikitini, ELISA multiubikitin zincirini saptamada tercih edilen yöntemlerdir (29).

Serum multiubikitin zincir konsantrasyonu akut viral hepatit hastalarında serum transaminazlarına paralel olarak artar.

Bu hastalarda serum multiubikitin zincir konsantrasyonu akut fazda artarken, iyileşme döneminde azalmaktadır. Bu değerler ALT ve AST aktiviteleri ile bağlantılıdır (30). Multiubikitin zincirleri kana hepatosellüler hasar sonrası salınır. Bir başka çalışmada da serum multiubikitin zincirlerinin ölçümünün alkolik siroz tanısı için bir markır olabileceği belirtilmektedir (31).

Multiubikitin zincirleri ve serbest ubikitin serum konsantrasyonları hemodializ hastalarında da çalışılmıştır. Okada ve arkadaşları hemodiyaliz tedavisi gören hastaların serum ubikitin değerlerini sağlıklı bireylere göre daha yüksek bulmuşlar ve bunu da amiloidozis ve hemodiyaliz süresi ile ilişkilendirmişlerdir (13). Akarsu ve arkadaşları da çalışmalarında diyaliz etkinliğini serum ubikitin seviyeleri ile değerlendirmişler ve etkin bir diyaliz sonrası ubikitin-proteozom yolunu patolojik olarak aktive eden olası faktörlerin eliminasyonu sonucu serum ubikitin düzeylerinde değişim olabileceğini belirtmişlerdir (32).

Diabetes mellitus (DM), ubikitin proteozom yolu aktive eden diğer bir hastalıktır. Ubikitin proteozom yolu diabetik nöropatide önemli rol oynar. Nöronlardaki proteinlerin ubikitinasyonu bu nöronları, hasarlanmış nöronal proteinlerin ve organellerin kronik atağından

korur. Patolojik olarak aktive edilmiş protein ubiquitinasyonu geç dönem hücrel hasarda irreversible katabolik olayın bir parçası olup nöronal ölüme yol açabilir. Yüksek serum ubiquitin düzeylerine sahip Tip II DM hastalarında, periferik sinir aksonlarında genlik azalması saptanmıştır. Serum ubiquitin düzeyleri ile akson genlikleri arasında ters ilişki bulunmuştur (33).

Ubikitin-proteozom yolu kanser araştırmalarında da önemli bir çalışma alanıdır. Ewing's sarkom hücrelerine uygulanan iyonize radyasyon sonrası apoptozisin arttığı ve konjuge formdaki ubiquitine proteinlerin biriktiği gösterilmiştir (34).

İyonize radyasyonun ubiquitin sistem üzerine etkisi çalışılmaktadır. Ancak serum ubiquitin düzeyleri ile radyoterapi arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Solid tümörlü hastaların radyoterapiye cevaplarının tahmininde akut kriter eksikliği önemli bir problemdir. Bu amaçla bölümümüzde radyoterapi uygulanan solid tümörlü hastalarda serum ubiquitin düzeylerini araştıran bir çalışma başlatılmıştır.

Ubikitin-proteozom yolu daha birçok hastalığın patogenezi ile ilgilidir. Sepsis, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve kas hastalıklarında da ubiquitin-proteozom yolunun önemi vurgulanmaktadır. Bu hastalıklarla ilgili yapılan ve yapılacak çalışmaların ışığında insan serumunda ubiquitin tayini klinik uygulamalarda yer alabilecektir.

KAYNAKLAR

- Fujimuro M, Sawada H, Yokosawa H. Production and characterization of monoclonal antibodies specific to multi-ubiquitin chains of polyubiquitinated proteins. *FEBS Letters* 1994; 349: 173-80.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev. Biochem.* 1992; 61:761-78.
- Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;81:1000-105.
- Rodwell VW. Catabolism of proteins and of amino acid nitrogen. In: Murray RK et al, eds. *Harper's Biochemistry*. 25th ed. Appleton and Lange, 2000:313-22.
- Ozkaynak E, Finly D, Wilkinson K, Cook W. Three dimensional structure of ubiquitin at 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 3582-7.
- King RW. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 1996; 274: 1652-9.
- Blennow K, Davidson P, Wallin A, Gottfries CG, Svennerhorn L. Ubiquitin in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Int Psychogeriatr* 1994; 6 (1): 13-22.
- Askanas V, Serdaroglu P, Engel WK, Alvarez RB. Immunolocalization of ubiquitin in muscle biopsies of patients with inclusion body myositis and oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurosci Lett* 1991; 130:73-6.
- Hayashi T, Tanaka J, Kamikuba T, Takata K, Matsuda M. Increase in ubiquitin conjugates dependent on ischemic damage. *Brain Res* 1993; 620: 171-3.
- Spatara V, Norbury C, Harris AL. The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *British Journal of Cancer* 1998; 77 (3): 448-55.
- Asseman C, Pancre V, Delanoye A, Capron A, Auriault C. A radioimmunoassay for the quantification of human ubiquitin in biological fluids: application to parasitic and allergic diseases. *J. Immunol Methods* 1994; 173: 93-101.
- Kudo T, Iqbal K, Rauid R, Swaab DF, Gundke-Iqbal I. Alzheimer's disease. Correlation of cerebro-spinal fluid and brain ubiquitin levels. *Brain Res* 1994; 639:1-7.
- Okada M, Miyazaki S, Hirasawa Y. Increase in plasma concentration of ubiquitin in dialysis patients: Possible involvement in β 2-microglobulin amyloidosis. *Clin Chim Acta* 1993;220:134-44.
- Schetter M, Hutbreyts JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E₆ and E₆AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993; 75:495-505.
- Rubin D, Finley D. The proteasome; a protein-degrading organelle. *Curr Biol* 1995; 5: 854-8.
- Yamao F. Ubiquitin System: Selectivity and Timing of Protein Destruction. *J. Biochem* 1999; 125:223-9.
- King RW, Glotzer M, Kirschner MW. Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 1343-57.
- Pahl HL, Baeuerle PA. Control of gene expression by proteolysis. *Curr Opin Cell Biol* 1996; 8: 340-7.
- Wang CY, Mayo MW, Baldwin ASJ. TNF and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science* 1996; 274: 784-7.
- Mcdade TP, Perugini RA, Vitimberga FJ Jr, Callery MP. Ubiquitin-proteasome inhibition enhances apoptosis of human pancreatic cancer cells. *Surgery* 1999; 126 (2): 371-7.
- Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B, precursor protein and the activation of NF- κ B. *Cell* 1994; 78 : 773-85.
- Russo SM, Tepper JE, Baldwin AS Jr, Liu R , Adams J, Elliott P, Cusack JC. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: Implications for a role of NF- κ B. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50(1):183-93.
- Han SY, Choung SY, Paik IS, Kang HJ. Activation of NF- κ B determines the sensitivity of human colon cancer cells to TNF- α induced apoptosis. *Biol Pharm Bull* 2000;23(4):420-6.
- Teicher BA, Ara G, Herbst R, Palombella VJ, Adams J. The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 1999; 5:9 2638-45.
- Cox LS, Lane DP. Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *Bioessays* 1995; 17: 501-8.
- Harris CC. Structure and function of the p53 tumour suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:1442-55.
- Basu S. The DNA-dependent protein kinase participates in the activation of NF- κ B following DNA damage. *Biochem Biophys Res. Commun* 1998; 247 (1): 79-83.
- Pajonk F, Macbride WH. Ionizing radiation affects 26S proteasome function and associated molecular responses, even at low doses. *Radiotherapy and Oncology* 2001; 59: 203-12.
- Takada K, Hibi N, Tsukada Y, Shibasaki T, Ohkawa K. Ability of ubiquitin radioimmunoassay to discriminate between monoubiquitin and multi-ubiquitin chains. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1290: 282-8.
- Takada K, Nasu H, Hibi N, Tsukada Y, Shibasaki T, Fujise K, Fujimuro M, Sawada H, Yokosawa H, Ohkawa K. Serum concentrations of free ubiquitin and multiubiquitin chains. *Clin Chem* 1997;43(7): 1188-95.
- Takagi M, Yamauchi M, Toda G, Takada K, Hiraoka T, Ohkawa K. Serum ubiquitin levels in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23(4 Suppl):765-809.
- Akarsu E, Pirim İ, Selçuk NY, Tombul HZ, Çetinkaya R. Relation between serum ubiquitin levels and KT/V in Chronic Hemodialysis Patients. *Nephron* 2001;88:280-2.
- Akarsu E, Pirim I, Çapoğlu I, Deniz Akçay G, Unuvar N. Relationship between electro-neurographic changes and serum ubiquitin levels in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24(1):100-4.
- Soldatenkov VA, Dritschilo A. Apoptosis of Ewing's sarcoma cells is accompanied by accumulation of ubiquitinated proteins. *Cancer Res* 1997;57:3881-5.

Geliş Tarihi: 15.03.2002

Yazışma Adresi: Dr. Yıldız GÜNEY
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya AD, ANKARA