

## Endoplazmik Retikulum Protein Kalite Kontrol Mekanizması Üyelerinde Varsayılan Androjen Cevap Elementlerinin Profillemesi

### Profiling of Putative Androgen Response Elements in Endoplasmic Reticulum Protein Quality Control Mechanism Members

Yalçın ERZURUMLU<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Biyokimya Anabilim dalı, Eczacılık Fakültesi, Süleyman Demirel Üniversitesi, 32260, Çünür, Isparta, Türkiye

## Ö Z E T

**Amaç:** Çalışmamızda endoplazmik retikulum protein-kalite kontrol mekanizması ile ilişkili genlerin promotor dizilerindeki varsayılan androjen cevap elementi bölgelerinin biyoinformatik araçlardan faydalanılarak *in silico* olarak analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bu yol ile ER'deki protein-kalite kontrol mekanizmasının androjenler ile gerçekleşebilecek olası regülasyonunun tanımlanması ve prostat kanserindeki rolünün anlaşılması hedeflenmiştir. **Materyal ve Metot:** Endoplazmik Retikulum protein-kalite kontrol mekanizmasına ile ilişkili 29 hedef genin promotor dizileri University of California, Santa Cruz ve Eukaryotic Promotor Database veri tabanları kullanılarak belirlenmiştir. Tanımlanan bu diziler matinspector biyoinformatik aracına aktarılarak selektif transkripsiyon faktörü olarak çalışan androjen reseptörü ile DNA'nın etkileşimine aracılık ederek seçici transkripsiyon sürecine olanak sağlayan varsayılan androjen cevap elementi motifleri analiz edildi. *In silico* analizler V\$GREF benzeşim matrixi kullanılarak sürdürüldü. **Bulgular:** *In silico* analiz sonuçlarımız Endoplazmik Retikulum protein kalite kontrol mekanizması ile ilişkili olarak incelediğimiz 29 adet genin promotor ve promotor bölge yakınında varsayılan androjen cevap elementi bölgelerinin bulunduğunu göstermiştir. **Sonuç:** Sonuçlarımız Endoplazmik Retikulum protein-kalite kontrol mekanizmasında yer alan proteinlerin androjen sinyal mekanizması aracılığıyla selektif olarak düzenlenebileceğini önermektedir. Olası bu regülasyon prostat kanseri gibi androjen sinyal iletiminin son derece kritik öneme sahip olduğu patolojilere ilişkin süreçlerin anlaşılabilmesine yol gösterici olacaktır. Her ne kadar biyoinformatik analizlerde varsayılan androjen cevap elementi bölgeleri tanımlanmış olsa da bu bölgelerin fonksiyonelliğine ilişkin ileri analizlerin gerçekleştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Androjen Cevap Elementi, Endoplazmik Retikulum, Prostat Kanseri, Protein Kalite Kontrol Mekanizması, *In silico* analiz

Alınış / Received: 17.10.2020 Kabul / Accepted: 18.11.2020 Online Yayınlanma / Published Online: 25.04.2021

## ABSTRACT

**Aim:** In our study, we aimed to *in silico* analyze the putative androgen response element regions in the promoter sequences of endoplasmic reticulum protein-quality control mechanism related genes by using bioinformatics tools. In this way, it is aimed to define the possible regulation with androgens of protein-quality control mechanism in the ER and to understand its role in prostate cancer. **Material and Method:** Promoter sequences of 29 target genes associated with the Endoplasmic Reticulum protein-quality control mechanism were determined using University of California, Santa Cruz ve Eukaryotic Promotor Databases. These sequences were transferred to the matinspector bioinformatics tool, and the putative androgen response element motifs that enable the selective transcription process by mediating the interaction of DNA with the androgen receptor, which works as a selective transcription factor, were analyzed. *In silico* analyzes was carried out using the V\$GREF similarity matrix. **Results:** Our *in silico* analysis results showed that there were putative androgen response element regions of the 29 genes we examined in relation to endoplasmic reticulum protein-quality control mechanism components near the promoter and promoter region. **Conclusion:** Our results suggest that proteins that play a role in the endoplasmic reticulum protein-quality control mechanism might be selectively regulated by the androgen signaling mechanism. This possible regulation will be a guide to understanding the processes related to pathologies such as prostate cancer where androgen signal transduction is highly critical. Although putative androgen response element regions have been defined in bioinformatic analyzes, further analysis of the functionality of these regions is needed.

**Keywords:** Androgen Response Elements, Endoplasmic Reticulum, Prostate cancer, Protein Quality Control Mechanism, *In silico* analysis



## 1. Giriş

Endoplazmik Retikulum (ER) hücrelerde protein sentezinin yoğun olarak gerçekleştiği başlıca merkezlerden birisidir (1). Sekretör yolağa giriş için portal görevi üstlenen ER'de hücrenin toplam protein sentezinin %30'luk bölümü gerçekleşmektedir (2). ER'de devam eden protein sentezi sürecinde doğal ya da doğal olmayan nedenlerle ortaya çıkan hatalı katlanmış, hiç katlanmamış veya doğru oligomerize olmamış proteinler hücrenin "*protein kalite kontrol mekanizması*" olarak ifade edilen mekanizmalar ile sürekli kontrol edilir (3). Protein katlanma işlemi hatasız bir süreç değildir. Hücrelerde yeni sentezlenen proteinlerin üçte birlik bölümünün hatalı katlandığı bilinmektedir (4). Her ne kadar proteinler uygun şekilde katlanmış olsalar da ısı, oksidatif ortam ve ER stresi gibi hücrel streslere sürekli olarak maruz kaldıklarından, hücre içerisinde sıklıkla hatalı protein formlarını ortaya çıkaran konformasyonel değişimlere uğramaktadırlar. Bu durum hidrofobik kalıntıların tekrar açığa çıkmasına yol açarak protein agregatlarının oluşumuna ve dolayısıyla proteotoksisiteye neden olmaktadır (3, 4). ER içerisinde tekrarlayan katlanma sürecine dahil edilen bu proteinler nihai formuna ulaşamadıklarında ER-ilişkili protein yıkım mekanizması (ER-associated Degradation, ERAD) yoluyla yıkıma uğratılırlar (3, 4). ERAD hücrelerde istenmeyen bu proteinleri proteozomal yıkıma yönlendirerek hücreyi olası proteotoksisiteden korumanın yanı sıra fizyolojik öneme sahip proteinlerin de düzeylerini kontrol ederek hücrel homeostazisin sürdürülmesine destek olmaktadır. Bu konudaki bilinen en iyi örnekler; kolesterol biyosentezinin anahtar enzimi olan HMG-KoA redüktaz'ın ve tümör baskılayıcı protein KAI1'in yıkımından sorumlu olan proteinlerin ifade düzeylerinin düzenlenmesidir (5).

Çok basamaklı bir süreç olan ERAD, hücre içerisindeki istenmeyen proteinlerin tanınması, ubiquitine edilmesi, hücrenin sitoplazmasına retrotranslokasyonu ve dislokasyonu, substrat deglikozilasyonu, proteozomal transfer ve yıkımdan oluşan basamaklarını içermektedir. Bu fonksiyonları yerine getiren çok sayıda protein üyesi senkronize bir şekilde çalışmaktadır (Tablo 1) (4, 6). ERAD substratları ilk olarak ER lümeninde yer alan moleküler şaperon sistemi tarafından tanınarak, ER membranında yer alan ve çok sayıda protein komponentini içeren ERAD kompleksine sevk edilir. Hedef alınan substrat molekülüne göre yıkım sürecinde rol alacak komponentlerin çeşitliliği ve düzenlenme şekli değişiklik göstermektedir. Modüler olarak ERAD incelendiğinde ise substrat tanınması, retrotranslokasyonun başlatılması, ubiquitinasyon, retrotranslokasyon, proteazoma hedefleme ve proteozomal yıkım olarak detaylandırılmaktadır (7). Genel olarak her bir modüldeki proteinler stabil etkileşimler kurarken farklı modüllerdeki faktörler dinamik etkileşimler içerisinde dirler. ERAD substratlarının 26S proteozoma sevk edilmesinde ubiquitinasyon anahtar basamak olarak işlev göstermektedir (8, 9). Protein ubiquitinasyonu; ubiquitin aktive edici enzim (E1), ubiquitin konjuge edici enzim (E2) ve ubiquitin ligaz (E3) enzimlerinin birlikte çalışması ile gerçekleşmektedir. Proteozomal hedeflemeye aracılık eden işaretleyici ubiquitin polipeptidinin hedef proteinlere spesifik olarak aktarımında E3 enzimleri görev almaktadır (9, 10).

ERAD'ın işleyişinde meydana gelen bozuklukların ve fonksiyonel kayıplarının kistik fibröz, alfa-1-antitripsin (AAT) yetmezliği, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi yetmiş yakın hastalığın patolojisinde rolü olduğu rapor edilmiştir (3, 5, 11, 12). Özellikle kanser hücrelerinde kontrolsüz gerçekleşen hücre proliferasyonu düşünüldüğünde; birçok hücre döngüsü faktörünün hücre içi düzeylerinin proteazom aracılı düzenlenmesi ubiquitin-proteazom sisteminin fonksiyonel bütünlüğünün korunmasını kanser hücrelerinin canlılığı için esansiyel hale getirmektedir. Bu nedenle birçok kanser hücresi için proteazom inhibitörü Bortezomib sitotoksik aktiviteye sahiptir ve Multiple miyeloma ve Mantle hücre lenfoması tedavilerinde kullanılmaktadır (13). Bortezomib'in etkisi kısmi ERAD inhibisyonu ve sonrasında gerçekleşen ER stres induksiyonu ile açıklanabilmektedir (14, 15). Dolayısıyla bazı tip kanserlerde ERAD yolağına farmakolojik olarak müdahalenin hedeflenmesi alternatif tedavi yaklaşımlarının önünü açabilmektedir.

Prostat kanseri, erkek bireylerde kanser ile ilişkili ölümlerin 2. sırasında yer almaktadır ve insidansı diğer kanser türlerine göre daha yüksektir (16, 17). Her yıl Birleşik Krallık'ta 47.000'den fazla erkeğe prostat kanseri teşhisi konmaktadır. Öte yandan bu sayı Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 3,3 milyondur (16-19). Androjen reseptörü (AR) ve androjen aracılı gerçekleşen sinyal iletim mekanizmaları normal prostat bezinin gelişiminin herhangi bir aşamasında ve ayrıca prostat kanserinin moleküler patogenezinde kritik bir rol oynar (20). AR şu an için yaklaşık 100 adet üyesi bulunan ve gün geçtikçe sayıları artan steroid-nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesidir. Bugüne kadar insan genomunda yalnızca bir adet AR geni tanımlanmıştır (21). Ligand aracılığı ile uyarılmayan AR, hücrenin sitoplazmasında HSP'ler, sitoskelet elemanları ve diğer şaperonlarla etkileşimini sürdürerek kararlı yapıda tutulmaktadır (22).

**Tablo 1.** ER protein kalite kontrol mekanizması üyesi proteinlere ilişkin bilgiler. ER protein kalite kontrol mekanizması bileşenlerinin kısa ve alternatif isimlendirmeleri, üstlenmiş oldukları biyokimyasal fonksiyonları, kromozomal lokasyonları ve NCBI Gene ID tanımlayıcı kodları tabloda gösterilmiştir.

Protein adı	Açık adı	Sinonim isimlendirmesi	Kromozomal Lokasyonu/Exon sayısı	ERAD Fonksiyonu	NCBI Gene Numarası
INSIG1	Insulin induced gene 1	CL6	7q36.3/7	Substrata Bağlanma ve Katılımı	3638
INSIG2	Insulin induced gene 2	INSIG-2	2q14.1-q14.2/7	Substrata Bağlanma ve Katılımı	51141
BAP31	B cell receptor associated protein 31	CDM, DDCH, BCAP31, 6C6-AG, DXS1357E	Xq28/8	Substrata Bağlanma ve Katılımı	10134
ERLIN1	ER lipid raft associated 1	KE04, KE04, SPFH1, SPG62, Erlin-1, C10orf69	10q24.31/13	Substrata Bağlanma ve Katılımı	10613
ERLIN2	ER lipid raft associated 2	NET32, SPFH2, SPG18, C8orf2, Erlin-2	8p11.23/14	Substrata Bağlanma ve Katılımı	11160
XTP3-B	ER lectin 1	ERLEC-1, CIM, HEI117, C2orf30, CL25084, XTP3TBP	2p16.2/16	Glikan bağlayan	27248
ERMan1	Mannosidase alpha class 1B member 1	Mns1p, MRT15, ERMAN1, MANA-ER	9q34.3/14	Glikan kırılması	11253
EDEM1	ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 1	EDEM	3p26.1/13	Glikan kırılması	9695
EDEM2	ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 2	C20orf31, C20orf49, bA4204.1	20q11.22/11	Glikan kırılması	55741
EDEM3	ER degradation enhancing alpha-mannosidase like protein 3	C20orf22	1q25.3/21	Glikan kırılması	80267
PDI	Prolyl 4-hydroxylase subunit beta	P4HB, DSI, GIT, PHDB, PDIA1, PO4DB; PO4HB, PROHB, CLCRP1, ERBAZL, P4Hbeta	17q25.3/10	Disülfid bağı düzenleyen	5034
BIP	Heat shock family A (Hsp70) member 5	GRP78, HEL-S-89n, HSPA5	9q33.3/8	Şaperon Hsp70	3309
GRP94	Heat shock protein 90 beta family member 1	HSP90B1, ECGP, GP96, GRP94, HEL-S-125m, HEL35, TRA1	12q23.3/18	Şaperon Hsp90	7184
ERdj4	DNA J heat shock protein family (Hsp40) member B9	DNAJB9, MDG-1, MDG1, MST049, MSTP049	7q31.1, 14q24.2-q24.3/3	Şaperon Hsp40	4189
ERdj5	DNA J heat shock protein family (Hsp40) member C10	JPDI, MTHr, PDIA19, DNAJC10	2q32.1/26	Şaperon Hsp40	54431
Derlin2	Derlin 2	DERL2, CGI-101, DERtrin-2, F-LAN-1, F-LANa, FLANa, derlin-2	17p13.2/8	Rhomboid pseudoproteaz	51009
Derlin3	Derlin 3	DERL3, C22orf14, IZP6, LLN2, derlin-3	22q11.23/8	Rhomboid pseudoproteaz	91319
UBAC2	UBA domain containing 2	PHGDHL1	13q32.3/11	Rhomboid pseudoproteaz	337867
RHBDL4	Rhomboid domain containing 1	RHBDD1, RRP4	2q36.3/15	Rhomboid proteaz	84236
UbxD2	UBX domain protein 4	Erasin, UBXN4, UBXD1,	2q21.3/13	p97/VCP adaptör	23190
UbxD8	UBX domain protein 8	UBXN3B, ETEA, FAF2	5q35.2/11	p97/VCP adaptör	23197
VIMP	VCP interacting membrane protein	SelS, SELONOS, AD-015, ADO15, SBB18, SELS, SEPS1, Selenoprotein S	15q26.3/7	p97/VCP adaptör	55829
NGly1	N-glycanase 1	PNGaz1, CDDG, CDG1V, PNG-1, PNG1	3p24.2/16	Deglukozilasyon	55768
UBQLN1	Ubiquilin-1	Ubqln1, DA41, DSK2, PLIC-1, UBQN, XDRP1	9q21.32, 9q21.2, q21.3/12	Mekik faktörü	29979
hHR23A	RAD23 homolog A, nucleotide excision repair protein	RAD23A, HR23A	19p13.13/8	Mekik faktörü	5886
hHR23B	RAD23 homolog B, nucleotide excision repair protein	RAD23B, HR23B, P58,	9q31.2/12	Mekik faktörü	5887
DNAJB2	DNA J heat shock protein family (Hsp40) member B2	HSJ1, CMT2T, DSMA5, HSJ-1, HSPF3	2q35/9	Mekik faktörü	3300
Ubl4A	Ubiquitin like 4 A	GET5, DX254E, DXS254E, G6PD, GDX, MDY2, TMA24, UBL4	Xq28/4	Mekik faktörü	8266
Bag6	BAG cochaperone 6	BAT3, Scythe, D3, D6S52E	6p21.33/31	Mekik faktörü, Şaperon	7917

Ligand bağımlı bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapan AR androjen uyarımı sonrasında ardışık konformasyonel değişimlere uğrayarak aktif transkripsiyon faktörü formuna dönüşür ve hücrenin nükleusuna transport olur. AR'nin DNA-reseptör ve reseptör-protein etkileşimleri konformasyonel değişimler aracılığıyla kontrol edilmektedir (21). Ligand uyarımı sonrasında ardışık konformasyonel değişimler geçiren AR'nin DNA-reseptör ve reseptör-protein etkileşimleri sitokiyometrik düzeydeki değişimler ile kontrol edilmektedir (21, 23). Ligand ile stimüle olan AR, koaktivatörler ve genel transkripsiyon faktörleri ile kompleksler oluşturarak, androjene cevap veren genlerin *cis-acting element* olarak bilinen ARE'lere seçici şekilde bağlanarak androjen hedef genlerinin transkripsiyonlarını modüle etmektedir (24). Bu nedenle ARE'lerine, AR aracılı gen ekspresyonunun doğrudan düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir (24, 25). Palindromik dizi organizasyonuna sahip olan klasik androjen cevap elementleri (cARE), iki adet heksamerik yarımsar bölgenin çevrelediği 3-5 bp'lik aralayıcı diziyi de içeren 15 bp'lik özelleşmiş motiflerden oluşmaktadır (25). cARE'ler 5'-AGAACAxxxTGTTCT-3' konsensüs motifini taşıırken seçici androjen cevap elementi (sARE) olarak tanımlanan bölgeler ise cARE'lerden farklı olarak 5'-AGAACAxxxAGAACA-3' formundaki direkt tekrar düzenine sahiptirler (24, 25). AR'nin seçici şekilde bağlandığı DNA segmentleri evrimsel süreçte büyük oranda korunmuş ve benzer dizi organizasyonuna sahip konsensüs dizilerdir. Androjene cevap oluşturan genlerin regülatör bölgelerinde en az 9 nükleotidin eşleşme gösterdiği konsensus ARE dizileri tanımlanmıştır (24). ARE'leri de içeren gen ifadesini kuvvetlendiren bu arttırıcı (enhancer) bölgeler, doku özgül çalışan genlerin promotor bölgelerinin içinde ya da yakınında bulunmaktadır (25). Bu genlerden en iyi bilinenleri prostat spesifik antijen (PSA), transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2), Myc proto-onkogen proteini (MYC), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGFA), interlökin-6 (IL6), protein kinaz C delta (PRKCD) ve steroid metabolizmasında ve redoks ortamının düzenlenmesinde rol alan bazı genlerdir (26-28).

Androjene yanıt veren genlerin tanımlanması ve bunların karakterizasyonu, androjenlerin hücreler üzerindeki etkisinin moleküler mekanizmaları hakkında bilgi sağlamakla birlikte prostat kanserinin teşhisi, prognozu, önlenmesi veya tedavisine yönelik yeni yaklaşımlara yol gösterici olabilmektedir. Bu çalışmada ER'deki protein kalite kontrolünde rol alan INSIG1, INSIG2, BAP31, ERLIN1, ERLIN2, XTP3-B, ERMan1, EDEM1, EDEM2, EDEM3, PDI, BIP, GRP94, ERdj4, 5, Derlin2, Derlin3, UBAC2, RHBDL4, UbxD2, UbxD8, VIMP, NGly1, Ubiquilin-1, hHR23A, hHR23B, DNAJB2, Ubl4A ve Bag6 olmak üzere 29 adet proteini kodlayan genin promotor ve promotor bölge yakınındaki olası fonksiyonel ARE bölgeleri in silico yaklaşım ile tanımlanmıştır. Sonuçlarımız, ERAD'da görev alan incelediğimiz tüm protein komponentlerinin androjen sinyali aracılığıyla düzenlenebileceğini önermektedir.

## 2. Materyal ve Metot

### Hedef genlerin promotor dizi bilgilerine erişilmesi

Hedef genlerin promotor dizilerine (-9999 ile +1 arası) California üniversitesi, Santa Cruz (UCSC) genom tarayıcısı ve ökaryotik promotor veri tabanı (EPD)'ndan ulaşılarak dizi bilgileri çıkartıldı.

### Varsayılan ARE bölgelerinin benzeşim matrix'leri ile araştırılması

Androjen reseptörü bağlanma motifi (TGTTCTxxxAGAACA, AGAACAxxxAGAACA) için varsayılan bağlanma bölgelerinin araştırılması için hedef genleri kodlayan DNA sekansları Matinspector biyoinformatik aracına (Genomatix Software, Munich, Germany, <http://www.genomatix.de>) aktarıldı. Matrix benzeşim oranındaki eşik sınır 1,0 olarak belirlenerek V\$GREF benzeşim matrixi aracılığı ile olası ARE motifleri incelendi. Varsayılan ARE bölgelerinin tanımlanması için V\$GREF matrixi altında yer alan ARE.01, ARE.02, ARE.03 ve ARE.04 alt matrixleri kullanıldı. Elde edilen benzeşim verileri hedef genlerin promotor haritaları üzerinde lokasyonları ile sunuldu. Benzeşim verilerine ilişkin detaylı bilgiler ise tablolaştırılarak ek bilgiler bölümünde paylaşıldı.

## 3. Bulgular

### İn silico analiz ERAD komponentlerinin androjen sinyalizasyonu yolu ile düzenlenebileceğini desteklemektedir.

Öncelikle memeli ERAD'ında rol oynayan protein komponentleri belirlendi (Tablo 1). Analizlere dahil edilen 29 proteinlerini kodlayan genlere ilişkin promotor ve promotor bölge yakınındaki DNA dizileri (9999 ile +1) UCSC ve EPD veri tabanları kullanılarak FASTA formatında ekstrakte edildi ve AR için spesifik bağlanma motifleri olan varsayılan ARE bölgeleri matinspector biyoinformatik aracı kullanılarak analiz edildi. Bu doğrultuda ERAD ile ilişkili INSIG1, INSIG2, BAP31, ERLIN1, ERLIN2, XTP3-B, ERMan1, EDEM1, EDEM2, EDEM3, PDI, BIP, GRP94, ERdj4, 5, Derlin2, Derlin3, UBAC2, RHBDL4, UbxD2, UbxD8,

VIMP, NGly1, Ubiquilin-1, hHR23A, hHR23B, DNAJB2, Ubl4A ve Bag6 genleri için analizler gerçekleştirildi. Çalışmaya dahil edilen 29 hedef gen için tanımlanan varsayılan ARE bölgeleri Tablo 2’de sunulmuştur. Her bir gen için tanımlanan varsayılan ARE bölgelerine ilişkin lokasyon, matrix skorları, benzerlik oranları ve homoloji ilişkilerinin detaylı gösterimleri excel dosyasında (Ek Bilgiler) sunulmuştur.

**Tablo 2.** ER protein kalite kontrol mekanizması ile ilişkili genlerin promotor ve promotor bölge yakınında tanımlanan varsayılan ARE'ler

Gen Adı	Tanımlanan Varsayılan ARE Bölgelerinin sayısı
INSIG1	14
INSIG2	14
BAP31	5
ERLIN1	12
ERLIN2	7
XTP3-B	11
ERMan1	8
EDEM1	7
EDEM2	14
EDEM3	20
PDI	1
BIP	3
GRP94	17
ERdj4	12
ERdj5	20
Derlin2	8
Derlin3	2
UBAC2	8
RHBDL4	18
UbxD2	9
UbxD8	18
VIMP	16
NGly1	18
Ubiquilin-1	10
hHR23A	2
hHR23B	8
DNAJB2	6
Ubl4A	11
Bag6	13

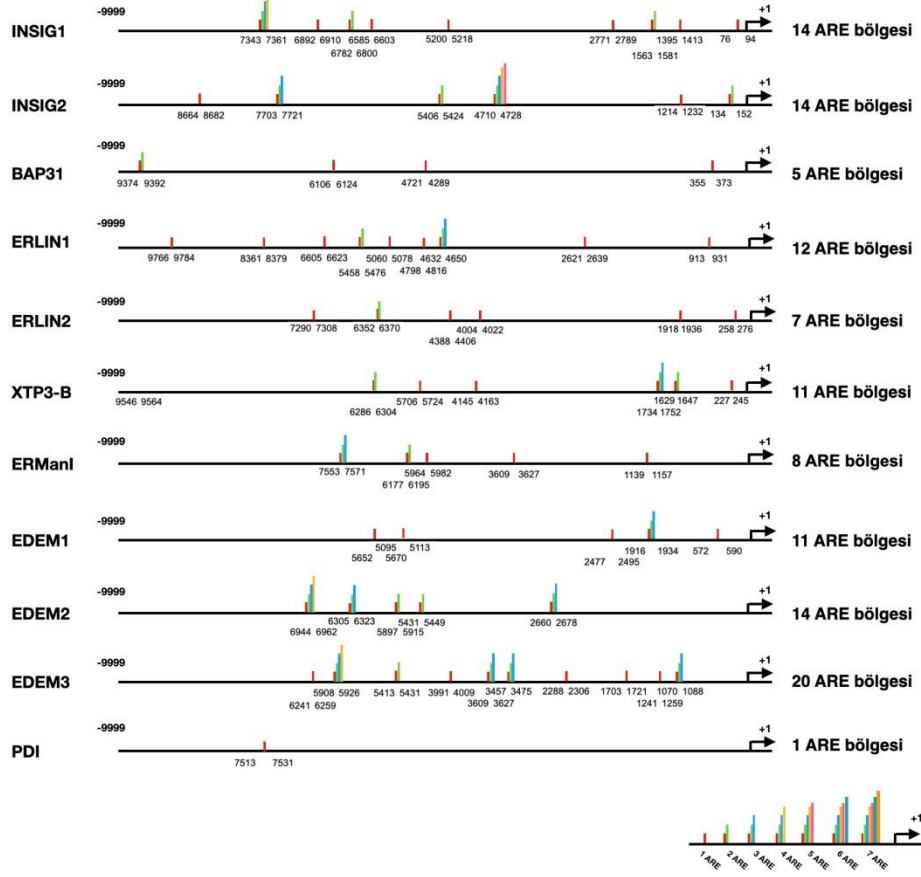
#### 4.Tartışma

Sekretör yolağa giriş için portal görevi üstlenen ER’de hücrenin toplam protein sentezinin %30’luk bölümü gerçekleşmektedir (29). Sekretör ya da transmembranal özellikteki bu proteinlerin sentezi ER ile etkileşim halindeki ribozomlar tarafından gerçekleştirilmektedir. ER, yeni sentezlenen polipeptitlere koruyucu moleküler grupların ilavesi gibi post-translasyonel modifikasyonların gerçekleştirilmesine ortam sağlamaktadır (7). Sentezi yeni gerçekleşen proteinler biyolojik olarak aktif formlarına ulaşabilmeleri için bir seri katlanma sürecine tabi tutulurlar ve bu süreç hatasız devam eden bir süreç değildir (4). ER’ye bağlı ribozomlarda yeni sentezlenen proteinlerin üçte birlik bölümünün hatalı katlandığı bilinmektedir (4, 6). Her ne kadar proteinler uygun şekilde katlanmış olsalar da ısı, oksidatif çevre ve ER stresi gibi hücrel streslere sürekli olarak maruz kalan proteinlerde sıklıkla konformasyonel kayıplar gözlenmektedir. Bu durum hidrofobik kalıntıların tekrar açığa çıkmasına yol açarak hücre içerisinde protein agregatlarının oluşumuna ve dolayısıyla hücrel düzeyde proteotoksisiteye neden olmaktadır (4). Bu nedenle canlı hücrelerde anormal formdaki proteinlerin denetlenerek uzaklaştırılması için karmaşık denetleme mekanizmaları evrimleşmiştir (6, 15). ERAD adı verilen hücrel mekanizma hatalı katlanmış ya da doğru oligomerize olamamış istenmeyen proteinler ile birlikte fizyolojik öneme sahip anahtar proteinlerin endojen düzeylerini regüle etmektedir (6, 15, 30). Oldukça karmaşık bir mekanizma olan ERAD çok sayıdaki moleküler basamağın senkron şekilde çalıştığı ve yıkıma uğrattılacak protein substratına özgül olarak protein komponentlerinin çeşitliliği ve kombinasyonunun

değiştirdiği ileri düzeyde regüle edilen bir süreçtir (Tablo 1) (4, 7). ERAD’ın fonksiyonunda gözlenen kayıpların kistik fibröz,  $\alpha$ 1-antitripsin (AAT) yetmezliği, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer, Huntington hastalıkları), viral enfeksiyon ve albinizm gibi yetmiş yakın hastalığın patolojisinde rol oynadığı gösterilmiştir (5). Özellikle ERAD’da gözlenen hatalı regülasyonların ve fonksiyonel kayıpların karsinogeneze büyük oranda destek verdiği bilinmektedir (31). Bununla birlikte ERAD’ın yüksek sekretuar kapasiteye sahip hücrelerde kritik düzeyde roller üstlenmektedir (32). Prostat hücreleri yüksek sekresyon yeteneğine sahip ve hormonal düzeyde ileri derecede regüle olan hücrelerdir (16, 33). Prostat bezindeki tübülo alveolar yapıdaki bezlerdeki hücrelerin anormal gelişimi sonucunda prostat kanseri gelişmektedir (16).

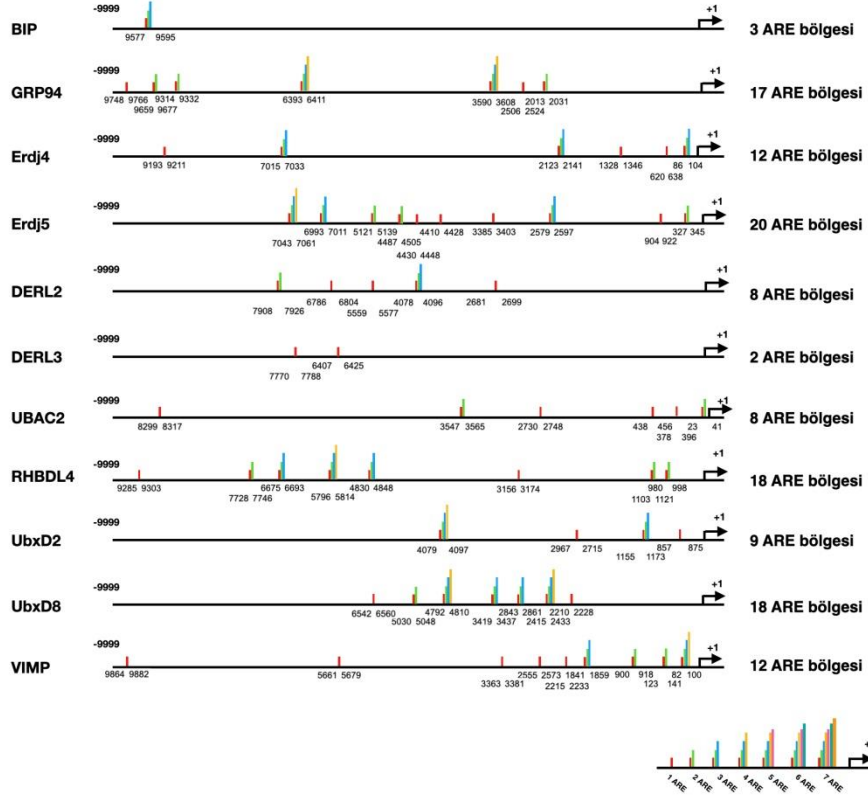
Prostat kanseri, erkek bireyler arasında cilt kanserinden sonra en sık görülen kanser türlerinin başında yer almaktadır. Özellikle bozulmuş AR sinyalizasyonunun karsinogenez sürecine destek verdiği bilinmektedir (16, 17, 22, 28). Ligand bağımlı bir transkripsiyon faktörü olan AR uyarımı ile AR hedef genlerinin ifadesini düzenlemektedir. Bu süreçte AR androjene cevap veren genlerin *cis-acting element* olarak bilinen ARE'lere seçici bir şekilde bağlanarak androjen hedef genlerinin transkripsiyonlarını modüle etmektedir (24).

Bugüne kadar çok sayıda AR hedef geni karakterize edilmiştir. Bu genlerden en iyi bilinenleri prostata spesifik antijen (PSA), transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2), Myc proto-onkogen proteini (MYC), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGFA), interlökin-6 (IL6), protein kinaz C delta (PRKCD) ve steroid metabolizmasında ve redoks ortamının düzenlenmesinde rol alan bazı genlerdir (26-28). Prostatın karsinogenez sürecinin altında yatan mekanizmaların detaylarına ilişkin ayrıntıların anlaşılması ve diğer moleküler sinyal mekanizmaları üzerindeki düzenleyici etkilerinin karakterize edilmesi son derece önemlidir.

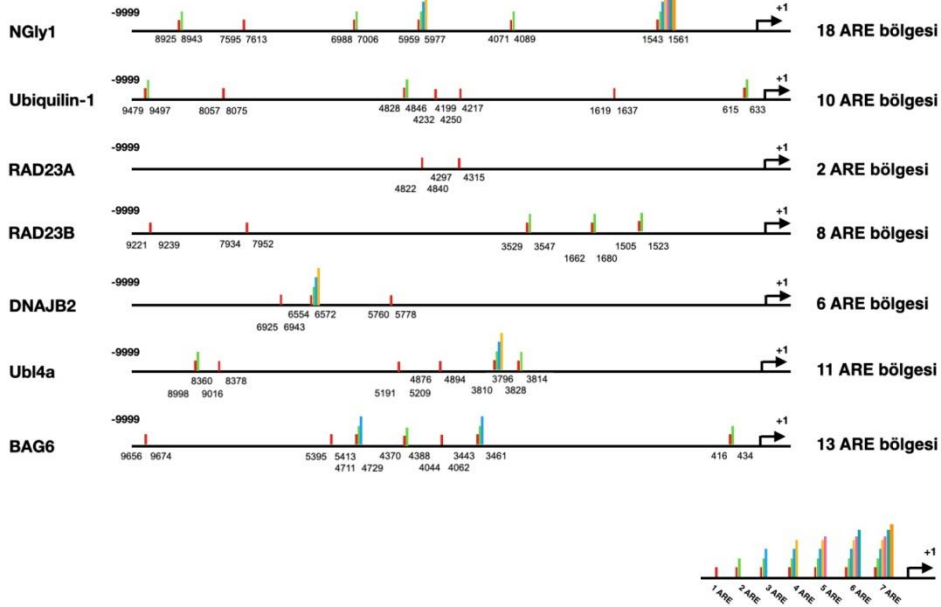


**Şekil 1.** *In silico* analizlerde ER protein kalite kontrol mekanizması ile ilişkili INSIG1, INSIG2, BAP31, ERLIN1, ERLIN2, XTP3-B, ERMan1, EDEM1, EDEM2, EDEM3 ve PDI genlerinin promotor ve promotor bölge yakınında tanımlanan varsayılan ARE'lere ilişkin lokasyonlar. Hedef genlerin promotor dizi bilgileri Matinspector biyoinformatik aracı ile analiz edilmiştir. V\$GREF matrixi altında yer alan ARE 01. 02. 03. 04. alt matrixleri (TGTTCTxxxAGAACA, AGAACAxixAGAACA) androjen reseptörünün bağlanacağı konsensüs etkileşim motiflerini belirlemek için kullanılmıştır. Her bir renkli çubuk, aynı konumdaki farklı varsayılan ARE bölgeleri temsil etmektedir.

ERAD'ın hormonal düzeydeki regülasyonuna ilişkin literatürde oldukça sınırlı veri yer almaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalar glikokortikoidlerin ER stresini inhibe ettiğini göstermiştir (34). Bununla birlikte Das ve arkadaşları ise 2013 yılında yayınladıkları bir çalışmada glikokortikoidlerin, doğru protein katlanmasını teşvik ederek hatalı katlanan proteinlerin degradasyonunu kuvvetlendirdiğini ve bu yol ile ince barsak sekretör hücrelerinde ER stresinin aşılmasında görev aldığını göstermiştir. Ayrıca aynı çalışmada ERAD ile ilişkili EDEM1 geninin bir glikokortikoid olan deksametazon uygulaması sonrası gen ifadesinin arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte *RNAi* aracılı olarak EDEM1 ifadesinin susturulması sonrası uygulanan deksametazon ile EDEM1 ifadesinin kısmen telafi edildiği belirlenmiştir. Benzer şekilde deksametazon uygulaması ile ERAD'da görev aldığı bilinen SEC61 ve p97/VCP gen ifadelerinde de düşük düzeylerde artışlar saptanmıştır (34). Bu sonuçlar doğrultusunda deksametaszonun ER stresi öncesinde biyosentez yüküne karşı olarak ER'nin adaptasyonunda rol oynadığı önerilmiştir. Barsak sekretör hücrelerinde deksametazon aracılığı ile UPR'den bağımsız olarak ERAD'ın düzenlendiği ve ER stresi öncesi biyosentetik yüke karşı ER'nin adaptasyonunun deksametazon aracılığı ile gerçekleştirildiği de önerilmiştir (34). Prostat kanseri hücre kültürü modeli ile yürütülen bir diğer çalışmada androjen uygulaması sonrası ERAD ile ilişkili Hrd1, gp78, p97/VCP, SVIP, Derlin1, Ufd1, Npl4 ve OS9 üyelerinin gen ve protein ifadesi düzeyinde androjen uyarımına paralel bir şekilde regüle olduğu gösterilmiştir (32). Aynı çalışmada *in silico* analizlerde ERAD üyelerinin promotor ve promotor bölge yakınında varsayılan ARE dizilerinin varlığı belirlenerek rapor edilmiştir (32).



**Şekil 2.** İn silico analizlerde ER protein kalite kontrol mekanizması ile ilişkili BIP, GRP94, ERdj4, 5, Derlin2, Derlin3, UBAC2, RHBDL4, UbxD2, UbxD8 ve VIMP genlerinin promoter ve promoter bölge yakınında tanımlanan varsayılan ARE'lere ilişkin lokasyonlar. Hedef genlerin promoter dizi bilgileri Matinspector biyoinformatik aracı ile analiz edilmiştir. V\$GREF matrixi altında yer alan ARE 01. 02. 03. 04. alt matrixleri (TGTTCTxxxAGAACA, AGAACxxxAGAACA) androjen reseptörünün bağlanacağı konsensüs etkileşim motiflerini belirlemek için kullanılmıştır. Her bir renkli çubuk, aynı konumdaki farklı varsayılan ARE bölgeleri temsil etmektedir.



**Şekil 3.** İn silico analizlerde ER protein kalite kontrol mekanizması ile ilişkili NGly1, Ubiquilin-1, hHR23A, hHR23B, DNAJB2, Ubl4a ve Bag6 genlerinin promoter ve promoter bölge yakınında tanımlanan varsayılan ARE'lere ilişkin lokasyonlar. Hedef genlerin promoter dizi bilgileri Matinspector biyoinformatik aracı ile analiz edilmiştir. V\$GREF matrixi altında yer alan ARE 01. 02. 03. 04. alt matrixleri (TGTTCTxxxAGAACA, AGAACxxxAGAACA) androjen reseptörünün bağlanacağı konsensüs etkileşim motiflerini belirlemek için kullanılmıştır. Her bir renkli çubuk, aynı konumdaki farklı varsayılan ARE bölgeleri temsil etmektedir.

Bu çalışmada, matinspector biyoinformatik aracı ile INSIG1, INSIG2, BAP31, ERLIN1, ERLIN2, XTP3-B, ERMan1, EDEM1, EDEM2, EDEM3, PDI, BIP, GRP94, ERdj4, 5, Derlin2, Derlin3, UBAC2, RHBDL4, UbxD2, UbxD8, VIMP, NGly1, Ubiquilin-1, hHR23A, hHR23B, DNAJB2, Ubl4A ve Bag6 dahil olmak üzere toplam 29 adet ERAD ile ilişkili hedef genin AR aracılı olası regülasyonunu anlamak üzere promotor ve promotor bölge yakınlıklarında varsayılan ARE motifleri incelenmiştir. Sonuçlarımız hedef genlerin promotor bölgelerinde (-9999 ile +1) çok sayıda potansiyel varsayılan ARE motiflerinin bulunduğunu göstermiştir (Şekil 1 – 3) (Tablo 2). Belirlenen bu motifler daha önce androjenler ile regüle olduğu tanımlanan ERAD ile ilişkili üyelere ek olarak ERAD'ın diğer komponentlerinde androjenler ile gen ve protein ifadesi düzeyinde regüle edilebileceğini önermektedir.

## 5.Sonuç

Günümüzde çok sayıdaki araştırma ekibi tarafından memeli ERAD'ı yoğun olarak çalışılrsa da ERAD'ın hücre içi regülasyonu ve özellikle prostat kanserindeki regülasyonuna ilişkin detayları ortaya koyan veriler oldukça sınırlıdır. Sonuçlarımız ERAD üyelerinin androjenler ile kompleks bir şekilde düzenlenebileceğini önermesine karşın in silico olarak tanımlanan bu varsayılan ARE dizilimlerinin fonksiyonelliğinin belirlenebilmesi ve androjenlerin ERAD üzerindeki kapsamlı rolünün anlaşılabilmesi için daha ileri analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Olası bu regülasyon prostat kanserine yönelik geliştirilecek yeni tedavi yaklaşımları için ERAD'ın iyi bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.

## Kaynakça

- [1] Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and molecular life sciences*. 2016;73(1):79-94.
- [2] Rapoport TA. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*. 2007;450(7170):663-9.
- [3] Hegde RS, Ploegh HL. Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum. *Current opinion in cell biology*. 2010;22(4):437-46.
- [4] Morito D, Nagata K. Pathogenic hijacking of ER-associated degradation: Is ERAD flexible? *Molecular cell*. 2015;59(3):335-44.
- [5] Guerriero CJ, Brodsky JL. The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiological reviews*. 2012;92(2):537-76.
- [6] Araki K, Nagata K. Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(11):a007526.
- [7] Christianson JC, Ye Y. Cleaning up in the endoplasmic reticulum: ubiquitin in charge. *Nature structural & molecular biology*. 2014;21(4):325-35.
- [8] Mehnert M, Sommer T, Jarosch E. ERAD ubiquitin ligases Multifunctional tools for protein quality control and waste disposal in the endoplasmic reticulum. *BioEssays*, 2010; 32 (10): 905-913.
- [9] Claessen JH, Kundrat L, Ploegh HL. Protein quality control in the ER: balancing the ubiquitin checkbook. *Trends Cell Biol*. 2012;22:22–32.
- [10] Bonifacino JS, Weissman AM. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:19-57.
- [11] Needham PG, Brodsky JL. How early studies on secreted and membrane protein quality control gave rise to the ER associated degradation (ERAD) pathway: the early history of ERAD. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(11):2447-57.
- [12] Scheper W, Hoozemans JJ. The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. *Acta neuropathologica*. 2015;130(3):315- 31.
- [13] Adams J, Kauffman M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest*. 2004;22(2):304-11.
- [14] Fribley A, Wang CY. Proteasome inhibitor induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress. *Cancer Biol Ther*. 2006;5(7):745-8.
- [15] Szokalska A, Makowski M, Nowis D, Wilczynski GM, Kujawa M, Wójcik C, et al. Proteasome inhibition potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice through induction of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. *Cancer Res*. 2009;69(10):4235-43.
- [16] Swami U, McFarland TR, Nussenzveig R, Agarwal N. Advanced Prostate Cancer: Treatment Advances and Future Directions. *Trends Cancer*. 2020;6(8):702-715.
- [17] Galani P. Diagnosis&Prognosis of Prostate Cancer. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research*. 2015;3(5):S49.



- [18] Cipolla BG, Mandron E, Lefort JM, Coadou Y, Della Negra E, Corbel L, et al. Effect of sulforaphane in men with biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Cancer prevention research*. 2015;8(8):712-9.
- [19] Peisch SF, Van Blarigan EL, Chan JM, Stampfer MJ, Kenfield SA. Prostate cancer progression and mortality: a review of diet and lifestyle factors. *World journal of urology*. 2017;35(6):867-74.
- [20] Brooke GN, Bevan C. The role of androgen receptor mutations in prostate cancer progression. *Current genomics*. 2009;10(1):18-25.
- [21] Gao W, Bohl CE, Dalton JT. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chemical reviews*. 2005;105(9):3352-70.
- [22] Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010;42(6):813-27.
- [23] Carver BS, Chapinski C, Wongvipat J, Hieronymus H, Chen Y, Chandarlapaty S, et al. Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer. *Cancer cell*. 2011;19(5):575-86.
- [24] Horie-Inoue K, Bono H, Okazaki Y, Inoue S. Identification and functional analysis of consensus androgen response elements in human prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;325(4):1312-7.
- [25] Shaffer PL, Jivan A, Dollins DE, Claessens F, Gewirth DT. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(14):4758-63.
- [26] Bolton EC, So AY, Chaivorapol C, Haqq CM, Li H, Yamamoto KR. Cell- and gene-specific regulation of primary target genes by the androgen receptor. *Genes Dev*. 2007;21(16):2005-17.
- [27] Jariwala U, Prescott J, Jia L, Barski A, Pregizer S, Cogan JP, et al. Identification of novel androgen receptor target genes in prostate cancer. *Mol Cancer*. 2007;6:39.
- [28] Jin HJ, Kim J, Yu J. Androgen receptor genomic regulation. *Transl Androl Urol*. 2013;2(3):157-177.
- [29] Bastiaansen KC, Otero-Asman JR, Luirink J, Bitter W, Llamas MA. Processing of cell-surface signalling anti-sigma factors prior to signal recognition is a conserved autoproteolytic mechanism that produces two functional domains. *Environmental microbiology*. 2015;17(9):3263-77.
- [30] Friedlander R, Jarosch E, Urban J, Volkwein C, Sommer T. A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nature cell biology*. 2000;2(7):379-84.
- [31] Tsai YC, Weissman AM. The unfolded protein response, degradation from the endoplasmic reticulum, and cancer. *Genes & cancer*. 2010;1(7):764-78.
- [32] Erzurumlu Y, Ballar P. Androgen mediated regulation of endoplasmic reticulum- associated degradation and its effects on prostate cancer. *Sci Rep*. 2017;7:40719.
- [33] Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, et al. DD3: A New Prostate-specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer research*. 1999;59(23):5975-9.
- [34] Das I, Png CW, Oancea I, Hasnain SZ, Lourie R, Proctor M, et al. Glucocorticoids alleviate intestinal ER stress by enhancing protein folding and degradation of misfolded proteins. *Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(6):1201-16.

#### Web Sayfaları

Genomatix Software, MatInspector, Munich, Germany. Available from:

[http://www.genomatix.de/cgi-](http://www.genomatix.de/cgi-bin/eldorado/main.pl?s=8a065286baae1e0945d3d9294f299d6d;SELECTION=reg)

[bin/eldorado/main.pl?s=8a065286baae1e0945d3d9294f299d6d;SELECTION=reg](http://www.genomatix.de/cgi-bin/eldorado/main.pl?s=8a065286baae1e0945d3d9294f299d6d;SELECTION=reg) (Last accessed: October 2020)