

## Ubikitin-Proteozom Yolağının Karsinogenezdeki Rolü

*Doktora Öğrencisi N.Ceren SÜMER TURANLIGİL\**  
*Dr. Yiğit UYANIKGİL\*\**

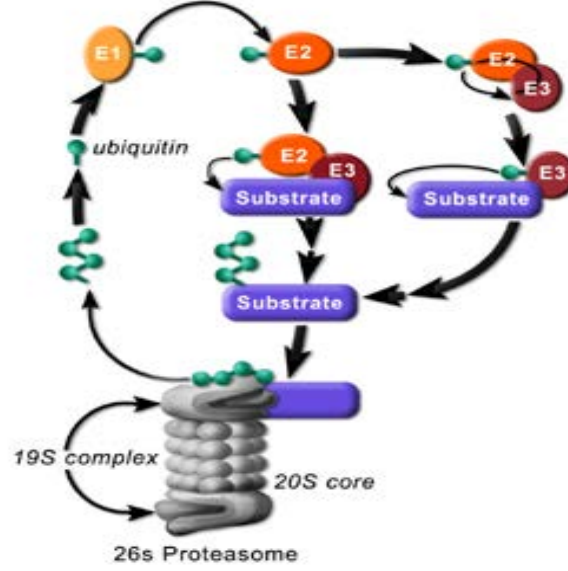
### Ubikitin Etki Mekanizması ve Genel Bilgiler

Ubikitin molekülü anormal bir hücrenin malign hücreye dönüşümüyle ilgili hücre içi sinyaller, hücre proliferasyonu, bağışıklık yanıtı ve transkripsiyonun düzenlenmesi gibi birçok moleküler homeostatik mekanizmaya katılır. Ubikitin, 76 aminoasitlik küçük bir peptid olup hedef substratlara E1 (ubikitin aktifleştirici enzim), E2 (ubikitin konjuge edici enzimler) ve E3 (ubikitin ligaz) denen 3 enzimin sırasıyla etkinleşmesi ile bağlanan ve onları proteozom adlı subselüler organelere hedef gösteren bir moleküldür<sup>1</sup>. Proteinlerin katlanması ya da protein komplekslerinin oluşumu endoplazmik retikulumda organelde gerçekleşir. Yanlış katlanan proteinler endoplazmik retikulum şaperonlarını içeren bir sistem tarafından tanınır, çoklu ubikitinlerle işaretlenir (poliubikitinlenme) ve 26S proteozom aracılığıyla yıkılır<sup>2-4</sup>. Yeni sentezlenen proteinlerin yaklaşık üçte biri sentezlendiği dakikada proteozomlar tarafından yıkılır<sup>2</sup>. 26S Proteozom 2400 kDa'lık bir kompleksdir ve 40'dan fazla alt birim içerir<sup>5</sup>. Benzer şekilde, katlanmamış protein de tehlikelidir ve gen ekspresyonunu uyarabilir. Bu, translasyonel strestir ve meydana gelen yanıt da ısı-şok yanıtıdır<sup>4,6,7</sup>. 26S proteozom bir 20S ana yapıdan ve iki 19S düzenleyici yapıdan oluşur<sup>8</sup> (Şekil 1).

---

\* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İZMİR

\*\* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İZMİR



**Şekil 1.** UPY'nin çalışma mekanizması ve 26S proteozomun bileşenleri <sup>9</sup>.

Literatürde E3 ubiquitin ligazların çeşitli aracı moleküllerle birlikte kanser etiyolojisindeki rolüne işaret edilmiştir. Bunlar içerdikleri protein domainlerine göre birkaç gruba ayrılır ve her domain tümörlerle ilişkili farklı substratlara işaret eder. Bu domainler HECT, RING, SCF, ECV ve Cul4-tipi domainlerdir. İlişkili tümör baskılayıcı ve onkogen ürünleri ise TbetaR1, Smad 1, Smad 2, Smad 4, Smad5 , Smad 7, p53, RB, p27, EGFR, beta-catenin, Ikb, Wee 1, Period, c-Myc, c-Myb, Cyclin E, c-Jun, Notch, mTOR olarak sıralanabilir<sup>10</sup>.

Bir proteinin ubiquitin-proteozom yolağı aracılığı ile yıkılması iki aşamayla başlar: Birincisi, hedef substrat çoklu ubiquitin zincirlerine kovalent olarak tutunması, ikincisi ise tutunan proteinin, ubiquitini serbest bırakacak şekilde yıkımıdır<sup>11</sup>. Ubikitinin substratlarına konjugasyonunda birinci aşama aralarında hücre siklusu kontrolü, DNA tamirini, ribozom benzeri organellerin biyosentezini, MHC sınıf 1 antijen sunumu ve enflamatuvar yanıtını, hücre yüzey proteinlerinin endositozu ve iyon kanallarının modülasyonunu, nöronal ağların morfojenезini, NF-kB'ye bağımlı sinyalleme kaskadları ve transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesini, uzun süreli hafıza ve biyoritmin oluşumunu, apoptozu, farklılaşmayı, stres yanıtını ve protein kalitesinin kontrolünü içeren birçok hücre içi işleme katılır<sup>11-16</sup>. Ubikitin, proteozomdan bağımsız olarak da çalışabilir. Buna bir başka örnek de histon ubiquitinlenmesinin, heterokromatinin gevşemesine neden olması ve transkripsiyon faktörlerinin promotorda birikmesi olarak verilebilir<sup>17</sup>.

Ubikitin yolağı ile ilişkili patolojiler iki sınıfa ayrılırsa; birincisi işlev kaybı mutasyonları, ikincisi ise işlev kazanımıyla sonuçlanan değişiklikleri içermelidir. Birincisi hedef proteinlerde stabilizasyon ile ikincisi ise hedef proteinlerde anormal yıkımla karakterizedir<sup>18</sup>. Örneğin astrositomada, akciğer kanserinde ve hepatoselüler karsinomda ubiquitinle konjuge proteinlerin birikimi gösterilmişken, ubiquitin sisteminin bazı N-myc, c-fos, c-jun, Src ve EGFR gibi kanseri uyarabilen büyüme faktörlerinin reseptörlerini hedef aldığı hatta doğrudan tümör baskılayıcı proteinlerin patofizyolojisinde rol aldığı da gösterilmiştir<sup>15,18</sup> (Tablo I).

Tablo I. UPY ile ilgili moleküller: Genel Sınıflama

Tepkimelere aracılık eden protein domainleri	UPY'nin etkinliği için gerekli moleküller	UPY'nin hedefleri
RING-finger	P53 ve c-jun degradasyonuna aracı Mdm2	Tümör baskılayıcı p53 ve pRb proteinleri
HECT	EGF reseptörünün degradasyonuna aracı c-Cbl	Hücre siklusu bileşenlerinden p27, cycA, cycB, p40-sic 1, cdc25, Rad23B
SH2, SH3	HPV 'nin p53'ü yıkmasına aracı E6 proteini	Protoonkogenlerden c-myc ve AP-1'in bileşenlerinden c-jun
SCF (Cul1, Skp1, Roc1, F-box protein)	Proteozom etkinliğinde değişimi indükleyen IFN-gamma	Büyüme faktörlerinden Grb-2 adaptörü ve EGF reseptörü ailesi
ECV (Cul2, EloB/C, Roc1, BC/SOCS-Box)	GH reseptörünün endositozunda etkinliği gereken transkripsiyon faktörü NF-Kb	Transkripsiyon faktörlerinden NF-kB etkinliği için IKB
Cul4 (Cul4, DDB1, Roc1, DCAF)		Büyüme hormonu reseptörü (GHR) CMyc, cMyb, Notch, mTOR Smad7 BRCA1 RNAPII

### Ras-aracılı Düzenleme ve Kansereleşme ile İlişkisi

Büyümeyi düzenleyen faktörler tarafından aktiveleştirilen yollar, RAS yolağını, PI3 kinaz yolağını, PLC (fosfolipaz C) yolağını, SRC protein ailesini ve JAK (Janus kinaz)'ları barındırır<sup>19,20</sup>. RAS genleri insan kanserlerinde en çok mutasyona uğrayan genler arasındadır. RAS sinyalleme yolağı, tirozin kinaz reseptörleri (RTK) ile ilişkilidir. RAS etkinleşince, transkripsiyonu harekete geçirecek olan protein kinazları (c-RAF'tan MEK'e; MEK'ten MAP/ERK'e) etkinleştirir<sup>20</sup> (Tablo II). Özelliği, büyüme faktörlerine yanıt olarak

büyüme uyarıcıdır. Büyüme faktörleri RTK'lar ve RAS proteinleri üzerinden PI3K'ı (fosfatidilinozitol 3- kinaz) etkinleştirerek başka kaskadları tetikler. Birçok durumda PI3K yolağı MAPK yolağıyla birlikte çalışır<sup>21</sup>. Ras, Raf'ı hem direkt hem de dolaylı olarak etkinleştirir. Raf'ın tersiyer yapısı şaperonlarla stabilize edilir. Bir şaperon olan Hsp 90 (ısı-şok proteini 90)'ı bağlayan Geldanamisin, onun hedef proteinin katlanmasında aracı rolünü bozmaktadır. Geldanamisin ile yapılan deneylerde hücreler saflaştırılmış Raf-1 proteinlerinin birikimini, ubiquitinlenmelerini ve yıkımlarını uyarılmışlardır. Raf-1 ile ilişkili literatürde tanımlanan ve kanserleşmeyle ilgili olan Ras harici moleküller arasında G-proteinleri, hücre iskeleti (vimentin), şaperonlar (Hsp 90, 60, 65), kinazlar (ERK-5, Jak), Bcl-2 ve STAT-1 proteinleri, IL-2 reseptörü (interlökin 2), EGF reseptörü ve PDGF reseptörü (trombositten türetilen büyüme faktörü) bulunmaktadır<sup>22</sup>.

#### **EGF ile ilişkili kanserleşme**

EGF'ye yanıt olarak EGF reseptörü, c-Cbl'nin RING E3'ü tarafından ubiquitinlenir ve yıkılır. Ubikitin ligaz etkinliğinden yoksun onkogenik Cbl mutantları, EGFR'nün sinyalleşmesinin daha uzun sürmesine neden olur. EGFR ailesi reseptörlerinin (ERBB, ERBB2) amplifikasyonu glioblastoma, skuamöz hücre karsinomları, göğüs ve over kanserleri gibi malignitelerde siktir<sup>3,21</sup>.

Tablo II. UPY ile ilgili karsinojeneze aracılı moleküller.

Onkogenik Büyüme faktörleri ve sinyallemeyle ilgili	Tümör baskılayıcı genlerle ve hücre siklusuyla ilgili	Diğer
RTK (reseptör tirozin kinazlar), SH2, SH3 (Src homoloji-2 ve 3) domainleri	P53 proteini, MDM2, E6-AP	Transkripsiyon faktörleri: NF- $\kappa$ B (nükleer kappa b), I $\kappa$ B (inhibitör kappa b), STAT proteinleri
Ras protoonkogeni, Grb2 adaptörü, Sos proteini	Rad proteini	AP-1 transkripsiyonel kompleks (c-jun, c-fos)
PDGF	chk1, chk2 proteinleri	İmmünite: MHC gen lokusu ilaç direnci
ErbB-2 (Epidermal büyüme faktörü reseptörü) c-Cbl protoonkogeni	cdc, cdk siklinler(sikline bağımlı kinaz) cdc25A, cdc28, cdc37	Büyüme hormonu
TGF-beta sitokini, Smad (Sma ve mad homologu) proteinleri	Kontrol noktaları G1/S geçişi G2/M geçişi Metafaz/Anafaz geçişi	BRCA1
GHR (büyüme hormonu reseptörü)	SCF, APC kompleksleri	
TNF- $\alpha$ (tümör nekroze edici faktör alfa) TNFR1, TNFR2 TRAF (TNF reseptörüyle ilişkili faktör)	PTEN	
Myc ve Myb	Tob1	
$\beta$ -catenin	Abi (Abl interaktörü)	
HIF (hipoksiyle indüklenen faktör)		

### TGF- $\beta$ ile ilişkili kanserleşme

TGF- $\beta$  (transforme edici büyüme faktörü beta) hem normal hem de transforme olmuş memeli hücrelerinde çeşitli hücreyel yanıtlarda rol alan bir sitokindir. Hücre büyümesi üzerine örneğin G1 fazında Rb (retinoblastoma

geni) 'nın c-myc veya Cdk'ları negatif regülasyonu veya Cdk (sikline bağımlı kinaz) inhibitörlerinin etkinleştirilmesi (p27kip1, p15lnk4b veya p21) gibi etkileri vardır. TGF- $\beta$  yolağındaki mutasyonlar karsinogenezde önemlidir. Smad'lar, TGF- $\beta$ 'nın biyolojik etkilerini göstermesine aracı hücre içi moleküllerdir. TGF- $\beta$  reseptörü fosforlanırsa Smad 3 çekirdeğe gider ve transkripsiyonel düzenlemeye katılır. Smad 3 ile etkinleştirilen TGF- $\beta$ , UPY ile yıkılır. Smad 2 ve 4 ise hücrede tümör baskılayıcı gibi davranır. İnsan kolorektal ve pankreas kanserlerinde Smad 2 ve 4'ün amino uçlarında MH1 domainindeki arginin kalıntısında korunmuş bir missense mutasyon bulunmuştur. Smad'larda herhangi bir genetik defekt, UPY ile yıkımlarına sebep olur<sup>21,24-30</sup>.

### **GH'nun İşlevinin UPY ile Kontrolü**

Büyüme hormonunun (GH) fizyolojik etkileri arasında protein sentezinin tetiklenmesi yoluyla başlayan lineer büyüme, bunu içeren doku yenilenmesi ve tamiri ile bunların idamesi yer alır. Mitojenik etkilerini insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) aracılığıyla gerçekleştirir. Etki mekanizması şu şekildedir: GH hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanınca reseptör dimerleşir. Bunu takiben bir tirozin kinaz olan JAK-2 ve sinyal transducer'ı olan STAT proteinleri fosforlanır ve etkinleşir<sup>3</sup>. Bu da PI3 kinaz ve NF-kB sinyalleme yollarını indükler. PI3 kinazın etkinleşmesi, c-Myc'in ifadesi üzerindedir<sup>30</sup>. Hücre yüzeyindeki büyüme hormonu reseptörlerinin (GHR) sayısı UPY ile belirlenir. GHR'nün endositozu etkin bir ubiquitin sistemiyle mümkündür. Ubikitin sistemi inhibe edilirse, GHR'leri membranda birikir. Proteozom inhibitörleri hem GHR'nün membrandan içeri alınmasına hem de endozomdan lizozoma transportuna engel olur. Proteozom inhibitörleri hücre proliferasyonunu azaltır ve apoptozu uyarır ve başta multipl miyelom olmak üzere hematolojik malignitelerin ve birçok solid tümörün tedavisinde kullanılmaktadır<sup>8,32</sup>. Proteozom inhibitörlerinin anti-miyelom moleküler hedefleri arasında alfa4-integrin, HLA, HSP-90, IL-6, IGF-1, JNK, NF-kB, p53, ROS ve VEGF vardır<sup>33</sup>. GHR, ligandından bağımsız olarak da dimerleşebilir fakat ilgili sinyal yollarını etkinleştirmez. Bu dimerleşme, aynı zamanda,

reseptörün UPY ile endositozu için bir koşuldur<sup>3</sup>.

### **NF-kB ve Diğer Transkripsiyon Faktörlerinin Etkinliğinin UPY İle Düzenlenmesi**

NF-kB (nükleer faktör kappa enhancer bağlayıcı protein), sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, hücre-adezyon molekülleri ve yüzey reseptörleri benzeri molekülleri kodlayan genlerin düzenlenmesinde görevli bir transkripsiyon faktörüdür<sup>34</sup>. Dolayısıyla bağışıklık yanıtına, enflamasyona ve apoptoza etkin olarak katılır. NF-kB'nin etkinleşmesinin en az 3 basamağı direkt ubiquitinlenmeyi gerektirir: inhibitör kB'nin (İKB) yıkımı, NF-kB'nin öncüllerinin yıkımı ve TAK1'in (TGF-beta ile etkinleşen kinaz 1) etkinleşmesi<sup>35</sup>. NF-kB bir heterodimerdir ve 50kDa'lık ve 65 kDa'lık alt birimlerden meydana gelir. Bu alt birimlerin etkinliği proteozom aracılığıyla düzenlenir ve çalışmak için proteolize ihtiyaç duyar. NF-kB'nin etkinliği, İKB ile engellenir ve uyarılmayan hücrelerde inaktif halde kalmasını sağlar.

NF-kB ile düzenlenen gen ürünleri proapoptotik ve anti-apoptotik olarak ikiye ayrılabilir. Proapoptotik ürünler arasında p53, Fas, TNF, Kaspaz 1, TRAIL, C-Myc ve Fas ligand gibi moleküller yer alırken antiapoptotik olanlar arasında Cyclin D1, cIAP1 ve 2, COX-2 (sitokrom oksidaz 2), Bcl-2, TRAF-1 (TRAIL ile ilişkili faktör 1) ve 2, Survivin ve MnSOD (mangan süperoksit dismutaz) yer alır<sup>34,36,37</sup>.

NF-kB, GH'nun anti-apoptotik ve proliferatif etkilerine de aracılık eder. Aşırı GH ekspresyonunun immun neoplazilerin oluşmasına ve gelişmesine neden olduğu söylenmiştir. Ayrıca, Hodgkin lenfomada, B hücreli lenfomada ve T hücreli lenfomada NF-kB'nin sürekli ekspresyonu gösterilmiştir<sup>31</sup>.

### **TNF- $\alpha$ ve UPY**

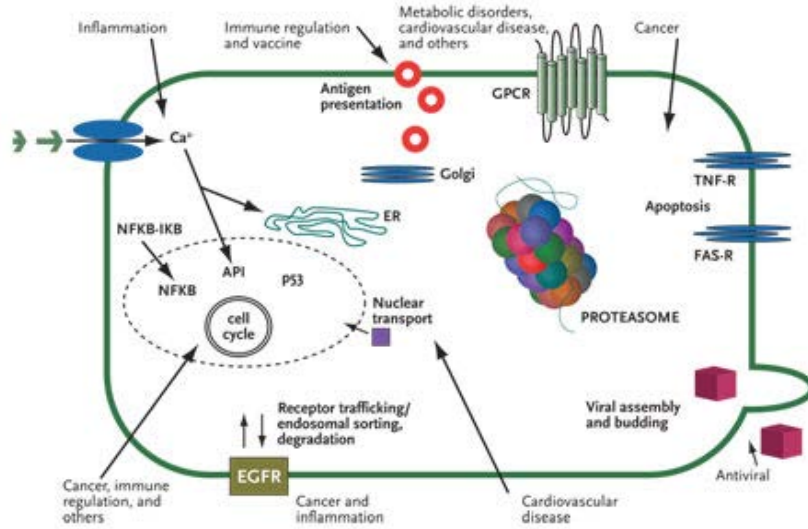
TNF- $\alpha$  (tümör nekroze edici faktör alfa) enflamasyona, enfeksiyona ve hasara yanıt olarak üretilen ve ateşte, akut-faz tepkimelerinde, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında ve apoptozda görev alan bir sitokindir. TNF- $\alpha$  promotörü NF-kB ve AP-1 bağlanma bölgeleri içerir. TNF- $\alpha$ 'nın reseptörlerine bağlanması sıklıkla AP-1 ve NF-kB transkripsiyon faktörlerinin



etkinleşmesiyle sonuçlanır ve enflamatuvar işlerde görevli genler indüklenir. Bu genlerin bazıları TNF- $\alpha$  ile indüklenen apoptozu baskılar<sup>36,38</sup>.

TNF- $\alpha$  ile uyarılabilen yolakla İKB'nin fosforlanması, İKB'nin proteozomal yıkımıyla sonuçlanır, ve NF- $\kappa$ B'nin inhibisyonu ortadan kalkar<sup>37</sup>.

TNF- $\alpha$ 'nın iki reseptörü vardır: TNFR1 ve TNFR2. TNF- $\alpha$ 'nın reseptörlerine bağlanması reseptörlerin trimerleşmesini ve çeşitli sinyal proteinleri reseptörlerinin biraraya gelmesini uyarır. TNFR'ye katılan proteinlerden TRADD (TNFR1-ile ilişkili ölüm domaini); RIP1 (reseptörle etkileşen protein 1), FADD (Fas-ile ilişkili ölüm domaini) proteini ve TRAF2 (TNF-reseptörüyle ilgili faktör) gibi aracı molekülleri biraraya toplar. TRAF2, IKK (inhibitör kinaz kinaz)'ın ve MAPK'ın (mitojenle ilişkili protein kinaz- JNK ve p38 etkinleşmesi yapan) etkinleşmesine neden olur. TNFR'ler ve atipik bir protein kinaz C (aPKC) arasında çapraz iletişim bulunmuştur. aPKC ile ilgili bir protein olan p62'nin, TNF- $\alpha$ 'ya yanıt olarak gelişen IKK etkinliğinde yer aldığı öngörülmüştür. p62'nin down-regülasyonu, TNF-aracılı NF- $\kappa$ B etkinliğini inhibe etmiştir. P62, çoklu ubikitin-bağlayan bir proteindir<sup>38,39</sup> (Şekil 2).



Şekil 2. UPR'nin etkinliğinde ve düzenlenmesinde görevli moleküllerin şematik görünümü<sup>40</sup>.

### **Tümör Baskılayıcı p53 Geni Etkinliğinin Düzenlenmesinde UPY**

p53, DNA hasarına ve ısı-şokuna, hipoksi ve hiperoksiye, onkogenler - replikasyon-mikrotübül inhibitörleri gibi toksinlere ve diğer stres çeşitlerine yanıt olarak hücre siklusu ilerlemesini bloke etmekten, büyümeyi baskılamaktan veya apoptozu başlatmaktan sorumlu bir çekirdek proteindir. Hüresel stres veya DNA hasarından sonra (örneğin uv ışık, gamma radyasyonu ve nükleotid deprivasyonu gibi durumlarda) p53 ya büyümeyi durduracak ya da hücreyi apoptoza götürecektir şekilde stabilize edilir. Bunun temeli, UPY ile olan yıkımın azaltılmasıdır<sup>29,36,37,41,42</sup>.

P53 tümör baskılayıcı protein, hücreleri genetik hasardan korumak ister. p53'ün DNA hasarına yanıtta yetersizliği, onkogenik olan mutasyonel değişikliği artırır<sup>28,39</sup>. p53'ün hücre içi düzenleyicilerinden biri MDM2 protoonkogen ürünü proteindir. MDM2 p53'e bağlandıktan sonra ubiquitinlenmesine ve takiben yıkımına sebep olur. MDM2'nin RING-finger domaini, E3 etkinliği için gereklidir<sup>29</sup>. MDM2 protoonkogeninin ilgili p53 düzenlenmesine aracı rolleri şu şekildedir: p53'e bağlanma, p53'ün transkripsiyonel etkinliğini bloke etme, p53'ün çekirdekten dışarı atılması ve p53'ün UPY tarafından yıkımına aracılık edilmesidir. Özetle, MDM2, p53'ün hedef gösterilmesine neden olan bir E3 ubiquitin ligaz gibi çalışır. p53'ü yıkıma hedef gösteren bir diğer protein de Jun-N terminal kinazıdır<sup>42</sup>.

MDM2'ye bağlanan diğer proteinler arasında p73 (p53 benzeri bir protein), E2F1 (hücre siklusunun S fazına özgün genleri etkinleştiren transkripsiyon faktörü), pRb (MDM2'nin p53'ü stabilize etme yeteneğini bloke eden bir protein), CBP (CREB bağlayan protein) ve p300 (p53 ile ilişkili transkripsiyonel ko-etkinleştirici) bulunur. Birçok tümör ve malignitede MDM2 geninin amplifikasyonu ve MDM2 proteininin aşırı anlatımıyla karşılaşmıştır. MDM2 amplifikasyonlu kanserlerde p53 mutasyonuna gereksinim yoktur<sup>43</sup>.

İnsan anogenital karsinomunun çoğunluğunun etiyolojisinde HPV virüsü yer alır. Bunlarda p53'ün ubiquitine dayalı yıkımının hızındaki değişiklikler önemli rol oynar. Yüksek riskli HPV (örneğin HPV 16, 18, 5, 8) tarafından E6 onkoproteini kodlanır ve p53'ün proteozomal yıkımını uyarır. E6-p53

kompleksinin oluşumu E6-AP (E6 ilişkili protein) denen hücresel bir E6 bağlayıcı proteine gereksinim gösterir. E6-AP, ubiquitinle tiyoester bağı kurabilen bir HECT domaini paylaşan HECT E3 proteinleri denen protein ailesinin üyesidir. E6-AP, p53'ü ubiquitinleyen ve 26S proteozom tarafından yıkıma yönelten bir E3 enzimi gibi davranır<sup>36,37,44</sup>.

p53'ü de içeren hücre siklusu kontrol elemanları, örneğin Cdk4, Wee-1, c-Myc, pRb ve p27/Kip1, ısı-şok proteini 70 (Hsp 70) ailesi üyeleriyle geçici birleşmeler yapabilir. Hsp 70 ve/veya 90, Src kinazlar, tirozin kinaz reseptörleri, Raf ve MapK'larla da etkileşebilir. Stresiz koşullarda sağlıklı p53'ün çekirdek içine ve dışına taşınımı dengededir. Sağlam p53'ün çekirdeğe taşınımı Hsp90 gibi şaperonlar aracılığı ile gerçekleşir. Stres koşullarında ise sağlam p53, hücre siklusu duraklaması, DNA tamiri ve apoptoz genlerinin ve hsp70'in transkripsiyonunu uyarır. Şaperonlar bazı kanserlerde sağlam p53'ün lokalizasyonunun düzenlenmesine aracılık edebilir<sup>45</sup>.

#### **Hücre Siklusu Bileşenleri, Kontrol Noktaları ve UPY**

Her hücre bölünmesi arası interval bir hücre siklusudur. Dinlenen memeli hücreleri Go'da kalmaktadır. Kontrol noktaları DNA duplikasyonunun bütünlüğünün ve kromozom segregasyonunun doğruluğunun kontrol edildiği aralardır. Üç ana kontrol noktası söz konusudur: Kanserle ilgili birçok defektin meydana geldiği G1/S kontrol noktası, G2/M kontrol noktası ve bunun DNA hasarına yanıt olarak etkinleşmesi ve metafaz/anafaz (veya M/G1) geçişindeki kontrol noktasıdır. Memeli hücresinin büyümesinin kontrolü temel olarak G1 fazındadır. G1 fazından ilerlemeyi başlatan onkogenler arasında yanlış anlatımlı olanlar (v-sis/PDGF), kısmi olarak etkinleştirilmiş büyüme faktörü reseptörleri (v-erb/EGF, v-fms/CSF-1R, trk/NGF-R, met/HGF-R) veya sinyal iletimi yollarının bileşenleri (Ras ve Raf) vardır<sup>29,46-48</sup>.

Mitoz tetikleyici faktörün (MPF) protein kinaz alt biriminin mayadaki benzeri cdc2 tarafından kodlanır. Bölünen mayada cdc2'nin mutasyona uğraması hücre bölünmesinin G1/S sınırında durmasına neden olur. Mayadaki cdc2'nin insandaki benzerlerine cdk denir. Bütün ökaryotlar hücre bölünmesinin

aşamalarında aynı cdk-bazlı kontrol sistemini kullanır. Cdk'nın etkinleştiricisi siklidir. Siklinler siklusun çeşitli aşamalarında sentezlenir ve yıkılırlar. DNA sentezi öncesi G1 fazını geçmek için önemli olaylardan birisi pRb'nin (retinoblastomaya duyarlı gen ürününün) cdk'lar tarafından fosforlanmayla etkisizleştirilmesidir. Bu fosforlanma, pRB'yi transkripsiyon faktörü E2F'ye bağlanmaktan ve onu düzenlemekten alıkoyar. Böylece E2F'ye yanıt genlerinin DNA replikasyonu ve hücre siklusu ilerlemesi için gerekli şekilde anlatımı gerçekleştirir. Rb'nin nokta mutasyonları veya delesyonları insanda çok sayıda kanserde özellikle retinoblastoma ve sarkomlarda bulunur<sup>20,36,48-51</sup>.

Siklinlerin geçişlerdeki etkinliğiyle ilgili bir örnek, Siklin B'nin, mitozdan çıkışta proteozom aracılığıyla yıkılmasıdır. S fazına kadar da düşük düzeyde kalır. Siklinlerin birikimi, mitozu başlatır. Siklin B ve E, bazı meme kanserlerinde aşırı eksprese edilmiş şekilde bulunmuştur. Siklin D1 de birçok tümörde aşırı eksprese edilmektedir.

Siklin D1 ve E UPY için substrattır; ve yıkımlarındaki azalma, tümörlerde bu siklinlerin aşırı ekspresyonu ile sonuçlanır. Örneğin cdk ile bağlandığı zaman siklin D1'in fosforlanması, ubiquitinlenmesi ve 26S proteozom tarafından yıkılması uyarılır. Siklin D1 bir onkogen gibi davranabilir. Siklin D1'in aşırı ekspresyon yoluyla Rb-aracılı hücre siklusu kontrolünden kaçışı karsinogenez için önemlidir<sup>47-49, 52-54</sup>.

Cdk inhibitörleri (CIK), Cdk etkinliğini düzenler. Özgünlüklerine göre INK4 ve cip/kip aileleri olarak ikiye ayrılırlar. Örneğin siklin D'nin cdk4'e bağlanması siklin/ckd kompleksleri ile CIK'ler arasındaki dengeyi Rb'nin fosforlanmasını başlatmak yönünde etkiler. Siklin E/ckd2 kinazı da, bir CIK olan p27'yi proteozom aracılı yıkımı indükleyerek fosforlar<sup>20,49,55</sup>. Kolorektal ve meme kanserleri gibi bazı sık rastlanan tümörlerdeki düşük p27 düzeyi kötü prognozla ilgilidir. P27 proteini miktar bakımından hücre içinde sıkı kontrol altındadır. Dinlenmekte olan hücrelerde yüksektir ve hücreler S fazına girdikçe anlamlı derecede düşer. Hücre siklusunun p27 harici diğer elemanları da tümörler için deregülasyonda hedeftir<sup>36,49</sup>.

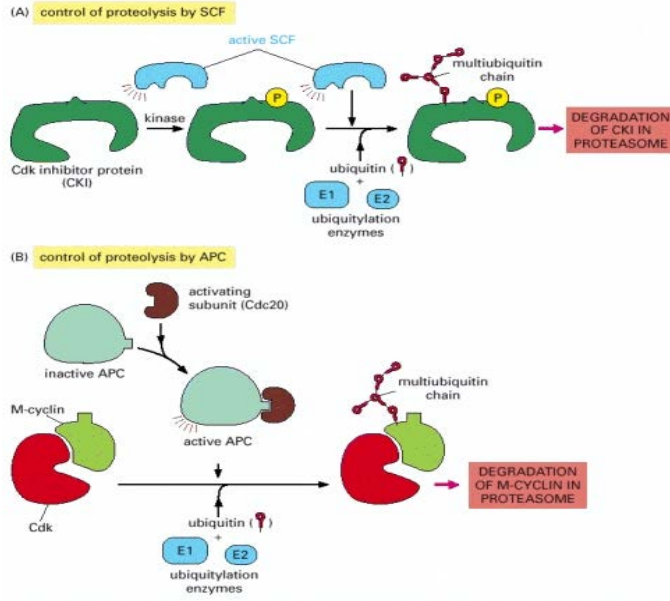
Cdc25 ailesi üyeleri protoonkogendir ve G1/S geçişinde kritik bir

düzenleyicidirler. *cdc25A* memeli hücrelerinde *myc*'in hedefi olan bir gendir. Hücrelerin S fazına girişini *cdk2/siklin E* ve *cdk2/siklin A* komplekslerini defosforile ederek düzenler. UPY tarafından hem bölünen hem de terminal farklılaşma canlı hücrelerde yıkılır. Terminal olarak farklılaşan miyeloid hücrelerde ve insan akciğer kanseri kültürü H1299'da, *cdc25A*'nın UPY ile yıkımında artma gözlenmiştir<sup>56</sup>.

DNA, hücre siklusunun S-fazında replike edilir. Eğer yeterli miktarda DNA hasarı birikirse ya tamir enzimleri uyarılır ya da siklusun ilerlemesini yavaşlatan bir grup proteinin fosforlanmasıyla sonuçlanan bir sinyal kaskadı devreye girer. ATM ve ATR, memelilerde Chk 1 ve Chk 2 kinazların benzerleri ve DNA hasarı kontrol noktasının bileşenleridir. Bu noktanın düzenleyicilerinden Rad1, ATM'ye dayalı bir yolla fosforlanır<sup>49,57,58</sup>.

Cdc37, farklı protein kinazlarla bağlantılı olan ve onları stabilize edebilen, çeşitli canlılarda yüksek oranda korunmuş bir proteindir. Ayrıca inaktif Cdc28'i siklinle bağlanabileceği ve onu etkinleştirebileceği bir konformasyonda stabilize edebilir. Cdc28'in etkinliğini düzenleyen birçok protein kararsızdır. Bu kararsızlık, "Start proteolizi" veya "Anafaz proteolizi" mekanizmaları ile giderilir. Her iki mekanizma da ubiquitin-aracılı yıkımı kullanır. Proteolize uğrayacak substratların Cdc28'e bağımlı fosforlanma ile etkinleşmeleri gerekmektedir.

Metafazdan anafaza geçişte yine proteozom tarafından, APC E3-ligazlarının başlattığı yıkım gerçekleştirilir. Hedef proteinler arasında siklin A, siklin B, sekurin, Pds1p proteinleri vardır<sup>29,36,59</sup> (Şekil 3).



Şekil 3. Hücre siklusu ilerlemesi için E3-ubikitin ligaz etkili APC ve SCF kompleksleri<sup>60</sup>.

### DNA Tamirinde UPY

Tamir edilmeyen DNA hasarı kanserleşmeye veya hücre ölümüne neden olur. DNA tamirine aracılık eden BRCA1, CUL4-DDB1 ve BRCA1 gibi ubikitin ligazları vardır. Hasarlanmamış hücrelerde hiperfosforile edilmiş RNApolimeroz II ile etkileşir, sonra RNApolimeroz II'den ayrılır ve hasarlanmış bölgeye gider. CUL4-DDB1 (hasara özgü DNA bağlayıcı protein) kompleksleri ise NER (nükleotid eksizyon tamiri) işlemlerinde görev alır. NER mekanizması hasarlı DNA bazlarının çıkarıldığı ve daha sonra DNA polimeraz ve DNA ligaz etkinliğiyle DNA'nın yeniden yapılandırıldığı işlemdir<sup>10</sup>.

### Antijen Sunumu ve UPY

MHC sınıf 1 antijenlerin işlenmesinden 26S proteozom sorumludur. MHC molekülleri, T hücrelerinin protein yapıdaki antijenleri tanımada rol oynar.

Endojen olarak ifade edilen sitoplazmik proteinlerden türevlenen peptidler, sitotoksik T lenfositlerinin tanınması için endoplazmik retikulumdan yüzeye MHC1 molekülleri ile taşınırlar. Proteinlerin proteozom tarafından yıkım için ubiquitin aracılı hedeflenmeleri, MHC sınıf 1 molekülüne bağlanacak peptidlerin üretimi için önemlidir<sup>31</sup>.

Proteozomun 20S katalitik merkezinin 11S düzenleyici komplekse veya PA28 adlı komplekse bağlanması, IFN-gamma ile indüklenir. IFN-gamma tarafından up-regüle edilen moleküller arasında iki veya üç proteozom bileşeni mevcuttur<sup>20,36,61</sup>.

Tümörlerde MHC sınıf 1 ile tanımlı peptid sunumunun modifiye olduğunu ve bağışıklık sisteminden kaçışa katkıda bulunabildiği gösterilmiştir. Bununla ilgili UPY aracılı yıkımda değişiklikler rapor edilmiştir<sup>36</sup>.

T hücreleri tarafından tanınabilir antijen işlenmesi ve sunumunda yetersiz kalan tümör hücreleri, bağışıklık sistemi tarafından yok edilmeyecekleri için seçici bir avantaja sahip olabilir<sup>61</sup>.

#### **İlaç direnci ve UPY**

İnsan tümörlerinde çokça ifade edilen ve tümör direnciyle ilişkisi kurulan POH1 adlı proteinin amino asit dizisi, 26S proteozomun S12/p40 alt birimiyle anlamlı derecede benzemektedir. POH1, AP-1 transkripsiyon faktörünü up-regüle eder ve bunun sonucunda çoklu-ilaç direnci gelişir. Proteozom/Ap-1 aracılı direncin, akut miyeloid lösemisinin bir alt türünde kötü prognoza katılabileceği gösterilmiştir. Çoklu ilaç direnci genleri, NF-kB ile düzenlenir<sup>36,62</sup>.

#### **Kolorektal kanser etyolojisinde UPY: kolon epitelinin farklılaşmasının ve proliferasyonunun düzenlenmesinde UPY**

Kolorektal karsinoma sık rastlanır ve metastatik olduğunda daima öldürücüdür. Kolorektal gelişimde önemli bir sinyalleme yolağı Wnt ile ilgilidir. Wnt'nin ilgili reseptöre (Frizzled) bağlanması beta-katenin'in proteozomal yıkımına neden olacak bir yıkım kompleksinin etkinliğini inhibe eder. Beta-katenin, transkripsiyon faktörü TCF4 (T-hücre faktör 4) ile beraber çalışır.  $\beta$ -katenin/TCF4 kompleksinin hedefleri arasında siklin D, c-Myc, aktif kinaz ve c-

Jun vardır. Epitelyal kök hücrelerin çoğaldığı kolon kriptalarında artmış  $\beta$ -katenin etkinliği görülmüştür. Wnt'nin düzenlenmesine katıldığı Hath1 adlı bir transkripsiyon faktörü daha vardır: fosforlandığı zaman ubiquitinlenir ve proteozomda yıkılır<sup>63</sup>.

Ubikitin-proteozom yolağının kanser etiyopatolojisi üzerine etkilerinin araştırılması yeni belirleyiciler ve moleküler biyolojik gereçlerin keşfi ile oldukça güncel ve popüler bir hal almıştır. Konu ile ilgili yapılmış çalışmaların gözden geçirilmesi ve bu konuda yeni stratejilerin geliştirilmesi gereklidir.

### Kaynaklar

1. Spataro V, Norbury C, Harris A. The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *British Journal of Cancer* 1998; 77: 448-455.
2. Yewdell JW. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol* 2001; 11(7): 294-297.
3. Strous GJ, Gent J. Dimerization, ubiquitylation and endocytosis go together in growth hormone receptor function. *FEBS Letters* 2002; 529: 102-109.
4. Rudd PM, Merry AH, Wormald MR ve ark. Glycosylation and prion protein. *Current Opinion in Structural Biology* 2002; 12(5): 578-586.
5. Liu CH, Goldberg AL, Qiu XB. New insights into the role of the ubiquitin-proteasome pathway in the regulation of apoptosis. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18(7): 957-971.
6. Scott AI, Graziano J, Cho CY, Knuth MW ve ark. Gene expression response to misfolded protein as a screen for soluble recombinant protein. *Protein Engineering* 2002; 15(2): 153-160.
7. Healy SJM, Gorman AM, Mousavi-Shafaevi P ve ark. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *European Journal of Pharmacology* 2009; 625: 234-246.
8. Wu WKK, Cho CH, Lee CW ve ark. Proteasome inhibition: A new therapeutic strategy to cancer treatment. *Cancer Letters* 2010, Feb 4. Epub ahead of print, PMID20133049.
9. [http://www.bb.ustc.edu.cn/ocw/NR/rdonlyres/Biology/7-340Fall-2004/7D4E5F70-D6E2-44B7-BF0B-836ACCD62630/0/chp\\_ub\\_p\\_sys.jpg](http://www.bb.ustc.edu.cn/ocw/NR/rdonlyres/Biology/7-340Fall-2004/7D4E5F70-D6E2-44B7-BF0B-836ACCD62630/0/chp_ub_p_sys.jpg)
10. Kitagawa K, Kotake Y, Kitagawa M. Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products. *Cancer Sci* 2009; 100(8): 1374-1381.
11. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews* 2002; 82(2): 373-428.



12. McKenna S, Spyrapopoulos L, Moraes T ve ark. Noncovalent interaction between ubiquitin and the human DNA repair protein Msm2 is required for Ubc13-mediated polyubiquitination. *J Biol Chem* 2001; 276(43): 40120-40126.
13. Yu CL, Burakoff SJ. Involvement of proteasomes in regulating Jak-STAT pathways upon interleukin-2 stimulation. *J Biol Chem* 1997; 272(22): 14017-14020.
14. Cobb JA, Bjergbaek L, Gasser SM. RecQ helicases: at the heart of genetic instability. *FEBS Letters* 2002; 529: 43-48
15. Osada T, Sakamoto M, Nishibori H ve ark. Increased ubiquitin immunoreactivity in hepatocellular carcinomas and precancerous lesions of the liver. *Journal of Hepatology* 1997; 26: 1266-1273.
16. Zheng N, Wang P, Jeffrey PD ve ark. Structure of a c-Cbl-UbcH7 Complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* 2000; 102: 533-539.
17. Dhananjayan SC, Ismail A, Nawaz Z. Ubiquitin and control of transcription. *Essays Biochem* 2005; 41, 69-80.
18. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for sake of construction. *Physiological reviews* 2002; 82(2): 373-428.
19. Waterman H, Katz M, Rubin C ve ark. A mutant EGR receptor defective in ubiquitylation and endocytosis unveils a role of Grb2 in negative signaling. *The EMBO Journal* 2002; 21(3): 303-313.
20. Dudek RW. *High Yield Cell and Molecular Biology*. Ch: 19, s 102. Lippincott Williams & Wilkins, Maryland USA, 1999.
21. Arthur WS. *Cancer Pathways: Springer. Molecular Biology of human Cancers: An advanced student's textbook*. Dordrecht, 2005, 113-143
22. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351: 289-305.
23. Klapper LN, Waterman H, Sela M ve ark. Tumor-inhibitory antibodies to HEWR-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. *Cancer Research* 2000; 60: 3384-3388.
24. Wieser R. The transforming growth factor beta signaling pathway in tumorigenesis. *Current Opinion in Oncology* 2001; 13: 70-74
25. Öklü R, Hesketh R. The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J* 2000; 352: 601-610.

26. Buenemann CL, Willy C, Buchmann A ve ark. Transforming growth factor-beta1-induced smad signaling, cell-cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells. *Carcinogenesis* 2001; 22(3): 447-451.
27. Fukuchi M, Imamura T, Chiba T ve ark. Ligand-dependent degradation of smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol Biol Cell* 2001; 12(5): 1431-1443.
28. Hagan I, Sharrocks AD. Understanding cancer from the gene to the organism. *EMBO Reports* 2002; 3(5): 415-419.
29. Benjamin Lewin. *Genes VIII*. International edition Chapter 30; 920-921, Pearson Prentice Hall Publications, NJ, 2004.
30. Pawson T, Raina M, Nash P. Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behaviour. *FEBS Letters* 2002; 513: 2-10.
31. Jeay S, Sonenshein GE, Postel-Vinay MC ve ark. Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002; 188: 1-7.
32. Yang H, Zonder JA, Dou QP. Clinical development of novel proteasome inhibitors for cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18(7): 957-971.
33. Shah JJ, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23: 1964-1979.
34. Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor-kB activation: a question of life and death. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2002; 35(1): 28-40.
35. Skaug B, Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 769-796.
36. Spataro V, Norbury C, Haris AI. The Ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *British Journal of Cancer* 1998; 77: 448-455.
37. Deshaies RJ. Make it or break it: the role of ubiquitin-dependent proteolysis in cellular regulation. *Trends in Cell Biology* 1995; 5: 428-434.
38. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology* 2001; 11(9): 372-376.
39. Lee NK, Lee SY. Modulation of life and death by the tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2002; 35(1): 61-66.
40. <http://images.the-scientist.com/content/figures/0890-3670-051205-42-1-2.jpg>
41. Wang S, Shi X. Mechanisms of Cr(VI)-induced p53 activation: the role of phosphorylation, mdm2 and ERK. *Carcinogenesis* 2001; 22(5): 757-761.
42. Bargonetti J, Manfredi J. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Current Opinion in Oncology* 2002; 14: 86-90.

43. Momand J, Wu HH, Dasgupta G. MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 2000; 242: 15-29.
44. Kao WH, Beaudenon SL, Talis AL ve ark. Human papillomavirus type 16E6 induces self-ubiquitination of the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Journal of Virology* 2000; 74(14): 6408-6417.
45. Weinberg RA. How cancer arises. *Scientific American* 1996, 275(3): 62-70..
46. Fu H, Reis N, Lee Y ve ark. Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *The EMBO Journal* 2001; 20(24): 7096-7107.
47. Stacey DW. CyclinD1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. *Current Opinion in Cell Biology* 2003; 15(2): 158-163.
48. Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell cycle control and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6: 369-381.
49. Germain D, Russell A, Thompson A ve ark. Ubiquitination of free cyclinD1 is independent of phosphorylation on threonine 286. *J Biol Chem* 2000; 275(16): 12074-12079.
50. Lopes UG, Erhardt P, Yao R ve ark. p53-dependent induction of apoptosis by proteasome inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 12893-12896.
51. Mendenhall MD, Hodge AE. Regulation of Cdc28 Cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology reviews* 1998; 62(4): 1191-1243.
52. Jaclman M, Lindon C, Nigg EA ve ark. Active cyclinB1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* 2003; 5(2): 143-148.
53. Meyer T, Begitt A, Lödige I ve ark. Constitutive and IFN-gamma-induced nuclear import of STAT1 proceed through independent pathways. *The EMBO Journal* 2002; 21(3): 344-354.
54. Robbins KC. Temel Patoloji. Yedinci Baskı, 3: 62-64. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2003.
55. Ceccarelli E, Mann CA.Cdc28 mutant uncouples G1 cyclin phosphorylation and ubiquitination from G1 cyclin proteolysis. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(45): 41725-41731.
56. Bernardi R, Liebermann DA, Hoffman B. Cdc25A stability is controlled by the ubiquitin-proteasome pathway during cell cycle progression and terminal differentiation. *Oncogene* 2000; 19: 2447-2454.
57. Francesconi S, Smeets M, Grenon M ve ark. Fission yeast 'chk1' mutants show distinct responses to different types of DNA damaging treatments. *Genes to Cells* 2002; 7(7): 663-673.
58. Pearce AK, Humphrey TC. Integrating stress-response and cell cycle checkpoint pathways. *Trends in Cell Biology* 2001; 11(10): 426-432.
59. Castro A, Bonnemains YA, Vigneron S ve ark. APC/Fizzy-related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Reports* 2002; 3(5): 457-462.
60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A3167>

61. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology . Üçüncü baskı, USA: 1997.
62. Rosell R, Taron M, O'Brate A. Predictive molecular markers in non-small cell lung cancer. Current Opinion in Oncology 2001; 13(2): 101-109.
63. Voutsadakis IA. The ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer. Biochimica et Biophysica Acta 2008; 1782: 800-808.

**Yazışma Adresi :**

Dok. Öğr. N. Ceren SÜMER TURANLIGİL  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyofizik Anabilim Dalı  
35100 Bornova/İZMİR

Tel: 0232 3904398  
Fax: 0232 3422142  
E-mail: csumer@gmail.com