




## ■ Derleme

# Çok işlevli proteinler: Moonlight proteinler

## *Multifunctional Proteins: Moonlight Proteins*

Birşen BİLGİCİ\* , Sebatı Sinan ÜRKMEZ , Yeşim CİVİL 

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun/TÜRKİYE

### Öz

Son yıllarda birçok proteinin birden fazla fonksiyona sahip olduğu bilgisi, bir gen - bir protein - bir fonksiyon fikrinin yerini almaya başlamıştır. Moonlight proteinler çok fonksiyonlu proteinlerin bir alt sınıfıdır. Moonlight protein kavramı, tek bir polipeptid zincirinin çoklu biyokimyasal fonksiyonları yerine getirmesini tanımlamaktadır. Bugün 300'den fazla moonlight proteini tanımlanmıştır. Bununla birlikte, veriler daha fazla moonlight proteini olabileceğini göstermektedir. Moonlight proteinlerin bilinen örnekleri arasında, reseptörler, enzimler, transkripsiyon faktörleri, adezinler ve hücre iskeleti de dahil olmak üzere çeşitli protein türleri bulunmaktadır. Bir moonlight protein, farklı hücre tiplerinde, farklı hücre içi lokasyonlarda, farklı oligomerik durumlarda bulunarak veya bir ligandın, substratın, kofaktörün ya da ürünün konsantrasyonundaki değişikliklere bağlı olarak ikinci fonksiyonunu aktive edebilmektedir. Ancak bu mekanizmalar, özgül değildir ve fonksiyonlar arasındaki geçişlerde bu yollardan birini ya da bunların bir kombinasyonunu kullanabilmektedir. Moonlight proteinlerin, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser gibi hastalık fenotipleri ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir. Bunun yanı sıra hastalık patogeneplerinde yer alarak tedavi süreçlerine bir takım zorluklar getirmekle birlikte potansiyel bir tedavi hedefi ve tedavi aracı olarak da fırsatlar sunmaktadır. Biz bu derlemede, başlıca insanlardaki mevcut moonlight proteinlerin biyokimyasal, fizyolojik ve patolojik özelliklerini ve hastalıklarla ilişkilerini tartışarak mevcut temel ve biyokimyasal bilgilerimize katkıda bulunmayı amaçladık.

**Anahtar kelimeler :** Moonlight proteinler; çok işlevli proteinler; protein fonksiyonu; metabolik düzenlenme; ilave yeni fonksiyonlar

Sorumlu yazar\*: Birşen Bilgici , Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun/TÜRKİYE

E-posta: b\_bilgici@yahoo.com

ORCID: 0000-0001-7783-5039

Gönderim: 20-03-2019 Kabul: 08-01-2020

Doi:10.18663/tjcl.542346

## Abstract

**Aim:** In recent years, the knowledge that many proteins have more than one function has begun to take the place of one gene – one protein - one function idea. Moonlight proteins are a subclass of multi-functional proteins. The concept of moonlight protein describes the ability of a single polypeptide chain to carry through multiple biochemical functions. Today more than 300 moonlight proteins have been identified. However, the data indicate that there may be more moonlight proteins. Known examples of moonlight proteins include a variety of protein types including receptors, enzymes, transcription factors, adhesins, and scaffold proteins. A moonlight protein can activate the second function in different cell types, at different intracellular locations, at different oligomeric states, or depending on changes in concentration of a ligand, substrate, cofactor or a reaction product. However, these mechanisms are non-specific and the mechanism of transition between functions may use one of them or their combination. Moonlight proteins have been suggested to be associated with disease phenotypes such as neurodegenerative diseases and cancer. Moonlight proteins bring some difficulties to treatment processes by taking place in pathogenesis of diseases but also offer opportunities as a potential treatment target and treatment tool. In this review, we aimed to contribute to our current basic and biochemical knowledge by discussing the biochemical, physiological and pathological features of the present moonlight proteins and their relationships with diseases.

**Key words:** Moonlight proteins; multifunctional proteins; protein function; metabolic coordination; additional novel functions

## Giriş

Proteinler canlı organizmasında çok fazla çeşitlilikte fonksiyona sahip makromoleküllerdir. İnsan genom dizisinin anlaşılmasıyla, birçok farklı hücre tipine sahip böyle bir kompleks organizma için beklenenden çok daha az proteinin kodlandığı (19000 gen) ortaya çıkmıştır [1,2,3]. Çoğu proteinin tek bir fonksiyonu olmasına rağmen bazı proteinler multifonksiyoneldir ve her geçen gün bunlara yenileri eklenmektedir, dolayısıyla günümüzde “bir protein - birden fazla fonksiyon” fikri “bir gen - bir protein - bir fonksiyon” hipotezinin yerini almaya başlamıştır [2,3,4]. Bu çok fonksiyonlu protein tiplerinden biri de moonlight proteinlerdir. Bu derlemede, başlıca insanlardan izole edilen moonlight proteinlere odaklanılmakla birlikte, örnek çeşitliliğini arttırmak amacıyla diğer türlerden de örnekler verilmiştir.

Moonlight tanımı, tek bir polipeptid zinciri tarafından iki veya daha fazla farklı fonksiyonu gerçekleştiren proteinlere karşılık gelmektedir [5]. İlk olarak 1980'lerin sonlarında Wistow ve Piatigorsky tarafından lens kristalinlerinin, metabolik enzim fonksiyonlarının gösterilmesiyle keşfedilmiştir [7,6]. Başlangıçta Piatigorsky bu proteinleri “gen paylaşımı” proteinleri olarak adlandırmış daha sonra Constance Jeffery tarafından 1999'da “moonlight” tanımı gündüz ve gece farklı işler yapan insanlara benzerlik oluşturmak için kullanılmış ve kabul görmüştür [5,8].

Moonlight fonksiyonlar, gen füzyonlarını, ribonükleik asit (RNA) splicing varyantlarını, homolog protein ailelerini veya multipl proteolitik fragmentlere bağlı ek fonksiyonları kapsamaktadır. Ayrıca geniş substrat spektrumuna sahip detoksifikasyon enzimleri, anormal koşullarda (örneğin; fizyolojik olmayan bir substratın yüksek konstrasyonu) farklı reaksiyonları katalizleyen karmaşık fonksiyonlu enzimler, bir biyokimyasal fonksiyonla sonuçlanan farklı yollarda veya fizyolojik süreçlerde birden fazla hücresel yolda farklı fonksiyonlara sahip pleiotropik proteinler ve farklı hücre tiplerinde veya hücre altı lokasyonlarda aynı işleve sahip proteinler, moonlight protein kapsamında değildirler [4,9,10,11].

Moonlight proteinlerin çoklu fonksiyonları birbiriyle bazı durumlarda tamamen ilgisiz bazı durumlarda ise bağlantılı olabilir. Bu durum beraberinde organizmaya bir dizi faydalar getirmektedir. Moonlight proteinler, birbiriyle ilişkili hücresel aktivitelerin koordinasyonuna aracı olabilmektedir [9]. Kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR) protein, hem siklik adenosin monofosfata (cAMP) bağlı bir klorür kanalı hem de bir epitelyal sodyum kanalı (ENaC) düzenleyicisidir. CFTR'nin defektif olması mukoza epitel hücresinde Cl<sup>-</sup> retansiyonu ve aşırı Na<sup>+</sup> absorpsiyonu ile sonuçlanır ki bu durum proteinin bifonksiyonel karakteriyle ilgilidir [12]. 1-cys peroksiredoksin, iki farklı aktif bölgede fosfolipaz A2 ve

glutasyon peroksidaz aktiviteleri gösteren bifonksiyonel bir enzimdir ve bu iki fonksiyonun oksidatif strese karşı birlikte hareket ettiği düşünülmektedir [13]. Trombin, koagülasyon kaskadında hem fibrinojeni fibrine çeviren bir proteaz hem de G-protein ilişkili proteaz aktive edici reseptör-1 (PAR-1) aktivasyonu ile trombosit adezyonuna neden olan bir sinyal proteindir [14]. Siklin bağımlı kinaz 1 (CDK1) hücre siklusunun geç G2 ve mitoz fazlarını kontrol eden bir serin/treonin kinazdır. Anafaz uyarıcı kompleks/siklozom (APC/C) ise CDK1 ile kompleks oluşturarak mitotik sürecin sonlanmasını kontrol eden bir düzenleyici proteindir. CDK1-APC/C kompleksinin siliyalı hücrelerde mitoz bölünmeden sonra sentriollerin üretimini, gelişimini ve siliyer yapıları farklılaşmasını sağladığı bulunmuştur [15]. Bir proteinin iki tamamlayıcı fonksiyona sahip olması, farklı yollar arasında bir geçiş görevi görebileceğini de düşündürmektedir [9]. Örneğin, ökaryotik mitokondride, Lon ATP'ye bağımlı bir proteazdır fakat aynı zamanda da bir şaperondur [16].

Moonlight kavramı sıklıkla proteinleri belirtmek için kullanılmakla birlikte güncel bir çalışmada çinko parmak (ZnF) motif içeren bir protein ailesi olan Cys2His2 (C2H2)-ZNF'ye ait mRNA'ların da sıra dışı bir özelliği keşfedilmiştir. Bu mRNA'lar üzerindeki çinko parmak motiflerindeki tekrarlı sekansların, mRNA'nın poliadenilasyon sürecini kısıtladığı ve bundan bağımsız olarak mRNA'nın nükleustan sitozole translokasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir [17]. Bu durum ihtiyaç halinde kullanılmak üzere bu mRNA'ların depolanabileceğini düşündürmekle birlikte moonlight kavramının kapsamını transkript düzeyine genişletme potansiyelini de taşımaktadır.

### **Moonlight Proteinlerin Evrimi**

Gancedo ve Flores, "evrimde nihai bir amaç olmadığı ve yeni işlevlerin sadece var olanları uyarlayarak geliştiği" teorisinden yola çıkarak belirli bir yeni fonksiyonun, evrim sırasında seçilmesinin ancak organizma için avantaj sağladığında olası olduğunu belirtmişlerdir [18]. Bununla birlikte, çoklu rolleri olan proteinlerin neden evrimleştiğini açıklayan evrensel olarak kabul edilmiş bir teori yoktur [5,19]. Moonlight proteinlerin, tek fonksiyona sahip çok sayıda proteinin sentezlenmesi için gereken amino asitleri

ve enerjiyi muhafaza ederek evrimsel açıdan organizma için avantajlı bir durum yarattığı düşünülmektedir [5]. Bazı moonlight proteinlerin ise, herhangi bir sitozolik proteinin medyan uzunluğundan daha uzun ve buna bağlı olarak daha kararlı bir yapıda oldukları bulunmuştur. Bu durum hücre sitozolünden daha zorlu bir ortamda yeni bir fonksiyon için gerekli kararlılığa nasıl sahip olduklarını ve moonlight fonksiyonu için seçilme nedenlerini açıklarken, proteinin esas işlevini etkilemeden, küçük bir yüzey bölgesinin yeni bir protein bağlama bölgesi oluşturmak için evrimsel modifikasyona uğrama olasılığını yaratmaktadır [20].

### **Moonlight Protein Örnekleri ve Fonksiyonlar Arası Geçiş Mekanizmaları**

Moonlight proteinler birçok organizmada yaygın bir şekilde bulunmaktadır ve bugüne kadar 300'den fazla moonlight proteini tanımlanmıştır [21]. Bununla birlikte, veriler daha fazla moonlight proteini olabileceğini göstermektedir [20]. Moonlight proteinlerin bilinen örnekleri arasında, reseptörler, enzimler, transkripsiyon faktörleri, adezinler ve hücre iskelet proteinleri gibi çeşitli protein türleri bulunmaktadır [4,5,22]. Glikolitik yoldaki 10 enzimin 7'sinin ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsündeki 8 enzimin 7'sinin de moonlight fonksiyonuna sahip olduğu bildirilmiştir [23,24]. Tompa ve ark., bazı moonlight proteinlerin, aslında düzensiz proteinler (IUP) olarak bilinen, iyi tanımlanmış üç boyutlu bir yapıya sahip olmayan proteinler olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Örnek: p53 proteini) [25], ancak bu görüşe fazla ilgi gösterilmemiştir [26]. Tanımlanmış bazı insan moonlight proteinleri Tablo 1 'de verilmiştir.

Bazı moonlight proteinler, her iki işlevi aynı anda yerine getirebilirken bazıları moonlight fonksiyonlarını, hücre içinde meydana gelen değişikliklere bağlı olarak gerçekleştirir. Bir moonlight protein, farklı hücre tiplerinde, farklı hücre içi lokasyonlarda, farklı oligomerik durumlarda bulunarak veya bir ligandın, substratın, kofaktörün ya da bir reaksiyon ürününün konsantrasyonundaki değişikliklere bağlı olarak ikinci fonksiyonunu aktifleştirebilir [27,28]. Bu mekanizmalar, özgül değildir, bir proteinin fonksiyonları arasındaki geçişte bunlardan biri ya da bunların bir kombinasyonu kullanılabilir [5].

**Tablo 1.** İnsanlarda tanımlanan bazı moonlight proteinler

| Protein  | 1. Fonksiyon   | 2. Fonksiyon   |
|--|--|--|
| 1-Sistein Peroksiredoksin                                  | Asidik kalsiyumdan bağımsız fosfolipaz A2 (aiPLA2)   | Selenyum içermeyen glutatyon peroksidaz  |
| Isı şok proteini 60 (Hsp60)                                | Proteinlerin mitokondri dışına transportu, doğru ve yeniden katlanmanın uyarılması, yanlış katlanmanın önlenmesi | Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) için apolipoprotein apo A-II reseptörü                                |
| Enolaz   | Enolaz, glikoliz enzimi  | Plazminojen bağlama  |
| Laktoz sentaz  | Laktoz sentaz, enzim   | Galaktoziltransferaz, enzim  |
| Delta-aminolevulinik asit dehidrataz                       | 5-aminolevulinat dehidrataz, enzim   | Proteozom inhibitörü   |
| Lökotrien A4 hidrolaz                                      | Lökotrien A-4 hidrolaz, enzim  | Aminopeptidaz, enzim   |
| Lizil hidroksilaz  | Lizil hidroksilaz izoform 3, enzim   | Kollajen glukoziltransferaz, enzim   |
| Fosfogliserat kinaz  | Fosfogliserat kinaz, glikoliz enzim  | Disülfid redüktaz, enzim   |
| Timozin beta-4   | Polimorfonükleer lökositlerinde G-aktin sekestrasyonu  | Salgılanabilen anti-inflamatuar ajan   |
| Timidin fosforilaz   | Pirimidin metabolizması, kurtarma yolunda dTMP biyosentezi   | Trombosit kaynaklı endotel hücre büyüme faktörü  |
| Kalretikülin   | Şaperon  | Adezin   |
| Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz                        | Glikoliz enzimi  | İnterferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) ile aktive transkripsiyon inhibitörü (GAIT) kompleksi bileşeni         |
| Ribozomal protein S7, L11, L5, L23                         | Ribozomun 40S (S7) ve 60S (L11, L5, L23) alt birimi bileşenleri  | Ubikitin ligaz inhibisyonu   |
| Timidilat sentaz   | Pirimidin metabolizması de novo timidilat sentezi  | Kendi mRNA transkripsiyonunun inhibisyonu  |
| Dihidrofolat redüktaz                                      | Tetrahidrofolat biyosentezi enzimi   | Kendi mRNA'sına bağlanarak sentezini düzenler  |
| Akonitaz   | Sitrik asit döngüsü enzimi   | Demir duyarlı element bağlayıcı protein (IRE-BP)   |
| Band 3 anyon değiştirici                                   | Plazma membranı boyunca inorganik anyonların taşınması   | Glikolitik enzimlerin katalitik aktivitesinin düzenlenmesi   |
| Kistik fibrozis transmembran iletkenlik düzenleyici (CFTR) | Klorid taşıyıcı; Adenozin trifosfat (ATP) bağlayan ve hidrolize eden nükleotid bağlayıcı alanlar içerir.         | Bazı iyon kanallarının düzenlenmesi  |
| Çoklu ilaç direnci protein 1 (MDR)                         | ATP bağımlı transmembran taşıyıcı; ilaçlar ve diğer küçük moleküllü bileşikler                                   | Hacim ile aktive klorür kanallarının düzenlenmesi  |
| Aldolaz  | Glikoliz, enzimi   | Ovumun zona pellusida proteinleri ile etkileşim  |
| Fosfatidilinositol bağlayıcı klatrin montaj proteini       | Endositozda klatrin kaplı çukur oluşumu ve klatrin ve adaptör protein kompleksi 2'yi hücre zarına taşıma         | Transkripsiyon aktivasyonu   |
| Metilglutakoniol-Koenzim A hidrataz                        | Lösin katabolizmasında enzim   | RNA bağlama  |
| Fruktoz-1,6-bisfosfataz                                    | Glukoneogenez enzimi   | Hipoksi indüklenebilir faktör (HIF) proteinine bağlanır ve inhibe eder                                   |
| Glutatyon S-transferaz M3                                  | Glutatyon S-transferaz enzim   | Spermatozoan üzerinde bulunur ve rekombinant insan zona pellusida protein 4 (rhZP4) ile etkileşime girer |
| Fosforuktokinaz 1  | Glikoliz enzimi  | Transkripsiyon faktörleriyle etkileşim   |
| Fosfogliserat kinaz 1                                      | Fosfogliserat kinaz, enzim   | mRNA'yı bağlayarak ürokinaz reseptörünün ekspresyonunu düzenler  |
| Glutatyon peroksidaz 4                                     | Fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz  | Zona pellusida proteinleri ile etkileşim   |
| Piruvat kinaz izozim M2                                    | Piruvat kinaz, glikoliz enzimi   | Transkripsiyon düzenleyicisi   |
| Trioz-fosfat izomeraz                                      | Triozfosfat izomeraz, enzim  | Zona pellusida proteinleri (rhZP3 ve rhZP4) ile etkileşim  |

\*Tablodaki veriler MOONPROT veri bankasından (<http://moonlightingproteins.org/>) elde edilmiştir [21].

### **Bazı proteinler hücre içinde ve dışında farklı fonksiyona sahiptirler**

Hücre sitozolünde fosfoglukoz izomeraz (PGI) bir glikoliz enzimidir ve birçok hücre tarafından ekstrasellüler ortama salgılanabilir ve en az dört ek fonksiyona sahiptir [5]. PGI ile amino asit dizilimi % 90 homoloji gösteren nörolokin (NLK) lektin ile stimule edilmiş T hücreleri tarafından salınan bir lenfokindir, ayrıca spinal ve sensorik nöronlar için nörotrofik etkiye sahiptir [29,30,31]. PGI ile aynı protein olduğu sekans analizi ile belirlenen otokrin motilite faktörü (AMF) in vitro hücre göçünü ve in vivo metastazı uyaran, kanser hücrelerinden salgılanan bir sitokindir [32]. İnsan myeloid lösemi hücrelerden salınan farklılaşma ve matürasyon mediatörü (DMM) amino asit sekansının PGI ve NLK ile %100 homoloji gösterdiği bulunmuştur [33].

Matriks metalloproteinazları (MMP), ekstrasellüler matriks ile bazal membran komponentlerini parçalayarak matriksin protein turnoverını sürdüren homolog bir enzim ailesidir. Hücre içinde farklı substratlar üzerinde proteolitik etkiye sahip olmakla birlikte aynı zamanda bir transkripsiyon faktörü, sinyal molekülü ve bakterisidal etkili proteinlerdir [34].

Timidin fosforilaz ile trombositten türetilmiş endotelial hücre büyüme faktörü (PD-ECGF) 120 aminoasitlik aynı sekansa sahiptir. Hücre sitozolünde timidin fosforilaz, timidin ve deoksiüridini geri dönüşümlü olarak desfosforile ederek bunları kendilerine özgül bazlara ve 2-deoksiriboz 1-fosfata ayrılmasını katalize ederken, PD-ECGF endotelial hücre gelişimini, kemotaksisi ve anjiyogenezi ekstrasellüler olarak uyarır [35].

### **Bazı proteinler ekspresyon bölgelerine göre farklı fonksiyona sahiptirler**

Moonlight proteinler, eksprese edildikleri hücre türüne göre farklı fonksiyonlar gösterebilmektedir [36]. Nöropilin, endotelial hücrelerde eksprese edildiğinde, vasküler endotelial büyüme faktörünü tanıyan ve anjiyogenezi uyaran bir hücre yüzey reseptörüdür. Aynı protein nöronlarda eksprese edildiğinde ise kollapsin/semaforini tanıyan ve aksonları uygun lokalizasyonlara yönlendiren bir hücre yüzey reseptörüdür [37].

### **Bazı proteinler, monomerik ve multimerik formlarda farklı fonksiyonlara sahiptir**

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, tetramer yapıda glikolitik yoldaki enzim fonksiyonunu gösterirken monomer yapıda, nükleer urasil-DNA glikozilaz fonksiyonunu göstermektedir [38]. Piruvat kinaz da yine tetramer yapıda glikolitik yoldaki metabolik aktivitesini gösterirken monomerik yapıda ise tiroid hormon bağlayıcı protein fonksiyonunu gösterir [39].

### **Bir enzimin fonksiyonu, mevcut substrat, ligand veya kofaktör miktarı ile değişebilmektedir**

Akonitaz, yüksek hücrel demir konsantrasyonlarında sitrik asit siklusunda yer alan demir bağımlı bir enzimdir. Hücrel demir konsantrasyonu azaldığında, üzerindeki Fe-S kümesini dolayısıyla akonitaz aktivitesini kaybetmekte ve demir yanıt elementi bağlayıcı protein (IRE-BP) rolünü üstlenmektedir [40]. Bu durumda demir yanıt elementine (IRE) bağlanan IRP-BP transferrinin mRNA translasyonunu artırırken, ferritinin mRNA translasyonunu inhibe ederek demir konsantrasyonu artırılmaya çalışılır.

### **Bağlanma bölgeleri ikinci fonksiyona sahip olabilir**

Bazı moonlight enzimler, farklı bağlanma bölgeleri kullanarak çoklu işlevlerini yerine getirebilmektedirler [10]. Enolaz glikoliz yolağında yer alan ubikitöz bir enzimdir. Aynı zamanda hücre dışında plazminojeni bağlama fonksiyonu göstermektedir. Plazminojen bağlayan bölgenin enolazın katalitik aktif bölgesinden farklı, molekülün C-terminalinde genellikle lizin içeren kısa bir amino asit sekansı olduğu bulunmuştur [41]. Eya proteinleri (Eyes Absent proteins) six homeoprotein (Sineoculis homeobox) ailesinin başlıca transkripsiyonel ko-aktivatörleridir ve organogenezde önemli rolleri vardır. Buna ek olarak bu proteinler, C-terminalinde iki farklı bölgede, Mg<sup>2+</sup> bağımlı tirozin fosfataz aktivitesine sahiptir [42]. Bununla birlikte bazı proteinler için mevcut aktif bölgenin kullanıldığı durumlar da vardır. Örneğin IRE-BP'nin RNA-bağlama bölgesinin akonitazın aktif bölgesinde yer aldığı gösterilmiştir [43].

### **Post translasyonel modifikasyonlar çoklu fonksiyon sağlayabilir**

Çok fonksiyonellik, post translasyonel modifikasyonların bir sonucu olarak da ortaya çıkabilmektedir [44]. Bazı hücre yüzey proteinlerinde birkaç yüzey amino asidinin veya C terminal kalıntısının lizinler ile yer değiştirmesiyle, genel protein yapısında veya orijinal işlevinde önemli değişikliklere neden olmaksızın plazminojen için bağlanma bölgeleri oluştuğu gösterilmiştir [20]. Ayrıca fosforilasyon da moonlight protein fonksiyonuna geçişe neden olabilmektedir. Örneğin, fosfoglukoz izomerazın Ser-185 kalıntısından fosforilasyonu, glikolitik enzim fonksiyonunu durdururken, proteinin otokrin motilite faktörü fonksiyonu devam eder [45]. Buna ek olarak GAPDH'nin fosforilasyon, nitrozilasyon, asetilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonları proteinin farklı fonksiyonları ile ilişkilidir [46].

### Hastalıkların Patofizyolojisinde ve Tedavisinde Moonlight Proteinlerin Yeri

Bazı hastalıkların moonlight proteinler ile ilişkili olabileceğini gösteren veriler bulunmaktadır. Konformasyonu değişen proteinlerin yeni yapılar bağlanarak çeşitli patolojilere sebep olması bir moonlight olgusudur [47]. Trioz fosfat izomeraz (TPI) enzimidaki bazı mutasyonlar, yeni protein-protein etkileşimlerine yol açarak aneminin ve hatta şiddetli nörolojik hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir. Oluşan TPI agregatları düzensiz yapıdadır ve diğer hücre proteinlerinin de birikmesine yol açabilmektedir [48]. GAPDH'nin,  $\beta$ -amiloid öncü proteini, huntingtin ve  $\alpha$ -sinüklein gibi nörodejeneratif hastalıklarda ( Alzheimer, Huntington, Parkinson hastalıkları) rol oynayan proteinlere bağlandığı gösterilmiştir [49]. Bu yeni bağlanma modelinde, protein birikiminin yansira, hücre içi enerji metabolizmasının yavaşlamasına da neden olarak nörodejenerasyona katkıda bulunulabileceği ileri sürülmüştür [50]. Senil sistemik amiloidoz ve ailesel amiloid polinöropatisinde de transtiretinin konformasyonunun değişmesi, amiloid fibrillerinin oluşumuna yol açarak, nörodejenerasyon patogeneğinde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir [51,52].

Moonlight proteinler anormal enzimatik özellikler göstererek de bazı patolojilere yol açabilirler. Dihidroliipoamid dehidrogenaz (DLD), çeşitli çoklu enzim komplekslerinde bulunan flavin bağımlı, homodimerik bir oksidoredüktazdır. DLD aktivitesi, hücrede enerji ve redoks dengesi için kritik öneme sahiptir ve aktivite eksikliğinde infantlarda büyüme ve gelişme hızının yavaşlaması, hipotoni ve metabolik asidozla karakterize şiddeti değişen derecelerde patolojilere yol açmaktadır. Homodimer yapısı bozulduğunda DLD monomerleri enerji metabolizmasındaki görevlerini yerine getiremezken ayrıca bu monomerler moonlight fonksiyon kazanarak proteaz aktivitesi ile mitokondriyal proteinleri yıkıma uğratmaktadır [53].

Moonlight proteinler kanserle ilişkili bazı hücre proteinleri ve biyokimyasal yollarla da yer alır [9]. Ribozom alt birimlerine ait bir çok yapısal protein, aynı zamanda çeşitli kanser tiplerinin oluşumunda ve progresyonunda önemli görevleri olan birer sinyal molekülü ve/veya transkripsiyon faktörüdür. Söz konusu bu etkiler hem onkogenik hem de tümör supresör özellikte olabilmektedir [54]. Isı şok proteini 90 (Hsp90), proteinlerin ATP aracılı katlanmasına, kararlılığına, proteolitik döngüsüne aracılık eden sitoplazmik bir şaperondur [55]. Bununla birlikte, Hsp90 hem salgılanabilen bir protein hem de membran yüzey proteinidir. Ekstrasellüler Hsp90'nın salgılanabilen formu pro-onkogenik bir protein olarak kabul edilmektedir [56].

Salgılanmış Hsp90, anjiyogenez ve kanser hücre invazyonuna katkıda bulunan matris metalloproteinaz-2'yi (MMP-2) kararlı hale getirir [57]. Ayrıca bu formun prostat kanserinde E-kaderin fonksiyonunu değiştirdiği ve epitelyal-mezenkimal transformasyona yol açtığı da bildirilmiştir [58].

Glikolitik yola ait  $\alpha$ -enolazın artmış ekspresyonunun, nöroblastoma ve akciğer kanserinde tümör gelişimi ile korelasyonu bildirilirken, bir çok tümörün potansiyel tanılabilir belirleyicisi olduğu düşünülmektedir. Tümörlerin dışında  $\alpha$ -enolazın değişmiş ekspresyonlarının Alzheimer, reumatoid artrit gibi diğer hastalıklarla da ilişkili olduğu rapor edilmiştir [59]. Kanserle ilişkili bazı proteinler Tablo 2'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.** Kanserle ilişkili moonlight proteinler

| Protein  | Primer Fonksiyon   | Ek Fonksiyon   |
|--|--|--|
| Transglutaminaz 2 (TG2)                              | Sitoplazma; Protein çapraz bağlarının oluşumunun katalizi                                | Nükleus; Pro-tümöral gen ekspresyonunu düzenler Ekstrasellüler bölge; Hücre adezyonu   |
| GAPDH  | Sitoplazma; Glikolitik enzim   | Nükleus; p53 gen düzenlenmesine ve apoptotik yolların aktivasyonuna katılır, bunun yanında hücre farklılaşmasını da uyararak pro-tümöral etki gösterebilir |
| p53  | Nükleus; Transkripsiyon faktörü  | Mitokondri; Mitokondriyal membran geçirgenliğinin artırılması Nükleus; DNA onarımı ve apoptoz  |
| Yüksek mobiliteli grup B1 (HMGB1)                    | Nükleus; Nükleozomlara bağlanarak transkripsiyon faktörlerinin etkileşimini düzenler     | Ekstrasellüler bölge; inflamatuvar sitokin   |
| $\beta$ -katenin                                     | Nükleus; Wnt genleri için transkripsiyon faktörü   | Sitoplazma; diğer kateninler ve aktinler ile etkileşim   |
| Non-steroid anti-inflamatuar ilaç aktive gen (NAG-1) | Ekstrasellüler bölge; Hücre büyümesinin inhibisyonu, apoptozun ise uyarılması            | Nükleus: İnvazyona, metastaza, EMT, plasminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) ve MMP'lerin salınımına yönelik pro-tümöral gen ekspresyonunu düzenleme      |
| MMP'ler  | Ekstrasellüler bölge; proteolitik ve büyüme faktörü aktivasyonu veya serbestleştirilmesi | Nükleus: Konektif doku büyüme faktörü (CTGF) ve NF- $\kappa$ B gibi genlerin ekspresyonunu düzenler  |
| E-kaderin  | Hücre yüzeyi; hücre adezyonuna ve kontakt inhibisyonuna katılır                          | Nükleus: C-terminal fragment-2 (CTF2) ile etkileşim sonucu apoptozun inhibisyonu   |

\* Bu tablo Kyung-Won M. ve ark.'ın "Moonlighting proteins in cancer (2016)" adlı mini derlemesinden alınarak tekrar düzenlenmiştir [56].

Birden fazla fonksiyonu olan bir moonlight proteinin hastalık halinde bu fonksiyonlarından hangisi ve/veya hangilerinin etkilendiği bir belirsizlik yaratmakta ve sadece tek bir fonksiyonuna yönelik tedavi yeterli olamayabilmektedir [9]. Bazı durumlarda ise moonlight proteininin sadece tek bir fonksiyonunu engellemek gereklidir [4]. Örneğin, Six homeoproteinlerin transkripsiyon koaktivatörü olan Eya proteinleri aynı zamanda Tyr fosfataz aktivitesine sahiptir. Söz konusu bu fosfataz aktivitesinin hedefleri H2AX ve ERp proteinleridir ve bu proteinlerin defosforilasyonu sırasıyla DNA hasarı durumunda hücreyi apoptotik yol yerine DNA onarımına yönlendirmekte ve anti-tümöral transkripsiyonel aktivitenin inhibisyonuna neden olmaktadır. Dolayısıyla Eya proteinlerinin fosfataz aktivitesinin inhibisyonu kanser tedavisi için önem taşımaktadır [42]. Fosfoglikoz izomerazın otokrin motilite faktörü aktivitesi, motilite ve metastazın uyarılması, endotelial hücrelerde anjiyogenezin uyarılması, apoptozun inhibisyonu gibi etkilere sahiptir dolayısı ile kemoterapi için iyi bir hedefdir. Ancak kemoterapotiklerin, fosfoglukozun enzim, nörolökin ve matürasyon faktörü gibi etkilerini engellememesi yaşamsal açıdan önemlidir [10].

Moonlight proteinler potansiyel tedavi hedefleri olmalarının yanında tedavi aracı da olabilir. Örneğin, Parkinson hastalığında bir monoamin oksidaz B inhibitörü olan deprenil kullanılmaktadır. Bir deprenil türevi olan TCH346, monoamin oksidazı etkin bir şekilde inhibe etmese de sahip olduğu nöro-protetik etki hastalığın tedavisine katkı sağlamaktadır [60]. Steril  $\alpha$  motif ve histidin (H) aspartat (D) domain içeren protein 1 (SAMHD1), HIV-1 enfeksiyonlarında kullanılan anti viral bir dNTP trifosfohidrolazdır. Yapılan bir çalışmada SAMHD1'in, DNA çift iplik kırılmalarının homolog rekombinasyonunu kolaylaştırdığı, dolayısıyla kanser tedavisinde fayda sağlayabileceği bildirilmiştir [61]. Öte yandan sitokin fonksiyonlu moonlight proteinler, bağışıklık sisteminin modülasyonu amacıyla kullanım alanı sunmaktadır. Örneğin, İnsan şaperon proteini Hsp10, immün supresif etkilere sahiptir ve multipl skleroz, romatoid artrit, ve psöriyazis tedavisi için rekombinant Hsp10'un güvenilirliği ve etkinliği değerlendirilmektedir [62,63,64].

Bazı proteinler moonlight özelliklerinden dolayı hastalık tanısında kullanılabilecek potansiyel belirteçler olabilir. RPL10 ribozomun 60S alt ünitesine ait bir yapısal proteindir. Ancak bu proteinin, karsinogenez sürecinde artan mitokondriyal ROS üretiminin nötralizasyonu ile ilgili proteinlerin ekspresyonunu düzenlenmesi ve elektron transfer zincirinde kompleks 1'i etkileyerek, ROS seviyelerinin düzenlenmesinde yer aldığı bildirilmiştir. Ayrıca RPL10'un pankreatik kanser olgularında tümörün geninin bir belirteci olabileceği ileri sürülmüştür [65].

### **Moonlight Protein Veri Tabanları**

Protein Veri Bankasındaki proteinlerle karşılaştırıldığında, moonlight proteinleri kapsayan az sayıda veri vardır. Ancak moonlight proteinler için yeni veri tabanları oluşturulmaktadır. Şu anda, üç adet moonlight protein veri tabanı bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, MultitaskProtDB (<http://wallace.uab.edu/multitaskII/>) [66]. İkincisi olan MOONPROT (<http://moonlightingproteins.org/>), Jeffery laboratuvarı tarafından derlenen bir veri tabanıdır [21]. Üçüncüsü MoonDB (<http://tagc.univ-mrs.fr/MoonDB/>), literatürden elde edilen insan moonlight proteinlerini ve network tabanlı bir yaklaşımla moonlight protein adaylarını içermektedir [67]. Ayrıca moonlight protein-protein etkileşimleri, APID (Agile Protein Interactomes DataServer) sitesinde (<http://cicblade.dep.usal.es:8080/APID/init.action>) yer almaktadır [68].

### **Sonuç**

Moonlight proteinler normal hücre çoğalması, farklılaşması ve biyokimyasal yollarda çevresel şartlara göre birden fazla fonksiyon üstlenerek metabolizmanın düzenlenmesinde rol alırken, birçok hastalık ve kanserin patogeneğinde de rol oynadığından potansiyel tedavi hedefi olarak da umut vadetmektedir ve bu konuda daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

### **Çıkar çatışması / finansal destek beyanı**

Bu yazıdaki hiçbir yazarın herhangi bir çıkar çatışması yoktur. Yazının herhangi bir finansal desteği yoktur.

### **Kaynaklar**

1. Ezkurdia I, Juan D, Rodriguez J et al. Multiple evidence strands suggest that there may be as few as 19,000 human protein-coding genes. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 5866–78.
2. O'Leary NA, Wright MW, Brister JR et al. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: 733–34.
3. Omenn GS, Lane L, Lundberg EK et al. Metrics for the human proteome project 2016: progress on identifying and characterizing the human proteome, including post-translational modifications. *J Proteome Res* 2016; 15: 3951–60.
4. Jeffery CJ. Moonlighting proteins—an update. *Mol Biosyst* 2009; 5: 345–50.
5. Jeffery CJ. Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 8–11.
6. Piatigorsky J and Wistow GJ. Enzyme/crystallins: gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell* 1989; 57: 197–99.
7. Wistow G and Piatigorsky J. Recruitment of enzymes as lens structural proteins. *Science* 1987; 236: 1554–56.
8. Cvekl A and Zheng D. Gene sharing and evolution. *Hum Genomics* 2009; 4: 66–67.



9. Jeffery CJ. Multifunctional proteins: examples of gene sharing. *Ann Med* 2003; 35: 28–35.
10. Copley SD. Moonlighting is mainstream: Paradigm adjustment required. *Bioessays* 2012; 34: 578–88.
11. Copley SD. Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7: 265–72.
12. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 1995; 269: 847–50.
13. Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem* 2000; 275: 28421–27.
14. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991; 64: 1057–68.
15. Al Jord A, Shihavuddin A, Servignat d'Aout R et al. Calibrated mitotic oscillator drives motile ciliogenesis. *Science* 2017; 358: 803–06.
16. Suzukia CK, Rep M, van Dijl JB, Suda K, Grivell LA, Schatz G. ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 118–23.
17. Russo J, Jalkanen AL, Heck AM, Schmidt CM, Wilusz J, Wilusz CJ. Sequences encoding C2H2 zinc fingers inhibit polyadenylation and mRNA export in human cells. *Sci Rep* 2018; 8: 16995.
18. Gancedo C and Flores CL. Moonlighting proteins in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72: 197–210.
19. Huberts DH and van der Klei IJ. Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 520–25.
20. Amblee V and Jeffery CJ. Physical Features of Intracellular Proteins that Moonlight on the Cell Surface. *PLoS ONE* 2015; 10: e0130575.
21. Chen C, Zabad S, Liu H, Wang W, Jeffery C. MoonProt 2.0: an expansion and update of the moonlighting proteins database. *Nucleic Acids Res* 2018; 46: 640–44.
22. Jeffery CJ. Moonlighting proteins: complications and implications for proteomics research. *Drug Discov Today: Targets* 2004; 3: 71–78.
23. Lu Z and Hunter T. Metabolic Kinases Moonlighting as Protein Kinases. *Trends Biochem Sci* 2018; 43: 301–310.
24. Kim JW and Dang CV. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 142–50.
25. Tompa P, Szász C, Buday L. Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 484–89.
26. Hernández S, Amela I, Cedano J et al. Do moonlighting proteins belong to the intrinsic disordered proteins class? *J J Proteomics Bioinform* 2012; 5: 262–64.
27. Jeffery CJ. Molecular mechanisms for multitasking: recent crystal structures of moonlighting proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14: 663–68.
28. Jeffery CJ. An introduction to protein moonlighting. *Biochem Soc Trans* 2014; 42: 1679–83.
29. Chaput M, Claes V, Portetelle D et al. The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase. *Nature* 1988; 332: 454–55.
30. Gurney ME, Apatoff BR, Spear GT et al. Neuroleukin: a lymphokine product of lectin stimulated T cells. *Science* 1986; 234(4776): 574–81.
31. Gurney ME, Heinrich SP, Lee MR, Yin H. Molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons. *Science* 1986; 234: 566–74.
32. Watanabe, H. Takehana K, Date M, Shinozaki T, Raz A. Tumor Cell Autocrine Motility Factor Is the Neuroleukin/Phosphohexose Isomerase Polypeptide. *Cancer Res* 1996; 56: 2960–63.
33. Xu W, Seiter K, Feldman E, Ahmed T, Chiao JW. The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase. *Blood* 1996; 87: 4502–06.
34. Jobin PG, Butler GS, Overall CM. New intracellular activities of matrix metalloproteinases shine in the moonlight. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017; 1864: 2043–55.
35. Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T et al. Angiogenic Factor. *Nature* 1992; 356: 668.
36. Jeffery CJ. Mass spectrometry and the search for moonlighting protein. *Mass Spectrom Rev* 2005; 24: 772–82.
37. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor. *Cell* 1998; 92: 735–45.
38. Meyer-Siegler K, Mauro DJ, Seal G, Wurzer J, deRiel JK, Sirover MA. A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 8460–64.
39. Kato H, Fukuda T, Parkison C, McPhie P, Cheng SY. Cytosolic thyroid hormone binding protein is a monomer of pyruvate kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7861–65.
40. Kennedy MC, Mende-Mueller L, Blondin GA, Beinert H. Purification and characterization of cytosolic aconitase from beef liver and its relationship to the iron-responsive element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 11730–34.





41. Ehinger S, Schubert WD, Bergmann S, Hammerschmidt S, Heinz DW. Plasmin(ogen)-binding alphaenolase from *Streptococcus pneumoniae*: crystal structure and evaluation of plasmin(ogen)-binding sites. *J Mol Biol* 2004; 343: 997–1005.
42. Zhou H, Zhang L, Vartuli RL, Ford HL, Zhao R. The Eya phosphatase: Its unique role in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2018; 96: 165-70.
43. Basilion JP, Rouault TA, Massinople CM, Klausner RD, Burgess WH. The iron-responsive element-binding protein: localization of the RNA-binding site to the aconitase active-site cleft. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 574–78.
44. Jeffery CJ. Protein species and moonlighting proteins: Very small changes in a protein's covalent structure can change its biochemical function. *J Proteomics* 2016; 134: 19-24.
45. Jeffery CJ. Moonlighting proteins: complications and implications for proteomics research. *Drug Discov Today: Targets* 2004; 3: 71–78.
46. Sirover MA. On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1810: 741–51.
47. Jeffery CJ. Proteins with Neomorphic Moonlighting Functions in Disease. *IUBMB Life* 2011; 63: 489-94.
48. Orosz F, Oláh J, Ovádi J. Triosephosphate isomerase deficiency: facts and doubts. *IUBMB Life*. 2006; 58: 703-15.
49. Mazzola JL, Sirover MA. Alteration of intracellular structure and function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a common phenotype of neurodegenerative disorders? *Neurotoxicology* 2002; 23: 603-09.
50. Chuang DM, Hough C, Senatorov VV. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, apoptosis, and neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 269-90.
51. Liz MA, Mar FM, Franquinho F, Sousa MM. Aboard transthyretin: from transport to cleavage. *IUBMB Life* 2010; 62: 429-35.
52. Sekijima Y, Kelly JW, Ikeda S. Pathogenesis of and therapeutic strategies to ameliorate the transthyretin amyloidoses. *Curr Pharm Des* 2008; 14: 3219-30.
53. Babady NE, Pang YP, Elpeleg O, Isaya G. Cryptic proteolytic activity of dihydrolipoamide dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 6158-63.
54. Molavi G, Samadi N, Hosseingholi EZ. The roles of moonlight ribosomal proteins in the development of human cancers. *J Cell Physiol* 2019; 234: 8327-41.
55. Whitesell L and Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 761-72.
56. Min KW, Lee SH, Baek SJ. Moonlighting proteins in cancer. *Cancer Lett* 2016; 370: 108–16.
57. Song X, Wang X, Zhuo W, et al. The regulatory mechanism of extracellular Hsp90{alpha} on matrix metalloproteinase-2 processing and tumor angiogenesis. *J Biol Chem* 2010; 285: 40039-49.
58. Hance MW, Dole K, Gopal U et al. Secreted Hsp90 is a novel regulator of the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in prostate cancer. *J Biol Chem* 2012; 287: 37732-44.
59. Díaz-Ramos A, Roig-Borrellas A, García-Melero A, López-Alemany R.  $\alpha$ -Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 156795.
60. Hara MR, Thomas B, Cascio MB et al. Neuroprotection by pharmacologic blockade of the GAPDH death cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 3887-89.
61. Daddacha W, Koyen AE, Bastien AJ, Head PE, Dhere VR, Nabeta GN. SAMHD1 Promotes DNA End Resection to Facilitate DNA Repair by Homologous Recombination. *Cell Rep* 2017; 20: 1921-35.
62. Broadley SA, Vanags D, Williams B et al. Results of a phase IIa clinical trial of an anti-inflammatory molecule, chaperonin 10, in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009; 15: 329-36.
63. Vanags D, Williams B, Johnson B et al. Therapeutic efficacy and safety of chaperonin 10 in patients with rheumatoid arthritis: a double-blind randomised trial. *Lancet* 2006; 368: 855-63.
64. Williams B, Vanags D, Hall S et al. Efficacy and safety of chaperonin 10 in patients with moderate to severe plaque psoriasis: evidence of utility beyond a single indication. *Arch Dermatol* 2008; 144: 683-85.
65. Yang J, Chen Z, Liu N, Chen Y. Ribosomal protein L10 in mitochondria serves as a regulator for ROS level in pancreatic cancer cells. *Redox Biol* 2018; 19: 158-65.
66. Hernández S, Ferragut G, Amela I et al. MultitaskProtDB: a database of multitasking proteins. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: 517-20.
67. Chapple CE, Robisson B, Spinelli L, Guien C, Becker E, Brun C. Extreme multifunctional proteins identified from a human protein interaction network. *Nat Commun* 2015; 6: 7412.
68. Prieto C and Javier De Las Rivas J. APID: Agile Protein Interaction Data Analyzer. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 298–302.