

PROTEİN HOMEOSTAZI VE YAŞLANMA

Yaşlılıkta Moleküler, Fizyolojik ve Bilişsel Mekanizmalar
TIP 5001

Doç. Dr. Güvem GÜMÜŞ AKAY

guvemakay@gmail.com

Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D.
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Disiplinlerarası Sinirbilimleri A.D.
Beyin Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi

Proteom

- Hücrelerin içinde ve plazma zarlarında bulunan her türden protein havuzunun tamamıdır.
- Tüm hücreler, stabil ve işlevsel bir proteomu sürdürebilmek için protein homeostazını düzenleyen hassas mekanizmalara sahiptir.
- Protein Homeostazı: **Proteostaz**
- Yaşlanma ile birlikte hücrelerin proteomlarının stabilitesini koruma yeteneklerinde giderek artan bir bozulma söz konusudur.

3-boyutlu yapı bilgisi primer yapıda saklıdır.

Neredeyse sonsuz sayıdaki potansiyel 3-boyutlu katlanma arasından çok kısa zamanda en doğru konformasyona nasıl ulaşıyor?

LEVINTHAL PARADOKSU

Deneme-Yanılma

100 aa, her aa için 10 farklı konformasyon olsun

Olası konformasyon sayısı: 10^{100}

Her bir konformasyon mümkün olan en kısa sürede denensin: 10^{-13} sn

Tüm olası konformasyonların denenmesi için gerekli süre: **10^{77} yıl**

SONUÇ: Protein katlanması tüm olası konformasyonların sistematik bir şekilde tarandığı **deneme yanılma** ile gerçekleşen bir işlem **değildir**.
Spesifik bir katlanma yolağı olmalıdır.

Serbest enerji bacası (energy landscape) modeli

- ✓ Her protein doğal konformasyonuna ulaşmak için farklı bir rota izleyebilir.
- ✓ Proteinler en düşük serbest enerji seviyesine ulaşmak için katlanırlar.
- ✓ Gelişigüzel bir düğüm yapısı ile düzenli olarak katlanmış bir protein yapısı arasında bulunan ve şekli huniye benzeyen bir enerji gradyanı yolu kullanılır.
- ✓ Protein katlanması için tek bir yol olmayabilir.

Hücre İçi Protein Katlanması

- Katlanma işlemi ve polipeptid sentezi işlemleri birbirinden ayrılamaz.
- Sitoplazma: 340 mg/ml protein
- Ribozomda sentezlenmekte olan zincir bir yandan yanlış katlanmış araformların ve agregatların oluşumundan, denatürasyondan ve proteolizden korunmalıdır.
- Etkin ve doğru bir katlanma için hücreler polipeptid zincirinin doğal yapısına katlanmasını kontrol eden bir grup protein içerir.

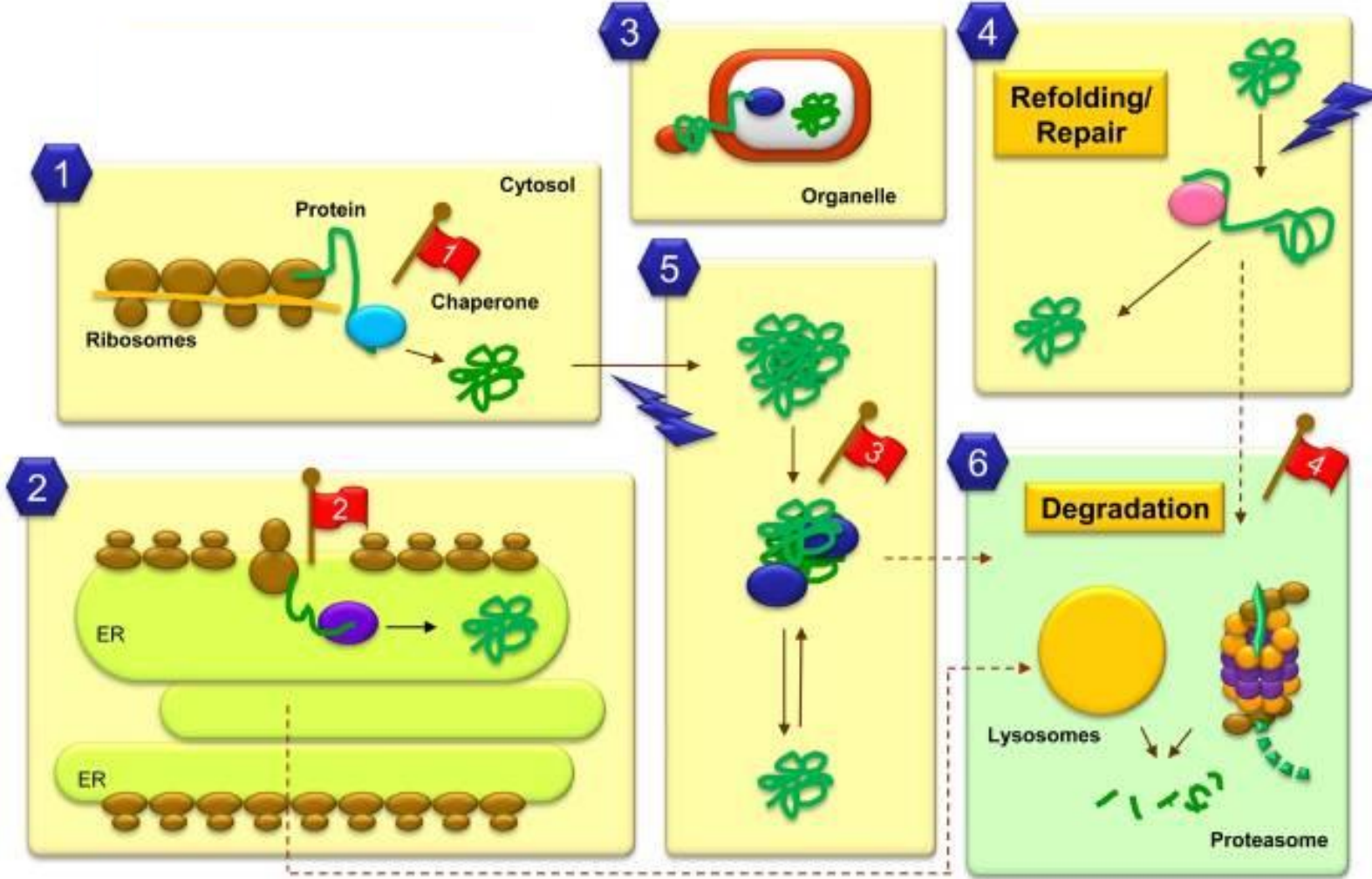
Proteom Sıkı Kontrol Altındadır

- Her bir proteinin uygun şekilde;
 - ✓ sentezlenmesi
 - ✓ katlanması
 - ✓ hücre içinde alt kompartmanlara yönlendirilmesi
- Pek çok hücreyel sistem proteinlerin kalite kontrolünde aktif olarak rol oynar: **PROTEOSTAZ AĞI**
- Bu sistemlerin sekteye uğramasının hücreyel homeostaz ve hücreyel işlevler için ciddi olumsuz sonuçları vardır.

Hücreesel yaşlanma

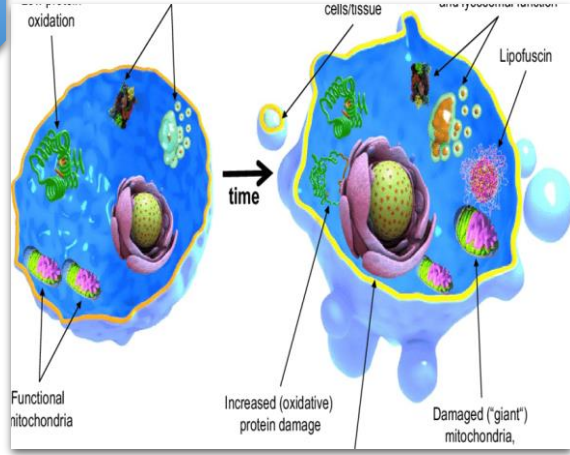
Hücreesel tamir mekanizmalarının verimliliğinde azalma söz konusudur.

Proteinlerin yaşam döngüsü



Hücre içi proteinler son derece dinamiktir.

- Sık sık konformasyonel değişikliğe uğrarlar
- Kısmen/Tamamen açılma/yeniden katlanma
 - Membranlara translokasyon
 - İşlevsel birimler şeklinde organize olma
 - Kendi aktivitelerini düzenleme
 - Diğer proteinlerle etkileşim



Sağlıklı genç hücrelerde ve kanser hücrelerinde yanlış katlanmış toksik proteinleri onarabilen veya ortadan kaldırabilen protein katlama ve parçalama mekanizmaları, henüz tam olarak anlaşılamamış nedenlerden ötürü yaşlanmış hücrelerde yetersiz hale gelmektedir.

HÜCRE ÖLÜMÜ VE HASTALIKLAR

Protein konformasyonel bozuklukları: PROTEOTOKSİSİTE

Nörodejeneratif hastalıklar

Miyopatiler

Metabolik hastalıklar

Karaciğer hastalıkları

Amiloidozlar

Protein Homeostazi

Moleküler şaperonlar



Proteolitik sistemler

Moleküler Şaperonlar

Moleküler Şaperonlar

Açıĝa çıkan hidrofobik bölgelere baĝlanarak diĝer proteinlerle istenmeyen ve spesifik olmayan etkileşimlerin meydana gelmesine engel olurlar.

Moleküler Şaperonlar

De novo sentezlenen ancak katlanmasını düzgün tamamlayamayan proteinler, şaperon ve şaperoninler tarafından tanınarak doğru ve stabil katlanmaya yönlendirilir.

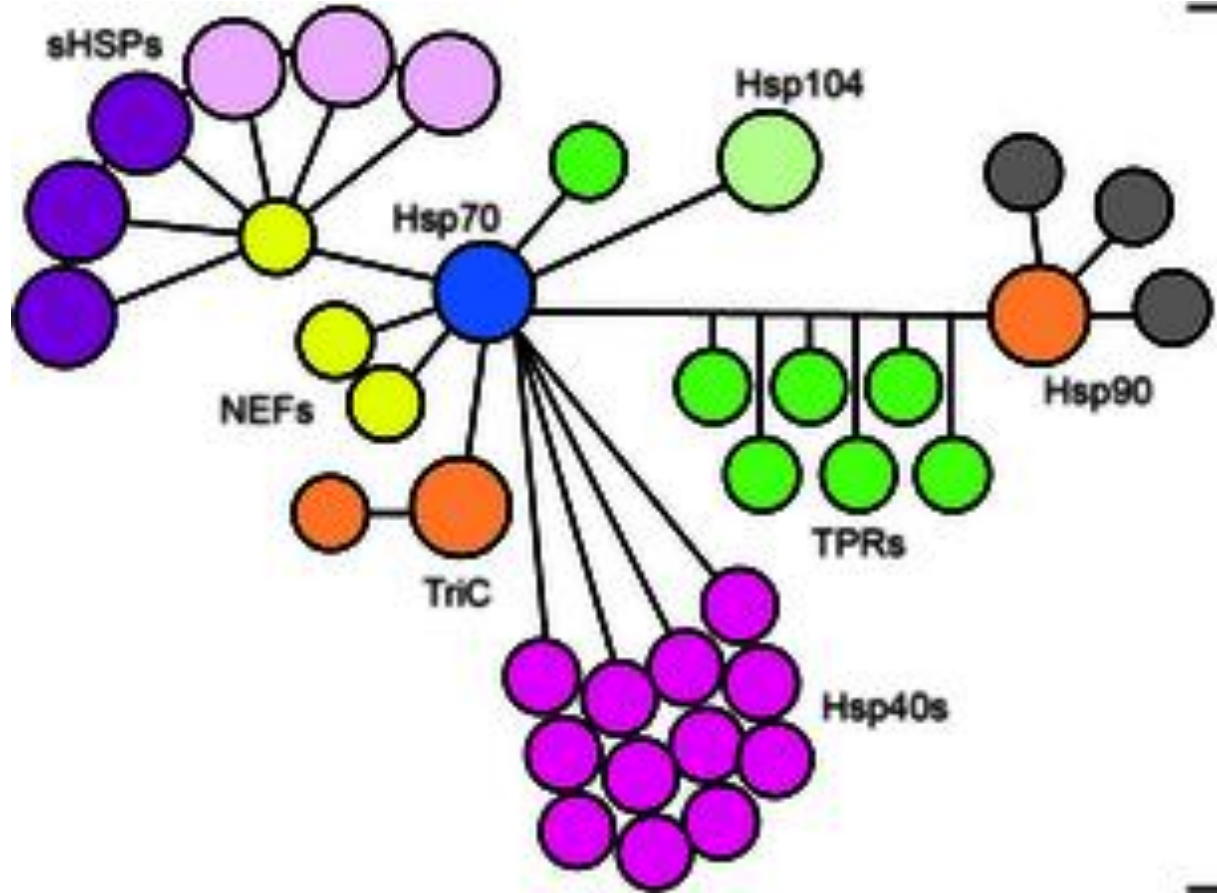
Eğer bu süreç başarısız olursa yanlış katlanmış proteinlerin proteolitik sisteme yönlendirilmesi gerçekleşir.

Anormal sentezlenen proteinler doğrudan parçalanmaya yönlendirilir.

Moleküler Şaperonlar

İki basamaklı Katlama/Parçalanma kontrolü, daha önceden sentezlenmiş ancak açılmış proteinler için de geçerlidir.

- İstenmeyen post-translasyonel modifikasyonlar
- Zarar verici ajanlar



Karmaşık bir şaperon ağı

Proteinlerin kalite kontrolü, hücre içerisindeki bütün proteinler için ve bir proteinin tüm ömrü boyunca söz konusudur.

Şaperonlar: Isı Şok Proteinleri

HSP100

HSP90

HSP70

HSP60

Küçük HSPler

- ✓ Evrimsel olarak son derece korunmuş moleküllerdir.
- ✓ Sıcaklık artışı gibi hücre için stres oluşturan koşullarda ifadeleri arttığı için bu isim verilmiştir.
- ✓ Her bir ailenin üyesi farklı hücresel kompartmanlarda yer alır.
- ✓ Farklı tip proteinlerin korunmasından/kontrolünden sorumludur.
- ✓ HSP70 ve HSP60 üyeleri daha az seçicidir ve pek çok protein üzerinde etki gösterir.
- ✓ Çok daha spesifik olanlar da vardır (örn. Sadece kollajen veya aktine bağlananlar).

- ✓ Sitozolik şaperonlar sitoplazmada meydana gelen katlanma/açılma olaylarını modüle ederler.
- ✓ Pek çoğu HSP70 ailesi üyesidir ve protein homeostazında kooperatif olarak iş görürler.
- ✓ Organele-özgü şaperonlar

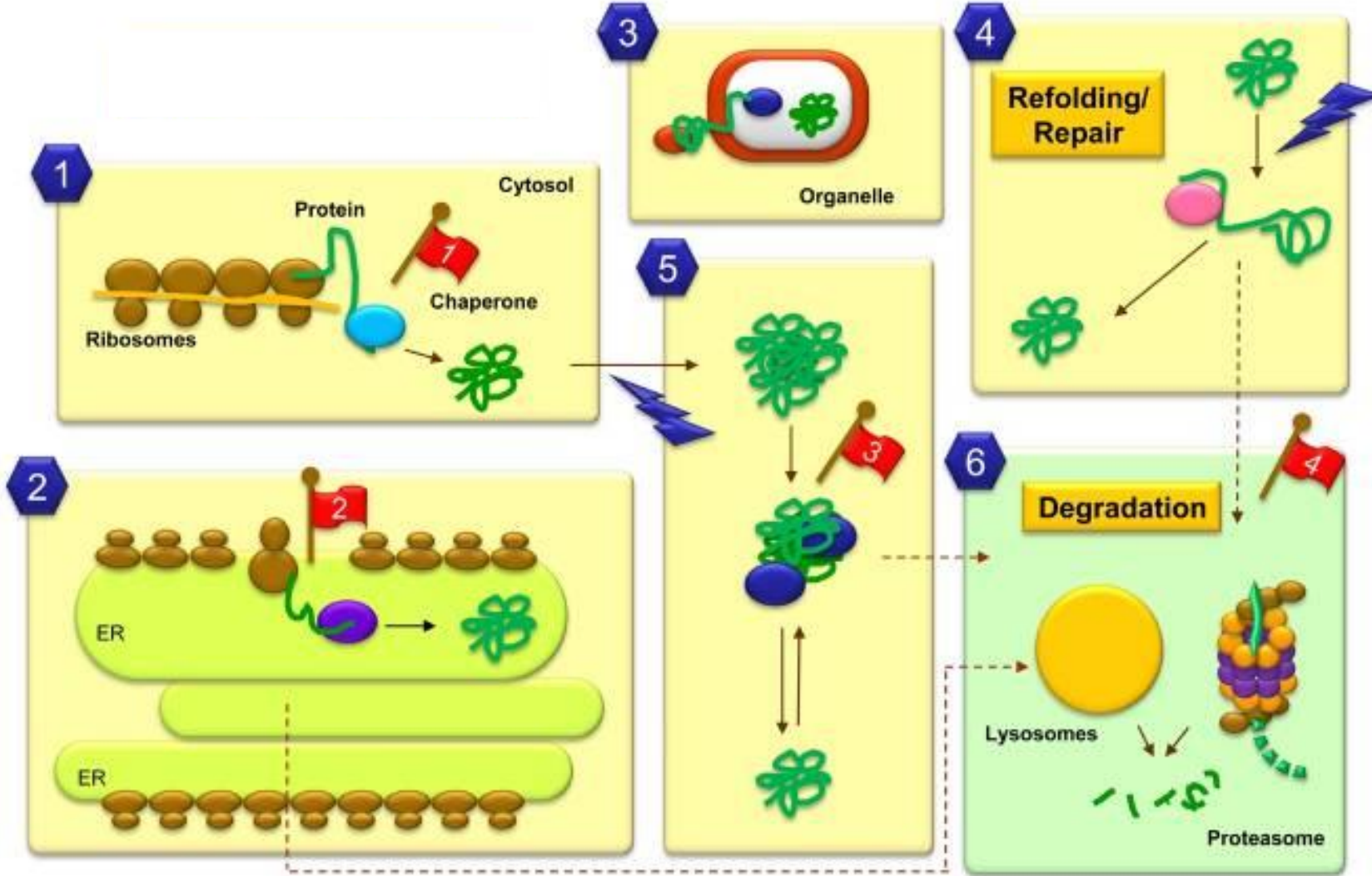
ER: BiP

UPR: Katlanmamış protein cevabı

Şaperoninler

- ✓ Moleküler şaperonların bir alt grubudur.
- ✓ Daha aktif rol oynarlar
- ✓ Çok konsantre ve kalabalık olan intraselüler çevreden izole bir mikroçevre oluştururlar

Moleküler Şaperonlar ve Yaşlanma



Yaşlanma ile birlikte

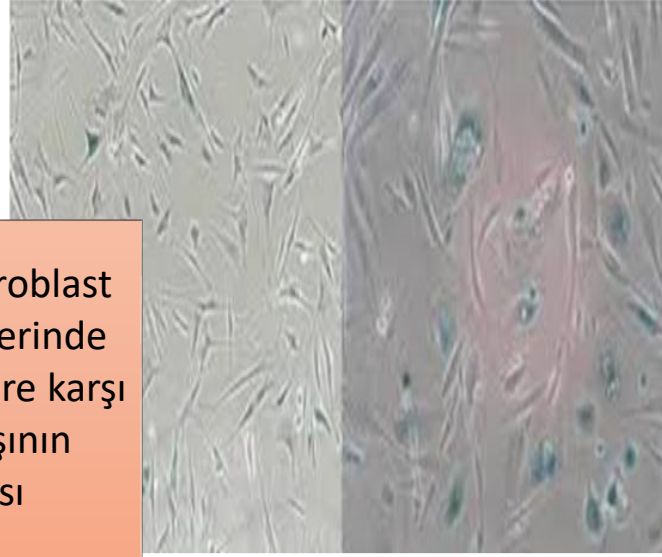
- Azalmış sitozolik şaperon miktarı
- Strese karşı azalmış ER yanıtı
- Agrege olan prtein miktarında artış
- Hasarlı proteinlerin parçalanmaya yönlendirilmesinde yetersizlik

Moleküler Şaperonlar ve Yaşlanma

- Genellikle işlev bozukluğu söz konusu
- Ancak bazı patolojilerin erken dönemlerinde hücresel homeostazi sürdürmek adına şaperon miktarının artışı gözlenebilir.
- Örn: Beyinde her yerde ifade bulan hsp27 → Alzheimer Hastalığı

Brain Res. 2006 May 17;1089(1):67-78

Yaşlanmış fibroblast
hücre kültürlerinde
farklı stresörlere karşı
HSP70 artışının
olmaması



Kalori
kısıtlamasının pek
çok hücre tipinde
şaperon yanıtını
düzeltmesi



Yüz yaşını aşan
kişilerden elde
edilen fibroblast
kültürlerinde stres
koşullarında
şaperon yanıtının
korunması



Şaperon indüksiyonu ve uzun yaşam



Hsp-70 ailesi üyelerinin veya küçük HSPlerin ekstra kopyasını ifade eden sinek ve solucanlar: Uzamış yaşam süresi



HSP'lerin transkripsiyon faktörü olan HSF'nin ifade artışı: Nematodlarda uzamış yaşam süresi

CHIP (carboxy-terminus of hsp70-interacting protein)

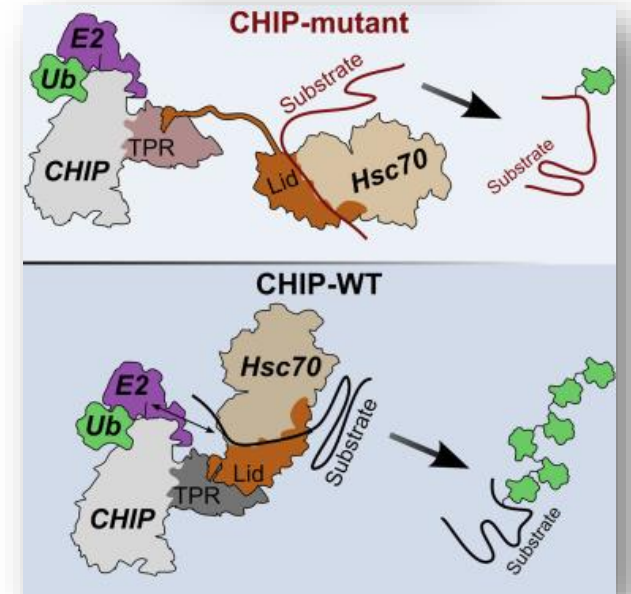
CHIP-kusurlu
fareler

Kısa ömür

Hızlanmış yaşlanma fenotipi

Artmış hasarlı protein miktarı

Azalmış proteozom aktivitesi



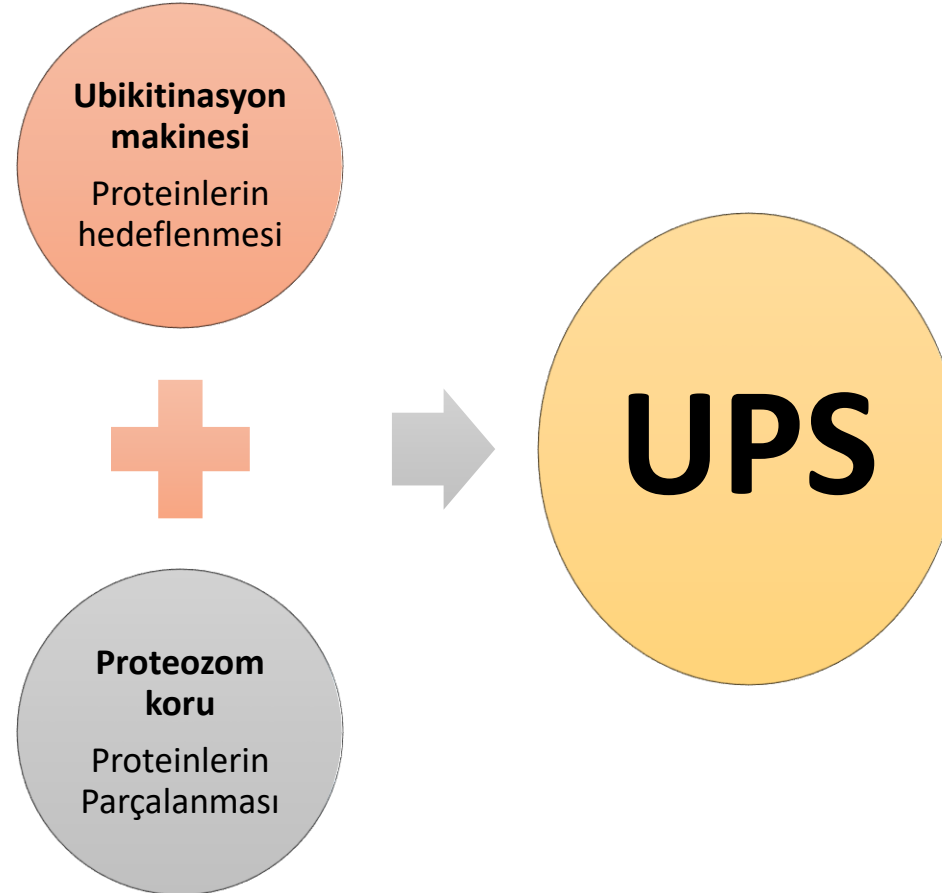
Proteolitik Sistemler

Proteolitik Sistemler

- Ubikitin/Proteozom Sistemi (UPS)
- Otofajik/Lizozomal Sistem

Ubikitin-Proteozom Sistemi

Proteinlerin kalite kontrolünde rol oynayan temel sistemdir.



Ubikitinasyon

- ✓ **Ubikitin:** Evrimsel olarak korunmuş 76 aa'lık küçük bir proteindir.
- ✓ Proteinlere bağlandığında onları hızlı parçalanma için etiketler.
- ✓ E1, E2, E3 enzimleri birlikte, ubikitin zincirlerinin hedef proteine eklenmesini katalizler.
- ✓ E3 spesifikliđi belirler.
- ✓ Ubikitin zincirleri sayesinde etiketlenen proteinler Proteozoma yönlendirilirler.

Proteozom kompleksi

- Çok sayıda alt birimden oluşan silindirik şekilde bir protein kompleksidir.
- Protein ATP hidrolizi ile proteozom içinde parçalanırken, ayrılan ubiquitin zinciri daha sonra tekrar kullanılmak üzere sitoplazmaya salıverilir.

Proteolitik Sistemler ve Yaşlanma

Yaşa bağlı değişiklikler söz konusudur.

Yaşlı organizmalarda bu sistemin etkinliği düşüktür.

Proteostaz bozular.

Alzheimer Hastalığı

ALS

Parkinson Hastalığı

Huntington Hastalığı

- **Yetersiz çalışma:** Hücre için zararlı proteinlerin toksik seviyede birikmesi
- Yanlış katlanmış proteinlerin temizlenememesi sonucu hücre içi protein agregatlarının oluşması

OTOFAJİ/LIZOZOM SİSTEMİ

- **Auto:** Kendi, **Phagy:** Yemek
- Hücrenin kendini yemesi
 - Çeşitli sitoplazma içerikleri,
 - Organeller,
 - Agregasyona yatkın proteinler,
 - Enfeksiyöz ajanlar

gibi substratların **otofagozom** adı verilen çift membranlı veziküller aracılığıyla lizozoma taşınmasıyla gerçekleşen hücre içi yıkım olayıdır.

Otofaji

Mikrootofaji

Makrootofaji

Şaperon
aracılı otofaji

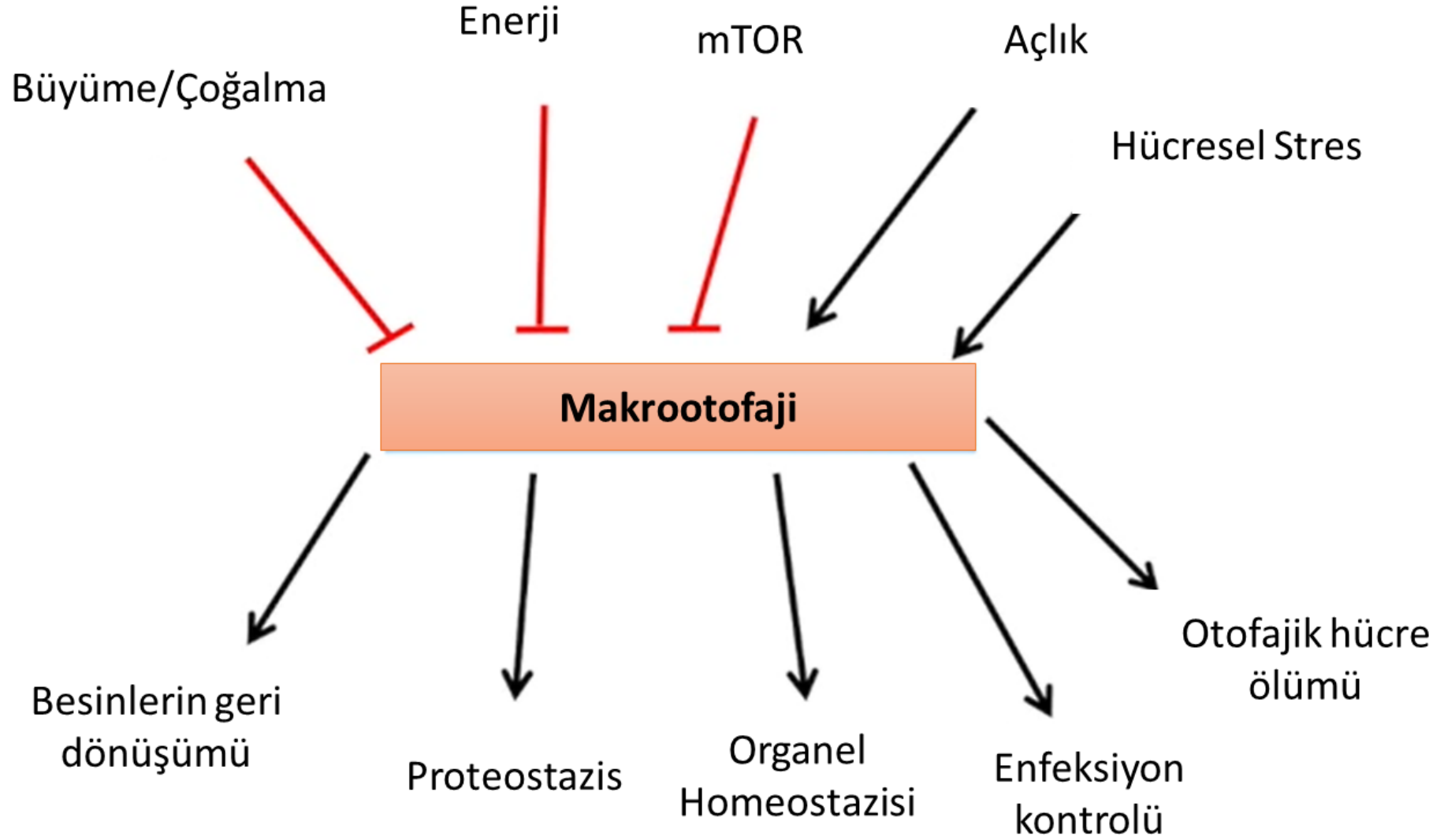
- Evrimsel olarak korunmuştur.
- Homeostazın korunmasında kritik rol oynar.

Mikrotofaji

- Otofagozom oluşmadan, sitoplazmanın doğrudan lizozom içine alınması olayıdır.
- Mikrotofaji lizozom membranının içe kıvrılmasıyla gerçekleşir.
- Memelilerde çok iyi anlaşılammıştır.
- Yaşlanma ile birlikte nasıl değiştiği bilinmemektedir.

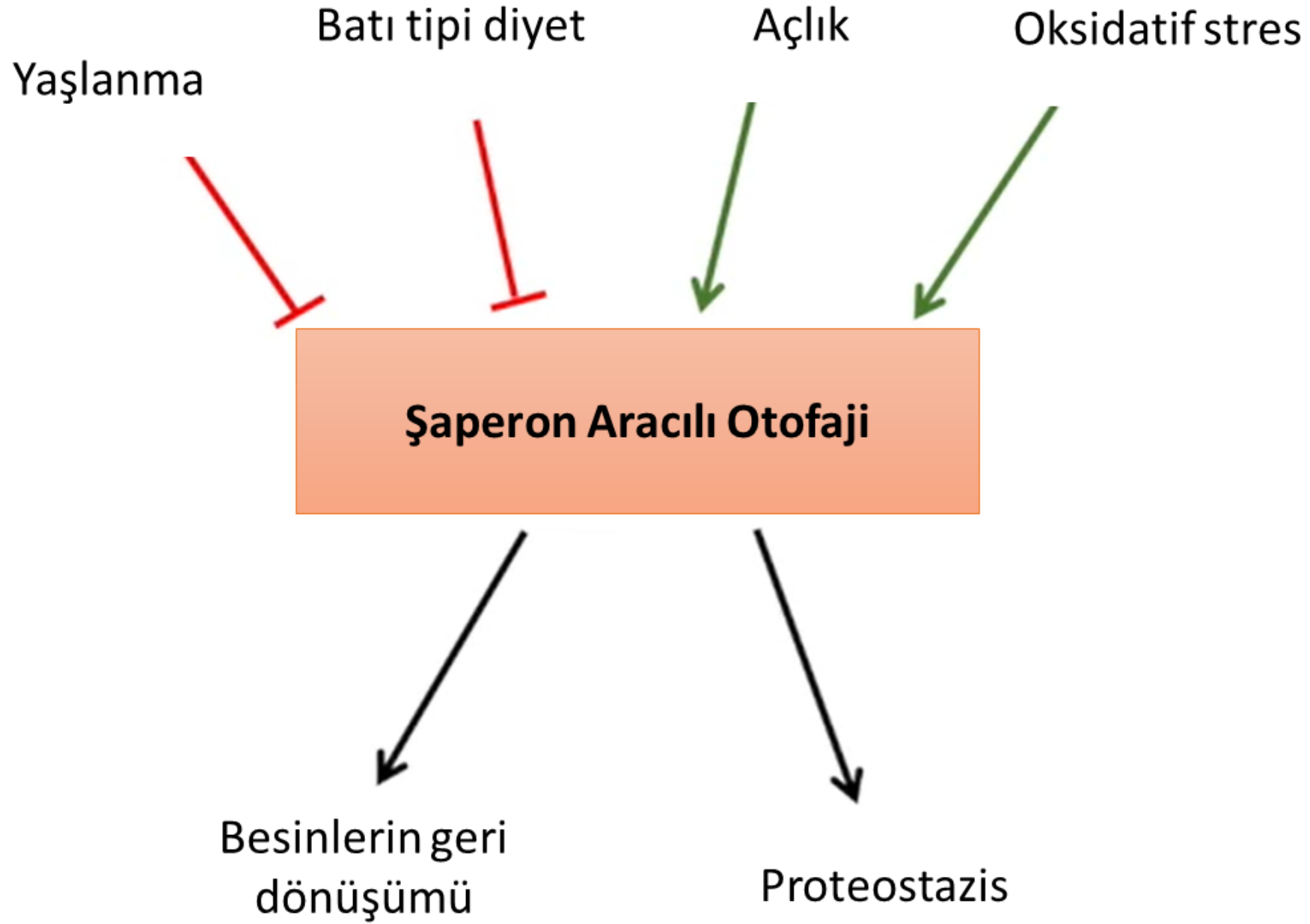
Makrotofaji

- Otofajinin en iyi bilinen formudur.
- Sitoplazmanın bir kısmıyla birlikte otofajiye uğrayacak substratların çift membranlı zarla kaplanması ve lizozom ya da geç endozomal multiveziküler cisimcikler ile birleşerek substratların yıkılması olayıdır.



Şaperon aracılı otofaji

- Yalnızca C-terminalinde pentapeptid KFERQ motife sahip olan proteinler için gözlenir.
- Hücre içi çözünen proteinlerin %30-40'ı
- Degredasyon lizozomda gerçekleşir.
- Uzun süreli açlık (>12 saat) ile tetiklenir.
- Azalmış aktivite:
 - Normal yaşlanma süreci
 - Batı tipi diyet



ER Stresi ve Otofaji

- Agregasyona yatkın proteinlerin fazlalığı
- Katlanmamış proteinlerin birikimi
- Katlanmamış protein yanıtı: UPR
- ER'nin organize yapısını kaybetmesine yol açar
- ER spesifik HSP70 ailesi üyesi Grp78/BiP otofaji ilişkili genlerin ifadesini artıran TF'lerin üretiminden sorumlu IRE1, ATF6 ve PERK yollarını aktive eder
- Hücre içi Ca^{+2} artışına bağlı olarak AMPK aktivasyonu gerçekleşerek otofaji tetiklenir.

Otofajik Sistemde Yaşa Bağlı Değişiklikler

- Azalmış makrootofajik aktivite gözlenir.
- Yaşlı sıçanlarda otofagozomlar oluşmakta ancak lizozomla füzyon yolu ile eliminasyonda sorun yaşanmaktadır.
- Aynı zamanda lizozomla birleşen kargo içinde bulunan çapraz bağlanmış proteinler, lizozomda iş gören proteinlerin posttranslayonel modifikasyonlarına neden olarak onların işlevini bozmaktadır.
- Lizozomda parçalanamama sonucu biriken proteinlerin ileri modifikasyonları ve çapraz bağlanmaları, **lipofuksin** adı verilen bir pigment oluşmasına neden olur: Yaşlanma için belirteç olarak kullanılmaktadır.

- Bozulmuş ŞAO: Parkinson hastalığı, bazı tip taupatiler, diyabet
- Yaşlı sıçanların neredeyse tüm dokularında azalmış ŞAO
- Yaşlanmış insan fibroblastlarında azalmış ŞAO
- Lizozomal ŞAO reseptörü LAMP2A seviyesinde azalma
- Lizozomal membran lipitlerinde yaşa bağlı değişimler nedeni ile LAMP2A'nın stabilitesinde düşüş olduğu düşünülmekte