

P Tipi ATPazlar: H^+/K^+ ATPaz Proteini ve Na^+/K^+ ATPaz Proteini

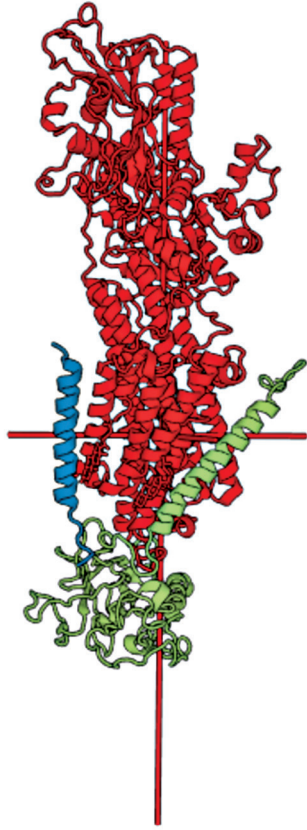
Ege SOYDEMİR, Zeynep Büşra AKSOY

Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü, Ankara

Moleküler biyoloji’de hücre membranlarında bulunan pompa görevi gören proteinler çok büyük öneme sahiptirler. Bu proteinler aktif ya da pasif olarak taşıyıcılık yapabilmektedirler. Aktif proteinler (enzimler) organizmaların enerji ünitesi olan ATP’yi (adenosine triphosphate) hidrolize ederek kullanmaktayken pasif proteinler enerji kullanmadan membran içi ve membran dışı arasındaki konsantrasyon farklarına göre moleküler taşımayı sağlamaktadırlar (1). P tipi ATPaz protein ailesi aktif taşıyıcılık yapan en yaygın protein pompalarındandır ve iyi ve önemli örnek olarak H^+/K^+ ATPaz’lar ve Na^+/K^+ ATPaz’lar verilebilir (2). H^+/K^+ ATPaz (hidrojen, potasyum ATPaz) proteinleri mide ve böbrekte bazı hücre membranlarında bulunmaktadır. Na^+/K^+ ATPaz (sodyum, potasyum ATPaz) proteini ise bütün hayvan hücrelerinin membranlarında bulunmaktadır. Na^+/K^+ ATPaz proteini iyon dengesini sağlamakla beraber bir çok hücre içerisindeki oluşan moleküler mekanizmalar için sinyal iletiminin büyük bir bölümünü sağlamaktadır (3). H^+/K^+ ATPaz proteini ise asıl olarak gastrik asit salgılamasında görev alan son moleküler elemandır (4). Gastrik asit salgınımı, canlıların ya da yoğunlaşacağımız üzere insanların hayat döngülerine devam edebilmesi için çok önemli bir yere sahiptir.

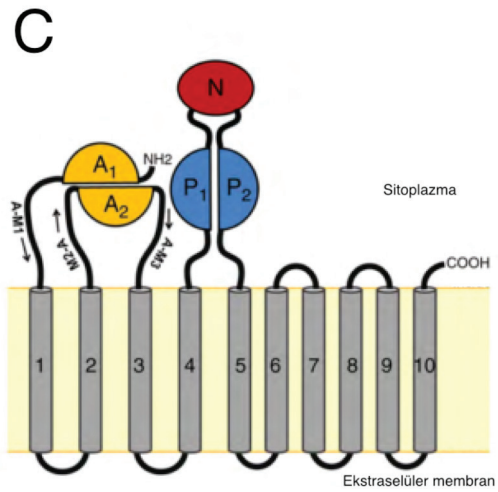
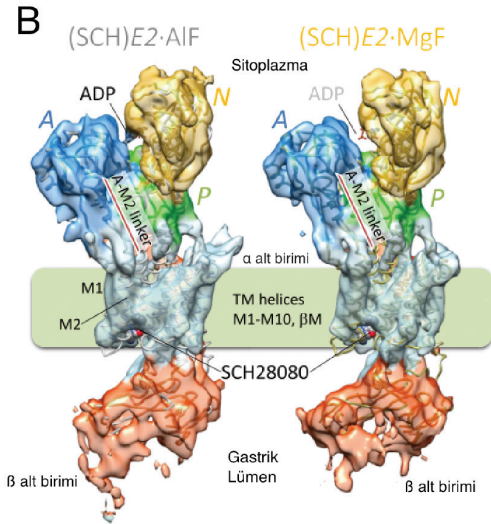
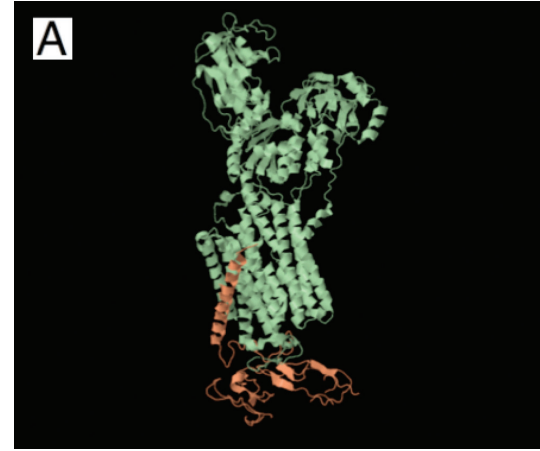
Bu protein ilk olarak 1975 yılında gastroenterolojik hastalıkların tedavisi için ilaç üretiminde hedeflemek amacıyla inhibe etmek üzere hedeflenmiştir (5). Daha sonra timoprazole’ün bir türevi olan omeprazole klinik çalışmalarda kullanılmaya başlamıştır. Günümüzde hala bu proteinler üzerindeki çalışmalar yoğunlukla devam etmektedir.

P tipi ATPaz’lar aynı protein ailesinde olduklarından çıkarılabileceği gibi birbirlerine yakın yapılarda bulunmaktadır. Genellikle ortak olarak 2 alt birime sahiptirler [alpha (α) ve beta (β) alt birimleri]. Örnek vermek gerekirse; Na^+/K^+ ATPaz proteinin katalitik alt birimi (alpha) H^+/K^+ ATPaz proteinin alpha alt birimi ile ~63% oranında homologdur (6). Fakat bunların yanında doğal olarak birbirleri arasında farklılık olması gerektiğinden yapısal farklılıklar da bulunmaktadır, örneğin Na^+/K^+ ATPaz proteini, H^+/K^+ ATPaz proteininden daha büyüktür ve alpha ve beta alt biriminin yanında fazladan gamma (γ) alt birimine sahiptir (Şekil 1). Na^+/K^+ ATPaz proteini hücre içi ve dışı arasındaki hayati iyon dengesini sağlamanın yanında daha önce bahsedildiği gibi hücreler dolayısıyla bütün canlı sistemler için yaşamsal sinyal iletimi yollarında görev almaktadırlar (3).



Şekil 1. Na⁺/K⁺ATPaz proteininin RCBS Protein Data Bank (RCBS PDB)'den alınmış görüntüsü. Kırmızı olan bölge α alt birimini, yeşil bölge β alt birimini ve mavi olan bölge ise γ alt birimini göstermektedir (7).

Bir proton pompa proteini olan H⁺/K⁺ATPaz ise mide mukozasındaki paryetal hücrelerin membranlarında bulunan bir integral membran proteinidir. 2 alt birimi bulunmaktadır, bunlar alpha (α) alt birimi ve beta (β) alt birimidir. H⁺/K⁺ATPaz proteininin α alt birimi, iki birim arasında katalitik olan birimdir. 1033 amino asitlik α alt birimi Na⁺/K⁺ATPaz proteinini α alt biriminde olduğu gibi hücre membranında 10 transmembran (TM) segmenti oluşturur (8). Bu 10 TM segmenti katyon [pozitif (+) yüklü iyonlar] bağlayan bölgeleri içermektedir. TM segmentlerinin sitoplazmada bulunan bölgesinde ise A, P ve N bölgeleri bulunmaktadır (Şekil 2). Bu bölgelerde gerekli enerjinin tüketimi için ATP hidrolizi ve fosforilasyon gerçekleşir (2). β alt birimi ise α alt biriminden çok daha küçük olup 190 amino asitten oluşmaktadır ve büyük çoğunluğu hücre membranının dışında kalmaktadır. β alt birimi αβ kompleksinin ifade edildikten sonra hücre membranına hedeflenerek taşınır bağlanmasını ve αβ birimlerinin kompleks oluşturmasını sağlamaktadır (9). Enzim *in vivo* bir durumda



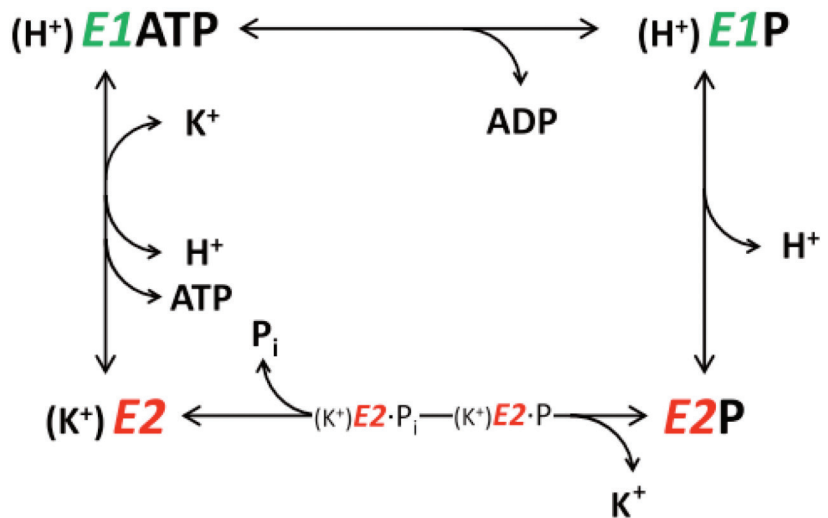
Şekil 2. A) H⁺/K⁺ATPaz proteininin RCBS PDB'den alınan görüntüsü. Turuncu ile gösterilen bölge β alt birimini temsil ederken, yeşil ile gösterilen bölge α alt birimini temsil etmektedir. B) H⁺/K⁺ATPaz proteininin 3 boyutlu yapısı (11). C) H⁺/K⁺ATPaz proteininin bölgelerinin açıkça gösterimi (2).

heterodimer olarak, $[\alpha\beta]$ (2,8) yani birbirlerine bağlı α ve β alt birimlerinden iki kopya, tekrar birbirlerine bağlı olarak bulunmaktadır (Şekil 2). $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ proteini $\alpha\beta$ alt birimleri de prensip mekanizma olarak $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ proteini $\alpha\beta$ alt birimleri ile aynı özelliklere sahiptirler. $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ proteininden farklı olarak $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ proteini γ alt biriminin $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ fonksiyonunda bir etkisi olduğu gözlemlenmemiştir, fakat bazı araştırmalar sonucunda γ alt biriminin bir takım enzimatik modifikasyonlarda etki gösterdiği düşünülmektedir (10).

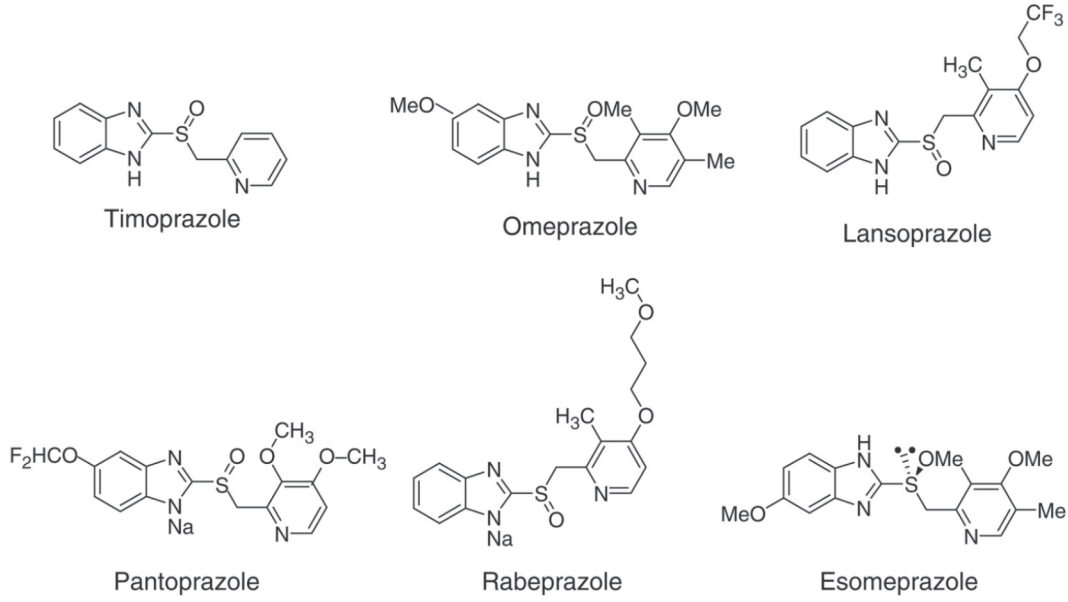
P tipi ATPaz proteinlerinin temel çalışma mekanizmaları birbirleri ile benzerlik göstermektedirler, bu nedenle $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ proteini üzerinden konuya yaklaşılabılır. $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ proteinin temel prensibi hücre sitoplazmasında bulunan asidik özelliklere sahip H^+ iyonlarını hücre dışına (gastrik $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ durumunda mideye), dışardaki K^+ iyonlarını ise konsantrasyon farkına karşı olarak dolayısıyla enerji kullanarak içeri almasıdır (12). Diğer P tipi ATPazlar gibi (örn. $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$) $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ iki farklı konformasyonda bulunmaktadır, bunlar E1, E2 ve E1, E2 konformasyonunun fosforile olmuş hali E1P, E2P'dir. Konformasyon değişiklikleri sayesinde iyon taşınımını gerçekleştirdiği bilirse de konformasyon değişikliğinin tüm detayı ile henüz aydınlatılamamıştır (11,13). Mekanizmada gerçekleşen kimyasal reaksiyona genel bir bakış açısı ile bakılırsa E1, E2 ve E1P, E2P konformasyonları arasında ATP hidrolizi gerçekleşerek oluşan bir döngü görülmektedir (11). Paryetal hücre içerisinde $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ 'a ATP bağlanır (E1ATP) ve E1 konformasyonunun fosforilasyonu gerçekleşir (E1P). Daha sonra fosforile olmuş $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$, E1P konfigürasyonu, E2P konfigürasyonuna dönüşürken hücre dışına, hücre içinde kimyasal olarak oluşan H^+ iyonunu vermektedir. E2P konfigürasyonu daha sonra defosforile olarak E2 konfigürasyonuna döner ve ATP E2 konfigürasyonuna E1ATP konfigürasyonuna dönüştürmek amacıyla bağlandığında hücre içerisinde dışardan gelen K^+ iyonu alınmaktadır. Bu reaksiyon ters yönde de ilerleyebilmektedir (Şekil 3) (11,13-16).

$\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ enzimi üzerinde siklik adenosin monofosfat (cAMP) bağlı protein kinaz A enzimi (PKA) için bağlanma bölgeleri bulunduğu bilinmektedir. Asit salınımının başlatılması cAMP protein kinaz yolağının aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. Bu yolak sonucunda $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ proteini paryetal hücrelerin membranlarına yerleşir. Aynı zamanda paryetal hücrelerin H^+ iyonu salınımı için aktivasyonunun gerçekleşmesi için gastrik enzim proteinin Ser⁶⁶ (66. serin kalıntısı)'nın cAMP PKA tarafından fosforilasyonu gerekmektedir (13, 17).

Gastrik asit ile ilgili olan hastalıkların bir çoğuna çözüm olarak $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ enzimi hedeflenilmiştir. $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ proteinin inhibe edilmesi için kullanılan moleküllere "proton pompa inhibitörleri" (PPI) denmektedir. Proton pompa inhibitörleri gastrik ve duodenal ülserler, gastroözofageal reflü ve Zollinger-Ellison sendromu gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. PPI'lar için kronolojik olarak keşfedilme sırasına göre omeprazole, lansoprazole, pantoprazole ve rabeprazole örnek verilebilir (Şekil 3) (8). İlk olarak timoprazole bileşiği 1975 yılında asit üretimini inhibe etmek için üretilmiştir, fakat bu bileşiğin nasıl etki ettiği bulunamamış ve sonunda ATPaz proteininin asit taşınımını gerçekleştirmediği, etkisiz olduğu kanısına varılmıştır (8). Daha sonra 1977 yılında picoprazole bileşiği bulunmuş ve bu bileşiğin asit taşınımı süresinden kısa bir gecikme süresi sonrasında inhibe edici özelliğinin ortaya çıktığı görülmüştür (8).



Şekil 3. $\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ proteininin konformasyonel döngüsü (11).



Şekil 4. Farklı proton pompa inhibitörleri (8).

Omeprazole'ün çalışma prensibi, bileşik asidik ortama girdiğinde asit ile katalizlenen bir reaksiyon sonucunda katyonik sülfenamid'e dönüşmesi ile özetlenebilir. Oluşan sülfenamidler ATPaz proteinin α alt biriminin üzerindeki "thiol" gruplarına bağlanarak stabil olan kovalent disülfid bağlarını oluşturur ve proteinin fosforilasyonunu engelleyerek proteinin E2 konfigürasyonunda kalmasını sağlar, bu sayede inhibisyon gerçekleşmektedir (18). Omeprazole gibi lansoprazole, pantoprazole gibi bileşikler de asit ile aktifleşen ilaçlardır (15).

Günümüzde P tipi ATPazların birçok moleküler yolakta ve sistemlerin çalışmasında çok önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir. Bu sistemlerdeki sıkıntılar sayesinde çıkan has-

talıklar bolca bulunmakta iken eğer bu hastalık P tipi ATPaz proteinleri ile alakalı ise (örneğin H^+/K^+ ATPaz proteinini ve proton pompa inhibitörleri) ilaç üretiminde genel felsefe o membran proteinini bloklamak ya da çalıştırmaya çalışmaktır. P tipi ATPazların bir bölümünün moleküler biyolojisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Örneğin yakın tarihteki çalışmalarda H^+/K^+ ATPaz'ın β alt biriminin E1/E2 konformasyonları arasındaki dengeyi sağladığı gösterilmiştir (19,20). P tipi ATPaz proteinlerinin hakkındaki bilgilere ulaşılması ve her yeni bilginin başka bir soruyu ortaya çıkartması bu alandaki projelerin ve araştırmaların devam edeceğinin en büyük göstergelerindendir.

KAYNAKLAR

1. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. Seventh Ed. Samols L, Hadler GL, Brooks N, Zimmerman P, editors. New York: W. H. Freeman; 2012. 383-409 p.
2. Bublitz M, Poulsen H, Morth JP, Nissen P. In and out of the cation pumps: P-Type ATPase structure revisited. Curr Opin Struct Biol [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;20(4):431-9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2010.06.007>
3. Xie Z, Cai T. $Na^+ -K^+$ -ATPase-Mediated Signal Transduction: From Protein Interaction to Cellular Function. Mol Interv. 2003;3(3):157-68.
4. G S, Jm S, O V, N L, I Y, K M. The gastric H^+/K^+ ATPase as a drug target: past, present, and future. J Clin gastroenterol [Internet]. 2007;41(Suppl 2):1-37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2860960/>
5. Li H, Meng L, Liu F, Wei J-F, Wang Y-Q. H^+/K^+ -ATPase inhibitors: a patent review. Expert Opin Ther Pat [Internet]. 2013;23(1):99-111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23205582>
6. Pont HHM De, Lewin MJM. Arno T . P . Skrabanja a , Philippe Asty ~ , Annick Soumarmon ~ , Jan Joep. 1986;131-6.

7. Gregersen JL, Mattle D, Fedosova NU, Nissen P, Reinhard L. Isolation, crystallization and crystal structure determination of bovine kidney Na⁺,K⁺-ATPase. *Acta Crystallogr Sect Struct Biol Commun. International Union of Crystallography*; 2016;72:282–7.
8. Sachs G, Shin JM, Vagin O, Lambrecht N, Yakubov I, Munson K. The gastric H,K ATPase as a drug target: past, present, and future. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. 2007;41(6 Suppl 2):S226–42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17575528
9. Chow DC, Forte JG. Functional significance of the β -subunit for heterodimeric P-type ATPases. *J Exp Biol* [Internet]. 1995;198:1–17. Available from: <http://jeb.biologists.org/content/198/1/1.long>
10. Minor NT, Sha Q, Nichols CG, Mercer RW. The gamma subunit of the Na,K-ATPase induces cation channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998;95(11):6521–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=27846&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
11. Abe K, Tani K, Fujiyoshi Y. Systematic comparison of molecular conformations of H⁺, K⁺-ATPase reveals an important contribution of the A-M2 linker for the luminal gating. *J Biol Chem*. 2014;289(44):30590–601.
12. Gumz ML, Lynch JJ, Greenlee MM, Cain BD, Wingo CS. The renal H⁺-K⁺-ATPases: physiology, regulation, and structure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298(1):F12–21.
13. Yu H, Zhou J, Takahashi H, Yao W, Suzuki Y, Yuan X, et al. Spatial control of proton pump H,K-ATPase docking at the apical membrane by phosphorylation-coupled ezrin-syntaxin 3 interaction. *J Biol Chem*. 2014;289(48):33333–42.
14. Shin JM, Vagin O, Munson K, Kidd M, Modlin IM, Sachs G. Molecular mechanisms in therapy of acid-related diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(2):264–81.
15. Law RJ, Munson K, Sachs G, Lightstone FC. An Ion Gating Mechanism of Gastric H,K-ATPase Based on Molecular Dynamics Simulations. *Biophys J* [Internet]. Elsevier; 2008;95(6):2739–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2527272/>
16. Rabon EC, Reuben MA. THE MECHANISM AND STRUCTURE OF THE GASTRIC H⁺, K-ATPase. 1990;
17. Zhou R, Cao X, Watson C, Miao Y, Guo Z, Forte JG, et al. Characterization of protein kinase A-mediated phosphorylation of ezrin in gastric parietal cell activation. *J Biol Chem*. 2003;278(37):35651–9.
18. Prinz C, Kajimura M, Scott D, Helander H, Shin J, Besancon M, et al. Acid secretion and the H,K ATPase of stomach. *Yale J Biol Med*. 1992;65(6):577–96.
19. Abe K, Tani K, Nishizawa T, Fujiyoshi Y. Inter-subunit interaction of gastric H⁺,K⁺-ATPase prevents reverse reaction of the transport cycle. *EMBO J* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009;28(11):1637–43. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2693145&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Dürr KL, Abe K, Tavraz NN, Friedrich T. E2P state stabilization by the N-terminal tail of the H,K-ATPase β -subunit is critical for efficient proton pumping under in vivo conditions. *J Biol Chem*. 2009;284(30):20147–54.



**FYODOR MIHAYLOVIC DOSTOYEVSKI
(1821-1881)**

Herkesin yanlış yaptığı şeyi sen doğru yaparsan;
Herkesin yaptığı doğru, senin yaptığın yanlış olur.