Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi C- Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji
Anadolu University Journal of Science and Technology C- Life Sciences and Biotechnology

2017 - Volume: 6 Number: 2
Sayfa: 103- 113
DOI: 10.18036/aubtdc.307261
Geliş: 20 Nisan 2017 Düzeltme: 28 Temmuz 2017 Kabul: 25 Ağustos 2017

D E R L E M E

DOĞAL BİR ANTİ-KANSER PROTEİN OLAN PARASPORİNLER

Müjgan KESİK OKTAY [1], Hatice GÜNEŞ [1,*]

[1] Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, Türkiye

ÖZET

Bacillus thuringiensis doğada geniş yayılım gösteren, gram pozitif ve spor oluşturan bir bakteridir. Sporulasyon evresinde, sporlarla birlikte birçok böcek çeşidine karşı insektisit etki gösteren kristal proteinleri de üretir. İnsektisidal kristal proteinler Cry ve Cyt proteinler olup; aktivitelerini duyarlı böceklerin orta barsak membranlarında bulunan reseptöre bağlanarak gösterirler. Bu reseptör bağlantılı özgül aktivitelerinden dolayı zirai mücadelede önemlidirler. Daha sonraları, insektisit olanlara göre doğada daha geniş dağılım gösteren insektisit olmayan kristal proteinler üzerindeki çalışmalar yeni bir protein sınıfı olan parasporinleri ortaya çıkarmıştır. Parasporinler ayrıcalıklı olarak kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterirken normal hücrelere etki etmez ve hemolitik etki göstermez. Şimdiye kadar altı parasporin ailesi tanımlanmış olup toplamda 19 alt grup bilinmektedir. Parasporinler de insektisidal kristal proteinlere benzer şekilde reseptör bağlantılı etki gösterdiğinden kanser tedavisiyle ilgili çalışmalarda yeni bir araştırma alanının ortaya çıkmasını sağlamıştır. Bu derlemede; parasporinlerin keşfi, özellikleri, çeşitleri ve etki mekanizmaları hakkında yapılmış olan çalışmalar özetle anlatılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus thuringiensis*, Parasporin, Anti-kanser aktivite

PARASPORINS AS A NATURAL ANTI-CANCER PROTEIN

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt) is a gram positive and spore forming bacterium that shows a wide distribution in the nature. During the sporulation phase, it produces insecticidal crystal proteins along with spores. These insecticidal proteins are called Cry and Cyt proteins and have an activity when binding to spesific receptor located on the plasma membrane of mid-gut epithelial cells of susceptible insects. This receptor mediated spesific activity makes Bt important in agricultural control of insects. Afterwards, research on non-insecticidal proteins that have a wider distribution in nature than insecticidal ones revealed a new protein class called parasporin. Parasporins are capable of discriminately killing cancer cells while does not show cytotoxic and hemolytic activity against normal cells. So far, six parasporin families have been defined and a total of 19 sub-group is known. Because parasporins have a similar spesific-receptor binding effect with insecticidal crystal proteins, they had led to emergence of a new research field related to cancer treatment. This study reviewed the discovery of parasporins, their characteristics, varieties and their mechanisms of action on cancer cells.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Parasporin, Anti-cancer activity

1. GİRİŞ

Bacillus thuringiensis ilk defa 1901 yılında Shigetane Ischiwata tarafından Japonya'da ani kolaps (Flacherie veya Sotto hastalığı) hastalığına yakalanmış ipek böcekleri araştırıldığında keşfedilmiştir [1]. İlk önceleri *B. thuringiensis'in* ipek böcekleri için bir tehlike olduğu düşünülmesine rağmen sonraları çeşitli böceklere karşı insektisit olarak kullanılmıştır.

B. thuringiensis, Bacillus cereus grubunda yer alan gram pozitif, fakültatif anaerobik ve spor oluşturan bir bakteridir. *B. thuringiensis* toprak, su, ölü böcek kalıntıları, tarımsal artıklar, çeşitli

*Corresponding Author: haticegunes@mu.edu.tr

koniferler ve böcekçil memeliler olmak üzere çok farklı ekosistemlerde geniş bir dağılım göstermektedir [2,3,4]. *B. thuringiensis* büyümenin durağan evresinde sporulasyon ile birlikte parasporal kristal proteinler üretir. Bu kristaller taksonomik olarak çok yakın olan *B. thuringiensis* ve *B. cereus* türlerinin birbirinden ayırt edilmesini sağlayan tek karakteristik özelliktir [5]. Parasporal kristal proteinler delta-endotoksinler olarak adlandırılan ve çok farklı böcek türlerine karşı insektisidal aktivite gösteren kristal (Cry) ve sitolitik (Cyt) toksinlerdir. Kristal proteinlerin insektisidal aktivitesi, duyarlı böceklerin orta barsak epitel hücrelerinin plazma membranında yer alan reseptöre spesifik bağlanması sayesinde gerçekleşir [6]. Bu seçici özellik tarımsal mücadelede *B. thuringiensis'*i çevresel ve ekolojik yönden güvenli bir mikrobiyal ajan yapar.

Ancak doğada yayılış gösteren *B. thuringiensis'*lerin insektisidal olmayan Cry proteinlerinin bulunma oranı, insektisidal olanlardan çok daha fazladır [7,8]. Topraktan elde edilen ve insektisit aktivite göstermeyen *B. thuringiensis* suşlarının oranının oldukça yüksek olması (%90), Cry proteinlerinin diğer biyolojik aktivitelerini araştırma gereksinimini ortaya çıkarmıştır [9].

2. PARASPORİNLERİN KEŞFİ

1999 yılında Mizuki ve arkadaşları [10] tarafından *B. thuringiensis* Cry proteinlerininin kapsamlı olarak taranması ile insektisit etkisinin dışında yeni bir biyolojik aktivite tanımlanmıştır. Bu da insan kanser hücrelerini ve insan-patojenik protozooları hedef alan proteinlerin keşfini sağlamıştır. Bu kapsamda 1700 *B. thuringiensis* izolatı (Kyushu university *B. thuringiensis* collection) ve 44 referans suşa ait parasporal proteinlerin, insan lösemik T hücrelerine karşı sitosidal aktiviteleri ve koyun eritrositlerine karşı hemolitik aktiviteleri taranmıştır. İlk olarak, parasporal proteinler koyun eritrositlerine uygulanmış ve 60 izolatta hemolizi uyardığı görülmüştür. Hemolize birçok omurgalı ve omurgasıza etki eden Cyt proteinler ve hemolitik enterotoksin+ hemolizin BL (HBL) protein kompleksi neden olmaktadır [11,12,13]. Kalan 1684 izolatın MOLT-4 (lösemik T hücreleri) hücrelerine karşı etkisine bakıldığında 42 izolatın sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu izolatlara ait parasporal proteinler insektisit aktivite de göstermemektedir. Üç izolat seçilerek parasporal proteinlerin neden olduğu antikanser aktivite karakterize edilmiştir. Üç izolat da A549 (Akciğer kanseri hücreleri), HeLa (Uterus serviks kanseri hücreleri) ve MOLT-4 (Lösemik T hücreleri) hücrelerine karşı oldukça sitotoksik olup farklı seviyelerde sitotoksik aktivite göstermiştir. Bu izolatlardan A1462 ve A1190'ın lösemik ve normal T hücrelerini ayırt edebilme yeteneğinde oldukları ve lösemik olanlara etki ettikleri görülmüştür [10].

2000 yılında Mizuki ve arkadaşlarının [14] A1190 suşundan 81 kDa'luk proteini elde etmesiyle bu proteinler Parasporin olarak isimlendirilmiştir. Elde edilen bu yeni proteinin, *B. thuringiensis* Cry proteinlerinde bulunan beş korunmuş bölgeyi içerdiği fakat var olan Cry ve Cyt proteinlerle çok az benzerlik (<25 %) gösterdiği sekans analizleri sonucunda ortaya çıkarılmıştır. Parasporin ilk olarak bilinen bir insektisit aktivitesi olmayan ve insan kanser hücrelerini hedef alan proteinler olarak tanımlanmıştır. Daha sonradan insektisidal aktivite parasporin tanımından çıkarılarak "hemolitik olmayan fakat ayrıcalıklı olarak kanser hücrelerini hedef alan *B. thuringiensis* ve ilgili bakteriyel proteinlerdir" olarak değiştirilmiştir [15,16]. *B. thuringiensis'*in sporulasyon evresinde ürettiği parasporal proteinler olan Cry proteinler ve parasporinlerin tanımları tamamen ayrılamamakta; bazı parasporinler hem böcekler hem de kanser hücreleri üzerinde etkili olabilmektedir [16].

2.1. Parasporinlerin Genel Özellikleri

Parasporinler belirli kanser hücrelerine karşı hedefe özgü sitotoksik aktivite gösterirken normal hücreler üzerine etki etmemektedir. Ayrıca insan hücreleri üzerinde hemolitik etkisi yoktur. Parasporinler de insektisidal Cry proteinler gibi sporulasyon evresinde öncül toksin olarak sentezlenir. Aktiflenebilmeleri için alkali koşullarda, proteolitik olarak N ve/veya C uçlarından kesilmesi gerekmektedir. Proteolitik kesim sonrasında öncül toksin, toksin formuna dönüşmektedir. Yapılan

çalışmalar parasporinlerin etki mekanizmalarının da insektisidal Cry proteinlerde olduğu gibi reseptör bağlantılı gerçekleştiğini ortaya çıkarmıştır. Parasporinlerin etkilerini duyarlı hücrelerin membranlarında yer alan reseptörler ile etkileşimin ardından apoptotik yollarla veya membran oligomerizyonunu uyarmaları ile hücre geçirgenliğinin bozulması sonucunda hücre ölümüne yol açtıkları belirlenmiştir [17]. Tanımlaması yapılmış altı farklı parasporin Japonya, Vietnam ve Kanada'da yapılan çalışmalarda elde edilmiştir. Dünyanın farklı yerlerinde de parasporinlerin dağılımı ve etki mekanizmalarının aydınlatılması ile ilgili çalışmalar yapılmaya devam etmektedir.

2.2. Parasporinlerin Sınıflandırılması

Parasporinler, Cry proteinlerin sınıflandırılma sisteminde olduğu gibi, aminoasit sekans benzerliğine dayalı dört aşamalı isimlendirme ile sınıflandırılmaktadır [17]. Şimdiye kadar 19 parasporin tanımlanmış olup, bunlar parasporin (PS) sınıflandırma ve isimlendirme komitesi tarafından altı ana grupta (PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 ve PS6) sınıflandırılmıştır [18]. Bunların dışında henüz tanımlanması yapılmamış parasporin benzeri proteinler de literatürde yer almaktadır [19,20,21,22].

Parasporinlerin sitosidal spektrumları ve aktiviteleri farklı olmasına rağmen yapısal olarak β-por oluşturan toksin tipi (β-PFT) ve üç domainden oluşan toksin tipi olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar [16,23]. Üç domainden oluşan parasporinler; insektisidal Cry proteinler için karakteristik olan beş korunmuş bölgeyi kapsayan üç domainli yapıdan meydana gelen Cry proteinlere yapısal olarak benzerlik göstermektedir. PS1, PS3 ve PS6 üç domainli yapı gösteren parasporinler olup moleküler ağırlıkları diğer parasporinlerden yüksektir ve yaklaşık 80 kDa'luk inaktif formları proteolitik olarak işlenerek 60-70 kDa'luk aktif formlarına dönüşürler [15,24,25]. β-PFT tip parasporinler MTX-benzeri Cry toksinlerle ilişkilidir ve üç domainli yapı göstermezler. PS2, PS4 ve PS5 β-PFT yapısındadır. Üç domainli parasporinlere göre moleküler ağırlıkları daha düşük olup; inaktif formları 31-27 kDa, aktif formları ise 27-30 kDa'dur [26,27,28].

2.3. Parasporin Tipleri ve Sitotoksik Etki Mekanizmaları

Parasporinlerin normal hücreler üzerinde değil ancak kanser hücreleri üzerinde seçici sitotoksik aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Tablo 1'de 6 parasporin tipinin sitotoksik etki gösterdiği çeşitli kanser hücreleri verilmiştir. Aşağıda her bir parasporin tipinin özelliği, sitotoksisitesi ve kanser hücrelerini öldürme mekanizmaları açıklanmıştır.

Tablo 1. Parasporinlerin karakteristik özellikleri

Parasporin	*B. thuringiensis* kaynak suşu	Duyarlı Hücre Hatları	Proteolitik işlenme şekli	Moleküler ağırlık (kDa) Öncül/aktif toksin	Protein yapısı	Kaynak
PS1Aa1	A1190	HeLa, HL60, MOLT-4, HepG2	N teminal/ Tripsin	81/ 15+56	ß-Domain	Katayama et al., 2005
PS2Aa1	A1547	MOLT-4, Jurkat, HL60, HepG2, Caco-2, Sawano	N ve C terminal/ Proteinaz K	37/ 30	β-PFT	Ito et al., 2004
PS3Aa1	A1462	HL60, HepG2	N ve C terminal/ Proteinaz K	88/ 64	ß-Domain	Yamashita et al., 2005
PS4Aa1	A1470	MOLT-4, HL60, HepG2, Caco-2, Sawano, TCS	C terminal/ Proteinaz K	31/ 27	β-PFT	Okumura et al., 2005
PS5Aa1	A1100	HeLa, MOLT-4, HepG2, Caco-2, Sawano, TCS, Jurkat, HL-60	C terminal/ Proteinaz K	33/ 30	β-PFT	Ekino et al., 2014
PS6Aa1	M019	HeLa, HepG2	N terminal/ Tripsin	73/ 14+ 59	ß-Domain	Nagamatsu et al., 2010

Akiba ve Okumura [16]'ya göre düzenlenmiştir. MOLT-4, Lösemik T hücresi; JURKAT, Lösemik T hücresi; HL60, Miyeloid Lösemi; HeLa, Uterus Serviks Kanseri; TCS, Uterus Serviks Kanseri; Sawano, Uterus Kanseri; HEPG2, Hepatosit Kanseri; A549,Akciğer Kanseri; Caco-2, Kolon Kanseri.

2.3.1. Parasporin-1

Yapılan sınıflandırmaya göre Cry31Aa1'e karşılık gelen Parasporin-1 (PS1Aa1), *B. thuringiensis* A1190 suşundan elde edilmiştir [14]. Parasporin-1 proteini 81,045 Da moleküler ağırlığı olan 723 aminoasit rezudisinden oluşan bir polipeptittir. Parasporin-1'i sentezleyen gen 2169 bç uzunluğundadır. Bu protein insektisidal Cry proteinlere benzer şekilde beş korunmuş bölgeyi içeren üç domainli yapıda olmasına rağmen bilinen Cry ve Cyt proteinleri arasındaki benzerlik (<25%) çok düşüktür [17]. PS1 kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini yalnızca proteazlarla aktivasyon sonrası göstermektedir [14,15]. 81 kDa'luk öncül proteinin tripsin ile N-teminal bölgesinden proteolitik olarak işlenmesi ile proteinin aktif formu olan 56 kDa ve 15 kDa'dan oluşan heterodimer bir protein oluşur [15]. Toksinin aktif formu birçok kanser hücre hattına karşı sitotoksik aktivite gösterir. HL60 (Promiyeloktik lösemi hücreleri) ve HeLa (Uterus serviks kanser hücreleri) hücreleri toksine oldukça duyarlı olup EC_{50} (İlacın maksimum etkisinin yarısını oluşturan konsantrasyon) değerleri sırasıyla 0,32 µg/ml ve 0,12 µg/ml'dir ve ayrıca normal hücrelere karşı toksisite göstermemektedir (Tablı 1; Tablo 2). Duyarlı hücrelerin PS1'e cevabının ise üç domainli Cry toksinlerinde olduğu gibi por oluşumuyla açıklanması güçtür. PS1, por oluşumuna yol açan membran geçirgenliğini arttırma veya membran depolarizasyonuna neden olmaz. Bunun yerine kalsiyumun hücre içine alınımını uyararak duyarlı hücrelerde kalsiyum konsantrasyonunu arttırmak suretiyle apoptotik sinyal yolağını aktifleştirdiği düşünülmektedir [29]. Foto reaktif çapraz bağlantılı deneyler sonucunda tumor baskılayıcı bir gen olan *beclin-1* tanımlanmıştır. *Beclin-1*'in PS1'in reseptörü olarak hem otofaji hem de apoptozu düzenlediği önerilmektedir. Ayrıca anti-beclin-1 antikorları ile olan etkileşimler iki protein arasında bir bağlantı olduğunu doğrulamaktadır [30].

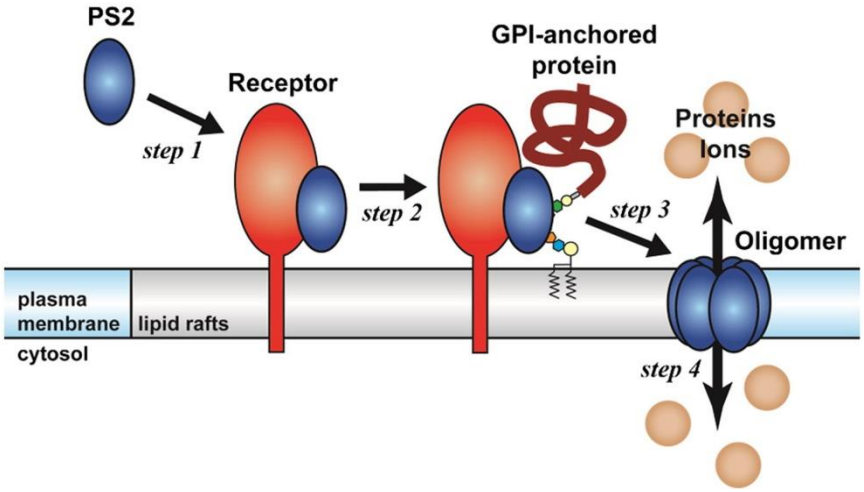
2.3.2. Parasporin-2

Cry46Aa1 olarak isimlendirilen Parasporin-2 (PS2Aa1), *B. thuringiensis* serovar *dakota* A1547 suşundan elde edilmiştir [31]. 338 aminoasit rezudisinden oluşan yaklaşık 37,446 Da ağırlığında bir polipeptit olup, gen 1014 bç uzunluğundadır. PS1Aa1'in aksine PS2Aa1, insektisidal kristal proteinlerde bulunan üç domainli yapıda değildir. Yalnızca Cry15Aa1 ile düşük seviyede benzerlik gösterir [17,32]. 37 kDa'luk öncül proteinin N ve C terminallerinden proteinaz K ile işlenmesi sonucunda toksinin aktif formu olan 30 kDa'luk protein elde edilir [26]. Aktif toksin HepG2 (Hepatoselüler karsinoma hücreleri), CACO-2 (Kolon kanser hücreleri), MOLT-4 (Lösemik T hücresi), Jurkat (Lösemik T hücresi) ve HL60 (Miyeloid lösemi hücresi) kanser hücrelerine karşı oldukça toksik olup EC_{50} değeri ortalama 20ng/ml'dir. Normal hepatosit ve HeLa hücrelerine karşı daha az etkilidir (EC_{50}>1 µg/ml) [16] (Tablo 2). Aktif toksin HepG2 hücrelerinin plazma membranında lipit tabakalarında bulunan bilinmeyen bir reseptör protein ile etkileşmektedir [33,34]. PS2 proteini reseptöre bağlandıktan sonra membran geçirgenliği artar ve por oluşumuna yol açan oligomerizasyona neden olur [26,31]. Hücre membranında yer alan kolesterol oligomerizasyonu etkilediğinden dolayı, PS2'nin sitosidal aktivitesinin hücre yüzeyindeki lipit tabakalarda bulunan Glikofosfatidilinositol (GPI)-demirli protein ile ilgili olduğu düşünülmektedir [34,35]. Por oluşumu; hücre şeklinin değişmesi, organellerin fragmentasyonu, balonlaşmaya benzer şekilde hücre morfolojisinin değişmesi ve son olarak hücrenin parçalanmasına neden olur [34].

Abe ve ark. [36] tarafından yapılan çalışmada PS2'nin etki mekanizması aydınlatılmıştır. Bu çalışmada, duyarlı hücrelerin membranlarında bulunan GPI-demirli proteinlerin PS2'nin sitosidal aktivitesi ile ilişkisi kanıtlanmıştır. GPI-demirli proteinlerde bulunun glikandan oluşan çekirdeğin PS2'nin sitosidal aktivitesi için gerekli olduğu buna karşın polipeptit bölgenin bir işlevinin olmadığı

belirlenmiştir. Ayrıca, PS2'nin lipit tabakalar ile etkileşiminin GPI-demirli proteinlerden bağımsız gerçekleştiği kanıtlanmıştır ve bu da GPI-demirli olmayan bazı lipit tabaka moleküllerinin PS2'nin hücre yüzeyine bağlanmasına yardımcı olduğunu göstermektedir. Tüm veriler henüz belirlenemeyen PS2 reseptörünün, lipit tabakada yer alan bir protein olduğunu işaret etmektedir. Etki mekanizması kısaca şu şekilde özetlenebilir (Şekil 1): PS2 olası protein reseptörüne bağlanıncaya kadar duyarlı hücrelerin membranlarında bulunan lipit tabakada birikir (1. Basamak). Toksin bağlanması GPI-demirli proteinlerin glikandan oluşan çekirdekleri ile stabilize edilir (2. Basamak). Ardından PS2 membrana gömülü bir oligomer oluşturur (3. Basamak). Toksin oligomerizasyonu sonucunda oluşan porlar plazma membranının geçirgenliğinin artmasına neden olur ve hücre ölür (4. Basamak).

Diğer taraftan, 2015 yılında Bresseur ve ark. [33] tarafından yapılan çalışmada PS2'nin farklı insan kanser hücrelerinde apoptozu düzenleyen hücre öldürücü bir toksin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Yapılan çalışmada *B. thuringiensis* 4R2 suşuna ait PS2'nin kanser hücrelerinde apoptozu indüklerken normal hücrelere etki etmediği belirlenmiştir. PS2 saflaştırılmadan hücreler üzerine uygulansaydı ham özüt içerisinde bulunan bileşenler tarafından sitosidal aktivite engellenebilirdi. Bu çalışmada HepG2 hücrelerine karşı elde edilen LD_{50} değeri daha önce Kitada ve ark. [26]' nın elde ettiği değerlerden 10 kat daha fazla olması bu düşünceyi desteklemektedir. Bununla birlikte hücre tipine bağlı olarak PS2'nin apoptozu uyarması hipotezi çalışmaların dışında tutulamaz [36].



Şekil 1. Parasporin-2'nin Etki Mekanizması

Şekil Abe ve ark. [36]'dan alınmıştır**.** PS2 lipit tabakada bulunan olası protein reseptörüyle bağlanır (1. Basamak). Toksin bağlanması GPI-demirli proteinler ile stabilize edilir (2. Basamak). PS2 membrana gömülü bir oligomer oluşturur (3. Basamak). Por oluşumu sonucunda plazma membranının geçirgenliğinin değişmesine neden olur (4. Basamak).

2.3.3. Parasporin-3

Sınıflandırma tablosunda Cry41Aa1 olarak yer alan PS3Aa1, insektisidal Cry proteinlerde olduğu gibi üç domainli yapıya sahip olup korunmuş beş bölgeyi taşır. 825 aminoasit rezudisinden oluşur ve 93,689 Da moleküler ağırlığında olup insektisidal Cry proteinlerle yüksek benzerlik göstermez. Proteinin aktiflenmesi için proteolitik kesime ihtiyaç vardır. 81 kDa'luk öncül protein N ve C terminallerinden proteolitik olarak işlenerek 64 kDa'luk aktif proteini oluşturur [17,24]. PS3 yalnızca HL-60 ve HepG2 karşı sitotoksik aktivite gösterir [29,31] (Tablo 2). PS3'ün insektisidal kristal proteinlerde olduğu gibi tipik üç domainli yapı içermesi, kanser hücrelerinde plazma membranında por

oluşumuna neden olarak etki ettiğini düşündürmektedir. Bu teori PS3'ün hedef hücrelerde membran geçirgenliğinin artmasına neden olduğu belirlendikten sonra güçlenmiştir [17].

Cry41Aa (PS3) insektisidal Cry proteinler için karakteristik olan beş korunmuş bölgeyi içerdiğinden dolayı yapısal olarak insektisidal Cry proteinlerle oldukça benzerlik gösterir. Cry41Aa ve insektsidal Cry proteinler arasındaki temel fark; Cry41Aa'nın karbonhidrat bağlama özelliği taşıyan risin domaini içermesidir. Cry41Aa geninin üç genli bir operon sistemi içinde bulunan bir gen olduğu belirlenmiştir. ORF2 (Açık Okuma Çerçevesi) genin işlevsel bölümünü oluşturur, ORF3 genin ifade edilmesi ile ilgili iken ORF1'in bilinen bir görevi bulunmamaktadır. Cry41Aa'da bulunan ORF2; C terminalinde insektisidal Cry proteinlerde bulunmayan ve proteinin hedef hücrenin yüzeyinde bulunan karbonhidratlara bağlanmasını sağlayan risin domaini içerir ve bu da toksinin özgüllüğünün tespit edilmesine yardımcı olur. Cry41Aa'nın HepG2 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi ilk birkaç saatte gözlemlenmiştir. İnsektisidal Cry proteinlerde olduğu gibi proteolitik aktivasyon gereklidir. Ayrıca proteinin protoksin formu da az da olsa hücre canlılığının azalmasına neden olmuştur. Bunun endojen proteazlardan kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Cry41Aa toksinine maruz kalan HepG2 hücrelerinde zaman ve doz bağımlı olarak hücre membran geçirgenliği hızla artmıştır. Toksin uyarımına bağlı olarak ATP tüketimi, metabolik aktivitede azalma, hücrenin şişkinleşmesi, ve membran hasarı gözlenmiştir. Cry41Aa kaspaz aktivasyonuna veya oksidatif strese neden olmamıştır. Edinilen veriler Cry41Aa'nın HepG2 hücrelerine karşı sitotoksik etkisinin ROS (Reaktif Oksijen Türleri) bağımsız nekrozisin ardından por oluşumu ile gerçekleştiğini desteklemektedir. Sonuçlar hücre ve toksine özgüdür. Cry41Aa ile yapısal olarak benzerlik gösteren insektsidal Cry1Ca toksini aynı deney koşullarında HepG2 hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermemiştir. Ayrıca insektisidal ve insan kanser hücrelerini hedef alan her iki toksinin de toksisitesini 2. Domain'in 3. İlmeği ile ilgili olduğu belirlenmesine rağmen bu bağlantı sekans ve yapısal düzeyde tam olarak anlaşılamamıştır ([37]).

2.3.4. Parasporin-4

Cry45Aa1'e karşılık gelen PS4Aa1, 275 aminoasit rezudisinden oluşan ve 30,078 Da ağırlığında bir polipeptittir. 828 bç uzunluğundaki gen tarafından ifade edilir. İnsektisidal Cry proteinlerde bulunan beş korunmuş bölgenin hiç birini taşımaz ve üç domainli yapı göstermez. Diğer Cry ve Cyt proteinlerde dahil olmak üzere proteinlerle <30 % olmak üzere çok düşük homoloji gösterir [17]. PS4 Sawano (Uterus kanseri hücreleri), TCS (Uterus serviks kanseri hücreleri), MOLT-4, HL60 (Miyeloid lösemi hücreleri), HepG2 ve Caco-2 (Kolon kanseri hücreleri) hücrelerine karşı sitotoksik olup en etkili olduğu hücre hatları Caco-2 (LD_{50}: 0.124 µg/ml) ve Sawano (LD_{50}: 0.245 µg/ml)'dur (Tablo 2). PS4 ilk defa Okumura ve ark. [38] tarafından *B. thuringiensis* A1470 suşunda tanımlanmıştır. A1470 suşu PS4 ile birlikte PS2'yi de üretmektedir. Okumura ve ark. [27] bir diğer çalışmada, PS4'ün uygulandığı Caco-2 hücrelerinde çekirdeklerin küçülmesine ve hücrelerin patlamasına neden olduğu belirlenmiştir. PSI-BLAST çalışmaları sonucunda PS4'ün aerolizin tip β-por oluşturan bir toksin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Laktat dehidrojenaz salınımı ve FITC-dekstranların hücre içine alınımı sadece duyarlı hücrelerde görülmüş olup kaspaz- 3 ve 7 efektörlerinde aktivasyon görülmemiştir. Kolesterol tüketimini uyaran cyclodextrin uygulandığında ise PS4 Caco-2 hücrelerine karşı oldukça toksiktir. Tüm bunlar PS4'ün kolesterol bağımsız aktivite gösteren β-por oluşturan bir toksin olduğunu göstermektedir [27]. PS4 birçok özellik bakımından diğer parasporinlerden farklıdır. Bu nedenle etki mekanizmasının da farklı olduğu düşünülmektedir ancak bu anlamda kapsamlı çalışmalar mevcut değildir [39].

2.3.5. Parasporin-5

Cry64Aa1 olarak isimlendirilen PS5Aa1, *B. thuringiensis* serovar *tohokuensis* A1100 suşundan izole edilmiştir. 33.8 kDa'luk inaktif öncül proteininin C terminalinin proteinaz K ile kesilmesi sonucu oluşan 29.8 kDa'luk protein aktif toksin formunu oluşturmaktadır. Diğer parasporinlerle çok fazla sekans benzerliği göstermemekle birlikte Cry toksinler ve aerolizin tipi β-por oluşturan toksinlerle az

da olsa benzerlik göstermektedir. Cry proteinlerde bulunan beş domainli yapı bulunmamaktadır [17,28]. Lösemik T hücrelerine (MOLT-4) karşı oldukça sitotoksik olup EC_{50} değeri 0.075 µg/ml'dir. Bunun dışında 18 farklı memeli hücre hattı üzerinde test edilmiş ve farklı seviyelerde sitotoksik etki göstermiştir [28] (Tablo 2). PS5'in reseptör bağlantısı ve etki mekanizması ile ilgili henüz yeterince veri bulunmamaktadır.

2.3.6. Parasporin-6

Cry63Aa olarak isimlendirilen PS6Aa1 *B. thuringiensis* M109 suşundan elde edilmiştir. İlk olarak CP84 olarak isimlendirilen toksinin sekans analizleri bu proteinin üç domainli bir Cry toksin olduğunu desteklemektedir [25,38]. İnsektisidal Cry2 toksini ile % 56.4 oranında sekans benzerliği göstermektedir ve ayrıca üçüncü domaininde yer alan ekstra peptid gruplarından dolayı Cry2'den daha büyük bir moleküldür. Yapısal özellikleri ve etki ettiği hücre tipleri karşılaştırıldığında CP84'ün ayrı bir parasporin olarak değerlendirilmesi uygun görülmüş ve parasporin-6 olarak isimlendirilmiştir. Alkali pH ortamında N terminalinin proteinaz K ile işlenmesi sonucunda aktiflenen toksin HepG2 (LC_{50} değeri 2.3 µg/ml) ve HeLa (LC_{50} değeri 7.2 µg/ml) hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermiştir (Tablo 2). Toksinin HepG2 hücreleri üzerindeki morfolojik etkisi hücre-hücre adhezyonunun kaybı sonucunda küçük hücre kümelerinin oluşması ve ardından yuvarlak şekilli hücrelerin şişkin balon benzeri yapılar oluşturması şeklinde gözlemlenmiştir. Toksinin bu hücreler üzerinde insektisidal Cry proteinlerde olduğu gibi sitoplazmik membran hasarına neden olabileceği düşünülmektedir. Toksin HeLa hücreleri üzerindeki morfolojik etkisini hücrelerin şişkinleşmesi ile göstermiştir. Sitoplazmada vakuol oluşumunun por oluşturan toksinlerin farklı bir etkisi olduğu düşünülmektedir. [25]. PS6'nın hedef aldığı moleküller ve karakteristik özellikleri üzerine çalışmalar devam etmektedir.

Tablo 2. Parasporinlerin Etki Spektrumları

Hücre Hattı	Hücrelerin Nitelikleri	PS1	PS2	PS3	PS4	PS5	PS6
MOLT-4	Lösemik T hücresi	++	++++	-	-	+++	??
JURKAT	Lösemik T hücresi	-	++++	-	-	++	??
HL60	Miyeloid Lösemi	+++	++++	++	+++	++	??
HeLa	Uterus Serviks Kanseri	+++	-	-	-	++++	+
TCS	Uterus Serviks Kanseri	-	-	-	-	++	??
Sawano	Uterus Kanseri	-	+++	-	+	++	??
HEPG2	Hepatosit Kanseri	++	++++	++	++	+++	++++
A549	Akciğer Kanseri	-	+++	-	-	-	??
Caco-2	Kolon Kanseri	-	+	-	-	-	+
T Hücresi	Normal T Hücresi	-	+++	-	-	??	??
UtSMC	Normal Uterus Hücresi	-	++	-	-	++	??
HC	Normal Hepatosit	-	-	-	-	-	-
MRC-5	Normal Akciğer Hücresi	-	+	-	-	-	??
Vero	Böbrek Hücresi	-	??	-	-	??	??
PC12	Feokromositoma	??	??	??	++	??	??

Ohba ve ark. [17] ve Krishnan [40]'a göre düzenlenmiştir. Hücre proliferasyon deneylerinin sonuçlarına göre hesaplanan EC_{50} (Etkili konsantrasyon) değerlerine göre sitotoksisite seviyeleri gösterilmiştir. Sitotoksisite oranları: oldukça yüksek, ++++; yüksek, +++; orta, ++; düşük, +; toksik değil, -; test edilmedi, ?? ile gösterilmiştir.

3. SONUÇ

Günümüzde tanımlanmış altı farklı parasporin ailesi olup bunlar Japonya, Vietnam ve Kanada'dan izole edilen suşlardan elde edilmiştir. Bunların dışında Hindistan ve Karayip adalarından da parasporin varlığına dair raporlar bulunmaktadır [11,41]. Parasporinler kendilerine özgü bir mekanizma ile kanser hücreleri üzerinde etkisini göstermektedir. Her bir parasporinin etki spektrumu ve etki ettiği kanser hücre hatları spesifik olup HepG2 hücrelerine karşı tüm parasporinler etkin olup farklı düzeylerde sitotoksik aktivite göstermektedir. PS1, duyarlı kanser hücrelerinde kalsiyum iyonlarının seviyesini arttırarak apoptozu indüklerken; PS2 hedef hücrelerde membran geçirgenliğine neden olan bir sitolizin gibi görev yapmaktadır. PS3 hedef hücre membranlarında bulunan GPI-demirli proteinlerle etkileşerek oligomerizasyona neden olmaktadır. PS4 ise kolesterol bağımsız por oluşturan bir toksindir. PS6'nın por oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir. PS5 ve PS6 ile ilgili detaylı çalışmalar henüz mevcut değildir.

Parasporinler kanser hücrelerine karşı gösterdikleri sitotoksik aktiviteden dolayı kanserin tedavisi ile ilgili klinik çalışmalarda umut vaad etmektedir. Ancak bu toksinlerin doğrudan hastalara uygulanması istenmeyen immünolojik cevaplara neden olacaktır. Bir diğer konuda parasporinlerin *in vivo* sistemlerde denenmemiş olmasıdır. Bu toksinlerin bir organizma üzerinde nasıl etki edeceği bilinmemektedir. Dolayısıyla, kanser hücrelerinde parasporin spesifik hücre reseptörlerinin belirlenmesi önemli olup; başarılabildiği taktirde reseptörleri hedef alan oldukça etkili antitumor ilaçlar üretilebilecektir. Parasporinlerin mekanizmalarının anlaşılması belirli kanser hastalıklarının tedavisiyle birlikte tarımsal alanlarda pestisid olarak kullanılan *B. thuringiensis* toksinlerinin risk tespitinde de yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Ishiwata S. On a kind of severe flacher (sotto disease). Dainihon Sanshi Kaiho 1901; 114: 1-5.

[2] Ben- Dov E, Zaritsky A, Dahan E, Barak Z, Sınal R, Manasherob R, Khamraev A, Troitskaya E, Dubitsky A, Berezina N, Margalith Y. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field collected strains of *Bacillus thuringienis.* Appl Environ Microbiol 1997; 63: 4883- 4890.

[3] Bernhard K, Jarrett P, Meadows M, Butt J, Ellis DJ, Roberts GM, Pauli S, Rodgers P, Burges HD. Natural Isolates Of *Bacillus Thuringiensis:* Worldwide Distribution, Characterization, And Activity Against Insect Pests. J Invertebr Pathol 1997; 70 (1): 59-68.

[4] Ichimatsu T, Mizuki E, Nishimura K, Akao T, Saitoh H, Higuchi K, Ohba M. Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh water of Japan. Curr Microbiol 2000; 40: 212- 217.

[5] Logan N. *Bacillus anthracis, Bacillus cereus*, and other aerobic endospore-forming bacteria. Topley and Wilson's Microbiology & Microbial Infections Bacteriology. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G, editors. 10th ed. London, UK: Hodder Arnold, 2005. pp. 922-952.

[6] Bravo A, Gill SS, Soberon M. *Bacillus thuringiensis* mechanism and use in: comprehensive molecular insect science. Elsevier *BV* 2005; 175-206.

[7] Ohba M, Aizawa K. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. J Invertebr Pathol 1986; 47: 12-20.

[8] Lee MK, Walters FS, Hart H, Palekar N, Chen JS. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegatative insecticidal protein vip3A differs from that of Cry1Ab δ- endotoxin. Appl Environ Microbiol 2003; 67: 5328- 5330.

[9] Ohba M, Wasano, N, Mizuki, E. *Bacillus thuringiensis* soil populations naturally occuring in the Ryuksus a subtropic region of Japan. Microbiol Res 2000*;* 155: 17- 22.

[10] Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, Park YS. Unique activity associated with non- insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: *in vitro* cell- killing action on human cancer cells. J Appl Microbiol 1999*;* 86: 477-486.

[11] Guerchicoff A, Delécluse A, Rubinstein CP. The *Bacillus thuringiensis cyt* genes for the hemolytic endotoxins constitude a gene family. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 1090-1096.

[12] Granum PE, Lund T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Lett 1996; 14:145-149.

[13] Arnesen LPS, Fagerlund A, Granum PE. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Rev 2008; 32: 579-606.

[14] Mizuki E, Park YS, Saitoh H, Yamashita S, Akao T, Higuchi K, Ohba M. Parasporin a human leukemic cell- recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis.* Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7: 624- 634.

[15] Katayama H, Yokota H, Akao T, Nakamura O, Ohba M, Mekada E, Mizuki E. Parasporin-1 a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis.* J Biochem 2005; 137: 17-25.

[16] Akiba T, Okumura S. Parasporins 1 and 2: their structure and activity. J of intervebr pathol 2016; 142: 44-49.

[17] Ohba M, Mizuki E, Uemori A. Parasporin, a new group of anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis.* Anticancer Res 2009; 29: 427- 434.

[18] Comitte of Parasporin Classification and nomenclature [http://parasporinfitcpreffukuokajp/Accesed] (14 May 2015).

[19] El-hag HAA, Safhi MA. Antimalignancy activity of *Bacillus thuringiensis* serovar *dakota* (H15) in vivo. J Med Sci 2011; 6: 06–16.

[20] Gonzalez E, Granados JC, Short JD, Ammons DR, Rampersad J. Parasporins from a Caribbean island: evidence for a globally dispersed *Bacillus thuringiensis* strain. Curr Microbiol 2011; 62: 1643–1648.

[21] Poornima K, Saranya V, Abirami P, Binuramesh C, Suguna P, Selveganayagam P, Shenbagarathai R. Phenotypic and genotypic characterization of BtLDC- 391 strain that produce cytocidal proteins against human cancer cells. Bioinformation 2012; 8: 461–465.

[22] Ammons DR, Short JD, Bailey J, Hinojosa G, Tavarez L, Salazar M, Rampersad JN. Anti-cancer Parasporin Toxins are Associated with Different Environments: Discovery of Two Novel Parasporin 5-like Genes. Curr Microbiol 2015; 72(2): 184-189.

[23] Inouye K, Okumura S, Mizuki E. Parasporin-4, a novel cancer cell-killing protein produced by *Bacillus thuringiensis*. Food Sci Biotechnol 2008; 17: 219–227.

[24] Yamashita S, Katayama H, Saitoh H, Akao T, Park YS, Mizuki E, Ohba M, Ito A. Typical three domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytocidal activity on limited human cancer cells. J Biochem 2005; 138: 663- 672.

[25] Nagamatsu Y, Okamura S, Saitouh H, Akao Y, Mizuki E. Tree Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. Biosci Biotechnol Biochem 2010; 74 (3): 494- 498.

[26] Kitada S, Abe Y, Shimada H, Kusaka Y, Matsuo Y, Katayama H, Okumura S, Akao T, Mizuki E, Kuge O, Sasaguri Y, Ohba M, Ito A. Cytocidal actions of parasporin-2 an antitumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis.* J Biol Chem 2006; 281: 26350- 26360.

[27] Okumura S, Saitoh H, Ishikawa T, Inouye K, Mizuki E. Mode of action of parasporin-4, a cytocidal protein from *Bacillus thuringiensis.* BBA - Biomembranes 2011; 6: 1476–1482.

[28] Ekino K, Okumura S, Ishikawa T, Kitada S, Saitoh H, Akao T, Oka T, Nomura Y, Ohba M, Shin T, Mizuki E. Cloning and characterization of a unique cytotoxic protein parasporin-5 produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 strain. Toxins 2014; 6(6): 1882-1895.

[29] Katayama H, Kusaka Y, Yokota H, Akao T, Kojima M, Nakamura O, Mekada E, Mizuki E. Parasporin-1 a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis,* induces Ca^{++} influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca^{++} concentration in toxin- sensitive cells. J Biol Chem 2007; 282: 7742- 7752.

[30] Katayama H, Kusaka Y, Mizuki E. Parasproin-1 receptor and use thereof European Patent 2273266, filed 30 March 2009, issued 12 January 2011.

[31] Ito A, Sasaguri Y, Kitada S, Kusaka Y, Kuwano K, Masutomi K, Mizuki E, Akao T, Ohba M. A *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytocidal action to human cells. J Biol Chem 2004; 279: 21282- 21286.

[32] Brown KL, Whiteley HR. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp *thompsoni.* J Bacteriol 1992; 174:549- 557.

[33] Brasseur K, Auger P, Asselin E, Parent S, Côté JC, Sirois M. Parasporin-2 from a New *Bacillus thuringiensis* 4R2 Strain Induces Caspases Activation and Apoptosis in Human Cancer Cells. PLoS One 2015; 10(8): e0135106.

[34] Kitada S, Abe Y, Maeda T, Shimada H. Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytocidal action to human hepatoma cells. Toxicol 2010; 264: 80–88.

[35] Shimada H, Kitada S. Mega assemblages of oligomeric aerolysin-like toxins stabilized by toxin-associating membrane proteins. J Biochem 2011: 149; 103–115.

[36] Abe Y, Inoue H, Ashida H, Maeda Y, Kinoshita T, Kitada S. Glycan region of GPI anchored-protein is required for cytocidal oligomerization of an anticancer parasporin-2, Cry46Aa1 protein, from *Bacillus thuringiensis* strain A1547. J Invertebr Pathol 2017; 142: 71-81.

[37] Krishnan V, Domanska B, Elhigazi A, Afolabi F, West MJ, Crickmore N. The human cancer cell active toxin Cry41Aa from *Bacillus thuringiensis* acts like its insecticidal counterparts. Biochem J 2017; DOI:10.1016/j.jip.2016.11.008

[38] Okumura S, Akao T, Higuchi K, Saitoh H, Mizuki E, Ohba M, Inouye K. *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* strain 89-T-34-22 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cells. Lett Appl Microbiol 2004; 39:89-92.

[39] Okassov A. Parasporins as a new anticancer agents: a review. J Buon 2015; 20(1): 5-16.

[40] Krishnan V. Investigation of parasporins, the cytotoxic proteins from the bacterium *Bacillus thuringiensis* Thesis: Department of Biochemistry, School of Life Sciences, University of Sussex, Sussex, 2013.

[41] Poornima K, Selvanayagam P, Shenbagarathai R. Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytocidal activity against cancer cells. J Appl Microbiol 2010; 109:348-354.