

Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptozis

APOPTOSIS: PROGRAMMED CELL DEATH

Asuman SUNGUROĞLU*, Esra ATABENLİ ERDEMLİ**, Meral TEKELİOĞLU**

* Dr.Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD, Öğr.Üyesi,

** Dr.Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD, Öğr.Üyesi, ANKARA

Apoptozis, dokuda tek tek hücrelerin azalmasıyla karakterize bir hücre ölümüdür. Yunanca'dan gelen bu deyim ağaçlardan sonbaharda yaprakların tek tek düşmesi anlamındadır. İlk olarak 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından, nekrozdan farklı olarak programlı hücre ölümü şeklinde hücre intiharı ifadesiyle tarif edilmiştir (1). Bu makalede Apoptozisde morfolojik ve metabolik değişiklikler, sinyal iletim yolları ve moleküler mekanizmalar ele alınmıştır.

Hücre ölümü, dokulardaki hücre birliğinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu bazen çok çarpıcı ve patolojik olarak izlenir. Örneğin enfarktüsle kanlanmanın bozulduğu bölgede hücreler senkronize şekilde ölürler (iskemik nekroz). Bazı durumlarda ise hücre ölümü dikkat çekici değildir. Esas olan, hücre sayısının normal sınırlarda tutulmasıdır. Programlı hücre ölümü buna örnek teşkil eder. Sıklıkla hücre ölümü ölen hücrelerin görülmesinden çok, sayısındaki azalma ile fark edilir. Lenfoid sistemde görülen ölüm şekli buna örnek verilebilir.

Apoptozis, embriyonun gelişmesi, metamorfozis olaylarında ve sağlıklı erişkin dokularda olagelen fizyolojik bir hücre ölümüdür. Bunun dışında endokrin dokularda kan trofik hormon konsantrasyonunun düşmesi ile oluşan atrofi, neoplazmlarda kendiliğinden oluşan veya kemoterapötik ajanlar, iyonize radyasyon ve hipertermi tedavileri sonrası görülen ölüm, allerjilerde T lenfositlerin hedef hücreye olan etkisi apoptoz yoluyla gerçekleşir (2).

APOPTOZİSDE MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

Apoptozisde hücreler tek tek etkilenir; hacimce küçülür, komşu hücrelerle temasını kaybeder (mikrovillus gibi özel yüzey farklanmaları ve diğer hücrelerle olan bağlantı yapıları bozulur). Bu olay hızla gerçekleşirken aynı anda hücrede değişik yüzey çıkıntıları ve kıvrıntıları oluşur (Resim 1). Bunların membranla çevrili olarak

hücreden ayrılmasıyla "apoptotik cisimler" meydana gelir.

Erdemli ve arkadaşları AML'li çocuk hastalarda yüksek doz metil prodnizolon kullanarak elde ettikleri apoptozisde, hücrelerde tipik morfolojik değişiklikler saptamışlardır (3). Burada sunulan mikrograflar bu hücrelerdeki orjinal bulgulardır.

Bu hücrelerde ER (endoplazmik retikulum) genişler, genişlemiş sarnıçların hücre yüzeyi ile birleşmesi sonucu hücre yüzeyinde krater gibi oyuklar gözlenir. Hücre iskeleti filamanları hücre yüzeyine paralel kenarlarda toplanır. ER dışında diğer hücre organelleri yapılarını korurlar. Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görülür.

Mitochondriyonlar, nekrozla ölen hücrelerin aksine başlangıçta itibaren normal yapıdadır. Nekrozdan farklı olarak apoptozisde hücre zarı sağlamdır. Bu nedenle inflamasyona neden olmaz.

Bütün önemli yapısal değişiklik çekirdekte başlayarak izlenir. Çekirdek zarının altında kromatin materyali yoğunlaşır ve kaba, büyük kümeler yapar. Buralarda nükleolar parçaları seçilemez. Çekirdek düzensizleşir ve ileri evrelerde nükleolar parçalara bölünür. Çekirdekçiği genişler ve granülleri kaba kümeler halinde dağılır. Sitoplazmada açık renk vakuoller gelişir.

Sonuçta yüzey çıkıntıları plazmalemma ile beraber hücre yüzeyinden ayrılır ve membranla çevrili yuvarlak veya oval apoptotik cisimler meydana gelir. Bunların sayısı, büyüklüğü ve içeriği hücrenin tipine göre değişir. Bazıları, yoğunlaşmış sitoplazmayla beraber bir veya daha fazla nükleolar parça içeriyorken bazıları sadece sitoplazma elemanlarını içerir. Nükleolar içerik bulunması cismin büyüklüğüne bağlı değildir (Resim 2).

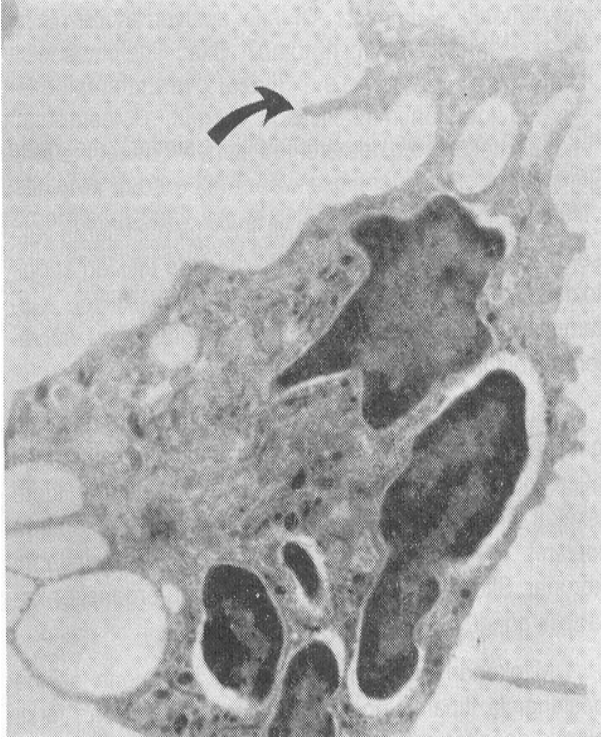
Oluşan bu apoptotik cisimler hücreler arası doku aralıklarına dağılırlar veya lümene dökülürler. Mononükleolar fagositik sistem veya komşu epitel hücreleri tarafından fagosite edilirler (Resim 3). Tümör nodüllerinde derinlerde bulunanlar ise neoplastik hücreler tarafından sindirilirler (4).

Dokuda 4-9 saat tanınabilir halde kalan apoptotik hücreler daha sonra fagozomlar içinde birkaç saat görülebilir, sonra da sindirilemeyen materyal olarak kalırlar. Apoptotik cisimlerin sindiriminde fagositik hücrenin

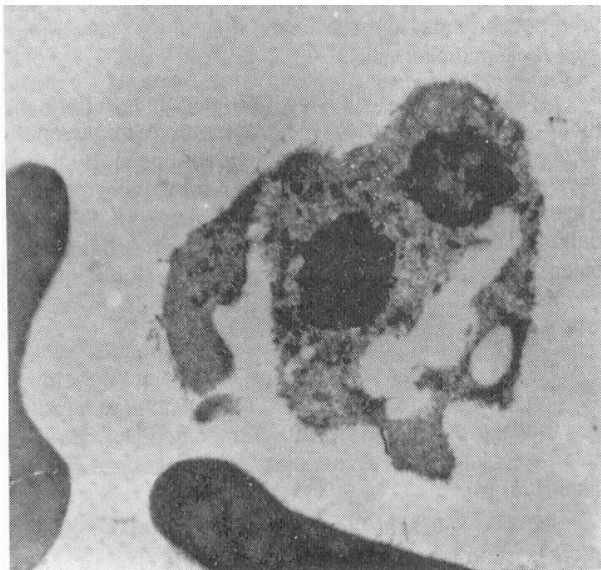
Geliş Tarihi: 28.12.1995

Yazışma Adresi: Dr.Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ABD, ANKARA

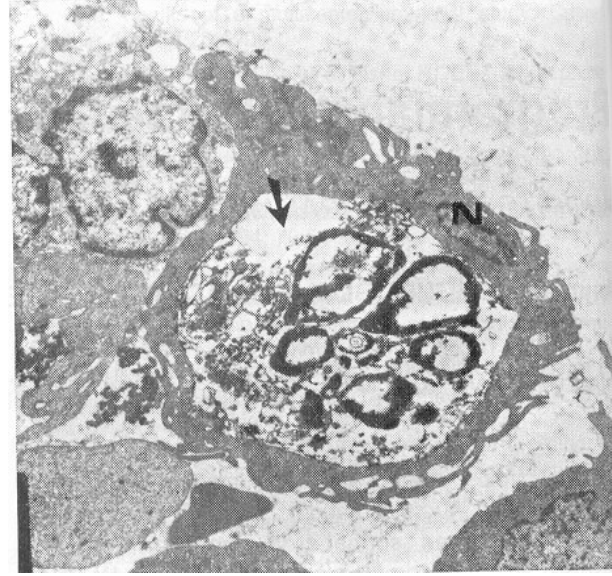
lizozomal enzimleri rol oynar. Kendisine ait lizozomlar diğer organeller gibi bozulmamıştır. Her ne kadar apoptotik cisimler hızla fagosite edilse de bazıları özellikle süspansiyon kültürleri, tümör asitleri gibi sıvılarda dağılmış olanlar fagositozdan kaçabilir. Bunlar kendiliğinden şişme ve membran rüptürüyle dejenerasyona giderler. Buna "Sekonder Nekroz" denir. Morfolojik olarak nekrozla aynıdır (1).



Resim 1. Çekirdeklerinde parçalanma ve periferde kromatin kümelenmesi gösteren apoptotik hücreye ait mikrografta, hücre, büzülmüş, organeller intakt ve yüzey uzantıları beirgin olarak dikkat çekmektedir (↑) (X4500).



Resim 2. Nükleer parçalar içeren apoptotik cisim (X9500).



Resim 3. Makrofaj tarafından fagosite edilmiş nükleer parçalar içeren apoptotik cisime ait (↑) mikrograf. Fagozom içerisinde organeller dejenerasyon nedeniyle ayırt edilememektedir. N-Makrofaj çekirdeği (X9500).

Apoptotik cismin ayırıcı özellikleri şöyledir; dejenere hücre parçaları küçüktür, oval veya yuvarlaktır, tipik olarak görülen nükleer parçalar bulunabilir (Resim 2) (5).

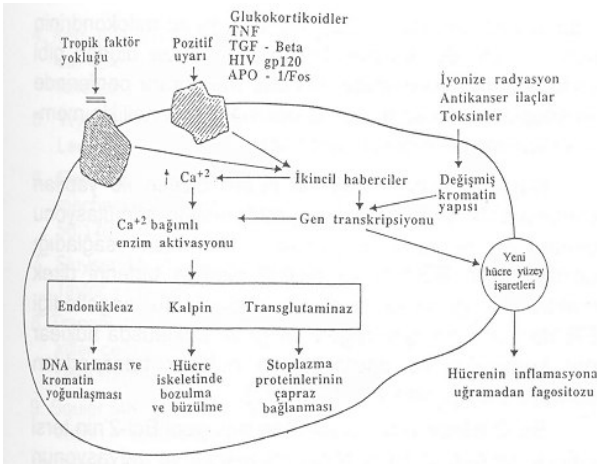
APOPTOZİSDE METABOLİK DEĞİŞİKLİKLER

Her ne kadar apoptozis nekrozla karşılaştırıldığında fizyolojik bir hücre ölümüyse de çeşitli patolojik uyarılar tarafından uyarılabilir. Apoptozisde, değişmez metabolik olaylar sırası yoktur. Birçok hücrede apoptozisin erken döneminde sitosol içerisinde iyonize kalsiyum devamlı yükselir. Kalsiyum apoptozisde yapısal değişikliklere neden olacak latent enzimleri aktive eder (Şekil 1). Bu enzimler;

Kalsiyuma-bağlı Nükleer Endonükleaz: DNA zincirini 180-200 bp'lik nükleozomlara parçalar. Bu parçalanma jel elektroforezde karakteristik "merdiven" görüntüsü verir (2).

Transglutaminaz: Apoptotik hücre morfolojik dejenerasyona başladığı zaman hücre büzülür, küçük parçalara ayrılır ve bu yapılar protein çapraz bağlanmalar ile stabilize edilir. Transglutaminaz, sitoplazmik proteinlerde çapraz bağların oluşmasına neden olur. Nitekim apoptotik hücrelerde deterjanlardan etkilenmeyen protein bir kabuk vardır. Scanning Elektron mikroskobu (taramalı elektron mikroskobu)'nda epidermisin kornifiye hücreleri gibi kıvrıntılı görülürler (6).

Lipid modifiye edici enzimler: Apoptotik hücrede plazma membranı fosfolipid asimetrisinin kaybolduğu gözlenmektedir. Normalde fosfatidil kolin ve sfingomyelin fosfolipid baş gruplarının sık paketlenmesini sağlar ve hücre dışında yer alır. Buna karşın fosfatidilserin ve fosfatidil etanolamin iç yüzeyde bulunur ve bu kenarın daha



Şekil 1. Apoptozisde ortak metabolik olaylar.

gevşek paketlenmesini sağlar. Bazı hücrelerde bu asimetri ATP-bağımlı fosfolipid translokaz tarafından sağlanır. Apoptozisin indüksiyonu, bu translokazı etkileyebilir ve fosfolipid asimetrisi kaybolunca makrofajların apoptotik hücreyi tanıyamaması sonucu fagositoz gerçekleşir (7).

Kalsiyuma bağımlı proteaz

Sitotoksik hücreler, hedef hücrelerde endojen apoptotik programı tetikleyen, "ölüm vuruşu" (letal hit) yapan granüller içeren sekresyonlar ile ölüm gerçekleştirirler. İlk bulunan granül protein perforinin hedef hücre membranında geniş su dolu porlar oluşturduğu ve bunların iyonlara non-spesifik geçirgen olduğu gösterilmiştir. Perforin bu özelliği nedeniyle proteazların ve özellikle Ca²⁺'un stoplazmaya ve nukleusa geçişine izin verebilir. Proteazlar, histonları ve kromatin yapısının stabilizasyonunu sağlayan diğer proteinleri degrade ederler. Bir Ca²⁺ bağımlı nötral proteaz olan Kalpin ise hücre iskeletinin bozulmasına yol açar (8,9).

Apoptozisin genellikle ATP formunda enerjiye ihtiyacı vardır. Hücre tipine ve apoptotik uyarana bağlı olarak aktif RNA ve protein sentezine gerek olabilir veya olmaz. Uzun süre yaşayan lenfositlerde RNA veya protein sentezini engelleyen ajanlar apoptozisi bloke eder. Tam tersine, aynı ajanlar nötrofil ve bazı lösemi hücrelerinde apoptozisi indükleyici mi yoksa inhibe edici mi etkiye sahip olduğuna karar verilebilir (10).

Ormerod, insan over kanseri hücrelerine cisplatin vererek yaptığı çalışmada hücrelerin apoptozis yoluyla öldüğünü gözlemiştir. Bu hücrelerin önce 30 kbp'lik daha büyük kromatin parçalara bölündüğünü bu sırada kromatin yapısında morfolojik değişikliklerin saptandığını 180-200 bp'lik oligonükleozomlara ayıran internükleozomal parçalanmanın daha geç bir olay olduğunu göstermiştir. Bu nedenle jel elektroforezdeki merdiven manzarasının iyi bir kriter olmadığı, erken tanıda mikroskopla apoptozis belirtilerine bakılması gerektiğini söylemektedir (11).

DNA yıkımı karakteristiktir ancak, çekirdeksiz hale getirilmiş hücrelerle yapılan çalışmalarda DNA yıkımı olmadan da apoptozis ile ölümün indüklendiği gösterilmiştir (12).

Hücrelerdeki çarpıcı hacim azalması ve yoğunluk artışı, bu tip hücre ölümüne "küçülme veya büzülme nekrozu" denmesine neden olmuştur. Timositlerde bu küçülmenin hücre içi su ve iyon kaybıyla olduğu gösterilmiştir. Apoptotik hücrede genişlemiş ER sarnıçları, plazma zarıyla birleşerek içeriklerini ekstrasellüler alana boşaltırlar. Bu hızlı ve seçici sıvı ve iyon boşaltımı bir iyon taşıyıcı sistem tarafından dengelenir (2).

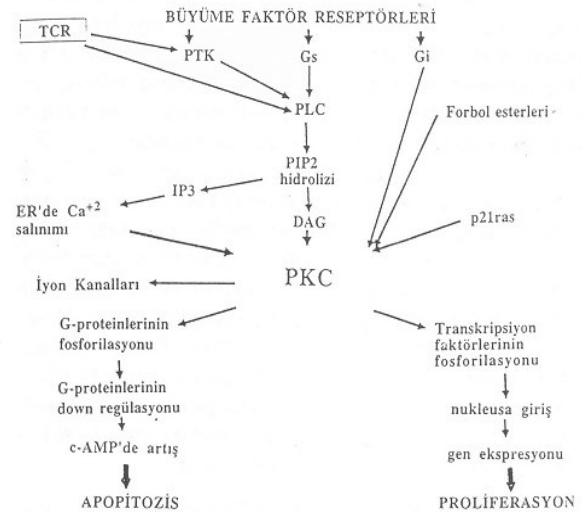
APOPTOZİSDE SİNYAL İLETİM SİSTEMLERİ

Apoptozisin homeostatik mekanizmalarda oynadığı önemli rollere verilen en iyi örnek T-hücreleridir. Bir çok timositte ait T-hücre reseptörü (TCR) konakçı organizmada bulunan antijenleri tanıyabilir ve bu hücrelerin zararlı otoimmün cevabı başlatma potansiyelleri vardır. Bu risk, timusdaki negatif seleksiyon sırasında hücrelerin apoptozise uğramaları sağlanarak en aza indirgenir (13).

İn vitro olarak TCR ile stimülasyon, glukokortikoid reseptör bağlantısı ya da hücreler iyonize radyasyona maruz kaldığında hücre ölümü sağlanabilir. Ancak, her üç etken farklı transdüksiyon mekanizmaları yoluyla etki gösterirler (14).

TCR stimülasyonu Ca²⁺ gibi sekonder haberci sistemde değişiklik oluştururken; glukokortikoidler, nukleusa taşınan sitoplazmik steroid reseptörler yolunu kullanırlar, ışınlama ise direkt DNA hasarı oluşturmaktadır (15).

Hücre ölümü veya yaşamının sürdürülmesindeki stimülasyon ile ilgili olaylar, Protein kinaz C, büyüme faktör reseptörleri ve G proteinler tarafından geçirilen sinyal yollarını içerirler (15).



Şekil 2. Hücrede sinyal iletim yolları.

PTK: protein tirozin kinaz, Gs-Gi: G proteinleri, PLC: fosfolipaz C, PIP2: fosfatidilinozitol, 4,5-bifosfat, IP3: inositol 1,4,5-trifosfat, DAG: diaçilgliserol.

Bazı hücre içi olaylarda olduğu gibi apoptozisde gelişen olaylar, benzer sinyal yollarını kullanmaktadır. Bu olaylar serisi, hücrel proliferatif homeostazisde denge oluşturulması için gereklidir. Hatta küçük bir denge-sizlik tek bir hücre için letal etkiye veya andiferansiyel hücrelerde atipik proliferasyona neden olur.

Plazma membranının sitoplazmik yüzeyinde lokalize olan G proteinleri transmembran sinyal sistemlerinde önemli rol oynarlar, adenilat siklazın stimülasyonu veya inhibisyonu ile hormonal sinyal iletimini sağlarlar.

Uyaran reseptöre bağlandığında G protein veya TCR aracılığı ile fosfolipaz C aktive olur. Bu enzim ile PIP₂'den IP₃ ve DAG oluşumu gerçekleşir. IP₃ endoplazmik retikulumundan Ca⁺² kanallarının açılmasına neden olur ve böylece hücre içi Ca⁺² konsantrasyonu yaklaşık 100 kat artar. DAG ile membranda yer alan Ca⁺² bağımlı protein kinaz C aktive edilir. Bu enzimin, fosforilleştiği proteinin tipine göre hücre ya apoptozise veya proliferasyona sevk edilir (Şekil 2) (13,16,17).

APOPTOZİSDE MOLEKÜLER MEKANİZMALAR

Multiselüler organizmalarda hücreler; hormonlar, sitokinler, iyonize radyasyon ve kemoterapötik ajanlar içeren çok çeşitli sinyallere cevap olarak bir intihar genetik programının aktivasyonu ile kendi kendilerini öldürebilirler. Bu hücre intiharının adı apoptozisdir ve genellikle fizyolojik koşullar altında oluşur.

Omurgalılarda apoptozisi regüle eden genler c-myc, p53 ve bcl-2 olarak bilinmektedir. Hücre proliferasyonunun kontrolünde önemli rolü olduğu bilinen c-myc apoptozisin regülasyonunda fonksiyonu vardır. Bir transkripsiyon faktörü olan c-myc proteini ortamda bazı faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin proliferasyona veya apoptozise girmesine neden olur (18).

Normal veya yaban tip p53'ün; c-myc fonksiyonunu veya ekspresyonunu inhibe ettiği ve proliferasyonu baskılayan genlerin ekspresyonunu kontrol ettiği düşünülmektedir. Yaban tip p-53 gen ürünü, nükleer bir protein olup, normal düzeyde iken hücrelerin non-proliferatif evrede kalmasını sağlar, bu ise hasarlanmış hücreler onarımı için gerekli süreyi sağlar. Hücreler oluşan hasarı kritik süre içinde onaramadığı takdirde apoptozise giderler. Böylece p53, DNA hasarından apoptozise gidiş yolunda temel elemandır. p53 ve diğer proto-viral onkogen ürünleri arasındaki ilişkiler p53 fonksiyonunu inaktive eder. p53'ün fonksiyonunun baskılanması ile hasar onarımının tamamlanmasından önce DNA replikasyonuna izin verilmesi ile kanser oluşumu gözlenebilir. p53 yüksek düzeyde eksprese olduğunda ise DNA sentezini c-myc, c-jun, ve c-fos gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu inhibe eder (18-20).

Alnemri ve arkadaşları 1992'de yüksek düzeyde bcl-2 eksprese eden B hücrelerinin glukokortikoidle muameleden sonra apoptozise girmediklerini göstermişlerdir (21). Ayrıca, son yayınlarda Bcl-2'nin glukokortikoid ve Ca⁺²'un indüklediği ölümü supresyonda çok efektif

olduğu bildirilmektedir (22). Bcl-2 proteini mitokondrinin hem iç hem de dış membranında lokalize olduğu gibi endoplazmik retikulumda nükleus membranı periferinde ve sitoplazmada az miktarda bulunabilir, genellikle membran yapıları ile işbirliğindedir (21).

Büyüme faktörü bağımlı hücre dizileri ile yapılan çalışmalarda bcl-2 proteinin proliferasyon stimülasyonu olmaksızın hücrenin yaşamını sürdürmesini sağladığı belirlenmiştir. Bcl-2'ni ya reaktif oksijen türlerini direk inaktive ettiği veya bunların oluşumunu engellediği ER'da Ca⁺² geçişini regüle ettiği ve nükleusda nükleer por kompleksi ile bağlantılı ve nükleer transportdan sorumlu olduğu sanılmaktadır (22).

Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan bax geni Bcl-2'nin tersi çalışan bir gendir. Kemoterapötik ajanlar ve radyasyonun neden olduğu DNA hasarı p53 proteini veya p53 transkripsiyonel aktivitesinin artmasına neden olur. p53 proteini bax gen ekspresyonunu artırırken, bcl-2 gen ekspresyonunu azaltır. Sonuçta Bcl-2/Bax protein oranı azalır ve hücreler hücre-ölüm uyarımına daha duyarlı hale gelir. p53 tüm hücrelerde bcl-2 ve bax gen ekspresyonunun dominant regülatörüdür (7).

Bir hücre bir virüsün varlığını tesbit ettiğinde hücrel metabolizmasında değişiklikler olur ve hücre kendini yok eder. Böylece virus replike olamaz ve komşu hücrelere yayılamaz. Bazı virüslarda hücrenin intiharına karşı var olan ve bcl-2 benzeri anti-apoptotik genler, virus enfeksiyonlarına karşı kuvvetli bir savunma olan hücre ölümünü ortadan kaldırmaya yöneliktir (23).

Bazı önemli antikanser ajanları içeren farmakolojik preparatlar, hücreyi sanki viral atak varmış gibi aldatarak toplu intihara götürebilir. Hücre, ilacın direk etkisi ile ölmeye önce kendi kendini öldürür (24).

Apoptozis proliferasyon, farklılaşma ve transformasyon gibi genlerle regüle edilen bir olaydır. Apoptozisin fizyolojik önemi, hücre komünitesinde istenmeyen hücrelerin aktif olarak çekilmesine neden olur ve fizyolojik sistemlerin (nöral, endokrin ve immün sistemler) regülasyonu ile organizmaların yaşamının sürdürülmesinde hücre komünitesinin sosyal kontrolünü yapar. Apoptozisin hatalı regülasyonu, kanser, AIDS, otoimmün hastalıklar, viral enfeksiyon, kardiyovasküler hastalık, dejeneratif nöral hastalıklar, malformasyon ve yaşlanma etyolojisinde de rol oynayabilmektedir (7). Gelişme ve homeostazis için temel olan apoptozis, mekanizması aydınlandıkça insan hastalıklarının geniş spektrumunda önemli yararlar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR, Cell Death: The significance of apoptosis int. Rev Cyt 1980; 68:251-305.
2. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: Pathology mechanisms & roles int. Rew Exp Path 1991; 32:223-54.
3. Hiçsönmez G, Erdemli E, Tekelioğlu M, Tuncer AM, Özбек N, Çetin M, Cotter TG. Morphologic evidence of apoptosis in childhood acute myeloblastic leukemia treated with high dose methylprednisolone Leukemia and lymphoma 1996; 22:91-6.

4. Kerr JFR, Wyllie AH & Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-57.
5. Wyllie AH. Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture). *Br J Cancer* 1993; 67:265-208.
6. Fesus L, Davies PJ, Piacentini M. Apoptosis: Molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol* 1991; 56:170-7.
7. Sluysen M. Apoptosis in normal development and cancer. Taylor & Francis Ltd, 1996.
8. Trapani JA, Smyth MJ. Killing by cytotoxic T cells and natural killer cells: multiple granule serine proteases as initiators of DNA fragmentation. *J Exp Med* 1993; 71:201-8.
9. Squier MK, Miller AC, Malkinson AM, Coker JJ. Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* 1994; 159:229-37.
10. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis & Disease *The Lancet* 341: May 15, 1251-54, 1993.
11. Ormerod MG, O'Neill CF, Robertson D, Harrap KR. Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Exp Cell Resc* 1994; 211:231-7.
12. Shulze-Osthoff K, Walczak H, Dröge W, Krammer PH. Cell nucleus and DNA fragmentation not required for apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 1994; 127:15-20.
13. Lawrence Osborne S, Osborne A. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunology Today* 1993; 14(12):582-90.
14. Evans VG. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol International* 1993; 17(5):461-4767.
15. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61:203-12.
16. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 1284:555-6.
17. Cotter TG, Leron SV, Martin SJ. Apoptosis: Programmed cell death *J. Biomed Sci* 1990; 1:72-80.
18. Reed JR. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *Y Cell Biol* 1994; 124(1):1-6.
19. Marshall CJ. Tumor suppressor genes. *Cell* 1991; 64:313-26.
20. King LB, Ashwell JD. Signaling for death of lymphoid cells. *Cur Opin Immunol* 1993; 5:368-73.
21. Alnemri ES, Fernandes TF, Haldar S, Croce CM, Litwack G. Involvement of bcl-2 in glucocorticoid-induced apoptosis of human pre-B cell leukemia. *Cancer Res* 1992; 52:491-5.
22. Hockenbery D, Nunez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:6961-65.
23. Myashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy induced apoptosis in a human leukemia cell line *Blood* 1992; 81:151-7.
24. Haecker G, Vaux DL. Viral, worm and radical implications for apoptosis *TIBS* 19:99-100 March, 1994.