

# Apoptoz: Ölmeye Yatmak

## Apoptosis: The Death Decision

Haldun Öniz

SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği,  
Çocuk Onkoloji ve Kemik İliği Transplantasyonu Ünitesi, İzmir

### ÖZET

Apoptoz ya da programlı hücre ölümü, normal ve maliyn süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu tip hücre ölümü DNA'nın bir ya da daha fazla nükleozom parçalarına ayrılması, kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanması gibi özel şekilsel değişikliklerle karakterizedir. Normal şartlar altında apoptoz, vücudun her bir parçasının içerik ve büyüklüğünün fizyolojik gereksinimlerin belirlediği sınırlar içinde kalmasını sağlar. Apoptozun başlaması ve baskılanması karmaşık bir düzenleyici sinyal ağı tarafından kontrol edilir. Bu derleme temel apoptoz mekanizmalarını hücresele, biyokimyasal ve moleküler düzeyde özetlemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, programlı hücre ölümü

### SUMMARY

Apoptosis, or programmed cell death, plays a central role in the regulation of both normal and malignant processes. This form of cell death is characterized by DNA degradation into fragments with sizes of one or more nucleosomes and by specific morphologic changes including chromatin condensation and nuclear fragmentation. In the normal context, one role of apoptosis is to ensure that the actual size and constitution of any particular compartment of the body does not exceed the limits dictated by physiological needs. Induction and inhibition of apoptosis are presumably controlled by an intricate network of regulatory signals. This review summarizes the basic mechanisms of apoptosis at the cellular, biochemical, and molecular levels.

**Key Words:** Apoptosis, programmed cell death

Başvuru tarihi: 03.11.2003

**SSK Tepecik Hast Derg 2004;14(1):1-20**

Çocukluğumda en hoşlandığım şeylerden biri babaannemlere gittiğimizde babamın yaprakları sararmış çocuk dergilerini karıştırmaktı. Bu dergilerden birinde okuduğum, kışın sertleşen şartlarında daha elverişli yerlere göç eden bir eskimo topluluğunun hayli gerisinde kalmış yaşlı baba, oğlu, gelini ve küçük torununun öyküsü belleğimde yer etmiş. Olasılıkla varmaları gereken yerden önce tükenecek birkaç günlük yiyecekleri kalan bu küçük ailenin hızını kesen yaşlı baba sonunda dayanamaz ve oğlunu yanına çağırarak yola onsuz devam etmelerini, öndeki

topluluğa yetişerek torununu güvenceye almalarını istediğini söyler. Oğul önce kabul etmek istemese de töreleri hatırlatan babasına fazla direnemez. Zaten sınırlı olan su ve yiyeceğin az bir bölümünü de almayı reddeden babalarını bir tepenin kenarına bırakırlar. Bir süre sonra geride kalan beyazlık içinden artmış kurt ulumaları duyulur. Gözlerinde biriken yaşları silerek, herşeyden habersiz gülümseyen küçük bebeğe sarılıp yollarına devam ederler. Apoptoz terimi ile ilk karşılaştığımda nedendir bilinmez önce bu küçük öyküyü anımsadım.

Canlıların yaşam döngüsünün temel unsurları doğum, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölümdür. Yaşamın sürdürülmesi organizmada yapı ve fonksiyonun fizyolojik gereksinimlerin belirlediği sınırlar içinde korunmasına bağlıdır. Bunun için hücre çoğalması ve ölümü arasında bir denge bulunması gerekir. Bu denge kaybolduğunda, yani çoğaldan çok hücre öldüğü ya da farklılaştığında dejeneratif hastalıklar, ölen ya da farklılaşandan daha fazla hücre çoğalması durumunda ise kanser ve otoimmün hastalıklar görülür. Apoptoz konusunda verdiği bir konferansa şair Robert Browning'in "Hayatın anlamını ölünceye kadar bilemezsiniz, hayatı yaşanılır kılan ve ona önemini veren ölümdür" sözüyle başlayan Dr. Mak "Hücre ölümü olmadığında yaşam da olmaz" vurgusunu yapmaktadır (1).

Ölüm, canlılarda bütün yaşam süreçlerinin geriye dönüşü olmayacak biçimde durmasıdır. Tüm canlıların en küçük işlevsel birimi olan hücrede ölüm, patolojik ya da fizyolojik süreçler sonunda gerçekleşir. Başlıca iki hücre ölüm şeklinden biri olan nekroz, hücre şişmesi ve hücre parçalanması ile karakterize, ani ağır iskemi, mekanik travma gibi büyük çevresel değişikliklerin neden olduğu patolojik ve pasif bir süreçtir (2). Bu tür hücre ölümünde hücre içi denetim mekanizmalarının etkisi yoktur. Hücre kendi isteği ile ölmez (Tablo 1). Diğer bir hücre ölüm şekli olan fizyolojik ölüm yolu ise yaşlı, hasarlı ya da anormal hücreleri ortadan kaldırarak hücreler arası dengeyi ve hücrelerin canlılıklarını sürdürmelerini sağlar (3). 1920'li yıllardan beri bilinen ve nekroza farklı olarak hücre büzüşmesi görülmesi nedeniyle "büzüşme nekrozu" olarak adlandırılan fizyolojik hücre ölümünün, büyük oranda önceden kestirilebilir (programlanmış), kesin şekilsel (morfolojik) nitelikleri olan bir olay olduğu 1970'lerde Kerr, Wyllie ve Currie tarafından ileri sürülmüştür (4). Genetik olarak belirlenen aktif bir süreç olan programlanmış hücre ölümünün, günümüzde en az iki ayrı şekli olduğu belirtilmektedir (5):

### 1. Apoptotik programlanmış hücre ölümü:

Apoptoz, eski Yunanca apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan

ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür. Bu nedenle bazı hücrelerin sonbahar yaprakları gibi adeta kuruyarak vücudu terketmesi ve arkadan gelen hücrelere yer açmasıyla gerçekleşen hücre ölüm tipi, Klasik Yunan tarihçisi olan James Cormack'ın önerisiyle "apoptoz" olarak adlandırılmıştır (4). Kromatin yoğunlaşması, hücre büzülmesi, DNA fragmantasyonu, apoptotik cisimlerin oluşması, bunların komşu parankimal hücreler ya da makrofajlarca fagosite edilmeleri ve hücrenin çevre hücrelerden ayrılması bu tip hücre ölüm şeklinin gözlenen şekilsel özelliklerdir (4). Yenidoğanda timusun gerilemesi bu tip hücre ölümünün en klasik örneğidir.

### 2. Apoptotik olmayan programlanmış hücre ölümü:

Apoptozda görülen yapısal değişiklikler izlenmeden programlanmış bir olay sonucu hücre ölümünün gerçekleşmesidir. Canlı organizmanın oluşum (embriyogenezis) ve başkalaşma (metamorfoz) sürecinde birçok organın ortadan kalkması bu tipe örnektir (5).

## APOPTOZUN ŞEKİSEL ÖZELLİKLERİ (MORFOLOJİSİ)

Apoptoz, dokuda belli bir bölgedeki tüm hücreleri etkilemek yerine dağınık olarak tek tek hücrelerde ortaya çıkar ve tipik olarak yangısal değişiklikler yoktur. Belirlenen ilk şekilsel değişiklik kromatinin çekirdek zarının altında yoğunlaşarak değişik boyutta yarım ay ya da oval şekillerde iyi sınırlı yoğun kitleler haline gelmesidir. Çekirdek merkezinde osmiofilik granül kümeleri oluşturmak üzere çekirdekçik kromatini dağıtır. Fibriler protein merkez yoğunlaşmış çekirdek kromatinin iç yüzeyinde yoğun granüller kitle oluşturur. Bu çekirdek değişiklikleriyle aynı anda apoptotik hücre komşu hücrelerden ayrılır ya da bağlantı noktaları ortadan kalkar. Mikrovilluslar gibi özel yüzey yapıları kaybolur ve düzgün sınırlı hale gelir. Hücre hacmi azalır, hücre yoğunluğu artar, sitoplazmik organeller yoğunlaşır, düz endoplazmik retikulum genişler. Yoğunlaşmış sitoplazmada vakuoller oluşur.

**Tablo 1.** Apoptoz ve nekrozun özellikleri.

Özellik	Apoptoz	Nekroz
<u>Patolojik</u>		
Ölüm şekli	Dokuda dağınık olarak tek tek hücrelerde	Komşu hücre gruplarında
Hücre büyüklüğü	Azalıp (büzüşme) Fragmanlara ayrılma	Artar (şişme)
Hücre zarı	Devamlılık korunur Tomurcuklanma Zar yüzeyinde fosfolipidlerin Erken parçalanma	Düzleşme
Mitokondri	Zar geçirgenliğinde artma Sitoplazma içine sitokrom-c, Apaf-1 salınımı Yapı göreceli olarak korunur	Şişme Yapıda bozulma
Organel şekli	Kontrakte Apoptotik cisimler	Şişme Bozulma
DNA parçalanması	Fragmente, internükleozomal bölünme, Serbest 3' sonları, Elektroforezde merdiven görünümü Sitoplazmada DNA görülmesi	Yaygın ve rasgele
Hücre temizlenmesi	Fagositoz İnflamasyon yok	İnflamasyon Makrofaj invazyonu
<u>Mekanizmalar</u>		
Genel uyarı	Gelişimsel programlar Endojen sinyaller Hücrelerarası sinyaller Hastalık süreçleri	Hastalık süreçleri
Spesifik uyarı	Büyüme faktörü eksikliği (NGF,IL-2) Ölüm aktivatörleri Yüzey reseptörlerine bağlanma Sitokinler Lenfokinler Toksik hormonlar, radyasyon, orta derecede iskemi, oksidanlar, artmış DNA hasarı	Toksik Ağır iskemi Radyasyon
Hücresel süreçler	Programlı reaksiyonlar dizisi kaspaz aktivasyonu, internükleozomal endonükleazlar, transglutaminaz aktivasyonu Gerekenler yeni RNA transkripsiyonu, protein sentezi, ATP	Protein sentezi yok RNA transkripsiyonu yok Enerjiden bağımsız ATP azalması

Genişleyen sisternalar hücre zarı ile birleşerek hücre yüzeyine doğru tomurcuklanmalar oluştururlar. Sitoplazmik flamanlar yan yana ve hücre yüzeyine paralel tabakalar şeklinde toplanırlar (4,6).

Bu dönemle içiçe geçen ya da hemen ardından gelen devrede hücre yüzeyinde tomurcuklanma ve çekirdek sınırında düzensizlik vardır. Bunların ayrılması ile çekirdek ve sitoplazma değişik boyutlarda "apoptotik cisimcikler" oluşturur. Bu

cisimler epitelyal yüzeyden dökülebilir ya da çoğunlukla komşu normal parankimal hücreler ya da makrofajlar tarafından fagosite edilirler(4,6).

Son aşama kalıntı çekirdek ve sitoplazmik yapıların genellikle fagosite eden hücrenin fagozomu içinde lizozomal enzimlerle parçalandığı "in vitro otoliz" dönemidir. Hücre parçalanması sırasında hücre içi elemanlar hücreler arası aralığa dağılmadığı, proteolitik enzimler ya da toksik oksijen salınımı olmadığı için yangısal yanıt oluşmaz ve komşu hücrelerin hasarlanması önlenir (4,6).

### APOPTOTİK HÜCRELERDEKİ BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

Kromatin değişikliklerinin başlamasından kısa süre önce, hücrel aktivitelere ve sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan kalsiyumun sitoplazma içi miktarında hafif artma görülür (5,7-9). Bu artış bazı sessiz enzimleri aktive ederek bazı yapısal değişikliklere yol açar. Kalsiyuma bağlı endonükleaz ve transglutaminaz bu enzimler arasındadır. Bazı hücrelerde ise apoptozun geç döneminde kalsiyum artışı olması kalsiyumun apoptozun değişik dönemlerinde farklı roller üstlenebildiğini düşündürmektedir (5,7).

Çekirdek değişikliklerine endojen kalsiyum-magnezyum bağımlı nükleazların aktivasyonu neden olur (8-10). Bu nükleazlar bazı hücrelerde sürekli olarak bulunurken bazılarında apoptozdan önce görülürler. Nükleozomlar arasında kromatini bölerler ve apoptotik hücre DNA'sı hepsinin uzunluğu 180-200 baz çifti ve katları olan parçalara ayrılır. Bu parçalar agaroz jel elektroforezde apoptoza özgü merdiven görünümünü oluştururlar (3).

Apoptozun belirgin yapısal özelliği olan sitoplazmik yoğunlaşmanın mekanizması bilinmemektedir. Bunun sonucunda önce hücre yüzeyinde çıkıntılar, sonra hücre içeriğini ayıran apoptotik cisimler oluşur. Apoptoza yönelen hücrede şekilsel değişiklikler gelişmeden ve DNA parçalanması görülmeden önce  $\beta$ -tubulin haberci (messenger) RNA, daha sonra  $\beta$ -tubulin miktarı artar (8).

Çoğu apoptotik hücre daha önce kendilerinde bulunmayan transglutaminaz aktivitesi gösterir. Bu enzim apoptotik hücrelerin sitoplazmik proteinleri arasında  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil) lizin bağları oluşumuna yol açar. Bu çarpaz bağlı transglutamin proteinler sitoplazma zarı altında keratinize hücredekine benzer SDS-dirençli kabuk oluştururlar. Bu yapı, fagosite edilmelerinden önce apoptotik cisimlerin içindeki tehlikeli hücre içi enzimlerin salınımını önler. Apoptotik hücrelerin sınırlarının bozulması ve büzüşme bu enzim aktivitesi ile olabilir. Kalpain gibi bazı kalsiyuma bağımlı proteazlar da hücre yapısının bozulmasına katkıda bulunabilir (8-10).

Apoptotik hücre yüzeyinde beliren yeni moleküler yapıların fagositik hücreler tarafından tanınması sonucu fagositoz görülür. N-asetilglukozamin ve dimeri N,N'-diasetilşitabrozun bu tanıma işleminde rolü olduğu gösterilmiştir. Normalde hücre zarında gizlenmiş ya da korunmuş durumda bulunan bu şeker molekülleri apoptozda görülen zar değişiklikleri ile açığa çıkarlar ve makrofajların yüzeyindeki reseptörler tarafından tanınırlar. Apoptoz sırasında hücre zarındaki fosfolipid dağılımı da değişir. Hücre zarı iç yüzeyinde bulunan negatif yüklü fosfolipidlerin zarın dış yüzeyine çıkar. Fosfolipid dağılımındaki değişiklik sonucu en önemlisi C1q olan kollektin adı verilen çeşitli çözünür proteinlerin apoptotik hücre zarına bağlandığı, mitokondri yerleşimli kardiyoipinin de apoptoz sırasında zarda bulunduğu saptanmıştır. Makrofajların vitronektin reseptörleri trombospondin köprüleri yoluyla apoptotik hücrelere bağlanmadan sorumludur. Vitronektin reseptörlerine bağlanmaya dayanan fagositoz, fagositozu yapan makrofajdan inflamatuvar maddelerin salınmamasını sağlar. Makrofaj Fc ve C<sub>3</sub> reseptörleri yoluyla olan fagositoz ise nötrofil kemotaktik faktörlerin salınımına ve bölgeye nötrofil toplanmasına neden olur (8,11,12).

### APOPTOTİK SÜRECİN BAŞLAMASI

Apoptozun genetik düzenlenmesi hakkındaki bilgilerimiz *Caenorhabditis elegans* ile yapılan ayrıntılı incelemelere dayanmaktadır (13). 1986' da Robert Horvitz *C. elegans*'ta normal embri-

yogenez ve hücre ölümü için en az 3 genin gerekli olduğunu gösterdi. Ced-3, Ced-4 ve Ced-9 adı verilen bu genler olmadan apoptoz görülmediği ve gelişme olmadığı gözlemi Dr. Horvitz'e 2002'de Nobel ödülü kazandırdı (1).

Apoptoz biyolojisinde iki evre görülür:

1. Programlı ölüm kararının verilmesi
  - Uyarı
  - Uyarının hücre tarafından tanınması
  - Ölüm kararının verilmesi
  - Ölüm
2. Programlı olarak ölen hücrenin ortadan kaldırılması

Apoptoz uyarısı alan hücre bir hazırlık döneminden geçer. Geriye dönüşümlü olan bu dönemde hücrelerin sitoplazmasında bazı genlerin uyardığı m-RNA ve protein yapımı olduğu görülür. Protein yapımını önleyen ajanlar apoptozisi önlemektedir (6,8-10,14). Ancak apoptozis sırasında değişmez şekilde ortaya çıkan metabolik bir olay dizisi bulunmamaktadır. Aktif RNA ve protein sentezine duyulan gereksinim hücre tipine ve apoptotik uyarının türüne bağlıdır. Bu durum hemen bütün hücrelerde fizyolojik hücre ölümünü baskılayan ya da başlatan düzenleyici proteinlerin bulunması ile açıklanabilir. Belli bir hücre tipinde baskılayıcıların ve başlatıcıların göreceli yıkım hızları apoptozu başlatan ya da durduran RNA ve protein sentezinin durup durmayacağını belirler (14).

Üç apoptoz aktivasyon modeli tanımlanmıştır (15):

1. **Uyarma** (indüksiyon) modelinde uyarı alındıktan sonra yeni gen yapımı görülmektedir. Bu modelde apoptoz, protein ürünleri hücre için ölümcül olan, daha önce sessiz duran genlerin kopyalanmasına (transkripsiyon) bağlı görünmektedir. Bunun sonucunda internükleozomal DNA parçalanması görülür. Bu tip glukokortikoidlerle karşılaşan timositlerde görülür.
2. **Serbestleşme** (release) mekanizmasında apoptoz, gen yapımının baskılanması ile aktive olur. Bu durumda hücrede bazı erken yollar ve son ana yolu içeren bir ölüm programı zaten aktif durumdadır, ancak baskıla-

yıcılar tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Eğer baskılayıcı, ölüm programının elemanlarından daha kısa yarı ömürlü ise, makromoleküler sentezin durması baskılayıcının hızla azalmasına, ölüm programının serbestleşmesine ve apoptozu yol açar.

3. **İletme** (transdüksiyon) modelinde uyarı sonrasında gen yapımı görülmemesidir. Sitotoksik T hücrelerle karşılaşan tümör hücrelerinin ölümünde görülür. Olasılıkla katil hücrenin zarındaki sinyalleme sonucudur.

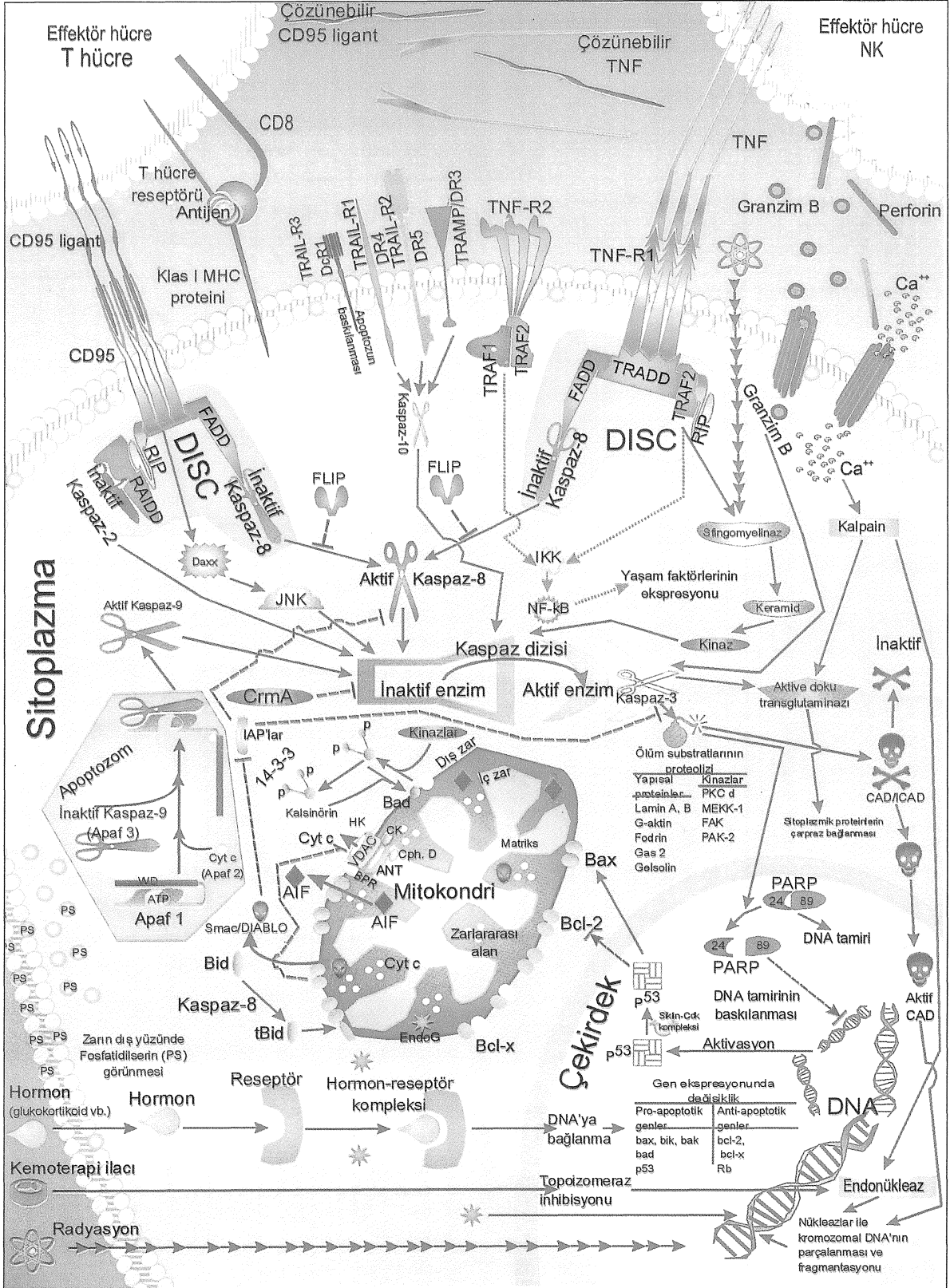
Her çeşit hücrede kaçınılmaz olarak apoptozu yol açacak uyarıcı sinyal yoktur. Hücrede apoptoz olup olmaması hücrenin sinyale yanıtının doğası kadar apoptoz baskılayıcı moleküllerin var olup olmamasına bağlıdır.

Sitokinler, hormonlar, toksinler, fiziksel ajanlar ve büyüme faktörlerinin azalması gibi pek çok etken, Fas ve Tümör Nekroz Faktör (TNF) reseptörlerinin uyarılması apoptozisi başlatabilir (10,16-18). Çeşitli yollarla aktive olabilen apoptoz süreci daha sonra tek bir ana yol ile devam eder (15). Apoptozu başlatan en önemli mekanizmalar fizik olaylar ( $\gamma$ -ya da uv radyasyon), DNA alkilasyonu (mitomisin-C ile karşılaşma), topoizomeraz II aktivitesinin değişmesi (etoposid tedavisi), reaktif oksijen türleri ya da mitoz defektleri ile oluşan DNA hasarı olarak görünmektedir (19,20). Reaktif oksijen türleri ve düzenleyicileri önemli bir başlatıcı etkidir. Reaktif oksijen yapımı sonucu görülen lipid peroksidasyonu farklı etkenlerin başlattığı apoptozla ilişkilidir. Ancak çok düşük oksijen düzeylerinde de apoptozun görülmesi apoptozda reaktif oksijen türlerine mutlaka gerek duyulmadığını, apoptoz sürecinin başlatılmasını kolaylaştıran fakat doğrudan yol açmayan hücre içi sinyallerden biri olarak işlev gördüğünü düşündürmektedir. TNF'nin apoptozu başlatma yeteneğinde süperoksid dismutaz düzeylerinin göze çarpan etkisi Fas'ın başlattığı hücre ölümünde görülmez. Başka başlatıcı yollar da bulunmaktadır (5,9,19).

Apoptoz başlıca iki yolla gerçekleşir: Dış (ekstresek) ve iç (intrensek) yollar. Apoptozun dış yolu TNF ailesi hücre yüzey reseptörlerinin

ligantlar yolu ile aktive edilmesi ile uyarılır (Şekil 1). Hücre ölümünü düzenleyen mekaniz-

malarn belki de en iyi anlaşılması örneği sitokine bağlı dış apoptoz yoludur. TNF-α, TNF ile



Şekil 1. Apoptoz mekanizması.

ilişkili apoptosis uyarıcı ligantlar (TRAIL) ve Fas ligantları bazı maliyet ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek ölüme neden olurlar. TNF ailesi reseptörler (TNF-R1/CD120a, TNF-R2, DR3/Wsl-1/Tramp, DR4/Trail-R1, DR5/Trail-R2, CAR-1) ve Fas (CD95/APO1) reseptörü belli bir aminoasit dizilimi ve homolojiyi paylaşır (21,22). Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligant bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarının kıyaslanması bu moleküllerde kısmen korunmuş olan bir ölüm bölgesinin (DD) bulunduğunu gösterir. Bu bölgeler apoptozun başlaması için gerekli olan sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlandığı yerlerdir. Duyarlı ligandların bağlanmasıyla üç TNFR ya da Fas molekülü kompleks oluşturmak üzere bir araya gelir ve TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TRADD ve FADD/Mort-1 adlı adaptör proteinlere bağlanırlar. Bu adaptör proteinlerden birinin ektopik yapımı apoptozu uyarabilmektedir. Bu proteinlerin hem DD hem de proteazların ölüm oluşturan bölgesine (DED) bağlanan protein etkileşim bölgesi vardır. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar bir "Ölümü Başlatan Sinyalleme Kompleksi (DISC)" oluşturur. Proteazların aktivasyonu apoptotik sinyali üretir. Apoptozu başlatma yeteneklerini hasarlayan TNFR ya da Fas mutasyonlarında sitoplazmik ölüm bölümü proteinlerinin bağlanmasının bozulması, bu moleküllerin Fas ve TNFR'e bağlı apoptozda önemli rol oynadıklarının göstergesidir (16,23). Normalde "Ölüm Bölgesi Susturucusu (SODD)" olarak adlandırılan protein ile uyarılmamış reseptörlerin sitoplazmik DD uçları maskelenerek reseptörlerin kendiliğinden sinyal oluşturmasını önlenir. Reseptörün uyarılması ile SODD ölüm ucundan ayrılır ve DED içeren adaptörün bağlanmasına izin verir (22,24).

TNFR sinyalleme kompleksi en az 3 farklı etkinlik gösteren işlev aktivasyonuna yol açar: JNK aktivasyonu, NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve apoptozun uyarılması. TNF- $\alpha$  etkisini TNF-R1 ve TNF-R2 reseptörleri üzerinden gösterir. TNF-R1'in uyarılmasıyla sitoplazmik kısma bağlanan TRADD adaptörü aslında RIP, FADD ve TRAF2

proteinlerinin bağlanmasına aracılık eden bir platformdur. TNF-R2 reseptörü ise önce TRAF2'ye, bu protein ise TRAF1'e bağlanır (21). TNFR tarafından apoptozun başlatılması için TRADD ve FADD gerekirken JNK ve NF- $\kappa$ B aktivasyonu TRADD, TRAF2 ve RIB ile olur. JNK ve NF- $\kappa$ B aktivasyonu apoptoz uyarımında yer almaz, apoptozdan koruyucu yanıt oluşturabilir. Örneğin NF- $\kappa$ B, ürünleri apoptozu baskılayan çok sayıda antiapoptotik geni aktive etmektedir. Bunlar içinde IAP'lar, cFLIP, A<sub>1</sub> (Bfl1), TRAF1 ve TRAF2 sayılabilir. TRAF proteinleri yüksek oranda korunmuş C-ucu TRAF bölgesi ile RING finger ve birkaç zinc finger motifi içeren daha değişken N-ucuna sahiptir. IKK ve JNK aktivasyonu için TRAF2'nin N-ucu RING ve Zn-finger motifleri gereklidir. RIP proteinleri de C-ucu DD bölgesi, intermediate bölge ve N-ucu serin/treonin protein kinaz bölgesi içerir ve TNF-R1'in NF- $\kappa$ B'yi aktive etmesinde anahtar etkiye sahiptir (25).

Fas hücre yüzey reseptörü de JNK yolunu kuvvetle aktive etmektedir. Ancak FADD'ın hücre ölümünü uyarırken JNK aktivasyonu oluşturmaması Fas'ın JNK'yi aktif eden başka sinyal molekülleri üzerinden etkili olduğunu düşündürmektedir. Daxx denilen bir doğal sinyal proteini spesifik olarak Fas'ın DD bölgesine bağlanır. Daxx'ın büyük miktarda yapılması Fas ile uyarılan apoptozu artırır ve JNK yolunu aktive eder. Daxx apoptotic yolu Bcl-2'ye duyarlı iken FADD yolu Bcl-2'ye duyarlı değildir (25,26).

Yakın zamana kadar sadece yapısal bir molekül olarak işlev gördüğüne inanılan hücre zarının ana maddesi sfingomiyelin, sfingomiyelinaz ile ikincil ulak (messenger) olarak davranan keramid'e (ceramid) hidrolize olur.  $\gamma$ -ışınlama, TNF ya da Fas bağlanması ile başlatılan apoptotik sinyaller sfingomiyelin yolunu keramid yapımını başlatmak üzere aktive eder. Asidik sfingomiyelinazın apoptotik sinyalin taşınmasında özellikle önemli olabileceği belirtilmektedir (19,27).

Ancak apoptozun başlaması için mutlaka sfingomiyelin yolunun gerekliliği henüz gösterilememiştir. Keramid, keramid sentaz enziminin aktivitesi ile de hücre içinde birikebilir. Topoi-

zomeraz II üzerinden DNA hasarına neden olan daunorubisinin aktive ettiği keramid sentazı baskılayan fumonis B'nin keramid yapımını ve daunorubisinin oluşturduğu apoptozu önleyebilmesi bazı olgularda DNA hasarından çok keramid birikiminin daunorubisinin neden olduğu apoptozun kritik sinyal elemanı olduğunu düşündürmektedir (19,20,27-29).

Apoptozun daha yaygın yolu olan iç yol hücrenin kendi içinden, örneğin sitotoksik ilaçlar gibi hasar yapıcı ajanlarla başlayan sıkıntılı duruma yanıt olarak aktive olur. İç yoldaki apoptotik sinyal iletiminde mitokondrinin temel bir rolü bulunmaktadır. Ayrıca Fas kaynaklı sinyalin hücre tipine bağlı olarak mitokondri yoluyla da kaspazı aktive etmesi mümkündür (16). Mitokondri hücresel enerji yapımı ve hücrenin yaşaması için gereklidir. Mitokondri apoptoz sırasında sitoplazmaya geçerek ölüm programının akışını aktive eden birkaç faktör taşır. Bunlar sitokrom c ve "Apoptozu Uyarıcı Faktör (AIF)" adlı doğal bir faktördür. Bcl-2 bu faktörlerin sitoplazmaya salınımını önlemektedir (30).

AIF canlı hücrede mitokondri zarları arasında yerleşmiş, bakteriyel ferredoksin ya da NADH oksidoredüktazlarına benzerlik gösteren ve çekirdek tarafından kodlanan, proteaz özelliğinde olan 57 kDa'lık bir flavoproteindir. AIF sitoplazmik faktörler olmadığında apoptotik çekirdek değişikliklerini başlatır ve kaspazı aktive eder. Bonkreik asid ve siklosporin A gibi zar geçirgenlik değişimi baskılayıcıları tarafından bazı apoptoz şekillerinin durdurulabilmesi apoptozdaki rolünün önemini göstermektedir (30).

Sitokrom c mitokondriyal elektron aktarım sisteminin önemli bir parçasıdır. Normalde mitokondrinin iç ve dış zarı arasındaki bölgede yerleşmiştir. Salınımı Bcl-2 proteinleri tarafından düzenlenen ve kaspazların aktivasyonunda gerekli bir kofaktördür. dATP (ya da ATP) ve sitoplazmik faktör Apaf-1 (Ced-4'ün memeli-deki eşdeğeri) ile birlikte sitoplazmaya salınımı Kaspaz-9'un kendini ve sonra cellat Kaspaz-3'ü aktive eder. İnsan Apaf-1 proteini Ced-4'ten daha karmaşık bir yapıdır. Putatif ATP

bağlayan P halkası içeren Ced-4 benzeri uca ek olarak insan Kaspaz-2 ve -9'unun bağlanma bölgesine benzerlik gösteren bir N-ucu vardır. Bu uç CARD olarak adlandırılır (31). Kaspaz-9'un bağlanma bölgesiyle etkileşerek bu kaspazı aktive eder. Apaf-1 içindeki Ced-4 benzeri uç WD bölgesinin 12 ardışık kopyasıyla karboksil ucuna yandan bağlanır. Bu C-uç bölgesi sessiz dönemde Apaf-1'in negatif düzenleyici ucu olarak işlev görür ve Kaspaz-9'a bağlanmayı önler. İnsan Apaf-1 proteini kaspazla etkileşmek için bir aktivasyon basamağı gerektirir. Aktivasyon için gereken bilinen tek mekanizma sitokrom-c'dir (32,33).

AIF ve sitokrom-c salınımı, "membran potansiyel kaybı ( $\Delta\psi_m$ )" ve "membran geçirgenlik değişimi (PT)" gibi işlev bozukluklarına bağlıdır.  $\Delta\psi_m$ 'de kollaps apoptozisin klişe özelliğidir (34). Büyük spesifik olmayan kanal olarak belirtilen geçişi sağlayan por kompleksi (PTPC) mitokondrinin iç ve dış zarlarının birbirine bakan yüzlerine yerleşmiş multimerik bir yapıdır. PTPC dış mitokondri zarında bulunan "Voltaja Bağımlı Anyon Kanalı (VDAC, porin)", 18 kDa mitokondrial benzodiazepin reseptör ve hekzokinazdan, iç zar ve matrikse bakan yüzde yerleşmiş olan "Adenin Nükleotid Geçirgeni (ANT)" ve siklofilin D'den oluşur. Sitokrom c salınımının tam mekanizması bilinmemektedir. İleri sürülen iki teori bulunmaktadır (31,34-36).

İlk teoriye göre apoptoz sırasında sıvı ve eriyikler matrikse girerek mitokondrinin şişmesine neden olur. İç zar çok sayıda kristalleri nedeniyle dış zardan daha büyük bir yüzeye sahip olduğu için matriksin şişmesiyle iç zarın genişlemesi dış zarı parçalar. Zarlar arası bölgedeki içerik sitoplazmaya geri dönüşsüz olarak geçerken iç zar sağlam olduğundan matriks içeriği mitokondride kalır. Fakat apoptoz sırasında mitokondride fizik hasar nadiren tanımlanmıştır ve sitokrom c salınımının nedeni olmaktan çok sonucu olması olasıdır (34,35).

Matriks şişmesi bir modele göre apoptoz sırasında mitokondrial ATP'nin sitozolik ADP'ye değişimindeki yetersizlikten kaynaklanan iç zar hiperpolarizasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu



değişim mitokondri dış zarındaki VDAC ile iç zarındaki ANT yolu ile olmaktadır. VDAC'ın kapanmasıyla ATP-ADP değişiminin bozulması  $F_1F_0$ -ATPaz aktivitesini baskılayarak  $H^+$ 'nin tekrar matrikse girmesini engeller. Mitokondri iç zarı hiperpolarize olur.  $\Delta\psi_m$  azalışı ozmotik matriks şişmesine neden olur. PTPC'nin açılması  $Ca^{2+}$ , adenin nükleotid konsantrasyonunda azalma, inorganik fosfat, reaktif oksijen türleri, pH değişikliği ya da  $\Delta\psi_m$  düşmesi ve Bax tarafından başlatılmaktadır. Ancak sitokrom c salınımının  $\Delta\psi_m$  yokken ya da öncesinde olabildiği gösterilmiştir. Diğer modele göre PTPC açılması elektron transport baskılanması ya da kaspaz aktivasyonu sonucu görülür. Kaspaza bağlı PTPC açılması güçlendirme halkası şeklindedir. İlk sitokrom c salınımı matriks şişmesi, dış zar parçalanması ve kalan sitokrom c ile diğer zar arası proteinlerin sitoplazmaya kaçışını uyarmaktadır (34-37).

İkinci teoriye göre kanallar çözünmüş proteinlerin geçeceği büyüklüktedir. Bu kanalları Bcl-2 ailesinin Bax ve Bad gibi apoptotik üyeleri oluşturabilir. Bu proteinler tek başlarına por oluşumu için yetersiz kalırken Bax'ın oligomerize olması çok yüksek iletkenlikte kanallar oluşmasını sağlayabilir. Ayrıca Bax ve tBid'in fosfolipid tabakaların stabilitesini azaltması mitokondri zarının doğrusal geriliminin azalmasına ve Bax ile tBid'in zar arası proteinlerin sitoplazmaya geçmesine yetecek büyüklükte proteinlipid kompleksleri oluşturmasına neden olabilir. Bir başka olasılık kanal oluşumunda Bax'ın VDAC ile birlikte çalışmasıdır. Bax ve Bad kanal açılmasını başlatırken Bcl- $X_L$  kapanmasını kolaylaştırır (34,35,37,38).

## APOPTOTİK ÖLÜM SİNYALİNİN TANINMASI

Apoptotik sinyallerin en büyük alıcı grubu hücre döngüsünde önemli rolleri olan moleküllerdir. Apoptozu kontrol ettiği en iyi anlaşılmalı olan genler c-myc, p53 ve Bcl-2'dir (39,40). c-myc proteininin yapımı diğer yaşam faktörlerinin varlığına bağlı olarak hücreyi hem çoğaltmaya hem apoptozu götürür. Myc yapımı büyüme faktörlerinin eklenmesi durumunda hücre-

leri çoğalma siklusuna sokar. Büyüme faktörlerinin uyarımı kesildiğinde hücrede büyüme durur ve hücre canlılığını korumaya çalışır. Ancak bu sırada myc yapımı varsa büyüme durmaz, hücre döngüde kalır ve apoptozla ölür. Büyüme faktörleri tarafından baskılanan apoptozu uyarması normal işlevi olabilir, ancak tüm apoptoz şekilleri için gerekli değildir. Myc yapımı hücreyi TNF'ün uyardığı apoptozu daha duyarlı kılar (9,39-42).

Apoptozun iki ana düzenleyicisi p53 ve Bcl-2'dir. Başlangıçta bir onkoprotein olarak belirlendiyse de yabani (wild) p53 proteininin özellikle DNA hasarlanmasına yanıt olarak hücre ölümünü başlatıcı işlev gördüğü açıklık kazanmıştır. 393 aminoasitli bir proteindir. Üç fonksiyonel bölgesi vardır: N-ucunda asidik transaktivasyon bölgesi, merkezinde DNA'ya bağlanan bölge ve C-ucunda tetramerizasyon bölgesi. Pek çok hücresele proteine bağlanan ve gen ekspresyonunda yer alan yabani p53, çevresel şartlara ve hücresele duruma göre hücre döngüsünün kontrolü, DNA tamiri ve sentezi, hücre farklılaşması, genomik şekillenme (plasticity) ve programlı hücre ölümünde görev almaktadır (43,44). DNA hasarlanması olan normal hücrelerde p53 protein düzeyinde belirgin bir artışla hücre döngüsü  $G_1$ 'de bloke olur. Büyümenin durmasından sonra DNA onarımı, hücre DNA'sının çoğaldığı S fazına geçmeden önce tamamlanır. Genom hasarı büyük boyutlarda ise hücre programlı hücre ölümüne girer (45-49). p53 proteini, genomu dönüştürücü etkisi olan mutasyonlardan temizlenene kadar hücrenin S fazına geçişini engellediği için "genom gardiyanı" olarak tanımlanır. p53 proteininin etkinliği gendeki değişikliklerle, kopyalama sonrası fosforilasyon değişikliği ile, hücresele ya da viral diğer proteinlerle etkileşmesi ile etkilenebilir. Mdm-2 denilen bir hücresele proto-onkogeni p53 proteinine bağlanarak kompleks oluşturur. Yüksek mdm-2 konsantrasyonları p53 proteininin gen kopyalama aktivitesini önleyerek onun tümör baskılayıcı işlevini inaktive eder (50-52).

p53 aktivasyonu "sikline bağlı kinaz (cdk)" inhibitörü p21<sup>WAF1/CIP1</sup>'in ve büyümeyi durduran GADD45 geninin kopyalanmasını arttı-

arak hücre döngüsünün durmasına neden olur. Cdk'nın başlattığı hücre döngüsü belirli yapıların fosforilasyonu ile ilerler (53). p21 proteinin artması cdk'nın kendi substratlarını fosforile etmesini önler. Böylece hücre döngüsünün G<sub>1</sub>'den S fazına ilerlemesi durdurulur. p53 geni mutant olan tümör hücrelerinde görülen DNA hasarından sonra hücre döngüsünün G<sub>1</sub>'de durdurulamaması hasarlı DNA kalıbı kullanılarak DNA'nın çoğalmasına yol açar. p53'e bağlı hücre döngüsünün G<sub>1</sub>'de durması için p21 gereklidir. p21 eksik olan hücrelerde DNA hasarından sonra hücre döngüsü normal G<sub>1</sub> evresinde durmaz. p21 mitozun tamamlanması için DNA çoğalmasının (replikasyon) başlangıcına da katılabilir. Bu durumda p21 G<sub>2</sub>/M'de hasarlanan hücrenin DNA çoğalmasının ikinci bölümünün yeniden başlamasını önleme işlevi görebilir. Böylece mitotik değişimi (katastrof) ve hücre ölümünü önler. p53 14-3-3σ kopyalanmasını arttırarak G<sub>2</sub>/M kontrol noktasına katkıda bulunabilir. 14-3-3σ hücre döngüsünün G<sub>2</sub>/M geçişi için gerekli olan cdk'in aktivasyonunu önler (44, 46,50,53).

Bazı hücre tiplerinde p53'ün kopyalama ile Bax yapımını uyardığı görülmektedir (42). Diğer olası kopyalama hedefleri hücre yüzeyi ölüm reseptörleri DR5 ve Fas'tır. p53 tarafından kopyalama ile uyarılan bir diğer gen olan IGF-BP3 insülin benzeri büyüme faktörü-1'e bağlanır ve apoptozu önleyici sinyal oluşumunu önler. p53'ün uyardığı PAG608 geni hücre içine taşındığında hücre ölümüne neden olabilir. Son olarak p53'ün hücre oksidasyonu arttıran bir gen grubunu uyarabildiği belirlenmiştir. Oksidasyon bloke olduğunda p53 kaynaklı apoptozun baskılanması p53'ün apoptozu hücre oksidasyon yolu ile aktive edebildiğini düşündürür (48,54).

Apoptotik mekanizma içinde p53 gerektirmeyen uyarılar da vardır. TNF ve Fas, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanarak kaspazı aktive eder. Ayrıca bir hücre tipinde hücre ölümünü başlatmak için p53 sinyali gerektiren uyarılar bir diğer hücre tipinde p53 gerektir-

meyebilir. Örneğin iyonize radyasyon timositleri öldürmek için işlevsel p53 gerektirirken akciğer mikrodamarlarındaki endotel hücrelerinde p53'den bağımsız olarak lipid sinyal iletim molekülü keramid ile apoptozu neden olur (16).

Hücrenin bir stres sonucu p53'e bağlı hücre döngüsü durması ya da p53'e bağlı apoptoz ile mi yanıt vereceğinin ana belirleyicisi hücre tipidir. Lenfositler DNA hasarından sonra hızla hücre ölümüne gitme eğilimindeyken epitelyal hücreler daha fazla yaşama eğiliminde olup hücre döngüsünü durdururlar. Aynı hücre tipinde bile hücre çevre yaşam ya da ölümü dikte edebilir. IL-3'e bağımlı lenfositlerde DNA hasarı, IL-3 varlığında hücre döngüsü durmasına neden olurken IL-3 olmadığında programlı hücre ölümüne neden olur. Ayrıca sitotoksik strese yanıt genetik şartlara da bağlıdır. E1A ve aktif ras onkogenlerini gösteren fibroblastlarda kemoterapi p53'e bağlı apoptozu uyarırken bu onkogenler olmadığında p53 olmayan fibroblastlar DNA hasarlayan ajanlara daha duyarlı olabilmektedir. Bu çelişki ya bu onkogenlerin yokluğunda p53'ün apoptotik sinyal göndermemesi ya da bu durumda p53 sinyalinin apoptotik mekanizma tarafından algılanamaması ile açıklanabilir. Bu hücre şartlarında p53 ya DNA tamirini kolaylaştırarak ya da endoreduplikasyon sonucu olan hücre ölümünü sınırlandırarak hücreleri kemoterapiden koruyabilir (49,50,55).

Sitotoksik hücrelerdeki granüllerin iki önemli komponenti olan perforin ve serin proteaz granzim B, patojenlerin reseptöre bağlı endositozisine benzer mekanizmayla hedef hücreye aktarıldığında aspartaz olan granzim B prokaspazları aktive ederek ölüm programını başlatır. Perforine bağlı olarak çekirdeğe de geçerek kaspaz substratı olan poli-(ADP riboz) polimeraz, DNA'ya bağlı protein kinaz ve nükleer mitotik aparat proteini gibi proteinleri doğru- dan ve etkin şekilde parçalar. Granzim B hücre bölünmesinde gerekli iki sikline bağlı kinazın (CDK) aktivitesini de (Siklin A-cdc2 ve Siklin A-CDK2) arttırır. Cdc2 aktivasyonunu baskılayan Wee-1'nin, perforin/granzim B'nin başlattığı

apoptozu durdurması nedeniyle granzim B ile karşılaşan hücrelerde apoptozun p34<sup>cdc2</sup> gibi sikline bağlı kinaz aktivasyonu ile başladığı düşünülür. T hücre hibridomlarında aktivasyonun başlattığı apoptoz hücre döngüsünün uzamış p34<sup>cdc2</sup> kinaz aktivasyonu olan G<sub>2</sub> döneminde görülür ve siklin B'yi hedef alan antisens oligonükleotidler tarafından baskılanabilir. Bu hücre ölüm şeklinin başlıca Fas-Fas ligand etkileşimi yoluyla da meydana geldiği gösterilmiştir (56,57). Apoptozda Fas sinyalinin hücre döngüsünce, olasılıkla sikline bağlı kinazlar yoluyla etkilenmesi mümkündür. p34<sup>cdc2</sup> ilişkili bir kinaz olan PITSLRE'nin apoptozdan önce hem Fas sinyali hem glukokortikoidler tarafından oluşturulduğu ve bu kinazın ektopik yapımının apoptozu başlattığı bulunmuştur. Cdc2'nin apoptozu benzeyen mitotik değişimi (katastrofi) başlatabilmesi tüm apoptoz şekillerinin bu molekülün aktivasyonuna bağlı olabileceğini düşündürmüştür. Ancak mitozu durduran Cdc2 defektli hücrelerin yine de çeşitli etkenlere yanıt olarak apoptozu gidebilmesi apoptozda p34<sup>cdc2</sup> yolunun kullanıldığını, ancak bunun hücre döngüsünden bağımsız bir olay olduğunu göstermektedir (19,25,44).

Apoptozu giden endotel hücrelerinde sikline bağlı kinaz inhibitörü olan p21<sup>Cip1/Waf1</sup> ve p27<sup>kip1</sup>'in parçalanması nükleer siklin-CDK2 kompleksini aktive eder. Parçalanmış p21<sup>Cip1/Waf1</sup>'in C-ucu çekirdek yerleşim sinyalini kaybederek çekirdekte çıkması ile CDK2 baskılanması ortadan kalkar. Monosite farklılaşan U937 hücrelerinde nükleer p21<sup>Cip1/Waf1</sup>'in sitoplazmada görülmesi endotel hücrelerinin tersine apoptotik uyarılara direnç gösterir. Sitoplazmik p21<sup>Cip1/Waf1</sup> monositte stresin uyardığı MAPK dizisini baskılayan ASK-1 ile kompleks oluşturur. Monositler hücre içi patojenleri ve hücre dışı kendinden olmayan hedefleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve reaktif oksijen türleri üreterek parçalar. Sitoplazmik p21<sup>Cip1/Waf1</sup>'nin güçlü koruyucu etkisi ile MAPK yolunun baskılanması sonucu diğer hedefleri öldürmeye yetecek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve reaktif oksijen düzeylerinde de monositin yaşaması sağlanır (25,58).

## APOPTOZUN SON AŞAMASI: ÖLÜM MAKİNASI

Farklı organizmalarda çeşitli dokulara ait hücreler önemli oranda benzer şekilsel özelliklerle apoptozu giderler. Bir türde apoptozu düzenleyen genler diğer türlerde de benzer işlevlere sahiptirler. Bu gözlem, evrimsel gelişim sırasında korunmuş, kimi yazarlar tarafından cellat (executioner) olarak adlandırılan bir ana apoptoz makinesi olduğunu düşündürmektedir. Gözlemler bu "cellat"ın sitoplazmada yerleşmiş olduğunu ve çoğu hücrede büyük oranda ya da tam olarak önceden bulunduğunu düşündürmektedir (19,59).

*Caenorhabditis elegans* nematodunda tüm programlı hücre ölümlerinde gereken ced-3 geni memelilerde "İnterlökin 1β Dönüştürücü (converting) Enzim (ICE/Kaspaz-1)" ile benzerlik göstermektedir. Memeli ICE benzeri proteazların ektopik olarak yapılmalarının hücrede apoptozu neden olduğu gösterilmiştir (58,59). Bu proteazlar apoptoz süreci için önemli görünmektedir. Bu proteazları bloke eden peptitler apoptozu durdurabilmektedir (13). Proteazların hücre ölümünde iki rolü bulunmaktadır:

1. Özel hücre bölümlerinde oluşan ölüm sinyallerinin iletimi ve
2. Bazılarının aktivasyonu, bazılarının inaktivasyonu ile sonuçlanan çok sayıda hücrel proteinin parçalanması.

Serin proteaz ailesi başlatma sürecinde rol alırken sistein proteaz ailesi cellat işlevinde bulunur (60). Anayol proteaz dizisini (kaskad) "Kaspazlar (Caspases)" denilen tek bir sistein proteaz ailesi oluşturur (19,32). Bu yol Bcl-2 ailesi ve IAP ailesi gibi hücre ölüm karşıtı proteinler tarafından ters yönde etkilenir. İnsan ve farede ondört kaspaz belirlenmiştir. Bunların 11'i insanda bulunmaktadır (59). Kaspazlar prekürsör (inaktif) zimojen olarak üretilir. Katalitik (p10 ve p20 alt üniteleri) bölge ve N-ucunda bağlanma bölgesi (prodomain) vardır. Aktive olmaları için proteolizle C-ucundaki aspartik asit kalıntılarının ayrılması gerekir. Sıklıkla bağlanma bölgesinin uzaklaşması ile katalitik bölge

iki alt üniteye ayrılır. Ayrılan büyük ve küçük alt üniteler katalitik ünite oluşturmak üzere biraraya gelir. Aktif kaspaz iki p10 ve iki p20 alt ünitesi içeren ve iki aktif bölgesi olan bir heterotetramerdir. Aktif bölge sistein ve histidin uçları büyük alt üniteye, substrattaki aspartatlara bağlanarak parçalanmayı oluşturan arginin uçları ise küçük alt üniteye bulunur. Kaspazlar aspartat bölgelerinden substratlarını parçaladığı ve kendileri de aspartat bölgelerinin parçalanmasıyla aktive olduklarından proteolitik bir şelale başlatma potansiyelleri vardır. Yapı ve işlevlerine göre 3 grupta toplanırlar (59):

1. Başlıca lenfokin yapımında bulunan kaspazlar: Kaspaz-1 (ICE), Kaspaz-4, Kaspaz-5, Kaspaz-11, Kaspaz-12, Kaspaz-13 ve Kaspaz-14. Fakat Kaspaz-1 ve -4 apoptozda da rol oynar;
2. Çeşitli hücre proteinleri parçalayan ve küçük bir bağlanma bölgeleri olan cellat kaspazlar: Kaspaz-3 (CPP32/Yama), Kaspaz-6 ve Kaspaz-7. Bunlara Sınıf II ya da sonuçlandırıcı (effektör) kaspazlar da denilir;
3. Sinyal iletiminde yer alan ve cellat kaspazları aktive eden aktivasyon kaspazlar: Kaspaz-2, Kaspaz-8 (FLICE/MACH), Kaspaz-9 ve Kaspaz-10. Sınıf I ya da başlatıcı (initiator) kaspazlar denilen bu kaspazların uzun bir bağlanma bölgesi vardır. Bu bölgeler CARD ve DED olarak adlandırılırlar. Bu uçlara bağlanacak özel moleküller yoluyla aktive olurlar. Kaspaz-2 ve -9'da CARD bağlanma bölgesi bulunurken Kaspaz-8 ve -10'da DED bağlanma bölgesi vardır. Kaspaz-2'deki CARD aktivasyon için homodimerizasyon gerektirirken Kaspaz-9'daki CARD Apaf-1 ile etkileşir (31). Sitokrom c ve dATP ile oligomerize olan Apaf-1'in inaktif Kaspaz-9 ile etkileşimi Kaspaz-9'da otoaktivasyon etkisi yapar. Kaspaz-8'deki DED bölgesi adaptör proteinlerin DED bölgeleri ile etkileşerek aktive olur ve kaspaz aktivasyon dizisini başlatır (19,32,59).

Kinazları (MEKK-1, PKC, fokal adezyon kinaz, PAK2) ve hücre iskeleti ile ilgili proteinleri (lamin, aktin, gelsolin, gas-2) içeren çok sayıda

hücre proteininin apoptoz sırasında kaspazlar tarafından parçalandığı gösterilmiştir. Çekirdek laminlerinin parçalanmasının çekirdek büzülmesi ve tomurcuklanmaya, hücre iskelet proteinlerinin (fodrin ve gelsolin) parçalanmasının tüm hücre şeklinin kaybına neden olduğu, PAK2'nin kaspaz tarafından parçalanmasının apoptotik hücrede aktif kabarcık oluşturduğu gösterilmiştir (58,61).

DNA'yı parçalara ayıran faktör (DFF) 40kDa (DFF40) ve 45 kDa'lık (DFF45) iki alt üniteye oluşan heterodimerik bir proteindir. Apoptozun aktive olmasıyla DFF Kaspaz-3, Kaspaz-7 ya da Granzim-B tarafından parçalanır ve DFF45 DFF40'tan ayrılır. CAD olarak da adlandırılan DFF40'ın apoptozdaki oligonükleozomal DNA parçalanmasına neden olduğu saptanmıştır. Kromatinle ilişkili proteinler (Histon H1, Yüksek Hareketli Proteinler ve Topizomera II) endonükleaz aktivitesini önemli oranda uyararak DNA'nın parçalara ayrılmasını kolaylaştırırlar. Normalde kendine özgü baskılayıcı olan DFF45'e (ICAD) bağlanarak inaktif halde durur. CAD ve ICAD birer CIDE bölgesi içerir. CIDE-CIDE etkileşimi CAD/ICAD aktivitesinin düzenlenmesinde önemlidir. ICAD'ın aşırı yapımı DNA parçalanmasını önlese de hücre ölümü ve apoptotik şekilsel değişiklikleri önlemez (19,32, 62).

Yeni belirlenmiş olan mitokondriyal apoptotik endonükleaz G (EndoG) mitokondri zarları arası bölgeden sitokrom c salınımına benzer şekilde salınır. Doğrudan çekirdeğe geçerek nükleozomal DNA parçalanmasını sağlar. CAD'ın çift zincirli DNA kırıkları oluşturan endonükleaz aktivitesinden farklı olarak EndoG, tek zincirli DNA'yı çift zincirli DNA'dan daha hızlı parçalar. Ayrıca DFF'nin tersine EndoG'nin mitokondriyal DNA çoğalmasının başlaması için RNA primerleri oluşturan enzimatik aktivitesi de vardır. Çok sayıda apoptotik endonükleaz çeşitli hücrelerde değişik durumlar altında genomun parçalanmasının zamanında ve tam olmasını sağlar. Siklofilinler ve asidik endonükleazlar çekirdek DNA'sını sindirebilir. Uyarılabilen lenfosit  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  bağımlı endonükleaz T hücre apoptozunda görev yapar (62).

Çekirdekte DNA parçalanmasına neden olan diğer iki protein AIF ve acinustur. AIF mitokondriden gelerek kromatin yoğunlaşması ve büyük DNA fragmantasyonu oluşturur. Acinus ise nükleaz aktivitesi göstermeyen, çekirdekte yerleşmiş olan bir DNA koruyucu faktördür. Apoptoz sırasında kaspaz ve serin proteazların parçalaması ile aktive olur (24,58).

## APOPTOZ ÖNLEYİCİLERİ

Apoptotik olayı dengede tutan çok değişik apoptoz baskılayıcıları belirlenmiştir. Baskılayıcıların bir kısmı normalde genomda bulunan genlerdir. Büyüme faktörleri apoptozu önleyici işlev görmektedir. İnsülin kaynaklı büyüme faktörü (IGF-1) antiapoptotik etki gösterir (63). Sinir büyüme faktörü (NGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörünün (PDGF) antiapoptotik etkisi PI3-Kinaz işlevine bağlı görünmektedir (40). PI3-K yolu Akt-serin-treonin kinaz aktivasyonu yolu ile merkezi bir rol oynayarak apoptotik yolda bulunan pek çok proteini fosforile eder. Bad'ın fosforile olarak 14-3-3 proteinine bağlanmasını, Kaspaz-9'un etkisizleştirilmesini, kopyalama faktörlerinden forkhead ailesi üyelerinin 14-3-3 proteinine bağlanmasını sağlayarak Fas ligant gibi ölüm genlerinde kopyalamanın azalmasını, IKK ve IκB5'in parçalanmasını arttırarak NF-κB aktivasyonunu ve yaşamı uyaran genlerin kopyalanmasını, CREB kopyalama faktörü olan Bcl-2'nin kopyalanmasının artmasını sağlar. Büyüme faktörleri Ras iletişim yolunda bulunan MAPK üzerinden pp90 ribozomal S6 kinaz'ı (RSK) aktive ederek CREB'i aktive, Bad'ı inaktive ederler (58,60).

Onkogenik Abl-kinaz şekillerinin yapımı hematopoetik hücrelerde büyüme faktörlerine bağlılığı ortadan kaldırmaktadır. KML'de antisens oligonükleotidler tarafından azaltılan Bcr-abl düzenlenmesi hücreleri toksik ajanların başlattığı apoptozu duyarlı kılmaktadır. Benzer şekilde v-Abl yapımı kemoterapötiklerle apoptozun başlatılmasına direnç geliştirir. Büyüme faktörleri gibi bu apoptotik durum da yeni protein sentezine gereksinim duymamaktadır (19,58,64).

Bir diğer grup viral kaynaklıdır. Virus enfeksiyonları hücrede apoptozu neden olur. Bu viral

yayılmayı önleyen genel ve önemli bir hücre savunma yöntemidir. Virus etkin olarak çoğalmadan önce hücrenin kendini öldürme çabasını önleyen ya da geciktiren antiapoptotik proteinler üretir. İlk kez Baculovirüslerde belirlenen ve benzerleri birkaç vertebralı ve vertebrasız türde de gösterilen bu proteinler Bcl-2 ve IAP ailesine aittir ya da kaspaz baskılayıcısıdır. İnsanda beş IAP ailesi protein bilinmektedir: NAIP, cIAP1, cIAP2, XIAP ve SURVIVIN.65 IAP ailesi proteinlerin en az ~70 aminoasit içeren ve BIR bölgesi olarak adlandırılan bir kopya bölümü vardır. Fakat çoğu IAP ailesi proteinde iki ya da üç BIR bölgesi bulunur. Bazı IAP ailesi proteinlerin (cIAP1, cIAP2, XIAP) Kaspaz-3, Kaspaz-7 ve Kaspaz-9 gibi kaspazların aktif formlarına doğrudan bağlandıkları ve enzimatik aktivitelerini baskıladıkları görülmüştür. Vücudun endojen hücre ölüm proteaz baskılayıcıları olarak hizmet eden IAP proteinlerin tümü cellat kaspazlara bağlanmaz (58,65-67).

Mitokondrial Smac/DIABLO proteini IAP'ların baskılayıcı etkisini fiziksel etkileşimle ortadan kaldırarak apoptozu uyandır. Smac/DIABLO'daki N-ucundaki dizilim BIR'deki uygun yüzü tanır. Smac/DIABLO N-ucundaki mutasyonlar IAP'la etkileşimin olmamasına ve Smac/DIABLO'nun işlevinin ortadan kalkmasına neden olur. Kaspaz-9'un N-ucundaki dizilim de olgun Smac'da bulunan N-ucu ile önemli benzerlik gösterir. Smac'ın kaspaz-9 aktivitesini arttırmasının, kaspaz-9'un bağlayıcı peptidinin BIR3 ile etkileşimini bozarak kuvvetlendirdiği düşünülmektedir. BIR3'e bağlanmayı sağlayan, biri Smac diğeri Kaspaz-9 üzerinde olan iki benzer dizilim kaspaz aktivitesi ve apoptozda zıt etki göstermektedir (47,66,67).

Bazı viruslar Fas ve TNFR kaynaklı hücre ölümden kaçmak için FADD ile ilgili FLIP proteini üretirler. FLIP ve FLAME olarak bilinen protein, aktive edici kaspazlarda bulunan DED'e benzerlik gösterir. Aktive edici kaspazlara ve adaptör protein FADD'a DED bölgelerinin oligomerizasyonu ile bağlandığında Fas'ın aktivasyonunu engelleyerek apoptozdaki proteolitik sürecin başlamasını önler. SV40 büyük T antijeni, HPV-E6 ve Adenovirus E1b 55k p53'ü

bloke ederek apoptozun bazı şekillerini baskılamaktadır. Cowpox virus CrmA proteini serpin proteaz baskılayıcısı olarak işlev görmekte ve ICE ailesi proteazlara özgü baskılayıcı olarak görünmektedir (68).

*C. elegans*'taki benzeri Ced-9 olan Bcl-2 değişik uyarılarla oluşan apoptozu baskılayabilmektedir (13). İlk kez 1985'de B hücreli lenfomada t(14;18) kromozomal translokasyonunda keşfedildiği için Bcl-2 adı verilmiş olmasına rağmen insanlarda görülen kanserlerin yarısında anormal yüksek düzeylerde ve/veya hatalı Bcl-2 proteini yapımı vardır. İnsanda en az 17 Bcl-2 ailesi üyesi vardır. Bcl-2 ailesi proteinler birkaç  $\alpha$ -heliks yumağını içeren benzer protein yapısını paylaşır. Bunlar 4'e kadar numaralanan BH bölgesi olarak adlandırılır. Bcl-2 ile ilgili proteinler yapısal ve işlevsel durumlarına göre 3 grup altında sınıflanırlar (42,58):

1. Bcl-2 alt grubu Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-w'den oluşur, dört bölgeleri (BH1, BH2, BH3, BH4) kuvvetli benzerlik gösterir. Hepsinin antiapoptotik aktivitesi vardır. Proteinin C ucunda zara tutunma bölgesi vardır ve mitokondri dış zarına yerleşirler;
2. Bax alt grubu Bax ve Bak'dan oluşur. BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinde Bcl-2'ye benzerlik gösterirler ve hepsi proapoptotiktir. Yapı olarak bazı bakteriyel toksinlerin por oluşturan proteinlerine benzerlik göstermeleri en azından kısmen hücre içi zarlarda (mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarı) kanallar oluşturma potansiyelleri olabileceğini düşündürür. Bax difteri toksininin yapısal olarak tam benzeridir. Bu toksin, endozomal/lizozomal zarlarda mRNA çevirimini (translasyon) baskılayan adenozin 5'-difosfat ribozile edici polipeptit A alt ünitesinin sitoplazmaya geçmesini sağlayacak büyüklükte kanallar oluşturarak hücreyi öldürür;
3. Bik alt grubu proapoptotik Bik, Bid ve Bim'den oluşur. Bunlar yalnız BH3 bölgeleri Bcl-2'ye benzerlik gösterdiği için BH3 proteinler olarak da adlandırılırlar. Belirgin özellikleri heterodimerler oluşturmaları ve

böylece eşlerinin aktivitelerinin düzenlenmesini sağlamalarıdır.

Bcl-2 işlevleri en azından kısmen protein-protein etkileşimi şeklindedir. Birbirlerine BH3 bölgelerinden bağlanarak dimerize olurlar, homo ve heterodimerler oluştururlar. Bax Bcl-2 ile heterodimerize ve kendisi ile homodimerize olur. Bax hücrede aşırı yapıldığında apoptotik ölüm artarken Bcl-2 aşırı yapıldığında Bax ile heterodimerize olur ve apoptotik ölüm baskılanır. p53 aktive olduğunda Bax yapımını uyarır. Bax proteini de mitokondride yerleşmiştir. Bu durumda antiapoptotik bcl-2 proteinlerinin apoptotik bcl-2 proteinlerine oranı azalır. Mitokondride Bax miktarının artması ile Bax-Bax homodimerleri oluşur. Bu durum, mitokondride por oluşturarak sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı ile Apaf-1 aktivasyonuna neden olur (33). Bcl-XL Bcl-2'ye benzer, apoptozu baskılar. Bak Bcl-2 ailesi üyesidir ve işlevsel olarak Bax'a benzer, Bcl-2 ve Bcl-XL ile etkileşerek onların aktivitesine karşı koyar.

Bad hücre ölüm yolunda diğer Bcl-2 aile bireylerinden farklı rol oynar. Bcl-2 ile etkileşiminden dolayı belirlenmiş olsa da Bad, Bcl-X<sub>L</sub>'ye daha kuvvetli bağlanır ve Bcl-X<sub>L</sub>'nin etkisine kuvvetle, Bcl-2'nin etkisine ise daha zayıf olarak karşı koyar. Bad'ın yalnız BH3 bölgesi vardır. Bu bölge ile Bcl-X<sub>L</sub> ve Bcl-2'ye kuvvetli bağlanması Bcl-X<sub>L</sub> ve Bcl-2'nin tutulmasına, Bax'ın serbest kalmasına, Bax-Bax homodimerleri oluşmasına ve hücre ölümünün gelişmesine neden olur. Hücre Bad'ı fosforilasyon yolu ile kontrol eder. PKB adlı antiapoptotik protein Bad'ı fosforile eder. Fosforile olan Bad 14-3-3 adlı proteine bağlanarak sitoplazmadan uzaklaştırılır ve Bcl-2'ye bağlanamaz. Kalsiyuma bağlı fosfataz olan Kalsinörin Bad'ı defosforile ederek 14-3-3'den ayrılmasına, Bcl-2'ye bağlanarak apoptozun uyarılmasına neden olur (60). Hücresel Bax'ın %50'sinin Bcl-X ya da Bcl-2 ile heterodimerize olduğu hücrelerin apoptoza dirençli olduğu, Bax'ın %80'i homodimerize olduğunda apoptotik sinyalin hücre ölümüne neden olduğunun gösterilmesi Bad'ın Bax'ın heterodimer ve homodimer miktarını değiştire-

rerek hücre ölümünü negatif olarak düzenlediğini düşündürmektedir (42).

Bir diğer BH3 içeren üye Bid'tir. Sitoplazmada inaktif şekilde bulunan Bid, ölüm reseptörleri aracılığı ile uyarılan kaspaz-8 tarafından ikiye ayrılır. C-ucunu kaybeden Bid (tBid), mitokondriye giderek mitokondrielerin çekirdek çevresinde toplanmasına ve BH3 bölümü içeren aktif kısmının Bax'a bağlanmasının oluşturduğu şekilsel değişiklik ile sitokrom-c'nin salınımına neden olur (24,47,67).

Bcl-2 ailesi proteinler apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesindeki rolleri dışında hücre döngüsünün G<sub>0</sub>'dan G<sub>1</sub>'e ilerlemesini baskılama ve bazı nöronların kendini yenileme (rejenerasyon) yeteneklerini artırma aktivitelerine de sahiptir. Bcl-2 ailesinden olmayan ancak Bcl-2'yi bağlayabilen Bag-1, Raf-1 ve SMN gibi proteinlerin Bcl-2'nin aktivitesini arttırdığı bildirilmektedir, ancak bunu nasıl yaptıkları bilinmemektedir (42).

Bcl-2 dağılımı hücre tipine bağlı olarak değişen bir hücre içi zar proteindir. Bcl-2'nin en fazla yerleştiği yerler mitokondri, düz endoplazmik retikulum (ER) ve çekirdek çevresindeki zardır. Mitokondri dış zarı, ER ve çekirdek zarı reaktif oksijen türlerinin yapıldığı yerlerdir. Bcl-2, hücreleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> üreten t-butil hidroperoksid ve menadiona karşı koruyabilir. Düşük konsantrasyonlarda bu oksidan stres, apoptotik süreçle hücreleri öldürür. N-asetil sistein, glutatyon peroksidaz ve desferroksamin gibi reaktif oksijen türlerini azaltan ajanlar apoptoza karşı kısmi korunma sağlayabilir. Bcl-2 butionin sulfoksimin, etakrinik asid gibi hücre içi glutatyonu azaltan ajanların neden olduğu ölüme karşı hücreyi koruyabilir. Bcl-2, oksidatif hasarda görülen ve sıklıkla apoptoza da eşlik eden lipid peroksidasyonunu baskılamaz (32,42).

Bcl-2'nin endoplazmik retikulumdaki yerleşimi ile hücre içi kalsiyum dengesi ilişkilidir. İnter-nükleozomal DNA parçalanmasının Ca<sup>2+</sup>'a bağımlı olması nedeniyle Ca<sup>2+</sup>, apoptozda yer alır. Hücre ölümünün uyarılması ile toplam hücrel Ca<sup>2+</sup> içeriğinin değişmesine de yeniden dağı-

lımı görülür. ER ile ilişkili Ca<sup>2+</sup> pompası baskılayıcısı thapsigargin ile yapılan çalışmalar apoptozun ER'dan sitoplazma içine Ca<sup>2+</sup> salınımı ile ilişkili olduğunu ve Bcl-2'nin ER zarı boyunca bu salınımı durdurabildiğini göstermiştir (32, 69).

Bcl-2 her hücre ölümünü önlemez. Timositlerin negatif seçiminde etkisi yoktur. Sitotoksik T hücreye bağlı apoptozu bazen önleyebilmesi sonuçların doza bağlı olabileceğini düşündürür. Ancak Bcl-2'nin (1) Hematopoetik, lenfoid ve fibroblastik hücrelerde büyüme faktörü kaybı; (2) nöronlarda nörotropik faktörlerin olmaması; (3) ultraviyole ve  $\gamma$ -radyasyon; (4) ısı-şoku (heat-shock); (5) bazı sitotoksik lenfokin tipleri (TNF); (6) kalsiyum iyonoforları; (7) bazı virus tipleri; (8) L-glutamat gibi uyarıcı nörotransmitterler ve (9) serbest radikal yapımını uyarıcı ajanlar ile oluşan hücre ölümlerini engellediği gösterilmiştir. Çok farklı uyarılar ve hücre içi yollardan oluşan apoptozu baskılayabilmesi Bcl-2'nin bu yolların birbirine yaklaşmasından sonra işlev gördüğünü düşündürmektedir. Bcl-2'nin koruyucu işlevleri (1) hücre ölüm durdurucusu olarak işlev görebilmesi için gereken eşleşme proteinlerinin yokluğunda; (2) Bcl-2 proteinini inhibe eden proteinlerin yüksek düzeyde bulunması halinde ve (3) Bcl-2 proteinin işlevlerini bozan çeviri sonrası (post-translational) değişikliklerin uyarılması durumunda yetersizleşir (32,42).

## APOPTOZU BELİRLEME YÖNTEMLERİ

Şekilsel özellikler, apoptozun değerlendirilmesinde en güvenilir yöntemlerden biridir. Ancak değişikliklerin oldukça kısa sürede ortaya çıkması ve tek tek hücrelerde görülmesi yetersiz kalmasına neden olabildiğinden başka belirleme yöntemleri geliştirilmiştir (3,6). Bunların içinde en sık kullanılan DNA agaroz jel elektroforezidir. DNA'nın 180-200 baz çiftinin katları parçalara ayrılmasından ötürü merdiven örneği gösterir. Apoptotik hücrelerin boyutlarının küçülmesi ve azalmış DNA içeriği nedeniyle akım hücreölçerlerde (flow cytometry) hipodiploid (sub-G<sub>1</sub>=A<sub>0</sub>) pik gözlenmesi apoptozun değerlendirilmesini sağlayan bir diğer yöntemdir. Ayrıca parafin kesitlerde terminal deoksitranferaz yoluyla bio-dUTP "nick-end" işaretleme

ve "in situ end" işaretleme yöntemleri geliştirilmiştir. İlkinde terminal transferaz, ikincisinde DNA polimeraz DNA zincir kırıklarında biotinlenen nükleotidlere girer ve işaretlenmiş DNA immünohistokimyasal olarak görülür. Nekrozda da DNA zincir kırıkları görülebildiğinden sonuçların yorumlanmasında dikkatli olmak gerekir (4).

Apoptozun pek çok gen tarafından düzenlendiği, nekrozun ise toksik ya da fizik etkenlerle başlayan pasif dejeneratif bir olay olduğu, Bcl-2 ve kaspaz'ın apoptoza özgü olduğu düşünülmektedir. Bcl-2 ve Bcl-XL'nin hücre solunumunu durdurarak (oksijen azaltılması ya da respiratuvar zincir inhibitörleri eklenmesi ile) başlatılan nekrotik hücre ölümünü baskılaması, tetrapeptid baskılayıcıları ve CrmA içeren kaspaz baskılayıcılarının nekrotik hücre ölümünü geciktirmeleri apoptoz ve bazı nekrotik hücre şekillerinin ana yolları paylaştığını düşündürmektedir (19,32).

Hücre içi ATP düzeyi de hücre ölüm şeklinin belirlenmesinde önemlidir. Apoptoz ATP'ye bağımlı iken nekroz değildir. Bazı ölüm uyarıları ATP varlığında apoptozu uyarır, ATP az ise nekroza neden olur. Kaspaz aktivasyonunun işlevsel akışında sitoplazmik apoptotik etkilicilerin çekirdek içine aktif taşınması ATP'ye bağlıdır. Ancak hangi basamağın ATP'ye bağlı olduğu belirlenmeyi beklemektedir (54).

## APOPTOZUN KLİNİK ÖNEMİ

Apoptozu düzenleyen genlerin karıştığı bazı hastalıklar belirlenmiştir. Folliküler lenfoma ve büyük B hücreli lenfomada t(14;18) kromozomal değişimi Bcl-2'yi aktive etmektedir. Hematopoetik tümörlerde Bax mutasyonları bildirilmiştir (70). Fas ve FasL mutasyonlarının lenfoproliferatif hastalıklara neden olduğu gösterilmiştir (71). Belirgin özelliği alt motor nöron dejenerasyonu olan otozomal resesif geçişli Spinal Muskuler Atrofi (SMA), hücre ölümünü önlemede Bcl-2 ile benzer (sinerjik) ve ona bağlanan bir protein kodlayan Smn geni ile anti-apoptotik aktivite gösteren Naip belirlenmiştir (19). Alzheimer hastalığı, ataksi telenjektazi, lupus eritematozus, Sjögren sendromu, glome-

rulonefrit, polikistik böbrek hastalığı, tip I diabetes mellitus gibi çeşitli hastalıklarda apoptoz bozuklukları bulunmaktadır (10,72).

Apoptoz genetik olarak düzenlenen bir intihar mekanizması olduğundan apoptozun hatalı düzenlenmesi ile ilgili çeşitli hastalıkların apoptotik yolun yapay değiştirilmesiyle tedavi edilebileceği görüşü hakimdir (64,73,74).

Farklı tümörlerde apoptozu düzenleyen biyolojik faktörler çeşitlidir ve tümörün türüne bağlı olarak apoptozun prognozu belirleyici özelliği olabilir (75,76). Bazı tümörlerde tümör dokusunda yüksek düzeyde apoptoz bulunan hastaların sonuçlarının daha iyi olabildiği belirtilmektedir. Tümör hücrelerinin kemoterapi ya da radyoterapi ile ölümleri büyük oranda apoptoz yolu ile olur (77-81,93). Birçok tümörde Bcl-2 yapımının ya da p53 mutasyonlarının tedaviye olumsuz yanıt ile ilişkili olduğu saptanmıştır (52, 73,77,78,82). Bcl-2 yapan tümörlerde bu gene yönelik girişimler hücrelerin çeşitli uyarılara olan direnç eşliğini düşürebilir.

## KAYNAKLAR

1. Mak T. Apoptosis: "Tis death that makes life live". *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:483-8.
2. Kane AB. Redefining cell death. *Am J Pathol* 1995; 146:1-2.
3. Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol* 1995;146:16-9.
4. Cummings MC, Winterfold CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 1997;21:88-101
5. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146: 3-15.
6. Kerr JFR, Winterfold CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-26.
7. Mason RP. Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis. Implications for carcinogenic potential. *Cancer* 1999;85:2093-102.
8. Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissue: An overview. *Cancer Metastasis Rev* 1992;11:95-103.
9. Conroy LA, Alexander DR. The role of intracellular signalling pathways regulating thymocyte and leukemic T cell apoptosis. *Leukemia* 1996;10:1422-35.
10. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993;341:1251-4



11. Homburg CHE, Roos D. Apoptosis of neutrophils. *Curr Opin Hematol* 1996;3:94-9.
12. Giles KM, Hart SP, Haslett C, Rossi A, Dransfield I. An appetite for apoptotic cells: controversies and challenges. *Br J Haematol* 2000;109:1-12.
13. Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: Integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1286-96.
14. Joza N, Kroemer G, Penninger JM. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet* 2002;18(3):142-9.
15. Owens GP, Cohen JJ. Identification of genes involved in programmed cell death. *Cancer Metastas Rev* 1992;11:149-56.
16. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996; 334:1717-25.
17. Rudin CM, Dongen JV, Thompson CB. Apoptotic signalling in lymphocytes. *Curr Opin Hematol* 1996; 3:35-40.
18. Fuller KJ, Issels RD, Slosman DO, Guillet J-G, Soussi T, Polla BS. Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer* 1994;30A:1884-91.
19. Green DR, Martin SJ. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr Opin Immunol* 1995;7:694-703.
20. Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastas Rev* 1992;11:121-39.
21. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 2001;11(9):372-7.
22. Porter AG. Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1999;9:394-401.
23. Nagata S. Fas-mediated apoptosis. In: Gorin N, Foa R, Mannucci PM (eds). "Education Programme 1996 - Meet the Expert Sessions of the 2nd Meeting of the European Haematology Association, 29 May-1 June, Paris, France", Blackwell Science Ltd, Glasgow, 1996:61-2.
24. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 1999;17(9):2941-53.
25. Ivy SP, Lugo TG, Bernstein ML, Smith MA. Evolving molecular and targeted therapies. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds): Principles and Practice of Pediatric Oncology. Fourth edition, Lippincott-Williams&Wilkins, Philadelphia, 2002;pp309-49.
26. Reed JC. Apoptosis and chemoresistance. In: Pui CH (ed): Childhood Leukemias. Cambridge University Press, Cambridge, 1999; pp 255-65.
27. Lucci A, Han TY, Liu YY, Giuliano AE, Cabot MC. Multidrug resistance modulators and doxorubicin synergize to elevate ceramide levels and elicit apoptosis in drug-resistant cancer cells. *Cancer* 1999;86:300-11.
28. Shikata K, Niiro H, Azuma H, Ogino K, Tachibana T. Apoptotic activities of C2-ceramide and C2-dihydroceramide homologous against HL-60 cells. *Bioorg Med Chem* 2003;11:2723-8.
29. Senchenkov A, Litvak DA, Cabot MC. Targeting ceramide metabolism - a strategy for overcoming drug resistance. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(5):347-57.
30. Fennell DA, Cotter FE. Controlling the mitochondrial gatekeeper for effective chemotherapy. *Br J Haematol* 2000;111:52-60.
31. Martin SJ. Dealing the CARDS between life and death. *Trends Cell Biol* 2001;11(5):188-9.
32. Tsujimoto Y. Molecular mechanism of cell death. In: Willemze R, McArthur JR, Kansu E (eds): Educational Program Book 1998. Combined Haematology Congress 27th Congress of the International Society of Hematology, 3rd Congress of the European Haematology Association, Amsterdam, 4-8 July 1998:161-5.
33. Rossé T, Olivier R, Monney L, Rager M, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998;391:496-9.
34. Costantini P, Jacotot E, Decaudin D, Kroemer G. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1042-53.
35. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000;10:369-77.
36. Nasr P, Gursahani HI, Pang Z, Bondana V, et al. Influence of cytosolic and mitochondrial Ca<sup>2+</sup>, ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem Int* 2003;43: 89-99.
37. Cohen I, Castedo M, Kroemer G. Tantalizing Thanatos: unexpected links in death pathways. *Trends Cell Biol* 2002;12(7):293-5.
38. Lepik D, Jaks V, Kadaja L, Värvi S, Maimets T. Electroporation and carrier DNA cause p53 activation, cell cycle arrest, and apoptosis. *Anal Biochem* 2003;318:52-9.
39. Sachs L, Lotem J. Control of programmed cell death in normal and leukemic cells: New implications for therapy. *Blood* 1993;82:15-21.
40. Evan GI, Hancock DC, Littlewood TD, Brown L, et al. Regulation of apoptosis. In: Gorin N, Foa R, Mannucci PM (eds). "Education Programme 1996 - Education Sessions of the 2nd Meeting of the European Haematology Association, 29 May-1 June, Paris, France", Blackwell Science Ltd, Glasgow, 1996:107-9.
41. Oren M. The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis. *Cancer Metastas Rev* 1992;11:141-8.

42. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: A discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 1996;88:386-401.
43. De Benedetti V, Bennett WP, Greenblatt MS, Harris CC. P53 tumor suppressor gene: Implications for iatrogenic cancer and cancer therapy. *Med Pediatr Oncol* 1996;Suppl 1:2-11.
44. Schmid M, Carson DA. Cell cycle regulation and hematological disorders. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U (eds): *Williams Hematology*, sixth edition, McGraw-Hill Company, New York, 2001;pp131-41.
45. Iliakis G. Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. *Semin Oncol* 1997;24:602-15.
46. Malkin D. Regulation of cellular proliferation effects on alteration of normal signaling pathways. *Med Pediatr Oncol* 1996;Suppl 1:20-4.
47. Huang P, Oliff A. Signaling pathways in apoptosis as potential targets of cancer therapy. *Trends Cell Biol* 2001;11(8):343-8.
48. Chen X. The p53 family: same respons, different signals? *Mol Med Today* 1999;5:387-92.
49. Offer H, Erez N, Zurer I, Tang X, et al. The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis* 2002;23(6):1025-32.
50. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: Implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol* 1998;16:3158-68.
51. Chang F, Syrjänen S, Syrjänen K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol* 1995;13:1009-22.
52. Marks DI, Kurz BW, Link MP, Ng E, Shuster JJ et al. Altered expression of p53 and mdm-2 proteins at diagnosis is associated with early treatment failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1997;15:1158-62.
53. Sherr CJ, Roussel MF. Starting and stooing G1 phase. In: Gorin N, Foa R, Mannucci PM (eds). "Education Programme 1996 - Education Sessions of the 2nd Meeting of the European Haematology Association, 29 May-1 June, Paris, France", Blackwell Science Ltd, Glasgow, 1996:110-1.
54. Prokocimer M, Rotter V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: Projection on the hematologic cell lineages. *Blood* 1994;84:2391-411.
55. Lohrum MAE, Vousden KH. Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol* 2000;10:197-202.
56. Squier MKT, Cohen JJ. Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1994;6:447-52.
57. Boise LH, Noel PJ, Thompson CB. CD28 and apoptosis. *Curr Opin Immunol* 1995;7:620-5.
58. Wickremasinghe G, Hoffbrant AV. Biochemical and genetic control of apoptosis. Relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood* 1999;93(11):3587-600.
59. Michalke M, Stroh C, Chlichlia K, Stepczynska A, et al. The emerging role of caspases in signal transduction as a revealed by knock-out studies – not only apoptosis. *Signal Transduction* 2001;1-2:51-65.
60. McCubrey JA, May WS, Duronio V, Mufson A. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia* 2000;14:9-21.
61. Thiele CJ, Kastan MB. Biology of childhood cancer. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds): *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Fourth edition, Lippincott-Williams&Wilkins, Philadelphia, 2002;pp 89-119.
62. Zhang J, Xu M. Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. *Trends Cell Biol* 2002;12:84-9.
63. Schofield PN. The insulin-like growth factors in cell growth and transformation. In: Gorin N, Foa R, Mannucci PM (eds). "Education Programme 1996 - Education Sessions of the 2nd Meeting of the European Haematology Association, 29 May-1 June, Paris, France", Blackwell Science Ltd, Glasgow, 1996:112-5.
64. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis and cancer. *Carcinogenesis* 2000;21(3):485-95.
65. Ditzel M, Meier P. IAP degradation:decisive blow or altruistic sacrifice? *Trends Cell Biol* 2002;12(10): 449-52.
66. Green DR. Apoptotic pathways:Paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 2000;102:1-4.
67. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
68. Thomson U. Viruses and apoptosis. *Int J Exp Pathol* 2001;82(2):65-.
69. Mason RP. Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis. Implications for carcinogenic potential. *Cancer* 1999;85:2093-102.
70. Meijerink JPP, Mensink EJBM, Wang K, Sedlak TW, et al. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood* 1998;91:2991-7.
71. Bleesing JJH. Autoimmune lymphoproliferative syndrome. A genetic disorder of abnormal lymphocyte apoptosis. *Immunol Allergy Clin N Am* 2002;22: 339-55.
72. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003;348: 1365-75.
73. Hannun YA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* 1997; 89:1845-53.
74. Hickman JA. Apoptosis: new vistas for therapeutic intervention? *Oncology in Practice* 1998;1:3-5.
75. Haslam RHA, Lamborn KR, Becker LE, Israel MA. Tumor cell apoptosis present at diagnosis may

- predict treatment outcome for patients with medulloblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998; 20:520-7.
76. Jäckel MC, Dorudian MA, Marx D, Brinck U, et al. Spontaneous apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma is independent of bcl-2 and bax protein expression. *Cancer* 1999;85:591-9.
77. Smets LA. Programmed cell death (apoptosis) and response to anti-cancer drugs. *Anti-Cancer Drugs* 1994;5:3-9.
78. Reed JC. BCL-2: Prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995;9:451-73.
79. Landowski TH, Gleason-Guzman MC, Dalton WS. Selection for drug resistance results in resistance to Fas-mediated apoptosis. *Blood* 1997;89:1854-61.
80. Eischen CM, Kottke TJ, Martins LM, Basi GS, et al. Comparisons of apoptosis in wild-type and Fas-resistant cell: Chemotherapy-induced apoptosis is not dependent on Fas/Fas ligand interaction. *Blood* 1997;90:935-43.
81. Komada Y, Zhou Y, Zhang X, Chen T, et al. Fas/APO-1 (CD95)-mediated cytotoxicity is responsible for apoptotic cell death of leukaemic cells induced by interleukin-2-activated T cells. *Br J Hematol* 1997; 96:147-57.
82. Salomons GS, Brady HJM, Verwus-Janssen M, Van Den Berg JD, et al. The Bax:Bcl-2 ratio modulates the response to dexamethasone in leukaemic cells and is highly variable in childhood acute leukaemia. *Int J Cancer* 1997;71:959-65.

---

**Yazışma adresi:**

Dr. Haldun ÖNİZ  
 SSK Tepecik Eğitim Hastanesi  
 Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği  
 Çocuk Onkoloji ve Kemik İliği Traşspl. Ünitesi  
 35120 Yenışehir / İZMİR  
 Tel: 0 232 469 69 69 / 2301  
 e-mail: halduno@hotmail.com

---

**KISALTMALAR**

AIF	= Apoptosis-Inducing Factor = Apoptozu Uyarıcı Faktör
ANT	= Adenine Nucleotide Translocater = Adenin Nükleotid Geçirgeni
APAF	= Apoptotic Protease Activating Factor = Apoptotik Proteazı Etkinleştiren Faktör
ASK	= Apoptosis Signal-stimulating Kinase = Apoptoz sinyali uyarıcı kinaz
BH	= Bcl-2 Homology = Bcl-2'ye Benzer
BIR	= Baculoviral IAP Repeats = Baküloviral IAP Tekrarları
CAD	= Caspase-Activated Deoxyribonuclease = Kaspazın Etkinleştirdiği Deoksiribonükleaz
CARD	= Caspase Activation and Recruitment Domain = Kaspazı Aktive Eden Bölge
Ced	= Caenorhabditis elegans cell death gene = Caenorhabditis elegans hücre ölüm geni
CIDE	= Cell death-Inducing DFF45-like Effector = Hücre ölümünü Başlatan DFF45 benzeri Etken
CK	= Creatine Kinase = Kreatin kinaz
CREB	= cAMP Responding Element Binding protein = cAMP Cevap Elemanı Bağlayan protein
crmA	= Cytokine Response Modifier A = Sitokin Yanıt Değiştiricisi A
Daxx	= Death-domain-Associated Protein <b>xx</b> = Ölüm ucuyla ilişkili <b>xx</b> proteini
DD	= Death Domain = Ölüm Ucu
DED	= Death Effector Domain = Ölüm Oluşturan Bölge
DFF	= DNA Fragmentation Factor = DNA'yı Parçalara ayıran Faktör
$\Delta\psi$	= Mitochondrial Transmembrane Potential = Mitondri Zarı Geçiş Potansiyeli
DIABLO	= Direct IAP-Binding protein with low pI = Doğrudan IAP'a bağlanan düşük pI'lı protein
DIAP	= Drosophila Inhibitor of Apoptosis Protein = Drosophila Apoptoz Baskılayan Protein
DISC	= Death-Inducing Signalling Complex = Ölümü Başlatan Sinyalleme Yapısı
DR	= Death Receptor = Ölüm Reseptörü
FADD	= Fas Associated Death Domain = Fas'a bağlı Ölüm Bölgesi
FAK	= Focal Adhesion Kinase = Fokal Adezyon Kinaz
FLASH	= FLICE-Associated Huge Protein = FLICE ile İlişkili Büyük Protein
FLICE	= Fas-associated ICE-like protease = Fas ile ilişkili ICE benzeri proteaz
FLIP	= FLICE-Inhibitory Protein = FLICE'yi Baskılayan Protein
IAP	= Inhibitor of Apoptosis Protein = Apoptozu Baskılayan Protein
ICAD	= Inhibitor of CAD = CAD Baskılayıcısı
ICE	= Interleukin 1 $\beta$ -Converting Enzyme = İnterlökin 1 $\beta$ Dönüştürücü Enzim
IKK	= I $\kappa$ B Kinase = I $\kappa$ B Kinaz
JNK	= c-Jun N-terminal Kinase = c-Jun N-ucu Kinazı
MAP	= Mitogen Activated Protein Kinase = Mitojenin Etkinleştirdiği Protein Kinaz
MMP	= Mitochondrial Membrane Permeabilisation = Mitokondri Zarı Geçirgenliği
MORT	= Mediator of Receptor-induced Toxicity = Reseptör Yoluyla uyarılan Toksikite
NF- $\kappa$ B	= Nuclear Factor Kappa B = Çekirdek Kappa B Faktörü
PAK-2	= p21-Activated Kinase-2 = p21 ile Etkinleşen Kinaz
PARP	= Poly-(ADP-Ribose) Polymerase = Poli-ADP-Riboz Polimeraz
PI3-K	= Phosphatidylinositol 3 Kinase = Fosfoinositol 3 kinaz
PKB	= PI3-Kinaz tarafından aktive edilen Akt
PKC	= Protein Kinase C = Protein Kinaz C
PTPC	= Permeability-Transition Pore Complex = Geçiş Sağlayan Por Kompleksi
RAIDD	= RIP Associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a Death Domain = RIP ile ilişkili ICE-1/CED-3 benzeri Ölüm ucu olan protein
RIP	= Receptor Interacting Protein = Reseptörle Etkileşen Protein
Smac	= Second mitochondria-derived activator of caspases = İkinci Mitokondri kaynaklı Kaspaz Aktivatörü
SODD	= Silencer of Death Domain = Ölüm Bölgesi Susturucusu
tBid	= Truncated Bid = Kesik Bid
TNF	= Tumour Necrosis Factor = Tümör Nekroz Faktör
TNFR	= Tumour Necrosis Factor Receptor = Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TRADD	= TNFR Associated Death Domain = TNFR'e bağlı Ölüm Bölgesi
TRAF	= TNF Receptor-Associated Factor = TNF Reseptörü ile İlişkili Faktör
TRAIL	= TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand = TNF'yle İlişkili Apoptozu Uyarıcı Bağ
VDAC	= Voltage Dependent Anion Channel = Voltaja Bağımlı Anyon Kanalı
XIAP	= X-Linked Inhibitor-of-Apoptosis Protein = X'e bağlı Apoptozu Baskılayan Protein