

AKCİĞER KANSERLERİ

Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar adlı kitaptan

Editörler: Prof. Dr. Kayıhan ENGİN ve Prof. Dr. Nihat ÖZYARDIMCI

Bölüm III

Bölüm Yazarı: Dr. Engin ULUKAYA

Hücre Siklusu ve Apoptozis

Giriş: Hücre siklusu, çoğalmak (prolifere olmak) üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Bir sıklusa giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıpa benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar. Hücre proliferasyonu hücre siklusu içinde yer alan bazı kontrol noktaları (“check-points”) tarafından düzenli olarak kontrol edilir. Hücre siklusu proliferasyon, farklılaşma (diferansiyasyon) ve apoptozis gibi temel hücresel fonksiyonları düzenlediğinden büyüme ve doku “turnover”ıyla yakın ilişki içinde bulunur. Bu düzenleme özelliğinin olması organizmadaki hemen hemen her tür fizyolojik (örneğin doku homeostazisi) ve patolojik durumlarda (örneğin tümör oluşumu) hücre siklusunun ne denli kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Nitekim, kanserlerde hücre siklusunun regülasyon proteinleri olan siklinler veya siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI)’nin düzeylerinde anormallikler saptanmıştır. Örneğin, siklin D meme ve skuamöz hücre tümörlerinde aşırı ekspresyona sahiptir. Bir tür CDI geni olan p16 geninin ailesel melanom ve pankreatik kanser olgularında rearanje olduğu bulunmuştur.

Apoptozis, nekrozisten farklı olarak, fizyolojik şartlar altında da meydana gelen ve genel olarak doku homeostazisini sağlayan bir hücre ölüm şeklidir. Apoptozis, son yıllarda terminoloji üzerindeki tartışmalara rağmen, programlanmış hücre ölümü olarak da isimlendirilmektedir. Ayrıca, fizyolojik hücre ölümü veya hücre intiharı olarak da bilinmektedir. Apoptozis ve hücre siklusu birbirleriyle kompleks ve yakın bir ilişki içinde çalışırlar. Örneğin apoptoziste rol alan bir protein olan p53 aynı zamanda hücre siklusunu durduran ve hücreye DNA’sındaki hasarları onarması için zaman kazandıran bir işlev görür. Apoptozis organizmada proliferasyonla (bir diğer anlamda hücre siklusuyla) bir denge halinde birçok dokuda (örneğin deri, ince barsak, kan) doğal olarak oluşur. Şu anda bu paragrafı okurken bile milyonlarca hücremiz apoptozis yoluyla ölmektedir. Fakat buna karşılık olarak milyonlarcası da mitozis yoluyla tekrar yapılmaktadır. Sonuçta, dokunun hücresel içeriği sayısal olarak hep aynı kalır. Böylece doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir harmoni içinde oluşu apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogenezinde rol aldığı gözlenmiştir. Örneğin, bu dengenin apoptozisin hızlanmasına yol açacak biçimde bozulmasının Alzheimer hastalığı gibi bazı nörodejeneratif hastalıkların veya AIDS’in patogenezinde, apoptozisin baskılanmasına yol açacak şekilde bozulmasının ise karsinogenezinde rol aldığı düşünülmektedir.

Bu bölümde hücre siklusu ve apoptozis fazla detaylarına inilmeden incelenecek ve ayrıca bu iki hücresel aktivitenin, genel anlamda kanserle ilişkisi, özel anlamda ise akciğer kanserlerindeki yeri, belirtilecektir.

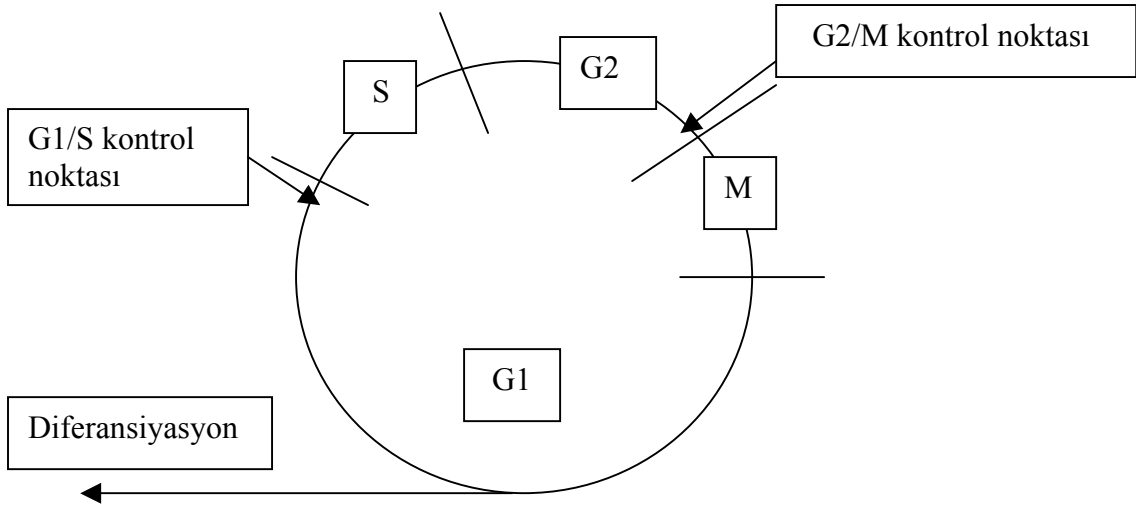
Hücre Siklusu: Bir hücrenin canlılığının göstergesi olan en anahtar noktalardan biri onun birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücreye bölünmesidir. Genel olarak, hücreler bir bölünme sinyali almadıkları sürece hücre siklusunun aktif (G1, G2, S ve M) fazlarına girmezler ve istirahat fazı denilen G0 fazında beklerler. Hücrelerin ikiye bölünmesi mitozis (veya gonadlarda mayozis)'le gerçekleşir. Hücreyi bölünmeye sevkeden sinyaller (örneğin, büyüme faktörleri, sitokinler veya mitojenler) çok çeşitlidir. Hücre bölünme sinyalini aldığı anda sinyal ileti kaskadı "signal transduction cascade" adı verilen bir ileti mekanizması (örneğin, MAP kinaz, Protein Kinaz C veya JAK/STAT yolları) devreye girer. Bu ileti mekanizması ya transkripsiyonu, hücre siklusunu veya hücre iskeletini kontrol eden bir substratı fosforiller yada nukleusa ulaşıp (STAT'da olduğu gibi) doğrudan transkripsiyonu modüle eder. Böylece, hücre siklusa sokularak bölünmeye (mitozise) sevk edilmiş olur. Hücreler mitozise girmeden önce bir hazırlık safhası geçirirler ve bu safhada hücreler hacimce büyürler. Bu hazırlık safhasında bölünme için gerekli olan çeşitli düzenleyici proteinler (Örn. Siklin'ler) ve makromoleküller (Örn. Deoksiribonükleik asit'ler) sentezlenir. Bu hazırlık safhasına da interfaz denir. İnterfaz kendi içinde G1, S, ve G2 olmak üzere çeşitli alt bölümlerden (fazlardan) oluşur. Mitozis ve interfaz beraber hücre siklusu olarak bilinen bir süreci oluştururlar. Dolayısıyla, bir hücre siklusu, fazların işleyiş sırasına göre söylemek gerekirse; G1, S, G2 ve M fazlarından oluşur. G1 ve G2 kısaltmaları "gap" (ara, boşluk) sözcüğünden gelmektedir. S ise DNA sentezi (replikasyonu) fazını gösterir. M ise mitozis anlamına gelmektedir. G0 fazı ise normalde hücre siklusu içinde yer almayan ve siklusunu tamamladıktan sonra siklusa çıkan hücrelerin bulunduğu fazdır. Hücreler bölünme uyarısı aldıkları zaman bu fazdan ayrılıp G1 fazına yani siklusa ilk fazına girmiş olurlar. Bölünmeye devam etmeyip G1 fazından ayrılan hücreler ise diferansiye olmak üzere farklı bir yöne kayarlar (Şekil 1). Hücre siklusunun süresi hücreden hücreye değişir. Sinek embriyosu 8 dakika ile en kısa siklus süresine sahipken insan karaciğer hücresinin hücre siklusu 1 yıldan bile uzun sürebilir.

Hücre siklusu siklusa özgü bir takım proteinler olan siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından özgün olarak kontrol edilir. Siklinler, CDK ve CDI'lerinin düzeyleri hücre siklusunun çeşitli aşamalarında farklılık gösterir ve oldukça komplike bir düzen içinde siklusa ilerlemesini düzenlerler. CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler. Ancak, siklin'e bağlandıklarında aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana gelir. Siklinler bu komplekslerin regülatör subüniteleri, CDK'lar ise katalitik subüniteleridir. Siklinler (A, B1, D ve E) siklusa çeşitli fazlarında periyodik olarak bir taraftan sentez edilirlerken diğer taraftan da yıkılırlar. Bu yüzden de siklinler olarak isimlendirilmişlerdir. Siklinlerin periyodik yapım ve yıkımları, dolayısıyla ilişkide buldukları CDK (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25)'ların aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar. CDK'ların aktiviteleri sadece siklinlerle düzenlenmez ayrıca özgün fosforilasyon/defosforilasyona yol açan başka yollarla da düzenlenir. CDI'leri (p15, p18, p19, p21 ve p27) ise ya siklinler, ya CDK'ların kendisi yada siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe ederler. Siklinlerin seviyeleri transkripsiyon düzeyinde regüle edilir. Yıkımları ise "ubiquitin" metabolik yoluyla sağlanır. D tip (D1, 2, 3) siklinler başlama siklinleri olarak adlandırılırlar ve büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak eksprese edilirler. Mitojenler ortamdaki uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılırlar. Hangi tip siklin D'nin eksprese edileceği doku tipine özgüdür. Örneğin, T lenfositler daha ziyade D3 (bir miktar da D2) tipini eksprese ederler. D tip siklinler CDK4 ve CDK6'yı regüle ederler. Siklin E, G1/S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiği anda hızla yıkılır. Siklin E, CDK2'yi regüle eder. Siklin A ve B1 mitotik siklinlerdir. Siklin A, S fazı boyunca sentez edilir ve anafaz sırasında da yıkılır. Siklin A, CDK2 ile kompleks yapar ve bu kompleksin DNA replikasyonunda direkt

rolünün olduğu düşünülmektedir. Siklin B1 ise S fazının geç döneminde sentez edilir ve G2 fazından M fazına geçerken sentezi maksimal düzeye erişir, ardından anafazda yıkılır. Siklin B, CDK2 ile etkileşime girer ve bu kompleks MPF (“M-phase/maturation promoting factor”) olarak da bilinir. Siklin B’nin anafazda yıkılmasıyla birlikte hücre mitozisden çıkar ve G1’e tekrar geri döner.

Görüldüğü gibi bu proteinler, biyokimyasal olarak ifade etmek gerekirse, birbirleriyle protein:protein kompleksleri (interaksiyonları) oluşturarak birbirlerinin aktivitelerini düzenlerler. Bu aktivitelerin düzenlenmesi, moleküler düzeyde ifade etmek gerekirse, fosforillenme yoluyla gerçekleşir. CDK’lar siklinlerle interaksiyon sonucu aktive olurlarken, CDI’leriyle interaksiyon yapmaları halinde ise inhibe olurlar. CDK’ların aktif formları, substratları fosforilleyerek onları aktif hale getirir (Şekil 2). Böylece substrat aktivasyon durumuna göre hücre siklusu ya durur ya da bir sonraki aşamaya geçer. Bir örnekle açıklamak bu ilişkilerin daha iyi anlaşılabilmesini kolaylaştırabilir. Bunun için, aynı zamanda bir tümör supressör gen olan retinoblastoma geninin ürünü ve aynı zamanda CDK’ların substratlarından biri olan Rb proteini (pRb) örnek olarak verilecektir. pRb hücre bölünmesi ve diferansiyasyonun kontrolünde anahtar bir rol üstlenir. Terminal diferansiyasyonunu tamamlamış, dinlenme fazındaki, veya yaşlı “senescence” hücrelerde pRb eksprese edilir ve defosforile halde bulunur. pRb, normal işlevi gereği hücre siklusunu dolayısıyla proliferasyonu G1 fazının sonunda bulunan bir kontrol noktasında (G1/S kontrol noktasında) durdurur. pRb hücre siklusu üzerindeki bu inhibitör etkisini hücrenin G1 fazından S fazına geçişini sağlayan bir transkripsiyon faktörü ailesi olan E2F ailesini bağlayarak (dolayısıyla inaktifleştirerek) gerçekleştirir. E2F ailesinin inaktifleşmesi sonucu hücre bir sonraki faz olan S fazına ilerleyemeyeceğinden siklus durur. Fakat eğer istirahat yani G0 fazındaki (“quiescence”) bir hücre bölünme sinyali almışsa pRb’nin normalde hemen hemen G1 fazı süresince hipofosforile durumda olan formu G1 fazının sonuna doğru bir yerde (ilk kontrol noktasında, G1/S) CDK’ların etkisiyle fosforillenir ve M fazına kadar fosforile formda kalır. Fosforile durumdaki pRb artık E2F ailesini bağlayamayacağından E2F ailesi pRb’den bağımsızlaşır. Böylece E2F ailesinin siklus ilerletici etkisi sonucu hücre artık G1 fazında kalamaz ve bir sonraki faz olan S fazına girer. E2F ailesi ise etkilerini S fazına girişi sağlayan bir takım regülör proteinlerin (örneğin, DNA polimeraz α , myc, ve timidin kinaz) ilgili genlerini aktive ederek gösterirler. Sonuçta görüldüğü gibi, CDK’ların aktivasyonu veya inhibisyonu pRb ve E2F üzerinden hücre siklusunun ilerlemesine veya durmasına neden olur. CDK’lar tarafından fosforillenmiş substratlar tekrar hipofosforile hale fosfatların da etkisiyle dönerler.

Özetlemek gerekirse, hücre siklusunun çeşitli fazlarında bu üç grubun (siklinler, CDK’lar ve CDI’leri) çeşitli üyelerinin aktivasyonları gerçekleşir. Örneğin, siklin E en yüksek seviyeye G1 fazının geç döneminde; Siklin A ve B ise G2 ve M’de çıkar. Siklin D ise G1 fazının erken döneminde artmaya başlar ve fazın sonuna doğru gittikçe artar. Herbir siklin özellikle spesifik CDK’na bağlanır. Değişik fazlarda spesifik siklinlerin ve CDK’ların varlığı veya yokluğu herhangi bir fazda hangi kinazın aktifleşeceğini belirler. CDK’lar mitojenik büyüme faktörleri tarafından aktifleştirilirler.



Sekil 1: Hücre siklusunun bölümleri

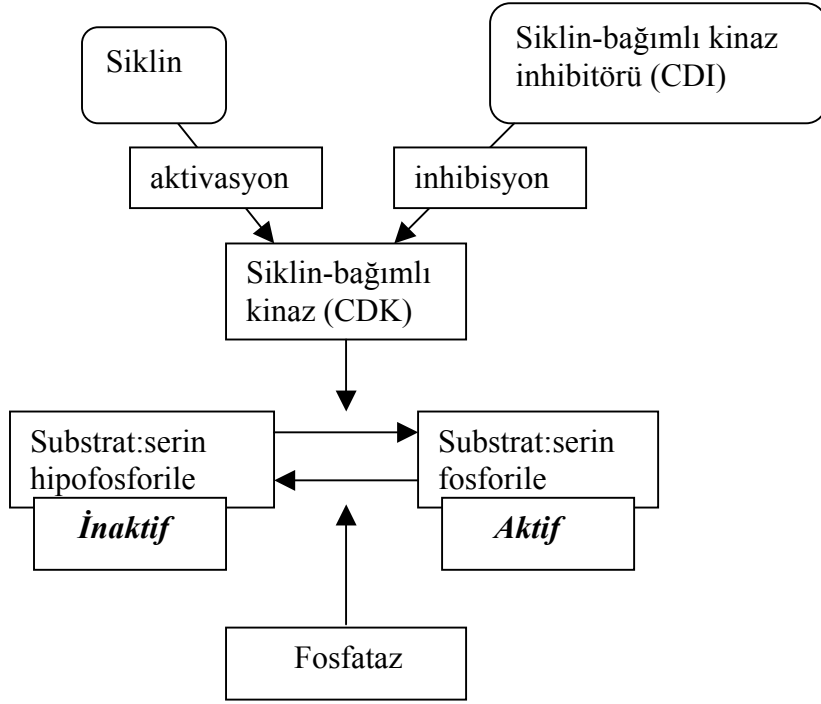
Hücre siklusuna giren bir hücre DNA sentezi yapar, böylece DNA'sını replike eder (ikiye katlar) ve ardından da DNA mitozisle iki yavru hücreye eşit olarak dağılır. Genel olarak, G1 fazı DNA sentezine (S fazına) ve G2 fazı ise mitozise (M fazına) hazırlık fazlarıdır. Bu fazlarda RNA ve protein sentezleri yapılır ve ayrıca hücre kendisini bölünme için yeniden organize eder.

G1 fazı, hücre siklusunun süresi açısından en değişkenlik gösteren fazıdır. Bu fazın süresi siklusun en önemli belirleyicisidir. Bu fazda hücre ya bölünmek, ya diferansiye olmak, ya da ölmek için karar verir ve bazı genlerde değişiklikler başlar. Örneğin, bölünecek hücrede DNA polimeraz veya nükleotid sentezinde gerekli olan dihidrofolat redüktaz gibi bazı enzimlerin genlerindeki aktivasyonları takiben bu genlerin ürünleri G1/S sınırında artmaya başlar. Bu fazda gerçekleşen değişiklikler başlıca c-fos, c-myc ve c-jun gibi transkripsiyon faktörlerinin genlerinde görülür. Bu transkripsiyon faktörleri AP1 bölgeleri olarak da bilinen regulatör DNA dizilerine bağlanırlar. Böylece, AP1 bölgelerini taşıyan genlerin aktivasyonu sonucu siklin ve CDK'ların aktivasyonları sağlanır. Bunlardan c-myc ve c-jun aynı zamanda onkojen olarak da bilinirler. Ayrıca hücre-spesifik bir onkojen ürünü olan c-myb de hematopoetik hücrelerde bu fazda artış gösterir. İnhibitör sinyaller CKI ailesi üzerinden etki gösterirler.

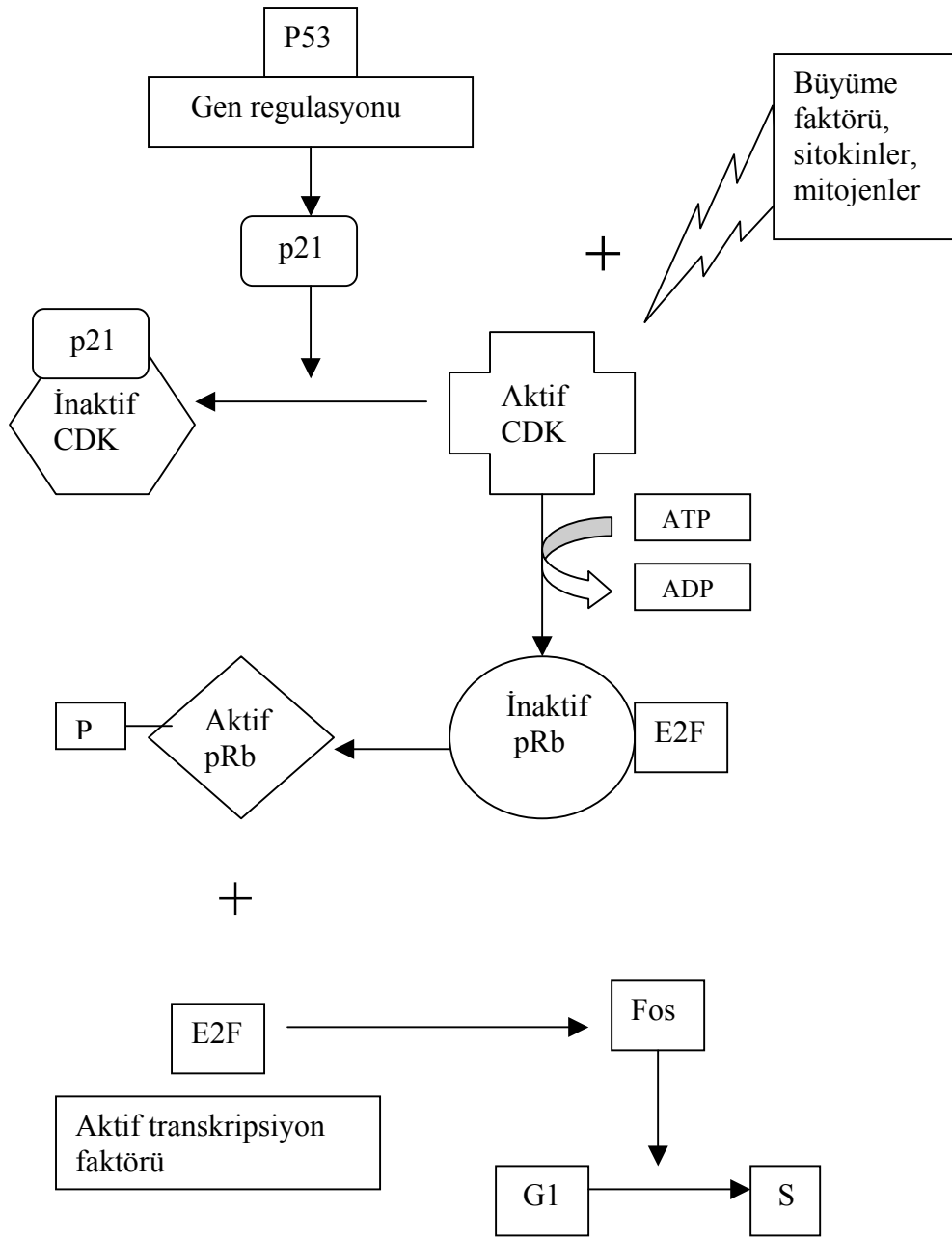
S fazında, hücre DNA'sını replike hızla replike eder. Hızlı olmasının nedeni, DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılması esnasında bazılar, çeşitli ilaçlar veya mutajenler gibi dış ajanların etkisine açık hale gelirler. Bu yüzden DNA sentezi bir kez başladımı hızla bitirilmelidir.

G2 fazında, bir önceki (S) fazda replike olmuş DNA ve kromatin proteinleri kondanse olurlar ve "sister" kromatidler halinde paketlenirler. Tamir mekanizmalarından kaçmış hasarlı DNA veya replike olmamış DNA bu fazda kontrol edilir.

M fazında, "sister" kromatidler düzgün bir şekilde bir hizaya gelirler ve ardından çeşitli aşamalardan geçilerek (profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez) hücre ikiye bölünür. CDK'lar bu fazda da gereklidir.



Şekil 2: Siklin-bağımlı protein kinaz (CDK) sistemi



Şekil 3: p53 ve pRb'nin hücre siklusundaki yerleri

Apoptozis: Apoptozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozisten birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Biyolojik bilimler literatüründe apoptozis terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. Apoptozis veya, daha genel anlamda söylemek gerekirse, hücre ölümü uzun süre araştırmacıların çok ilgilenmedikleri bir alan olarak kalmıştır. Fakat apoptozisin gelişim biyolojisinde, normal doku “turnover”ında ve immun sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları gibi bazı önemli fizyolojik süreçlerdeki rolü ortaya çıktıkça önemi de hızla artmıştır. Üstelik, oto immün bozuklukların, AIDS’in, Alzheimer hastalığının da dahil olduğu bazı major nörodejeneratif bozuklukların ve hatta malignitelerin dahil olduğu daha birçok patolojik durumlarda da rol aldığı anlaşılmıştır. Bu yüzden, son yıllarda yayınlanmış çalışma sayısı açısından bakıldığında, bir şekilde apoptozisle ilgili çalışmaların pik yapmış olduğu görülür.

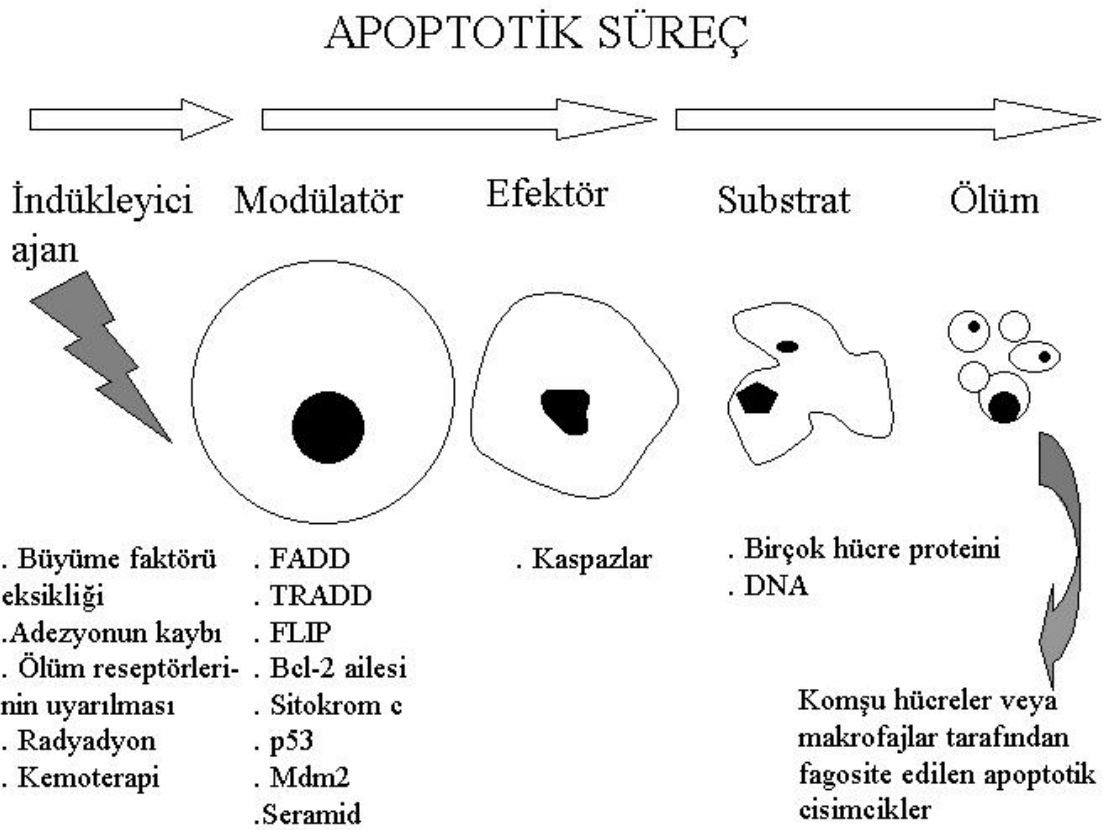
Apoptozis aynı zamanda programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü veya hücre intiharı olarak da bilinir. Her hücre doğar, belli bir süre (hücre tipine göre günlerden yıllara kadar değişen bir süre) yaşar ve sonra ölür. Bu durum fizyolojik olarak her saniye yaklaşık bir milyon hücremizin ölmesiyle bir ömür boyu sürer. Buradaki ölüm mekanizması apoptozisdir. Apoptozisi programlanmış hücre ölümü olarak ifade etmek üzerinde tartışılan bir konu olmasına rağmen sıkça kullanılan bir yaklaşımdır. Apoptozisi anlamak için nekrozisle karşılaştırılarak öğrenilmesi faydalı olacaktır. Bunun için Tablo 1’de nekrozisle apoptozis karşılaştırılmıştır. Tabloda da görüldüğü gibi, nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Diğer bir ifadeyle apoptozis hem sağlıklıda hem de hastalıkta karşımıza çıkmaktadır. Apoptozis normal hücre “turnover”ında rol alan bir hücre ölüm şekli olduğundan lenfositlerin timusdaki klonal seleksiyonunda ve inflamatuvar reaksiyon sonrasında ortamdaki uzaklaştırılmasında, embriyonik gelişim esnasında, deride keratinositlerin yüzeye doğru göç edip epidermisin en üstteki tabakası olan stratum korneum’u oluşturmalarında, barsak kriptlerindeki epitel hücrelerinin “turnover”ında, menstruasyon esnasında uterus duvarında gerçekleşen epitel doku dökülmesinde ve hatta gözde lensin oluşumunda gözlenebilir. Her saniye yaklaşık bir milyon hücremiz apoptozisle vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Ve yapım (mitozis) ile yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogeneze katkıda bulunur. Örneğin, apoptozis bazı viral enfeksiyonlarda (Epstein-Barr, insan papillom virüsü) baskılanabildiğinden, kanser gelişimine katkıda bulunabilir. Ayrıca, oto-reaktif lenfositlerin ortamdaki apoptozisle uzaklaştırılmaması veya geç uzaklaştırılmaları sonucu otoimmün bozukluklar oluşabilmektedir. Oysa, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda veya AIDS’de apoptozisin aktive olmasıyla artmış hücre kayıpları (nöron, T lenfositler) gerçekleşmektedir.

Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken “cell swelling”, apoptotik hücre tam tersine küçülür “cell shrinkage”. Nekrozisde kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır “chromatin aggregation” ve kondanse olur “chromatin condensation”. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepekler “membrane blebs” oluşur. Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere “apoptotik bodies” parçalanır (Şekil 4). Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır değişen miktarlarda nükleus, veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekrozisde hücre içeriği dış ortama salıverildiğinden inflamasyon reaksiyonu uyarılır ama apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz. Apoptozisin en önemli

| ÖZELLİK | NEKROZİS | APOPTOZİS |
|--------------------------------|---|---|
| Yol açan nedenler | İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress | Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması “Senescence” HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress |
| Morfolojik özellikler | Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin “flocculation”u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi | İntakt hücre membranı fakat membranda “bleb”lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücresinin intact mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotic cisimciklere parçalanması |
| Biyokimyasal özellikler | Bozulmuş iyon homeostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4 °C’de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde “smear” görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu(=ölümün geç safhasında) | İyi kontrollu, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 °C’de gerçekleşmez) DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni=apoptozisin en önemli belirteci) Prelitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir) |
| Diğer özellikler | Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur | Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez |

Tablo 1. Nekrozis ve apoptozisin karşılaştırılması. TNRF-1, tumor nekrozis factor reseptörü-1

özgün yönü (“hallmark”) DNA’nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının “ladder pattern” ortaya çıkmasına neden olur. Ama bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilo bazçifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir. DNA’yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleazdır. Ayrıca, DNase I ve II’de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyarının özelliğine göre değişebilir. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin’in erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır “phosphatidylserine translocation”. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar.



Şekil 4: Apoptozisin genel görünümü

Apoptozisin modülör (mediatör) leri: Apoptozis çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (*c-myc*), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı mediatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli **kalsiyum** girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler. Fakat hücreye kalsiyum girişi apoptozisin gerçekleşmesi için esansiyel değildir. **Bcl-2** ailesi, üyelerinin bir kısmının

apoptozisi indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X_l) geniş bir ailedir. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu (“survival”) bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax (ikisinin oranı) bazı hematolojik malignansilerde prognostik markır olarak görülmektedir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir. *Bcl-2* geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bu lenfoma tipinde, Bcl-2 normalden uzun yaşam sürelerine neden olur. Böylece malignite oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bax sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük delikçikler “pore” oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sonuçta sitokrom *c* ve apoptozis-indükleyici faktör olarak bilinen AIF’ün mitakondriden sitozole çıkmasını sağlar. Bcl-2’nin ayrıca mitokondri ile olan ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidan stresin neden olduğu apoptozisi baskılayabildiği bulunmuştur. **Seramid**, membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür. Plasma membran hasarına karşı bir sinyal olduğu düşünülmektedir. **p53**, hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı (“single or double-strand breaks”, nükleotid eksikliği) oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA’sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozisi indükler. p53’ün apoptozisi indüklemesi Bax’ın ekspresyonunu artırması böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Bazı virüsler (insan papillom virüsü, Epstein-Barr virüsü, adenovirüs tip 12) ya p53’ü inaktive ederek ya da Bax’a bağlanarak apoptozisi bloke ederler, böylece bu hücrelerin enfekte ettikleri hücreler doğal hücre ölüm mekanizmasından kurtulduklarından virüsle-indüklenen karsinogenezise bu yolla katkıda bulunurlar. p53 ayrıca bir transkripsiyon faktörü olan Mdm2 (murine double minute 2) tarafından da ya transkripsiyonu “down” regüle edilerek ya da kendisine bağlanılarak hem aktivitesi inhibe edilir hem de yıkımı hızlandırılır. Fakat, DNA’nın hasarlanması halinde p53’ün fosforilasyonu artar ve buna bağlı olarak da Mdm2’den ayrılır, böylece yarılanma ömrü uzadığı için de aktivitesi artar. **Sitokrom c**, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom *c*’nin **mitakondriden** sitoplazmaya saliverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversibl bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom *c*, mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamış bir şekilde mitakondriden apoptozis-indükleyici faktör (“AIF, apoptosis-inducing factor”) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom *c* sitoplazmik protein olan Apaf-1 (“apoptotic protease activating factor-1”)’e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP’nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9’un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3’ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (“ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease”) inaktifleştirir, böylece ICAD’ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (“CAD, caspase-activated deoxyribonuclease”) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. Buraya kadarki mekanizma kaspaz-bağımlı apoptozisi gösterir, oysa kaspaz-bağımsız apoptozisin varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apoptozis yine mitakondriden saliverilen bir faktör olan AIF’ün etkisiyle gerçekleştirilir. Fakat, AIF’ün etkilediği nükleazın ne olduğu henüz bilinmemektedir (Hunot and Flavell, 2001). **Kaspaz (“caspase”)’lar**, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve

çoğu apoptozisde rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)'a neden olurlar. Bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara nakledeleler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim ICE (interlökin 1- β dönüştürücü enzim)'dir ve prokaspaz 1 olarak bilinir. Kaspaz kaskadı, sitokrom *c*'nin sitoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom *c*'nin salıverilmesine neden olabilirler. Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan IAP ("inhibitors of apoptosis")'leri kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar. Bu inhibitörler birçok malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedirler. IAP'leri ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apoptozisi durdurabilirler. Kaspazlardaki defektler otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna katkıda bulunabilir (Kidd ve ark, 2000). Hatta, kaspaz 8'in nöroblastomada tümör süpressörü olarak işlev gördüğü bulunmuştur (Teitz ve ark, 2000). **Granzim** ("Granzyme") ler, patojenle enfekte edilmiş hücrelerin veya tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkin rol alırlar. Perforinler ve granzimler normal olarak sitotoksik lenfositlerin (CTL) ve "natural killer (NK) cell" lerin sitoplazmik granüllerinde bulunurlar. CTL'lerinin hedef hücreye bağlanmasıyla perforinler salgılanır ve hedef hücrenin membranına bağlanarak membranda porlar meydana getirirler. Perforin porlar sitozolik kalsiyum düzeylerinin hızla artmasına yol açar. Beraberinde salgılanan ve bir serin proteaz olan granzimin de bu porlar aracılığıyla hücreye girmesiyle hücre içinde prokaspaz 8'in aktivitesi, dolayısıyla kaspaz kaskadı başlatılır. Bu da enfekte hücreyi (veya kanser hücrelerini) apoptozise götürür.

Apoptozisin indüklenmesi: Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmaları) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunurlar. İlgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL, tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve "natural killer" hücrelerde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein:protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri ("death domain") adı verilen TRADD ("TNFR-1 associated death domain") ve FADD ("Fas associated death domain") ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar. Hücre içinde ayrıca bu ölüm bölgelerini inhibe eden proteinler de bulunmaktadır. Örneğin, kaspaz 8 (FLICE) FLIP ("FLICE-inhibitory protein")'i inhibe eder. Apoptozis yukarıda da belirtildiği gibi genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün aktivasyonu başlatılabilir. Plazma membran hasarına bağlı olarak sfingomyelinaz aktivitesine bağlı olarak seramid oluşumu da apoptozisi başlatabilir. Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stress) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir.

Hücre siklusu ile apoptozisin entegrasyonu: Bu entegrasyonda anahtar faktör bir tümör süpressör gen ürünü bir protein olan p53'dür. Normalde esas fonksiyonu, DNA bir şekilde (radyasyon veya bazı ilaçlar etkisiyle) hasarlandığı zaman, hücre siklusunu (proliferasyonu) durdurup hücrenin hasarlanmış DNA'sını tamir etmesi için ona zaman kazandırmasıdır. Bu

yüzden gen koruyucusu “guardian of the genome” olarak da tanımlanır. p53 bilindiği gibi kanser hastalarında mutasyonu en sık görülen proteindir ve kanserlerin %50-55’inde mutant’dır. p53 normal olarak bir CKI’ü olan p21’in sentezini artırarak proliferasyonu bloke eder. p21, siklin-CDK kompleksini bağlanarak inaktive eder. Böylece, bu kompleks pRb’yi fosforile edemeyeceğinden E2F ailesi de pRb’den ayrılamayacağı için siklus ilerletici işlevini yerine getiremez ve sonuçta hücre siklusu durur (Şekil 3). Hücre siklusunun durması hücreye zaman kazandırır ve hücre hasarlanmış DNA’sını tamir eder. Ama hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse bu kez p53 hücreyi apoptozise götürür.

Hücre siklusu ve apoptozisin akciğer kanserlerindeki önemi: Apoptozis regülasyonunun bozulmasının, eğer hepsinde olmasa da önemli bir kısmında, malign hastalıkların oluşumunda en az artmış proliferasyon kadar büyük önem taşıdığı açıktır (Hoffman and Liebermann, 1994). İlaveten, radyasyonun da dahil olduğu çoğu kemoterapötik ajanların apoptozisi indüklediği de bilindiğinden (Vrdoljak ve ark, 1992; Ojeda ve ark, 1994; Kerr ve Winterford, 1994; Dunn ve ark, 1997) apoptozis ve malignitenin birbiriyle çok sıkı ve kompleks bir ilişkide oldukları yadsınamaz bir gerçektir. Böylece, apoptozisin hücre siklusuyla olan ilişkisi de göz önüne alındığında apoptozis, hücre siklusu ve kemoterapi üçlüsünün aralarındaki interaksiyonlarının kanser hastalarının gerek prognozunu gerekse tedaviye yanıtını belirleyeceğini düşünmek zor olmasa gerektir. Bu anlayıştan yola çıkılarak yapılan çalışmalarda, hastaların apoptozis veya hücre siklusunu ilgilendiren moleküler düzeydeki özelliklerinin prognozla ve tedaviye yanıtla ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Örneğin, Volm ve Koomagi, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tanısı konmuş 150 hastada yapılan bir çalışmada multivaryant istatistik analizi sonucu siklin A’nın en önemli prognostik faktörlerden biri olduğunu göstermişlerdir (Volm and Koomagi, 2000). p53 hemen hemen her kanser türünde çalışılmış olup mutant formlarının eksprese olduğunun saptanması genellikle kötü prognoz göstergesi olarak görülmektedir. Küçük hücreli akciğer kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada da mutant p53 ekspresyonlarının kötü prognoza işaret edebileceği belirtilmiştir (Gemba et al, 2000). p53’ün ayrıca küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde de prognostik faktör olabileceği gösterilmiştir (Langendijk et al, 2000). Bu çalışmada ayrıca, apoptotik indeksin “survival” ile ilişkili tek faktör olduğu da görülmüştür. Hatta, adenovirüsle-yönlendirilen “wild” tip p53 gen ekspresyonunun küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerini radyosensitize ettiği bulunmuştur (Kawabe et al, 2001). Apoptozisi indükleyebilmek bilindiği gibi kanser tedavisinde istenen bir durumdur. Nitekim küçük hücreli olmayan akciğer tümörlerinde yüksek apoptozis düzeyleri daha iyi “survival” değerleriyle ilişkili bulunmuştur (Macluskey et al, 2000). Ayrıca, bu histolojik tipe sahip akciğer tümörlerinde cisplatin, topotekan ve gemitabine gibi antikanser ilaçların apoptozisi indüklerken “caspase-8” aktivasyonu neden oldukları gösterilmiştir (Ferreira et al, 2000). Bunlara ilaveten, Tanaka ve ark. hem apoptozisin hem de p53 durumunun ikisinin birden postoperative adjuvan 5-florourasil uygulamasının etkinliğinin tahmin edilmesinde faydalı faktörler olduğunu göstermişlerdir (Tanaka et al, 2001). Üstelik p53 durumunun apoptozisin ana belirleyicisi olduğu da belirtilmiştir (Gorgoulis et al, 2001). Akciğer adenokarsinomu hücre kültürleriyle yapılan in vitro bir çalışmada, apoptozis baskılayıcı bir protein olan bcl-xL’nin anti-sense tedaviyle baskılanması sonucu apoptozisin indüklediği bulunduğundan, bu yaklaşımın akciğerin adenokarsinomlarının tedavisinde kullanılabileceği önerilmiştir (Leech et al, 2000). Rekombinant adenovirüs kullanılarak eksojen p16 ekspresyonunun küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinin büyümesi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada ise pRb ve anti-apoptotik protein olan bcl-2’nin ekspresyonunun azaldığı bu yolla da hücre büyümesinin baskılandığı bulunmuştur (Kataoka et al, 2000).

Referanslar:

Dunn SE, Hardman RA, Kari FW, Barret JC. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) alters drug sensitivity of HBL100 human breast cancer cells by inhibition of apoptosis induced by diverse anticancer drugs. *Cancer Res* 57:2687-2693, 1997

Ferreira CG, Span SW, Peters GJ, Kruyt FAE, Giaccone G. Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. *Anticancer Res* 60:7133-7141, 2000

Gemba K, Ueoka H, Kiura K, Tabata M and Harada M. Immunohistochemical detection of mutant p53 protein in small-cell lung cancer: relationship to treatment outcome. *Lung Cancer* 29:23-31, 2000

Gorgoulis VG, Zacharatos P, Mariatos G, Liloglou T, Kokotas S, Kastrinakis N, Kotsinas A, Athanasiou A, Foukas P, Zoumpourlis V, Kletsas D, Ikonomopoulos J, Asimacopoulos PJ, Kittas C, Field JK. Deregulated expression of c-mos in non-small cell lung carcinomas: Relationship with p53 status, genomic instability, and tumor kinetics. *Cancer Res* 61: 538-549, 2001

Hunot S and Flavell RA. Death of a monopoly?. *Science* 292: 865-866, 2001

Kataoka M, Wiehle S, Spitz F, Schumacher G, Roth JA, Cristiano RJ. Down-regulation of bcl-2 is associated with p16(INK4)-mediated apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 19: 1589-1595, 2000

Kawabe S, Munshi A, Zumstein LA, Wilson DR, Roth JA, Meyn RE. Adenovirus-mediated wild-type p53 gene expression radiosensitizes non-small cell lung cancer cells but not normal lung fibroblasts. *Int J Rad Biol* 77: 185-194, 2001

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis:a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257, 1972

Kerr JF and Winterford CM. Apoptosis. its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:2013-2026, 1994

Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T. Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* 11:191-201, 2000

Langendijk H, Thunnissenb E, Arendsc JW, Jonga JD, Velded GT, Lamerse R, Guineef D, Holdenf J and Woutersd M. Cell proliferation and apoptosis in stage III inoperable non-small cell lung carcinoma treated by radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* 56: 197-207, 2000

Leech SH, Olie RA, Gautschi O, Simoes-Wust AP, Tschopp S, Haner R, Hall J, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. Induction of apoptosis in lung-cancer cells following bcl-xL anti-sense treatment. *Int J Cancer* 86:570-76, 2000.

Macluskey M, Baillie R, Chandrachud LM, Pendleton N, Schor AM. High levels of apoptosis are associated with improved survival in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 20:2123-2128, 2000

Ojeda F, Diehl HA, Folch H. Radiation induced membrane changes and programmed cell death: possible interrelationships. *Scanning Microsc* 3:645-651, 1994

Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Yamada T, Miyahara R, Kawano Y, Li M, Inui K, Wada H. Apoptosis and p53 status predict the efficacy of postoperative administration of UFT in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 84: 263-269, 2001

Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ. *Nat Med* 6:529-35, 2000

Vrdoljak E, Bill CA, Stephens LC, Van Der Kogel AJ, Ang KK, Tofilon PJ (1992) Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes *in vitro*. *Int J Rad Biol* 62:475-480

Volm M and Koomagi R. Relevance of proliferative and pro-apoptotic factors in non-small cell lung cancer for patient survival. *Br J Cancer* 82:1747-1754, 2000.