

Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması

Devrim Öz Arslan¹, Gözde Korkmaz², Devrim Gözüağık²

¹Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Sabancı Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Biyolojik Bilimler ve Biyomühendislik Programı, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Otofaji uzun ömürlü proteinlerin, organellerin ve sitoplazmik parçacıkların parçalanmasından sorumlu fizyolojik bir fenomendir. Otofaji, lizozomal parçalanmadan sonra hücresel geridönüşümü sağlar ve hücrenin açlık, büyüme faktörü yokluğu ve oksidatif stres gibi çeşitli koşullarda hayatta kalmasına yardımcı olur. Paradoksal olarak bazı koşullar altında otofaji hücreyi kaspaz bağımsız yolak üzerinden, apoptotik olmayan hücre ölümüyle, öldürebilmektedir (Tip II hücre ölümü ya da otofajik hücre ölümü). Birçok veri, klasik apoptoz ile otofaji arasında doğrudan bir bağlantı olduğunu işaret etmektedir ve bu bağlantı moleküler düzeyde aydınlatılmaya başlanmıştır. Apoptoz ve otofaji arasındaki karşılıklı etkileşim oldukça karışık gibi gözükmektedir. Fakat bu alandaki araştırmalar kanser, enfeksiyonlar ve nörodejenaratif hastalıklar gibi sağlık problemleri için yeni tanı, takip ve tedavi yöntemlerine yol açma potansiyeli nedeniyle çok büyük önem arz etmektedir.

Anahtar sözcükler: Otofaji, apoptoz, hayatta kalım, sinyal iletimi.

AUTOPHAGY: A CELLULAR STRES AND CELL DEATH MECHANISM

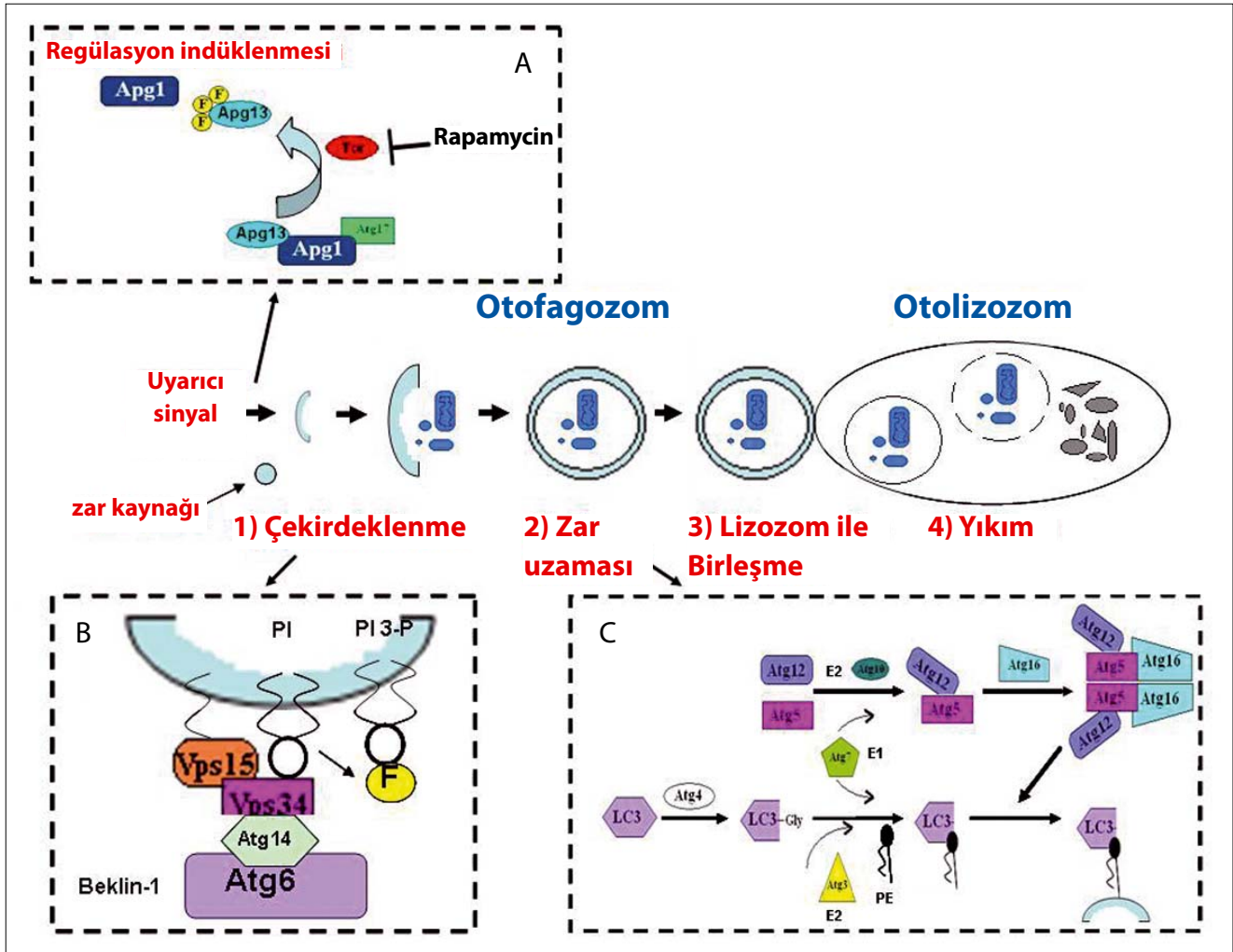
ABSTRACT

Abstract: Autophagy is a physiological phenomenon responsible for the degradation of long-lived proteins, organelles and cytoplasmic fragments. It allows cellular recycling following lysosomal degradation and helps the cell to survive various stress conditions including starvation, growth factor and oxidative stress. Paradoxically, under certain conditions autophagy may kill the cell through a caspase-independent, non-apoptotic type of cell death (Type II cell death or autophagic cell death). Several lines of evidence point out to a direct connection between classical apoptosis and autophagy. Molecular mechanisms of apoptosis-autophagy connection start to be unraveled. The cross-talk between autophagy and apoptosis seems quite complex but certainly is critical for the development of novel diagnosis, follow-up and treatment modalities in health problems such as cancer, infections and neurodegenerative diseases.

Key words: autophagy, apoptosis, cell survival, signal transduction

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır. Kısa ömürlü proteinlerin ubiquitin-proteozom sisteminde parçalanmasına karşın, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofaji sistemi tarafından parçalanırlar ve oluşan yapı taşları (Örn. aminoasitler) hücre kullanımı için yeniden kazanırlar (1,2). Otofaji, kelime anlamı olarak kendi kendini (*auto*) yeme (*phagy*) anlamına gelir ve hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyolojik koşullarda, besin elde etmek için

hücre içindeki yapıları nasıl parçalandığını ifade etmek amacı ile kullanılmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre homeostazisinin korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir (1,2). Son on yılda yapılan çalışmalar ise otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sistemin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığını ortaya koymuştur (2,3). Ayrıca araştırmalar, otofaji anormalliklerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejenaratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını göstermektedir (4).



Şekil 1. Otofajik kesecik oluşumunda rol oynayan mekanizmalar. **A.** mTor kompleksi; **B.** Lipid kinaz Vps34, düzenleyici enzim Vps15 ve Atg6'dan (Beclin) oluşan PI3K kompleksi; **C.** İki ubikitin benzeri mekanizmanın rol oynadığı zar uzaması.

Otofaji; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılıklı otofaji şeklinde en az üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlardan makrotofaji, pek çok hücrede bazal düzeyde oluşmakta, protein parçalarının ve hasar görmüş organellerin parçalanmasında en önemli rolü üstlenmektedir. Mikrotofaji, lizozom membranının içe çökmesi ile sitoplazmanın lizozom tarafından doğrudan yenilmesi ve içeriğinin lizozom içinde hazmedilmesidir. Şaperon aracılıklı otofaji ise KFERQ motifli proteinlerin lizozom zarına seçici biçimde taşınmasını sağlamaktadır (5). Bu derlemede makrotofaji mekanizmalarına yoğunlaşılacaktır. Bu nedenle, derlemede otofajiden bahsedildiğinde kastedilen makrotofajidir.

Otofaji mekanizmalarında rol oynayan proteinlerin çoğu "otofaji ile bağlantılı proteinler" (Autophagy-related proteins) ya da kısaca Atg proteinleri mayada yapılan çalışmalar

sonucunda bulunmuş ve günümüzde 30'dan fazla Atg geni tanımlanmıştır (5). Atg proteinlerinin bir kısmı ve çeşitli protein kompleksleri "otofajik kesecik" ya da bir başka deyişle "izolasyon membranının" ve otofagozom oluşumunda rol oynamaktadır. Hücrede otofagozomlar "otofaji oluşum merkezi" (Preautophagosomal structure, PAS) adı verilen ve memelilerde endoplazmik retikulum ile golgi yapılarının aralarına serpiştirilmiş olan yapılarda ortaya çıkarlar. İzolasyon membranının kaynağı tam belli olmasa da en çok kabul edilen model bunun yeni sentez edildiği ya da endoplazmik retikulum, mitokondri dışı membranı ve plazma membranından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (6). Bu temel moleküler mekanizma Atg1-Atg13-Atg17 kinaz kompleksi; sınıf III fosfoinositol 3 fosfat (PI3F) kinaz, Vps34'ün aktivitesini düzenleyen Atg6 protein (memelilerde Beclin-1) kompleksi; iki ubikitin benzeri sistem ve Atg9 ve döngü sistemi olarak dört basamakta özetlenebilir (7). PI3F'in görevi, kendisine bağlanma

özelliğine sahip ve kesecik oluşumunda rol oynayan proteinleri ve protein gruplarını PAS'a yönlendirmektedir. Bu şekilde çekirdeği oluşan otofagazom membranının uzaması ve kesecik halini alması ise iki übikitinlenme benzeri sistem tarafından kontrol edilmektedir. Bunlardan birincisinde, Atg12 proteininin Atg5 proteinine kovalent olarak bağlanması katalize edilir. Ardından Atg12'ye bağlanmış Atg5, Atg16 ile de birleşerek izolasyon membranının dış yüzeyine bağlanır (Şekil 1). İkinci übikitin benzeri sistemde ise, biyolojide az rastlanan bir reaksiyonla, Atg8 (memelilerde MAP-LC3 ya da kısaca LC3) proteininin, bir fosfotidiletanolamin (FE) yağ molekülüne kovalent olarak bağlanması söz konusudur. Atg12-Atg5-Atg16 kompleksi, Atg8/LC3'ün FE'ye bağlanması için gereklidir. Bu bağlanmanın olabilmesi için, Atg8 ya da LC3'ün C-ucundaki beş aminoasitin Atg4 proteazı tarafından kesilmesi ve sondan 6. aminoasit olan glisinine ortaya çıkarılması gerekmektedir. FE molekülü, bu glisine bağlanmaktadır. Atg8/LC3'ün FE'ye bağlanması, PAS'a zar taşınması ve burada zar uzaması için gerekli bir olaydır. Ayrıca Atg4, kesecik oluşumu sonrasında görevi tamamlanan LC3 proteinlerini yağdan kopararak yeniden kullanılmasına yol açmaktadır (1, 2, 5). Atg9 ve döngü sistemi otofajik zardan otofagozom oluşumunda rol oynamaktadır (7). Bir başka deyişle, otofaji ile ilgili proteinlerin çoğu, otofajik zarları oluşumunda ve bunların uzayarak kesecik haline gelmesinde görev yapmaktadır. Otofagozom daha sonra geç endozom veya lizozomla birleşerek taşıdığı kargonun parçalanmasına yol açar (Şekil 1). Lizozomal enzimler tarafından kargonun yıkımı sonrasında, kargo (proteinler, organeller vb.) ortaya çıkan yapıtaşları (örn. aminoasitler, yağ asitleri, vb.) tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılır (1, 2, 5-7).

Otofajinin regulasyonu

Açlık, hipoksi ve çeşitli stres koşulları, hücredeki otofajik aktiviteyi uyarmaktadır. Otofajik aktivitenin kontrolünde, Tor protein kompleksi önemli bir rol oynamaktadır. Tor, ilk olarak mayada mantara karşı kullanılmak üzere geliştirilmiş bir ilaç olan rapamisinin hedefi olarak ortaya çıkarılmış ve ünlenmiştir. Aslında Tor, hücrede protein sentezi ve hücre büyümesini kontrol eden bir kinazdır. Bu proteinin baskılanması, hem mayalarda hem de memelilerde otofajiyi aktif hale getirir. Açlık benzeri stres durumlarında, protein sentezini yönlendiren bir mekanizmanın bloke olmasının, protein yıkımı ile ilgili bir hücresel olay olan otofajinin aktivasyonu ile birlikte regüle olması mantıklı görülmektedir. Zira besinin bol olduğu koşulda maya Tor proteini, otofaji proteinlerinden biri olan Atg13'ü fosforile etmekte ve otofajiyi baskılamaktadır. Açlık durumunda ise Tor aktivitesinin düşmesi sonucunda Atg13 defosforile

olarak otofaji ile bağlantılı Atg1 adlı serin treonin kinaza bağlanmaktadır (Şekil 1). Atg1 kinazının aktivasyonu direkt olarak otofajinin uyarılmasına neden olmaktadır (8). Memelilerde bu kompleksin karşılığı ULK:Atg13: FIP200 (200 kDa fokal adezyon kinaz ailesi ile etkileşen protein) proteinleridir. Çok yakın zamanda ULK1 ve ULK2 proteinlerinin mTor kinaz ve AMPK (Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz) ile direkt etkileşerek ve memelilerde otofajinin başlamasına eşlik ettiği gösterilmiştir (9). Bu durumun aksine Tor yolağında yer alan proteinlerden ribozomal S6 proteininin hedefi olan S6K proteininin fosforilasyonu ise otofajinin baskılanmasının bir işaretidir (10).

Sınıf I fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K)/ protein kinaz B (Akt/PKB), mitojenik uyarılara yanıt sonucu hücre büyümesinin kontrolünde en etkili sinyal yollarından birisidir (11). Sınıf I PI3K, PI (3,4)P₂ fosfat ve PI (3,4,5)P₃ oluşumunu sağlamakta ve bu ürünler Akt/PKB yolağının aktivasyonuna neden olmaktadır (12). Aktif haldeki Akt de Tor'u aktive ederek otofajiyi bloke etmektedir. Bir tümör baskılayıcı protein olan PTEN ise PI3K/Akt yolağı ile ters yönde çalışarak otofajinin artırılmasında görev yapmaktadır. Nitekim PTEN molekülünde meydana gelen mutasyonların otofajiyi baskıladığı gösterilmiştir (13). Yukarıda bahsedilen PI3K'lardan farklı bir kinaz olan sınıf III PI3K Vps34 ve ürünü PI3-fosfat'ın otofajinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı yine ilk olarak mayada gösterilmiştir. Mayada PI3K kompleksinin görevi, PI3K Vps34'ün aktivitesini düzenlemektir. PI3K kompleksi, Atg6 (memelilerde Beclin-1), Atg14, Vps15 ve PI3K Vps34 proteinlerinden oluşmaktadır ve daha önce de bahsedildiği gibi, PI3K bağlayıcı proteinlerle otofajik keseciği oluşumunu başlatmaktadır (Şekil 1). Memelilerde, Vps34 aktivitesini düzenleyen Ambra1, Bif-1, UVRAG, Rubicon gibi proteinler de PI3K kompleksinin birer üyesidirler (7). PI3 kinaz kompleksinin otofaji için gerekli olmasından dolayı, PI3K inhibitörü bir ilaç olan 3-metiladenin (3MA) yaygın olarak kullanılan bir otofaji inhibitörüdür (14). PI3 kinaz inhibitörleri hem sınıf I ve sınıf III PI4-3 kinaz enzimlerini inhibe etmekte ve böylelikle hem otofaji hem de S6 fosforilasyonunu azalmaktadırlar (6,7). Tüm bunlara ek olarak, yakın zamanda otofagozomal zar oluşumunda LC3 molekülü ve WIPI (Fosfoinositit ile etkileşen WD-tekrarı olan protein, mayadaki karşılığı Atg18) proteinlerinin PI3 kinaz kompleksi tarafından oluşturulan PI3'e bağlandığı ve mTOR'un yolağı ile etkileştiği bildirilmiştir. WIPI proteini hücrede otofajinin izlenmesi için de bir yöntem olma niteliği taşımaktadır (15).

Özellikle HT-29 kolon kanser hücrelerinde, Ras/Raf-1/ERK1/2 sinyal yolağı ve golgi/endoplazmik retikulum zarında bulunan heterotrimerik G proteinleri, otofajiyi

düzenleyen mekanizmalardan biri olarak tanımlanmıştır. Bu yolla, aminoasit yokluğunda Raf-1 aktive olarak ERK1/2 fosforilasyonunu sağlamaktadır. Gai3 gibi GTP bağlayıcı proteinler, hücre içinde moleküler anahtar görevi görmektedirler. GTP veya GDP'ye bağlı hallerde farklı hücresel olayları kontrol edebilmektedirler. Burada ise, Raf-1 tarafından fosforile olan ERK1/2, Gai3 altbirimi için GTPazı aktive eden bir protein olan GAIP proteininin uyarılmasına neden olmaktadır. GAIP, Gai3'ye bağlı GTP'nin hidrolizine ve guanozin 5'difosfat (GDP) bağlı formunun stabilizasyonuna yol açmaktadır. GDP-Gai3'nin, otofajinin uyarılmasında önemli olduğu gösterilmiştir (16).

Memeli hücrelerinde bir başka otofaji kontrol mekanizması olarak protein çevirisiyle (translation) ilgili proteinler ön plana çıkmaktadır. Mesela, besin yokluğunda ökaryotik başlatıcı faktör'ün (eIF2 α) fosforillenmesi, protein translasyonunu ve otofajiyi aktive etmektedir. eEF2 kinazın da otofaji kontrolünde rol oynadığına dair kanıtlar giderek artmaktadır (6).

Bazı onkogen ve tümör süpresör proteinlerin de otofajinin düzenlenmesinde rol oynadığı gözlenmiştir. Örneğin, ölümle ilişkili protein kinazlar olan DAPk protein ailesinin kanser hücrelerinde yüksek oranda ifadesi otofajiyi artırmıştır ve hücre ölümüne yol açmıştır (17).

Hücre ölümü ve otofaji

Otofajinin çoğunlukla hücrenin hayatta kalımı ile ilgili bir mekanizma olduğu düşünülmüşse de son yıllardaki çalışmalar otofaji, hücre hayatta kalımı ve ölümü arasında karmaşık bağlantılar bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Otofaji, uyarana ve deney sistemine bağlı olarak hücrenin yaşamını sürdürmesine ya da ölümüne neden olabilmektedir.

Yakın zamana kadar hücre ölümü denilince akla iki morfolojik ve moleküler tanım gelmekteydi. Apoptoz, genetik olarak programlı hücre ölümü olarak tanımlanmıştı. Bunun karşılığı olan ve "rastlantısal" olarak ortaya çıkan, "programsız" hücre ölümüne nekroz denilmekteydi. Son on yılda ulaştığımız bilgi birkimi, en az yedi çeşit programlı hücre ölümünün varlığına işaret etmektedir. Bu nedenle, artık apoptoz terimi programlı hücre ölümüyle eş anlamlı olarak kullanılmamaktadır. Alternatif programlı hücre ölüm mekanizmalarından biri olan otofajik hücre ölümüne ilgi, maya otofaji genlerinin memeli karşılıklarının bulunması ve çalışmaların morfolojik tanımlardan moleküler düzeye inmeye başlaması sayesinde artmış; sonuç olarak, otofaji, apoptoza ek veya alternatif olarak düşünülen temel ölüm yollarından birisi haline gelmiştir.

Programlı hücre ölümü morfolojilerinin tanımlanması

Hücre ölümünü morfolojik olarak inceleyen Swhweichel ve Merker'in ilk çalışmalarına ek olarak Clarke, 1990 tarihli makalesinde doğal gelişimsel hücre ölümü ve toksin uygulanması sonrası oluşan hücre ölümünde, temel üç hücre morfolojisinin varlığından bahsetmiştir (18, 19). Clarke, apoptozu tip I, otofajiyi tip II, lizozomal olmayan hücre ölümünü ise tip III programlı hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Tip III hücre ölümleri arasında en az çalışılan türdür ve bu yazının konusu dışındadır.

Apoptoz, hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve sonunda hücrenin "apoptotik cisim" adı verilen parçacıklara ayrılması özellikleriyle ayırt edilmektedir (19). Kaspaz adı verilen proteazlar, bu tip hücre ölümünün önemli bir aracı olup, hücrede gözlemlenen birçok morfolojik değişiklik, kromatin DNA'sının ve hücre yaşamı için önemli proteinlerin bu proteazlar tarafından kesilmesine bağlanmıştır. Bunun sonucunda oluşan hücre parçacıkları olan "apoptotik cisimlerin" (apoptotic bodies) son durakları, profosyonel hücreler ve komşu hücrelerce tarafından fagositoz sonucu, başka hücrelerin lizozomları olmaktadır.

Tip II programlı hücre ölümü olan otofajik hücre ölümünde en belirgin morfolojik değişiklik, sitoplazmada oluşan iki veya daha fazla katmanlı zarla (üst üste iki veya daha fazla yağ çift katmanı (lipid bilayer)) çevrili keseciklerin oluşmasıdır. Bu kesecikler sitoplazma parçaları ve/veya mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) gibi organelleri içerirler. Bu nedenle otofajik kesecikler elektron mikroskopisinde, taşıyıcı kesecikler (transport vesicles) ve stres keseciklerinden farklı olarak "elektron yoğun" (electron dense) olarak gözlenirler. Sonunda otofaji kesecikleri lizozoma kaynaşır, içlerinde taşıdıkları yüklerin lizozomal enzimler tarafından parçalamasını sağlarlar. Bu hücre için hayati önem taşıyan bazı proteinlerin ve mitokondri gibi enerji metabolizmasında rol oynayan organellerin yıkımına yol açmaktadır. Otofaji görülen hücrelerde, apoptozdan farklı bir ölüm gözlenmesine karşın, hücre ölümüne yol açan moleküler mekanizmaları hala ayrıntılı olarak tanımlanmadığı için, otofajinin bu ölümde aktif rol oynayıp oynamadığı konusu alanın uzmanlarının bir araya geldiği toplantılarda ve bilimsel literatürde yoğun bir şekilde tartışılmaktadır (20, 21). Özellikle, apoptozla ölebilen hücrelerde görülebilen otofajik hücre ölümü konusu hala bazı araştırmacılar tarafından şüphayla karşılanmaktadır. Yine de çoğu araştırmacının üzerinde birleştiği fikir, apoptozun mümkün olmadığı durumlarda, uyarıcının türü, süresi ve

miktarı gibi değişkenlere bağlı olarak, otofajinin hücre ölümüne doğrudan ya da dolaylı olarak yol açtığıdır.

Kesin olan bir şey varsa, artmış otofaji görülen hücrelerde meydana gelen programlı ölüm, apoptozdan çok farklı morfolojik ve moleküler özellikler taşımaktadır. Otofajik hücre ölümünde, kromatin yoğunlaşması gibi çekirdeğe özgü değişiklikler apoptotik hücre ölümüne nazaran çok daha sonra olmaktadır. Ölüm kaspaz etkinliğine bağımlı olmadığından, ne DNA merdivenleri ne de apoptotik cisim oluşması gözlenmektedir. Ayrıca, otofajide ölü hücrelerin fagositoz tarafından temizlenmesi apoptozda görüldüğünden çok daha geç ve düzensiz bir biçimde olmaktadır. Bütün bu gözlem ve veriler otofajik hücre ölümünün ayrı bir ölüm tipi olarak sınıflandırılmasının doğru olduğuna işaret etmektedir.

Bazı dokularda ve belirli koşullarda, yukarıda belirtilen hücre ölümü morfolojilerinin birkaç tipi aynı hücrede görülebilmektedir. Bu gözlem, birden fazla hücre ölüm mekanizmasının aynı uyarın tarafından, aynı hücrede etkinleştirilebileceğine işaret etmektedir (22, 23). Bunun bir açıklaması, farklı hücre ölüm mekanizmalarının ana hedeflerinin farklı olması olabilir. Otofajik hücre ölümü daha çok sitoplazmada gelişen bir hücre ölümüdür. Apoptozun en önemli hedefi ise DNA'nın barındığı hücre çekirdeğidir. Lenfositler gibi küçük sitoplazmalı hücrelerin yok edilmesi için apoptoz çoğunlukla yeterli olmaktadır. Fakat büyük sitoplazmalı hücrelerin yok edilmesi birden fazla mekanizmanın aynı anda aktivasyonunu gerektirebilir. Böylece, apoptotik moleküler mekanizmalar çekirdeği yok ederken, otofaji sitoplazmayı ve buradaki organelleri temizleyerek ölümü hızlandırıyor olabilir. Literatürde bu görüşü destekleyen çalışmalar mevcuttur (6-7).

Otofajik hücre ölümü: Ayrıntılar

Otofajinin hücre ölümü ile ilişkisi, uzun yıllardır bilinmekteydi. Çeşitli organizmaların hücre ve dokularında yapılan morfolojik analizler, gelişim sırasında ölen bazı hücrelerde otofajik etkinliğin artmış olduğunu ortaya koymaktadır. Buna, böcek dokularında metamorfoz sırasında görülen hücre ölümü, kuşlardaki kanat çıkıntısı oluşumunda ve memelilerde damak kapanması sırasında gerekli olan hücre ölümü de dahildir (18, 19, 24). Ayrıca bazı toksinlerin, otofajik aktivitenin artmasıyla seyreden hücre ölümüne yol açtığı gözlemlenmiştir (18). Her ne kadar bu çalışmalarda otofajik aktivite ve hücre ölümü arasındaki nedensel bağ gösterilemese de, bu tarz morfolojik araştırmalar otofajinin hücre ölümündeki rolünün daha ayrıntılı çalışılmasına neden olmuştur.

3-MA ve diğer PI3K inhibitörleri wortmannin ve LY294002 gibi kimyasalların otofajiyi baskıladığının keşfedilmesi, otofajik hücre ölümünün analizinde bir dönüm noktası teşkil etmektedir (25, 26). Farklı hücre tipleri ve farklı uyarıcılar kullanılarak birbirinden bağımsız gruplar tarafından yapılan çalışmalar, otofajik kesecik oluşumu ve lizozomal aktivite artışıyla ilerleyen, yukarıda sıralanan kimyasallar tarafından baskılanabilen ve kaspazlardan bağımsız bir hücre ölüm tipinin varlığını göstermiştir. MCF-7 meme kanseri hücrelerinin östrojen reseptör antagonisti tamoksifen tarafından tetiklenen ölümü, lösemi hücrelerinin TNF- α 'ya bağlı ölümleri, mide ve gliom hücrelerinin aktive olmuş Ras tarafından öldürülmesi ve sinir hücrelerinin büyüme faktörü eksikliğinden dolayı ölümleri bu tür çalışmalara örnek gösterilebilir (27-30). Araştırmalarda kullanılan çoğu kimyasal madde gibi, otofaji baskılayıcı maddelerin de hücreyel yan etkileri görülmüştür. En yaygın kullanılan otofaji baskılayıcısı 3-MA bile, otofaji çalışmalarında kullanılan optimum doz aralığında kullanıldığında otofajiyi baskılama etkisinin yanında, JNK ve p38 stres proteinlerini de baskılamış, mitokondiri geçirgenliğini etkilemiş ve lizozom pH'ını artırmıştır (30-32). 3-MA ve diğer kimyasalların yan etkilerden dolayı, bunlarla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara bilimsel camia tarafından ihtiyatla yaklaşmıştır. Bu nedenle, ölen hücrelerde gözlenen otofaji, tartışılan bir konu olmuştur (33, 34). Otofajinin hücre ölümündeki rolü konusunda daha güçlü veriler, programlı hücre ölümüne yol açtıkları tartışmasız olarak kabul edilen BNIP3, DAPK ve DRP-1/DAPK2 gibi proteinlerin otofajik hücre ölümünü tetiklemesi ve Bcl-2 gibi hücrelerin hayatta kalmasını sağlayan proteinlerin otofajiyi baskılamasının gösterilmesi ile sağlanmıştır (34, 17, 35-38).

Maya otofajisinin moleküler işleyişinde rol oynayan genlerin çoğunun bağımsız araştırma takımları tarafından bulunması, bu biyolojik olayın altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlamış ve otofaji araştırmalarında yeni bir dönem açmıştır (1, 39). Daha sonraki çalışmalar bu ortologların otofajideki işlevlerinin, evrimsel olarak daha gelişmiş canlılarda da korunduğunu ortaya koymuştur. Maya otofaji genlerinin ortologları çok kısa bir süre içinde *Dictyostelium*, *C. elegans*, *Drosophila*, fare ve insanda bulunmuştur (40). Bu önemli gelişmeler, otofajinin hücre ölümündeki rolünün daha ayrıntılı çalışılmasını sağlamış, otofajik genlerinin silinmesi (knock-out), gen ürünlerinin RNAi ve antisens yöntemlerle baskılanması gibi genetik yöntemlerin kullanılmasının önünü açmıştır.

Atg5, Atg7 ve Beclin-1 gibi otofaji proteinlerinin RNA'larının baskılanması ile yapılan ifade azaltma (knock-down)

deneyleri, belli deneysel koşullar altında, hücre ölümünü de baskılamıştır. L929 fare fibroblastları, U937 monosit hücreleri ve makrofajlarda kaspaz baskılayıcı Z-VAD'ın yol açtığı ölüm, Bax/Bak genleri silinmiş fibroblastların etoposin ve staurosporin etkisi altındaki ölümleri ve tümör baskılayıcı smARF'ın hücrelerde yüksek düzey ifade edilmesi sonrası görülen hücre ölümleri otofaji gen ifadesi baskılanarak önlenmiştir (41-44). Kimyasal işbirlikçiler yerine modern genetik yöntemler kullanılarak elde edilen bu veriler, otofajik hücre ölümünün varlığını tartışmasız bir biçimde ortaya koymuştur.

Otofaji ve apoptoz arasındaki hücre düzeyinde bağlantılar

Otofajinin hücre yaşamındaki kritik rolüne özellikle Atg3, Atg5, Atg7, Atg9, Atg16L1 genleri eksik olan farelerde otofajinin uyarılmadığı ve besin yokluğunda doğumdan hemen sonra bu farelerin öldüğünü gösteren çalışmalar ışık tutmuştur. Otofajinin açık durumda hücre yapısı taşlarının yıkılarak geridönüşümü ve hücrenin enerji depolarının yenileyerek apoptotik hücre ölümünü engellediği ya da zıt olarak hücre ölümüne yol açtığı gösterilmesine ek olarak apoptozla karmaşık bir ilişkide olduğu pek çok yayında ifade edilmektedir (45).

Otofaji özellikle apoptotik hücre ölümünün baskılandığı koşullarda aktive olarak, apoptozla ölmesi mümkün olmayan hücrelerin ölümüne yol açabilir. Bu özelliği ile, bazı durumlarda apoptoz yanında bir "hücre ölümü B planı" şeklinde görev yapabilir. Bunun yanında, otofaji ve apoptoz arasında en az üç farklı bağlantı gözlenmiştir. Otofaji; apoptozla paralel olarak hücre ölümüne yol açabildiği gibi, apoptozu baskılayarak hücrenin hayatta kalmasını sağlayabilir ya da apoptoz için bir ön koşul olabilir (46).

Apoptoz ve otofajinin birlikte çalıştığını gösteren pek çok yayın bulunmaktadır. Apoptozu artırdığı bilinen uyarılardan etoposin, fare embriyonik fibroblast hücrelerinde (MEF), seramid, meme ve kolon karsinomalarında ve TRAIL, reseptörü-2 kanser hücrelerinde otofaji ile apoptoz yanında aynı anda otofaji aktivasyonuna neden olmuştur (47, 48). Bunlardan başka arsenik tiroksit ile muamele edilen T-lenfosit lösemisinde her iki yolak da aktive olarak hücre ölümüne ve tümörün durdurulmasına katkıda bulunmuştur (49). İmatinib ile tedavi edilen Kaposi sarkomasında ve MG132 adlı proteozom inhibitörü ile muamele edilen PC3 prostat kanser hücrelerinde görülen ölüm, apoptoz-otofaji işbirliğine bir başka örnek olarak gösterilebilir (50, 51).

Bazı durumlarda otofaji ve apoptoz hücrede birbirine zıt etkiler yapabilmektedir. Bu durumda, otofaji hücre ölümüne karşı bir hayatta kalma mekalmazı olarak çalışarak, apoptozun durdurulmasına ve ölümün engellenmesine yol açmaktadır. Otofaji metabolik stres, ilaç ya da radyasyon hasarıyla karşı karşıya kalan hücrede anormal ve hasarlı proteinlerin yok edilmesinde ve genomik DNA'nın hasardan korunmasında önemlidir. Otofaji yokluğunda tümör hücrelerinde, DNA hasarı, gen amplifikasyonu ve kromozomal anormallikler artmaktadır (52). Yine aynı doğrultuda olmak üzere, otofajinin; meme, prostat ve kolon kanserlerindeki inhibisyonu, bu hücrelerin radyoterapiye ölüm yanıtını artırmaktadır (53).

Başka hücre senaryolarında ise, otofaji kendi başına hücre ölümüne sebep olmaksızın apoptotik hücre ölümüne yardımcı olabilmektedir. Örneğin; besin yokluğunda otofaji bağımlı hücre ATP düzeyinin sürdürülmesi apoptozun önemli belirteçlerinden olan fosfotidilserinlerin hücre zarının dışına transferini sağlar. Bundan başka, apoptozda görülen hücre zarı tomurcuklanması (blebbing) enerji bağımlıdır aktin-miyozin kasılması ATP ile meydana gelmektedir (54). Bazı koşullarda otofajinin kaspaz aktivasyonu için gerekli olduğunu gösteren yayınlar da bulunmaktadır. Örneğin otofajinin, CD4⁺ T hücrelerinin HIV ile enfeksiyonunu sırasında kaspaz-bağımlı hücre ölümü için gerekli olduğu gösterilmiştir (55). Atg7 ya da Beclin-1'in hedeflenmesi ya da 3-MA ile muamele sonucunda otofajinin baskılanması, kaspaz aktivasyonu ve hücre ölümünü engellemektedir (42).

Bütün bu gözlemlerde ortaya çıkan karmaşık ilişkiler, moleküler düzeyde otofaji yollarının apoptoz sistemi ile birlikte regüle olabileceğine, aynı sinyal bağlantılarıyla uyarılabileceklerine ve bazı ortak proteinlerin bu iki sistemin birbiriyle ilişkilerini düzenleyebileceğine işaret etmektedir.

Moleküler bağlantılar

Son yıllarda hücre ölümü konusunda yapılan çalışmaların bir kısmı, otofaji, apoptoz, hücre hayatta kalma ve ölüm sinyalleri arasında gözlenen ilişkilerin moleküler düzenleyicilerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalar, otofaji ile apoptoz birlikte kontrol eden proteinlerin varlığını ortaya koymuştur. Hatta bazı otofaji proteinlerinin kaspaz veya kalpain gibi proteazlar tarafından kesilmesi sonrası apoptoz yolağında görev yaptıkları bile gözlenmiştir. Bu kısımda, bu moleküler bağlantıları hakkında şu ana kadar elde edilen bilgiler tartışılacaktır.

Akt/PKB ve Tor yolağı

Otofajinin düzenlenmesinde en önemli moleküler sensör olan Tor (memelilerde mTor), bir "GTP-bağlayıcı küçük protein" olan Rheb'in GTP bağlı şekli tarafından düzenlenmektedir. Tuberoz skleroz proteinleri Tsc1 ve Tsc2 (Tuberous sclerosis complex 1/2, TSC1/TSC2) Rheb tarafından GTP hidrolizini kolaylaştırılmakta ve böylelikle Rheb'i inaktive etmektedir. Yani, Rheb mTor aktivitesini pozitif, Tsc1/Tsc2 negatif olarak etkiler. Tor yolağının aktivasyonu hücre büyüme ve hayatta kalmasına, baskılanması ise otofajiyeye yol açmaktadır.

mTor yolağı, hücre içi aminoasit ve ATP düzeyleri yanında, büyüme faktörleri ile aktive olan ve bir hücre hayatta kalma yolağı olan Akt/PKB yolağı tarafından da kontrol edilmektedir. Akt/PKB bunu ERK ya da RSK gibi, TSC1/TSC2'yi fosforilleyerek ve bu mTor inhibitörlerini inaktif duruma getirerek yapar. Böylelikle Akt/PKB aktivasyonu, Rheb tarafından mTor uyarımına ve otofajinin inhibisyonuna yol açmaktadır (56, 57).

Bu sinyal ileti molekülleri ve yolakları sadece otofajiyeye özgün değildir. Akt ve ERK aynı zamanda apoptozu etkileyen yolakları da aktive etmektedir. Akt/PKB, Bcl-2 ailesi üyelerinden Bad'in ile fosforillenmesine, NF-kB yolağının uyarılmasına ve apoptoz inhibisyonuna da yol açmaktadır (58-60). Yani aynı yolağın (Akt/PKB) uyarımı, hem otofajiyeyi, hem de apoptozu bloke edebilmektedir.

Bcl-2 ve Bcl-XL

Anti-apoptotik proteinlere mensup olan Bcl-2 ve Bcl-XL proteinleri apoptoz gibi otofajiyeyi de inhibe edebilmektedirler. Otofaji keseciği oluşumunda görev yapan Vps34 PI3 kinazın aktivitesinin Atg6/Beclin'i de içeren bir grup protein tarafından kontrol edildiğini yukarıda belirtmiştik. Bcl-2 ya da BclXL, Beclin'in sahip olduğu BH3 bölgesine bağlanabilmekte ve bu şekilde onu otofaji üzerinde etkisiz hale getirebilmektedir (61, 62). BclXL'in JNK tarafından fosforillenmesi Beclin'e bağlanmasını zayıflatmakta ve otofajiyeyi aktive etmektedir. DAPk da benzer etkiyi Beclin üzerinden gösterebilmektedir (Bkz. Aşağıda DAPk). Beclin yanında, Vps34 düzenleyici proteinlerden biri olan Bif-1 de hücre ölümü ile ilişkilidir. Bif-1, otofaji yanında, Bax/Bak aktivasyonu ile apoptozu da düzenlemektedir. Bcl-2 protein ailesinden, hipoksi ve apoptozda rol oynayan bir protein olan BNIP-3'ün otofajiyeyi aktive ettiği çeşitli sistemlerde gösterilmiştir. Bazı sistemlerde, Beclin ile BNIP-3'ün etkileşimleri görülmüştür (63).

At4D, Atg5 ve Beclin

Otofajinin en önemli temel proteinlerinden olan Atg4D, Atg5 ve Beclin-1'in proteolitik olarak kesilmesinin

apoptotik hücre ölümünü arttırılabileceğinin gösterilmesi bu iki ölüm mekanizması arasındaki etkileşim için güçlü birer dayanak olmuştur. Atg5, Atg12 ile bir dimer oluşturarak Atg16L ile bağlanmakta ve otofajik izolasyon oluşumunda rol oynamaktadır (Şekil 1). Atg5'in FADD adlı reseptör tarafından apoptoz aktivasyonu meknizmasında rol oynayan bir proteinle etkileştiği, ve interferon gamma tarafından hücre ölümünde rol oynadığı gösterilmiştir (64, 65). Birçok apoptotik uyarın, Atg5'in kalpain tarafından kesilerek ikiye bölünmesine yol açmıştır. Kesilen proteinin amino kısmının mitokondri zarındaki Bcl-XL ile etkileştiği, sitokrom-c salınımına ve kaspaz aktivasyonuna neden olduğu görülmüştür (66). Yine apoptoz sırasında, otofaji proteini Beclin'in ve Atg4D kaspazlarca yıkıma uğradığı saptanmıştır (67-69). Bunlara ek olarak yakın zamanda Atg7 ve Atg12-Atg3 konjugasyonunun da apoptozla ilişkili olduğu gözlenmiştir (70-71). Kısacası bazı otofaji proteinleri apoptoz yolakları tarafından kullanılabilen, diğerleriyle yok edilebilmektedir.

p53

Bir apoptoz uyarını olan p53, Bax, PUMA ve NOXA gibi pro-apoptotik genlerin transkripsiyonel düzeyde arttırılması ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik protein ifadesinin azaltılmasından sorumludur (72). p53'ün DNA'ya hasar verici ajan etoposid ile aktivasyonu, mTor yolağının inhibisyonuna yol açmakta, dolayısı ile otofajinin aktivasyonunu tetiklemektedir (73). Otofaji üzerindeki pozitif etkisine zıt olarak, p53 işlevinin yitirilmesi otofajinin tam olarak aktivasyonuna yol açmaktadır. p53 hücre içi lokalizasyonuna göre de otofajiyeyi iki farklı şekilde düzenleyebilmektedir. Çekirdekdeki p53'ün transkripsiyonel etkisi aracılığıyla otofajiyeyi indüklerken, sitoplazmik p53'ün ise otofajiyeyi baskıladığı gösterilmiştir (74).

Reaktif Oksijen türleri ve Atg4

Reaktif oksijen türlerinin (ROS), otofajik kesecik oluşumunda ve otofajinin hücre ölümü ya da hayatta kalımı üzerindeki rolünün düzenlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Hücre içinde yüksek düzeydeki ROS apoptozun uyarılmasına yol açarken; düşük konsantrasyonlarda ROS bir sinyal ileti molekülü gibi görev yaparak hücre büyümesi ve hayatta kalımı düzenlemektedir. ROS'un otofajiyeyi düzenlemesi, otofagozom oluşumunda önemli olan Atg4 üzerinden gerçekleşmektedir. Yukarıda da bahsettiğimiz gibi Atg4, LC3 proteinlerinin olgunlaşmasında ve yağ moleküllerinden koparılmalarında rol oynamaktadır. ROS Atg4'ü, katalitik bölgesindeki sistein amino asitini okside ederek regüle etmektedir. Okside olmuş Atg4 inaktive olarak otofagozom oluşumunu baskılanmaktadır (75). Bunun dışında hücre içinde anormal ROS birikimi, en önemli ROS

yakalayıcı enzim olan katalazın otofajik yıkımına sebep olmaktadır. Kaspaz inhibisyonun yol açtığı otofaji tarafından katalaz yıkımı ve ROS birikiminin, bu sistemde otofaji tarafında hücre ölümüne katkıda bulunduğu gösterilmiştir (76). Kısaca ROS otofaji ile bağlantılı olarak hücre ölüm ya da hayatta kalmasını değişik düzeylerde regüle eden bir sinyal molekülüdür.

ARF

Bir tümör baskılayıcı gen olan ARF'nin hem apoptoz hem de otofajik hücre ölümü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. p19ARF (p14ARF) p53'ün aktivatörü olarak INK4a/ARF lokusundan alternatif okuma çerçevesinde kodlanmaktadır. Bu molekülün tümör baskılayıcı özelliği, Mdm2 (p53 inhibitörü) ile ilişkiye girerek bu p53 inhibitörünün görevini engellemesiyle gerçekleşmektedir (77). p19ARF'in mRNA'sının ikinci bir izoform kodladığı gözlenmiştir. smARF adı verilen bu izoform, p19'u çekirdeğe gönderen ve Mdm2'ye bağlanmasına aracılık eden amino ucu parçasından yoksundur. Apoptozla bağlantılı p19'dan farklı olarak smARF mitokondriye yönlendirilmekte, mitokondri depolarizasyonu ve otofajik hücre ölümüne yol açmaktadır (78).

FADD, kaspaz-8, FLIP

Özellikle immün sistem hücrelerinde, tümör nekroze edici faktör (TNF) ailesi reseptörlerinden Fas'ın FasL adı verilen uyarıcısına (ligand) bağlanması, dışsal (extrinsic) apoptoz yolağının aktive olmasına neden olmaktadır. Bu bağlanma Fas oligomerizasyonuna yol açmakta ve Fas (reseptör), FADD (adaptör) ve kaspaz-8'i içeren ölüm kompleksi (DISC) tarafından yıkıcı (executionary) kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Fas kendisine ayrıca bağlanan RIP kinaz üzerinden kaspazlardan bağımsız hücre ölümüne de neden olabilmektedir. Fakat bu kaspazlardan bağımsız hücre ölümünün moleküler mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar, kaspaz-8'in RIP kinazı yıkıma uğratarak bu yolağı saf dışı bıraktığını göstermiştir (42). Kaspaz-8'in bloke edilmesi, RIP kinaz tarafından otofajinin uyarılmasına, selektif olarak katalazın otofajik yıkımına ve hücrelerin oksidatif stresten ölümüne yol açmıştır (76). Bunun yanında, FADD ve kaspaz-8 aktivitesinden yoksun olan T hücrelerinde otofajik sinyalin çok fazla aktive olduğu ve hücrelerin ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (64,79). Bu otofajik sinyalde FADD'in, Atg5-Atg12/RIPK1 ile bir kompleks oluşturduğu ve daha sonra bu komplekse kaspaz-8'in bağlanmasına ön ayak olduğu savunulmaktadır. Ayrıca otofaji sinyalin Atg7'in ya da kimyasal ajanlarla otofajinin bloke edilmesi ile yeniden T hücre proliferasyonunun oluştuğu dolayısı ile kaspaz-8 inhibisyonun otofajiyi arttırdığı görülmüştür (42). Bütün bu bulgular, reseptörler tarafından hücre ölümü aktivasyonunda otofaji-apoptoz

ilişkinin hücre ölümü ya da hayatta kalması konusunda verilecek kararı etkilediğine işaret etmektedir. Bunlara ek olarak hücreyi apoptozdan koruyan hücrel ve viral FLICE-benzeri inhibitör protein (FLIP) Atg3 proteinini yarışarak otofagozom oluşumunda rol oynayan LC3 ile bağlanmakta ve dolayısı ile Atg3 aracılığı ile oluşan otofagozom uzamasını engellediği saptanmıştır (80).

DAPK

Kalsiyum/kalmodulin bağlanmasıyla düzenlenen bir serin/treonin kinaz olan DAPK, hem apoptozu hem de otofajiyi en az iki farklı yolak üzerinden modüle etmektedir. DAPK onkogenler tarafından p53 aktivasyonu ve apoptotik hücre ölümü uyarımı için gerekli bir proteindir (81). Ayrıca karaciğer kanseri hücrelerinde TGF- β tarafından uyarılan apoptotik hücre ölümünde gereklidir (82). Bunun yanında DAPK, IFN- γ tarafından uyarılan otofajik hücre ölümünde de rol oynamaktadır (83). Aminoasit yokluğunda DAPK tarafından otofaji uyarımında MAP1B adı verilen mikrotübül bağlayıcı proteinin (84) önemli olduğu öne sürülmüştür (83, 85). İlginç bir şekilde, mTor regülatörlerinden Tsc2'yi fosforilleyerek mTor'u aktive ettiği ve otofajiyi önlediği de iddia edilmiştir (86). DAPK'ın yüksek oranda ifadesinin otofajiyi aktive ettiğine dair yayınlar, otofaji baskılanmasıyla ilgili yayınlardan daha fazladır. DAPK'ın otofajiyi nasıl aktive ettiği konusunda en ikna edici moleküler açıklama, Beclin ile ilgili olanıdır. DAPK Beclin'e doğrudan bağlanmakta ve onu fosforillemektedir. Beclin'in Bcl-2 ailesi proteinlere bağlanmasına yarayan BH3 bölgesi, DAPK tarafından fosforillenmenin hedefidir. Fosforillenme sonrasında, Beclin Bcl-XL'den ayrılmakta ve otofajinin aktive olmasında görev yapabilmektedir (87).

Gözüaçık ve Kimchi grubu, DAPK'ın aynı hücrede bile hem apoptoz hem de otofaji uyarımında rol oynadığını gözlemlemişlerdir. Endoplazmik retikulum (ER) stresi fibroblastlarda hem apoptozu (kaspaz aktivasyonu) hem de otofajiyi uyarmakta ve her iki yolak da hücre ölümüne katkıda bulunmaktadır. DAPK'ı olmayan farelerden elde edilen hücrelerin ve hatta böbrek gibi organların, ER stresinin neden olduğu hücre ölümünden korunduğunu gözlemledi (72, 86-88). Bu çalışmalar, ER stresinin aynı sistemde apoptoz ve otofajinin birlikte aktivasyonu ile giden hücre ölümünde DAPK'ın önemli bir rol oynadığını ortaya koydu ve DAPK'ın iki hücre ölümü arasında bir moleküler anahtar rolü oynayabileceğinin altını çizdi (46, 86-88).

E2F1

E2F transkripsiyon faktörü ailesi hücre ölümü ve yaşamı ile ilişkili çeşitli sinyal ileti yollarında görev yapar. Bu aileye

mensup olan E2F1, özellikle DNA zararı veren ajanların varlığında apoptoz ve otofaji aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. E2F1'nin, p19ARF üzerinden p53'ün aktivasyonu ile apoptozu tetiklerken; otofaji genlerinden LC3, Atg1, Atg5, DRAM'ın ifadesini artırarak da otofajiyi indüklediği gösterilmiştir (89,90). Ayrıca bu çalışmalar ve başka çalışmalar, mayadakininden farklı olarak memeli otofajisinin transkripsiyon mekanizmaları tarafından da kontrol edilebileceğini ortaya koymaktadır.

Sonuç

Özellikle son on yılda yapılan çalışmalar ve otofaji hakkında moleküler düzeyde elde edilen bilgiler, hücre ölümünün nasıl kontrol edildiği konusundaki bakış açımızı değiştirmiştir. Bütün bu bilgi birikimi halen karmaşık bir tablo ortaya koymaktadır. Otofaji bazı koşullarda hücrenin strese direncini artırmakta ve hayatta kalmasına yol açmaktadır. Buna karşın, bazı koşullarda, otofajik aktivite ölümle birlikte seyretmektedir. Hatta bu durumda otofajinin ilaçlar tarafından ya da genetik olarak bloke edilmesi, hücrenin yaşama şansını artırmaktadır. Üstüne üstlük, otofaji ile apoptoz arasında da karmaşık ilişkiler söz konusudur. Bütün bu çalışmalar, bir hücre içi yıkım ve geri dönüşüm mekanizması olan otofajinin, nasıl olup da hücre ölümüne yol açtığı konusunu ancak kısmen açıklığa kavuşturmuştur. Bu durum, otofaji ve hücre ölümü ile

uğraşan biliminsanlarını bölmekte, toplantılarda ve literatürde hararetle bilimsel tartışmalara yol açmaktadır. Otofaji ve otofajik hücre ölümünün moleküler mekanizmaları konusunda daha fazla ve ayrıntılı bilgi sahibi olunması, özellikle otofaji regülasyonu ve otofaji tarafından hücrelerin nasıl öldürüldüğü konularının açıklığa kavuşturulması, bu tür tartışmaların uzlaşma ile sonuçlanması için gereklidir. Unutmamak gerekir ki, biyolojik sistemler, milyonlarca yıllık evrim sonucunda ve ihtiyaçlar doğrultusunda ortaya çıkmışlardır, bu nedenle karmaşık olmaları doğaldır. Şu an elimizde olan kısmi bilgilerle, karmaşık sistemleri basit kurallarla dayandırarak açıklamaya çalışmak ve hatta önyargı sahibi olmak bir hata olacaktır.

Otofaji bozukluklarının kanser, enfeksiyon hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar (Örn. Alzheimer hastalığı), iskemik hastalıklar (Örn. inme, miyokart enfarktüsü) gibi pek çok hastalıkla olan bağlantısı otofaji araştırmalarının insan sağlığı için önemini altını çizmektedir. Bu bağlamda insan otofaji mekanizmalarının nasıl çalıştığı, nasıl regüle olduğu ve hangi sinyal yolları tarafından kontrol edildiği konusunda çalışmalar hızla sürmektedir. Otofajinin hem temel bilimde hem de klinik bilimlerde daha iyi anlaşılması, yeni ilaç, tanı, takip ve tedavi araçlarının bulunmasına ve insan sağlığını tehdit eden önemli hastalıklara yeni, bilinçli ve moleküler temelli çözümler üretilmesine yol açacaktır.

Kaynaklar

1. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:211-6.
2. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004;306:990-5.
3. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008;451:1069-75.
4. Yang Z, Klionsky D. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 2010;12:814-822.
5. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptation. *Nat Cell Biol* 2007;9:1102-9.
6. Kroemer G, Marino G, Levine B. Autophagy and integrated stress response. *Mol Cell* 2010;40(2):280-293.
7. Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research* 2010;20:748-762.
8. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 2000; 150:1507-13.
9. Shang L, Wang X. AMPK and mTOR coordinate the regulation of Ulk1 and mammalian autophagy initiation. *Autophagy* 2011;7(8):924-6.
10. Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell* 2004;7:167-8.
11. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 2001;411:355-65.
12. Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:2445-62.
13. Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, Ogier-Denis E. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 2001; 276:35243-6.
14. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402:672-6.
15. Pfisterer SG, Mauthe M, Codogno P, Proikas-Cezanne T. Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase signaling via CaMKI and AMPK contributes to the regulation of WIPI-1 at the onset of autophagy. *Molecular Pharmacology* September 6, 2011 doi:10.1124/mol.111.071761
16. Ogier-Denis E, Couvineau A, Maoret JJ, Hourii JJ, Bauvy C, De Stefanis D, Isidoro C, Laburthe M, Codogno P. A heterotrimeric Gi3-protein controls autophagic sequestration in the human colon cancer cell line HT-29. *J Biol Chem* 1995;270:13-16.
17. Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol* 2002;157:455-8.
18. Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973; 7:253-66.

19. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*. 1990;181:195-213.
20. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* 2007;78:217-25.
21. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005;115:2679-88.
22. Lockshin RA, Zakeri Z. Cell death in health and disease. *J Cell Mol Med* 2007;11:1214-24.
23. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 2008;44:205-21.
24. Bursch W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2001;8:569-81.
25. Blommaert EF, Krause U, Schellens JP, Vreeling-Sindelarová H, Meijer AJ. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 1997;243:240-6.
26. Seglen PO, Gordon PB. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:1889-92.
27. Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Török L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 1996;17:1595-607.
28. Jia L, Dourmashkin RR, Allen PD, Gray AB, Newland AC, Kelsey SM. Inhibition of autophagy abrogates tumour necrosis factor alpha induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells. *Br J Haematol* 1997;98:673-85.
29. Chi S, Kitanaka C, Noguchi K, Mochizuki T, Nagashima Y, Shirouzu M, Fujita H, Yoshida M, Chen W, Asai A, Himeno M, Yokoyama S, Kuchino Y. Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene* 1999;18:2281-90.
30. Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci* 1999;14:180-98.
31. Xue L, Borutaite V, Tolkovsky AM. Inhibition of mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c by anti-apoptotic nucleoside analogues. *Biochem Pharmacol* 2002;64:441-9.
32. Caro LH, Plomp PJ, Wolvetang EJ, Kerkhof C, Meijer AJ. 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism. *Eur J Biochem* 1988; 175:325-9.
33. Gozuacik D, Kimchi A: Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004;23:2891-906.
34. Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg AH. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol* 2000;20:5454-68.
35. Gozuacik D, Kimchi A. DAPk protein family and cancer. *Autophagy* 2006;2:74-9.
36. Cárdenas-Aguayo Mdel C, Santa-Olalla J, Baizabal JM, Salgado LM, Covarrubias L. Growth factor deprivation induces an alternative non-apoptotic death mechanism that is inhibited by Bcl2 in cells derived from neural precursor cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12:735-48.
37. Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Curr Biol* 2001;11:361-5.
38. Yanagisawa H, Miyashita T, Nakano Y, Yamamoto D. HSpin1, a transmembrane protein interacting with Bcl-2/Bcl-xL, induces a caspase-independent autophagic cell death. *Cell Death Differ* 2003;10:798-807.
39. Kim J, Klionsky DJ. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 2000;69:303-42.
40. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 2003;5:539-45.
41. Xu Y, Kim SO, Li Y, Han J. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *J Biol Chem* 2006; 281:19179-87.
42. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 2004;304:1500-2.
43. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 2004;6:1221-8.
44. Reef S, Zalckvar E, Shifman O, Bialik S, Sabanay H, Oren M, Kimchi A. A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death. *Mol Cell* 2006;4:463-75.
45. Wiraman E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agonistis P, Vanderabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Research* 2011;1-19.
46. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A: Life and death partners. apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* 2009; 16:966-75.
47. Patingre S, Bauvy C, Levade T, Levine B, Codogno P. Ceramide-induced autophagy: to junk or to protect cells? *Autophagy* 2009;5:558-60.
48. Park K, Lee S, Kim T, Lee H, Lee C, Kim EH, Jang JY, Choi KS, Kwon MH, Kim YS. A human scFv antibody against TRAIL receptor 2 induces autophagic cell death in both TRAIL-sensitive and TRAIL-resistant cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67:7327-34.
49. Qian W, Liu J, Jin J, Ni W, Xu W. Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1. *Leuk Res* 2007;31: 329-39.
50. Basciani S, Vona R, Matarrese P, Ascione B, Mariani S, Cauda R, Malorni W, Straface E, Lucia MB. Imatinib interferes with survival of multi drug resistant Kaposi's sarcoma cells. *FEBS Lett* 2007;581: 5897-5903.
51. Yang W, Monroe J, Zhang Y, George D, Bremer E, Li H. Proteasome inhibition induces both pro- and anti-cell death pathways in prostate cancer cells. *Cancer Lett* 2006;243:217-227.
52. Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 2007;21:1621-1635.
53. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp C, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S, White E. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007;21:1367-81.

54. Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan R. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 2007;128:931-46.
55. Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, Codogno P, Biard-Piechaczyk M. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest* 2006;116: 2161.
56. Corradetti M, Guan K. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* 2006;25:6347-60.
57. Guertin D, Sabatini D. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 2007;12:9-22.
58. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005;9:59-71.
59. McCubrey J, Steelman L, Chappell W, Abrams S, Wong E, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1263-84.
60. Ballif B, Blenis J. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK survival signals. *Cell Growth Diff* 2001;12: 397-408.
61. Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2008;4:600-6.
62. Noble C, Dong J, Manser E, Song H. BCL-XL and UVRAG cause a monomer-dimer switch in beclin1. *J Biol Chem* 2008;283:26274-82.
63. Mellor HR, Harris AL. The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26:553-66.
64. Bell BD, Leverrier S, Weist BM, Newton RH, Arechiga AF, Luhrs KA, Morrissette NS, Walsh CM. FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signalling in proliferating T cells. *PNAS*. 2008;105:16677-82.
65. Pyo JO, Jang MH, Kwon YK, Lee HJ, Jun JI, Woo HN, Cho DH, Choi B, Lee H, Kim JH, Mizushima N, Oshumi Y, Jung YK. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem* 2005;280:20722-9.
66. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 2006;8:1124-32.
67. Cho DH, Jo YK, Hwang JJ, Lee YM, Roh SA, Kim JC. Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells. *Cancer Lett* 2009;274:95-100.
68. Wirawan E, Vandewalle L, Kersse K, et al. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis* 2010;1-18.
69. Betin VM, Lane JD. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci* 2009;122:2554-2566.
70. Walls KC, Ghosh AP, Franklin AV, et al. Lysosome dysfunction triggers Atg7-dependent neural apoptosis. *J Biol Chem* 2010; 285:10497-10507.
71. Radoshevich L, Murrow L, Chen N, et al. ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death. *Cell* 2010;142:590-600.
72. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003;22:9030-40.
73. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:8204-9.
74. Tasdemir E, Maiuri M, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G, Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno P, Cecconi F, Kroemer G. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* 2008;10:676-87.
75. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 2007; 4:1749-60.
76. Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;28:4952-7.
77. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:731-7.
78. Reef S, Shifman O, Oren M, Kimchi A. The autophagic inducer smARF interacts with and is stabilized by the mitochondrial p32 protein. *Oncogene* 2007;26:6677-83.
79. Yu L, Lenardo MJ, Baehrecke EH. Autophagy and caspases. *Cell Cycle* 2004;3:1124-6.
80. Lee JS, Li Q, Lee JY, et al. FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat Cell Biol* 2009;11:1355-1362.
81. Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, DePinho RA, Kimchi A. DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nat Cell Biol* 2001;3:1-7.
82. Jang CW, Chen CH, Chen CC, Chen JY, Su YH, Chen RH. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol* 2002;4:51-8.
83. Bialik S, Kimchi A. The death-associated protein kinases: structure, function and beyond. *Annu Rev Biochem* 2006;75:189-210.
84. Harrison B, Kraus M, Burch L, Stevens C, Craig A, Gordon-Weeks P, Hupp TR. DAPK-1 binding to a linear peptide motif in MAP1B stimulates autophagy and membrane blebbing. *J Biol Chem* 2008;283:9999-10014.
85. Halpain S, Dehmelt L. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 2006;7:224.
86. Stevens C, Lin Y, Harrison B, Burch L, Ridgway RA, Sansom O, Hupp T. Peptide combinatorial libraries identify TSC2 as a death-associated protein kinase (DAPK) death domain-binding protein and reveal a stimulatory role for DAPK in mTORC1 signaling. *J Biol Chem* 2009;284:334-44.
87. Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R, Kimchi A. DAPK-mediated phosphorylation on the BH3 domain of Beclin-1 promotes dissociation of Beclin-1 from Bcl-XL to induce autophagy. *EMBO Rep* 2009; 10: 285-92.
88. Gozuacik D, Bialik S, Raveh T, Mitou G, Shohat G, Sabanay H, Mizushima N, Yoshimori T, Kimchi A. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death Differ*. 2008;(12):1875-86.
89. Iaquinta P, Lees J. Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:649-57.
90. Polager S, Ofir M, Ginsberg D. E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene* 2008;27:4860-64.