

Programlı hücre ölümü ve spermatozoon

Şule Doğan^{1,2}, Müge Kovalı^{2,3}, Ceyda Yıldız², Çetin Pekçetin²

¹Mississippi State University. Laboratory of Animal Functional Genomics. Animal and Dairy Sciences MS / USA

²Dokuz Eylül Üniversitesi. Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı. Balçova / İzmir

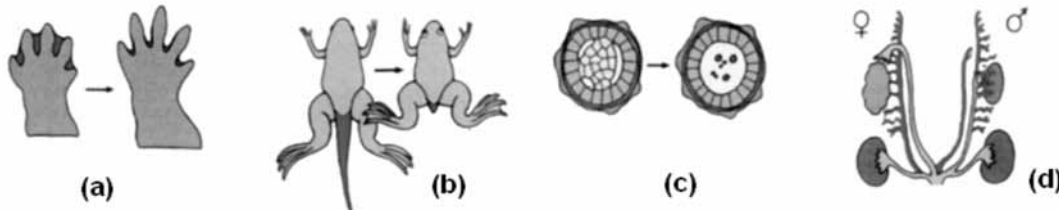
³Dokuz Eylül Üniversitesi. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.- Tüp Bebek Merkezi Balçova / İzmir

Programlı hücre ölümü olarak da bilinen Apoptoz 1964'te Lockshin tarafından ilk kez ipekböceği metamorfozu sırasında tanımlanmıştır. Walther Flemming 1885te, 'chromatolysis' prosesininin tavşan ovaryumunda foliküller atrezi sırasında granüloza hücrelerinin kaybı için sorumlu olduğunu tarif etmiştir. Aynı ölüm prosesini testiküller germ hücre dejenerasyonunda gözlemiştir. Bu çalışmalar, apoptosis terimi kullanılsa da morfolojik olarak apoptotik hücreleri göstermiştir (1). Günümüzde de hala kullanılan Apoptoz terimini ilk olarak 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie, Yunanca da apo (ayrılan) ve ptosis (düşen) terimlerini birleştirerek 'ağaçtan dökülen yapraklar' anlamındaki 'apoptosis' terimiyle açıklamışlardır (1,2).

Kerr ve arkadaşları apoptotik hücreyi morfolojik ve elektron mikroskopik olarak; komşu hücrelerinden ayrı, hücre hacmi küçülmüş (sitoplazmik büzülme), kromatini kondanse olmuş (kromatin kondenzasyonu), nükleusu çevreleyen zarfın (nuclear envelope) periferde toplanması/küçülmesi (nükleer piknosis) ve son olarak sitoplazma membranı içindeki fragmantasyonlar olarak bilinen apoptotik cisimciklerin (eski adıyla Councilman bodies) gözlemlenmesiyle karakterize etmişlerdir (1,2,3). Wyllie 1984de apoptotik hücrede morfolojik değişimle-

rin yanında birçok karakteristik biyokimyasal marker olduğunu gözlemiştir (4). Bunlardan en önemlisi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile DNAda mono ve oligonukleozomal (180-200bp) birimlerin merdiven gibi belli aralıklarla kırklar göstermesinin nükleer kromatin fragmantasyonu olarak bilinmesidir (1).

Çok hücreli organizmalarda hücre sayısı, doku büyüklüğü ve bu hücrelerin homeostazi, hücre bölünmesi, hücre göçü, hücre ölümünün programlanması ile sıkı bir şekilde kontrol altında tutulur (6). Apoptoz ve mitoz dokuda sürekli bir denge halindedir (4). Belirli bir dokuda hücre proliferasyonu mitozla, o dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptoz ile belirlenir (6). Apoptozun; hücre ölümünün normal gelişim, homeostaz ve yaşlanma sürecinde ya da hastalık-zararlı ajanların hücrede hasar oluşturduğunda, immün cevapta olduğu gibi savunma mekanizmasında var olduğu gösterilmiştir (2,3). Apoptozun görüldüğü birtakım fizyolojik olaylar Şekil 1'de gösterilmiştir (5). Apoptoz gelişimin normal sürecinde fizyolojik olarak görülmekle birlikte bir denge içinde olmalıdır. Bu dengenin zoulması çeşitli patolojilere yol açabilir. Bu konuda birçok araştırmacı apoptozin düzenlenememesinin birçok insan patolojisi, kanserleri, otoimmün hastalıklar,



Gewies A. Introduction to Apoptosis; 2003: Page 1-26. www.ihcworld.com/_books/apointro.pdf den uyarlanmıştır.

Şekil 1: Apoptozun görüldüğü fizyolojik olaylar (5)

- (a) Parmak oluşumu sırasında aradaki mezeneşimal hücrelerin apoptozu.
- (b) Amfibilerin metamorfozu sırasında kuyruk hücrelerinde.
- (c) Bağırsak gibi lümenli organ oluşumunda.
- (d) Üreme organları oluşumunda (Wolf ve Müllerian kanal apoptozu)

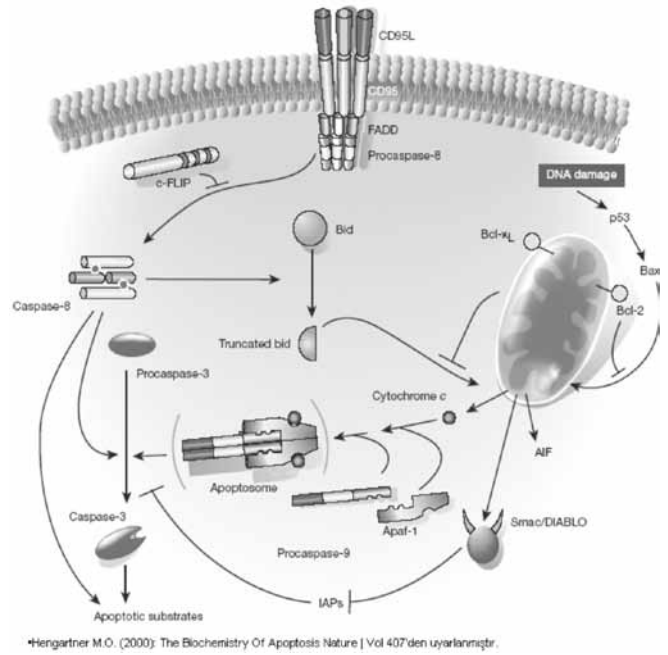
nörodejeneratif düzensizliğin nedeni olduğunu saptamıştır (7).

Apoptozisin moleküler biyolojisi ve genetiği

İkibinli yıllarda araştırmacılar tarafından apoptozun başlaması, uygulanması ve regülasyonu sırasında farklı türlerde birçok genin tanımlandığı gösterilmiştir (1,7). Kerr ve Wyllie, 1994 yılında apoptozun genetik kontrol altında olduğunu ileri sürmüşlerdir (4). Daha sonra 1999'da Horvitz tarafından memelilerde apoptozun genetik mekanizmasının anlaşılmasında *C. Elegans* kullanılmıştır. Başlangıçtaki 1090 somatik hücreden 131'inin programlı bir şekilde öldüğü ve bunun genetik olarak kontrol edildiği ortaya konulmuştur. Burada 3 kilit gen tanımlanmıştır: *ced-3*, *ced-4* ve *ced-9* dur. *Ced-9* geninin proteini aynı adlı *Ced-9*'dur ve programlı hücre ölümü ve embriyonik mortalitede ölüm reseptörü fonksiyonundadır. *Ced-3* ve *ced-4* genlerinin proteinleri aynı adlı *ced-3-4* dür ve gelişim esnasında hücrenin apoptozda hayatta kalımıyla ilgilidir (1). *Ced-4* geninin homoloğu memelilerde proteini de aynı adlı olan *apaf-1* (apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1) genidir. *Ced-9* geninin homoloğu ise *bcl-2* dir ve bu da aynı adlı proteinler üretir. *C. elegans*'teki bir diğer gen olan *ced-3* ün memelilerdeki homoloğu, interlökin 1 β -dönüştürülmüş enzim (ICE=interleukin-1 β -converting enzyme)dir. Bugüne kadar memelilerde tanımlanmış 11 *ced-3* homoloğu protein vardır. İnsanda bu genin karşılaştığı proteinler kaspazlara karşılık gelir (1).

Apoptozis mekanizması

Apoptozis mekanizması oldukça karmaşık, kompleks ve enerji bağımlı moleküler aktivite kaskadını içerir. Bu güne kadar yapılan çalışmalar, intrinsek ve ekstrinsek olmak üzere apoptotik yolları gösterilmiştir (Şekil 2). Bazı araştırmacılar endoplazmik retikulum aracılığıyla hücre stresin kalsiyum salınımı ile ya mitokondriyal yol ile Kaspaz 12'yi aktive etmesiyle apoptozu indüklediği görüşünü savunurken (8), bazıları da intrinsek ve ekstrinsek yol ile bağlantılı ve bu yollardan birinin moleküllerini etkileyen başka bir apoptotik yolları olduğunu ileri sürerler. Bu yol, T hücre aracılığıyla sitotoksikite ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içerir (3). Ekstrinsek ya da intrinsek kaspaz-3'ün yarıklanması ile başlatılır. DNA frag-



Şekil 2: Apoptozun mekanizması

mantasyonu nükleer proteinler ve hücre iskeletinin bozulması, fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması, proteinlerin çapraz yer değiştirmesi, apoptotik cisimlerin oluşması, fagositik hücrelerin reseptörleri için ligandların eksprese edilmesi ve son olarak da fagositik hücrelerce ortadan kaldırılması ile sonuçlanır (3).

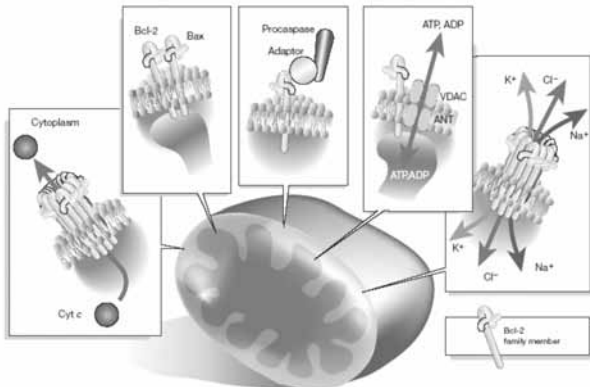
1. Ekstrinsek- ölüm reseptörleri yolu

Hücre zarı üzerinde bulunan 'ölüm reseptörlerinin' aktivasyonu ve virüs ile enfekte olan hedef hücrelerin ortadan kaldırılması, tümör hücrelerinin öldürülmesi ve birçok patolojik durumdaki hücrelerin uzaklaştırılması gibi olaylarda önemli rol oynar. FAS reseptörünün ligandı -FASL ve TNF reseptörünün ligandı -TNFR'dır. Fas, birçok hücre tipinde bulunur. Fas ligandı (FasL) da TNF ailesinin bir üyesidir (1,6). Fas ve TNFR-1'in ölüm bölgesi denen bir sitoplazmik uzantı (Death Domain, DD) içerir. Bu ölüm alanlarını Fas'ın sitoplazmik bölümü FADD ve TNFR'nin ise TRADD'dır. Ligandlar bağlandığında Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (TNFR) ya da Fas molekülü üçlü kompleks (TRADD) (FADD/Mort-1) oluşturur. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar "Ölümü Başlatan Sinyalleme Kompleksi (DISC)" denen yapıyı oluştururlar. Reseptörün uyarılmasıyla aktive olan bu trimer proteinler prokaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptozu doğ-

rudan uyarırlar. Aktive olan kaspaz-8 daha sonra diğer kaspazları aktive eder ve apoptoz süreci başlar (Şekil 2) (1,3).

2. İntrensek - mitokondrial yol

Mitokondri hücrenin enerji deposu olmasının yanında sitoplazmaya geçerek ölüm programını aktive eden faktörler salarak apoptozda büyük rol oynar. Bu faktörlerden en önemlisi sitokrom c dir. Apoptozu indükleyen mitokondride bulunan; AIF (gizemli apoptotik aktivite ilişkili flavoprotein), Sma c/ DIABLO, Omi / HtrA2, IAPs Endonükleaz G ve çok sayıda kaspas (prokaspas -2, -3 ve -9) tanımlanmıştır (6) (Şekil 3). İntrensek yolda özet olarak; ekstrasellüler ve intrasellüler faktörlerle UV, büyüme faktörü yoksunluğu gibi nedenlerle DNA da hasar oluşur ve bu hasar p53ü aktive (tümör suprese geni) eder. p53, çevresel şartlara ve hücre duruma göre hücre döngüsünün kontrolü, DNA tamiri ve sentezi, hücre farklılaşması, genomik şekillenme ve programlı hücre ölümünde görev alır (3). Bcl-2 ailesi proteinlerinin denetimindeki mitokondriden salınan sitokrom c sitozoldeki Apaf 1 ve Pro-kaspaz-9 ile birleşerek Apoptozom'u oluşturur ve Kaspaz 9 aktifleşerek kaspaz kaskadını etkinleştirir Kaspaz 3ün aktive olmasıyla da hücre ölüm süreci başlar (1).



*Hengartner M.O. (2000) The Biochemistry Of Apoptosis. Nature | Vol 407' den uyarlanmıştır.

Şekil 3: Apoptoz ve mitokondri

Kaspazlar, bu ölüm proteazları caspase (Sistein aspartik asit proteazlar) olarak bilinen ve birbirleriyle homolog büyük protein ailesidir. Kaspazlar, proteolitik yanklanmasıyla aktifleşen, inaktif granüller olarak üretilir Kaspazlar apoptotik yolun cellatlarıdır ve apoptozdaki karakteristik değişikliklerin en önemli sebebidir (6).

Bcl-2 ailesi; Protein-protein intereksiyonunu regüle eden Bcl -2 ailesi üyeleridir. Bcl-2 ailesi proteinler birkaç-heliks yumağını içeren benzer protein yapısındadır. Bunlar 4'e kadar numaralanan BH bölgesidir. Bcl-2 ile ilgili proteinler yapısal ve fonksiyonlarına göre 3 grupta toplanır (Şekil 4a):

1. Bcl-2 alt grubu antiapoptotik: Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-w'den oluşur, dört bölgeleri (BH1, BH2, BH3, BH4) kuvvetli benzerlik gösterir. Hepsinin aktivitesi vardır.

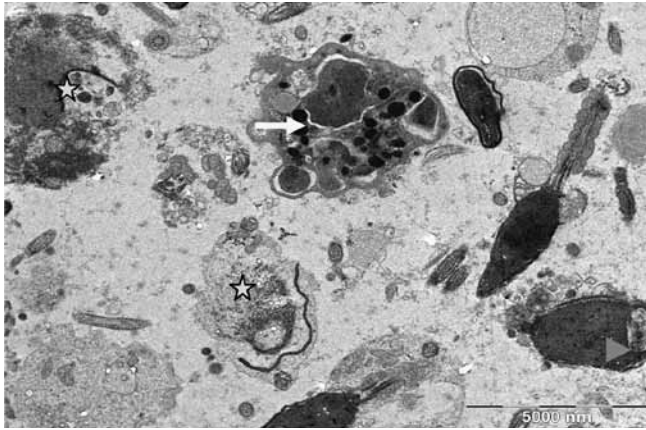
2. Bax alt grubu proapoptotik: Bax ve Bak'dan oluşur. BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinde Bcl-2'ye benzerlik gösterirler .

3. Bik alt grubu proapoptotik: Bik, Bid ve Bim'den oluşur. Bunlara yalnız BH3 bölgeleri Bcl-2'ye benzerlik gösterdiği için BH3 proteinler de denir.

Bax/ Bcl-2 Dengesi: Sağlıklı hücrede bax sitozolde bulunur. Bax / Bcl -2 dengesi hücre için çok önemlidir bu oranın değişmesi hücrenin apoptozu gidip gitmeyeceğini belirler. Bax sitokrom c salınımını indüklediğinden artışı hücre için ölümcül, Bcl-2 ise anti apoptotik olması nedeniyle sit-c salınımını bloke ettiğinden artışı hücre için hayatta kalım demektir (6).

Spermatogenez ve apoptoz

Son çalışmalar germ hücrelerinde spermatogenez sırasında apoptozun en önemli regüle edici mekanizma olduğunu göstermiştir. Apoptoz testislerde spermatogonia, spermatositler ve spermatidlerde yaygın olarak araştırılmış ve birçok apoptotik faktör tanımlanmıştır (9). Normal spermatogenez sırasında hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu spermatozoon oluşumunda kritik rol oynar. Sonuçta spermatozoon potansiyel sayısı tahminen %75'i kadar azalır. Testiküler germ hücre apoptozu fizyolojik ve devamlı olarak hayat boyu meydana gelir (10). Apoptozisin normal spermatogenez sürecinde iki önemli rolü vardır. Bunlardan ilki Sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek sayıda germ hücre popülasyonunu sınırlandırmak, ikincisi de anormal spermatozoonun azaltılmasında seçici olmaktadır (10,11). Sperm matürasyonu ve fonksiyonu fertilitiyle korelasyon gösterir ayrıca anormal spermatogenezde bir genin disfonksiyonel ekspresyonu sonucu olur. Oligozoospermik ve normozoospermik



Şekil 4: Ultrastrüktürel apoptotik sperm
(*): Nekrotik sperm (→): (Apoptotik cisimcikler - nükleer fragmentasyon) Apoptotik sperm (Δ): Spermde Nükleer vakuol (Yayınlanmamış data) 'den uyarlanmıştır (19).

gruplarda sperm konsantrasyonu ve normal morfoloji ve gen ekspresyonu oligozoospermik grupta normozoospermik gruba göre daha düşük bulunmuştur (12).

İnsan spermatozoonda apoptozisin varlığı yapılan çalışmalarda ortaya konduktan (13,14,15,16) sonra ejakulatta matür spermatozoonda apoptozisin varlığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Şekil 4) (10,13,14,16,17,18,19). Bu araştırmacılar somatik hücredeki kapsamlı DNA hasarına neden olan endojen endonükleazların aktivasyonu, üreme havuzundan defektli germ hücrelerinin eliminasyonu gerçekleştireceği görüşündedirler. Sakkas 1999'da apoptotik eliminasyon hatası sonucu ejakulattaki spermatozoonda görünen apoptozisi 'abortif apoptoz' olarak tanımlamıştır ve bu hücrelerin bir şekilde apoptozisten kaçtığını öne sürmüştür (11,16,20). Apoptozis çeşitli patolojilerin ve spermatogenez kontrol sistemlerinin kaldırılmasının sonucu olabilir (21). Yapılan bir çalışmada DNA hasarı ve muhtemel DNA tamirinin azalan seviyeleri karşısında apoptozisin, hatalı genetik bilginin embriyoya geçmesini engelleyen son basamak olduğu düşünülmüştür (22).

Erkek üreme sistemine lökositlerin büyük etkisi gösterilmiştir fakat seminal lökositlerin işlevi hala netlik kazan-

mamıştır. Spermatozoon apoptozisi semen kalitesiyle korelasyon göstermeyebilir. Ürogenital kanallardaki enfeksiyon yokluğunda; Seminal lökositlerin asıl fonksiyonlarından biri, apoptotik spermatozoayı ortadan kaldırmak olabilir (9). Spermatozoon apoptozisi ve spermatozoon DNA'sında hasar erkek infertilitesinin potansiyel belirleyicileri olarak kabul edilir. Apoptozis ile ortaya çıkan germ hücre kaybı, spermatogenez sırasında oluşur. p53, p21, CD 95 (16), Kaspaz-3 (23,24), Kaspaz 1-8 (24), Bcl-2, Bcl xl (10,25) ve Fas düzeyleriyle, değişik yollarla saptanabilmektedir. Kaspaz 1-3-8 postakrozomal bölgede, Kaspaz 9 ise orta parça (midpiece) bölgesinde gösterilmiştir (24).

Son çalışmalar antiapoptotik fonksiyon sergileyen ve spermatozoon matürite işareti olarak kabul edilen HspA2 adlı protein ve erkek fertilitesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Isı şoku proteini A2 (Heat-shock protein, HspA2) bir spermatozoon matürite işareti Hsp70 şaperon protein ailesinin üyesi olan testis spesifik proteindir. Hsp70-2 bloke edilen farelerde mayoz duraksamasına ek olarak karakteristik apoptotik DNA patern bozulmasıyla germ hücre apoptozisi artışı görülür. Yapılan çalışmalarda HspA2 gen ekspresyonu oligozoospermik grupta normozoospermik gruba göre daha düşük bulunmuştur (12). HspA2 ilk olarak primer ve sekonder spermatositte, daha sonra plazma membran yeniden şekillenmesi ve sitoplazmik artıklı uzamış spermatidde görüldü. İnsan ejakulatında düşük seviyede HspA2 tespit edilmiştir. Hsp70'in apoptoziste çalışma mekanizması, apoptotik enzimler olan Kaspaz-3 ve -9'un salınmasıyla gerçekleşir. Böylece HspA2, apoptotik sürecin olası inhibitörüdür (26). Başka bir araştırmacı seminal plazmada apoptoz inhibitörü bir protein olan survivinin üzerinde durmuştur. Aynı çalışmada normozoospermik erkeklerde oligozoospermiklere göre bu proteinin daha fazla olduğu, obstrüktif azospermik seminal plazmasında ise hiç bulunmadığını saptamıştır (27).

Kaynaklar:

1. Fauser BCJM, Rutherford AJ, Strauss JF, Van A; *Molecular biology in reproductive medicine.*; Parthenon Publishing Group Inc. New York. 1th Edition, 1999; 80-87
2. Kerr JFR. *History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept.*; *Toxicology.* 2002;181-182: 471-74.
3. Elmore S. *Apoptosis: A review of programmed cell death.*; *Toxicol Pathol.* 2007;35(4): 495-516
4. Majno G. & Joris I. *Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.*; *American Journal of Pathology.* 1995; 146: 3-15
5. Gewies A. *Introduction to apoptosis.*; 2003; Page 1-26. www.ihcworld.com/_books/apointro.pdf
6. Hengartner MO. *The Biochemistry of apoptosis.*; *Nature.* 2000; 407.
7. Yan N, Shi Y. *Mechanisms of apoptosis through structural biology.*; *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2005;21: 35-56

8. Fengzhi L. Apoptosis. *Oncology for scientists*. Hilleboe Auditorium: 2006. Available from: [Http://Hosted2.Roswellpark.Org/O4s/Slideshows/Fall2006/Apoptosis%20oncology%20class%20talk%20V2.Pdf](http://Hosted2.Roswellpark.Org/O4s/Slideshows/Fall2006/Apoptosis%20oncology%20class%20talk%20V2.Pdf)
9. Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, ve ark. Apoptosis in human sperm : Its correlation with semen quality and the presence of leukocytes.; *Hum Reprod*. 2002;17(10):2665 -72.
10. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal Nuclear Determinants of Reproductive Outcome: Implications For ART.; *Hum. Reprod Update*. 2005;11(4):337-349.
11. Sakkas D, Moffat O. Nature of dna damage in ejaculated human spermatozoa and possible involvement of apoptosis.; *Biol reprod*. 2002;66:1061-67.
12. Cedenho AP, Lima SB, Cenedeze MA, Spaine DM, ve ark. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa.; *Hum Reprod*. 2006 ;(21)7:1791-94.
13. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro.; *Biol reprod*. 1997; 56, 602-07.
14. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection.; *Fertil Steril*. 1998; 69(3):528-32.
15. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton PA, ve ark. DNA integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality.; *J Androl*. 2000; 21:33-44.
16. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, ve ark. Origin of dna damage in ejaculated human spermatozoa.; *Rev Reprod*. 1999; 4:31-37.
17. Lachaud C, Tesarik J, Cañadas, ML and Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa.; *Hum Reprod*. 2004; 19(3):607-10.
18. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E. Relationship between ROS production , apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility.; *Hum Reprod*. 2004;19(1):129-38.
19. Dogan S. Seminal plazma reaktif oksijen türlerinin (ROS) sperm DNA fragmentasyonu ve apoptozu sürecinde infertiliteye olan etkisinin değerlendirilmesi. DEÜ-Histoloji Embriyoloji Yüksek Lisans Tezi 2008. DEÜ- BAP tarafından 2008.Kb.Sag.003 sayı ile desteklenmiştir.
20. Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index.; *Hum Reprod*. 2007;22(5):1413-19.
21. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L. ve ark. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa.; *Hum Reprod*. 2000; 15(4):830-39.
22. Singh N.P, Muller C.H, Berger R.E. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm.; *Fertil Steril*. 2003;80(6):1420-30.
23. Weng SH, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A. ve ark. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm.; *Mol Hum Reprod*. 2002;8(10):984-91.
24. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A., Glandera H.J. Activation pattern of caspases in human spermatozoa.; *Fertil Steril*. 2003;81:802-9.
25. Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, ve ark. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm.; *Mol Hum Reprod*. 2004;10(5):365-72.
26. Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L .Putative creatine kinase M isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2.; *Biol Reprod* .2000; 63:925-32.
27. Roshdy N, Mostafa T. Seminal plasma survivin in fertile and infertile males.; *J Urol*. 2009; 181(3):1269-72.