



Hücrenin temel işlevlerine ilişkin mekanizmaların çözülmesini sağlayan bilimsel çalışmaların Fizyoloji veya Tıp dalında Nobel Ödülü getirdiğine sıklıkla şahit oluyoruz.

Bu yılki Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'ne de yine önemli bir hücresel işlevin, otofajinin işleyişinin ayrıntılı olarak ortaya çıkarılmasına yönelik yaptığı büyük katkılardan dolayı Yoshinori Ohsumi adlı bilim insanı layık görüldü.

**Nobel Fizyoloji veya
Tıp Ödülü
Otofaji Araştırmalarının
Pirine:**

**Yoshinori
Ohsumi**



Ohsumi hücrenin bileşenlerinin parçalanmasını ve geri dönüştürülmesini sağlayan temel bir süreç olan otofajinin işleyiş mekanizmalarını keşfetti ve aydınlattı. Otofaji (İngilizce *autophagy*) sözcüğü “kendi” anlamına gelen Yunanca *auto-* ön ekinden ve yemek anlamına gelen yine Yunanca *phagein* sözcüğünden geliyor. Dolayısıyla otofajinin kelime anlamı “kendi kendini yemek” demek. Bu kavram ilk kez 1960’lı yıllarda araştırmacıların hücrenin kendi bileşenlerini zarlarla çevreleyip kese benzeri yapılar oluşturduğuna ve daha sonra bunları lizozom adlı geri dönüşüm birimine taşıdığına ilişkin gözlemler yapması sonucunda ortaya çıktı. Olgunun araştırılmasındaki zorluklardan dolayı konuyla ilgili bilgiler uzun süre kısıtlı kaldı.

Ta ki Yoshinori Ohsumi 1990’ların başında bir dizi dâhiyane deneyle ekmeke mayasında otofaji için gerekli temel genleri ortaya çıkarana kadar. Ohsumi daha sonra mayada otofajinin işleyiş mekanizmalarını aydınlatan ve benzer gelişmiş bir sistemin insan hücrelerinde de bulunduğunu gösteren çalışmalar yaptı.

Ohsumi’nin keşifleri hücrenin bileşenlerini nasıl geri dönüştürdüğüne ilişkin anlayışımızda bir paradigma değişimine neden oldu. Yaptığı keşifler otofajinin açlığa uyum sağlama ve enfeksiyonlara verilen tepki gibi pek çok fizyolojik süreçteki hayati öneminin anlaşılmasının yolunu açtı. Otofaji genlerindeki mutasyonlar hastalığa yol açabiliyor. Otofajik süreçlerin kanser ve nörolojik hastalıklar gibi pek çok sağlık sorunuyla ilişkili olduğu biliniyor.

Tüm Canlı Hücrelerdeki Temel Bir İşlev: Yıkım

1950'lerin ortalarında araştırmacılar hücredeki özelleşmiş bölmeler olan organellerin proteinleri, karbonhidratları ve yağları sindiren enzimler içeren yeni bir çeşidini gözlemledi. Lizozom adı verilen bu organel, hücre bileşenlerinin yıkılması yani parçalanarak yapı taşı moleküllerine ayrılması için bir atölye işlevi görüyor. Belçikalı bilim insanı Christian de Duve lizozomu keşfinden dolayı 1974'te Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü aldı. 1960'larda yapılan yeni gözlemler hücre içeriğinin büyük kısımlarının, hatta bütün haldeki organellerin zaman zaman lizozomun içinde bulunabildiğini gösterdi. Görünüşe göre hücrenin büyük yükleri lizozoma taşımak için bir stratejisi vardı. Sonraki biyokimyasal ve mikroskobik incelemeler hücredeki birtakım yükleri yıkılmak üzere lizozoma taşıyan yeni bir kesecik tipi olduğunu ortaya koydu (Şekil 1). Lizozomun kâşifi Christian de Duve bu süreci tasvir etmek için "kendi kendini yeme" anlamındaki otofaji terimini kullandı. Yeni keseciklere ise otofagozom adı verildi.

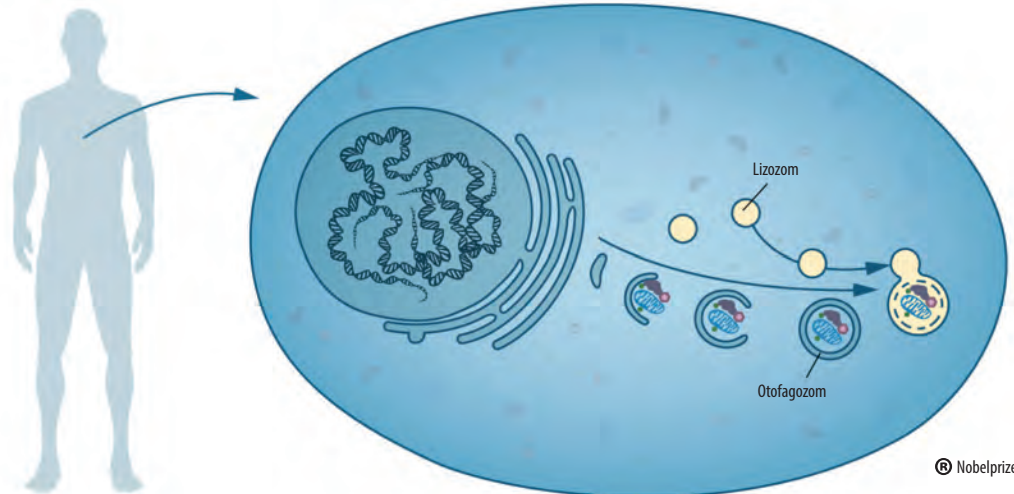
1970'lerde ve 1980'lerde araştırmacılar proteinlerin yıkımında kullanılan "proteazom" adlı başka bir sistemi aydınlatmaya odaklandı. Bu alanda çalışan Aaron Ciechanover, Avram Herhsko ve Irwin Rose ubiquitinle yönlendirilen protein yıkımını keşiflerinden dolayı 2004'te Nobel Kimya Ödülü'nü kazandı. Proteazom, proteinleri etkin bir biçimde tek tek parçalayan bir sistem, ancak bu mekanizma hücrenin daha büyük protein komplekslerini ve yıpranmış organelleri nasıl parçaladığını açıklamıyordu. Acaba otofaji bunun cevabı olabilir miydi ve eğer öyleyse bunun altındaki mekanizmalar neydi?

Çığır Açıcı Bir Deney

Yoshinori Ohsumi çeşitli araştırma alanlarında etkinlik göstermişti, ancak 1988'de kendi laboratuvarını kurduğunda çalışmalarını vakuol içindeki protein yıkımı üzerine yoğunlaştırdı. Vakuol insan hücrelerindeki lizozomun maya hücrelerindeki karşılığı olan organel. Maya hücreleri, üzerinde çalışılması daha kolay olduğu için sıklıkla insan hücreleri yerine model olarak kullanılıyor. Maya hücreleri özellikle karmaşık hücre yolaklarındaki (belirli bir işlevi gerçekleştiren biyokimyasal olaylar silsilesi) genlerin belirlenmesinde faydalı oluyor. Ancak Ohsumi'nin önünde önemli bir zorluk vardı; maya hücreleri küçüktü ve iç yapısı mikroskop altında ayırt edilemiyordu, dolayısıyla Ohsumi otofajinin bu canlıda var olduğundan bile emin olamıyordu. Ohsumi, otofaji süreci etkinken vakuoldeki yıkım sürecini sekteye uğratmayı başarırca otofagozomların vakuol içinde birikip mikroskop altında görünür hale geleceğini düşündü. Bunun için de vakuole ait yıkım enzimlerinden yoksun mutant (mutasyon geçirmiş) maya hücrelerini kültür ortamında büyütüp sonra da aç bırakarak bu hücrelerde otofaji sürecini tetikledi. Sonuçlar çarpıcıydı! Saatler içinde vakuoller parçalanmamış küçük keseciklerle dolmuştu (Şekil 2). Bu kesecikler otofagozomlardı ve Ohsumi'nin deneyi otofajinin maya hücrelerinde de gerçekleştiğini kanıtlamıştı. Ancak daha da önemlisi artık Ohsumi'nin elinde otofaji sürecinde rolü olan genleri belirlemek ve tanımlamak için yeni bir yöntem vardı. Bu çığır açıcı bir gelişmeydi ve Ohsumi elde ettiği sonuçları 1992'de yayımladı.

Şekil 1:

Hücrelerimizde birbirinden farklı, özelleşmiş bölmeler bulunur. Lizozomlar bu bölmelerden biridir ve hücre bileşenlerinin sindirimi için gerekli enzimler içerirler. 1960'larda yapılan gözlemlerde otofagozom adı verilen yeni bir kesecik tipi keşfedilmişti. Otofagozom oluşurken hücresel bileşenleri, örneğin zarar görmüş proteinleri içine alıyor. Sonunda lizozomla birleşiyor ve otofagozomun içindeki atık hücre bileşenleri burada daha küçük parçalara ayrılıyor. Bu süreç hücreye beslenme ve yenilenme için gerekli yapı taşlarını sağlıyor.



Otofaji Genleri Tanımlanıyor

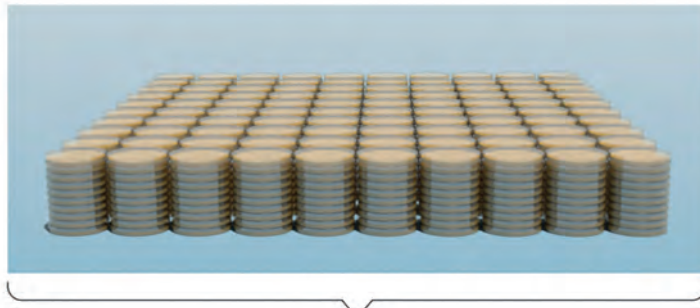
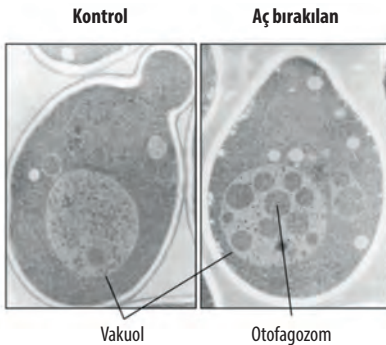
Ohsumi artık aç bıraktıklarında vakuollerinde otofagozomlar biriken, genetik değişikliğe uğratılmış maya soylarının avantajını kullanmaya başlamıştı. Otofaji için önemli olan genler etkisizleştirildiğinde bu birikimin gerçekleşmemesi gerekiyordu. Ohsumi maya hücrelerini pek çok gende rastgele mutasyonlar oluşturan bir kimyasal maddeye maruz bıraktı ve sonra da bu hücrelerde otofajiyi tetikledi. Stratejisi işe yaradı! Mayada otofaji olduğunu göstermesinden sonraki bir yıl içinde otofaji için gerekli ilk genleri keşfetti. Daha sonra yaptığı bir dizi muhteşem çalışmada bu genlerin kodladığı proteinleri işlevsel olarak tanımladı. Sonuçlar otofajinin bir olaylar silsilesi tarafından kontrol edildiğini gösteriyordu. Bu silsilede çeşitli proteinlerin ve protein komplekslerinin her biri otofagozom başlangıcının ve oluşumunun belirgin bir aşamasını düzenliyordu (Şekil 3). Ohsumi kilit önem taşıyan otofaji genlerinin kodladığı proteinleri inceledi. Stres sinyallerinin otofajiyi nasıl başlattığını ve proteinlerin ve protein komplekslerinin otofagozom oluşumunun belirgin aşamalarını yönlendirme mekanizmasını ayrıntılarıyla ortaya koydu.

Ohsumi Otofaji Genlerini Keşfediyor

1990'ların başında o zaman Tokyo Üniversitesi'nde yardımcı doçent olan Yoshinori Ohsumi tohumculanan bir maya türü olan *Saccharomyces cerevisiae*'yi model organizma olarak kullanıp otofaji sürecini araştırmaya karar verdi. Üzerinde yoğunlaştığı ilk soru otofajinin çok hücreli bir canlıda var olup olmadığıydı. Mayadaki vakuol memelilerdeki lizozomun karşılığıydı. Ohsumi eğer mayada otofaji varsa vakuol enzimlerinin engellenmesinin, vakuol tarafından yutulmuş olan sitoplazma bileşenlerinin vakuol içinde birikmesine yol açacağı yönünde bir mantık yürüttü. Bu hipotezini sınamak için de vakuol proteazlarından (protein parçalayıcı enzim) proteinaz A, proteinaz B ve karboksi-peptidazdan yoksun mutant maya soyları geliştirdi. Genetiği değiştirilmiş bu mayalar besince fakir ortamda büyütüldüğünde otofajik cisimciklerin vakuolde biriktiğini ve mikroskop altında gözlemlenebilen anormal büyüklükte vakuoller oluştuğunu gördü. Böylece Ohsumi otofajinin başlamasını kontrol eden genleri keşfederken kullanılabileceği eşsiz bir fenotip (belirli bir genotip yani genetik özellik sonucunda görülen somut özellik) elde etmiş oldu. Vakuol pro-

teazlarından yoksun maya hücrelerinde rastgele mutasyonlar oluşturdu ve vakuol içinde otofajik cisimcikler biriktiremeyen ilk mutant maya hücrelerini elde etti. Bu hücrede mutasyona uğramış olan gene otofaji 1 (*APG1*) adını verdi. Daha sonra *APG1* mutantının azotça fakir ortamda yabani tip maya hücrelerine göre daha kısa sürede öldüğünü gözlemledi. İkinci bir tarama için bu yeni fenotipteki mayaları kullandı ve 75 çekinik mutasyon daha keşfetti. Bu mutasyonlar farklı tamamlayıcı gruplar altında toplanıyordu. (Eğer farklı mutasyonlar aynı gende yer alıyorsa, bu iki mutasyona sahip bireylerin çiftleşmesi sonucunda oluşan bireyde genin sağlam kopyayla tamamlanması mümkün olmadığından, bu iki mutant genin aynı tamamlayıcı gruba dâhil olduğu kabul edilir. Dolayısıyla her bir tamamlayıcı grup bir geni temsil eder.) Ohsumi 1993'te *FEBS Letters*'de yayımladığı makaleyle ökaryotik hücrelerde otofajinin etkinleşmesi için hayati önem taşıyan 15 gen keşfettiğini duyurdu. Bu genleri *APG1-15* şeklinde adlandırdı. Daha sonra yeni otofaji genleri belirlendikçe *ATG* kısaltmasının kullanıldığı daha standart bir isimlendirme sistemi benimsendi.

© Nobelprize.org

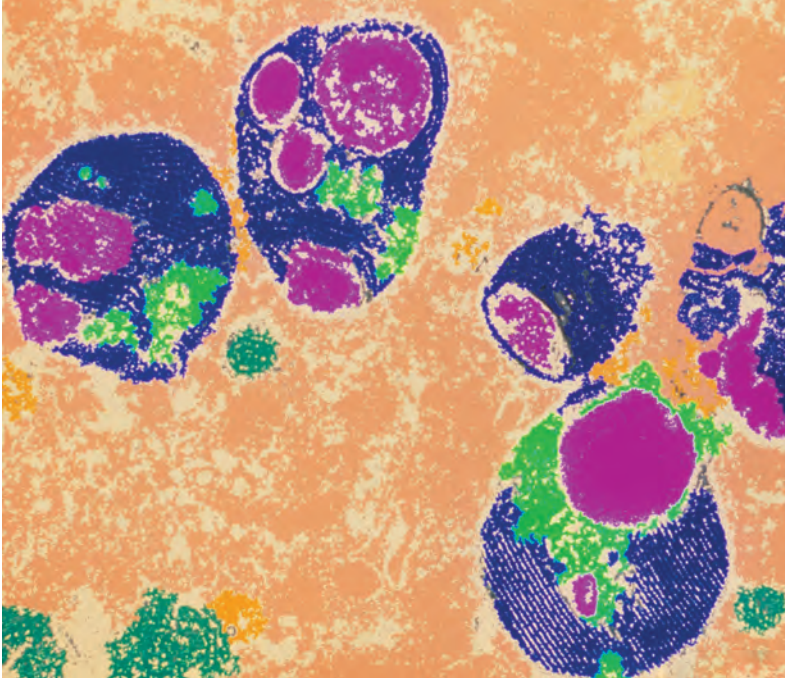


15 gen

Şekil 2:

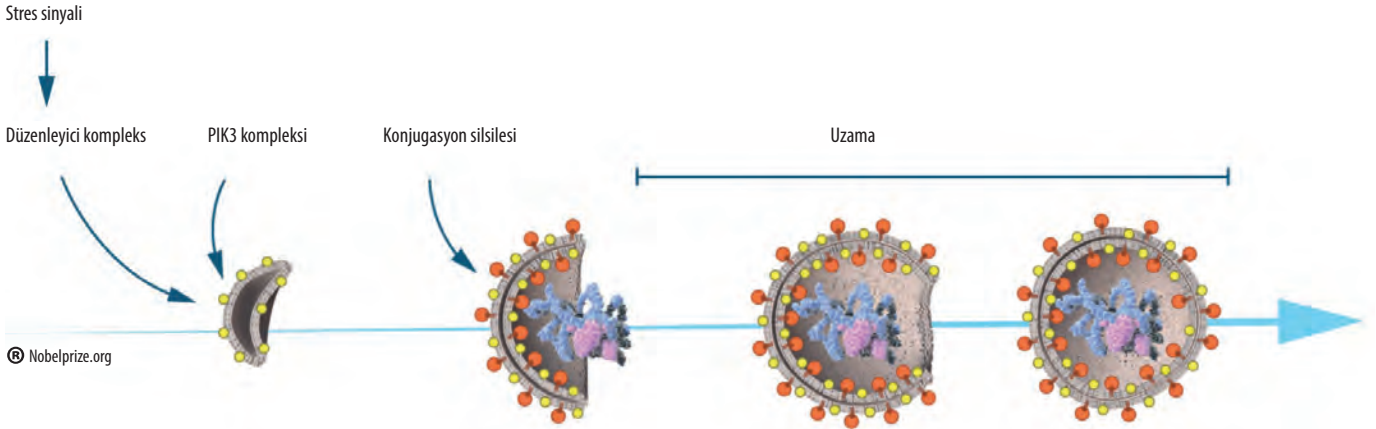
Mayada (solda) bulunan vakuol adlı büyük bölme memeli hücrelerindeki lizozoma karşılık gelir. Ohsumi yıkım için gerekli vakuol enzimlerinden yoksun mutant maya hücreleri oluşturdu. Bu maya hücreleri aç kaldığında otofagozomlar hızla vakuol içinde birikir (ortada). Ohsumi'nin deneyi otofajinin mayada da gerçekleştiğini kanıtladı. Sonraki adımda Ohsumi mutant mayayı (sağda) inceleyerek otofaji süreci için hayati önem taşıyan 15 geni belirledi.

Memeli böbrek hücreesindeki lizozomların renklendirilmiş geçirimsiz elektron mikroskopu (TEM) görüntüsü. Lizozomlar (mavi) sindirim enzimleri içerir. Burada lizozomlar atık hücre organellerini ya da hücredeki hasar görmüş molekülleri (yeşil/mor) sindiriyor. Sindirim ürünleri lizozom zarından geçerek sitoplazmaya (pudra rengi) dağılıyor.



Otofajinin Farklı Türleri

Ohsumi'nin temel buluşlarından sonra artık parçalanmak üzere taşınan yüke bağlı olarak otofajinin farklı alt türleri olduğu görülüyor. Otofajinin en kapsamlı olarak incelenmiş türü olan makrotofaji sitoplazmanın büyük kısımlarının ve hücresel organellerin parçalanmasında rol oynuyor. Seçici olmayan otofaji sürekli gerçekleşiyor ve açlık gibi stres durumlarında etkin biçimde tetikleniyor. Bunun dışında belirli hedeflere -protein birikintilerine, sitoplazmik organellere ve istilacı virüs ve bakterilere- yönelik seçici otofajide, bu hedefleri tanıyan ve bunları otofagozom zarındaki özel bir proteine yönlendiren belirli adaptörler rol alıyor. Lizozom zarının içeri kıvrılmasıyla sitoplazmik malzemelerin doğrudan yutulması şeklindeki mikrotofaji ile şaperonla yönlendirilen otofaji (CMA), otofajinin diğer alt türleri arasında. CMA'da özel tanıma sinyalleri taşıyan proteinler bir şaperon kompleksine bağlanarak doğrudan lizozoma taşıyor.



Şekil 3:

Ohsumi kilit önem taşıyan otofaji genlerinin kodladığı proteinleri inceledi. Stres sinyallerinin otofajiyi nasıl başlattığını ve proteinlerin ve protein komplekslerinin otofagozom oluşumunun belirgin aşamalarını yönlendirme mekanizmasını ayrıntılarıyla ortaya koydu.

Hücrelerimizdeki Hayati Bir Mekanizma: Otofaji

Mayada otofajinin işleyiş mekanizmasının belirlenmesinden sonra geride önemli bir soru kalmıştı. Diğer canlılarda da bu süreci benzer bir mekanizma mı kontrol ediyordu? Kısa süre içinde neredeyse aynı mekanizmaların insan hücrelerinde de işlev gördüğü açığa çıktı. İnsanlarda otofajinin önemini araştırmak için gerekli araçlar artık mevcuttu.

