|  |  |
| --- | --- |
| Blog Entry | APOPTOSIS  |

Actieve celdood

|  |
| --- |
| http://www.kennislink.nl/upload/5_26_empty.gif |
| http://www.kennislink.nl/upload/5_26_empty.gif |
| http://www.kennislink.nl/upload/5_26_empty.gif |

**De dood als natuurlijk en onvermijdelijk aspect van het leven is een onderwerp dat wetenschappers uit velerlei disciplines bestuderen. Zo ook celbiologen. Het is al lang bekend dat de dood van afzonderlijke cellen noodzakelijk is voor de vormgeving en het functioneren van meercellige organismen. Treedt er op de juiste plaats en op het juiste moment geen celsterfte op, dan kan dat dramatische gevolgen hebben. Zonder celsterfte kunnen nooit de goede verbindingen ontstaan tussen de miljoenen cellen in de hersenen en kan het afweersysteem zich niet ontdoen van ongewenste witte bloedcellen die gezonde weefsels in het eigen lichaam afbreken.**

Celdood treedt verder massaal op bij dieren die tijdens hun leven een gedaanteverandering ondergaan, zoals insekten of amfibie챘n. Zo gaan bij insekten tijdens het popstadium de embryonale organen vrijwel helemaal te gronde, waarbij de afbraakprodukten als bouwmateriaal dienen voor de volwassen organen. Een ander voorbeeld is de verandering van kikkervisje tot kikker, waarbij staart en kieuwen volledig worden afgebroken voordat de volwassen vorm ontstaat.

**Apoptose en necrose**

Er is een duidelijk verschil tussen necrotische en apoptotische processen. Apoptose ofwel actieve celdood is een onmisbaar proces bij de ontwikkeling van een organisme.

Actieve celdood kent een aantal stadia die onder de elektronenmicroscoop meestal duidelijk te herkennen zijn. Een cel - soms ingebed in ogenschijnlijk gezond weefsel - verliest door vormverandering allereerst het contact met zijn buren. Hij wordt ook aanzienlijk kleiner, maar de meeste celorganellen, zoals die voor de energievoorziening of de eiwitsynthese, blijven goeddeels intact. Het complex van DNA en eiwitten in de celkern condenseert vervolgens tot karakteristieke halve maantjes langs de kernmembraan en vaak valt de celkern na enige tijd uiteen. De cel krijgt dan opvallende kratervormige instulpingen en uiteindelijk valt de cel uiteen in brokstukken, die al of niet een deel van de oorspronkelijke celkern bevatten. Het hele proces verloopt doorgaans bijzonder snel. Er lekt bijna niets uit de cellen of celfragmenten en er doen zich derhalve nauwelijks ontstekingsreacties voor. Vaak worden de fragmenten snel en gemakkelijk opgenomen door naburige cellen of cellen die gespecialiseerd zijn in dit opruimingsproces (macrofagen), om vervolgens volledig te worden verteerd.

Voor actieve celdood is de - aan het Grieks ontleende - term apoptose bedacht, een woord dat beschrijft hoe bomen in de herfst of bloemen bij het verwelken geleidelijk hun blaadjes verliezen. Ook als deze kenmerken gedeeltelijk ontbreken, wordt het begrip apoptose gebruikt. Dat is bijvoorbeeld het geval bij de degeneratie van intersegmentale spieren tijdens de metamorfose van insekten of bij het afsterven van bepaalde zenuwcellen in ons lichaam tijdens de embryonale ontwikkeling.

Een en ander staat in schril contrast met een vorm van celdood die het gevolg kan zijn van een acuut zuurstoftekort of zware vergiftiging. In zo’n geval zwelt de cel juist op, allerlei onmisbare celstructuren raken onherstelbaar beschadigd, de cel barst uit elkaar en verliest zijn inhoud. Meestal gaan cellen dan massaal te gronde, wat ter plaatse resulteert in een flinke ontstekingsreactie. Deze pathologische celdood staat bekend als necrose.

**Het embryo**

Het optreden van apoptose in het rode gebied van dit jonge weefsel stuurt de ontwikkeling van de vleugelvorm.

SEM-foto's laten twee stadia in de ontwikkeling van de vleugel van een kwartelembryo zien.

Bij de ontwikkeling van bevruchte eicel tot volwassene spelen diverse processen een rol. Celdeling (toename van cellenaantal), differentiatie (ontstaan van verschillende celtypen) en migratie (verplaatsing van cellen naar een doelorgaan) zijn voorbeelden hiervan. Ook apoptose is bij deze ontwikkeling van belang.

De actieve celdood treedt meestal lokaal op en in een bepaalde ontwikkelingsfase. Een fraai voorbeeld hiervan is de vorming van handen en voeten. In een vroeg stadium zijn die peddelvormig, zonder vingers en tenen. Op een zeker moment groeien kleine delen van de peddel sneller dan tussenliggende gebieden en groeien vingers en tenen uit. In de tussenliggende gebieden komt op grote schaal apoptose voor, zodat de weefselgroei er achterblijft. Verhindert men experimenteel het optreden van apoptose, dan ontstaan er aaneengegroeide vingers, een afwijking die bij de mens syndactylie heet.

Het aardige is nu dat het aantal apoptotische cellen bij verwante diersoorten kan vari챘ren. Een embryonale eendepoot toont minder apoptose dan een kippepoot in ontwikkeling. Een eend houdt dan ook zwemvliezen tussen de tenen, terwijl een kip volledig gescheiden tenen heeft. Eenzelfde verschil bestaat er tussen bijvoorbeeld land- en zeeschildpadden.

Ook bij het ontstaan van het verschil in sekse speelt apoptose een belangrijke rol. Het verschil in bouw van de inwendige geslachtsorganen is hormonaal gereguleerd. De produktie van geslachtshormonen door de geslachtsklier (eierstok of zaadbal) komt echter pas relatief laat op gang. Voor die tijd zijn er twee sets afvoerwegen van de geslachtsklieren aanwezig en is een embryo eigenlijk gedeeltelijk tweeslachtig. Onder invloed van mannelijke en vrouwelijke geslachtshormonen degenereert 챕챕n van beide afvoergangen. Bij het vrouwtje blijven zo de primitieve eileider en baarmoeder bestaan en bij het mannetje de primitieve zaadleider. Door experimenteel geslachtshormoon toe te dienen, kunnen we het apoptoseproces be챦nvloeden, zodat de verkeerde afvoerbuis blijft bestaan. Bij de ontwikkeling van bijna alle grote orgaanstelsels (van zenuwen, hart, skelet en darm) blijkt apoptose een kritische rol te spelen bij de totstandkoming van de uiteindelijke vorm.

**Na de geboorte**
Ook na de geboorte komt celdood nog voor, bijvoorbeeld in het slijmvlies van maag en darm. De cellen van de slijmvlieslaag worden iedere paar dagen vervangen door nieuwe. De ontlasting bestaat dan ook deels uit afgestorven slijmvliescellen.

Bij de opbouw van de afweermechanismen in een lichaam is het van belang dat lymfocyten, een type witte bloedcellen, bij hun opruimactiviteiten onderscheid maken tussen lichaamsvreemde en lichaamseigen stoffen. In feite reageren onrijpe T-lymfocyten - de T komt van thymus (zwezerik) - met beide, maar de cellen die met lichaamseigen eiwitten in aanraking zijn gekomen, gaan te gronde. Dat is maar goed ook, anders zouden onze afweercellen het lichaam van binnenuit afbreken. Meer dan 95 procent van de onrijpe T-cellen in de thymus gaat op deze wijze dood.

**Regulatie van actieve celdood**

Deze stamboom van de cellen van het ringganglion van een nematode geeft aan dat vele cellen volgens een vast programma tijdens de embryonale ontwikkeling te gronde gaan.

De actieve celdood of apoptose kent vele varianten en er zijn veel manieren om het proces in gang te zetten. Soms lijkt er sprake te zijn van een ingebouwde activatie van het ‘celdoodprogramma’, maar meestal zijn factoren buiten de cel verantwoordelijk. Dat kunnen bepaalde hormonen zijn die binden aan receptormolekulen in de celmembraan of in het cytoplasma, die op hun beurt allerlei molekulaire boodschappers activeren of direct hun weg zoeken naar de celkern. Het eindresultaat is dat DNA wordt vertaald in eiwitten die verantwoordelijk zijn voor de apoptose.

Het kan echter ook zo zijn dat cellen als het ware van nature al in de startblokken staan om een actieve celdood te sterven, maar hiervan worden weerhouden door de aanwezigheid van ‘overlevingsfactoren’. Daalt de concentratie van die factoren in de omgeving van de bewuste cellen te ver, dan kan dit onmiddellijk consequenties hebben. Zo zijn er sterke aanwijzingen dat bij de ontwikkeling van een deel van het autonome zenuwstelsel, cellen met elkaar strijden om een bepaalde overlevingsfactor die wordt uitgescheiden door het orgaan waar de zenuw naar toe leidt. Onze genen dicteren namelijk niet altijd precies hoeveel cellen van een bepaald type op een bepaalde plaats moeten worden geproduceerd. De uiteindelijke omvang van een spier bijvoorbeeld staat bij voorbaat niet helemaal vast. Vandaar dat voor de zenuwvoorziening van die spier een overmaat aan zenuwcellen wordt aangemaakt, cellen die vervolgens een competitie op leven en dood aangaan.

Interessant is dat behalve deze fysiologische factoren ook factoren die een serieuze bedreiging voor cellen vormen, zoals straling of giftige stoffen, apoptose kunnen veroorzaken. Vooral cellen en weefsels met een hoge celdelingsactiviteit zijn hier gevoelig voor. Mogelijk voorkomt apoptose dat onherstelbare schade aan het DNA wordt overgedragen op de volgende generatie cellen. Als genetische veranderingen namelijk de groeiregulatie ontwrichten kunnen celwoekeringen (tumoren) ontstaan, zodat het organisme vroegtijdig sterft. In feite zou je hier dus kunnen spreken van een soort onbaatzuchtige celdood.

De complexiteit van het apoptoseproces doet vermoeden dat er een heel scala aan genen aan te pas komt. Hoewel daar in hogere organismen nog maar weinig van zijn beschreven, heeft onderzoek aan een tamelijk primitief organisme, het aaltje Caenorhabditis elegans, al heel wat opgeleverd. Van de 1090 cellen die tijdens de embryonale ontwikkeling van dit wormpje ontstaan, gaan er exact 131 dood. De meeste van deze cellen bevinden zich in het ringganglion, een zenuwknoop aan de kopzijde.

Er zijn twee genen gevonden die betrokken zijn bij het activeren van die celdood: ced-3 en ced-4. Genetische veranderingen (mutaties) in deze genen kunnen ertoe leiden dat cellen die geacht worden dood te gaan, (langer) blijven leven. Inmiddels is er een ander gen gekarakteriseerd, ced-9, dat de werking van ced-3 en ced-4 tegengaat en dus cellen van hun geprogrammeerde ondergang lijkt te redden. Dit ced-9-gen nu blijkt een tegenhanger te hebben bij de mens, het bcl-2-oncogen. Dit laatste gen kan de functie van ced-9 overnemen in C. elegans-wormen waarin ced-9 experimenteel is uitgeschakeld.

***Intermezzo***

**DNA-ladderpatronen**

Een DNA-histogram toont de met DNA-flowcytometrie gemeten DNA-inhoud van een aantal cellen. In de onbehandelde situatie zijn er twee pieken, namelijk normale cellen en cellen die hun DNA-inhoud net hebben verdubbeld. Bij apoptose is er een derde, brede piek met geringere DNA-inhoud.

Een opvallend biochemisch kenmerk van actieve celdood is dat door het vrijkomen van bepaalde enzymen het DNA in de celkern stapsgewijs in stukjes wordt geknipt. Eerst ontstaan DNA-fragmenten met een lengte van ongeveer 300 000 basenparen, die vervolgens weer worden gsplitst in stukken van zo’n 50 000 basenparen. In sommige celtypen nu worden die laatste fragmenten, vermoedelijk door toedoen van het enzym deoxyribonuclease I, in nog kleinere fragmenten geknipt. Dit knippen gebeurt niet op volstrekt willekeurige plaatsen in het DNA-molekuul, maar wordt bepaald door het feit dat het DNA in de celkern op een speciale manier is geordend. Bouwsteen is het nucleosoom, een complex van eiwitten waar twee lussen van de DNA-spiraal met een totale lengte van ongeveer 180 basenparen omheen zijn gewonden. Onder normale omstandigheden knipt het genoemde enzym vrijwel uitsluitend tussen de nucleosomen, waarschijnlijk ergens waar het DNA minder goed door eiwitten is afgeschermd. De zo ontstane DNA-fragmenten bestaan dus uit een veelvoud van circa 180 basenparen. Onlangs is aangetoond dat dit knippen vooral plaatsvindt in het ‘actieve’DNA (waar genen worden overgeschreven in boodschapper-RNA-molekulen en waar het DNA dus minder compact is).

Men kan het DNA uit celkernen isoleren en onderwerpen aan agarose-gelelektroforese, waarmee DNA-fragmenten van verschillende lengten te scheiden zijn. Het DNA, dat van eiwitten is ontdaan, wordt opgebracht op de gel en de negatief geladen molekulen bewegen zich langzaam naar de positieve elektrode. Hoe kleiner de fragmenten, hoe sneller ze zich verplaatsen. Wanneer apoptotische cellen alle stappen van het fragmentatieproces doorlopen hebben, kan zo’n agarose-gel na kleuring van het DNA een heel karakteristiek ladderpatroon laten zien. Dit is een veel gebruikte methode om aan te tonen dat een celpopulatie inderdaad apoptotische cellen bevat. DNA dat geïsoleerd is uit afstervend weefsel waarin het DNA van de dode cellen uiteindelijk eveneens wordt afgebroken, levert in het algemeen geen duidelijk ladderpatroon.

Een nadeel van deze methode is dat het ladderpatroon een slechte maat is voor de hoeveelheid apoptotische cellen in een weefsel. Kwantitatieve informatie kan men eigenlijk alleen maar krijgen door alle cellen afzonderlijk te analyseren. Met fluorescerende kleurstoffen die aan het DNA in de kern binden en speciale detectie-apparatuur, de flowcytometer, kan men van elke cel afzonderlijk de DNA-inhoud meten. Na een speciale voorbehandeling blijken apoptotische cellen minder sterk te kleuren. Mogelijk bevatten ze minder DNA, doordat tijdens de voorbehandeling de kleinste DNA-fragmentjes zijn verdwenen. Het aantal cellen met een kleinere DNA-inhoud dan normaal is dan een redelijke maat voor het aantal apoptotische cellen.

Het is sinds kort ook mogelijk om in afzonderlijke cellen de breuken in het DNA aan te tonen: na een voorbehandeling voegt men aan cellen een enzym toe, DNA-polymerase, dat toegevoegde DNA-bouwstenen (nucleotiden) aan die breukpunten kan koppelen. Zo’n nucleotide kan gemerkt zijn met een fluorescerende stof of met een enzym dat een toegevoegd substraat omzet in een kleurstof. Deze methode is dan bruikbaar voor flowcytometrische analyse van losse cellen, maar ook voor microscopisch onderzoek van dunne plakjes weefsel. Doordat apopto-se zo’n snel en efficiënt proces is, ziet men het zo weinig optreden in de meeste weefsels. Kleuring van de losse uiteinden van DNA-fragmenten vergemakkelijkt het opsporen van apoptotische cellen enorm.

*Einde intermezzo*

**Afweersysteem**
Sommige witte bloedcellen uit de groep van zogenaamde B-lymfocyten zijn afhankelijk van groeifactoren, eiwitten die groei en celvermeerdering reguleren. Zonder deze groeifactoren gaan de cellen dood door apoptose. Bij een bepaalde vorm van de bloedziekte leukemie komt het bcl-2-kankergen (een gen voor woekering van B-lymfocyten) in hoge mate tot expressie. Dat wil zeggen dat er op gezag van dit gen veel van het bijbehorende blc-2-produkt (blc-eiwit) wordt gevormd. Het gevolg is in dit geval dat cellen die normaal zouden moeten doodgaan, langer in leven blijven. Dat verhoogt weer de kans op genetische veranderingen in genen die de celdeling reguleren en dus op celwoekering. Het verrassende effect van een van deze groeiregulatiegenen, myc, is tweeledig: dit gen kan bevorderen dat cellen blijven delen, maar het kan ook actieve celdood stimuleren. Als er geen myc-produkt aanwezig is, gebeurt geen van beide. Is dat produkt er wel, dan zal de beslissing ‘deel of sterf’ afhangen van de verdere signalen die de cel ontvangt. Laboratoriummuizen met een verhoogde expressie van zowel het bcl-2- als het myc-gen, vertonen meer B-lymfocytwoekeringen dan wanneer slechts een van beide genen aanwezig is.

**Behandeling van kanker**
Zoals gezegd kan het verdwijnen van cellen door apoptose een soort bescherming bieden tegen de gevolgen van een teveel aan DNA-schade, vooral in organen waarin cellen zich voortdurend delen. Zo heeft recent onderzoek met proefdieren aangetoond dat straling of giftige stoffen - in doseringen zoals bij kankerbehandelingen - enkele uren na toediening apoptose veroorzaken in de cellen die zorgen voor de opbouw van het dunne-darmslijmvlies. Juist in deze stamcellen kunnen bepaalde genetische veranderingen resulteren in tumorgroei. Ook in de dikke darm veroorzaken deze behandelingen apoptose, alleen zijn het hier eerder de nakomelingen van de stamcellen die doodgaan dan de stamcellen zelf. Wellicht zou dit verschil in stamcelgevoeligheid voor straling of toxische stoffen kunnen verklaren waarom dikke-darmkanker veel vaker voorkomt dan kanker aan de dunne darm.

Een gen dat cruciaal lijkt voor de detectie van DNA-schade met de daaraan gekoppelde aanzet tot apoptose is het p53-gen. Onlangs hebben onderzoekers gevonden dat witte bloedcellen van muizen die dit gen missen pas bij een twintigmaal hogere stralingsdosis apoptotisch worden. Opmerkelijk is nu dat uitschakeling van dit p53-gen de meest voorkomende genetische verandering is in menselijke tumoren. Het lijkt er dus op dat het wegvallen van bescherming tegen het doorgeven van ongewenste genetische veranderingen aan dochtercellen bijna een voorwaarde is voor het ontstaan van kwaadaardige tumoren.

De mogelijke relatie tussen enerzijds het niet-apoptotisch worden van cellen die dat op grond van hun beschadigde genen eigenlijk wel zouden moeten en anderzijds het ontstaan of het steeds kwaadaardiger worden van kanker, betekent niet dat apoptose in tumoren een zeldzaam fenomeen is. Integendeel: in sommige tumoren is dat de belangrijkste factor die verklaart waarom tumoren langzaam groeien ondanks de aanzienlijke delingsactiviteit. Bovendien blijkt uit computersimulaties dat een kleine verschuiving in de keuze tussen deling en dood al enorme gevolgen kan hebben voor de groeisnelheid van tumoren.

Apoptose kan een opvallend fenomeen zijn in weefsel waaruit de tumor ontstaat, zoals bijvoorbeeld bij prostaat- of borstkanker het geval lijkt. Prostaat- en borstklierweefsel zijn sterk afhankelijk van hormonen: stopt de produktie van die hormonen, dan verdwijnt een aanzienlijk deel van de celpopulatie. Datzelfde gebeurt vaak ook wanneer bij pati챘nten met zulke tumoren de hormoonspiegels worden verlaagd danwel de specifieke activiteit van die hormonen wordt geblokkeerd.

Het spreekt vanzelf dat het voor de behandeling van kanker belangrijk is om meer te weten over de manier waarop toxische stoffen, bestraling of het achterwege blijven van hormooninwerking actieve celdood veroorzaakt.

Ook zou men daarom meer zicht willen krijgen op de specifieke kenmerken van de cellen die hiervoor gevoelig of juist ongevoelig zijn. Inzicht in de manier waarop celdoodprogramma’s worden geactiveerd en uitgevoerd en hoe dit in sommige cellen wordt onderdrukt, kan ontwerpers van geneesmiddelen helpen om effectievere antikankermiddelen te ontwerpen.

Uit: [Natuur & Techniek, 1994, jaargang 62, afl. 5](http://www.natutech.nl/)

<http://www.kennislink.nl/web/show?id=87360>