

Apoptoz: Düzenleyici Moleküller, Hastalıklarla İlişkisi ve Apoptozu Saptama Yöntemleri

Apoptosis: Regulatory Molecules, Its Relationship with Diseases and Apoptosis Detection Methods: Review

Dr. Püreda YAZICI,^{a,b}
Shohreh ALİZADEHSHARGH,^c
Dr. Gül GÜNER-AKDOĞAN^{a,b}

^aAraştırma Laboratuvarı,
^bBiyokimya AD,
^cMoleküler Biyoloji ve Genetik AD,
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
İzmir

Geliş Tarihi/Received: 08.10.2008
Kabul Tarihi/Accepted: 06.01.2009

Yazışma Adresi/Correspondence:
Dr. Püreda YAZICI
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Araştırma Laboratuvarı, İzmir,
TÜRKİYE/TURKEY
drpuredayazici@yahoo.com

ÖZET Apoptoz ve nekroz iki önemli hücre ölüm şeklidir. Uyarının yoğunluğuna veya süresine göre apoptoz veya nekroz oluşturulabilir. Biyokimyasal ve patolojik bulgular her iki ölüm şeklinde çok farklıdır fakat ortak bazı özellikleri de vardır. Bu farklılıklar nekroz ile apoptozun dokularda ayırt edilmesinde yardımcı olur. Hücre büzülmesi, kromatin kondansasyonu, sitoplazmik tomurcuklanma ve apoptotik cisimciklerin oluşumu ve apoptotik cisimciklerin makrofajlar tarafından doku hasarı oluşturmadan fagosite edilmesi apoptoz sürecinde dört önemli olaydır. Bcl-2 ailesi ve kaspazlar apoptotik yolda temel mediyatörlerdir. Entrensek yolak kaspaz-8 ve 10'un aktivasyonu ve ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumuyla, ekstrinsek yolak kaspaz-9 aktivasyonu ve apoptozom kompleksi oluşumuyla, kaspaz-3'ü indüklemektedir. Bu son basamakta kaspaz-3 tipik DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır. Bcl-2 ailesi hem apoptotik hem anti apoptotik üyelerle sahiptir. Bcl-2 proteinleri arasındaki dengeye göre proapoptotik veya anti apoptotik sinyaller mitokondriyi etkilemektedir. Apoptotik sinyaller baskınsa sitokrom c apoptozom kompleksini oluşturmak için mitokondriden ayrılır. Tetiklenmiş apoptoz organ yetmezliğine neden olurken, apoptozun engellenmesi hiperplazi ve kansere neden olmaktadır. Apoptoz defektleri gelişimsel, otoimmün ve nörodegeneratif hastalıklarda ve kanser gelişiminde önemlidir. Son yıllarda apoptotik sinyal moleküllerinin indüksiyonu ya da blokajı üzerine yapılan araştırmalar, kanser gelişiminin kontrolüne yeni bir bakış getirmiştir. Bu çalışmada, apoptozu düzenleyici moleküller, hastalıklarla ilişkisi ve apoptoz saptama yöntemleri üzerine olan son literatür bilgileri gözden geçirilerek tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, apoptozu düzenleyici proteinler, kanserler

ABSTRACT Apoptosis and necrosis are two important cell death forms. Depending on the intensity and duration of the stimulus, either apoptosis or necrosis can take place. Biochemical and pathological findings are very different in both death forms but at the same time have some common features. These differences help us to distinguish necrosis and apoptosis in tissues. Cell shrinkage, chromatin condensation, formation of cytoplasmic blebs and apoptotic bodies and phagocytosis of these apoptotic cells by the macrophages without forming tissue damage are the four important events in apoptosis pathology. Bcl-2 family and caspases are the major mediators of apoptotic pathways. Intrinsic pathway, by the activation of caspases-8 and 10 and formation of death-inducing signal complex (DISC) and extrinsic pathway, by the activation of caspase-9 and apoptosome complex formation, both induce caspase-3. At this last step, caspase-3 causes typical fragmentation of DNA. Bcl-2 family has either apoptotic or anti-apoptotic members. According to the balance between bcl-2 proteins, pro-apoptotic or anti-apoptotic signals affect the mitochondria. If apoptotic signals are dominated cytochrome c is released from the mitochondria to form the apoptosome complex. Induced apoptosis causes organ insufficiency and inhibition of apoptosis causes hyperplasia and cancer. Apoptosis defects are important in developmental, otoimmune and neurodegenerative diseases and in cancer progress. In recent years, researches on the induction and blockage of apoptotic signal molecules, have presented a novel approach to the control of cancer progression. In this article, recent literature data on apoptosis regulatory molecules, its relationship with diseases and apoptosis detection methods were reviewed and were discussed.

Key Words: Apoptosis, apoptosis regulatory proteins, neoplasms

APOPİTOZ NEDİR?

Apopitoz embriyogenez aşamasında istenmeyen dokuların ortadan kaldırılmasında ve dokunun yeniden şekillendirilmesinde; daha sonraki yıllarda gelişim, homeostazın sağlanması ve yaşlanmada, tüm yaşam süreci boyunca hasar görmüş, transformasyona uğramış, enfektif dokunun ve yaşam süresini doldurmuş sağlıklı dokunun elimine edilmesinde fonksiyon gören programlanmış hücre ölümüdür.¹

İNSANDA APOPİTOZ ÖRNEKLERİ

Apopitoz; insan vücudunda birçok dokuda, çeşitli durumlarda görülür.

■ Hormon azalmasına bağlı; östrojen azalmasına bağlı menstrüe siklus sırasında endometriyumda dökülmeler,² menopozda over foliküllerinde atrofi,³ laktasyon sonrası meme bezlerinde atrofi,⁴ kısırlaştırılma sonrası prostat bezlerinde atrofi,⁵

■ Bağırsak endoteli gibi dokularda, proliferen olan labil hücrelerden hücre kaybı,

■ Tümörlerde hücre ölümü,

■ Akut inflamasyon sonrası nötrofillerin ölümü,^{6,7}

■ Sitokinlerin çekilmesi sonrasında T ve B lenfositlerin ölümü,^{8,9}

■ Graft-versus-host gibi T hücrelerinin konak dokusunu reddi reaksiyonları,¹⁰

■ Hepatitler veya diğer viral hastalıklar,¹¹

■ Isı, radyasyon, hipoksi, kemoterapötiklerin yüksek dozları nekroza, düşük dozları apopitoza neden olmaktadır.^{12,13}

APOPİTOZDAKİ MORFOLOJİK DEĞİŞİMLER

Apopitozun tanınmasını sağlayan elektron mikroskopik görüntülerin karakteristik bir morfolojisi vardır. Bu sayede nekroz ve apopitoz birbirinden ayırt edilebilir. Apopitozdaki başlıca bulgular:

■ Hücre büzüşmesi: Nekrozda genelde Na⁺-K⁺ pompasında enerji azalmasına bağlı işlev görememe sonucu artan hücre içi Na⁺ ve suya bağlı hücre şişmesi görülürken, apopitozda Na⁺ kaybına bağlı hücre büzüşmesi görülür.¹⁴

■ Kromatin kondansasyonu: Endonükleazlar tarafından nükleusun iki veya daha çok parçaya bölünmesi apopitoz için tipiktir.

■ Apopitotik cisimcikler: Sitoplazmadan boğulanarak ayrılıp nükleer fragman içerecek veya içermeyecek şekilde paketlenip apopitotik cisimcikleri oluştururlar.

■ Apopitotik cisimciklerin fagositozu: Apopitotik cisimcikler, komşu parankimal doku veya makrofajlar tarafından fagosite edilirken, inflammatuar yanıt oluşumu görülmeden hücre ölümü gerçekleşir. İnflammatuar yanıt oluşturmaması apopitoz için tipiktir.^{15,16}

APOPİTOZ YOLAĞI VE GÖREVLİ MOLEKÜLLER

Kaspaz (caspase-cysteine aspartyl protease) aktivitesinin indüklenmesi; sitoskeletal ve nükleer proteinlerin parçalanmasında önemli rol oynar.

Transglutaminaz aktivitesi; proteinler arasında çapraz bağlar oluşturarak hücrenin büzüşmesini ve apopitotik cisimciklerin oluşmasını sağlar.¹⁷

Kaspazların indüklediği endonükleaz aktivitesi; çift sarmal DNA fragmanlarının oluşmasını ve elektroforezde DNA "ladder" (merdiven) görüntüsünün ortaya çıkmasını sağlar. Tipik DNA "ladder" görüntüsü nekrozda da görülebilir.¹⁸

Fosfatidil serinin hücre zarının iç tabakasından dış tabakasına kayması; apopitotik hücrelerin tanınarak inflammatuar yanıt oluşturmaktan makrofajlar tarafından tanınarak fagosite edilmesine olanak verir.¹⁹

Programlı hücre ölümü ile ilgili bilgilerimizin çoğu *Caenorhabditis Elegans* üzerinde yapılan araştırmalarla gelişmiştir. Bu araştırmalar sonucunda *Caenorhabditis Elegans*'ın apopitozu yönlendiren ced-3, ced-4 ve ced-9 moleküllerinin var olduğu ortaya konmuştur. Ced-3 ve ced-4 hücrenin ölümüne neden olurken, ced-9 hücre ölümünü engeller. Ced-3 ve ced-4 mutasyonla inaktive olduklarında hücre yaşamaya devam eder, ced-9 inaktive olduğunda erken dönemde hücre ölümü olur.²⁰ Programlanmış hücre ölümü konusundaki çalışmalarıyla tıp alanında 2002 Nobel Ödülü'nü alan Brenner, Horvitz ve Sulston, çalışmalarının birço-

ğunu bu nematod üzerinde gerçekleştirmişlerdir.²¹

Memeli dokularında, iki temel apoptoz yoluğı mevcuttur: Ekstresek yolak, intrinsek yolak (Şekil 1).

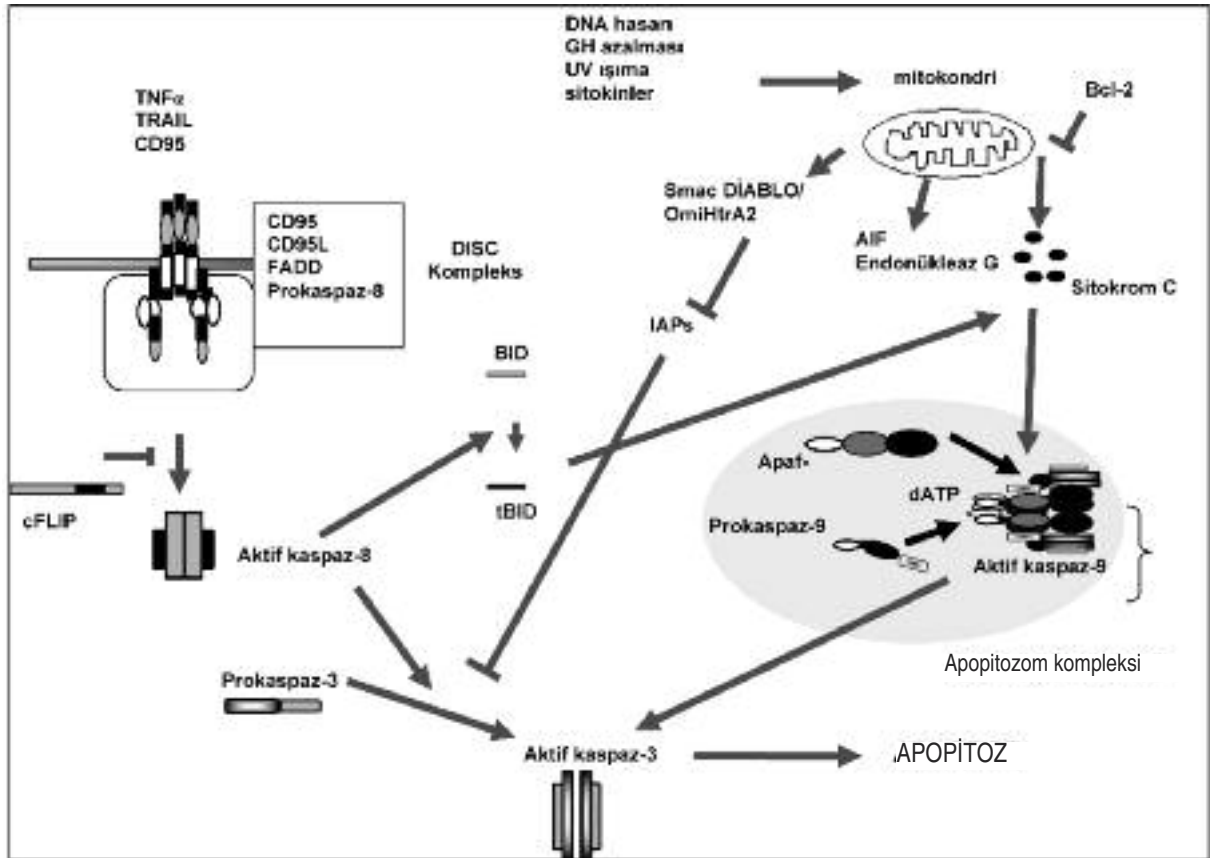
EKSTRESEK YOLAK (ÖLÜM-RESEPTÖRÜ YOLAĞI)

Bu yolak hücre dışı sinyallerle CD95 ligandına (Fas ligand= CD95L) bağlanan tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-alfa) ailesi tarafından uyarılmaktadır. Bu bağlanma, reseptörde ATP'den bağımsız konformasyonel değişikliklere neden olarak ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumuna neden olur. CD95 adaptör molekül Fas reseptörü ilişkili ölüm ünitesi (FADD) ile FADD da prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 ile birleşerek DISC kompleksini oluşturmaktadır. Küçük ve büyük alt ünitelerin ayrılması aktivasyon için gerekli değildir. Bu sonraki adımda prokaspaz-8 aktifleşerek, kaspaz-3'ten proteoliz ile

küçük alt ünitenin ayrılmasına ve böylece enzimin aktifleşmesine neden olmaktadır. Bu yolak kaspaz-3 aktivasyonu üzerinden mitokondriyal yolak ile birleşerek apoptoz sinyalini güçlendirmektedir. Hüresel FLICE-inhibe edici proteinler (cFLIP, cFLIPL, cFLIPs) DISC ile birleşerek kaspaz-8 ve 10'un aktivasyonunu inhibe ederek apoptozu engelledebilmektedir.²²⁻²⁴

İNTRESEK YOLAK (MİTOKONDRIYAL YOLAK)

Bu yolak ölüm reseptörü yolağından farklı olarak hem hücre dışı sinyallerle (büyüme faktörü veya hormon azlığı, ultraviyole (UV) ışını, çeşitli sitokinler], ayrıca DNA hasarına neden olan hücre içi sinyallerle indüklenebilir. Hücre içi sinyal bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerini uyararak mitokondriye göçünü sağlarken, proapoptotik üyeler dış mitokondriyal membrana yerleşerek burada porlar (mitokondriyal geçiş kanalları) oluşturmaktadır. Bu



ŞEKİL 1: Apoptozda görevli moleküller, intrinsek ve ekstrinsek yollar, DISC: Ölüm indükleyici sinyal kompleksi (death-inducing signaling complex), TRAIL: TNF ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TNF related apoptosis inducing ligand), CD95L: CD95/Fas ligandı, UV: Ultraviyole, FADD: CD95 adaptör molekül Fas reseptörü ilişkili ölüm ünitesi, AIF:Apoptoz indükleyici faktör, IAPs: Apoptozu inhibe edici protein, cFLIP: Hüresel FLICE-inhibe edici protein, GH: Büyüme hormonu, tBID: Kesilmiş (truncated) BID^{22,23}

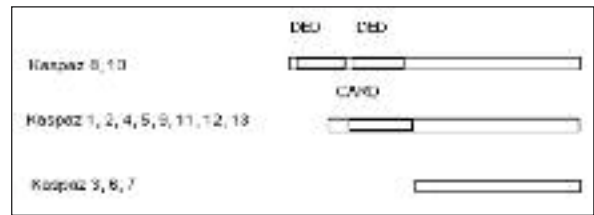
porlar mitokondriden sitokrom-c ayrılmasına olanak sağlamaktadır. Sitokrom-c; apaf-1, ATP, dATP ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptozomu oluştururken, apoptozom da kaspaz-3'ü aktive etmektedir. Başlangıçları farklı olsa da, her iki yol da sonuç olarak kaspaz-3 aktivasyonuna neden olmaktadır.

Ayrıca mitokondriden apoptoz indükleyici faktör (AIF), endonükleaz G, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 gibi moleküller de salınmaktadır. Endonükleaz G ve AIF; DNA fragmentasyonunu indüklerken, Smac/DIABLO ve Omi/HtrA2 ise apoptozu inhibe edici protein (IAPs)'i nötralize etmektedir. Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 gibi moleküller sitokrom c gibi mitokondrinin intermembraner bölgesinde bulunmaktadır. Smac/DIABLO ve Omi/ HtrA2'nin benzer birçok yönleri vardır. Ancak Smac/DIABLO kalpte bulunup beyinde saptanmazken, diğer taraftan Omi/HtrA2'nin yaygın dağılımı vardır.²²⁻²⁴

KASPAZLAR

Proteini, aspartat amino asidinden sonra kesen, aktif merkezinde sistein bulunan proteazlar ailesidir.²⁵ Bu kesme işlemi proteinin aktivasyon veya inaktivasyonuna neden olabilir. Kaspazlar zimojen olarak salınırlar. Tüm kaspazların yapısında büyük (p10) ve küçük (p20) katalitik alt üniteleri vardır.²⁶ N-terminal bölgesi kaspazdan kaspaza değişiklik göstermektedir. Buna bağlı olarak uzun N-terminal ön bölgesi bulunanlar başlatıcı, kısa N-terminal ön bölgesi bulunanlar sonlandırıcı kaspaz olarak ayrılırlar. Kaspaz-1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 başlatıcı kaspazlar olup, uzun N-terminal bölgesi içerirler. Bu uzun N-terminal bölgelerinde kaspaz aktive edici toplayıcı bölge [caspase-activating recruitment domain (CARD)] veya ölümü etkileyen bölgeleri [death effector domain (DED)] mevcuttur (Şekil 2).²⁷ Kaspaz-3, 6, 7, 14 sonlandırıcı kaspazlar olup kısa N-terminal bölgesi içerirler. Başlatıcı kaspazlardan; kaspaz-1, 2, 4, 5, 9, 11, 12, 13 CARD domain, kaspaz-8, 10 ise DED domain içermektedir. Kaspaz-3, 6, 7, 14 ise kısa N-terminal bölgeye sahip olup, CARD veya DED domain içermemektedir.

Uzun N-terminal ön bölgesi protein-protein ilişkisi için zemin hazırlar. Bu sayede aktive edici



ŞEKİL 2: Kaspazların içerdiği bölgeler (domains), DED: ölümü etkileyen bölge (death effector domain), CARD: kaspaz aktive edici toplayıcı bölge (caspase-activating recruitment domain)^{26,28}

protein kompleksi oluşabilir.²⁹ Kaspaz-8 ve kaspaz-10, DISC içinde aktive olurlar. Kaspaz-9'un aktivasyon kompleksi apoptozom olarak adlandırılır. Kaspaz-2 hakkında fazla veri yoktur. Sonlandırıcı kaspazlar iki basamakta aktive olurlar. DISC ile aktive olmuş başlatıcı kaspaz-8 veya apoptozom ile aktive olmuş başlatıcı kaspaz-9; sonlandırıcı kaspaz-3'ten proteoliz ile küçük alt ünitenin ayrılmasına ve böylece aktivasyonuna neden olur. Bu otokatalitik aktivasyon basamağı hücrel kaspaz inhibitörleri (IAPs, XIAP) ile engellenebilir. En iyi karakterize edilmiş olanı olan XIAP; inhibitör etkili ön bölgenin kaspazdan ayrılmasını bloklayarak kaspaz-3 aktivasyonunu engelleyebilir. Başlatıcı kaspazlar aktive olsa da, apoptoz; sonlandırıcı kaspazların aktivasyonunu sağlayan proteoliz sırasında bu inhibitörler ile durdurulabilir.³⁰

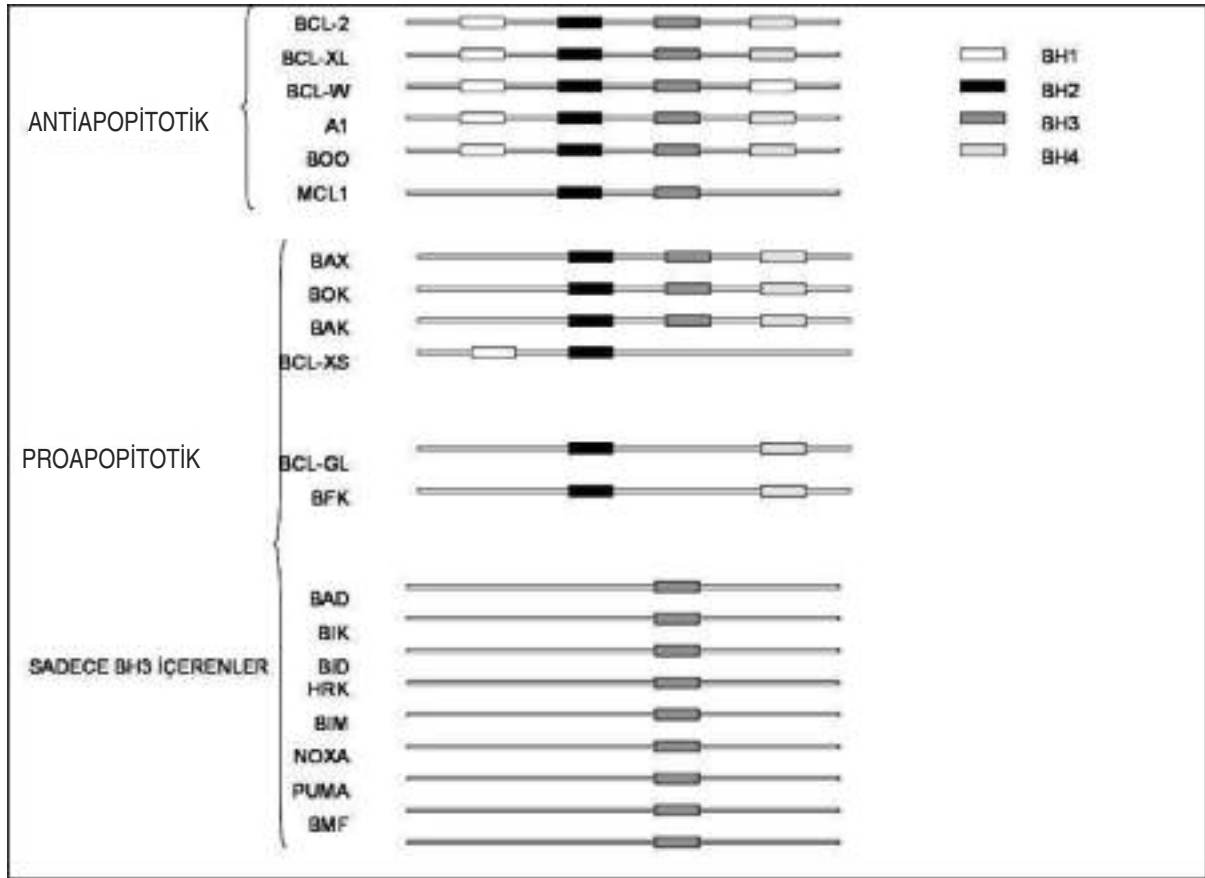
Kaspaz-1, 4, 5, 11, 12, 14 apoptoz dışında görev sahiptir. Kaspaz-1, 4, 5 proinflamatuvar sitokinlerin salınımında görevlidir. Örneğin; kaspaz-14, keratinosit matürasyonunda görevlidir.³¹

Bcl-2 AİLESİ

Bu protein ailesi; bölge (domain) yapısına göre üç temel gruba ayrılmaktadır (Şekil 3):

1. Grup I: bcl-2, bcl-x_L, bcl-w, mcl1, bfl-1/A1, boo. Bunlar ailenin antiapoptotik üyeleridir. Dış mitokondri membranı ile ilişkili olup, mitokondri bütünlüğünü sağlarlar. Dört korunmuş bcl-2 homoloji bölgesi (BH) içerirler. Bunlardan yalnızca mcl1'in 2 BH bölgesi vardır.

2. Grup II: bax, bak, bok, bcl-xs. Proapoptotik olup çoğunun 3 bazen de 2 BH bölgesi mevcuttur.



ŞEKİL 3: Bcl ailesi.²³ Şekilde Bcl ailesinin pro ve antiapoptotik alt grupları gösterilmiştir.

3. Grup III: (sadece BH3 içeren grup) bid, bik, bad ve diğerleri.³² Karakterize etmesi en güç olan grup olup sadece BH3 bölgesini içerirler. Bu moleküller mitokondri dış membranı ile ilişkilidirler. Bu aile üyeleri birbirleriyle ve dış mitokondriyal membran proteinleriyle etkileşime girerek mitokondri membranında porlar oluşturmak suretiyle sitokrom c'nin ayrılmasını sağlamaktadırlar. Normalde inaktiftirler, aktive olduklarında grup II'nin aktifleşmesini sağlarlar. Farklı apoptotik uyarı farklı molekülün uyarılmasına neden olmaktadır. Bid, reseptör uyarılı yolak ile bcl-2 yolağı arasında geçişi sağlamaktadır. Kaspaz-8 aktive olunca bid'in mitokondriye göçünü sağlamaktadır. Bid; daha sonra bax ve bak'ın oligomerleşmesine neden olup, pro ve antiapoptotik üyeler arasındaki dengenin bir sonucu olarak sitokrom c'nin salınmasını uyarmaktadır. Sitokrom c'nin ayrılması apoptozom oluşumunu indüklemektedir. Hücre bax ve bad

açısından hasarlı olduğunda apoptoza direnç kazanmaktadır.³³

HASTALIKLAR VE APOPTOZ

Tetiklenmiş apoptoz organ yetmezliğine neden olurken, engellenmiş apoptoz hiperplazi ve kanser oluşumu olarak kendini göstermektedir. Programlı hücre ölümünün aksaması gelişimsel, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklarda ve kanser sürecinde büyük öneme sahiptir.³⁴

APOPTOZ VE KANSER

Kanserlerde kemoterapötiklere gösterilen dirençten anti-apoptotik genler sorumlu olabilir.³⁵ Bir çok kanser tipinde anti-apoptotik etkili bcl-2 alt grubunun indüklendiği bulunmuştur. XIAP, IAP1 ve IAP2 gibi apoptoz inhibitörlerinin tümöral hücre hatlarında düzeylerinin indüklendiği saptanmıştır.³⁶

Kaemferol bitkisel bir ürün olup, (TNF ilişkili apoptozisi indükleyen ligand [TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL)] reseptörü ile ilişkili antikanser ilaçtır. Bu ilacın insan kolon kanser hücre hattında (SW480) TRAIL reseptörleri olan DR4, DR5 düzeylerini artırarak apoptozu indüklediği saptanmıştır.³⁷

Ölüm reseptörü yolağının FLIP ile bloke edilmesi tümör hücrelerinde immüniteden kaçışa imkân tanımıştır. Sitotoksik ajanlarla FLIP düzeyinin düşürülmesi; o kanser tipinde apoptoza olan duyarlılığı artırmıştır. Bu bilgiler antikanser ilaç geliştirilmesine ışık tutmaktadır.³⁸

Son çalışmalarda malign tümörlerin tedavisinde kullanılan anti-sense oligonükleotidlerin veya anti-sense bcl-2 ve bcl-x_L kullanımının proliferasyon hızını düşürerek kemoterapötiklerin etkilerini artırdığı bulunmuştur.³⁹

Farklı sitokinler farklı apoptotik veya anti-apoptotik molekül düzeyini indükleyerek tümörde proliferasyona veya apoptoza neden olabilmektedir. Örneğin; IL-3, bcl-x_L düzeyini indükleyerek miyeloid serinin yaşam süresini uzatırken, interlökin (IL)-5 ve IL-15, yine bcl-x_L düzeyini indükleyerek eozinofil ve mast hücrelerini apoptozdan korumaktadır.⁴⁰ Kronik lenfositik lösemide IL-4 düzeyleri artarak bcl-2'nin aşırı üretimi gerçekleşmekte ve malign B hücrelerinin yaşam süresi uzamaktadır. Tiroid karsinoma hücrelerinde iki anti-apoptotik sitokin IL-4 ve IL-10 salgılamakta ve kanser gelişim sürecine katkıda bulunmaktadır. Bu sitokinlerin nötralizasyonu ilaçların apoptotik özelliklerini artırmaktadır.⁴¹

APOPTOZ VE OTOİMMUN HASTALIKLAR

Otoimmün hastalıkların oluşum mekanizmasında çeşitli mekanizmalar vardır. Genetik analizler, serum proteinlerinin ve apoptotik hücrelerin klirensinde görevli reseptörlerin defektli olmasının otoimmün hastalık riskini artırdığı göstermiştir. Fosfatidil serinin apoptotik hücrelerin dış membran yüzeyine çıkmasının apoptoza uğrayacak hücrelerin tanınmasında görevli olduğu bilinmektedir. Bunun dışında hücrenin tanınmasını sağlayan CD14, CD68, CD36, ABC-1 taşıyıcısı gibi farklı reseptörler de mevcuttur.⁴²

Fas Ligandının Hashimoto tiroiditi, Tip 1 diyabet ve multiple skleroz gibi otoimmün hastalıklarda yıkıcı rolü olduğu düşünülmektedir.⁴³⁻⁴⁵ Tiroid dokusu, oluşumundan sonra çok nadir apoptoza uğramaktadır. Hashimoto'nun aktif evresinde apoptozun arttığı görülmektedir. Graves'de cFLIP, bcl-x_L gibi anti-apoptotik moleküller dokunun apoptoza uğramasını engellemektedir.⁴⁶ İkisi de otoimmün hastalık olmasına rağmen, Hashimoto'da apoptozun indüklenmesiyle yıkım, Graves'de apoptozun baskılanmasıyla hücre sayısında artış meydana gelmektedir.

Diğer bir deyişle; bir hücrede apoptoz veya proliferasyon gelişmesi birçok molekülün etkileşimi ile dengede tutulmaktadır. Vücuttaki patolojik ve fizyolojik süreçler bu moleküllerin etkisi altındadır. Bu süreçlere dışarıdan müdahale edilmesi gerek kanserlerde apoptozun indüklenmesi, gerekse otoimmün yıkımlarda apoptozun baskılanması yani insan vücut fizyolojisine uyum çabası yeni yapılan araştırmalarda yeni ilaç gelişim süreçlerinde devam edecektir.

APOPTOZU SAPTAMA YÖNTEMLERİ

Yapılan araştırmalarda; dokularda ve vücut sıvılarında apoptozun saptanması fizyolojik ve patolojik süreçlerin tanı ve takibinde büyük önem taşımaktadır.

MORFOLOJİK GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ

Işık Mikroskobu Kullanımı

Hematoksilen veya Giemsa ile boyama hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku incelemelerinde kolaylıkla kullanılabilir. Apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Nükleer kondansasyon ve apoptotik cisimcikler gözlemlenebilse de ışık mikroskobu apoptotik değişikliklerin saptanmasında çok yeterli bir yöntem değildir. Floresan boya (propidium iyodür, Hoechst) kullanılarak etkinliği artırılabilir. Ancak apoptozdaki geç değişikliklerin saptanmasında faydalıdır.^{28,47}

Floresan Mikroskobu/Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini, dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Canlı ve ölü hücre ayrımını yapabil-

mek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örneğin; Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örneğin; propidium iyodür) beraber kullanılır. Bu yöntemlerde canlılığın belirleyicisi olarak, hücrenin plazma membranının intakt olup olmadığı değerlendirilir. Membran intakt ise propidium iyodür hücre içine girememektedir. Bu nedenle propidium iyodür sadece membran bütünlüğü bozulan ölü hücreleri boyamaktadır. Hoechst boyası ise ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen bir boyadır.⁴⁷

Elektron Mikroskobu

Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptozda en değerli yöntemdir. Hücredeki patolojik değişimlerin gözlemlenmesine imkân tanır. Nekroz ve apoptozun ayırt edilmesinde altın standarttır. Erken ve geç apoptotik değişiklikleri saptamak gibi önemli bir avantajı da vardır.⁴⁸

Faz Kontrast Mikroskobu

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, flask veya plaklarda üretildiği çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır.²⁸

HİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER

Anneksin V Yöntemi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunan fosfatidil serin, hücre apoptoza giderse hücre zarının dış yüzüne transloke olmaktadır. Dış yüze transloke olan fosfatidil serin, çeşitli boylarla işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir. Anneksin V; fluoresan boya (örneğin FITC) ile konjuge edilerek fluoresan mikroskobunda gözlemlenebilir veya ışık ve elektron mikroskobu için uygun olduğu boylar da vardır. Bu yöntem fosfatidil serinin dış yüze translokasyonu gibi apoptozdaki erken değişikliğin saptanmasına olanak verir. Hem in vivo hem in vitro kullanılabilmesi önemli bir avantajıdır. Biotinlenmiş-anneksin ile hücreler apoptozun bütün safhalarında işaretlenerek akış sitometride gözlemlenebilir. Bu yöntemin dezavantajı, nekrotik hücrelerin de zaman zaman işaretlenebilmesinden dolayı spesifitesinin düşük olmasıdır. Ancak akış sitometride DNA'yı boyayan boylar kullanılarak

nekroz ve apoptoz birbirinden ayırt edilebilmektedir.^{49,50}

TÜNEL Yöntemi (The Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-dUTP Nick End Labeling)

Terminal deoksiribonükleotid transferaz (TdT)'in DNA kırıklarının 3' ucuna bağlanması ve böylece DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlayan yöntemdir. TdT; biyotin veya fluoresan boya ile kompleks oluşturmaktadır. İşaretlenmiş uçlar ışık veya fluoresan mikroskobunda, immünohistokimyasal olarak veya akış sitometride apoptoz göstergesi olarak saptanabilir.⁵¹ Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halinde veya plaklara ekilmiş ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozun varlığı bu metotla saptanabilir. Sıklıkla kullanılan yöntemdir. Bu yöntemin de birkaç sınırlılığı mevcuttur: Fiksasyon süresi sonucu etkileyebilir, nekrotik hücrelerde de zaman zaman DNA kırıkları oluşabileceğinden nekrozla karışabilir ve de sadece in vitro olarak kullanılabilir. Avantajı ise apoptotik indeks hesaplanarak apoptoza giden hücre sayısı hakkında bilgi edinilebilir.⁵⁰

ISEL (In Situ End-Labeling) Yöntemi

TÜNEL yönteminin modifikasyonu ile oluşturulmuştur. DNA kırıklarının 3' ucu bu kez DNA polimeraz I ile işaretlenir. dUTP son uçların tanınmasına imkân sağlayan biyotin veya fluoresan boya ile kompleks oluşturabilir. In situ endlabelling (ISEL) yöntemi, TÜNEL yöntemine göre daha az duyarlıdır ve daha zaman alıcıdır.²⁸

M30 Yöntemi

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeralin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanması ilkesine göre belirlenir. Fluoresan boya ile işaretlendiğinde fluoresan mikroskopu veya akış sitometride kullanılabilir. Yalnız sadece sitokeratin 18'i ekspres eden hücrelerde (epitelyum hücreleri) kullanılması mümkündür.²⁸

BİYOKİMYASAL YÖNTEMLER

ELISA

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA frag-

mentasyonu ve M30 düzeyini tespit etmek mümkündür.²⁸

Agaroz Jel Elektroforezi

DNA kırıklarının agaroz jelde yürütülerek oluşturduğu "ladder" görüntüsü saptanabilir. Kısıtlılığı ladder görüntüsünün oluşabilmesi için fazla miktarda DNA'ya gereksinim olmasıdır. Dolayısıyla yöntemin duyarlılığı düşüktür. Ayrıca tek bir hücrede değil, ancak hücre popülasyonlarında apoptozu gösterebilir.⁵²

Fluorometrik Yöntem

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu plaklara hücre lizatlarının eklenmesi ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazların parçalandığı ve kendisine fluoresan bir madde ile işaretlenmiş bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan fluoresansın şiddeti ölçülür.⁵³

Real-Time, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Spesifik mRNA düzeylerinin saptanması için kullanılmaktadır. RNA izolasyonu, RNA'dan cDNA eldesi ve cDNA'nın çoğaltılması basamakları ile istenilen gen elde edilebilmekte, deney koşullarında diğer gruplarla gen düzeyinde kaç kat değişim olduğu karşılaştırılabilmektedir.⁴⁷

Western Blotl Yöntemi

Bu yöntem yardımıyla apoptozu özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örneğin; bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örneğin kaspaz-3) saptanması mümkündür, Sitokrom c'nin mitokondri dışına çıkıp çıkmadığı da bu metotla belirlenebilir. Yalnız, sitokrom-c saptanmasında önce hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonlara ayrılması gerekir. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom-c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptozu gittikleri anlaşılır.^{47,53}

Akış Sitometri (Flow Cytometry):

Akış sitometri yardımıyla, işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Özellikle iki şekilde apoptoz deteksiyonu yapılır: Fluoresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak ya da anneksin V kullanılarak. Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemleri ile hücre boyutu ve içerdiği DNA miktarı kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptoz lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu tayin edilir.⁵⁴

DNA "Microarray"

DNA "Microarray" teknolojisi henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntemdir. Bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir süre içinde binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA'larının) saptanması mümkün olabilecektir. Böylece, apoptozu özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin veya kaspazın ekspresyon durumları değerlendirilebilecektir.⁵⁵

MR (Manyetik Rezonans) spektroskopisi

Canlıda hücrelerin tanınmasına imkan sağlayan ileri düzey bir yöntemdir.⁵⁶

PET (Pozitron Emisyon Tomografi) taraması

Anneksin V'in PET izotopuyla işaretlenmesi apoptoz saptama duyarlılığını artıran ileri düzey bir yöntemdir. Canlı dokuda apoptozu uğrayan hücreler bu sayede saptanabilir.⁵⁶

SONUÇ

Günümüzde apoptoz; çeşitli hastalıkların anlaşılması ve yeni tedavilerin geliştirilmesi açısından üzerinde yoğun araştırmalar yapılmakta olan gelişime açık bir konudur. Doku ve vücut sıvılarında apoptozu saptamaya yönelik yöntemlerin geliştirilmesi, fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki apoptozun rolünü daha iyi ortaya koymuş, çeşitli hastalıkların aydınlatılmasına ışık tutmuştur.

KAYNAKLAR

- Khan N, Adhami VM, Mukhtar H. Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of cancer. *Biochem Pharmacol* 2008;76(11):1333-9.
- Narkar M, Kholkute S, Chitlange S, Nandedkar T. Expression of steroid hormone receptors, proliferation and apoptotic markers in primate endometrium. *Mol Cell Endocrinol* 2006;246(1-2):107-13.
- Amsterdam A, Gold RS, Hosokawa K, Yoshida Y, Sasson R, Jung Y, et al. Crosstalk Among Multiple Signaling Pathways Controlling Ovarian Cell Death. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10(7):255-262.
- Tzeng YJ, Gottlob K, Santarelli R, Graessmann A. The SV40 T-antigen induces premature apoptotic mammary gland involution during late pregnancy in transgenic mice. *FEBS Lett* 1996;380(3):215-8.
- Buttayan R, Shabsigh A, Perlman H, Colombel M. Regulation of Apoptosis in the Prostate Gland by Androgenic Steroids. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10(2):47-54.
- Ocana MG, Asensi V, Montes AH, Meana A, Celada A, Valle-Garay E. Autoregulation mechanism of human neutrophil apoptosis during bacterial infection. *Mol Immunol* 2008;45(7):2087-96.
- Baykal Y, Özet G, Kocabalkan F. [Apoptosis and the immune system]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 1998;18(1): 11-4.
- Brenner D, Krammer PH, Arnold R. Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66(1):52-64.
- Yalınay-Çırak M, İmir T. [Apoptosis]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 1995;15(5):319-26.
- Nomura S, Ishii K, Inami N, Uoshima N, Ishida H, Yoshihara T, et al. Role of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand concentrations after stem cell transplantation. *Transpl Immunol* 2007;18(2):115-21.
- Lapierre P, Béland K, Alvarez F. Pathogenesis of autoimmune hepatitis: from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis. *Transl Res* 2007;149(3):107-13.
- McConnell KW, Muenzer JT, Chang KC, Davis CG, McDunn JE, Coopersmith CM et al. Anti-apoptotic peptides protect against radiation-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355(2):501-7.
- Sunguroğlu A, Atabeni-Erdemli E, Tekelioğlu M. [Apoptosis: programmed cell death]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 1996;16(5): 333-7.
- Yu SP. Na(+), K(+)-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. *Biochem Pharmacol* 2003;66(8):1601-9.
- Doonan F, Cotter TG. Morphological assessment of apoptosis. *Methods* 2008;44(3):200-4.
- Tomatır AG. [Apoptosis: programmed cell death]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2003;23(6):499-508.
- Fesus L, Szondy Z. Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival. *FEBS Lett* 2005;579(15):3297-302.
- Walker PR, Leblanc J, Smith B, Pandey S, Sikorska M. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Methods* 1999;17(4):329-38.
- Seres L, Cserepes J, Elkind NB, Töröcsik D, Nagy L, Sarkadi B, et al. Functional ABCG1 expression induces apoptosis in macrophages and other cell types. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778(10):2378-87.
- Stegh AH, Peter ME. Apoptosis and caspases. *Cardiol Clin* 2001;19(1):13-29.
- Horvitz HR. Worms, life, and death (Nobel lecture). *Chembiochem* 2003;4(8):697-711.
- Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644(2-3):125-32.
- Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(7-8):1462-75.
- Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 2003;15(3):185-93.
- Sarıoğlu S, Ataman Ş. [Apoptosis]. *Turkiye Klinikleri J PM & R* 2003;3(1):37-44.
- Stennicke HR, Salvesen GS. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* 2000;1477(1-2):299-306.
- Clerk A, Cole SM, Cullingford TE, Harrison JG, Jormakka M, Valks DM. Regulation of cardiac myocyte cell death. *Pharmacol Ther* 2003;97(3):223-61.
- Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepes S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 2007;139(1):143-56.
- Wang ZB, Liu YQ, Cui YF. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* 2005;29(7):489-96.
- Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 2004;14(4):231-43.
- Türk B, Stoka V. Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Lett* 2007;581(15):2761-7.
- Dröin NM, Green DR. Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644(2-3):179-88.
- Heiser D, Labi V, Erlacher M, Villunger A. The Bcl-2 protein family and its role in the development of neoplastic disease. *Exp Gerontol* 2004;39(8):1125-35.
- Ayaşlıoğlu E. [Apoptosis]. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2001;21(1):57-62.
- Çıtak EÇ. [Apoptosis and cancer]. *Turkiye Klinikleri J Pediatr* 2000;9(3):183-91.
- Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncol* 2008;9(10):1002-11.
- Taniguchi H, Yoshida T, Horinaka M, Yasuda T, Goda AE, Konishi M, et al. Baicalein overcomes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance via two different cell-specific pathways in cancer cells but not in normal cells. *Cancer Res* 2008;68(21):8918-27.
- Iyer AK, Azad N, Wang L, Rojanasakul Y. Role of S-nitrosylation in apoptosis resistance and carcinogenesis. *Nitric Oxide* 2008;19(2):146-51.
- Bolenz C, Becker A, Trojan L, Schaaf A, Cao Y, Weiss C, et al. Optimizing chemotherapy for transitional cell carcinoma by application of bcl-2 and bcl-xL antisense oligodeoxynucleotides. *Urol Oncol* 2007;25(6):476-82.
- BenJilani KE, Gaillard JP, Petit F, Arnould D, Roumier AS, Labalette M, et al. A suppressive effect of the adenovirus 5 protein E1B 55K on apoptosis induced by IL-3 deprivation and gamma-irradiation. *Biol Cell* 2002;94(2):77-89.
- Mehmet H, Laurenzi VD, Stassi G, Walczak H. Programmed cell death in disease. *Teaching Workshop on Apoptosis*. 1st eds. İzmir: Dokuz Eylül University Institute of Health Sciences; 2006.p.12-7.
- Cline AM, Radic MZ. Apoptosis, subcellular particles, and autoimmunity. *Clin Immunol* 2004;112(2):175-82.
- Stuck BJ, Pani MA, Besrouf F, Segni M, Krause M, Usadel KH et al. Fas ligand gene polymorphisms are not associated with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Hum Immunol* 2003;64(2):285-9.
- Burkhardt BR, Lyle R, Qian K, Arnold AS, Cheng H, Atkinson MA et al. Efficient delivery of siRNA into cytokine-stimulated insulinoma cells silences Fas expression and inhibits Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett* 2006;580(2):553-60.
- Zayas MD, Lucas M, Solano F, Fernández-Pérez MJ, Izquierdo G. Association of a CA repeat polymorphism upstream of the Fas ligand gene with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2001;116(2):238-41.
- Mitsiades N, Poulaki V, Mitsiades CS, Koutras DA, Chrousos GP. Apoptosis induced by FasL and TRAIL/Apo2L in the pathogenesis of thyroid diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12(9):384-90.

47. Otsuki Y, Li Z, Shibata MA. Apoptotic detection methods--from morphology to gene. *Prog Histochem Cytochem* 2003;38(3):275-339.
48. Özgen Ü. [Laboratory studies in apoptosis]. *Turkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 2005;1(3):106-14.
49. Brumatti G, Sheridan C, Martin SJ. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods* 2008;44(3):235-40.
50. Allen RT, Hunter WJ 3rd, Agrawal DK. Morphologic and temporal analysis of vascular smooth muscle cell apoptosis induced by c-myc and E1A Scanning 1998;20(8):577-86.
51. Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods* 2008;44(3):250-4.
52. Walker PR, Leblanc J, Smith B, Pandey, Sikorska M. Detection of DNA Fragmentation and Endonucleases in Apoptosis. *Methods* 1999;17(4):329-38.
53. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenebee P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 2008;44(3):205-21.
54. Otsuki Y, Li Z, Shibata MA. Apoptotic detection methods--from morphology to gene. *Prog Histochem Cytochem* 2003;38(3):275-339.
55. Sato A, Hiramoto A, Uchikubo Y, Miyazaki E, Satake A, Naito T, et al. Gene expression profiles of necrosis and apoptosis induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *Genomics* 2008;92(1):9-17.
56. Kettunen MI, Brindle KM. Apoptosis detection using magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Prog Nucl Reson Spectrosc* 2005;47(3-4):175-85.