

APOPTOZİS DERS NOTLARI

Dr. Engin ULUKAYA
Biyokimya Anabilim Dalı

Ayrıca bakınız:

www20.uludag.edu.tr/~eulukaya

www20.uludag.edu.tr/~biokimya

11.04.2003

A. APOPTOZİS VE OLUŞUMU

Apoptozis terminolojisi:

Ökaryotik organizmadaki hücreler doğarlar, belirli bir süre yaşarlar ve sonra ölürlür (Bowen, 1998). Yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Örneğin, barsak hücreleri 3-5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürlerken, derinin epidermal hücreleri 20-25 günlük bir süre sonunda ölmektedirler. Fakat, miyokard kası hücreleri veya nöronlar ömür boyu yaşarlar. Fakat buna rağmen miyositlerimizin veya nöronlarımızın kabaca %10-15'ini ömrümüzün sonuna doğru kaybetmekteyiz. Nöronların çok sayıda olması ancak sinapsların tam olarak oluşmadığı dönemden önce olur. Bu dönemde, doğumda aşırı sayıda olan nöronların sayısı uygun sinaptik ağına sağlanabilmesi için azalır. Optimum sayıda nöronun optimum sayıda sinaptik bağlantı içinde olabilmesi için bu nöron kayıpları gereklidir. Bahsedilen bu hücre ölümleri apoptozisle gerçekleşir. Zamanı gelince ölen bu hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde ölürlür ("programmed cell death"). Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü ("physiological cell death") olarak da adlandırılır. Ayrıca, bir şekilde DNA'sı hasarlanmış (virüs etkisi veya çevresel nedenlerle) hücreler organizmanın zarar görmemesi için kendilerini öldürürler ("cell suicide") ve bunu organizmanın yararı için yaparlar. Doku homeostazisi için (örneğin yara iyileşmesi veya barsak hücrelerinin "turnover"ında olduğu gibi) hücreler ortamdaki ölümlerle kaybolur ("cell deletion"). İşte, tüm bu kavramlar (programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı) apoptozisle eş anlamlı olarak kullanılabilen ve literatürde yer alan ifadelerdir.

Apoptozisin görüldüğü hücre çeşitleri:

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu

devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitozis) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir. Normal apoptotik hücre ölümü ve yerine yeni hücre yapımının ("tissue remodelling") günde yaklaşık 1×10^{11} hücreyi bulduğu hesaplanmaktadır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı yetişkin bir insanın vücut ağırlığının her 18-24 ayda bir yeniden yapım ve yıkımı anlamına gelmektedir. Bu doku ve hücrelere örnek olarak verilebilecekler aşağıdadır:

a. İnce barsaklar: İnce barsaklardaki kriptaların tabanlarında yeni oluşan hücreler, kriptaların uçlarına doğru göç ederler ve 3-4 gün süren bu göçün sonunda ölümler, barsak boşluğuna dökülürler.

b. Deri: Derinin keratinositleri derinin bazal tabakasında oluştuktan (stem hücre bölünmesi) sonra derinin en üst tabakasına doğru (stratum korneum) göç ederler. Bu göç esnasında derinin her tabakasında çeşitli farklılaşma özellikleri gösterip en sonunda derinin organizmayı dış etkenlerden (enfeksiyon ajanları, travmatik zedelenmeler vs.) koruyucu ölü tabakasını oluşturmak üzere ölürlür. Deri keratinositlerinde bu şekilde gerçekleşen apoptozisin özelleşmiş bir apoptozis formu olduğu düşünülmektedir.

c. Timus: İmmün sistemin çok önemli hücreleri olan T lenfositler timusda olgunlaşırlar. Bu hücrelerin etkisiz olanları veya organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli taşıyanları kan dolaşımına girmeden önce apoptozisle ölümler ve böylece ortamdaki uzaklaştırılırlar.

d. Uterus: Menstruasyon esnasında uterusun iç duvarındaki hücreler ölümler ve menstruasyon kanıyla uzaklaştırılırlar. Böylece, uterusun iç tabakası (endometrium) apoptozisle dökülür

e. Beyinde sinapsların oluşumu esnasında bazı nöronlar apoptozisle ortamdaki uzaklaştırılırlar.

f. Gözdeki lensde içleri saydam bir protein olan kristalin ile dolu apoptotik hücreler bulunur.

g. Diğer: Virüslerle enfekte olmuş veya kalıcı DNA hasarı oluşmuş hücreler sıklıkla apoptozisle kendilerini öldürürler (intihar ederler). Bu yolla apoptozise gidemeyen ve genetik olarak değişmiş hücreler ileride kanser gelişimine neden olabilirler. Hepatit C virüsünün “core” proteininin insan embriyonik böbrek hücre dizelerinde FADD-ilişkili apoptozisi artırdığı rapor edilmiştir.

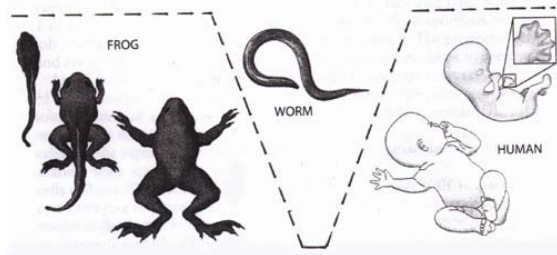
Apoptozis çok hücreli canlıların gelişimi esnasında da görülür:

Çok hücreli canlıların normal ve doğru gelişimleri seçilmiş bazı hücrelerinin apoptozisle ölmesine bağlıdır. Bazı örnekler aşağıda sıralanmıştır:

a. 1 mm uzunluğunda transparant bir kurtçuk olan *Caenorhabditis elegans*'ın başlangıçta 1090 olan hücre sayısı tam olarak 131 hücre azalır ve böylece hermafroditik formdan yetişkin forma dönüşür. Ölen hücreler mikroskop altında izlenebilirler. Bu kurtçuk model alınarak yapılan organ gelişimi ve apoptozis çalışmaları 2002 yılında Sydney Brenner, Robert Horwitz ve John Sulston'a Nobel Ödülü kazandırmıştır.

b. Kurbağaların metamorfozisi esnasında kuyrukları kaybolur. Böylece yetişkin forma geçerler. Kuyruktaki hücreler apoptozisle öler ve kaybolurlar.

b. İnsan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdelerin, buradaki hücrelerin apoptozisle ölmesi sonucu kaybolduğu düşünülmektedir.



Apoptozisin bozulduğu hastalıklar:

1. Viral enfeksiyonlar. Virüsler, hücreleri enfekte ettiklerinde girdikleri hücreye kendi proteinlerini sentez ettirirler. Oysa, o hücrenin kendisi için gerekli proteinlerin yapımını durdururlar. Bu yüzden, o hücrede apoptozis indüklenir ve hücre ölür. Böylece, zaten virüs kendisini de elimine eder. Fakat, bazı virüsler (örn., Ebstein-Barr ve Papillomavirüs) enfekte ettikleri hücrenin apoptozise gitmesini baskılayan yollar geliştirmişlerdir. Örneğin, Ebstein-Barr virüsü bir apoptozis inhibitörü olan bcl-2'ye benzer moleküller üretmektedir. Ayrıca, enfekte ettiği hücrenin kendi bcl-2 üretimini indükleyen moleküller de üretmektedirler. Bu yüzden, anti-viral tedaviyle uğraşan araştırmacılar virüslerin ürettikleri bu anti-apoptotik moleküllerin aktivitelerinin bloke edilmesiyle ilgili çalışmalar yapmaktadırlar. Papillomavirüs ise güçlü bir apoptozis indükleyicisi olan p53'ü inaktifleştirmektedir. Fakat vücudun immün sistemi viral enfeksiyonlarla savaşır. İmmün sistemin önemli bir komponenti olan sitotoksik “killer” T lenfositleri, virüsle enfekte olmuş hücreleri apoptozisi indükleyerek öldürürler. Apoptozisin indüksiyonu sitotoksik T lenfositlerinden salgılanan granzimlerin etkisiyle sağlanır. Böylece, virüsle enfekte olan hücre ortamdan uzaklaştırılır. Sitotoksik T lenfositleri ayrıca FasL salgılayarak da enfekte hücrelerde apoptozisi indükleyebilirler ama bu mekanizmayla sağlıklı komşu hücrelerde de apoptozisin indüklenme riski “bystander effect” vardır. Hepatit virüslerinin göreceli olarak daha az sayıda hücre enfekte etmelerine rağmen daha çok sayıda hücre hasarına neden olmalarının bu şekilde açıklanabileceği önerilmiştir.

2. Nörodejeneratif hastalıklar. Nöronlar, sinaptik bağlantılar uygun şekilde kurulduktan sonra bir daha bölünemeyen yani çoğalamayan hücrelerdir. Kalp kası gibi. Dolayısıyla yenilenemediklerinden ömür boyunca yaşarlar. Oysa, Alzheimer, Parkinson, Hutchinson gibi hastalıklarda nedeni henüz bilinmeyen bir şekilde

apoptozisin indüklenerek nöronların öldüğü düşünülmektedir.

3. Organ transplantasyonları. Transplante edilen organlara vücudun immün atağı olduğu bilinmektedir. Oysa, gözün ön “chamber”ı veya testisler gibi “immunologically privileged” bölgelerindeki hücrelerin devamlı olarak FasL eksprese ettiklerinden dolayı bu bölgelere gelen T lenfositlerini bu hücrelerin üzerindeki Fas reseptörlerini aktive ederek apoptozisle öldürebilmektedirler. Böylece, immün sistemin etkisinden kurtulabilmektedirler. Aynı şekilde, transplante edilen organın FasL eksprese etmesi sağlanabilse bu durumda rejeksiyon olasılığını önlemek mümkün olabilir. Bu konudaki çalışmalar sürmektedir.

4. İnsüline bağımlı tip diabet. Bu hastalıkta, insülin salgılayan hücreler apoptozisle ölmektedirler.

5. AIDS (“Acquired immunodeficiency syndrome”). AIDS enfeksiyonu sonucu CD4⁺ T- hücreleri (lenfositleri) apoptozisle ölmektedirler. AIDS enfeksiyonundan sorumlu virüs olan HIV (human immunodeficiency virus) CD4⁺ T hücrelerinin yüzeyindeki CD4 moleküllerine bağlanır. Bu bağlanma bir yüzey glikoproteini olan ve virüsün *env* geni tarafından kodlanan gp120 tarafından düzenlenir. Aslında, AIDS’de CD4⁺ hücrelerinin 100 000’de 1’inden az bir kısmında bu bağlanma görülmesine rağmen birçok hücre apoptozisle ölmektedir. Bunun mekanizması tam olarak anlaşılmış olmamasına rağmen bazı olasılıklar üzerinde durulmaktadır.

6. Malign hastalıklar. Malign hastalıklar klasik olarak kontrolsüz bir aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Oysa, aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignite gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen dolayısıyla beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler, genomlarında biriktirdikleri mutasyonların etkisiyle

malign hücelere dönüşme potansiyeli taşırlar.

Hücre ölümü:

Apoptozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozisten birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Biyolojik bilimlerde literatüründe apoptozis terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. Apoptozis veya, daha genel anlamda söylemek gerekirse, hücre ölümü uzun süre araştırmacıların çok ilgilenmedikleri bir alan olarak kalmıştır. Fakat apoptozisin gelişim biyolojisinde, normal doku “turnover”ında ve immün sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları gibi bazı önemli fizyolojik süreçlerdeki rolü ortaya çıktıkça önemi de hızla artmıştır.

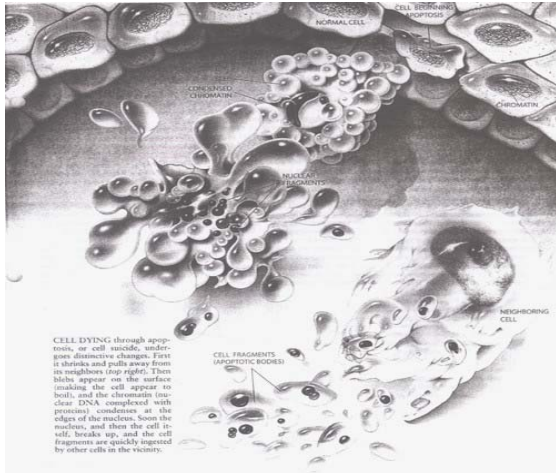
Her saniye yaklaşık bir milyon hücremiz apoptozisle vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Bunların yerine yenileri yapılmaktadır. Yapım (mitozis) ile yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır. İşte bu dengenin apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogeneze katkıda bulunur. Görüldüğü gibi apoptozis organizmada doğru bir şekilde işlemelidir. Olmaması gerekirken gerçekleşen apoptozis veya hızlanmış ya da tam tersine yavaşlamış apoptozis organizma için tehlikelidir. Apoptozisin gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip diyabet, hepatit C enfeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi hastalıklar verilebilirken; apoptozisin yavaşladığı hastalıklara örnek olarak ise otoimmün hastalıklar ve kanser verilebilir.

Apoptozis ve nekrozis:

Apoptozisi anlamak için nekrozisle karşılaştırılarak öğrenilmesi faydalı olacaktır. Bunun için Tablo 1’de nekrozisle

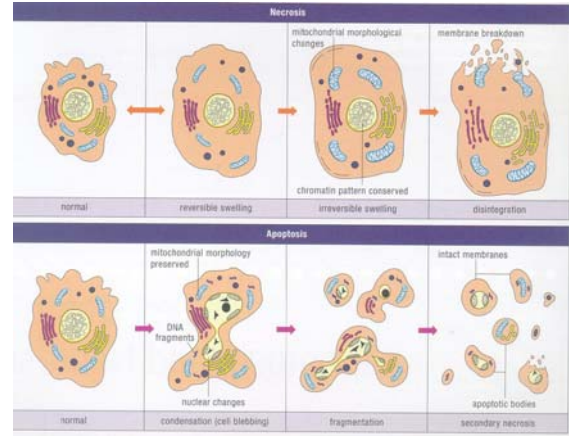
apoptozis karşılaştırılmıştır. Tabloda da görüldüğü gibi, nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Diğer bir ifadeyle apoptozis hem sağlıklı hem de hastalıkta karşımıza çıkmaktadır.

Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken “cell swelling”, apoptotik hücre tam tersine küçülür “cell shrinkage”. Nekrozisde kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatinini nükleus membranının çevresinde toplanır “chromatin aggregation” ve kondanse olur “chromatin condensation”. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepcikler “membrane blebs” oluşur.



Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere “apoptotik bodies” parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır değişen miktarlarda nükleus, veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekrozisde plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış

ortama salınması sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa, apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz.

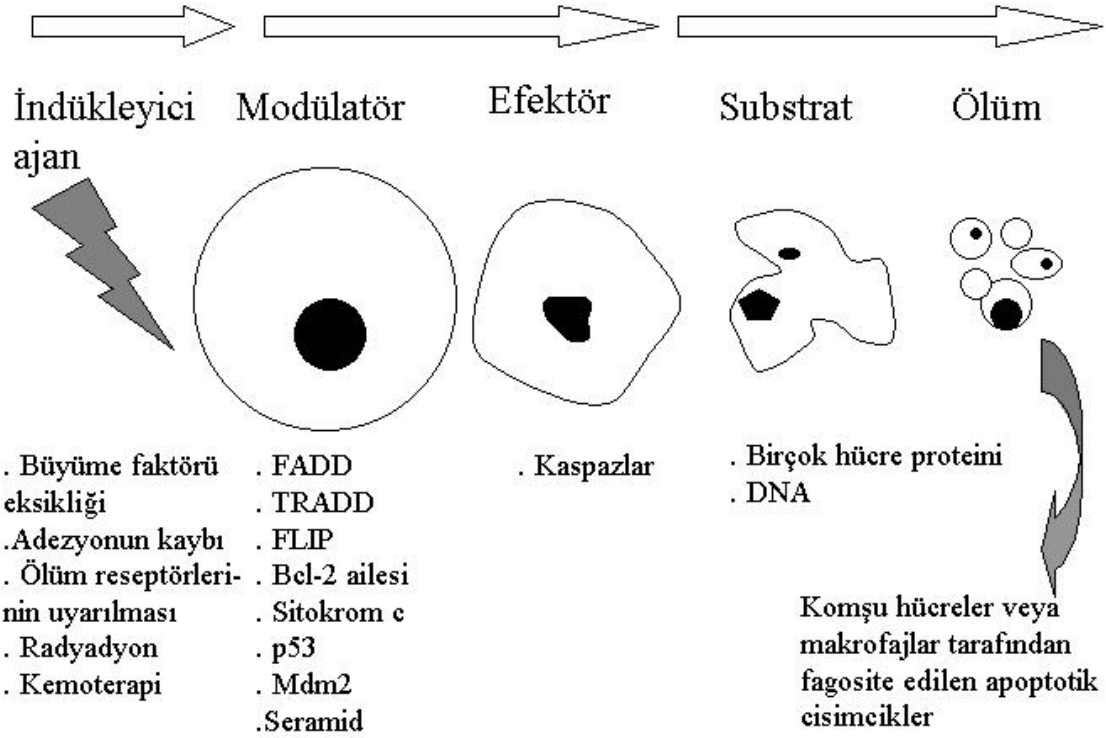


Apoptozisin en önemli özgün yönü (“hallmark”) DNA’nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının “ladder pattern” ortaya çıkmasına neden olur. Ama bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir ya da sadece yaklaşık 50 kilo bazçifti (kbp) boyutunda bir DNA fragmentasyonu da görülebilir. DNA’yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleazdır. Ayrıca, DNase I ve II’de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyarının özelliğine göre değişebilir. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin’in erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır “phosphatidylserine translocation”. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar.

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması “Senescence” HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stress
Morfolojik özellikler	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin “flocculation”u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı fakat membranda “bleb”lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücrenin intact mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotic cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4 °C’de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde “smear” görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu(=ölümün geç safhasında)	İyi kontrollu, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 °C’de gerçekleşmez) DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni=apoptozisin en önemli belirtici) Prelitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

Tablo 1. Nekrozis ve apoptozisin karşılaştırılması. TNRF-1, tumor nekrozis factor reseptörü-1

APOPTOTİK SÜREÇ



Apoptozisin genel görünümü. Not: Sözü edilen faktörlere sürekli olarak yeni ilaveler yapılmaktadır.

Apoptozisin modölatör (mediatör) leri:

Apoptozis çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (*c-myc*), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitakondri) bulunmaktadır. Bazı mediatörler hücre tipine özgündür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli **kalsiyum** girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler. Fakat hücreye kalsiyum girişi apoptozisin gerçekleşmesi için esansiyel değildir. **Bcl-2** ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X_i) geniş bir ailedir. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu ("survival") bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax'ın (ikisinin oranının) bazı hematolojik malignansilerde prognostik değer taşıdığı rapor edilmiştir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir. **Bcl-2** geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bu lenfoma tipinde, Bcl-2 normalden uzun yaşam sürelerine neden olur. Böylece malignite oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Bcl-2 özellikle mitakondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bax sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitakondri membranına bağlanır, burada küçük delikçikler "pore" oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sonuçta sitokrom *c* ve apoptozis-indükleyici faktör olarak bilinen AIF'ün mitakondriden sitozole

çıkmasını sağlar. Bcl-2'nin ayrıca mitakondri ile olan ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidan stresin neden olduğu apoptozisi baskılayabildiği bulunmuştur. **Seramid**, membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür. Plasma membran hasarına karşı bir sinyal olduğu düşünülmektedir. **p53**, hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı ("single or double-strand breaks", nükleotid eksikliği) oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozisi indükler. p53'ün apoptozisi indüklemesi Bax'ın ekspresyonunu artırması böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Bazı virüsler (insan papillom virüsü, Epstein-Barr virüsü, adenovirüs tip 12) ya p53'ü inaktive ederek ya da Bax'a bağlanarak apoptozisi bloke ederler, böylece bu hücrelerin enfekte ettikleri hücreler doğal hücre ölüm mekanizmasından kurtulduklarından virüsle-indüklenen karsinogenezise bu yolla katkıda bulunurlar. p53 ayrıca bir transkripsiyon faktörü olan Mdm2 (murine double minute 2) tarafından da ya transkripsiyonu "down" regüle edilerek ya da kendisine bağlanarak hem aktivitesi inhibe edilir hem de yıkımı hızlandırılır. Fakat, DNA'nın hasarlanması halinde p53'ün fosforilasyonu artar ve buna bağlı olarak da Mdm2'den ayrılır, böylece yarılanma ömrü uzadığı için de aktivitesi artar. **Sitokrom c**, mitakondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom *c*'nin **mitakondriden** sitoplazmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversibl bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom *c*, mekanizması henüz tam olarak

aydınlatılmamış bir şekilde mitokondriden apoptozis-indükleyici faktör (“AIF, apoptosis-inducing factor”) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom *c* sitoplazmik protein olan Apaf-1 (“apoptotic protease activating factor-1”)’e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP’nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9’un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3’ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (“ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease”) inaktifleştirir, böylece ICAD’ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (“CAD, caspase-activated deoxyribonuclease”) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. Buraya kadarki mekanizma kaspaz-bağımlı apoptozisi gösterir, oysa kaspaz-bağımsız apoptozisin varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apoptozis yine mitokondriden salıverilen bir faktör olan AIF’ün etkisiyle gerçekleştirilir. Fakat, AIF’ün etkilediği nükleazın ne olduğu henüz bilinmemektedir (Hunot and Flavell, 2001). **Kaspaz (“caspase”)’lar**, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)’a neden olurlar. Bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimeraz

(PARP)) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim ICE (interlökin 1-β dönüştürücü enzim)’dir ve prokaspaz 1 olarak bilinir. Kaspaz kaskadı, sitokrom *c*’nin sitoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz 9’un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom *c*’nin salıverilmesine neden olabilirler. Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan IAP (“inhibitors of apoptosis”)’leri kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar. Bu inhibitörler birçok malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedirler. IAP’leri ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apoptozisi durdurabilirler. Kaspazlardaki defektler otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna katkıda bulunabilir (Kidd ve ark, 2000). Hatta, kaspaz 8’in nöroblastomada tümör süpressörü olarak işlev gördüğü bulunmuştur (Teitz ve ark, 2000). **Granzim** (“Granzyme”) ler, patojenle enfekte edilmiş hücrelerin veya tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkin rol alırlar. Perforinler ve grenzimler normal olarak sitotoksik lenfositlerin (CTL) ve “natural killer (NK) cell” lerin sitoplazmik granüllerinde bulunurlar. CTL’lerinin hedef hücreye bağlanmasıyla perforinler salgılanır ve hedef hücrenin membranına bağlanarak membranda porlar meydana getirirler. Perforin porlar sitozolik kalsiyum düzeylerinin hızla artmasına yol açar. Beraberinde salgılanan ve bir serin proteaz olan granzimin de bu porlar aracılığıyla hücreye girmesiyle hücre içinde prokaspaz 8’in aktivitesi, dolayısıyla kaspaz kaskadı başlatılır. Bu da enfekte hücreyi (veya kanser hücrelerini) apoptozise götürür.

Apoptozisin indüklenmesi:

Apoptozisi başlatan nedenler çeşitlidir. Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz

faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılması) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunurlar. İlgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL, tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve “natural killer” hücrelerde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein:protein interaksyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri (“death domain”) adı verilen TRADD (“TNFR-1 associated death domain”) ve FADD (“Fas associated death domain”) ile interaksyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirerek caspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar. Hücre içinde ayrıca bu ölüm bölgelerini inhibe eden proteinler de bulunmaktadır. Örneğin, kaspaz 8 (FLICE) FLIP (“FLICE-inhibitory protein”)’i inhibe eder.

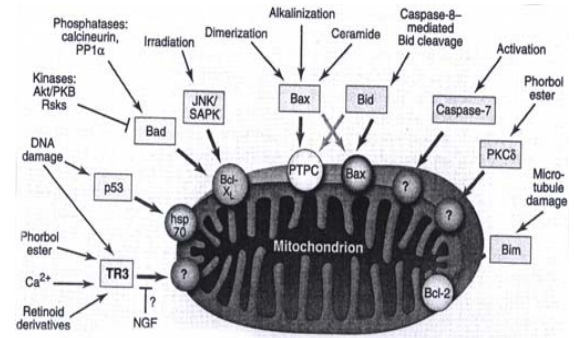
Apoptozis yukarıda da belirtildiği gibi genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır. p53 bax'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilir. Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stress) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir.

Apoptozisi büyüme faktörlerinin ortamdaki eksilmesiyle de başlatılabilir. Hücre kültür ortamında büyütülen hücreler eğer serum açlığı (“serum starvation”)’na maruz bırakılırlarsa apoptozisle ölürlar. Buradaki mekanizma, apoptozis indükleyici bir nükleer protein olan p53 aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşir. Ayrıca, bir pro-

apoptotik (apoptozis uyarıcı) bir bcl-2 ailesi üyesi olan Bad'ın fosforillenmemesi sonucu aktifleşmesi ve böylece mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi yoluyla da gerçekleşir. Apoptozisi başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salıverilen granzim B'lerin hedef hücrede (örn. virüsle enfekte hücre veya kanser hücresi) kaspaz sistemini aktifleştirmesidir.

Apoptozisde mitokondrinin rolü:

Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür.



Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi) apoptotik süreçte irreversibl (geri dönülemez) noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi gerçekleşir (apoptozisin başlaması) veya sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi baskılanır (apoptozisin inhibisyonu).

Bcl-2 Ailesi:

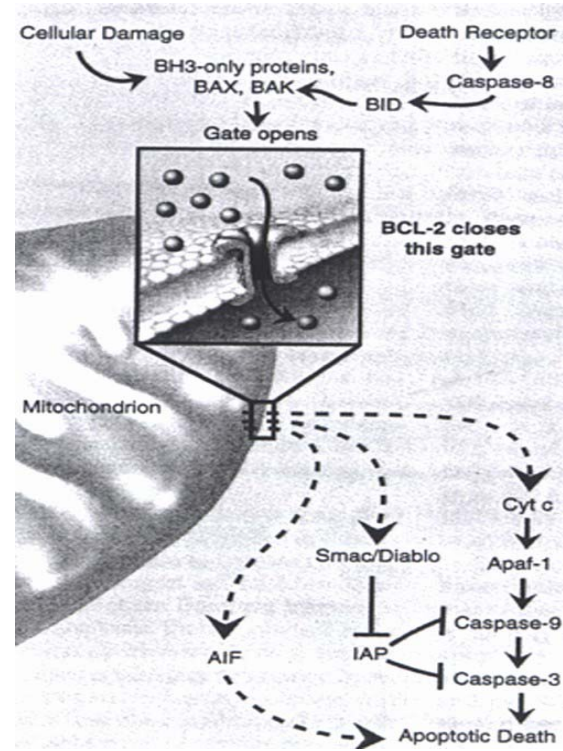
Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri pro-apoptotik, apoptozisi indükleyici, etkiye sahiptir. Diğerisi ise anti-apoptotik, apoptozisi baskılayıcı, etkiye sahiptir. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya

salıverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom c salıverilmesini baskırlar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik a-heliks) bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2, ve BH3 bölgeleri hidrofobik cep'i oluşturur. Amfipatik a-heliks, BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğer bcl-2 ailesi üyesinin BH3 bölgesine bağlanırlar. Pro-apoptotik üyeler kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt grublardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (örn., Bax, Bak), diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunur. Bu bölgenin, apoptozisin diğeri hüresel yollarla "pathway" ilişkisini kurduğu düşünölmektedir. Anti-apoptotik üyeler, doğal olarak "intrinsic" sitokrom c'nin salıverilmesini baskılama özelliğine sahiptir. Bu durumda, pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar ve sitokrom c salıverilmesi gerçekleşir. Bu yüzden, pro ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozisi baskıladığı oysa pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görölmektedir. Anti-apoptotik bcl-2 ailesi üyelerinin en iyi bilinenleri: bcl-2, bcl-X1, Mcl-1 iken, pro-apoptotik olanları ise: bax, bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid'dir.

Bcl-2 ailesinin mitokondri üzerindeki etkileri:

1. *Bid'in kırılması:* Bid, Bak ve Bax gibi pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyeleri normalde hücrelerde sessiz "latent" halde bulunurlar. Bu proapoptotik üyeler aktive edildiklerinde sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesini sağlarlar. Bid'in kırılmasına, dolayısıyla aktifleşmesine, yol açan etken kaspaz-8'in aktivasyonudur. Aktif kaspaz-8, bid'i kırar; böylece, 15 kDa'luk bir karboksi terminal fragmanı

oluşur. Bid ayrıca diğeri hücre yüzey ölüm reseptörleri olan TNF ve TRAIL aracılığıyla da aktifleşir.



Bid'i "knock out" yapılmış fare hepatositlerinde TNF veya anti-Fas ile apoptozis indüklenmeye çalışılırsa, bu farelerde apoptozis oluşmaz. Bu deney, bid'in hücre yüzey ölüm reseptörlerinden gelen apoptotik sinyalin mitokondriye iletilmesinde rol aldığını, böylece ölüm reseptörleri ile mitokondrinin bağlantısını sağladığını göstermektedir. Oluşan bid fragmanı BH3 bölgesine sahip olduğundan diğeri proapoptotik bcl-2 ailesi üyelerle interaksiyona girerek onların normalde buldukları sitoplazmadan mitokondriye göç etmelerine (aktivasyonlarına) neden olur. Bu aktivasyon sonucu, sitokrom c salıverilir. Bid karboksi terminal fragmanı ayrıca, bak-düzenlemeli sitokrom c salıverilmesini de aktifleştirir (Wei MC et al, 2000. Genes and development. 14:2060).

2. *Bad'ın defosforilasyonu:* Bad, birçok normal hücrede bulunmaktadır. Bad'ın diğeri bcl-2 ailesi üyeleriyle kompleks yapması fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile düzenlenir. Normal

koşullarda, bad yaşam (“survival”) faktörlerinin etkisiyle, serin-treonin kinaz Akt/PKB yolu aracılığıyla fosforile durumda tutulur. Fosforile durumda iken antiapoptotik üyelerle kompleks oluşturamadığından onları etkisizleştiremez. Yani, sitokrom c tutucu etkilerini antagonize edemez. Eğer defosforile olursa (örn., yaşam faktörlerinin eksikliği gibi bir nedenle) antiapoptotik üyelerle kompleks oluşturarak antiapoptotik (sitokrom c tutucu) etkilerini ortadan kaldırır. Böylece sitokrom c salıverilmesi gerçekleşir.

3. Bim'in mikrotübüllerden salıverilmesi: Bim, normalde mikrotübüllerle ilişki içinde olan dynein motor kompleksi ile birlikte bulunur. Apoptozis indüksiyonu esnasında mitokondriye göç eder. Pro-apoptotik aktiviteye sahiptir.

Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi kaspazların aktivasyonuna yol açar.

Kaspazlar:

Kaspazlar (“Caspases”), sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağına kırarlar. Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Böylece bir kaskad şeklinde işlerler. Apoptozisde hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler “effectors” olarak bilinirler.

Kaspazların sınıflandırılması:

- Kaspaz-1 (ICE)
- Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2)
- Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama)
- Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICERE_n)
- Kaspaz-5 (ICERE_{III}, TY)
- Kaspaz-6 (Mch2)
- Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)
- Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH)
- Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6)
- Kaspaz-10 (Mch4)
- Kaspaz-11 (ICH-3)
- Kaspaz-12
- Kaspaz-13 (ERICE)
- Kaspaz-14 (MICE)

Kaspazların aktivasyonu:

İnaktif (zimojen) formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu) ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir.

Apaf-1'in indüksiyonu ise sitokrom c'nin mitokondriden salıverilmesi ile gerçekleşir. Apaf-1'in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin biraraya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirir.

Mitokondriden ayrıca AIF (apoptosis indükleyici faktör)'ler salıverilir. Bunlar henüz bilinmeyen bazı nükleazları aktifleştirerek DNA degradasyonuna yol açarlar ama bunların nükleusda yol açtığı morfoloji değişikliği apoptozisde tipik olarak görülen tipde değildir. Daha ziyade, net olarak seçilebilen sınırlardan ziyade düzensiz sınırlı ve periferik yerleşimli dağınık nükleus parçaları şeklindedir.

Her dokunun eksprese ettiği kaspaz tipi farklı olabilir. Bu durumda farklı dokular için farklı kaspazların aktivasyonu yoluyla apoptozisin gerçekleştiği düşünülebilir. Örneğin, periferik T hücreleri ultraviole ile indüklenmiş apoptozise gitmek için ne kaspaz-3'e ne de kaspaz-9'a gereksinim duyarlar. Oysa, embriyonik stem hücreler bu durumda her iki kaspaza da gereksinim duyarlar. Hatta hücrelerin değişik farklılaşma derecelerinde değişik kaspazların aktivasyonuna gereksinim duyulabilir. Örneğin, periferik T hücreleri Fas'ın aktivasyonuna yanıt olarak gelişen apoptozisde kaspaz-3'e gereksinim duyarlar ama timositler kaspaz-3 eksikliğinde yine Fas'la indüklenen bir apoptozise gidebilirler.

Kaspazların substratları:

PARP: Poli (ADP-Riboz) Polimeraz'dır. DNA tamir mekanizmasında rol alan bir enzimdir.

DNA-PK: DNA bağımlı bir protein kinazdır.

PRb: Retinoblastoma geninin ürünüdür. Hücre siklusunun durdurulmasında rol alır.
Lamins: Nükleus membranında yer alan yapısal proteinlerdir.
NuMA: Nükleus mitotik aparatüs protein.
Fodrin: Hücre iskeletinde yer alan yapısal bir proteindir.
 β -Aktin: Hücre iskeletinde yer alan yapısal bir proteindir.
Mdm2: Tümör süpressör protein olan p53'ün inaktivasyonunu sağlayan bir proteindir.
Cyclin A2: Hücre siklusunda rol alır, ve siklusun ilerlemesini sağlar.
Presenilin: Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda biriktiği görülen bazı bileşiklerdir.
Others: Metabolik aktivitelere sorumlu bazı kinazlar gibi.

Apoptozisin özet olarak belli başlı aşamaları:

- Apoptozisin indüksiyonu
- Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması
- Sitokrom c'nin salıverilmesi
- Apoptozom oluşumu (sitokrom c+Apaf-1+kaspaz-9)
- Mitokondriyal transmembran potansiyelinin değişmesi
- Kaspazların aktivasyonu
- Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması
- DNaz'ın aktivasyonu sonucu DNA'nın fragmentasyonu (internükleozomal DNA fragmentasyonu)
- Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptozise özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi

B. APOPTOZİSİN SAPTANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa, günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn. aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir.

İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulundu. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı. Apoptozisin belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodları, 2000'li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikörlerin kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etti.

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır:

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. İmmunohistokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmunolojik yöntemler
5. Moleküler biyoloji yöntemleri

Fakat, bu sınıflama çeşitli şekillerde yapılabilir. Yani, yöntem türünden ziyade apoptozise özgü herhangi bir hücresel olayın / aktivitenin belirlenmesi esas alınarak değerlendirme yapılabilir. Örneğin, apoptozis DNA fragmentasyonu esas alınarak saptanacaksa o zaman

yukarıda sıralanan metodların bir veya birden fazlası kullanılabilir. Çünkü, DNA fragmentasyonu histokimyasal olarak gösterilebileceği gibi, biyokimyasal olarak da gösterilebilir. Hatta, ELISA ile de gösterilebilir. Bu ayırmada önemli olan çalışılacak numunenin cinsidir. Hücre kültürü yapılarak elde edilen bir numune ise, biyokimyasal bir yöntem olan agaroz jel elektroforezi yapılabilir. Eğer bir dokudaki DNA fragmentasyonları (apoptotik hücreler) araştırılıyorsa o zaman da histokimyasal bir yöntem olan TUNEL yöntemi kullanılabilir.

Apoptozis herhangi bir metodla tespit edildikten sonra bir başka metodla da doğrulanmalıdır. Aksi takdirde, yapılan çalışmanın temel bilim araştırmalarının yayımlandığı uluslararası dergilerde yayımlanma şansı ya hiç yoktur ya da azdır. Klinik bilim dergilerinde bu şans daha fazla olabilir.

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri:

1. Işık Mikroskobu
 - a. Hematoksilen Boyama
 - b. Giemsa Boyama
2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop
 - a. Propidium İyodür (PI)
 - b. Hoechst Dye
3. Elektron Mikroskobu*
4. Faz Kontrast Mikroskobu

1.1. Işık mikroskopu kullanımı:

a. Hematoksilen boyama: Morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde en ucuz ve kolay olanı hematoksilen ile boyamadır. Hematoksilen ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. Hematoksilen boyama (HB) hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metod olarak başlanması uygundur ve çeşitli açılardan (örn. ilk

değerlendirme, maliyet) diğer metodlara karşı avantaj sağlar.

Hematoksilen boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Apoptozise özgü değişiklikler iyi bir boyama yapılmışsa kolayca gözlenebilir. Fakat yine de deneyim gerektirmektedir. Çünkü bazı durumlarda mitotik hücreler ile apoptotik hücreler karıştırılabilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi “cell shrinkage”, veya sitoplazmik küçülme “cytoplasmic shrinkage”, kromatinin kondanse olması “nuclear condensation” ve nükleus zarının periferisinde toplanması, nükleusun küçülmesi “pyknosis” veya parçalara bölünmesi “nuclear fragmentation”. Yukarıdaki fotoğrafta hemen hemen merkezi konumdaki iki hücrede nükleus fragmentasyonu görülmektedir.

b. Giemsa boyama: Giemsa ile boyamada hematoksilenle boyamada da olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur.

1.2. Floresan mikroskopu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı:

Floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, DAPI, propidium iyodür) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Floresan sistemler ışık mikroskopuna göre çok daha pahalıdır. Fakat, eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Oysa, hematoksilen ya da Giemsa boyamanın kullanıldığı örneklerde hücrelerin tamamı yöntemin prensibi gereği zaten ölmektedirler. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn.

Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. propidium iyodür) beraber kullanılır. Bu boyama yöntemindeki prensip şudur: Bu yöntemlerde canlılığın belirleyicisi, hücrenin plazma membranının (hücre zarının) intakt olup olmadığıdır. Membranı intakt olan (canlı) hücreler propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlarlar. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskopu ile tanınabilirler. Kuşkusuz, bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayırımı hematoksilen boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisine bakılarak yapılır.

Kromatin kondensasyonu veya nükleus fragmentasyonu olan hücreler apoptotik hücreler olduklarını düşündürür.

Hücrelerin detaylı ayırımı aşağıdaki kriterlere göre yapılır:

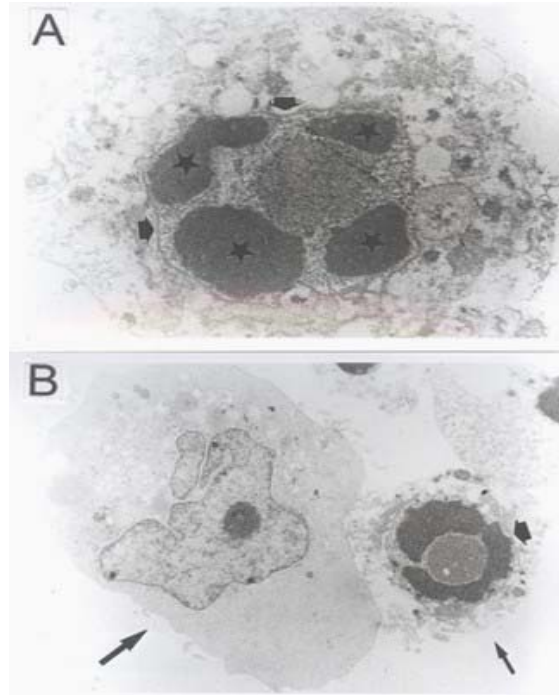
- *Nekrozisle ölen hücreler:* Ölü oldukları belirlenen (Hem propidium iyodür hem de Hoechst boyası pozitif) hücrelerin nükleuslarında apoptotik değişiklikler görülmez. Nükleus paterninde büyük değişiklik yoktur. Nükleusun başlangıçta daha küçük olduğu gözlenebilir ama ileri evrelerde normale göre biraz daha büyümüş görülebilir. Boya yoğunluğu başlangıçta daha fazla olabilir ama ileri evrelerde yoğunluk apoptotik hücrelere göre daha az bulunabilir.

- *Apoptozisle ölen hücreler:* Apoptotik hücrelerde hücre zarı eğer sekonder nekrozis gelişmemişse intakt olduğundan propidium iyodür ile boyanmaz ama Hoechst boyası pozitifdir. Yani propidium iyodür negatif ve Hoechst boyası pozitif boyanırlar. Fakat apoptozise özgü nükleus morfolojisi bu hücrelerde tanı koydurucudur. Tipik nükleus fragmentasyonu en önemli bulgudur.

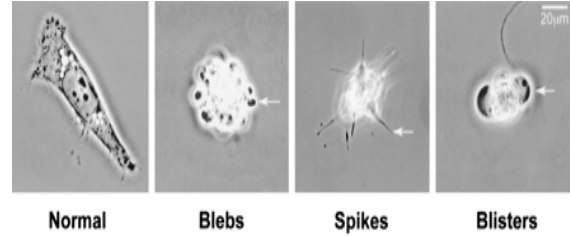
- *Normal (canlı) hücreler:* Propidium iyodür negatifdir. Hoechst boyası ile boyanırlar ve nukleus normaldir.

Özetle: Nekrotik hücreler: Hoechst boyası (+) ve propidiyum iyodür (+); Apoptotik hücreler: Hoechst boyası (+), propidiyum iyodür (-) ve apoptotik morfoloji (+); Normal hücreler: Hoechst boyası (+), propidiyum iyodür (-) ve apoptotik morfoloji (-).

1.3. Elektron mikroskopu: Elektron mikroskopu ile değerlendirme apoptozisde en değerli yöntem (“gold standard”) olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği bir yöntemdir. Üstelik subzellüler detaylar (örn. mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi) da incelenebilir. Yukarıdaki elektron mikroskopu çalışmalarında, üstteki resimde (A) nukleus fragmentasyonu net olarak izlenebilmektedir. Altındaki resimde (B), solda normal bir hücre görülmektedir. Sağdaki apoptotik hücrede, normal hücreyle kıyaslandığında sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilmektedir.

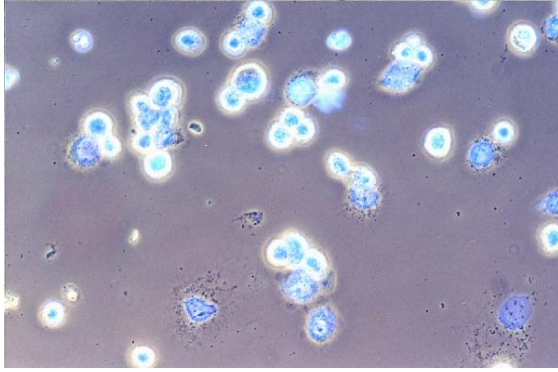


1.4. Faz kontrast mikroskopu: Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, “flask” veya “plate”lerde büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları “substratum”dan ayrılacakları için besiyer içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücreler faz kontrast mikroskopu ile gözlenebilirler. Mitozise giden hücreler de faz kontrast mikroskopuyla gözlenebilirler fakat bu hücreler aynı zamanda apoptotik hücrelerin erken evredeki görüntüleri ile karışabilirler. O yüzden ayrımları hemen hemen imkansızdır. Gerek mitozisde gerekse apoptozisin erken evresinde hücreler üzerine yapıştıkları “substratum” a yayılmış halde değil, tam tersine yuvarlaklaşmış ve küçülmüş olarak görülürler. Faz kontrast mikroskopu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler (“blebs”) izlenebilir.



Hücreler henüz “substratum” a yayılmış haldeler ise hücrelerin sitoplazmasında ortaya çıkan vakuoller de gözlenebilir. Ayrıca, bazı hücre tiplerinde “blister” olarak adlandırılan hücrenin sitoplazmasından dışarıya taşar gibi görülen bir veya birkaç tane büyük vakuoller de gözlenebilir. Bu vakuoller hücreden ayrılıp besiyer içinde yüzebilirler. İçleri boş küresel yapılar olarak gözükürler. Bu vakuoller olasılıkla bazı araştırmacıların hayalet hücre (“ghost cell”) olarak adlandırdıkları yapılardır. Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin başlangıçta hücre membranları intakt olmasına rağmen ileri dönemlerde sekonder nekrozis gelişir ve böylece membran bütünlükleri bozulur. Sekonder nekrozis aşamasına kadar olan süre içinde non-vital boyalar denen (örn. propidium

iyodür) boyalarla boyanacak olurlarsa apoptozis başlamış olmasına rağmen hücreler bu boyalarla boyanmazlar. Çünkü membran bütünlüğü halen tamdır. Sekonder nekrozis geliştikten sonra membran bütünlüğü bozulur ve hücreler non-vital boyalarla boyanma özelliği kazanmaya başlarlar.



“Blister”lerin oluştuğu aşamada membran bütünlüğü halen tamdır ve bu aşamada nükleus morfolojisindeki değişiklikler floresan boyalarla gözlenebilir. Fakat bu dönem uzun sürmez dakikalar içinde membran bütünlüğü bozulur. Faz kontrast mikroskopunda hücreleri gözlemek için normalde boya kullanmaya gerek yoktur ama istenirse yukarıda belirtildiği gibi hem faz kontrast mikroskopisi hem de floresan mikroskopisi aynı anda kullanılabilir. Böylece, örneğin nükleusu renklendirilmiş ve belirgin bir şekilde ortaya konmuş hücrelerin faz kontrast mikroskopisi fotoğrafları elde edilebilir.

2. Histokimyasal yöntemler:

2.1. Anneksin V Yöntemi

2.2. TUNEL Yöntemi

2.3. M30 Yöntemi*

2.4. Kaspaz-3 Yöntemi*

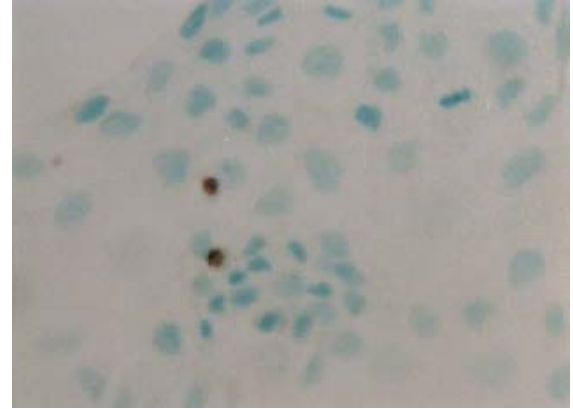
2.1. Anneksin V Yöntemi:

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan

PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS’ler, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur.

2.2. TUNEL Yöntemi:

DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya “plate”lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu metodla saptanabilir.



2.3. M30 Yöntemi:

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18’in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18’i ekspres eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır.

2.4. Kaspaz-3 Yöntemi:

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 İHC metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3’ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu metodla tespit edilebilirler.

3. Biyokimyasal Yöntemler:

3.1. Agaroz Jel Elektroforezi -

DNA fragmentasyonu

3.2. "Western Blotting"

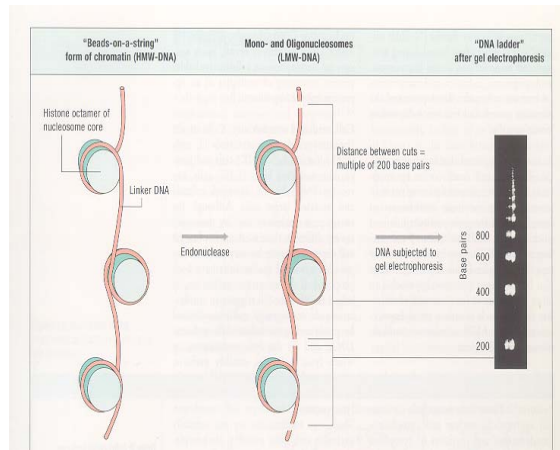
- Substrat kırılmaları
- Aktif kaspaz'ın belirlenmesi
- Sitokrom c salıverilmesi

3.3. "Flow" Sitometri

- DNA azalması
- Annexin V

3.1. Agaroz Jel Elektroforezi:

DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptozisde DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internükleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü "ladder pattern" oluşur. Bu bulgu apoptozisin karakteristik özelliğidir ve nekrozisde görülmez. O yüzden apoptozisi nekrozisten ayırmada faydalı yöntemlerden biridir.



3.2. "Western" Blotting

Bu metod yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metotla belirlenebilir. Yanlız, sitokrom c tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksi-

yonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptozise gittikleri anlaşılır.

3.3. "Flow" Sitometri

"Flow" sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozisde eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozis deteksiyonu açısından kullanışlıdır. Özellikle iki şekilde apoptozis deteksiyonu yapılır. a. floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak, b. Annexin V kullanılarak. Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemlerinin kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarının kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptozis lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu (sub-G1 piki) tayin edilir. İkincisinde, floresan mikroskopuyla uzun zaman alan sayma işlemi saniyeler içinde yapılarak sonuç alınır. "Flow" sitometri grafiklerinde sağ-alt kadrantındaki popülasyon annexin V'in pozitif ve propidium iodyd'in negatif olduğu apoptotik hücrelerin bulunduğu bölgedir.

4. İmmunolojik Yöntemler:

4.1. ELISA

- DNA Fragmentasyonu

- M30 Düzeyi

4.2. Fluorimetrik YÖNTEM

- Kaspaz Aktivasyonu (Hücre kültürü)

4.1. ELISA:

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek

mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür.

4.2. Fluorimetrik Yöntem:

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu “plate”lere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur, ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır.

5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri:

1. “DNA Microarrays” Gen ekspresyon dereceleri (mRNA) - Hücre ölüm reseptörleri - Kaspazlar

DNA “microarray” teknolojisi henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntemdir. Fakat, yakın bir gelecekte tıp pratiğini radikal bir biçimde değiştirme iddiası taşıyan bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir süre içinde (önceden aylarca sürerken) yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA’larının) tespiti mümkün olabilecektir. Böylece, apoptozise özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı doğacaktır.

