

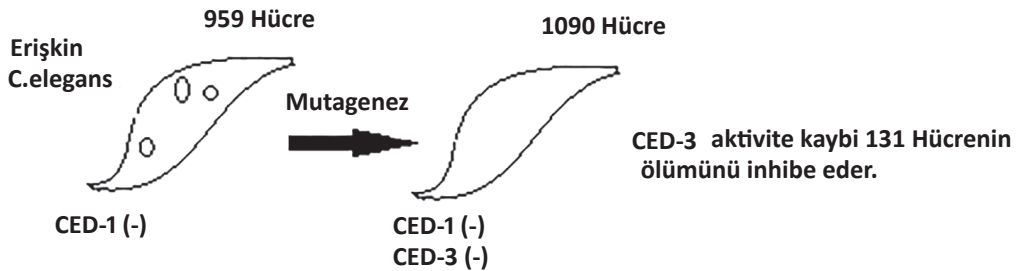
42.1. Apoptoz

Canlılarda yeni hücreler oluşurken, varolan hücrelerin bir kısmı ise patolojik veya fizyolojik nedenlere bağlı olarak ölmekte ve böylece sabit denge korunmaktadır. Varolan hücreler programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, patolojik hücre ölümü olan nekroz veya hücresel strese yanıt olan otofaji gibi çeşitli hücre ölüm tipleriyle yok olurlar.

Her gün milyonlarca hücre normal dokuların kendini yenileyebilmesi için ölür, hayati bir durumdur. Her hücrenin yaşam süresi birbirinden farklı olduğundan fizyolojik hücre ölüm süresi de farklılık göstermektedir. Yani bazı kan hücreleri ve barsak hücrelerinde fizyolojik ölüm daha sık iken, miyosit ve nöron gibi hücrelerde fizyolojik hücre ölümü daha az (geç) görülür. Hücre ölümünün en temel programlanmış hali ile dengenin sağlanabilmesine apoptoz adı verilir. Apoptoz Yunanca sonbaharda yaprak dökümü anlamında kullanılmakta ve hücrelerdeki ölüm ancak zamanı geldiğinde gerçekleştiği için apoptoz teriminin buna uygun olduğu düşünülmektedir. Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında John F. Kerr, Andrew Wyllie ve Sir Alistair Currie tarafından hücre ölümünün karakterizasyonu için

kullanılmıştır. Apoptoz ilk zamanlarda hücre morfolojisindeki değişiklik diye tanımlanırken günümüzde moleküler, biyokimyasal ve hücresel düzeyde değişiklikler olarak tanımlanır. Apoptoz kromatin kondensasyonu, nükleer fragmentasyon, membranda küçük baloncukların oluşması gibi temel morfolojik değişiklikler ile karakterize edilir.

Memeli hücrelerinde apoptoz sürecinde yer alan mekanizmaların anlaşılması, *Caenorhabditis elegans*'ın model organizma olarak kullanılması ile olmuştur. *C. elegans* 'da gerçekleşen apoptozun ana efektörleri memeli organizmalarda da korunmaktadır ve bunlar CED (cell death protein) olarak bilinir (Şekil 42.2). Aslında, *C. elegans*'taki ana apoptotik yol, ölecek olan hücrelerde EGL-1 (Programmed cell death activator) 'in aktivasyonu ile başlar. EGL-1, aktive edildiğinde *C. elegans*'daki anti-apoptotik olarak bilinen CED-9'u bağlar. CED-9 BCL-2 (B-cell lymphoma 2) benzeri proteindir ve EGL-1 tarafından inhibe edilir. CED-4 ise CED-9 tarafından inhibe edilir ve BH3 domaine benzer bir yapı içerir. CED-4, memeli APAF-1 (Apoptotic protease activating factor 1)'in benzeridir ve hücre ölümüne yol açan bir kaspaz olan CED-3'ün etkinleştiricisi olarak görev yapar. CED-3 ise memeli hücrelerindeki kaspazlara benzer.



Şekil 42.1. *C.elegans*'ta apoptozu etkileyen temel faktörler

- Spesifik hedef protein tespiti için eşleşen antikolar

Membran üzerinde antikoların eşleşmesi sonrasında ikincil antikordaki enzime bağlı olarak kolorimetrik, kemilüminesans veya floresans olarak sinyal oluşturacak substratlar kullanılmaktadır. Kemilüminesans yöntem hassasiyeti sebebiyle çok tercih edilmektedir. Genellikle antikoların eşleşmesinden sonra horseradish peroksidaz (HRP) bağlı ikincil antikor substrat luminol ile reaksiyona sokulur. Hedef proteinin gösterilmesi için membran üzerine kemilüminesans bir reaktif dökülerek protein bantları X-ışını filmi veya bir görüntüleme sistemi üzerinde görülür. Özellikle western blotlamada Bcl-2 ailesi üyeleri ve kaspaz aktivitesi analiz edilebilir. Kaspaz aktivitesinde kaspazların yarılması sonucu oluşan bantlar kolaylıkla görünür ve aktivite tespit edilebilir. Ayrıca kaspaz enzim aktivitesi proteazların amino asidi dizisine dayanan ELISA (Enzime bağlı immünosorban yöntem) ile kolorimetrik

olarak ölçülmektedir. Bu yöntem hücre içerisindeki kaspaz aktivitesini analiz etmek için basit ve etkilidir. Bu yöntemde etiketli substrat DEVD-pNA'dan (DEVD, bir amino asit dizisi Asp-Glu-Val-Asp) ayrıldıktan sonra, kromofor p-nitroanilidin (pNA) saptanmasına dayanır. Spektrofotometre veya 400 nm veya 405 nm'de bir mikro plaka okuyucusunda pNA'yı ölçmek için kullanılabilir.

► 42.3.7. TUNEL Yöntemi

TUNEL, DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlayan histokimyasal bir yöntemdir. Parafin içine gömülmüş olan dokulardan alınan kesitler, terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı deoksiridin trifosfat (dUTP) kullanılarak yapılan in situ işaretleme yapılır. Enzime biyotin etiketleme yapılır. Biyotin etiketlemede Streptavidin-horseradish peroksidaz ve diaminobenzidin (DAB) gibi kolorimetrik substratlar kullanılarak apoptozun histolojik olarak görüntüsü elde edilir.

42.4. Kaynaklar

- Arvanitis M, Li DD, Lee K, Mylonakis E. Apoptosis in *C. elegans*: lessons for cancer and immunity. *Front Cell Infect Microbiol* 2013; 3: 67.
- Chen M, Wang J. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 2002; 7: 313-319.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR.. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 2010; 37: 299-310.
- Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 49-63.
- Haiming Dai, X Wei Meng, Kaufmann SH. BCL-2 Family, Mitochondrial Apoptosis, and Beyond. *Cancer Transl Med* 2016; 2: 7-20.
- Hardwick JM, Soane L. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: a008722.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2005; 2: 1463-1467.
- Nambiar KS, Hegde V. Apoptosis detection modalities: A brief review. *International Dental & Medical Journal of Advanced Research* 2016; 2: 1-5.
- Niu X, Brahmabhatt H, Mergenthaler P, Zhang Z, Sang J, Daude M, et al. A Small-Molecule Inhibitor of Bax and Bak Oligomerization Prevents Genotoxic Cell Death and Promotes Neuroprotection. *Cell Chem Biol* 2017; 24: 493-506.
- Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim et Biophys Acta* 2004; 1644: 83-94.
- Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW.. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: a008714.
- Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM, et al. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 521-31.
- Westphal D, Kluck RM, Dewson G. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death and Differ* 2014; 21: 196-205.