

KROMOZOM KIRIKLARI VE MİKRONÜKLEUS-APOPTOZ BAĞLANTISI

Dr. Derya ÜSTÜNER*

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Meşelik / ESKİŞEHİR

Özet

Mikronükleus, kromozom parçalarından veya tüm kromozom kaynaklı olup bölünme esnasında anafazda geciken küçük ve fazladan oluşan nükleer oluşumlardır. Son yıllarda in vitro mikronükleus testi, genotoksisite için umut verici bir metod olarak kabul görmeye başlamıştır. Cytokinesis Block MicroNucleus (CBMN) analizi mikronükleusla beraber apoptotik ve nekrotik hücreleri de tanımlar. Bu test kanser tedavisi sırasında ve genotoksitesi belirlemede kullanılabilir. Bu gibi ölçümler kromozom kırığı ve apoptoz - kanser yolağındaki mekanizmaların aydınlanmasında da faydalı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kromozom, Mikronükleus, Apoptoz

CHROMOSOME FRACTURES AND MICRONUCLEUS-APOPTOSIS CONNECTION

Abstract

Micronuclei (MN) are small and extra nuclear bodies which is originating from chromosome fragments or whole chromosomes that lag behind at anaphase during nuclear division. In the recent years, the in vitro micronucleus test has become promising methodologies for genotoxicity testing. Cytokinesis blocked micronucleus (CBMN) assay is described as the inclusion of apoptotic and necrotic cells behind micronucleus. This test can be used during cancer treatment and to determine genotoxicity. These measurements, such as fracture of the chromosome, enlightenment of the mechanisms apoptosis and cancer pathway will be useful.

Key Words: Chromosome, Micronucleus, Apoptosis

1.Giriş

Kromozom kırıkları, ya kendiliğinden ya da mutajenik ajanlar nedeniyle oluşabilirken; bazen de iyonize radyasyon veya DNA hasarına neden olan kimyasallardan köken alabilmektedir. Genellikle kırılmış uçlar yeniden birleşir ve kırık onarılır ancak bazı durumlarda, bir kırık kromozomlarda delesyona yol açabilir veya bir hücrede birden fazla kırık meydana gelmişse kromozomların yeniden düzenlenmeleri mümkün olabilmektedir [1].

* E-Mail: dustuner5@gmail.com; dustuner@ogu.edu.tr

Kromozom kırıkları hücre siklusunun G₁, S ve G₂ evrelerinde mitoz ve mayoz süresince oluşabilir. Kromozom kırık çalışmaları, gen mutasyonlarında yapılan araştırmalar ile bağlantılıdır. Çünkü pek çok mutajen hem kromozom kırıklarını hem de gen mutasyonlarını indükler. DNA'nın bir kolunda kırık oluşma nedenlerini; pirimidin dimerlerinin oluşması (kısa dalga boylu UV), baz alkilasyonu (alkilleyici ajanlar), iplikçikler arasında çapraz bağlantı (uzun dalga boylu UV, çok fonksiyonlu alkilleyici ajanlar), DNA çift sarmalının arasına mutajen girmesi (acriflavin, proflavin vb.) gibi etkenleri söyleyebiliriz [1, 2, 3, 4].

Kromozomlarda yapısal olarak iki tip kırık vardır. Bunlar, kromozom tipi kırık ve kromatid tipi kırıklardır. Bir ajanın kromozom ya da kromatid tipi kırıklara neden olması, hücre siklusunun hangi fazında etkili olduğuna bağlıdır. Eğer ajan mitoz bölünmenin Go ya da G1 fazında etkiliyse kromozom tipi kırıklara, S ya da G₂ fazında etkili ise kromatid tipi kırıklara neden olur. Kromozom kırıkları, eğer G₁ fazında yalnız bir kromatid de bir kırık meydana getirir ve S fazı boyunca devam ederse, metafazdan sonra her iki kromatid de kırık oluşur ve böylece kromozom tipi kırık meydana gelir. Bu kırık tekrar birleşmez ise, bir delesyonlu kromozom ve bir asentrik fragment meydana gelir. Kromozom kırılması sonucu oluşan asentrik parçalar ya metafazda kaybolmakta ya da anafazda mikronükleusları oluşturmaktadır [1, 2, 3, 4].

2. Yöntem

2.1. Mikronükleus oluşum mekanizması ve kriterleri

MN (Mikronükleus) oluşumu ilk olarak Howell ve arkadaşları tarafından eritrositlerde saptanmıştır. Jolly tarafından tanımlanmıştır. Bu nedenle Howell-Jolly cisimciği adı da verilmektedir. Mikronükleus, hücre bölünmesi sırasında serbest kalan kromozom fragmentinin ya da kromozomların ortamda varlığını sürdürmesidir. Bir nükleoplazma ile sarılarak sitoplazma içerisinde ana nükleusun yanında yer alan nükleer materyaldir [5]. MN oluşumunun temelini, DNA hasarı oluşturmaktadır. Organizmanın çeşitli mutajenik, klastojenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalması sonucunda DNA'da harabiyet meydana gelmektedir. Genetik hasar ölçümünde, MN testinin toksikolojide, diyetle, ilaç sanayide, kanser riski oluşumu şüphesinde, radyoterapide önemi anlaşılmıştır [6]. DNA hasar oranının in vivo ve in vitro olarak belirlenmesinde, en ekonomik ve pratik tekniklerden biri haline gelmiştir [5,6,7,8,9].

MN tekniği, insan periferik kan lenfositlerinde kemik iliğinde ve yanak mukoza hücresinde kimyasal ajanların genotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Tekniğin basit oluşu, kısa zamanda sonuca ulaşılması ve DNA harabiyeti konusunda güvenilir bilgi vermesi tekniği önemli hale getirmiştir [7,8,9]. Bugün, pek çok kanser tipi ile spesifik kromozom düzensizlikleri arasında bağlantı olduğu bilinmektedir. Bu amaçla kanserli olgularda mikronükleus testi yapılmakta ve anlamlı sonuçlar elde edilmektedir [10,11,12]. MN testi ile ölçülen genotoksitesi ve iyonize radyasyonla tedavi sırasında sitotoksik ilişki incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre MN testi, gerek kanser gerekse tedavi sırasında kullanılabilen bir test haline gelmiştir.

MN testinin geniş bir araştırma ortamı bulunduğu diğer bir alanda yaşlanmadır. Yaş artışıyla anöploidi sıklığı arasında yakın bir ilişki vardır. Bireyin yaşam içerisinde maruz kaldığı çevresel ajanların etkisiyle kromozomların normal bölünmeden saptığı belirlenmiştir. Her hücrenin mitotik aktivitesi yaş ilerledikçe yavaşlamakta ve mitoz bölünmede iğ iplikçiklerinde katalizör görevi yapan enzimlerde dejenerasyon oluşmaktadır [13,14,15,16,17].

CBMN (Cytokinesis Block MicroNucleus) analizleri, Cyt-B'nin (Cytochalasin-B) hücre bölünmesini sitokinez evresinde durdurması özelliği temel alınarak tanımlanmıştır. [6,7,8]. Cyt-B, Helmin dematiodeumdan elde edilen bir ekstraktır. Cyt-B hücre bölünmesini sitokinez evresinde aktin filamentlerini etkileyerek durdurur. Bu etkisini de aktin filamentlerin ucuna bağlanarak, aktinin polimerize olmasını önleyerek gerçekleştirir [15,16,17,18,19]. Maluf ve arkadaşları, CBMN yönteminden faydalanarak, Down sendromlu ve Fanconi anemili hastalarda MN frekanslarının yüksek olduğunu göstermişlerdir [20]. Down sendromlu bireylerin malin hastalıklar için yüksek riske sahip hastalık grubundan olduğunu belirterek, bu hücrelerin çeşitli mutajen, radyasyon, virüs ve kimyasallara karşı fazlaca hassas olduğu için periferik kanlarında MN frekansının yükseldiğini belirlemişlerdir [20]. Bisht ve arkadaşları da doza bağlı olarak artan MN dağılımından 1'li MN oranının fazla oluşunun asentrik fragment kaynaklı olduğunu açıklamışlardır [21]. Mikronükleuslardaki kromozom orijinlerini belirleyebilmek için, MN'un orijinin tüm kromozomdan mı (sentromer pozitif MN) yoksa asentrik kromozom parçasından mı kaynaklandığını (sentromer negatif MN) anlayabilmek için de FISH (Floresan In Situ Hibridizasyon) tekniği kullanılmaktadır [22, 23, 24].

Fenech ve arkadaşları ise, NPB (NucleoPlasmic Bridge: Nükleoplazmik Köprü) oluşumlarının anafazda kromozomların sentromerlerin zıt kutuplarına çekilmesi sırasında gerçekleştiğini ve bir yada daha fazla NPB'lerin yanındaki 1'li veya 2'li MN'ların % 60'ından daha fazlasının asentrik kromozom parçasından orijin aldığını göstermişlerdir [5]. Bu oluşumların moleküler mekanizması tam olarak ortaya konamamıştır ama gelecekte bu yönlü çalışmalar ile mekanizmalar açığa çıkarılacaktır.

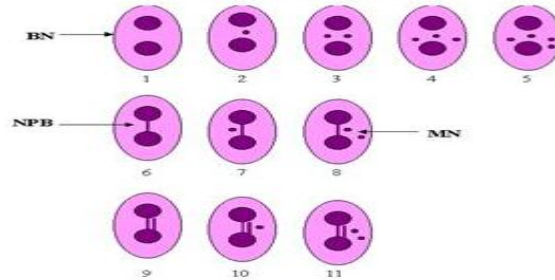
2.2. Mikronükleus hesaplama kriterleri

İnsan lenfositlerinin sitokinezinde bloklanan mikronükleus için detaylı hesaplama yöntemleri Washington'da Genotoxicity International Work Shop'la tüm dünyaya bildirilmiştir [9]. Buna göre, CBMN analizlerinde öncelikle hücre tipleri belirlenmelidir. Hücreler, mononükleus, binükleus, multinükleus, hücre tipinde ya da apoptotik veya nekrotik hücre tipinde olabilirler.

Mononükleuslu hücreler küçük sitoplazma, büyük nükleus şeklindedir. Binükleuslu hücreler ise aynadaki görüntü kadar eş büyüklükteki iki hücre tipindedir. Bu tip hücreler nükleoplazmik köprüyle (NPB) beraber olabilir. Nükleuslar birbirine dokunabilir veya üst üste olabilir. Multinükleuslu hücreler üç veya dördü halde, farklı büyüklükteki hücre formundadır [9]. Bu tip hücreler pek çok MN içerebilir. Apoptotik hücrelerde ise sitoplazma bozulmamıştır. Kromatin yoğunluğu artmıştır. Nükleer sınırlar ya erken ya da geç apoptotik formundadır. Nekrotik hücrelerde, sitoplazmik sınırlar daha az tanımlıdır ve vakuoller vardır. Çok sayıdaki vakuoller sitoplazmadadır. Sitoplazmik membranın hasara uğrayıp nükleusun çok az bozulduğu kısım erken nekrotik hücre fazıdır. Geç nekrotik hücrede ise sitoplazma kaybolmuştur [9].

Sitokineзде bloke edilmiş hücreler CBMN frekansı için hesaplanırken aşağıdaki özellikleriyle karakterizedir:

- MN sayımları BN' (Binükleus) da yapılmalıdır.
- MN'ların çapı ana nükleus yarı çapının 1/16 ile 1/3 arasındaki değerlerde olmalıdır.
- MN'ın alanı ana nükleusun alanının 1/256 ile 1/9'u arasında olmalıdır.
- MN'lar ana nükleusa bağlı olmamalıdır.
- MN'ların çoğu nükleusların arasındadır ama aynı zamanda hücrelerin kutuplarında da olabilir.
- MN'ların yapıları küçük nükleuslara benzer. Fakat kabarcıklar, noktalar MN olarak kabul edilmemektedir (Şekil 1) [9].



Şekil 1. CBMN (Cytokinesis Block MicroNucleus) Dağılımı;

1. Binükleuslu hücre, 2. Bir MN 'lu BN hücre, 3. İki MN 'lu BN hücre, 4. Üç MN 'lu BN hücre, 5. Dört MN 'lu BN hücre, 6. NPB'li BN hücre, 7. Bir nükleoplazmik köprü ve bir MN 'lu BN hücre, 8. Bir nükleoplazmik köprü ve iki MN 'lu BN hücre, 9. İki nükleoplazmik köprü, 10. İki nükleoplazmik köprü ve bir MN 'lu BN hücre, 11. İki nükleoplazmik köprü ve iki MN'lu BN hücre

Not : Fenech M.: The in Micronucleus Technique'den modifiye edilmiştir [9].

Klastojenlere maruz kalmış BN hücrelerde nükleoplazmik köprüler gözlemlenir. Bu köprüler iki nükleusu birleştirir. NPB'lerin anafaz boyunca sentromerlerin zıt kutuplara çekilerek disentrik kromozom oluşumu nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Bu köprü kalınlığı BN hücrelerdeki nükleus çapının 1/3 - 1/25 arasında değişmektedir [5, 9].

Sensitif nükleer bölünme frekansını hesaplamak için nekroza ve apoptoza uğramış hücreleri de saymak gerekmektedir. Bu yüzden daha duyarlı formüllere ihtiyaç duyulmuştur. Hücrelerin büyük bölümü yüksek toksik dozlu kimyasallarda ölmektedir. Hücre bölünme kinetiği kullanılarak modifiye edilen eşitlikte aşağıda belirtilen NDI (Nuclear Division Index:Nükleer Bölünme Frekansı) ve NDCI (Nuclear Division Cytotoxicity Index:Nükleer Bölünme Sitotoksite Frekansı) hesaplamaları ile lenfositlerin mitojenik cevapları belirlenmektedir (**Şekil 2**) [9,25].

$$\text{NDI: } [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$$

$$\text{NDCI: } [Ap+Nec+M1+2(M2)+3(M3)+4(M4)] / N^*$$

Ap: Apoptotik hücre

Nec: Nekrotik hücre

M1 : Bir nükleuslu hücre,

M2 : İki nükleuslu hücre,

M3 : Üç nükleuslu hücre,

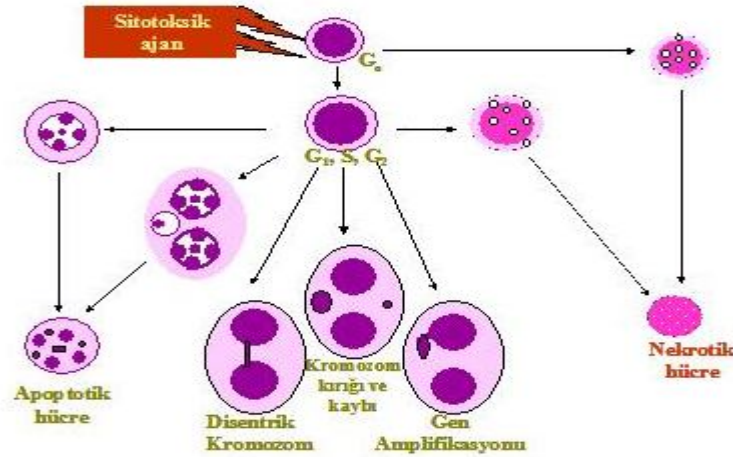
M4 : Dört nükleuslu hücre,

N: Toplam yaşayan hücre,

N* : Toplam hücre (Yaşayan hücre + Apoptotik hücre + Nekrotik hücre)

NDI: Nuclear Division Index (Nükleer Bölünme Frekansı)

NDCI: Nuclear Division Cytotoxicity Index (Nükleer Bölünme Sitotoksite Frekansı)



Şekil 2. Sitotoksik ajanın etkisindeki hücrelerin olası durumları

Not : Fenech M.: Micronuclei, NPB & nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes CBMN assay'den modifiye edilerek alınmıştır. [5].

3. Sonuç

Son yıllardaki çalışmalar göstermiştir ki; nükleer oluşumlar güçlü gen amplifikasyon ölçümleridir ve bu oluşumlar MN artışıyla beraber görülmektedir. Farklı maddelerdeki sitotoksik etkinin belirlenmesi çalışmaları, CBMN analizlerine farklı boyutlar kazandırmıştır. Binükleus hücrelerdeki, yapışık olan oluşumlar DNA amplifikasyonu olarak değerlendirilmeye başlanmış ve tıpkı CBMN sayımındaki gibi BN hücrelerin yanındaki oluşumlar sitotoksite kontrolü için ayrı birer biyolojik marker olarak kabul görmeye başlamıştır.

Sitotoksik ajanların etkisindeki hücreler kromozom kırıklarına, mikronükleus ve apoptotik hücre oluşumlarına yol açmaktadır. Cytokinesis Block MicroNucleus (CBMN) metodu ile apoptotik ve nekrotik hücreler de belirlenerek, DNA hasarı gösterilebilmektedir. Mikronükleus (MN) indeksi kanser riskinde de belirleyicidir. Böyle çalışmaların eklenmesi ile de kromozom kırığı onu takip eden mikronükleus ve apoptotik hücre oluşumu ve kanser ilişkisi ortaya konabilecektir. Bununla beraber bu yolakta daha pek çok mikro düzeydeki çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

- [1] Rooney, D.E., Czepulkowski, B.H, "Human Cytogenetics", Second Edition, *Oxford University Press*, (1992).
- [2] Gardner, R. J. M. K., Sutherland, G. R, "Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling", *Oxford University Press*, 1996.
- [3] Başaran, N, "Tıbbi Genetik", 7. Baskı, *Güneş ve Nobel Tıp Kitabevi*, (1999).
- [4] Conner, J.M., Smith, F. M.A, "Essential Medical Genetics", *Blackwell Scientific Publications*, Fourth ed., (1993)
- [5] Fenech, M., Crott, W.J, "Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay", *Mutation Research*, 504: 131-136 (2002).
- [6] Fenech, M, "The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry", *Health Phys*, 98(2): 234-243 (2010).
- [7] Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E K., Fenech, M. , "Buccal micronucleus cytome assay", *Nat. Protoc.* 4(6) :825-837 (2009).
- [8] Wu, J., Lyons, GH., Graham, RD., Fenech, M., "The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay", *Mutation Research*, 24(3) :225-232 (2009).
- [9] Fenech, M, "The in micronucleus technique", *Mutation Research*, 455: 81-95, (2000).
- [10] Bolognesi, C., Filiberti, R., Neri, M., Perrone, E., Landini, E., Canessa, P.A., Simonassi, C., Cerrano, P.G., Mutti, L., Puntoni, R, "High Frequency of Micronuclei in Peripheral Blood Lymphocytes as Index of Susceptibility to Plevral Malignant Mesothelioma", *Cancer Research*, 62: 5418-5419 (2002).
- [11] Rothfub, A., Schütz, P., Bochum, S., Volm, T., Eberhardt, E., Kreienberg, R., Vogel, W, "Induced Micronucleus Frequencies in Peripheral Lymphocytes as a Screening Test for Carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families", *Cancer Research*, 60: 390-394 (2000).
- [12] Smimizu, N., Shimura, T., Tanaka, T, " Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei", *Mutation Research*, 448: 81-90 (2000) .
- [13] Bonassi,S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Volders, M.K., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Tia, C., Giorgio, D.M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarfi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova,I., Vral, A.,Zijno, A, "Human Micronucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei", *Environmental and Molecular Mutagenesis* 37: 31-45 (2001).
- [14] Elhajouji, A., Tibaldi, F., Volders, K.M, "Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors *in vitro* in human Lymphocytes", *Mutagenesis*, 12:133-140 (1997).
- [15] Lindholm, C., Norppa, H., Hayashi, M., Sorsa, M, "Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin B in human lymphocyte cultures", *Mutation Research*, 260: 369-375 (1991).
- [16] Tawn, E.J., Whitehouse, C.A, "Frequencies of chromosome aberrations in a control population determined by G banding", *Mutation Research*, 490: 171-177 (2001).
- [17] Umegaki, K., Fenech, M, "Cytokinesis-block micronucleus assay in WILZ-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils", *Mutagenesis*, 15: 261-269 (2000).
- [18] Seoane, A.I., Dulout, F.N, "Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay", *Mutation Research*, 490: 99-106 (2001).
- [19] Toksi, G., Stankovi, M., Radovanovi, S., Dragi, M, "The use of cytochalasin block (CB) micronucleus test to identify clastogenic and antiproliferative action", *Archi ve of Oncology*, 9: 47-48 (2001).
- [20] Maluf, S.W., Erdtmann, B, "Genomic instability in Down Syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis", *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 124: 71-75 (2001)
- [21] Bisht, S.K., Devi, U.P, "Dose dependent increase in the frequency of micronuclei and chromosomal aberrations by misonidazole in mouse bone marrow", *Mutation Research*, 325: 57-63 (1994).
- [22] Digue, L., Orsiere, T., Meo, D.M., Mattei, G.M., Depetris, D., Duffaud, F., Favre, R., Botta, A, " Evaluation of the Genotoxic Activity of Parlitaxel by the *in Vitro* Micronucleus Test in Combination With Fluorescent *in Situ* Hybridization of a DNA Centromeric Probe and the Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis Technique (Comet Assay) in Human T-Lymphocytes", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34: 269-278 (1999).

- [23] Fomina, J., Darroudi, F., Boel, J.J. W.A., Natarajan, T, "Discrimination between complete and incomplete chromosome exchanges in X-irradiated human lymphocytes using FISH with pan-centromeric and chromosome specific DNA probes in combination with telomeric PNA Probe", *Int. J. Radiat.Biol.* 76: 807-813 (2000).
- [24] Migliore, L., Cocchi, L., Nesti, C., Sabbioni, E, "Micronuclei Assay and FISH Analysis in Human Lymphocytes Treated With Six Metal Salts", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34: 279-284 (1999).
- [25] Thomas, P., Umegaki, K., Fenech, M, "Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis- block micronucleus assay", *Mutagenesis*, 18: 187-194 (2003).