

**Programlı Hücre Ölümü; Apoptoz
Programmed Cell Death; Apoptosis
Tuğba Dağdeviren¹**

**¹Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp
Fakültesi, Histoloji
Embriyoloji Anabilim Dalı,
Sivas, Türkiye**

Sorumlu Yazar

Tuğba DAĞDEVİREN
Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp
Fakültesi, Histoloji Embriyoloji
Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye.
Posta kodu: 58140

E-mail:

dagdevirentuba@gmail.com

Özet

Organizmada yaşam, belirli aşamalardan oluşmaktadır. Bunlar; doğum, canlılığın devamı olan üreme, yaşlanma ve nihayetinde ölümdür. Yaşamın bu şekilde devam edebilmesi için canlıyı oluşturan temel fonksiyonlar arasında bir denge vardır. Organizmada yeni hücreler oluşurken, var olan hücrelerin bir kısmı da hücre ölümü ile ortadan kaldırılmaktadır ve böylece ölüm ile yaşam arasındaki denge korunmaktadır. Fizyolojik ve patolojik durumlarda hücreyi ölüme götüren ve işleyişleri farklı olan iki mekanizma vardır, nekroz ve apoptoz. Apoptoz, programlı hücre ölümü olarak bilinen enerjiye bağımlı fizyolojik bir süreçtir. Apoptoz, embriyolojik gelişim ve erişkin dokuların devamlılığında kritik rol oynar. Programlı hücre ölümü organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış ya da hasarlı hücreleri genetik düzeyde de kontrol ederek yok eden bir mekanizmadır. Apoptoz hızının bozulduğu, yavaşladığı veya arttığı durumlarda çeşitli hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Apoptozu düzenleyen mekanizma, çeşitli proteinleri ve molekülleri içerir. Bu moleküllerin karşılıklı aktivasyonu apoptozun gerçekleşmesi için önemlidir. Bu derlemede, programlı hücre ölümünün nasıl gerçekleştiği, apoptotik yollara ait moleküler mekanizmaların neler olduğu ve apoptozun belirlenmesinde kullanılan çeşitli yöntemler genel hatlarıyla ifade edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz; Bcl-2; Kaspaz

Abstract

Life in an organism consists of specific stages. These are birth, fertility that is the continuation of life, aging, and eventually death. In order for life to continue in this way, there is a balance between the basic functions that forming the life. While new cells are formed in the organism, some of the existing cells are eliminated by cell death, thus maintaining the balance between death and life. In physiological and pathological conditions, there are two mechanisms that lead to cell death and differ in their functioning, necrosis and apoptosis. Apoptosis is an energy-dependent physiological process known as programmed cell death. Apoptosis plays a critical role in embryological development and continuity of adult tissues. Programmed cell death is a mechanism that destroys cells that the organism does not need, that have completed their biological task or that control and destroy damaged cells at the genetic level. Various diseases occur when the rate of apoptosis is impaired, slowed down or increased. The mechanism that regulates apoptosis involves various proteins and molecules. Mutual activation of these molecules is important for apoptosis to occur. In this review, how programmed cell death occurs, what are the molecular mechanisms of the pathways

and various methods used in the determination of apoptosis are expressed in general terms.

Keywords: Apoptosis; Bcl-2; Caspase.

Giriş

Vücudumuzdaki her hücrenin belirli bir yaşam süresi vardır. Ve zamanı geldiğinde her hücre ölümle sonuçlanır. Hücre ölümü ve hücre proliferasyonu arasında düzenli bir iç denge bulunur (1,2). Hücre ölüm mekanizmaları farklı mekanizmalarla gerçekleşebilir. Bunlar oksijen eksikliği ve toksik maddelerin etkisi ile gerçekleşen hasar ya da ölüm (nekrotik); programlanmış hücre ölümü (apoptotik); ya da proteinlerin, organellerin ve sitoplazmik parçacıkların yok olmasıyla gerçekleşen otofaji yolu ile ölüm olmak üzere üç tipte gerçekleşmektedir. Nekroz, herhangi bir patolojik durumda ortaya çıkan ölüm şeklidir. Nekroz ile ölüme giden hücrelerde hücrelerin boyutunda artış izlenir, hücre organelleri su alarak şişer ve hemen ardından hücre zarında parçalanmalar meydana gelir. Apoptoz ise hücrenin küçülmesi ile karakterizedir. Sitoplazma içeriğinde artış meydana gelerek, hücre büzülerek kıvrıntılı bir hal alır. Nekroz durumunda inflamasyon oluşurken, apoptozda ise hücre inflamasyona uğramadan ortadan temizlenir. Programlı hücre ölümü olan apoptozda nekrozdaki farklı olarak ayrıca,

aktif, metabolik ve genetik açıdan kodlanmış hücrenin evrimsel olarak tercih ettiği ölüm yoludur (3).

Programlanmış hücre ölümü yani apoptoz kelime anlamı olarak, yunanca ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten ayrılan petal anlamına gelir. Apo: ayrı, Ptoxis: düşme anlamına gelmektedir. Apoptozun kelime anlamı ilk kez, 1972'de Avusturyalı bir patolog J.F.K Kerr tarafından tanımlanmıştır (4,5). Programlı hücre ölümü ile ilgili yapılan çalışmalarda genellikle *Caenorhabditis elegans* nematodu kullanılmıştır. Bu nematodlarda 3 gen; ced-3, ced-4 ve ced-9 apoptozu kontrol eden genlerdir. Mutasyon sonucunda inaktif olmuş ced-3 ve ced-4 genlerini taşıyan nematodlarda apoptoz gerçekleşmediği hatta normal şartlarda ölmesi gereken hücrelerin ölmeyip yaşamaya devam ettiği görülmüştür. Bu sebepten dolayı ced-3 ve ced-4 ölüm genleri olarak apoptozu indüklediği fakat ced-9'un ölüme karşı koyan gen olup apoptozu inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu genlerin günümüzde insan genomu için karşılıklı uyarlanması ise şu şekilde ifade edilmiştir; ced-3 için kaspaz ailesi, ced-4 için Apaf-1, ve ced-9 için ise Bcl-2 olarak tanımlanmıştır (6,7,5).

Günümüzde apoptozun, patolojik ve fizyolojik açıdan önemli olduğu ve çok hücreli canlılarda istenmeyen bazı

hücrelerin ortadan kaldırılmasıyla ifade edilen, belirli bir kontrol ve program içerisinde gerçekleşen fizyolojik bir ölüm süreci olduğu bildirilmiştir (8). Hücre ölümünün apoptotik yolu; organizmanın gelişimi, çoğalması, farklılaşması, homeostazi, hücre popülasyonunun düzenlenmesi ve bağışıklık sisteminde hatalı hücrelerin yok edilmesi gibi birçok hayati süreçte aktif rollere sahiptir (3,9). Apoptotik hücre sayısı, bir organizmanın sağlıklı olup olmadığına belirlenmesinde önemli bir faktördür. Apoptoz oranının azalması hücre sayısını artırırken, apoptoz oranının artması hücre sayısını azaltarak doku tahribatına neden olur. Programlı hücre ölümü dediğimiz apoptoz, çok hücreli organizmaların rutin gelişimi sırasında ortaya çıkar ve erişkin yaşamı boyunca devam eder böylece homeostazının devamlılığını sağlar (10). Apoptozun bilinen en önemli ve ilginç özelliği ise çevre dokularda herhangi bir yıkım söz konusu değildir. Bu özelliği, apoptotik hücre ölümünü nekroz hücre ölümünden ayıran önemli bir farktır.

Apoptoz DNA hasarı, sitotoksik ilaçlar, hücre döngüsü sinyalizasyonu ve yaşam sinyallerinin eksikliği gibi hücreyi içeriden ve dışarıdan etkileyen sinyallerle tetiklenebilir (11,12). Programlı hücre ölüm süreci olarak bilinen apoptozda proteinlerin proteolitik kesimi söz

konusudur. Proteinlerin proteolitik kesimi, hücre organellerinin değişimlerini organize eder ve apoptotik sinyalin hücreyel yayılımını gerçekleştirir, böylece bir proteolitik kaskad oluşturur (5,13). Bir hücreye apoptoz uyarısı geldiğinde, ortamdan uzaklaşır, ortamda bulunan komşu hücrelerle bağlantısını koparır ve büzülür. Büzülüşen hücrelerin kromatini yoğunlaşır ve piknotik bir görünüm alır. Hücre DNA'sı nukleozamlarından kesilir, fakat hücre organellerinin yapısal özellik ve bütünlükleri korunur. Hücre zarında bulunan fosfatidil serin hücre zarı iç kısmından hücrenin dış yüzeyine taşınır. Hücre çekirdeği küçülür ve parçalara ayrılır. Parçalara ayrılan hücre kısımları, tomurcuklar halinde koparak apoptotik cisimcikleri oluşturur. Makrofajlar, apoptotik cisimcikleri tanıyarak herhangi bir enflamasyon oluşturmadan fagosite ederek yok ederler (2,14-15).

Apoptoz'da Rol Alan Düzenleyici Moleküller

Hücreler için düzenlenmiş apoptotik sinyalleşme ağ bileşenleri genetik olarak kodlanmıştır (16). Programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde çeşitli ana moleküller yer almaktadır. Apoptozun düzenlenmesinde özellikle kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküller, p53, kaspazlar, sitokrom-c gibi proteinler ve çok sayıda mitokondri görev almaktadır.

Kalsiyum hücre ölümü boyunca kullanılır ve bu sürecin en önemli elementidir. Kalsiyum iyonları; proteaz, endonükleaz ve transglutaminaz aktivasyonlarında rol alır. Hücre iskeleti organizasyonu, hücre proliferasyonu ve gen regülasyonu gibi hayati fonksiyonlarda kalsiyum iyonları vardır (2,17)

1-Bcl-2 Ailesi

Hücrelerin apoptoza eğimli olup olmaması Bcl-2 ailesine bağlıdır. Bcl-2 ailesi genlerinin heterodimer ya da homodimer dizilimine bağlı olarak hücrelerin apoptoza gitmesine izin verir (2). Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) gen ailesi, apoptozu pozitif ya da negatif olarak düzenleyen 20'den fazla çeşitli özellikte birçok üye içerir (18,19).

Bcl-2 ailesi gen grubunun birbirine zıt iki farklı grubu yer alır;

- Proapoptotik üyeler
- Antiapoptotik üyeler

Proapoptotik proteinlerin fazla olduğu hücrelerde, hücre apoptoza gider. Antiapoptotik proteinlerin fazla olduğu durumda hücre apoptoza daha az eğilimlidir (20). Ailenin proapoptotik üyeleri BIK, BIM, PUMA NOXA, BAD, BAX ve BAK proteinleridir. Antiapoptotik üyeleri ise BCL-2, BCL-XL, BCL-W ve MCL-1' dir (21). Proapoptotik proteinler

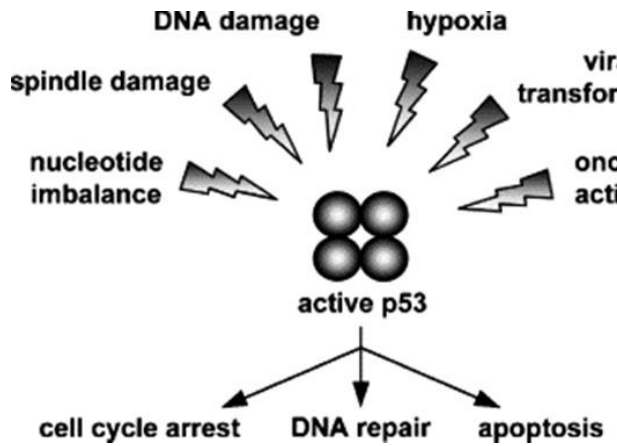
sitozolde bulunur. Bu proteinler, Sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör)'ün salınımı düzenli olarak artırarak apoptozu indükleyici mekanizmaya sahiptir. Antiapoptotik üyeler, mitokondrinin dış zarında endoplazmik retikulumda ve çekirdek zarında bulunur. Por oluşturarak iyon transportunu gerçekleştirirler ve iyon taşınımını düzenleyici mekanizmayı yaparlar. Hücrelerde bulunan Ca^{++} miktarını kontrol ederler ve kaspazlar için öncül form olan AIF ve sitokrom-c salınımını durdurur böylece apoptozu inhibe ederler (20,22,23).

Bcl-2 ailesi proteinleri genelde küçük kDa ağırlığına sahiptir, α heliksleri olan bir ya da daha çok sayıda homoloji domainin (BH domains) içeriğine göre ifade edilir. Bahsedilen bu domainler Bax ve Bcl-2 ile Bid, Bim ve Bad' da bir (BH3) arasında değişir (18). Bcl-2 gen ailesinin moleküler yapısı farklılık göstermektedir. Bu farklılık moleküler yapısı içerisinde yer alan bir zar ötesi domaini kapsar. Bax gibi multi domain içeren proapoptotik üyeler sitoplazmada monomerler şeklinde bulunur. BH3 içeren domainin proteinleri apoptozu indüklemek için multi domainli Bax ya da Bak' a ihtiyaç duyar (24). Sadece BH3 içeren proteinlerin ise multi domainli üyelerle etkileşimleri ve yapısal değişiklikleri homooligola- kazanılmış multimer oluşumunu bununla beraber

mitokondri dış zar geçirgenliğini tetikler (25). BH3 proteinleri, antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerini nötralize ederek apoptozu da teşvik eder ve bu durum birçok BH3, Bcl-2 kompleksiyle ilgili göreceli fikirleri kapsamaktadır (21).

2-p53

Hücrede, DNA hasarı gibi bir durum oluştuğunda bu hasarı gidermek için çeşitli mekanizmalara ihtiyaç duyulmaktadır. DNA hasarı söz konusu ise P53 tümör baskılayıcı gen ürünü olan p53 aktive edilmekte ve bu da hücre siklus inhibisyonu, apoptozis, DNA tamiri ve yaşlanmayı içeren antiproliferatif bir etkiye neden olmaktadır (Şekil-1) (26-28). Eğer hasar tamir edilemeyecek durumda ise Bax, Apaf-1 ve Fas yapımını artırır, böylece Bcl-2 ve Bcl-xL 'nin baskılanması ile apoptozu indükler (29). P53 bir transkripsiyon faktörüdür ve DNA hasarı, hipoksi, viral transformasyon, onkogen aktivasyonu, iğ hasarı, nükleotid düzensizliği gibi hücrelerde meydana gelen birçok bozukluk sonrası aktive edilerek hasarlı hücrenin proliferatif yayılımını engelleyecek gen ekspresyonunu başlatmaktadır. Bu durum kanser oluşumunun da önüne geçmektedir (30).



Şekil 1. Çeşitli stres koşullarında p53 aktive edilir ve sonuçta p53 aracılı apoptoz gerçekleştirilir (28).

3-Fas (Cd95 -Apo-1)

Fas ya da CD95 24 üyeli TNF reseptör ailesinin tanımlanmış en iyi üyesidir. Bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden mekanizmadan sorumludur. Fas hücre reseptörleri, sitotoksik T hücreleri ve naturel killer hücreleri üzerinde bulunan 43 kDa molekül ağırlığına sahip olan reseptörlerdir. Hücre yüzeyinde kendi reseptörlerine bağlanırlar ve reseptör trimerizasyonunu sağlar. Aktivasyonu tamamlanmış reseptörler ise FADD adaptör reseptörü ile birleşir (2). FAS ya da TRAILR1/2 reseptörlerine; FADD adaptör reseptör proteini, pro-C8/10, cFLIP (cellular FLICE-like Inhibitory Protein) proteinlerinin bağlanmasıyla proapoptotik DISC yapısı oluşturur (31,32). Pro-C8 otokatalitik aktivasyon geçirerek aktif C8 oluşumu

tamamlanır ve kaskat oluşur (33). Her FAS reseptörünün karboksil ve amino ucu bulunur ve Fas reseptörünün karboksil (C) ucuna yakın 80 aminoasit içeren bölgenin indüklenmesiyle prokaspazları aktive eder. Sonuçta oluşan kaskat apoptoz yönünde ilerler (23,34).

4-Kaspaz Ailesi

Apoptoz mekanizmasında hayati bir role sahip olan kaspazlar, sistein- aspartik - proteazlarıdır. Aspartik asitten sonraki peptit bağını kırma özeliğine sahiptir ve hücre içerisinde inaktif durumda bulunurlar. Kaspaz proteaz ailesinin üyeleri, apoptozun başlatılmasında ve gerçekleşmesinde rol alırlar (5,35). İnaktif halde bulunan kaspaz ailesi, proteolitik olarak birbirini aktifleştirme özelliğindedir. 100 farklı tipte hedef proteini kesebilirler ve böylece apoptozu başlatabilirler. 3 farklı grupta kaspaz mekanizması vardır.

- i. Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2, 8, 9, 10)
- ii. Efektör (cellat) kaspazlar (Kaspaz 3, 6, 7)
- iii. İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14).

Bir sinyale cevap veren kaspazlar başlatıcı kaspazlardır. Apoptotik süreçte ölüm sinyalini veren başlatıcı kaspazlardır, adaptör bir proteine bağlanarak hangi hücrenin öleceğine dair yön verirler. Fakat

hücresinin tamamen ölümünden sorumlu değildir. Başlatıcı kaspaz ailesi hücrenin ölümünü gerçekleştirecek moleküllerin aktivasyonunu sağlar. Hücrenin tamamen ölümünden sorumlu olan kaspazlar efektör kaspazlardır ve bunlar başlatıcı kaspazların hücre içerisinde görev almasından sorumludur (5). Başlatıcı kaspazlar, kendilerini aktive edebilir. Bu aktivasyon için gerekli olan N-terminal pro-olanlarının olmasıdır. Efektör kaspazlar, aktif başlatıcı kaspazlar olan 8,9 ve 10 tarafından aktive edilir. Bunlardan kaspaz-2 hem efektör hem de başlatıcı kaspazdır. Efektör kaspazların aktivasyon yolu perforin/granzim yolu ile doğrudan da başlatılabilir (1,36). Efektör kaspaz üyeleri kaspaz-3 ve kaspaz-7' dir. Kaspaz-6 da efektör kaspaz ailesi grubundadır, fakat apoptozda daha az role sahiptir. Kaspaz-6 daha çok nörodejeneratif hastalıklarda etkili bir role sahiptir (37,38). Başlatıcı kaspazlar, Kaspaz-2, 8, 9 ve 10' u içerir. Her başlatıcı kaspaz katalitik bölgeye sahiptir. Katalitik bölgenin dimerizasyonunu kolaylaştırmak için kullanılan bir proteini ve bu proteini kodlayan prodomain bölgeleri içerir. Bu prodomain bölgeleri arasında kaspaz-9 ve kaspaz-2' de bulunan kaspaz kabul (alım) bölgesi [caspase recruitment domain (CARD)] ve kaspaz-8 ile kaspaz-10'un prodomainlerinde yer alan ölüm efektör bölgesi [death effector domain (DED)]

bulunmaktadır (35). Bu etkileşim bölgeleri her kaspaz molekülü için aktivasyon alanıdır. Özellikle başlatıcı kaspazların büyük ve çoklu protein komplekslerine alınmasına aracı olur. Aktivasyon alanları her kaspaz için farklı ve spesifiktir. Örneğin kaspaz-8 ve kaspaz-10 için apoptoza götüren sinyal kompleksini (DISC), kaspaz-9 için ise apoptotik peptidaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) apoptozomu bununla birlikte p53'ü içerir. Kaspaz-2 için ise indüklenen ölüm bölgesi kendi proteini (PID Dosome) (39,40). En iyi tanımlanmış kaspaz substratı DNA'nın onarımında yer alan ve çekirdek proteini olan poly-(ADP-riboz) polimeraz (PARP)'dır. Kaspaz parçalanması için hedefteki başlangıç proteinlerinden biri PARP'tır (5). Böylece her kompleksin genellikle kendine ait bir reseptör proteini vardır. Örneğin, CD95/ Fas DISC, CD95/Fas oligomerleri, bağlanma proteini Fas ile ilişkili proteinin ölüm alanı FADD adaptör proteini ile birleştiğinde oluşur (1). Kaspaz inhibitörlerinin ise (IAP) efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir (41). Ayrıca IAP (inhibitors of apoptosis) ailesinin de kaspazlardan farklı olarak, transkripsiyon faktörlerinin modellenmesinde ve hücre siklusunun kontrolünde de apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir (42).

hücre ölümü ya da çeşitli büyüme faktörleri gibi bazı uyarıların yokluğunda aktive olan yoldur (25,47). Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) ailesi üyeleri mitokondriyal yolağın merkezi düzenleyicileridir. Bu proteinlerin etkileşimleri ile hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceği belirlenir. Bcl-2 protein ailesi, hem proapoptotik hem de antiapoptotik fonksiyonları olan gen ailesidir. (48,49). Bcl-2, apoptozu indükleyen Bcl-2 ilişkili X apoptoz regülatörü [Bcl-2 associated X apoptosis regülatör (BAX)], Bcl-2 ilişkili hücre ölüm protein antagonisti [Bcl-2 associated agonist of cell death (BAD)], Bcl-2 antagonist katili-1 [Bcl-2 antagonist killer-1 (BAK)], BH3 etkileşim alan ölüm agonisti [BH3-interacting domain death agonist (BID)], Bcl-Xs ve programlı hücre ölümünü inhibe eden Bcl-2, E1B-19K, CED-9 ve Bcl-X₁' den oluşan oldukça geniş bir protein gen ailesidir. Bu aileye ait üyeler kendi aralarında homo- ve heterodimerler oluşturmak üzere özelleşmişlerdir. Hücrelerin ölüme gidip gitmeyeceği bütün bu protein ailesinin arasındaki dengeye bağlıdır. Translokasyonlar ve gen amplifikasyonları gibi çekirdekte oluşan genomik değişikliklerin olması Bcl-2 protein ailesi üyelerinin bulunma düzeylerini artırabilir (50). Bcl-2 proteini homoloji bölgeleri (BH1, BH2, BH3 ve BH4) ile alfa sarmalını taşır (51). BH3 etkileşimlerinin

çeşitli görevleri vardır, apoptotik görevi kontrol eden homo- ve heterodimerlerin oluşmasına izin verir ve BH3- hidrofobik mekanizması yoluyla Bcl-2 etkileşimlerini düzenler. BH3, apoptozdan sorumlu olan BH alanıdır (52). Hücre içi sinyallerin alınmasıyla apoptotik uyarı başlatılır, proapoptotik protein Bid, Bcl-2' yi inaktive eder. Böylece BAX ve BAK proteinleri aktive olur. Mitokondri membranında, BAX ve BAK proteinleri por oluşumunu gerçekleştirir, por oluşumu için uygun ortam hazırlandığında ise zar potansiyeli değişikliğe uğrar (5,23). Smac (second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endonükleaz-G, AIF (Apoptoz indükleyici faktör) mitokondri membran porlarından salınmak üzere uyarılır. Apoptozun gerçekleşmesi için oksidatif fosforilasyonun gerçekleşmesi gerekir. Sitokrom-c, elektron taşınımı yaparak oksidatif fosforilasyon sürecini başlatır. SMAC, inhibitör apoptotik faktör (IAF)'ü engeller ve apoptozu hızlandırır. İnhibitör apoptotik faktörlerin olması ise kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunun durmasına neden olur. Apoptoz indükleyici faktör (AIF)'ün çekirdeğe translokasyonu tamamlanır ve Endonükleaz-g (ENDO-G) DNA' yı parçalar. Sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör-1) ve ATP'nin mitokondri porlarından salınması ile sitozolde Apoptozom denilen yeni bir kompleks oluşur (5). Apoptozom, Kaspaz-

9' u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 ise prokaspaz-3 ü aktif kaspaz-3' e dönüştürür. Aktifleşen kaspaz-3 inaktif kaspaz aktive edici DNaz (CAD)'ı inaktif hale getirerek serbestleştir. Çekirdekte kromatin yoğunlaşması ve DNA'nın nükleozomları oluşturarak fragmente olmasını sağlayan ise CAD kompleksidir (5,20).

Ekstrinsik (Dış) Yol

Apoptotik ekstrinsik yol (Ölüm reseptörü yolu), iç yoldan farklı olarak aktive olmuş T hücreleri, doğal öldürücü (natural killer) (NK) hücreler ve makrofajların hedef hücrelerinin zarında bulunan ölüm reseptörlerine tutunması ile başlar. Tümör nekroz faktör (TNF) ve FAS reseptörü hücre zarı integral proteinleridir. Ölüm aktivatörleri olan FasL ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ile bağlanarak, prokaspaz-8' kaspaz-8' e farklılaşır. Sonuçta kaspaz kaskadı oluşarak aktivasyon başlatılır (40). CD95 (Fas/APO-1), TNFR1, DR3 (APO-3), DR4 (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor-1), DR5 (TRAIL R2) ve DR6 ölüm reseptörleridir. Hücrenin ölüm sinyali, hedefteki hücrenin hücre zarı üzerinde bulunan TNF ailesi ölüm reseptörlerine bağlanarak aktive olur (1). FAS, TNF ve DR5 gibi hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerinin ölüm sinyalleri olan FasL, TNF-alfa ve TRAIL ile bağlanması sonucu ölüm reseptörleri

trimerik bir yapı kazanır. Trimerik yapıda olan reseptörler ile adaptör moleküller prokaspaz türevleri ile birleşerek Death inducing signaling complex (DISC) denilen bir yapı oluşturur. Kaspaz-8 ve kaspaz-10 DISC kompleksi tarafından aktive edilir. Aktive olmuş kaspaz-8 ve kaspaz-10, yürütücü kaspazlardan kaspaz-3, kaspaz-6 ve 7'yi aktif hale getirir. Aktifleşen, kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 ise apoptoza neden olan proteinlerin ve hücre iskeletinin imhasını başlatır (1). Bu mekanizma doğrudan ve direkt yolla gerçekleşir. Direkt olarak kaspaz-8 kaspaz-3 'ü aktive eder dolaylı olarak ise BİD'i keserek intrinsik yolda önce kaspaz-9 'u hemen ardından da kaspaz-3' ü aktive eder. Dolaylı ve direkt olan bu yolda gerçekleşen mekanizmada aktif kaspaz-3, CAD aktivasyonu gösterir ve DNA fragmentasyonuna neden olur (5).

Apoptozun Gösterilmesinde Kullanılan Temel Yöntemler

I. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

1. Işık Mikroskopik Teknikler
 - Hematoksilen Boyama
 - Giemsa Boyama
2. Floresan Mikroskopu
 - Propidium İyodür (PI) Geçirgenliği
 - Hoechst Dye
3. Elektron Mikroskopik Yöntem

4. Fast Kontrast Mikroskobu ile Görüntüleme

II. İmmunohistokimyasal Yöntemler

1. TUNEL Yöntemi
2. Anneksin V Yöntemi
3. Kaspaz-3 Yöntemi
4. M30 Yöntemi

III. Biyokimyasal Yöntemler

1. Agaroz Jel Elektroforezi
 - DNA fragmentasyonu
2. Western Blotting”
 - Aktif kaspaz’ın belirlenmesi
 - Sitokrom c salınması
 - Substrat kırılması
3. ‘Flow’ Sitometri

IV. İmmunolojik Yöntemler

1. ELISA
 - DNA fragmentasyonu
 - Kaspaz Aktivasyonu

V. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

- DNA Microarrays (2).

Sonuç

Vücudumuzda ihtiyaç duyulduğunda herhangi bir inflamasyon oluşmadan programlı hücre ölümleri gerçekleşir. Apoptoz, belirli morfolojik ve fizyolojik özelliklere sahip, çeşitli mekanizmalarla çalışan enerjiye bağlı programlanmış bir hücre ölüm sürecidir. Apoptozu düzenleyen çok sayıda moleküler

mekanizmalar ve proteinler yer alır. Özellikle kaspaz aktivasyonu hücre ölüm tipleri arasında kritik bir role sahiptir. İntrinsik ve ekstrinsik programlanmış hücre ölümünü basamakları apoptotik mekanizmanın en önemli iki basamağıdır. Bu iki yolağın ortak özelliği infazcı kaspazların aktivasyonu sonucunda hücrelerde apoptoza özgü değişimler meydana gelir. Apoptoz mekanizması hücre proliferasyonu ve programlı hücre ölümü arasında hassas bir alanı ifade eder. Burada bir hasar meydana geldiğinde otoimmün rahatsızlıklar, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların gelişmesine zemin hazırlar. Son yıllarda programlı hücre ölümünü düzenleyen çok sayıda proapoptotik ve antiapoptotik protein tanımlanmıştır. Bu protein ailesi organizmanın ölçüm ve yaşamı arasında bir homeostazdır. Günümüzde, apoptotik yolların mekanizmaları hakkında tam olarak bir sonuca varılmasa da bu alandaki çalışmalar devam etmektedir. Hücrede ölümü tetikleyen mekanizmaların bilinmezliği anlaşıldığında sadece apoptozun morfolojik ve fizyolojik rollerinin anlaşılmasıyla kalmayıp, aynı zamanda otoimmün hastalıklar, kanser ve nörodejeneratif hastalıklarında apoptozun patolojik sonuçlarının belirlenmesine katkı sağlayacaktır. Yapılan çalışmalar sonuçlandığında, programlı hücre ölümü

ile ilgili yeni kapılar açılacak ve çok sayıda apoptotik proteinin görevi anlaşılacaktır.

Kaynaklar

1. Celepli S, Bigat İ, Celepli P, Karagin PH. Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. Ankara: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu; 2020.
2. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2001;20(3):145-14.
3. Aykaç A, Cabadak H. Post-traumatic stress disorder: The importance of apoptosis. Clinical and Experimental Health Sciences. 2016;6(4): 173-5.
4. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972;26:239-19.
5. Dağdeviren T. Peri-implantasyon döneminde sıçan endometriumuunda Wnt-B katenin yolağının Tcf, lef ve caspase-9 ekspresyonundaki rolü (Yüksek Lisans Tezi). Sivas: Sivas Cumhuriyet Üniversitesi; 2019.
6. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000; 407: 770-6.
7. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important BMJ. 2001;322(7301):1536-3.
8. Çalışkan, M. Apoptosis: Pogramlanmış Hücre Ölümleri. Turk J Zool. 200;24:31-6.
9. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. Nature. 2000;407(12):796-6.
10. Hutchins JB, Barger SW. Why neurons die: cell death in the nervous system. Anat Rec. 1998; 253: 79-12.
11. Billig H, Furuta I, Hsueh AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. Endocrinol 1993;133:2204-12.
12. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. Nature. 2000; 407: 770-6.
13. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science. 1998;281(5381): 1312-5.
14. Ellis R, Yuan J, Horvitz H. Mechanisms and functions of cell death. Annu. Rev. Cell Biol. 1991;7: 663-36
15. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and

regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 1995;6 (1): 3-16.

16. Denault J, Salvesen G. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev.* 2002; 102: 4489-12.

17. Gillies, LA, Kuwana T. (2014). Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *Journal Of Cellular Biochemistry.* 2014;115(4):632-9.

18. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:647–10.

19. Liou AKF, Clark RS, Henshall DC, Yin XM, Chen J. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog Neurobiol.* 2003; 69:103– 42.

20. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochemical Sciences,* 2001;26(1): 61-6.

21. Rzayev E. Deneysel Pentilentetrazol-Epilepside 4-Fenil Butirik Asitin Endoplazmik Retikulum Stres ve Apoptoz Üzerine Etkisi (Doktora Tezi). Samsun; Ondokuz Mayıs Üniversitesi; 2020.

22. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci.* 2001;26:390-7.

23. Spierings DC, De Vries EG, Vellenga E, et al. Tissue distribution of the death ligand trail and its receptors. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(6): 821-11.

24. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsako-Poulou V, Ross AJ. Proapoptotic bax and bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science.* 2001; 292(5517):727–4.

25. Danial N, Korsmeyer S. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004;116:205-15.

26. Adimoolam S, Ford JM. P53 regulation of dna damage recognition during nucleotide excision repair. *Dna Repair.* 2003;2:947-8.

27. Brooks LC, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: The molecular basis for regulation. *Current Opinion In Cell Biology.* 2003;15:164-8.

28 .Latonen L, Laiho M. Cellular uv damage responses-functions of tumor supressor P53. *Bba.* 2005;1755:71-19.

29. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cells response to P53. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:594- 11.
30. Oskay S. P53^{-/-} Ve P53^{+/+} Hct116 Kolon Kanser Hücre Serilerinde Radyasyonun Hücre Proliferasyonu ve Telomeraz Aktivitesi Üzerine Etkisi (Yüksek Lisans Tezi). Ankara: Ankara Üniversitesi; 2008.
31. Yang JK. Death effector domain for the assembly of death-inducing signaling complex. *Apoptosis*. 2015;20(2):235–9.
32. Gökhan A, Kılıç KD, Gülle K, Uyanıkgil Y, Çavuşoğlu T. Apoptotik yollar ve hedefe yönelik tedaviler. *Medical Journal of Suleyman Demirel University*, 2020;27(4):565-9.
33. Peter ME, Krammer PH. The Ccd95(Apo-1/Fas) disc and beyond. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):26–10.
34. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanism in fas mediated apoptosis. *Cell Signal*. 2003;15:983-10.
35. Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2020;1867(6):118688.
36. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:388- 3.
37. Graham RK, Ehrnhoefer DE, Hayden MR. Caspase-6 and neurodegeneration. *Trends Neurosci* 2011;34:646-11.
38. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis. *Febs J*. 2018;285:416-31.
39. Tinel A, Tschopp J. The piddosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*. 2004;304:843-6.
40. Choo Z, Loh A, Chen Z. Destined to die: apoptosis and pediatric cancers. *Cancers (Basel)*. 2019;11:1623.
41. Tomatır AG. Apoptoz: programlı hücre ölümü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 2003;23(6):499-10.
42. Israels ED, Israels LG. The cell cycle. *The Oncologist*,2000;5(6):510-4.
43. D'arcy M. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*. 2019;43:582-11.

44. Pfeffer CM, Singh AT. Apoptosis: a target for anticancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2018;19:448.
45. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495-22.
46. Grilo AL, Mantalaris A. Apoptosis: a Mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology Advances.* 2019;37:459-17.
47. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of bcl-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20:175-19.
48. Gurzov EN, Eizirik DL. Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of B-cell death and dysfunction. *Trends Cell Biol.* 2011;21(7):424-8.
49. Du Toit A. Cell death: balance through a bivalent regulator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14:546.
50. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. Mir-15 and Mir-16 induce apoptosis by targeting Bcl2. *Proc Natl Acad Sci Usa.* 2005;102:13944-9.
51. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, et al. Mechanisms of action of bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5:A008714.
52. Flores-Romero H, Garcia-Saez A. The incomplete puzzle of the Bcl2 proteins. *Cells.* 2019; 8:1176.

