

Apoptotik hücrede yapısal değişiklikler ve tayin metodlarının karşılaştırılması

Hakan PARLAKPINAR, Mustafa KOÇ, Ahmet ACET

Inönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Bölümü, MALATYA

Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoziste gözlemlenen değişiklikleri erken apoptozis ve geç apoptozis diye sınıflamak mümkündür. Kabaca özetlemek gerekirse, erken dönemlerde membran fonksiyonlarında sadece polarite kaybı varken geç apoptoziste ise; hasarlanmış membran fonksiyonunu takiben bleb (sitoplazmik çıkıntı) formasyonları oluşur. Yine erken apoptoziste, DNA merdiveninde elektroforezde bulgu vermeden kromatin kondensasyonu olurken, ileri evrelerde ise DNA fragmentasyonu olur ve bu bulgular elektroforetik ve histokimyasal olarak tespit edilebilmektedir (1). Erken dönemin karakteristik bulgularından bir diğeri ise mitokondriyal membran potansiyelindeki azalma (2), ve fosfatidilserin (PS)' in yer değiştirmesidir (3).

Plazma Membranındaki Değişiklikler:

Apoptoziste membran bütünlüğü nekrozdan farklı olarak son aşamaya kadar korunmaktadır (4). Apoptozis süresince plazma membranındaki değişiklikler morfolojik değişimlerden çok biyokimyasal karakterdedir. Yalnız bir ayrıcalık var ki, hücre ölümünün ortak özelliği olan ve elektron mikroskopunda gözlemlenen mikrovilli kaybının olmasıdır (5). Mikrovilli kaybı, kaspaz ("caspase"= cysteine -containing aspartate specific proteases) adı verilen bir grup proteazların aktivasyonu ile oluşur (6). Plazma membranındaki moleküler değişiklikler muhtemelen fagositozun başlaması için önem taşır (7). Çoğu zaman ölü hücrelerin fagositozu düzenli apoptotik yolun aktivasyonunu gerektirir. Ancak bunun bir istisnası, antiapoptotik bir protein olan B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2)' nin artışı ile ölü hücrelere karşı nötrofiller yerine onların tutulması ve sindirilmesinde makrofajların rol oynamasıdır (8). Apoptozisin erken döneminde gözlemlenen değişikliklerden bir tanesi de PS' nin yer değiştirmesidir (9). İlk olarak bu yer değiştirme, eritrosit ve plateletlerde daha sonra da çekirdekli hücrelerde

gösterilmiştir. Normal hücrelerde fosfolipidlerin dağılımı asimetrikdir. İç membran anyonik fosfolipidleri dış membran ise çoğunlukla nötral fosfolipidleri içerir. Ancak apoptotik hücrelerde PS miktarı dış membran yüzeyinde artmıştır. PS' nin yer değiştirmesinden sorumlu olan Aminofosfolipid translocase isimli spesifik enzim normalde ATP bağımlı olarak fosfolipidlerin asimetrik topoğrafisini sağlarken, azalan ATP' ye bağılı olarak aktivitesi azalır ve artan kalsiyum (Ca²⁺) da inhibisyona yol açarak sonuçta PS' nin yer değiştirmesine sebep olur (3, 10). Yine Aminofosfolipid translocase' ın inhibisyonu (mesela, plateletlerde sitozolik Ca²⁺ artışı) ve Scramblase aktivasyonu neticesinde de PS yer değiştirmesi olduğu gösterilmiştir (11). Hücre membran fosfolipidlerindeki bu asimetri kaybı, hem hidrofobiteyi hem de membran yüzey yükünü değiştirir. Annexin V, Ca²⁺ bağlayan bir protein olup PS için oldukça spesifiktir ve normal hücrelere bağlanmaz. PS' nin bu yer değiştirmesi yaşlanmış eritrositlerde olduğu gibi retiküloendotelial sistem tarafından tanınarak dolaşımdan kaldırılır (12). Yine dokularda da benzer şekilde reseptör aracılığıyla fagositlerin tanınmasına ve fagosite edilmelerine sebep olur (13). Bu nedenle PS, istenmeyen ve gereksiz olan hücrelerin fizyolojik olarak ortadan kaldırılması için çok önemli bir sinyal kaynağı olmaktadır.

Apoptoziste Çekirdekte Oluşan Değişiklikler:

Hücre çekirdeğinde dikkate değer morfolojik değişiklikler; kromatinde yoğunlaşma ve ilerleyen dönemde çekirdeğin parçalara ayrılmasıdır. Daha sonra bu parçacıklar apoptotik cisimcik olarak paketlenir, fagositler ve komşu hücreler tarafından alınırlar (14). Çekirdekdeki bu değişiklikler DNA interkalasyon boyaları olan Akridin Orange ve Hoechst boyası ile boyanarak ışık ve elektron mikroskopunda gözlemlenebilir. Çekirdek kromatininde tespit edilebilen en erken değişiklik, membran boyunca

ca kromatin yoğunluğunun daha da artmış bir şekilde birikmesidir. Bu elektron mikroskopta elektron dens madde olarak gözlenebilir ve floresan boya kullanıldığında parlak bir halka şeklinde ayırt edilir. Çok sayıdaki apoptozisle ilgili spesifik çalışmalarda çekirdek proteinlerinde kaspaz aracılı proteolizis ve DNA kromozomlarında degradasyon tanımlanmıştır (15). Laminler, çekirdek içinde zarfın iç kısmına tutunmuş fonksiyonları tam olarak bilinmeyen proteinlerdir (16). Acaba laminlerdeki ayrılma çekirdeğin yıkımına katkıda bulunur mu? sorusuna cevap olarak yapılan gözlemler şüphelidir. Lamin A veya lamin B nin bölünmemiş mutantları ile yapılan çalışmalar neticesinde bunların fazlaca oluşumunun çekirdek morfolojisindeki değişiklikleri önlediği veya en azından geciktirdiği tespit edilmiştir (17). Kromozomal sindirim önce 30-50 ve 200-300 kbp lik DNA kırıkları ile neticelenir. Sonra internükleozomal parçalanma, nükleozom etrafında farklı boyutlarda çok sayıda DNA kırıkları ile sonuçlanır (11). Bir çalışmada kromozomal DNA'nın mikrokokal nükleaz ile basit sindiriminin kromatin yoğunluğunu artırdığı görülmüştür (18). Yoğunlaşmayı takiben çekirdek parçalanır ve çok sayıda apoptotik cisimcikler şeklinde paketlenmiş parçalara ayrışır. Bu olaydan sorumlu olan moleküler olaylar bilinmemektedir. Fakat bu proteinlerin parçalanması kaspaz aracılığı ile olmaktadır. Apoptozisi indükleyici faktör olarak bilinen AIF normalde mitokondri içinde bulunur ve apoptotik uyarı ile salınabilir. AIF, çekirdek dış membranında kromatinde yoğunlaşma gibi bazı morfolojik değişimleri indükleyebilir (19). Apoptozisteki hücreyel olaylar hücre ölümü için zorunlu değildir.

Apoptozise Giden Hücrelerde Yapı ve Şekil Değişiklikleri:

Apoptozisin mikroskop altında gözlenmesinde en dikkat çekici değişiklik; hücrenin dış kenarındaki reorganizasyon ve şekil değişiklikleridir. Hücre yüzeyinde oluşan çıkıntılar ışık ve elektron mikroskop ile görülebilir hale gelir. Bu çıkıntılara bleb adı verilir. Tespit edilen değişikliklerin birbirini etkilemek suretiyle ard arda gelen olaylar mı olduğu yoksa hepsinin ayrı ayrı mı düzenlendiği tam olarak net değildir. Normalde bu değişikliklerde kaspazların rol oynadığı varsayılabilir. Aslında yapılan bazı çalışmalarda kaspazların kimyasal inhibisyonu kısmi bir inhibitör etki göstermiştir (20). Caspase-3'ün eksik olduğu farelerde, hepatosit ve timositlerde bleb oluşumunda belirgin bir azalma görülmüştür (21). Benzer şekilde cas-

pase-3 eksikliği saptanan insan meme kanser hücrelerinde hücre ölümü süresince bleb oluşumunda azalma tespit edilmiştir (22). Kaspazların bu değişiklikleri nasıl yaptıkları tam olarak bilinmemektedir. Çok sayıda yapısal protein, apoptozis süresince kaspazlar ile direkt olarak yıkılır. (Örnek: Gelsolin, Fodrin, Actin, Gas2) (23). Bilindiği gibi hücrede "proteinaz k" artışı hücre içi proteinlerde sindirime yol açar. Ayrıca bu artış bleb ve bül oluşumunu da artırır. Kaspaz inhibitörleri varlığında "proteinaz k" nin bleb oluşumunu artırması ortadan kalkar. Ancak hücreyel proteinler yıkıma uğramaya devam ederler (24). Fokal adhezyon organizasyonuna katılan kaspaz aracılı yıkılmış proteinler, hücrelerin matriks etrafından erkenden ayrılmasına katkıda bulunur (25). Aktin reorganizasyonu bleb oluşumu için gereklidir. Bu organizasyon hücre periferinde halka yapı şeklinde tespit edilir (26). Aktin ağı oluşumunda görev alan gelsolin proteini apoptozis ile de ilişkilidir. Gelsolin' in apoptozisin başlamasında rolünün olması mümkün olmakla beraber fazlaca yapımının farklı apoptotik uyarılara karşı hücreyi daha dirençli hale getirdiği de gösterilmiştir (27). In-vitro olarak gelsolin' in kaspaz kaynaklı parçaları, aktin flamenlerini ayrıştırabilir. Her ne kadar bleb oluşumu için caspase-3 aktivitesinin gerekliliği düşünülse de yolak bir kere aktive olunca kaspaz inhibitörlerinin varlığında da devam eder (28). Bu olaylar kaspaz aktivitesinin bleblerin görünümü ile ilişkili mekanizmalar olduğunu gösterir. Miyozin hareketinin onun fosforilasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (20). Kaspaz yıkım ürünü, miyozin hafif zincir kinazın aktivasyonuna yol açar ve aktin-miyozin etkileşimi apoptotik bleblerdeki çıkıntı ve çekilmelere katkıda bulunur. Kaspaz aktivitesi ile kinaz aktivasyonu arasındaki moleküler bağlantı tam olarak açıklanmış değildir. Hücre iskeletinin reorganizasyonu normalde çok sayıda kinazların aktiviteleri ile ilişkilidir. Bu kinazlardan bazıları apoptozis sürecindeki morfolojik değişikliklerle de ilgilidir. Isı şok protein 27' nin (MAP) kinaz bağlı fosforilasyonunun aktin içindeki bleblerin yeniden yapılanmasında rolü olduğu ileri sürülmüştür (26). p21-activated kinase 2 (PAK-2), aktin iskeletinin yeniden şekillenmesine katkıda bulunabilir ve böylece apoptotik yeniden yapılanmada dahil olabilir (29). Hücre şişmesi ve apoptotik cisimcik oluşumuyla ilgili moleküler olaylar hakkında da bilgilerimiz çok azdır. PAK-2 apoptotik cisimcik oluşumunda rol alabilir (30). Apoptotik cisimcik oluşumunda bleb organizasyonundan bağımsız

olarak kaspazların aktivasyonu da gereklidir (28). Yapılan bir çalışmada vakuolizasyon için kaspaz aktivitesinin gerekli olduğu belirtilirken (31) bazı çalışmalar ise, kaspaz inhibisyonuna rağmen vakuollerin oluştuğunu göstermiştir (32).

Apoptozis'in Tayin Metotları:

Apoptozis'in tayin metotlarında şu ana kadar olan çalışmalar morfoloji üzerine yoğunlaşmıştır. Fakat son 10 yıldır apoptozisin moleküler mekanizmaları hakkında genişleyen bilgilerimize bağlı olarak gelişen teknikler; biyokimya, moleküler biyoloji ve immünolojiye doğru kaymaktadır. Apoptozisin başlangıç ve karar safhasına yönelik çalışmalar artmasına rağmen bu tekniklerin çoğu "infaz safhasında ne oluyor" kaynaklıdır (33).

Morfolojik Değişikliklerin Tayini:

1) Işık Mikroskopisi (IM): IM yardımıyla hücre morfoloji çalışmaları apoptozis tayininde en eski yöntem olup çok uzun yıllar altın standart olarak kullanılmıştır. Hematoksilin-Eosin boyalı histolojik kesitlerde membran blebleri, çekirdekte piknozis ve kırıkları tespit etmek mümkündür. Fakat apoptozis başlangıcını takiben 30-60 dk içerisinde fagositler tarafından apoptotik hücreler hızlıca uzaklaştırıldığı için IM bir dezavantaja da sahiptir. Hatta miyokardiyumdaki apoptotik hücreler ancak rastlantısal olarak saptanabilir. Ancak IM yardımıyla buzdağı görünümündeki değişikliklerin tiplmesi yapılabilmektedir (14).

2) Elektron mikroskopisi (EM): EM, yüksek spesifikiteye sahip olduğu için büyük bir avantaja sahiptir. Morfolojik değişiklikler subselüler düzeyde tespit edilebildiği için IM ile karşılaştırıldığında yüksek sensitivite ve spesifikiteye sahiptir. Fakat hantal ve taşınabilirliği zor olan bir alet olmasıyla beraber, çalışılabilir hücre sayısına limit koyması yüzünden rutin kullanım için çok uygun değildir. Ayrıca apoptozis tayininde sadece niteliksel bilgiler verir (34).

3) Flowsitometri (FC): FC tekniğinin belki de en önemli özelliği çok kısa zaman içerisinde çok geniş sayıdaki hücreleri tek bir hücre bazında inceleme olanağı sunabilmesidir. Ölçümün ihtiyaç duyduğu hücresel işlemler ise çok zor değildir. FC, hem adherent hem de kültüre edilmiş non-adherent hücrelerde kullanılabilir. Genellikle analiz için hücreler süspansiyon içerisinde olmak zorundadır. İşte bu özellik, rutin bir teknik olma kapasitesine sınır koymaktadır. Bu yüzden in-vitro çalışmalar için daha çok önem kazanmıştır. Fakat histolojik içeriklerden yoksun

olduğundan dolayı dokulardaki apoptozis tayini için pek uygun değildir.

Sitoplazmik Değişikliklerin Tayini:

Apoptotik işlemler sitoplazma içerisinde dramatik değişikliklere yol açar. Bazı sitoplazmik parametrelerin apoptozisin tespitinde kullanılabileceği yakın zamanda bulunmuştur. Bunlar aktive olmuş kaspazları, kaspazların proteolitik aktivesinden doğan "de novo" antijenleri, Ca²⁺ iyonlarını ve mitokondriden sitozolik alana doğru yer değiştiren mitokondriyal proteinleri içerir (35).

1) Kaspaz Aktivitesi: Kaspazlar, sistein proteaz ailesinden olup normalde sitoplazma ve organellerde inaktif formda bulunurlar. Spesifik aspartat rezidülerinden sonraki yarıklanmayla aktif hale geçerler. Hali hazırda farklı aktif kaspazlar için değişik kromogenik ve florojenik substratlar elde etmek mümkündür. Bu substratların çoğu hücre geçirgen olmayıp, kaspaz aktivitesinin tespiti için hücre ve doku homojenizasyonuna ihtiyaç duyarlar (36). Ayrıca bu substratlar bireysel olarak kaspazlar için non-spesifiktir. Bu yüzden pek çok vakada kromogenik ve florojenik aktivitenin bir tek spesifik kaspaza atfı çok güçtür. Kaspazların kendi proteolitik aktivasyonundan kaynaklanan neoepitoplara karşı kullanılan antikolar ile ve immünohistokimyasal metotlarla da kaspaz aktivasyonunu tayin etmek mümkündür (37). Yine immünolojik olarak kaspazların yarıklanmış substratlarını tanımlayıcı antikolar kullanarak da kaspaz aktivasyonu tayin edilebilir. Yakın zamanda kaspaz yarıklanmasını tanımlayan cytotkeratin 18, actin, Poly ADP Riboze Polymerase (PARP) için de antikolar tanımlanmıştır.

2) Kalsiyum Akımı: Pek çok vakada apoptotik yolağın aktivasyonu sitozolik Ca²⁺ konsantrasyon artışı ile ilişkilidir. Bu artış belki fura-2 gibi Ca²⁺ indikatörleri ile gösterilebilir (38). Bu tekniğin dezavantajı, artmış sitozolik Ca²⁺'nin apoptozis için spesifik olmayışıdır. Çünkü pek çok farklı sinyal yolları apoptozise yol açmadan bu artışı yapabilir (39). Hatta bazı vakalarda apoptotik işlemlerin, Ca²⁺ değişikliği olmadan da ilerleyebildiği gösterilmiştir (40). Sonuç olarak şöyle diyebiliriz ki, bu indikatörler özellikle in-vitro çalışmalar için daha uygundur.

3) Mitokondriyal Disfonksiyon: Mitokondriyal membran potansiyelindeki düşme, apoptotik hücre ölümünün erken bir özelliği olup geri dönüşün olmadığını göstergesi olarak kabul edilir. Membran potansiyelinin bir göstergesi olarak mitokondriyal potansiyel çeşitli problemlerle ölçülebilir. Apoptozise

bağlı olarak meydana gelen bu mitokondriyal kollaps neticesinde florokromların fonksiyonlarında azalma olacak ve nihayetinde mitokondriyada birikme olacaktır (2). Belki de gelecekte intermembran aralıktan sitozole doğru yer değiştiren değişik mitokondriyal proapoptotik faktörler ölçülebilecektir. Örnek: AIF, (19) sitokrom c, (41) procaspase 2, 3 ve 9 (42). Spesifik antikolar kullanarak immünolojik metotlarla da bu yer değiştiren proteinleri saptamak mümkündür. Bu tarz yaklaşımın dezavantajı ise, kesin olarak ölüm yolağı için düşük sensitivite göstermesidir. Yakın zamanlarda mitokondriden bağımsız olarak direkt aktive olan kaspazlar da gösterilmiştir (43).

DNA Kırılmalarının Tayini:

1) DNA Merdiveni: Çekirdek DNA'sının bozulması apoptozisin anahtar özelliklerinden birisidir. Apoptotik işlemler esnasında aktive olan endonükleazlar DNA'yı 180-200 baz çiftlik pek çok kırıklara ayırır. Meydana gelen kırıklar elektroforezde tipik DNA merdiveni olarak görünür (44). Bu metotun kısıtlayıcı sebeplerinden bir tanesi, DNA merdiven görüntüsü için büyük oranda bozulmuş DNA'ya ihtiyaç duymasındır. Ancak Ligation-mediated PCR (Polymerase Chain Reaction) bu ihtiyacı selektif amplikasyon yapmasıyla azaltmıştır (45). Yine bu tekniğin majör dezavantajlarından bir tanesi de, doku morfolojisinin kaybına bağlı olarak apoptotik hücrelerin lokalizasyonuna ve tanımlanmasına imkan sunamayışıdır. Bazı vakalarda apoptozis sadece yüksek moleküler ağırlıklı DNA kırıkları oluşturur ki, bu da bu tekniğin duyarlılığını düşürür.

2) Flowsitometri Aracılığıyla DNA İçeriği: DNA içeriği hücrenin siklusta hangi fazda bulunduğunu gösterir (G0/G1, S/G2 ve M). Apoptotik hücreler G0/G1 seviyesinin altında DNA içeriği azalmış olarak tespit edilir. Bu azalma FC ile veya propidium iodide gibi problemlerle tespit edilebilir. Yine bu teknikle nekroz ve apoptozis ayrımı yapmak da mümkün olabilmektedir (43).

3) DNA Zincir Kırıkları: Apoptoziste koruyucu bir enzim olan Poly ADP Riboze Polymerase (PARP), spontan tek zincir DNA kırıkları kenarındaki hücre proteinlerinin ribozilasyonunu katalizleyerek DNA tamirini kolaylaştırır. Ancak, apopain veya yama adı verilen Interleukin-1 Beta Converting Enzyme (ICE) ilişkili sistein proteaz homologları tarafından inaktive edilmesi bu fonksiyonundan geri bırakmaktadır. Yine Fas reseptör aracılı olarak PARP' in inaktivasyonu

yapılırken Bcl-2 ise bu inaktivasyonu azaltarak olumlu yönde etki yapar (46). DNA zincir kırıklarında 3' hydroxyl terminali varlığı, endonükleaz yarıklı DNA'nın karakteristik özelliği olup biotin, digoxigenin veya fluorescein-labeled dUTP gibi modifiye nükleotidlerin reaksiyonu ile tespit etmek mümkündür. Bu reaksiyon, terminal TdT (deoxynucleotidyltransferase) veya DNA polimeraz enzimlerine ihtiyaç duyar. Bunlardan en sık kullanılanı DNA polimeraz kullanarak in-situ nick end labeling (ISEL) (47) ve TdT-mediated X-dUTP nick end labeling (TUNEL) teknikleridir (48). Her iki teknik de hücre çekirdeğini ve dokudaki vezikülleri boyar (49). Bu protokollerin yeni modifikasyonları ile non-spesifik boyanan Ca²⁺ dolu vezikülleri devre dışı bırakmak mümkün olabilmektedir (50).

Plazma Membran Değişikliklerinin Tayini:

1) Membran Geçirgenliği: Plazma membranının trypan blue ve propidium iodide gibi boyalara geçirgen olmadığı zaman, değişmiş olan hücre morfolojisi apoptozis için tanımlayıcı bir özelliktir. Bu özellik apoptotik ve nekrotik hücre ayırımında çok büyük bir avantaj sağlamaktadır. Membran geçirgenliğinin değişmesi sonucu ortaya çıkan bu boyalara geçirgen olmama durumu ile (FC ile tespiti mümkündür) morfolojik değişikliklerin bir bütün olarak incelenmesi çok faydalı olmaktadır. Bununla beraber bu boyaların fazlaca toksik olması nedeniyle in-vivo apoptozis tayininde kullanımı çok uygun olmamaktadır (51).

2) Membran Değişiklikleri: Apoptotik hücrelerde kendi dış membranlarına doğru PS'nin yer değiştirmesi ile izole edilen membran lipidlerinin 2 yönlü ince tabakalı kromatografi ile tespiti mümkün olabilmektedir. Hidrofobik bir boya olan merocyanine 540' nin hücre membranı ile muamelesi neticesinde apoptotik hücrelerin karakteristik olan görünümü oluşur (52). Apoptotik işlemlere bağlı olarak plazma membranındaki bu değişiklik yukarıda da bahsedildiği gibi sadece in-vitro çalışmalar için uygun olabilmektedir.

Şu ana kadar tartışılan tayin metotlarını sınırlayan bir özellik, çoğunda apoptozisin geç dönemine yönelik parametrelerin ölçülüyor olmasıdır. Çünkü bu zamanda hücrelerin fagositler tarafından ortadan kaldırıldığı beklenen bir sonuçtur. Bununla beraber sadece tek bir parametre değerlendirmek sensitivite ve spesifite açısından sonuç vermeyecektir. Birkaç parametre ölçülerek bu paradokstan kurtulmak mümkün olabilmektedir. Halihazırdaki metotlar

sadece tek bir endpoint ölçüm yaptığı için apoptozisin dinamik işleyişi hakkında bir dezavantaj oluşturmaktadır. Yine pek çok tekniğin hücrelerin lizisine ve fiksasyonuna ihtiyaç duyuyor olması da bir dezavantaj oluşturmaktadır. Kardiyovasküler araştırmalar ışığında TUNEL ve ISEL metodu ile in situ apoptozisin lokalizasyonu hakkında bilgiler elde edilmesi ümit edilmektedir. IM ve EM, zaman alıcı işlemlerdir ve apoptozisin morfolojik değişikliklerini tespit etmede yerleri çok azdır (Örnek: miyokardiyumda elde edilen bulgular çok nadirdir). FC hücrelerin süspansiyon formuna, dokuların DNA çalışmaları için de doku homojenatlarına ihtiyaç duyar. Sonuç olarak diyebiliriz ki, özellikle kardiyovasküler sistemde apoptozisin fizyolojik ve patolojik rolünü anlamak için yeni tekniklere ihtiyaç vardır (35).

KAYNAKLAR

- Allen RT, Hunter III WJ, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *JPM* 1997;37:215-28.
- Metivier D, Dallaporta B, Zamzami N. Cytofluorometric detection of mitochondrial alterations in early CD95/Fas/APO-1 triggered apoptosis of Jurkat T lymphoma cells. Comparison of seven mitochondrion-specific fluorochromes. *Immunol Lett* 1998;61:157-63.
- Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997;89:1121-32.
- Apoptosis and cell proliferation second edition. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica 1998: p. 1-5.
- Fernandez-Segura E, Garcia JM, Campos A. Scanning electron microscopic study of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Histol Histopathol* 1990;5:305-10.
- Kondo T, Takeuchi K, Doi Y, Yonemura S, Nagata S, Tsukita S. ERM (ezrin/radixin/moesin)-based molecular mechanism of micro villar breakdown at an early stage of apoptosis. *J Cell Biol* 1997;139:749-58.
- Ellis RE, Jacobson DM, Horvitz HR. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1991a;129:79-94.
- Lagasse E, Weissman IL. Bcl-2 inhibits apoptosis of neutrophils but not their engulfment by macrophages. *J Exp Med* 1994;179:1047-52.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, Vanschie RCAA, Laface DM et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and ab1. *J Exp Med* 1995;182:1545-56.
- Morrot G, Zachowski A and Devaux PF. Partial purification and characterization of the human erythrocyte Mg²⁺ ATPase: a candidate aminophospholipid translocase. *FEBS Lett* 1990;266:29-32.
- Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555-6.
- Schroit AJ, Madsen JW, Tanaka Y. In vivo recognition and clearance of red blood cells containing phosphatidylserine in their plasma membranes. *J Biol Chem* 1985;260:5131-8.
- Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84:1414-20.
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
- Georg Häcker. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 2000;301:5-17.
- Moir RD, Goldman RD. Lamin dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:408-11.
- Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 1996;135:1441-55.
- Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 1990;136:593-608.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-6.
- Mills JC, Stone NL, Erhardt J, Pittman RN. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* 1998b;140:627-36.
- Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, Hingorani R, Crispe IN, Boyer JL et al. Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:618-23.
- Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998b;273:9357-60.
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997;278: 2-8.
- Wilhelm S, Häcker G. Proteolytic specificity of caspases is required to signal the appearance of apoptotic morphology. *Eur J Cell Biol* 1999;78:127-33.
- Wen LP, Fahrni JA, Troie S, Guan JL, Orth K, Rosen GD. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:56-61.

26. Huot J, Houle F, Rousseau S, Deschesnes RG, Shah GM, Landry J. SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 1998;143:1361-73.
27. Ohtsu M, Sakai N, Fujita H, Kashiwagi M, Gasa S, Shimizu S et al. Inhibition of apoptosis by the actin-regulatory protein gelsolin. *EMBO J* 1997;16:4650-6.
28. McCarthy NJ, Whyte MK, Gilbert CS, Evan GI. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* 1997;136:215-27.
29. Lee N, MacDonald H, Reinhard C, Halenbeck R, Roulston A, Shi T et al. Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13642-7.
30. Rudel T, Bokoch GM. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 1997;276:1571-4.
31. Fearnhead HO, Dinsdale D, Cohen GM. An interleukin-1 beta-converting enzyme-like protease is a common mediator of apoptosis in thymocytes. *FEBS Lett* 1995;375:283-8.
32. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14559-63.
33. Cotter TG, Martin SJ. *Techniques in apoptosis. A user's guide*, Portland. London: Press; 1996.
34. Gorman A, McCarthy J, Finucane D, Reville W, Cotter T. Morphological assessment of apoptosis. In: Cotter TG, Martin SJ, editors. *Techniques in apoptosis. A user's guide*, London: Portland Press; 1996: p. 1-20.
35. Waander L, van Heerde, Saskia Robert-Offerman, Ewald Dumont, Leo Hofstra, Pieter AD, Jos FM et al. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovascular Research* 2000;45:549-59.
36. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M et al. The polypeptide encoded by the c DNA for human cell surface antigen fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991;66:233-43.
37. Kitson J, Raven T, Jiang YP, Goeddel DV, Giles KM, Pun KT et al. A death-domain containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 1996;384:372-5.
38. Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 1997;276:111-3.
39. Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 1997;16:5386-97.
40. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993;268:10932-7.
41. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-6.
42. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med* 1999;189:381-94.
43. Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J* 1998;17:37-49.
44. Itoh G, Tamura J, Suzuki M. DNA fragmentation of human infarcted myocardial cells demonstrated by the nick end labeling method and DNA agarose gel electrophoresis. *Am J Pathol* 1995;146:1325-31.
45. Staley K, Blaschke AJ, Chun J. Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell Death Diff* 1997;4:66-75.
46. Bromme HJ, Holtz J. Apoptosis in the heart: when and why? *Mol Cell Biochem* 1996 Oct;163-164:261-75.
47. Meyaard L, Otto SA, Jonker RR. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 1992;257:217-19.
48. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
49. Kockx MM, Muhring J, Bortier H, DeMeyer GRY, Jacob W. Biotin-or digoxigenin-conjugated nucleotides bind to matrix vesicles in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1996;148:1771-7.
50. Lutgens E, Daemen MJAP, Kockxs M. Atherosclerosis in APOE 3-Leiden transgenic mice. From proliferative to atheromatous reasons stage. *Circulation* 1999;99:276-83.
51. Darzynkiewicz Z, Li X. Measurements of cell death by flow cytometry. In: Cotter TG, Martin SJ, editors. *Techniques in apoptosis. A user's guide*, London: Portland Press; 1996: p. 71-106.
52. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-16.
53. Andree HA, Reutelingsperger CPM, Hauptmann R. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 1990;265:4923-8.