

Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri

New discoveries in the mechanisms of apoptosis and cell survival and novel potential therapeutic strategies

Dr. Nazmi Gültekin,¹ Dr. Kamil Karaoğlu,² Dr. Emine Küçükateş³

İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü, ¹Kardiyoloji Anabilim Dalı, ²Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı, ³Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul

Apoptoz (programlanmış hücre ölümü) ve sağkalım mekanizmalarının anlaşılması, biyolojik bilimler alanında, yeni binyılın ilk yıllarından itibaren devrim niteliğinde gelişimlere yol açmıştır. Apoptoz organizmanın nükleuslu hücrelerinde genetik olarak programlanmış bir hücre ölümü şeklindedir. Bu hücre ölüm şekli, hücrenin nekroz ve kompleman lizisiyle yok oluşundan farklı mekanizmalarla oluşmaktadır. Apoptozda komşu hücreler hiçbir zarar görmez. Doğadaki birçok canlının embriyo döneminden yaşlanıp ölüncüye kadarki yaşam süreçlerinde görülen sayısız biyolojik olayların ve hastalıkların ortaya çıkma mekanizmalarında, herhangi bir nedenle stabilitesi bozularak, artık organizma için zararlı hale gelen hücrelerin yok oluş evrelerinde apoptoz ve sağkalım mekanizmaları çok büyük önem taşır. Apoptoz ve hücre sağkalımının hücresel mekanizmalarının ortaya konması, kalp hastalıkları, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, AIDS ve birçok hastalığın tedavisinde yeni tedavi stratejilerinin ortaya atılmasına olanak sağlamıştır. Böylece, dejeneratif tıp olanakları, rejeneratif tıbbın getirdiği kök hücre ve somatik hücre nükleer transferi gibi yeni tedavi imkanlarıyla birlikte kullanıldığında, gelecekte rasyonel tedavi yöntem ve ufukları da yaratılabilecektir.

Anahtar sözcükler: Apoptoz; kaspaz; hücre sağkalımı.

Tanım

Apoptoz (hücrenin orkestra eşliğinde ölüm dansı yaparak intiharı), canlının kendi otonom mekanizması tarafından ayarlanan zararlı, yaşlanmış, bakteri ve otoreaktif virüslerle infekte veya istenmeyen kendi hücrelerinin orkestral bir ahenk içinde enerji (ATP) kullanımlı ve zaman endeksli iz bırakmadan öldürülmesi sürecidir. Başka bir anlatımla apoptoz, yaşam

New discoveries in the mechanisms of apoptosis and cell survival have been a major breakthrough in biological sciences in recent years of the new millennium. Apoptosis is genetically programmed cell death in any nucleated cells of the organism. This type of cell death occurs through different mechanisms from those seen in necrosis and complement lysis of any cell, without affecting the neighboring cells. In the nature, apoptosis and cell survival are very important not only for the elimination of cells that acquire unstable features, became useless, and detrimental for the organism, but also for the mechanisms of numerous biological events and disorders seen during the lifespan of many organisms –from the embryological period to death. The discovery of mechanisms of apoptosis and cell survival has enabled the development of new therapeutic strategies in heart diseases, cancers, neurodegenerative diseases, AIDS, and many disorders. Combination of opportunities afforded by degenerative medicine with those of new therapeutic approaches of regenerative medicine such as stem-cell therapy and somatic cell nuclear transfer will possibly introduce new horizons and rational therapeutic approaches in the foreseeable future.

Key words: Apoptosis; caspases; cell survival.

boyu devam eden programlı, bir hücrenin genetik olarak düzenlenen sistematik yok oluş fenomenidir (Evrende bazı yıldızların iz bırakmadan kara deliklerde yok oluşuna benzetilebilir).

Apoptoz sözcüğü Yunancadan türetilmiştir. Bir çiçeğin yapraklarının sonbaharda dökülmesi anlamına gelir. Kerr, Wyllie ve Currie, 1972 yılında yayımladıkları bir makalede o tarihe kadar fazla

Geliş tarihi: 13.03.2006 *Kabul tarihi:* 06.07.2007

Yazışma adresi: Dr. Nazmi Gültekin, İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü, Kardiyoloji Anabilim Dalı, 34034 Haseki, İstanbul. Tel: 0212 - 459 20 00 / 29510 Faks: 0212 - 459 20 69 e-posta: nngultekin@yahoo.com

tanımlanmamış ve nekrozdan farklı morfolojik özellikler taşıyan bir hücre ölüm şeklini tarif etmişler ve bu olayı apoptoz olarak adlandırmışlardır.^[1]

Nekroz, apoptoza alternatif bir hücre ölüm şeklidir. Akut doku zedelenmesi ve iskemiyeye karşı bir reaksiyon olarak ortaya çıkabilir. Hücrede iyon pompası yetersizliği ve hücrenin kendi enerjisinin kaybı nedeniyle, hücre içine osmozla su girer ve hücre patlar, hücre membran bütünlüğü kaybolur, DNA rastgele, düzensiz olarak parçalanır ve hücrenin mitokondrisi şişer. Apoptozdan farklı olarak nekrozda, hücre tarafından yoğun inflamatuvar yanıt verilir ve inflamasyon belirteçleri pozitifleşerek yükselir.

Apoptozun temel işlevi ve amaçları

Komşu hücrelere hasar vermeden ve onları kötü yönde etkilemeden ve iz bırakmadan hedeflenen hücrenin yok edilmesidir. Bu şekilde:

a) Embriyo gelişimi, başkalaşım (metamorfoz) ve doku atrofisi sırasında olduğu gibi, gelişimi sırasında organizmaya, bir heykeltıraş titizliğinde ince bir mimariyle şekil verilir.

b) Organizmanın toplam hücre sayısı düzenlenir.

c) Tümör hücreleri, virüsle kontamine olmuş hücreler, kendi başına buyruk hale gelen ve kendine zarar veren immün hücreler (ki bunlar otoimmün hastalıklara yol açabilir) gibi istenmeyen ve tehlikeli hücreler ortadan kaldırılır ve bunlara karşı savunma oluşturulur.

Her gün bir insanda mitozla oluşan on milyar hücreyi dengelemek için her gün on milyar hücre ölmelidir. Bu rakam organizmadaki hücrelerin %5'ini oluşturur. Hücreler apoptoz ile arkalarında iz bırakmadan 15-120 dakika içinde ölürlür.

Apoptoz örnekleri. İnsan embriyosunun el ve ayak ekstremiteilerinin gelişimi sırasında, parmakarası bölgelerdeki hücreler, parmakların şekillenmesi için masif apoptoza giderler. Bu hücreler ölmek için programlanmışlardır. Bu programlı ölüm fizyolojik bir olay olarak kabul edilir. Eğer verdiğimiz örnekteki gibi programlı ölüm olmasaydı, şimdi el ve ayak parmak aralarımız tıpkı ördeklerde olduğu gibi perdeli olurdu.

Apoptoz uyarıcıları

a) Genetik kontrol (Embriyolojik evreden doğum sonrası yaşam boyu etkilidir.),

b) İyonize radyasyon,

c) İlaç ve çevresel faktörler (steroid tedavisi, kemoterapi, insektisitler, tarımda kullanılan ilaçlar, kozmik ışınlar, vb.),

d) İskemi sonrası reperfüzyon, mekanik travmalar, viremi, bakteriyemi sonrası gelişen sepsis ve septik şoklar.

Apoptozu uyaran sinyaller

a) Hücre dışı

i) Hormonlar (Örneğin tiroksin, kurbağa larvalarının kuyruklarında yani iribaş 'tadpole tails'te apoptoza neden olur.),

ii) Büyüme faktörü gibi sağkalım (survival) sinyalinde eksiklik apoptozu uyarır.

iii) Bitişik (adjacent) hücreden temas.

b) Hücre içi

i) İyonize radyasyon,

ii) Viral infeksiyon,

iii) Serbest radikallerden dolayı meydana gelen oksidatif hasar.

Apoptoz aşamaları

i) Ölüm sinyali,

ii) Kromatinde sıkışma,

iii) Hücrede parçalanma,

iv) Yutulma (fagositoz) şeklinde özetlenebilir.

Olay biraz daha ayrıntılandırılırsa şunlar görülür:

A) Eksternal olarak

a) Hücreler hacim kaybeder ve büzülür.

b) Hücre yüzeylerinde küresel kabarcıklar oluşur (blebbing).

c) Phosphatidylerine isimli fosfolipid hücreden dışarı çıkar.

B) İnternal olarak

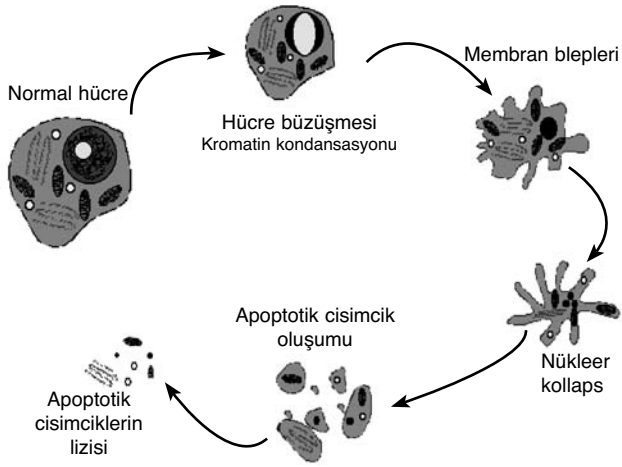
a) Sitoplazma yoğunlaşır (kondanse olur).

b) Mitokondriyum, sitokrom-C gibi apoptozu uyaran faktörleri serbestleştirerek bütünlüğünü kaybeder ve parçalanır.

c) Kaspaclar aktive olur.

d) Kromozomal DNA'lar kendi içinde 180-200 bp'lik internükleozomal fragmanlara ayrılarak parçalanır.

e) Hücre sağkalımı ve metabolizmasında çok önemli olduğu düşünülen ve moleküler ağırlığı 100 daltonun üzerinde olan birçok protein de benzer şekilde parçalanır (Şekil 1).



Şekil 1. Apoptoza uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler.

Apoptoz mekanizmaları

- 1) Ölüm reseptörleri yolu
 - a) Doğrudan yol
 - b) Dolaylı yol
- 2) Mitokondriyal yol
 - a) Apoptozom oluşmasıyla
 - b) Direkt mitokondriyal yol (primer ve sekonder).

Ölüm reseptörleri aracılığıyla apoptoza genetik bir örnek.^[2] Apoptoz programlanmış hücre ölümüdür. Ancak hücrenin geleceğine karar veren bir programla gerçekleşebilir. Genetiğin bu etkisi bir hermafrodit solucan olan *Caenorhabditis elegans* ile örneklendirilebilir. Gelişimi boyunca bu solucanın ürettiği 1090 hücrenin 131'i ölmeye adaydır. Organizmanın bu şekilde gelişimini kodlayan genler saptanmıştır. Bu genler dört gruba ayrılır.

- a) Hücre ölümüne karar verenler,
- b) Ölüm uygulayıcıları,
- c) Ölen hücrelerin yutulmasıyla ilgili olanlar,
- d) Yutulmuş hücrelerin parçalanmasıyla ilgili olanlar.

Ölüm programını *C. elegans*'ta yerine getirenler Ced-3 geni olarak adlandırılır. Ced-3 geni hücre ölüm programının yerine getirilmesinde kritik rol oynayan çok sayıda sistein proteazlarını içeren interlökin-1 beta dönüştürücü enzim (ICE) ailesini üretir. Diğer gen Ced-9 ise programlanmış hücre ölümüne giden hücrenin korunmasında rol alır. Ced-9 geninin insanlardaki karşılığı Bcl-2'dir. Bcl-2'nin memeli apoptozunda

koruyucu rolü vardır. Son raporlara göre apoptoza neden olan 30'dan fazla belirleyici ortaya konmuştur. Bunlar tümör nekroz faktörden (TNF) beta-amiloid peptidlere kadar geniş bir yelpazeyi içerir.

Apoptoz bileşenleri ve belirleyicileri

- a) Hücre membranı düzeyinde
Memelilerde hücre membranı yüzeyindeki reseptörler şunlardır:
 - i) CD 95 reseptörleri (Apo-1 veya Fas olarak da adlandırılır)
 - ii) TNF-R
 - iii) Trail reseptörü (Ölüm reseptörü-4 veya Apo-2)
- b) Reseptörleri kontrol eden genler
 - i) DcR-2, DR-3, DR-4, DR-5 ve DcR-3
- c) Reseptör bağları (ligandlar)
 - i) CD95L
 - ii) TNF-alfa
 - iii) Trail (Apo-2L) kanser hücrelerinde DR-4 ve DR-5'e bağlanır
- d) Hücre membranının alt yüzünde ve sitoplazmada bulunan inaktif proteinler
 - i) FADD (Fas-associated death domain), DISC'te (*death-inducing signalling complex*) yer alan adaptör proteindir.
 - ii) c-FLIP (Cellular FLICE-inhibitory protein): Yalancı kaspaz grubuna giren bir proteindir.
 - iii) FLICE (FADD-like IL-1 beta-converting enzyme): FLICE sıklıkla kaspaz-8 olarak da adlandırılır.
 - iv) Prokaspazlar (Zimogen) aşağıda ayrıntılı olarak bahsedilecektir.
 - v) Bcl-2 üst aile'den (super family) ayrıntılı olarak bahsedilecektir.
 - vi) Perforin ve Granzim'ler
- e) Protein domenleri (protein parselleri)
Proteinler bir geniş (L), bir de dar (S) koldan (subunit) oluşurlar. Geniş kollar bir takım domenlerden meydana gelir.
 - i) Ölüm domeni (Death domain-DD),
 - ii) DED (Death effector domain), tek başına öldürücü olmayan, ama ölüme yardımcı olan domenler,
 - iii) CARD (Caspase recruitment domain), kaspazları organize eden domenler,

- iv) Bcl-2 üst ailede bulunan BH domenleri. Bunların BH-1'den BH-4'e kadar olan alttıpleri vardır.
- v) BIR domenleri (BIR1-3) memeli proteinlerinde Baculovirus'lerin IAP tekrarlarına (repeats) neden olan domenlerle örtüşür.

DNA fragmentasyonunda rol oynayan inaktif proteinler

i) ICAD, kaspaz-3 ve kaspaz-7 tarafından ikiye ayrılır; kısa kol (S) 40 kDa'luk DNA'ya oligomerize olur. Bu fragmentasyona *caspase activated DNase* (CAD) adı da verilir. Bu fragmentasyon, nükleus içindeki DNA'ları 180 bp'lik düzenli parçalara ayırır ve kromatin fragmentasyonuna neden olur.

ii) Poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP): DNA hasarı başladığında aktive olur. Histonlar gibi nükleer proteinlere ADP-riboz polimerlerini ekler. DNA tamir sürecini uyararak hızlandırır.

iii) Telomer: Kromozomların uç kısımlarında yer alan kodlanmayan kısa, künt, ardışık DNA parçacıkları. Heflick'e göre bir hücrenin kaç defa mitoz yapacağına karar verir. Her mitozda (daughter-cell) boyu kısalmır ve fibroblast ve epitel hücreleri yaklaşık 50. bölünmeden sonra G1-G2 fazını durdurarak fonksiyonunu kaybeder; hücre 'senescence' (yaşlanmış artık bölünemeyen durağan hücre) durumuna girer (replikatif yaşlanma). Kök hücreler, üreme hücreleri, aktif lenfositler mitoz yeteneklerini kaybetmezler.

iv) Telomeraz: Telomerlerin her mitozda kısalarak fonksiyonlarını kaybetmesini önleyen enzimdir. Normalde memelilerde fibroblastlarda bulunur. Kanser hücreleri telomeraz yaparak ölümsüzlüğü keşfeder (immortalization). Telomeraz enzimi telomerlerin yeniden tesisini sağlar.

Mitochondriyal permeabilite proteinleri

i) Sitokrom-C oksidatif fosforilizasyon için elektron taşıyıcı. Muhtemelen "mitochondriyal permeability transition" porlarından salınır. Alternatif yollardan da mitokondriyi terk edebilir.

ii) AIF (Apoptosis inducing factor): Bir flavoprotein olup, mitokondriyal PT porlarından salgılanır. Hücre nükleusuna transloke olur ve onu yaklaşık 50 kb'lık parçalara ayırır.

iii) ANT (Adenine nucleotide transporter): Mitokondriyal iç yapraktan serbestleşir ve PT porlarının alt yapısında yer alan bir öge görevini yapar.

iv) Endonükleaz G (Endo-G): Mitokondriyal PT porlarından salınır, hücre nükleusuna transloke olur, tek sarmallı DNA'ları parçalar.

v) Smac/DIABLO (Second mitochondrial activator of caspase/Direct IAP binding protein with low pI): Bu protein mitokondriyal PT porlarından salgılanır; IAP'yi (Inhibitors of Apoptosis Proteins) inhibe eder. Böylece, apoptozu hızlandırır. IAP ilk defa Baculovirus'larda bulunmuştur. Memelilerin 1-3 BIR domenlerine teka-bül eder. IAP'nin ortamda bulunması caspase 3 ve 8'i inhibe eder. Bu şekilde viral replikasyon güçlenir.

vi) VDAC (Voltage dependent anion channel): Mitokondriyal membranda bulunur ve PT porunun alt yapısının oluşmasında rol alır.

vii) Mitokondriyal ya da periferik benzodiazepin (MBR ya da PBR): Bu protein mitokondriyal dış membranda yer alarak PT porunun yapısına girer.

viii) Mitokondriyal permeabilite geçiş poru (PT pore): PBR, ANT ve VDAC'den oluşur. PT porunun açılmasıyla AIF, endonükleaz G ve Smac/DIABLO sitoplazma içine salınarak apoptozu hızlandırır (sekonder mitokondriyal yol).

Kaspazlar (Cysteinyil aspartate-specific proteases)^{3,4}

Gerek ölüm reseptörleri yolu gerekse mitokondriyal apoptozda rol alırlar. Kaspazların günümüze dek 14 izoformu keşfedilmiştir. İlk keşfedilen kaspaz *C. elegans*'ın ced-3'ü olup memelilerde interleukin-1 beta dönüştürücü enzim (ICE) ile denktir. Daha sonraları kaspaz-1 olarak adlandırılmıştır.

Kaspazlar üç kategoride incelenir:

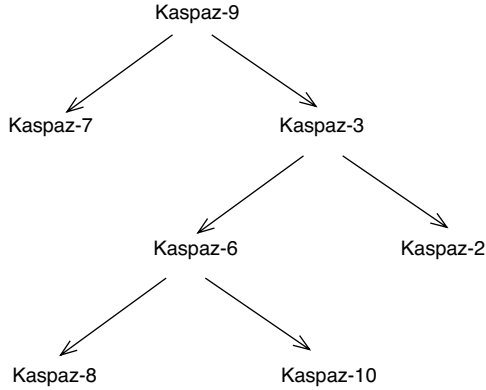
- a) Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8, 9)
- b) Etkileyici kaspazlar (kaspaz-3, 7)
- c) İnflamatuvar kaspazlar (diğerleri)

Kaspaz aktivitesi proteolitik kaskad yoluyla olmaktadır (Şekil 2). Kaspazlar inaktif iki prokaspazın hidrolizi, yani uzun ve kısa bacakların kendi aralarında yan yana gelmesiyle aktive olurlar. DED ve CARD inhibitör prodomenini içeren uzun kollar yarılarak ortamdan uzaklaşır. Asıl aktif kısım yan yana bir arada bulunan iki kısa koldur. Başlatıcı kaspazlar otoaktivasyonla, etkileyici kaspazlar ise transaktivasyon yoluyla otokatalitik olarak aktive olmaktadır.

Bcl-2 üst ailesi (super family)

Büyük bir protein ailesi olup, genelde anti-apoptotiktir. Küçük bir bölümü pro-apoptotiktir. Üç alt aile grubu içerir:

Bcl-2: Bcl-2, Bcl-x1 ve Bcl-w gibi üç tipi vardır. BH1'den BH4'e kadar tüm domenleri içerir, apoptozu önlemeye ve hücre sağkalımını devam ettirmeye çalışır.



Şekil 2. Kaspaz kaskadı.

şır. Bcl-x1 kristal yapıda olup, bakteriyel toksinlerin por içeren toksinlerine benzer etki gösterir. Bu özelliğiyle “mitokondriyal PT” por oluşumunu sağlar ve iyon kanallarını açar.^[5] Bcl-2 Burkitt lenfomasında ilk defa keşfedilmiş ve bütün aileye adını vermiştir.

Bax: Bax, Bak ve BAD olmak üzere üç alt grubu vardır. BH4 domenini içermez, bunların hepsi pro-apoptotiktir.

Bid: Sadece BH3 domenini içerir, pro-apoptotiktir.

Protein kompleksleri

Apoptozom: Sitokrom-C, prokaspaz-9, yapısı bilinmeyen APAF-1’den (apoptosis activating factor-1) oluşur. Apoptozom teşekkülü sitokrom-C tarafından yönetilir. APAF-1’de CARD domeni olduğu için CARD domeni olan prokaspaz-9 ile kombinasyona girer ve aktif kaspaz-9’un ortaya çıkmasına neden olur.^[6]

APAF-1: CARD domeni içeren bir adaptör protein olup, apoptozom oluşumunda kombinasyona girer.

DISC (Death-inducing signalling complex): Ölüm reseptör ligandları, ölüm reseptörleri ve FADD, TRADO gibi adaptör proteinlerin kombinasyonundan oluşur.

Apoptoz mekanizmaları (Şekil 3, 4)

Fas ligandı tarafından indüklenen apoptoz

Fas ligandı trimerler halinde bulunur, kendi reseptörlerine bağlanarak aktive eder ve böylece reseptör trimerizasyonunu oluşturur. Aktive olmuş reseptörler FADD adaptör molekülü ile birleşir, inaktif prokaspazların uzun ve kısa kollarını birbirinden ayırarak aktif kaspaz-8’i oluşturur (DISC sinyalizasyonu). Aktive kaspaz-8, kaspaz 3’ü iki yolla aktive eder.^[7]

a) Doğrudan (kısa) yol: Kaspaz-8 prokaspaz 3’ü direkt olarak parçalar ve aktif hale getirir. Kaspaz-3 DNA fragmentasyon faktörü 45’i (DFF 45), DFF 40’a

oligomere çevirir. DFF 40 DNaz aktivitesine sahiptir. DFF 40 oligomeri internükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. Böylece, DFF 40 oligomeri nükleusta apoptotik kromatin kondansasyonunu meydana getirir.

b) Dolaylı yol: Kaspaz-8 sitokrom-C serbestleşmesi için Bcl-2 proteinini Bid ve onun terminal kısmına ayırır. Bid ve tBid mitokondriye transloke olur. Bu şekilde mitokondriyal porlar açılır. Serbestleşen sitokrom-C + APAF-1 + dATP + prokaspaz-9 aynı domenleriyle bir araya gelerek apoptozomu oluşturur ve kaspaz-9’u etkin hale getirir (primer mitokondriyal yol). Kaspaz-9 da prokaspaz-3’ü eşit olmayan parçalara bölerek aktif kaspaz-3’ü meydana getirir (Tüm yollar Roma’ya gider deyimi gibi, yani kaspaz-3’e çıkar.). Bundan sonraki ardışık olaylar doğrudan yolda olduğu gibidir. Sonuç olarak genomik DNA fragmentasyonu ile olaylar zinciri son bulur.

Kaspaz-8 konsantrasyonu 30’un üzerinde ise doğrudan yol, 30’un altında ise mitokondriyal yol kullanılmaktadır. Aktive olan kaspazlar diğer prokaspazları aktive ederek, kanın pıhtılaşmasındaki olaylar zincirine benzer şekilde, protoelitik bir kaskad tetiklenir ve ICAD aktive edilerek DNA fragmentasyonu gerçekleşir. Kromozomlar merdivenvari internükleozomal fragmentasyona uğrar (DNA hasarı). Diğer taraftan da, görevini tamamlayan kaspazlar (PKB/Akt ve MAPK hücre sağkalım aktivasyon yollarıyla) deaktive olurlar. Kaspazların iki kolu (subunit) vardır. Uzun kol 20 kDa’dır. Kısa kol ise 10 kDa’dır. Kaspazların aktif kısmı bu küçük altbirimdedir. DED ve CARD içeren kısım inhibitör prodomen olarak kabul edilir. İnisiyator kaspazlar otoaktivasyonla etkinleşirler. Bunun için prokaspazlar uç kısımlarını birbirine yakınlştırırlar. Bu şekilde prokaspaz-8 DISC’e inkorpore olur.

Aktif kaspazların hücresel prosesler üzerinde birçok etkileri vardır.

a) Aktif kaspaz-9: Kaspaz-3 ve kaspaz-7’nin nükleusa girebilmeleri için nükleer porları harab eder veya genişletir.

b) Nükleus içine giren kaspaz-3 ICAD’yi iki yerinden ayırarak, inhibitör altbirimini bozar ve nükleozomlar arasındaki DNA’yı bölerek CAD/DFF-40’ı serbestleştirir.

c) Kaspazların aktivitesi fagositozda rol oynayan sinyallerin ortaya çıkmasına neden olur. Bunu da, kaspazlar normalde hücre membranının iç yüzünde bulunan PS’yi (phosphatidyl-serine) hücre dışına eksterne ederek yapar. Fagositler kendi CD14’ünü kullanarak, kendilerini PS’ye bağlarlar.^[4,8]

d) Kaspaz-3 hücre membranına yönelir. Hücre membranını idame ettiren gelsolini parçalar. Bu parçalanmayla hücre içinde aktin filamentleri oluşur ve hücre zarında mememsi çıkıntılar meydana gelir (blebbing). Diğer taraftan kaspaz-3 PDK-2'yi (p21-activated kinase-2) aktive eder. Bu şekilde, hücre iskeleti bozularak hücre apoptotik cisimlere parçalanır.

Bcl-2 ailesi ve apoptozda mitokondriyal yollar

Bu ailenin esas eylem mekanizması mitokondriyal membran permeabilitesinin regülasyonu üzerindedir. Bu ailenin bir kısmı pro-apoptotik, bir kısmı da anti-apoptotiktir.^[5,6,8-11]

Bcl-2 ailesinin etki mekanizmaları

a) Bcl-2 ailesinin proteinlere homodimer ve heterodimer ekleme özelliği vardır. Dimerizasyon BH3 bölgesinde meydana gelir. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki heterodimerizasyonun, pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin pro-apoptotik aktivitesini inhibe ettiği düşünülmektedir. Bu olayın gerçek mekanizması bilinmemektedir.

b) Bcl-2 ailesinin iyon kanalları oluşturduğu düşünülmektedir. Bcl-XL, bakteriyel toksinlerin por meydana getirme etkisine benzer bir özelliğe sahiptir. Bcl-2, Bcl-XL ve Bax sentetik lipid membranlarda iyon kanalları oluştururlar.^[11]

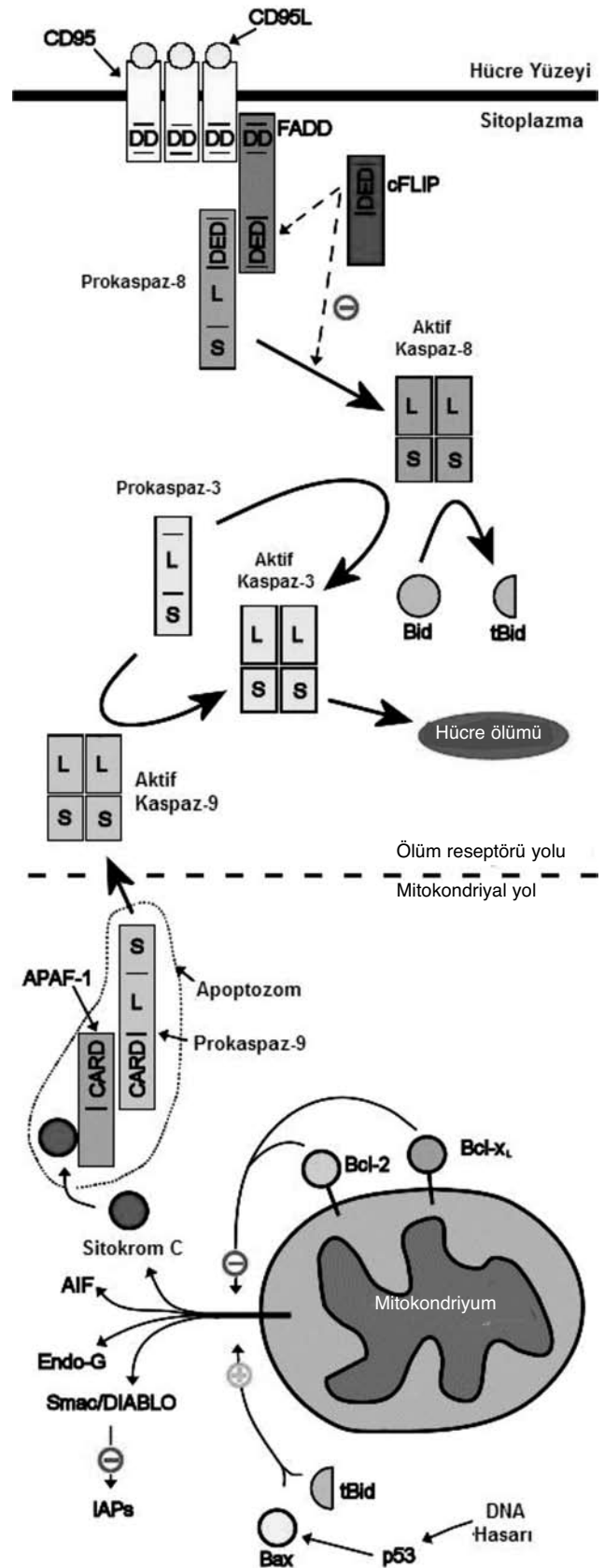
Bcl-2 ailesinin en muhtemel etki mekanizması, sitokrom-C ve AIF gibi maddelerin PT porlarından (mitokondriyal membrandan) geçiş permeabilitesini artırmasıyla olmaktadır.^[1] PT porları non-spesifik transportlardır; 1,5 kDa'dan küçük moleküller PT porlardan non-spesifik olarak geçebilirler. Bcl-2 PT porlarının açılışını inhibe eder, fakat Bcl-2'nin pro-apoptotik üyeleri (Bax ve Bak) sitokrom-C ve AIF salınımını artırır.

c) Bcl-2 süper ailesinin başka muhtemel bir mekanizması da, APAF-1 + Bcl-XL'nin birleşik etkisiyle olur. Bcl-XL APAF-1'i ayırarak (sequester), prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9'a dönüşmesini önler.

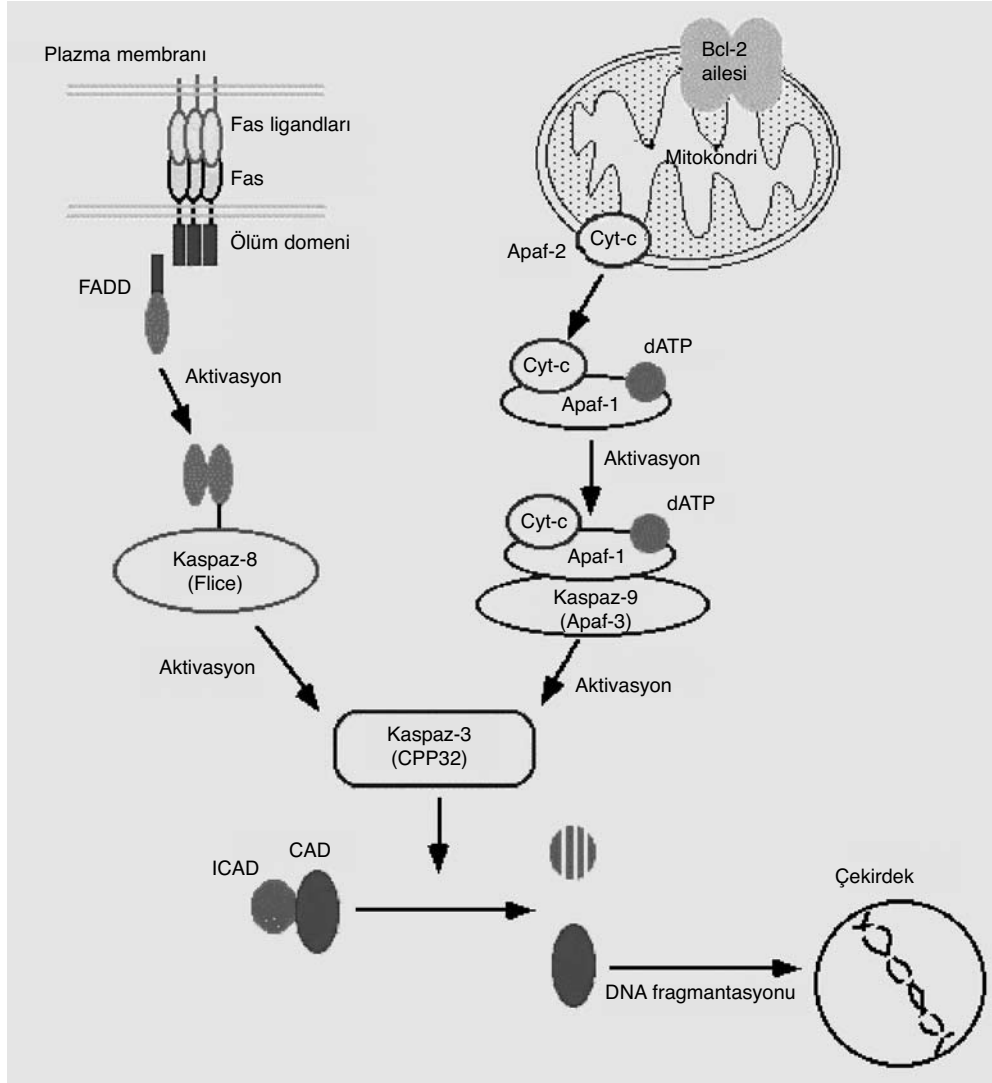
Sitokrom-C

Sitokrom-C'nin mitokondrilerden salınımı olayı, halen tartışmalıdır. Sitokrom-C, a) PT poru yoluyla,^[6] b) Bax ile mitokondrilerde sitokrom C'nin geçmesi için kanallar oluşması yoluyla^[12] ve c) su dolan mitokondrilerin dış membranlarının patlaması yoluyla sitoplazmaya girebilir.

p53 birçok genin kopyalanmasını sağlayan tümör supresör genlerden biridir ve "inducible NO" tarafından upregülasyonu gerçekleştirilir. MDM2 geni p53'ü etkinleştirir ve Bax genini de kopyalar. Böylece,



Şekil 3. Hücrede apoptoz oluşum mekanizmalarının yolları.



Şekil 4. Ölüm reseptörleri ve mitokondriyal yollarla kaspas-3 aktivasyonunun başlamasıyla nükleusta oluşan DNA fragmentasyonu.

sitokrom-C salgılanır, apoptozom oluşur ve apoptoz hızlanır (primer mitokondriyal yol).^[13]

PARP-1, DNA tamirinden sorumlu nükleer enzimdir. Aşırı aktive olursa apoptoz ve nekroza neden olur.^[4] PARP-1 tek sarmallı DNA ile aktive olur. Aktif PARP-1, NAD⁺'yi ikiye böler. PARP-1'in aşırı aktivitesi NAD kaybına, dolayısıyla da ATP kaybına neden olur. ATP noksanlığı da iyon pompası yetersizliğine yol açar. Böylece, hücreler şişer ve osmotik basınç nedeniyle patlar; bu bir nekroz olayıdır. Karşı seçenek olarak NAD eksikliği, sitoplazmadan mitokondrilere AIF translokasyonuna neden olur. Bu da apoptozu yol açar. PARP-1 aktivitesinin eşik düzeyine göre, DNA tamiri, apoptoz veya nekroz oluşur. Apoptoz ATP'ye bağımlıdır.^[10] Kaspazlar PARP-1'i bölerek ATP deplesyonunu önlerler.

Protein kinaz B aktivitesi (PKB/Akt) ve MAPK (mitogen-activated protein kinase) sağkalım yolları

Bu yollar hücrenin sağkalım yollarıdır. Sadece dışardan gelen sinyaller olduğu zaman aktifleşirler. Sağkalım sinyalleri eksikse, hücreler yanlışlıkla apoptozu da gidebilir. Sağkalım sinyallerine PDGF ve PDK-1 (phospholipid-dependent kinase-1) örnek teşkil eder.^[10,14,15]

a) PKB/Akt, bir taraftan BAD ve çatal başlı proteini sekestrasyona uğratarak CD95 transkripsiyonunu azaltır; diğer taraftan da, başka bir yolla NF- κ B ve NOS-III aktivasyonuna neden olarak, bunların kopulanmasını artırır. Bu durumda nitrik oksit, nonspesifik proteinlerin S-nitrolizasyonu yoluyla apoptozu inhibe eder.^[16]

b) MAPK yolu da PKB/Akt yolu gibi BAD fosforilasyonu yaparak CREP proteinini (cAMP-response element binding protein) ve transkripsiyon genlerinin aktivasyonunu artırarak hücre sağkalımını teşvik eder.

Tedavi stratejileri

Yetersiz apoptoz ve neden olduğu hastalıklar

Birçok kanser türünde ve otoimmün linfoproliferatif sendrom gibi hastalıklarda apoptoz çok ileri derecede azalır. Yetersiz apoptoz durumlarında apoptozun yapay olarak stimülasyonu yararlı olabilir.

a) Otoimmün linfoproliferatif sendrom (ALPS).

Bu hastalıkta mutasyonlara bağlı yetersiz apoptoz söz konusudur. Farklı tipleri vardır:

Tip 1A'da CD95'in ölüm domeninde (DD) mutasyon görülür.

Tip 1B'de CD95L mutasyonu vardır.

Tip 2'de kaspaz-10'un aktivitesini azaltan mutasyon vardır. Bu mutasyonda yetersiz apoptoza uğrayan lenfosit sayısı artar ve birçok otoimmün hastalık ortaya çıkar.^[2,17]

b) Kanser. Hücre akümülyasyonuna yol açan normal hücre siklus mekanizmasının disfonksiyonu olarak da tanımlanabilir. Hücreler ya aşırı proliferasyona uğrayarak ya da apoptotik yolların malfonksiyonu nedeniyle kanserli hücrelerin yok edilmelerinin yetersizliğine bağlı olarak yıkılım gösterirler. İnsan organizmasında günde iki bin adet tümör hücresi oluşmaktadır. Apoptoz veya yetersiz mutasyon nedeniyle hücrelerin patlaması sonucunda bu tümör hücreleri yok olur.

Kanserin oluşması için multipl genetik değişikliklere bağlı (mutasyon) olarak yapısı bozulmuş proteinlerin (altered proteins) ve onkojenlerin (HLA-A+β2-Mikroglobulin + tümör antijeninin nanomerik peptid fragmanı) oluşması gerekmektedir. Kanser sıklığının yaşla artması, uzun yaşam süreci boyunca birçok mutasyonun meydana gelebileceğini düşündürmektedir.

Bir malign tümörün oluşumunda üç ana dönem vardır:

a) Başlama (bir onkojenin oluşmasını sağlayan mutasyon): Onkojenlerin bazıları fetal hayatta bulunur ve erişkinde bazı patolojik durumlarda tekrar ortaya çıkabilir (fetal onkojenler).

b) Promosyon (phorbol esterleri ve safra asitleri gibi kimyasallar sorumlu olabilir): Tümör hücreleri

salgıladıkları glikoproteinlerle kemoterapiye direnç geliştirirler.

c) Progresyon: Bu dönemde kanser tüm vücuda yayılır.

Bu progresyon süreci, *i*) immortalizasyon (ölümsüzlük) = telomeraz ekspresyonu, *ii*) sürekli angiogenez ve *iii*) metastazlar ve apoptozdan kaçış şeklinde olur.

Bazı kanserler sıklıkla apoptozun azalmasıyla ilişkilidir ve bu nedenle kanser tedavisinde apoptozun yapay yolla indüksiyonuna dayanan yeni bir tedavi stratejisi geliştirilmelidir.^[7] Apoptozun azalması aşağıdaki nedenlere bağlı olabilir:

i) Bazı tümör hücreleri CD95 reseptörlerini azaltır (downregulation).

ii) Bazı tümör hücreleri CD95L'yi pasifize etmek için yüksek düzeyde solubl CD95 reseptör formunu sekrete ederler.

iii) Bazı tümör hücrelerinin, kendilerine bağlanmak isteyen T hücrelerini öldürmek için kendi hücrelerinin yüzeylerinde CD95L eksprese ettikleri gösterilmiştir.

iv) Teorik olarak tümör hücreleri, CD95L'yi bağlayan, fakat apoptotik sinyal yollarıyla eşleşmeyen tuzak reseptörler de eksprese ederler.

Yapay apoptoz meydana getiren yöntemler ve yetersiz apoptozda tedavi stratejileri

- Gen tedavisi (örneğin Bcl-2, cFLIP ve IAPS'yi hedef alanlar)
- Smac/DIABLO taklitçileri veya IAP antagonistleri^[18]
- Fotodinamik tedavi
- Recombinant TRAIL (bir ölüm reseptör ligandı)
- PKB/Akt sinyalinin inhibisyonu
- p53 aktivitesinin ortaya çıkmasına neden olan MDM2 inhibisyonu

Gen Tedavisi. a) Anti-apoptotik Bcl-2: Antisense mRNA kullanılarak (18 bp'lik oligonükleotid antisense Bcl-2 mRNA=G-3139) inhibe edilir.

b) cFLIP ve IAPS antisensleriyle, SCID (severe combined immunodeficiency) fare modellerinde geliştirilen kanserlerde sitotoksik ilaçlarla birlikte başarılı sonuçlar alınmıştır.

Fotodinamik tedavi. Bir porphyrin bileşiği olan phthalocyanine-4 tümör hücresine verilir ve tümör hücresine yoğun ışık kaynağı uygulanır. Bu şekilde ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri tümör hücre

resini apoptoza götürür. Reaktif oksijen türevleri mitokondri iç mebranlarını harab ederek mitokondriyal permeabiliteyi artırır. Bu da mitokondrilerin şişmesine ve sitokrom-C'nin sitozomlardan serbest hale gelmesine yol açar. Sitokrom-C kaspaz aktivasyonuna neden olarak apoptozom oluşumu sağlar.^[16]

Recombinant TRAIL. Apoptozu aktive etmenin başka bir yolu da ölüm reseptörlerini stimüle etmektir. TRAIL, CD95L ve TNF α ile benzerlik gösteren bir ölüm reseptör ligandıdır. TRAIL bazı insan tümörlerinin fare modellerinde denenmiştir. TRAIL, CD95L ve TNF α kadar karaciğer toksisitesi ve kanamalara yol açmaz.^[19]

PKB/Akt sinyalinin inhibisyonu. PKB/Akt inhibitörlerinden biri olan 'wortmannin', tümör süpresör geni olan PTEN'nin azalmasına bağlı PKB/Akt sinyalindeki artışı azaltır. Böylece, sitokrom-C'nin mitokondrilerden serbestleşmesini sağlayarak apoptozu hızlandırır.^[20]

Aşırı apoptozun eşlik ettiği hastalıklar ve tedavi stratejileri

- a) Nörodejenaratif hastalıklar: Parkinson hastalığı, amyotrofik lateral skleroz, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı
- b) AIDS (T-helper hücrelerinin aşırı apoptozu)
- c) İskemiler
 - i) İnmenin neden olduğu serebral iskemii,
 - ii) Miyokard infarktüsünü takiben görülen kardiyak iskemii örnek gösterilebilir.

Parkinson hastalığı. Substantia nigra'daki nöronlarda kayıp vardır ve mitokondrilerde hasar görülür. Bazı Parkinson hastalıkları kalıtsaldır ve anne tarafından kalıtımla geçer. PARP inhibitörleri Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılabilir.^[21]

Amyotrofik lateral skleroz. Spinal motor nöronlar aşırı apoptoz nedeniyle kaybolarak azalır. Bu da hastayı paralizi ve ölüme götürür. Amyotrofik lateral skleroza olguların %25'inde Cu/Zn süperoksit dismutaz (SOD) geninde görülen mutasyon neden olur ve aşırı miktarda peroksinitrit (ONOO⁻) motor nöronlarda birikir (apoptozda Zn kaskadı). Bu aşırı peroksinitrit birikimi de proteinlerin nitrasyon/oksidasyonunu etkiler. Oluşan bu Zn kaskadı da kaspazları aktive eder ve motor nöronların apoptozuna yol açar.^[17,22]

Alzheimer hastalığı. Amiloid prekürsör protein (APP) ve presenilinde mutasyon sonucu amiloid- β oluşumu artar. Amiloid- β apoptoza, nöron kaybına ve amiloid plakları oluşumuna neden olur. Amiloid- β

nörotoksiktir. Diğer taraftan APP oksidatif stresi artırarak ölüm reseptörlerini etkiler ve apoptoz yapar. Aynı zamanda TNF-R1'i aktive eder. TNF- α sekresyonunu artırır ve mikrogliaya neden olur.^[17,22]

Huntington hastalığı. Hip-1/Hippi heterodimeri prokaspaz-8'i uyarır. Kaspaz-8 de striatumdaki nöronların apoptozla kaybına neden olarak hastalık belirtilerini ortaya çıkarır.^[23]

AIDS. HIV neden olur. HIV, CD4⁺T hücrelerini enfekte eder ve CD4 reseptörlerine bağlanarak hücre içine girer. HIV'in 'Tat' proteini CD95 reseptör ekspresyonunu artırır. Bu durum, CD4⁺T hücrelerinin CD95'e duyarlılığını artırarak aşırı apoptozla sonuçlanır. Apoptozu azaltma AIDS için bu nedenle potansiyel bir tedavi yöntemidir.^[7,24]

Miyokard iskemisi. Kısmi koroner tıkanıklık angina pektoris, tam tıkanma ise akut miyokard infarktüsüne (AMİ) neden olur. Eğer kan akımı AMİ'nin başlangıcında çabuk düzeltilmezse fazla miktarda kardiyomyosit ölümü meydana gelir. Kan akımının sağlanmasının da bazı sakıncaları vardır; bu durum da reperfüzyon hasarına neden olur. Yakın zamanlara kadar reperfüzyon hasarının nedeni bilinmiyordu ve kardiyomyositlerin nekrozu sonucu olduğu düşünülüyordu. Şimdi reperfüzyon hasarında apoptozun rol oynadığı anlaşılmıştır. Tedavi apoptozu azaltmaya yönelmiş ve bu alanda bazı başarılar da elde edilmiştir. Akut miyokard infarktüsü sırasında iskemik miyokard dokusunda aşırı Bax ekspresyonu saptanmıştır. Antisens teknolojisiyle Bax inhibisyonu, apoptozu inhibe ederek kardiyomyosit ölümünü azaltabilir.

Diğer bir strateji ise kaspaz aktivitesini inhibe ederek apoptozu azaltmaktır. Bir kaspaz inhibitörü olan z-VAD-fmk'nin hayvan modellerinde meydana getirilen miyokard infarktüsünde miyokardiyal reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir. Apoptoza uğrayan hücrelerden çıkan fosfatidylserine'e annexin-V'yi bağlamak suretiyle, apoptoza uğrayan hücrelere floresans gösteren bir özellik kazandırılarak kaspaz inhibisyonunun faydaları, real-time direkt floresans mikroskopunda izlenebilmiştir. Ne yazık ki z-VAD-fmk reaktif oksijen türevlerini artırır ve yaygın toksisitelere neden olur. İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) infüzyonunun miyokard iskemili hayvan modellerinde apoptozu azalttığı gösterilmiştir. IGF-1 PKB/Akt sinyalini uyarak hücre sağkalım süresini artırır.^[25]

Serebral iskemii. Özellikle endüstri toplumlarında ölüm ve sakatlıklara yol açar. İskemik sinir sistemi dokusundaki ölüm olaylarının sırası aşağıda tanımlanmıştır.

Kan akımında azalma ve oksijen eksikliği iskemi ile sonuçlanır. Birçok hücre nekrozla ölür. Nekroza uğrayan hücrelerin lizisi doku sıvısı içine K^+ iyonları ve glutamat salgılar. Aşırı K^+ iyonları konsantrasyonu membran depolarizasyonuna neden olur. Glutamatlar potasyum iyonları ile kombine olur ve N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör aktivasyonuna, bu da nöronların içine kalsiyum iyonu akışına yol açar.

Yüksek sitoplazmik kalsiyum iyon konsantrasyonları hücreler için toksiktir. Eksitotoksiste, serebral iskeminin hemen yakın çevresindeki hücrelerin ölümüne neden olur. Bu hücrelerin ölümünün bilhassa apoptoza bağlı olduğu düşünülmektedir.

Serebral iskeminin tedavisi. z-VAD-fmk'nin sıçan modellerinde kullanılması serebral iskemi nedeniyle oluşan beyin hasarını ve nöron kaybını azaltır. z-VAD-fmk, NMDA reseptörü antagonistleriyle birlikte kullanıldığında sonuçların daha başarılı olduğu hayvan modellerinde gösterilmiştir.^[17]

Yukarıda bahsettiğimiz anti-apoptoz tedavilerin hepsi ayrı ayrı yararlı olabilir.

(Kaspaz inhibisyonu, PARP inhibisyonu, miyokard iskemisi için yukarıda bahsedilen PKB/Akt yolunun stimülasyonu, antisens teknolojiyle Bax inhibisyonu, ANT antikörleri gibi yukarıda bahsettiğimiz anti-apoptoz tedavilerin hepsi ayrı ayrı yararlı olabilir.

z-VAD-fmk gibi non-spesifik kaspaz inhibitörleri de geliştirilmiştir. Fakat, bunlar reaktif oksijen ürünlerinin aşırı üretimine neden olmakta ve toksisiteyi yararlarını gözelemektedir.

Kaspazların spesifik inhibitörleri, örneğin kaspaz-1 (ICE inhibitörleri) romatoid artrit tedavisinde kullanılmaktadır. Bu tedavide rasyonalite, kaspaz aktivitesinden ziyade IL-1 β miktarının azaltılmasıdır.^[26]

PARP inhibisyonu

En az 6 PARP geni tanımlanmıştır. p53 gibi PARP-1'in de ikili etkisi vardır. Bir taraftan apoptoza neden olur. Diğer taraftan DNA tamirinde rol oynar. PARP-1 inhibisyonu, bir taraftan DNA hasarı nedeniyle hücre ölümüne neden olurken, diğer taraftan hücre ömrünü uzatır. Bu nedenle, PARP-1 inhibitörleri, duruma göre, hem aşırı apoptozlu hastalıklarda, hem de yetersiz apoptozun eşlik ettiği hastalıklarda kullanılabilir.

PARP-1 inhibitörleri, DNA tamirini azaltma özellikleri nedeniyle, topoizomera-1 inhibisyonu ve radyoterapinin etkisini kuvvetlendirmek amacıyla kanser tedavisinde de kullanılabilir.

PARP inhibitörlerinin Parkinson hastalığının tedavisinde de kullanımı uygun olabilir.

PARP inhibitörleri mekanik darbe ve şoklar nedenleriyle oluşan travmatik kafa hasarında nöronal ölümü azaltır. Ayrıca, miyokard infarktüsündeki reperfüzyon hasarlarını da azaltır.

PARP-1'in inhibe edildiği farelerde, kontrol farelere göre septik şokun prognozu daha iyi seyretmiştir. Septik şok bakteriyel lipopolisakkaritlere bir yanıttır. Bu durumda makrofajlar aktive olur. Birçok interlökin eksprese olur ve nitrik oksit sentaz-II (NOS-II) aktive olur. Bu inflamasyon sonucu oluşan reaktif oksijen ürünleri DNA ile reaksiyona girer. Bunun sonucunda endotelde vasküler düz kas hücrelerinin DNA sarmalları kırılır. Bu durum PARP-1'in aşırı aktivitesine neden olur, geniş kanamalarla birlikte endotel hücreleri ölür. Böylece PARP-1 inhibitörleriyle, PARP-1'i baskılanmış fareler kanamalara karşı korunur.

Ayrıca, PARP-1 inhibitörleriyle tip-1 diyabetes mellitusta pankreatik β -hücre harabiyetinin azaltılabileceği düşünülmektedir.^[21]

Sonuç olarak, apoptoz ve hücre sağkalımının hücrel mekanizmalarının ortaya konması, kalp hastalıkları, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve AIDS'in tedavisinde yeni tedavi stratejilerinin gelişmesine olanaklar yaratmıştır. Böylece, dejeneratif tıp olanaklarının, kök hücre, progenitor hücre ve somatik hücre nükleer transferi (SCNT) gibi rejeneratif tıbbın getirdiği yeni tedavi olanaklarıyla birlikte kullanılması, geleceğin rasyonel tedavi yöntemleri konusunda yeni ufuklar yaratabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239-57.
2. Xue D, Wu YC, Shah MS. Programmed cell death in C. elegans: the genetic framework. In: Jacobson MD, McCarthy N, editors. Apoptosis: the molecular biology of programmed cell death. Oxford: Oxford University Press; 2002. p. 23-55.
3. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. Trends Cell Biol 2001;11:526-34.
4. Roy N, Cardone MH. The caspases: consequential cleavage. In: Jacobson MD, McCarthy N, editors. Apoptosis: the molecular biology of programmed cell death. Oxford: Oxford University Press; 2002. p. 93-135.
5. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annu Rev Biochem 2000;69:217-45.

6. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 2001;26:61-6.
7. McCarthy NJ, Bennett MR. Death signalling by the CD95/TNFR family of death domain-containing receptors. In: Jacobson MD, McCarthy N, editors. *Apoptosis: the molecular biology of programmed cell death*. Oxford: Oxford University Press; 2002. p. 200-34.
8. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
9. Zamzami N, Susin SA, Kroemer G. Mitochondria in apoptosis: Pandora's box. In: Jacobson MD, McCarthy N, editors. *Apoptosis: the molecular biology of programmed cell death*. Oxford: Oxford University Press; 2002. p. 161-75.
10. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:647-56.
11. Tsujimoto Y. Regulation of apoptosis by the Bcl-2 family of proteins. In: Jacobson MD, McCarthy N, editors. *Apoptosis: the molecular biology of programmed cell death*. Oxford: Oxford University Press; 2002. p. 136-60.
12. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001;26:390-7.
13. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002;2:594-604.
14. Bortner CD, Cidlowski JA. Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:259-81.
15. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003;15:983-92.
16. Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *J Biol Chem* 2001;276:47379-86.
17. Jacobson MD, Bergeron L. Cell death in the nervous system. In: Jacobson MD, McCarthy N, editors. *Apoptosis: the molecular biology of programmed cell death*. Oxford: Oxford University Press; 2002. p. 278-300.
18. Huang P, Oliff A. Signaling pathways in apoptosis as potential targets for cancer therapy. *Trends Cell Biol* 2001;11:343-8.
19. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000;407:810-6.
20. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:277-88.
21. Tentori L, Portarena I, Graziani G. Potential clinical applications of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Pharmacol Res* 2002;45:73-85.
22. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000;407:802-9.
23. Gervais FG, Singaraja R, Xanthoudakis S, Gutekunst CA, Leavitt BR, Metzler M, et al. Recruitment and activation of caspase-8 by the Huntingtin-interacting protein Hip-1 and a novel partner Hippi. *Nat Cell Biol* 2002;4:95-105.
24. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000;407:789-95.
25. Gill C, Mestrlil R, Samali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease-a novel therapeutic target? *FASEB J* 2002;16:135-46.
26. Pope RM. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2002;2:527-35.