

Otofaji Analiz Yöntemleri ve Uygulama Aşamaları

Devrim GÖZÜAÇIK

Sabancı Üniversitesi, Biyolojik Bilimler ve Biyomühendislik Programı, İstanbul.

dgozuacik@sabanciuniv.edu

TEMEL BİLGİ

Otofaji

Hücre sel anlamda stres, hücrelerin işleyişini etkilemekte, doğal dengelerini bozmakta ve hatta ölümlerine neden olabilmektedir. Hücre düzeyinde maruz kalınan stres, doku ve organların işlevlerini aksatmalarına neden olabilmekte ve organizma genelinde kendisini hastalık olarak göstermektedir. Stres iç ve dış faktörlere bağlı olarak gelişebilir. Kronik hastalıkların metabolizma üzerinde etkileri, hormonal değişiklikler, biyokimyasal değişiklikler ya da uzun süreli enflamasyon iç faktörlere bağlı stresin nedenleri arasındadır. Besin, büyüme faktörü ya da oksijen eksikliği (iskemi), toksik maddeler, bazı ilaç ve kimyasallara maruz kalma, ultraviyole ışınları, radyasyon gibi ışımalar hücre sel strese yol açabilen dış faktörler olarak sayılabilir. Ayrıca bazı kalıtsal hastalıklar (örneğin, kistik fibroz, alfa1-antitripsin eksikliği vb) ya da kalıtsal komponenti olan hastalıklar (örneğin, Alzheimer ya da Parkinson hastalığı), hücre içinde ve dışında toksik etkiler gösteren anormal proteinlerin birikimine neden olarak hücre sel strese yol açabilirler. Stresin nedenine göre farklı hücre sel yollarının aktive olabilmesine karşın, yukarıda bahsedilenler dahil pek çok stres faktörüne karşı hücrelerin verdiği en temel iki yanıt otofaji ve stresin dozuna göre programlı hücre ölümüdür. Otofajik hücre ölümüne stres dışında, doku ve organ gelişimi sırasında da rastlamak mümkündür.

Klasik olarak hücre ölümü apoptoz (programlı) ve nekroz (programsız) olarak iki sınıfa ayrılmıştı. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar, apoptoz dışı programlı hücre ölüm yolları da bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Hatta "programlı nekroz" adı verilen hücre ölüm tiplerinin de bulunduğu önerilmiştir. Çoğunlukla bir stres yanıtı ve

hayatta kalma mekanizması olarak işleyen otofajinin bile, özellikle apoptozun mümkün olmadığı durumlarda “otofajik hücre ölümü” adı verilen bir programlı hücre ölüm mekanizmasına dönüştüğü gözlenmiştir (Gozuacik D, 2007, Öz-Arslan D, 2011).

Otofajik hücre ölümü

Otofajinin hücre ölümü sırasında da aktive olduğu uzun yıllardır bilinmektedir (Bkz. Gozuacik D, 2004). Buna karşın, apoptoz konusundaki çalışmaların gölgesinde kalması nedeniyle, otofaji ve hücre ölümü arasındaki bağ son otuz yıldır göz ardı edilmiştir. Otofajiyi kontrol eden proteinlerin son döneme kadar bilinmemesi ve otofaji çalışmalarının çoğunlukla elektron mikroskopu kullanılarak yapılmak zorunda olması gibi teknik zorluklar da bu konuda yapılan çalışmaların moleküler bir düzeye inmesini engellemiştir. Üstüne üstlük, otofajinin bir stres yanıtı olarak hücrenin hayatta kalmasına katkı sağladığının bulunması, birçok biliminsanın gözünde otofajinin bir hücre ölümü mekanizması olarak da çalışabileceği fikrini zayıflatmıştır. Son birkaç yıldır gen nakavt ve RNA baskılama (RNA interference, RNAi) gibi modern genetik yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalar otofajik hücre ölümünün varlığını açık bir şekilde ortaya koymuştur (Gozuacik D, 2007; Gozuacik D, 2008, Öz-Arslan D, 2011).

Apoptoz hücrenin yuvarlaklaşması ve bağlı olduğu zemin veya dokudan ayrılması, kromatinin yoğunlaşması (chromatin condensation) ve hücre çekirdek iç çeperinde birikmesi ve hücrenin apoptotik cisimcikler (apoptotic bodies) adı verilen küçük parçalara ayrılmasıyla tanımlanan morfolojik bir olaydır. Apoptoz sonunda apoptotik cisimcikler komşu hücreler veya profesyonel fagositler tarafından yenilerek yok edilirler. Otofajik hücre ölümü ise daha farklı morfolojik özelliklerle seyredir. Önce hücre içinde çift ve çok zarlı otofajik veziküller belirmeye başlar. Bu veziküller sitoplazma parçaları yanında mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organelleri içerebilirler. Buna paralel olarak lizozom sayısı ve aktivitesi de artar. Hücre apoptozdakine benzer bir şekilde yuvarlaklaşır, fakat kromatin yoğunlaşması yok denecek kadar azdır. Hücre apoptotik cisimciklere ayrılmak yerine, kendini ve organellerini içten içe yiyerek küçülür. Hücrenin fagositozu ya olmaz ya da apoptoza göre çok geç gerçekleşir. Moleküler düzeyde, apoptozda kaspaz denilen ve hücrenin yıkımında rol oynayan enzimlerin aktivasyonu kural iken, otofajik hücre ölümü

kaspazlara bağlı değildir. Apoptozda DNA merdivenleşmesi (DNA laddering) denilen ve DNA'nın 200 bp civarındaki küçük paracıklara ayrılması gözlenirken, otofajik hücre ölümünde DNA çok daha büyük paracıklar halindedir. Yani otofajik hücre ölümü, apoptozdan farklı bir programlı hücre ölüm mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır (Apoptoz - otofajik hücre ölümü ayrıntılı karşılaştırması için, Gozuacik D, 2004'deki Tablo 1'e bakınız).

Otofajinin hücreyi nasıl lme götürdüğü konusu tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber, sitoplazma, hayati organeller ve hayatta kalmayı sağlayıcı bazı proteinlerin otofaji tarafından yıkımının bunda rol oynadığı düşünülmektedir. Örneğin, uzun süre ve güçlü bir şekilde aktive olan otofaji, mitokondri sayısını ve hatta sitoplazma miktarını azaltmaktadır. Katalaz adlı anti-oksidant enzimin otofaji tarafından selektif olarak paralanmasının hücreyi reaktif oksijen türlerine (ROS) hassaslaştırarak lme sürüklediği rapor edilmiştir. ROS'un otofajik hücre ölümüne katkıda bulunduğuna dair yayınlar vardır. RIP/JNK sinyal yolunun, seramidin, p19ARF'in bir alternatif şeklinin, DAPk ve Bcl-2 protein ailelerinin otofajiye bağlı hücre ölümünü aktive ettikleri bildirilmiştir (Gozuacik D, 2006, Gozuacik D, 2007, z-Arslan D, 2011).

Otofajik hücre ölüm mekanizmalarının ayrıntıları ve apoptozla bağlantısı, kurs sırasında tartışılacaktır.

YÖNTEMLERİN TEMEL PRENSİPLERİ

Hücre lmnn otofajiye bağlı olduğunun kanıtlanması

Hücre lm bağlantılı çalışmalarda, otofajinin aşağıda açıklanan yöntemler kullanılarak belgelenmesinden önce yapılması gereken en önemli n çalışma, hücre ölümünün otofajiye bağlı olduğunun gösterilmesidir. Yani hücre ölümü sırasında otofajinin aktive olduğunu göstermek yeterli değildir. Otofaji bloke edildiğinde hücre ölümünde bir azalma olduğunun ortaya konulması, ölümün otofajiye bağlı olduğunun iddia edilebilmesi için zaruridir (rnek alışma. Gozuacik D, 2008).

Öncelikle hücre ölümünün kaspazlara bağlı olmadığını ortaya konulması gerekmektedir. Bu amaçla z-VAD-fmk gibi birçok kaspazı birden etkisizleştiren moleküller yanında, kaspaz ya da apoptoz proteinleri (örn. Bax/Bak) nakavt hücreler ve/veya önemli kaspazlara karşı geliştirilmiş siRNA/shRNA'lar kullanılmalıdır.

Otofajik veziküllerin birikimi ile seyreden hücre ölümünün, apoptozun baskılandığı durumlarda dahi devam etmesi, ölümün otofajik hücre ölümü olabileceğine işaret eder. Fakat bu da yeterli değildir. Ölümün otofajinin baskılanması sonrasında yavaşladığının ya da durduğunun gösterilmesi gerekmektedir. Otofajiyi baskılayan çeşitli kimyasallar vardır. Öncelikle 3-metil adenin (3MA) veya Wortmannin kullanılabilir. Ama genetik baskılama daha sağlam bir kanıt olacaktır. Kilit otofaji proteinlerinden Atg5, Atg7 ya da Beclin 1'e karşı geliştirilmiş siRNA/shRNA'ler kullanılmalıdır. Ayrıca, otofaji proteinlerinden birisinin nakavt edildiği hücrelerle yapılacak deneyler, çalışmayı güçlendirecektir.

Sonuç olarak, özellikle kaspaz aktivasyonu olmayan ya da kaspazların baskılandığı, apoptozun gerçekleşmediği durumlarda, otofajik vezikül ve otolizozom birikimiyle ilerleyen ve otofajinin kimyasal ve genetik yöntemlerle baskılanması sonrasında yavaşlayan ya da önlenen hücre ölümü, "otofajik hücre ölümü" olarak adlandırılabilir. Moleküler biyoloji camiasında, otofajinin bir stres ve hayatta kalma yanıtı olarak da görev yapmasını, programlı hücre ölümüyle bağdaştıramayan biliminsanları mevcuttur. Bu nedenle, hücre ölümü alanında gönderilecek yayınların, bahsettiğimiz otofajik hücre ölümü kriterlerini karşılamaları, kontrollü, çok tekrarlı olmaları ve en az iki bağımsız moleküler teknik yanında elektron mikroskopisi ile de desteklenmeleri şarttır.

Otofajinin aktive olduğunun deneysel olarak gösterilmesi

GFP-LC3 noktasal yerleşimi

GFP-LC3, MAP1LC3 (Microtubule-associated protein 1 light chain 3, kısaca LC3) ya da mayada Atg8 adı verilen ve otofajik vezikül zar uzamasında rol oynayan LC3 proteininin yeşil floresan proteine kaynaşmış halidir. Floresan mikroskopu altında, GFP-LC3, otofaji uyarımı sonrası hücre içi yaygın (diffuse) yayılımdan noktasal bir

yerleşime geçmektedir. Noktasal yerleşim, hücre içindeki otofajik veziküllerin işaretlenmesinin bir sonucudur.

Yöntemin anlamlı olması için, mikroskop altında her deney koşulu için en az 150 hücrenin sayılması gerekmektedir. Kontrol ve uyarımsız koşulda hücre başına düşen nokta sayısına göre (genelde 5 ila 20 nokta/hücre), çalışılan sistemde bir otofaji eşiği belirlenmeli ve her hücrenin otofaji aktivasyon durumu bu eşiğe göre belirlenmelidir (Örn. "10'dan fazla nokta içeren hücreler otofaji pozitif, daha az içerenler ise negatiftir" şeklinde.)

Endojen LC3 proteinindeki jel kaymasının incelenmesi

Bütün hücrelerin kendi, endojen Atg8/LC3 protein ifadesi mevcuttur. Otofaji aktivasyonu sonrasında, LC3 proteininin, bir yağ molekülü olan fosfatidiletanolamine kovalent olarak bağlanması, yağ moleküllerinin otofajik zarlara taşınması ve zar uzamasına neden olması nedeniyle, otofajik uyarım sonrası gözlenen bir olaydır. Yağ molekülüne bağlanmanın, proteinin genel yükünde bir değişiklik yaratması nedeniyle, LC3'ün moleküler ağırlığı otofaji aktivasyonu sırasında değişmekte ve SDS-PAGE protein jellerinde belirgin bir kayma görülmektedir. Serbest LC3, LC3-I olarak adlandırılmakta ve 18kDa civarında gözlenmektedir. Yağ molekülüne konjuge olmuş ve otofajik veziküllere bağlı LC3 ise LC3-II olarak adlandırılmaktadır ve 16 kDa civarında moleküler ağırlığa sahiptir. Otofaji uyarımı sonrası LC3 moleküler ağırlığının değişmesi, LC3-I'in LC3-II'ye dönüşmesi, bu olayın son yıllarda genel kabul gören bir otofaji belirteci olarak kullanılmasına neden olmuştur (LC3'ün jelde kayması, gel shift). Sonuçlar, immüno blot bant yoğunluğunun ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>) ya da benzer bir programla ölçülmesi sonrası, LC3-I / LC3-II oranı ya da LC3-II / ACTIN oranı olarak ifade edilmelidir.

p62 proteini yıkım testi

p62 (p62/A170/SQSTM1) proteini özellikle bazı übikitinlenmiş proteinlere, protein yumaklarına ve hücre içi parazitlere bağlanan ve onların otofajik zarlar tarafından sarılmalarına neden olan sitoplazmik bir otofaji reseptörüdür. P62, hücre içindeki bu anormal yapıları tanıyarak onların otofaji tarafından yıkımlarına yol açar. P62

proteininin kendisi de, otofagozoma taşıdığı proteinlerle birlikte lizozomda yıkılmaktadır. Son yıllarda otofaji bilimsel topluluğu, p62 proteininin lizozomda yıkımının immüno blotlar kullanılarak takibinin de moleküler bir otofaji belirteci olarak kullanılabileceği konusunda hemfikirdir.

Bu yöntemin lizozom proteaz inhibitörleri varlığı ya da yokluğunda kullanılması, otofajik vezikül-lizozom kaynaşma (füzyon) bozukluklarının ayırımına varılmasını da sağlamaktadır.

GFP-RFP-LC3 deneyleri

Otofajik veziküllerin lizozomlarla birleşme oranlarını incelemek amacıyla kullanılan başka bir yöntem olan GFP-RFP-LC3 analizleri, GFP proteininin lizozomların asit pH'ında sönmesi temeline dayanmaktadır. Bu yöntemde, LC3 proteini hem GFP (yeşil), hem de RFP (kırmızı) floresan proteinlerine kaynaşmış olarak ifade edilmektedir. Floresan mikroskobunda yeşil kanaldan bakıldığında yalnızca otofajik veziküller sayılabilmekte, kırmızı kanal ise hem otofajik vezikülleri, hem de otolizozomları (lizozomla birleşmiş otofagozom) göstermektedir. Otofagozom-lizozom füzyon anormallikleri durumunda, yeşil / (kırmızı-yeşil) nokta oranları değişmektedir. Bu yöntem her deney koşulu için en az 40 hücre içindeki, 200 kadar noktanın floresan mikroskobu altında gözle sayılmasını gerektirdiği için çok zahmetli bir yöntemdir. Fakat elde edilen sonuçlar, her otofajik vezikülün otolizozomlardan farklı olarak görüntülenmesini sağladığı için değerlidir.

Aktif lizozom boyamaları

Otofajik veziküllerin hücre içi yıkım yerleri lizozomlar olduğu için, otofajinin aktive olduğu koşullarda otolizozomal etkinliğin uyarılması nedeniyle, hücre içi toplam lizozom etkinliği artmaktadır. Lizozomal belirteçler olarak lysotracker ve akridin portakal rengi (acridin orange) kullanılabilir. Bu boyalar, lizozomları pH'nin asit olduğu durumlarda boyamakta ve aktif lizozomları belirlemekte kullanılmaktadır. Sonuçlar floresan mikroskobu altında değerlendirilir. Ayrıca acridin orange'ın, otolizozom birikiminin akım sitometrisi (FACScan) ile analizinde de kullanılabileceği önerilmiştir.

LC3 ve p62 proteinlerinin noktasal yerleşiminin immünofloresans ya da immünohistokimya ile gösterilmesi

Özellikle dokular kullanılarak yapılacak çalışmalarda, otofaji belirteci olan LC3 ve p62 proteinlerinin, yaygın sitoplazmik yerleşim yerine hücre içi noktasal yerleşimde bulunduğu immünofloresans ya da immünohistokimya yöntemleriyle gösterilmesi, otofaji aktivasyonuna işaret eder. LC3 protein düzeylerinde otofaji aktivasyonuna bağlı olarak görülebilecek artış veya azalmalar anlamlı olabilir, fakat otofaji aktivasyonunu tek başına kanıtlamaz. Ayrıca, p62 protein birikimi, araştırmacıyı çalışılan sistemde bir otofaji bozukluğu bulunduğu olasılığına yönlendirmelidir.

Transmisyon elektron mikroskopisi analizleri

Yukarıda sayılan yöntemler, otofajinin nitelik ve nicelik olarak tanımlanmasında kullanılır. Yine de ultra yapısal (ultrastructural) olarak otofajik veziküllerin ve içlerindeki kargonun transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) yöntemi ile tanımlanması, otofaji analizlerinin olmazsa olmazlarındandır. En azından seçilmiş deney koşullarında, ya da birkaç örnekte TEM incelemeleri yapılması beklenmektedir. İdeal koşullarda, en az 30-40 hücre içindeki otofajik vezikül ve otolizozom sayılarının belirlenmesi, ve hatta hücre yüzey alanına göre alanlarının ortaya konulması çalışmanın güvenilirliğini artıracaktır. Bunun mümkün olmadığı durumlarda, elektron mikroskopisi incelemelerini gerçekleştiren kişinin gözle de olsa yeterli sayıda hücrede sayım yapması, otofajik vezikül ve otolizozom sayısında artış konusunda objektif bir şekilde ikna olması gerekir. Otofajik aktivasyondan tekrarlanabilen TEM analizleriyle ikna olunduktan sonra deneyi belgelemek amaçlı çekilecek fotoğraflarda, çift ya da çok zarlı yapılar içinde mitokondri gibi organellerin de gösterilmesi çalışmanın inandırıcılığını artıracaktır.

Otofaji protein ve mRNA düzeyleri

Otofaji ile bağlantılı proteinlerin, özellikle adları Atg kısaltmasıyla başlayan proteinlerin ve bunların mRNA'larının düzeylerinin immünoyoblotlama, yarı-nicel PCR (semi-quantitative PCR) ya da qPCR (real-time quantitative PCR), immünofloresans, immünohistokimya ya da in situ hibridizasyon veya benzeri tekniklerle belirlenmesi

mümkündür. Fakat yapılacak bu çalışmalar, incelenen koşullarda otofaji aktivasyonu hakkında bilgi vermez. Otofajinin araştırılan konuya katkısını ortaya koymaz. Yalnızca protein ve/veya mRNA düzeylerinde bir değişiklik görülmesi yetmez, ancak bunun incelenen koşulla bağlı olması durumunda, otofajik aktivite ile korelasyon göstermesi anlamlı olabilir. Yine de sonuçların yukarıda açıklanan tekniklerle desteklenmesi gerekir.

Yukarıda açıklanan tekniklerin çoğunun kullanıldığı örnek araştırma makalelerimiz kaynaklar kısmında mevcuttur (Gozuacik D, 2008, Korkmaz G, 2011).

Bitki moleküler biyolojisi analizleri

Otofaji bitkilerde de görülmektedir. Özellikle enfeksiyon yanıtlarında, gelişimde, stres yanıtları ve besin depolamada önem taşımaktadır. Bitkilerde otofajinin hücre ölümü ile bağlantısı gelişmekte olan ve önü açık bir alandır. Yukarıda memeli hücreleri için kullanılan yöntemlerin bir kısmı bitki çalışmalarına da adapte edilebilir. Bitkilerde otofaji analiz teknikleri, yakın geçmişte yayınlanmış olan makalemizde ayrıntılı bir şekilde özetlenmiştir (Mitou G, 2009).

KULLANILACAK ARAÇ VE GEREÇLER

LC3 plazmidleri. Addgene (<http://www.addgene.org>) plazmid paylaşım sitesinden, MTA (malzeme transfer sözleşmesi) belgesi imzalanarak ve yalnızca posta ücreti karşılığında elde edilebilir. GFP-LC3 (Plasmid 21073: pEGFP-LC3) ve GFP-RFP-LC3 (Plasmid 21074: ptfLC3).

Lysotracker. Invitrogen, L7528

Acridine orange. Invitrogen, A3568

% 3.7'lik PFA solüsyonu. Toz haldeki paraformaldehid, son hacimden daha az miktarda su içinde çözülür (örn. 100 ml için 3.7 gr hazırlanacaksa, 50-60 ml içinde). (Toksik! Tartarken maske takınız, kimyasal kabin altında çalışınız). Manyetik balık

içeren beşerde 60 dereceye kadar ısıtılır. Solüsyon şeffaf bir görünüm alıncaya kadar damla damla konsantre NaOH eklenir. Berrak solüsyona 10x PBS'ten final 1x olacak şekilde eklenir. Ph 7.4 olacak şekilde ayarlanır. Buz üzerinde soğutulur.

3-Methyladenine (3-MA). Sigma, M9281

Wortmannin. Sigma W1628

E64d. Sigma, E8640

Pepstatin A. Sigma, P5318

Chloroquine diphosphate salt. Sigma, C6628

RIPA tamponu. 50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.25% Na-deoxycholate ve proteaz inhibitörleri, pH 7.4.

Anti-LC3 antikor (immünoiblottlama için). Sigma-Aldrich, L7543. 1/2000 seyreltme.

Anti-LC3 antikor (immünohistokimya için). Medical and Biological Laboratories, PM036

Anti-p62 antikor. BD Transduct Lab., 610832. 1/1000 seyreltme.

Anti-fare antikor. Jackson Immunoresearch laboratories, 115035003

Anti-tavşan antikor. Jackson Immunoresearch laboratories, 111035144

YÖNTEMLERİN UYGULAMA BASAMAKLARI

GFP-LC3 ve GFP-RFP-LC3 floresan analizleri

1) GFP-LC3 ve GFP-RFP-LC3 plazmidlerinin hücrelere transfeksiyonundan 24-48 saat sonra floresan mikroskobu altında analiz yapılması gerekmektedir.

2) Lameller üzerinde büyütülen hücreler, taze ve soğuk % 3.7'lik PFA solüsyonu ile 20 dk fikse edildikten sonra, 2-3 kez PBS ile yıkanır.

3) İstenirse hücre çekirdekleri, son PBS yıkamasına DAPI veya Hoechst boyaları eklenerek boyanabilir.

4) Lameller, 1x PBS içinde hazırlanmış %50 Gliserol solüsyonu ile lam üzerine monte edilir ve tırnak cilasıyla sabitlenir.

5) Değerlendirme tercihen aynı gün ya da zorunluluk durumunda -20 derecede saklayarak ve bir miktar sinyal ve nokta kaybı ile bir-iki gün içinde yapılabilir.

*Acridine orange ve lysotracker analizleri için hücrelerin kültürleri sırasında boyanmaları ve fikse edilmeden incelenmeleri tavsiye edilir.

LC3 ve p62 immüno blot analizleri

1) Hücre veya dokulardan protein özütleri, RIPA tamponunda hazırlanmaktadır.

2) Özütler 30-50 microgram/kuyucuk olacak şekilde %12'lik SDS-PAGE poliakrilamid jellere yüklenir ve doğru akım altında koşturulur. LC3-II'nin jelden çabuk çıkmaması için %15'lik jel de kullanılabilir.

3) Takiben jeller nitroselülöz kağıt zarlara (membran) sulu transfer yöntemi kullanılarak aktarılır. Transfer, LC3 ve p62 jel analizleri için 1 saat, diğer analizler için 1,5 saat yapılmaktadır.

4) Kağıt (nitroselülöz) zarlar, %5 yağsız süt içeren PBS-Tween (PBS-T) tamponlar içinde özgün olmayan bağlanmalara karşı oda sıcaklığında (RT) 1 saat (ya da soğuk odada gece boyunca) doyurulur.

5) Zarlar birincil antikorlarla RT 1 saat (ya da soğuk odada gece boyunca) muamele edilirler. Birincil antikorlar %3 BSA (Dana serum albümini, Fraksiyon IV) içeren PBS tamponu içinde birçok kez kullanılabilir. Farklı antikorlar için seyreltme oranları yukarıda verilmiştir.

6) 5'er dakikadan üç kez PBS-T yıkama.

7) Birincil antikorun geliştirildiği hayvana bağlı olarak, antikorların hayvan cinsine özgü ve değişmeyen kısımlarına (Fc) karşı anti-fare, anti-tavşan vb ikincil antikorları ile 1: 10.000 ya da 1: 20.000 seyreltme ile, RT'de 1 saat muamele edilirler.

8) Ardından yine 3 x 5 dk yıkama yapılır.

9) İkincil antikorlar HRP (Horse reddish peroksidaz) enzimine bağlıdır ve zarlar ışık veren kimyasal reaksiyon (chemoluminescence) solüsyonu ECL ile 5 dk muamele edildikten sonra, sinyal X ışını filimlerine kaydedilir.

Parafine gömülü kesitler için LC3 immünohistokimya boyaması

- 1) Polilizin kaplı lam üzerine 3 mikron kalınlığında alınan kesitler 56 derecede 1 gece bekletilir.
- 2) Parafini uzaklaştırmak için kesitler her biri 5 er dakika olmak üzere 3 defa ksilen (xylene) de bekletilir.
- 3) Kesitler her biri 5 er dakika olmak üzere 3 defa etil alkolde bekletilir.
- 4) Saf su ile yıkanır.
- 5) Antijen kurtarması (retrival) için kesitler %10 Sitrat tampon solüsyonunda RHS cihazında 98 derecede 20 dakika kaynatılır.
- 6) Kesitler saf su ile yıkanır.
- 7) Doku kalemi ile doku etrafı işaretlenir ve PBS solüsyonuna alınıp 2 defa yıkanır.
- 8) Kesit üzerine %3 H2O2 damlatılıp 10 dakika bekletilir.
- 9) PBS solüsyonuna alınıp 2 defa yıkanır.
- 10) Kesit üzerine Super blok solüsyonu(Syntek laboratories, SHP 125) damlatılıp 5 dakika bekletilir. 5 dakikayı geçirmemek gerekir. Solüsyon YIKANMADAN sadece peçeteye dökerek uzaklaştırılır.
- 11) Birincil antikor LC-3 (Medical and Biological Laboratories, PM036) (polyclonal antikor) 20 mM HEPES, 1% BSA, 135 mM NaCl içeren solüsyon ile seyreltilerek doku üzerine damlatılır ve 1 saat bekletilir.
- 12) Kesitler PBS solüsyonu ile 3 defa yıkanır.
- 13) Kesitler Polyvalent biotinylated ikincil antikor ile 10 dakika inkübe edilir.
- 14) 3 defa PBS ile yıkamadan sonra Streptavidin/HRP bağlanmış antikor ile 10 dakika bekletilir.
- 15) 3 defa PBS ile yıkamadan sonra DAB Chromogen kesit uzerine damlatılıp, kesit kahverengini alana kadar (5 dakika) beklenir.
- 16) 3 defa saf su ile yıkanır.
- 17) Karşıt boyama için Hematosilen de 1 dakika bekletilir ve ilk once su ile 4-5 defa yıkanır. Sonra %96 ethanol ile yıkanıp kurutulur.
- 18) Kuruyan kesitler uzerine kapatıcı solüsyon (mounting solution) damlatılıp lamel ile kapatılır.

OLASI PROBLEMLER VE ÇÖZÜM ÖNERİLERİ

Öncelikle belirtmek gerekir ki, her sonucun en az 3 bağımsız deney yapılarak tekrar edilmesi, sonuçların anlamlı olduğunun istatistiksel testler ve p değerleri ile gösterilmesi önem taşımakta ve orta vadede zaman kaybını önlemektedir. Bahsedilen bağımsız deneyler, başından sonuna kadar birbirlerinden ayrı olarak hazırlanmış, mümkünse ayrı günlerde yapılmış deneylerdir (aynı deneydeki duplikat-triplikat noktalar değil). Bu yaklaşım, sonuçların güvenilirliğini sağlamakta, yanlış sonuçlar üzerine hipotez inşa edilmesinin ve büyük olasılıkla sarpa saracak takip deneyleri yapılmasının önünü kesmektedir. Çelişkili sonuç veren deneyler, genelde deney sisteminde ve koşullarında daha fazla optimizasyon ve düzelme yapılması, deney kalitesinin artırılması ya da son aşamada bir başka uzmanın fikrinin alınması gerektiğine işaret etmektedir.

GFP-LC3 noktasal yerleşimi

GFP-LC3 transgenik fareler mevcut olsa da, yöntem genelde kültür ortamındaki hücrelerin transfeksiyonu yoluyla kullanılmaktadır. Test ettiğimiz birçok hücre çeşidinde ve deneysel koşulda, GFP-LC3 noktasal yerleşimi yöntemi en hızlı ve açık sonuç veren yöntem oldu. Sık rastlanan en önemli sorun, bazı hücre tiplerindeki bazal otofaji düzey yüksekliğinin (örn. HeLa hücreleri), sayımları zorlaştırmasıdır. Biz daha çok bazal otofaji düzeyleri düşük olan 293T, MCF7 ve Huh7 hücrelerini tercih ediyoruz. Ayrıca, örneğin hücre içi kalsiyum düzeyinin yükselmesi ya da çok fazla ifade sonrası GFP'ye bağlı noktasal birikiminin, otoajiden bağımsız olan GFP-LC3 noktasal yerleşimine neden olduğu bazı yazarlar tarafından gözlenmiştir. Bu nedenle yöntemin diğer otofaji teknikleriyle birlikte kullanılması şarttır.

Endojen LC3 proteindeki jel kaymasının incelenmesi

Teknik birçok kez yorumu zor olan ve tekrar edilemeyen sonuçlar verebilir. Bazı deney sistemlerinde LC3-I'nin LC-II'ye dönüşümü açık olarak görülmekle birlikte, başka sistemlerde LC-I ve LC-II protein düzeylerinde (çoğunlukla otofaji sırasında tüketime bağlı olan) bir azalma gözlenebilmektedir. Testin anlamlı olabilmesi için kinetik nalizler yapılmalıdır ve mutlaka lizozom aktivite inhibitörleri E64d/Pepsatin A ya da Chloroquine içeren kontroller alınması gerekmektedir. Böylece LC3 kaymasının otofaji uyarımı sonucu mu yoksa otofajik vezikül-lizozom kaynaşmasının

engellenmesi sonucu mu ortaya çıktığı belirlenecektir. Ayrıca taze, hiç dondurulmamış protein ekstraları kullanılması, tekrarlanabilirlik oranlarını yükseltmektedir.

p62 proteini yıkım testi

Bu test sırasında uyarının E64d/Pepsatin A ya da Chloroquine ile birlikte kullanıldığı deney noktaları kullanılması, otofajik yıkımı alternatif protein yıkım mekanizmalarından (örn. Ubikitin-proteazom sistemi) ayırmak için gerekmektedir. İnetik analizler burada da önemlidir.

GFP-RFP-LC3 deneyleri

GFP-RFP-LC3 deneylerinde genelde GFP-LC3 tekniğiyle sayılandan çok daha az otofajik vezikül görülmekte ama otolizozom sayısı daha belirgin olarak öne çıkmaktadır. Teknik daha zahmetli olduğu için, otofajik vezikül sayısındaki artışın, otofajik yıkımdaki artışla bağlantılı olduğunun gösterilmesi için destekleyici teknik olarak kullanılmalıdır. Yanlış analizlerin önlenmesi için önemli bir nokta da, floresan mikroskopunda kullanılan filtre eşiklerinin (cut-off) kırmızının yeşile, yeşilin kırmızıya akmasını (bleeding) engelleyecek şekilde olmasıdır.

Aktif lizozom boyamaları

Lizozom boyalarının bazal lizozom aktiviteleri yüksek olan hücre-doku tiplerinde kullanımları zor olmaktadır. Kontrol düzeylerindeki yüksek aktivite, deney koşullarındaki aktiviteyi maskeleyebilir. Bazı yazarlar özellikle acridin orange boyasının FACS analizi ile kullanılabileceğini önermişlerse de biz bu tekniği denediğimizde, kendi koşullarımızda otofajik aktivasyonu belirgin olarak göremedik. Konuyla ilgili olarak, Monodensyl cadaverin (MDC) adlı bir floresan boyanın otofajik vezikülleri boyadığı bazı yayınlarda önerilmişti. Otofaji topluluğu bu boyanın otofajik aktivite değil genel lizozom aktivitesini gösterdiği konusunda hemfikirdir.

Transmisyon elektron mikroskopisi analizleri

Otofajik vezikül ve otolizozomların TEM altında morfolojik olarak tanımlanmasıyla ilgili zorluklar olabilir. Otofajik veziküller çift-ikili zarlı (double lipid bilayer) yapılardır. İki'den fazla, hatta soğan zarına benzeyen yapılar da görülebilir. İçleri boş değildir. Elektron yoğun (electron-dense) olmalıdırlar. Sitoplazma yoğunluğunda materyel ve/veya bazı organeller (örn. mitokondri) içerirler. Sabitleme kalitesine bağlı olarak bazen çift zarı oluşturan iç ve dış zarların ayrılması ve genelde yarım ay benzeri elektrondan fakir (electron-lucent) boşlukların oluşması görülebilir. Bu yapıların da merkezlerinde elektron yoğun, sitoplazma yoğunluğunda materyel bulunmalıdır. Ayrıca, hücre çekirdeğinin ya da hücre zarının bazı kıvrımları, dejenere olmuş, krista yapıları bozulmuş mitondriler yanlışlıkla otofajik vezikül olarak değerlendirilmemelidir.

KAYNAKLAR

- 1) Gozuacik D and Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. (2004) *Oncogene* 23(16):2891-906.
- 2) Gozuacik D and Kimchi A. (2006) DAPk protein family and cancer. *Autophagy* 2(2): 74-79.
- 3) Gozuacik D and Kimchi A. (2007) Autophagy and cell death. *Current Topic in Developmental Biology* 78:217-45.
- 4) Gozuacik D, Bialik S, Raveh T, Mitou G, Shohat G, Sabanay H, Mizushima N, Yoshimori T, Kimchi A. (2008) DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death and Differentiation* 15: 1875-86.
- 5) Mitou G, Budak H, and Gozuacik D. (2009) Techniques to Study Autophagy in Plants. *International Journal of Plant Genomics*, vol. 2009, Article ID 451357, 14 pages, 2009. doi:10.1155/2009/451357.

6) Öz-Arslan D, Korkmaz G, Gözüaçık D. (2011) Otofaji: bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, Kasım sayısı. Yayında.

7) Korkmaz G, le Sage C, Agami R, Gozuacik D. miR-376b controls starvation and mTOR inhibition-related autophagy by targeting ATG4C and BECN1. Autophagy. Yayında.