

# Apoptosis

(주)다인바이오

- Membrane Alterations
- DNA Fragmentation

## 1. Membrane Alterations

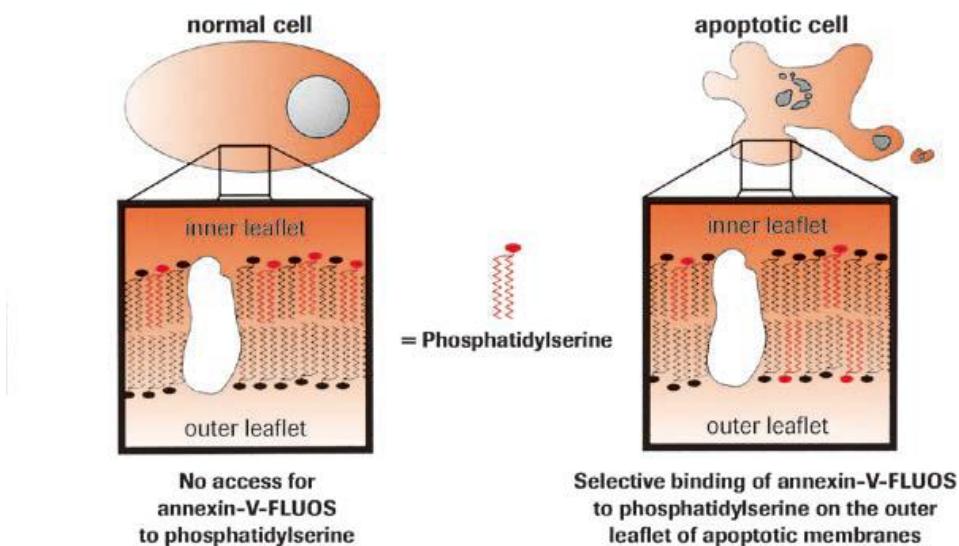
Necrosis와는 다르게 Apoptosis는 염증 없이 일어난다. Apoptosis의 마지막 단계에서, 대식세포와 식세포들이 apoptotic body를 에워싼다. 그러므로 apoptotic 세포 내용물은 유출이나, 염증반응 없이 제거된다.

Apoptosis가 일어나는 동안 세포표면에서 많은 변화가 나타나는데, 그 중 하나가 식세포에 의해 “바로 제거”되는 것이다.

정상세포는 음이온성 인지질을 포함하는 내막과 대부분이 중성 인지질인 외막으로 비대칭으로 분포되어 있다. Apoptosis Cell에서는 외막에 있는 Phosphatidylserine(PS)의 양이 증가하게 되고, PS가 액체 주변으로 노출되게 된다.

칼슘 의존적으로 인지질에 붙는 단백질인 Annexin-V는 PS와 높은 친화성을 보인다. Annexin-V는 살아있는 정상세포에는 붙지 않고, apoptosis cell 표면에 노출된 PS에 붙는다. 그러므로 Annexin-V는 apoptosis 세포를 추적하기에 적합하며, 다양한 기기들이 Annexin-V를 이용해 PS 전좌(translocation)의 추적을 제공한다.

## 2. Apoptosis 가 일어나는 동안 표면에서 일어나는 변화 관찰



- Apoptosis 가 일어나는 동안 세포막의 중성인지질(검정색)과 음이온성 인지질인 PS(빨간색)의 변화가 나타난다. PS는 Apoptosis 세포의 외막에서 볼 수 있고, 정상세포에서는 볼 수 없다. PS에 특이적으로 붙는 Annexin-V-FLUOS는 apoptosis 세포의 외막의 PS와 붙을 수 있으나, 정상세포의 PS와는 반응하지 않는다.

### 3. Membrane Alteration에서 사용 할 수 있는 assay

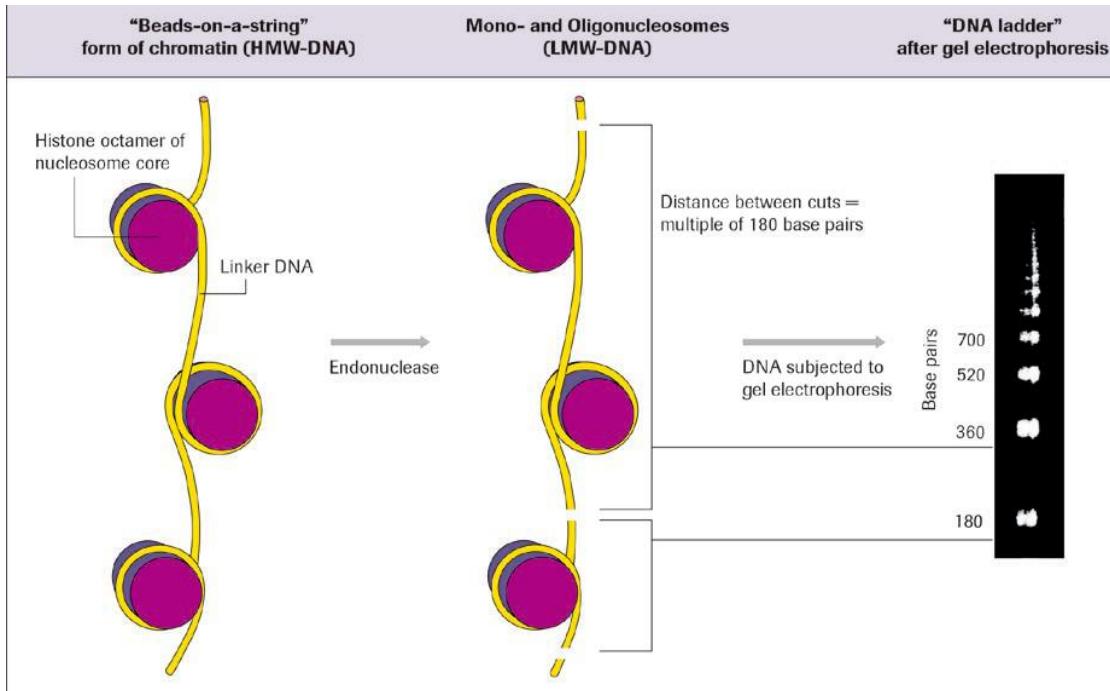
If you are studying	And you wish to detect	Using detection by	Then use
Membrane Alterations	Phosphatidylserine in the outer layer of the plasma membrane	Flow cytometry, Fluorescence microscopy, or light microscopy	Annexin-V-FLUOS Annexin-V-FLUOS Staining Kit Annexin-V-Alexa 568 Annexin-V-Biotin

### 4. DNA Fragmentation

Apoptosis의 생화학적 특징으로는 세포가 죽을 때 나타나는 genomic DNA Fragmentation가 있다. DNA Fragmentation(단편화)는 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>의존적인 nuclear endonuclease의 활성에 의해서 나타나는데, 이 효소는 선택적으로 nucleosomal(linker DNA) 사이의 DNA를 절단한다. DNA 절단으로, 180bp 크기 정도의 다양한 subunit을 포함하는 독특한 ladder 패턴을 전기영동으로 확인할 수 있다.

세포 내에서 DNA 절단을 수량화 하는 방사성, 비방사성적 방법은 꾸준히 발전되어 왔고, 일반적으로 증가하는 apoptosis 세포의 low molecular weight(LMW)나 줄어드는 apoptosis 세포의 high molecular weight(HMW)의 양의 추적을 기반으로 하고 있다. 이러한 방법으로 DNA 이중가닥(LMW DNA)이 잘리게 되면 원심분리기나 필터에 의해 매우 큰 크로모좀 DNA(HMW DNA)에서 쉽게 떨어지게 된다..

### 5. DNA fragmentation의 생화학적 반응과 “DNA ladder”의 변화



DNA 단편화를 수량화 하기 위해서 대부분의 방법은 DNA 표지 단계를 포함하고 있다. 세포 사멸 유도제나 이펙터 세포를 첨가하기 전에, 세포 동위 원소 또는 티미딘 유사체나 BrdU 중 하나와 함께 배양 한다. DNA 합성(복제)이 일어나면서, 변형된 genome DNA에 통합되게 된다. 표지 된 세포를 세포사멸 유도체 또는 이펙터 세포와 함께 배양 하면, 표지 된 DNA는 세포핵 속에 유지되어 있거나 단편화가 일어나고, 마지막으로, 각각의 DNA 유형(HMW, LMW)들이 정량화된다. 표지 된(labeled) DNA가 세포사멸유도 전에 끝나기 때문에, 이러한 표지는 “prelabeling”라고 한다. 세포집단의 prelabeling은, 다른 세포집단이 혼합된 경우에 표지 된 세포의 동작을 구체적으로 추적할 수 있게 해준다. 부분적으로 세포자살(apoptosis)에 의해서 세포독성(cell-mediated cytotoxicity(CMT))이 진행되기 때문에, DNA fragmentation assay는 CMT assay를 사용한다.

세포독성 연구에서 세포집단은 이펙터 세포(ex. CTL)등이 붙기 전에 표지화된다. 이어서, 표적세포막에 기공형성 때문에, 단편화된 LMW DNA는 세포질로부터 방출되어서 상층액으로 이동한다. 이펙터 세포의 독성은 손상된 표적세포로부터 방출된 표적의 정량화를 통해서 측정할 수 있다.

Genomic DNA의 prelabeling 대사는 DNA 합성이 요구되기 때문에, 세포 증식 또한 이러한 방법을 통해서 표지된다. 시험관에서 증식하지 않는 세포는 DNA를 복제하지 않고, 표지 된 뉴클레오티드를 포함하고 있지 않는다.

시험관에서 복제 되지 않는 세포에서 DNA fragmentation을 추적하기 위해, DNA는 전기영동에 의해서 고정되고 분석된다. 초기 apoptosis에서는 어떤 DNA도 상층액으로도 방출되지 않는다. 그러나, apoptosis 세포는 용해 되며, LMW DNA는 후기 apoptosis 과정의 상층액에서 발견된다. DNA 전기영동 분석과 분리가 외에 대체 방법으로는 면역학적 검출방법에 의해 LMW DNA를 추적하는 방법이 있다.

Apoptosis를 감지, 측정하는 많은 방법들은 장점과 단점이 각각 있는데, 이는 apoptosis 를 초래하는 세포 메커니즘이 복잡하기 때문이며, 대부분은 방법은 스스로 명확하게 apoptosis를 감지하기 어렵다. 세포사멸을 측정하기 위해서, 세포 형태와 같은 기준 등을 고려해야 하며, Apoptosis 세포사멸에 대한 형태학적 기준으로는, 작게 쪼개져서 apoptotic body에 의해 일어나는 핵막과 플라즈마 막의 blebbing과 함께 일어나는 염색체 응축 등이 있다. DNA 단편화가 이런 형태학적 특징을 동반할 때, apoptosis와 같은 세포 죽음을 정의하는 유용한 기준을 제공하게 된다.

## 6. DNA Fragmentation에 사용할 수 있는 assay

If you are studying	And you wish to detect	Using detection by	Then use
DNA Fragmentation	DNA fragments	Gel electrophoresis ELISA	Apoptotic DNA Ladder Kit Cell Death Detection ELISA PLUS Cell Death Detection ELISA

## 7. Reference

- Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation 4th edition, Roche
- Jae A. Collins, Cynthia A. Schandl, Kristy K. Young, Josef Vesely, and Mark C. Willingham  
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Medical University of South Carolina, Charleston,  
South Carolina, Major DNA Fragmentation Is a Late Event in Apoptosis, The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, Volume 45(7): 923 - 934, 1997