



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TUMOR NECROSIS FACTOR-RELATED APOPTOSIS-
INDUCING LIGAND (TRAIL) VE EPOKSOMİSİN'İN
OSTEOSARKOM HÜCRELERİNDE APOPTOZİS
ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ferhat HANİKOĞLU

Antalya, 2014



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TUMOR NECROSIS FACTOR-RELATED APOPTOSIS-
INDUCING LIGAND (TRAIL) VE EPOKSOMİSİN'İN
OSTEOSARKOM HÜCRELERİNDE APOPTOZİS
ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ferhat HANİKOĞLU

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Tomris ÖZBEN

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2014

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2011.04.0103.042 Proje No ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim sürecimde her aşamada büyük emeği ve desteği için, ayrıca tez çalışmamda kendisinin kurmuş olduğu Hücre Kültürü Laboratuvarı'nın imkanlarından yararlanmamı sağladığı için değerli danışman hocam sayın Prof.Dr. Tomris ÖZBEN'e,

Bölümümüzün değerli hocalarından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof.Dr. Gültekin YÜCEL'e,

Asistanlardan yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, değerli hocamız Prof.Dr. Sebahat ÖZDEM'e,

Hücre kültürü çalışmalarında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli asistan arkadaşlarım Ayşegül ÇÖRT ve Ertan KÜÇÜKSAYAN'a,

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki bütün değerli hocalarıma ve sevgili asistan arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde büyük emeği geçen rahmetli anneannem Türkan İNAL'a ve tüm aileme,

Sabırla, sevgiyle ve eşsiz bir enerjiyle bana destek olan sevgili eşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	iv
Şekiller Dizini	vi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Osteosarkom ve Epidemiyolojisi	2
2.2. Osteosarkom Etyolojisi	2
2.3. Osteosarkom Tedavisi	3
2.4. MG-63 ve Saos-2 Osteosarkom Hücreleri	4
2.5. Apoptozis	4
2.5.1. Hücre ölümünün iki şekli: Apoptozis ve nekrozis	5
2.5.2. Apoptozisin aşamaları	6
2.5.3. Apoptozisin önemi	6
2.5.4. Apoptozisde meydana gelen biyokimyasal ve morfolojik değişimler	7
2.5.5. Apoptozis yolları	8
2.5.6. Kaspazlar	12
2.5.7. Bcl-2 ailesi	16
2.6. TRAIL	19
2.7. Ubikitin-Proteazom Yolağı	20
2.8. Proteazom inhibitörleri ve Epoxomicin	22
3. MATERYAL VE METODLAR	24
3.1. Hücre Kültürü	24
3.1.1. Hücre dizileri (MG-63 ve Saos-2) ve kullanılan ilaçlar	24
3.1.2. Hücrelerin deneylere hazırlanması için gerekli çözeltiler	24
3.1.3. Hücrelerin çoğaltılması	25
3.1.4. Hücrelerin dondurulması	25
3.1.5. Hücrelerin çözülmesi	25

3.2. Çalışma Grupları ve Deneyler	26
3.3. Hücre Canlılık ve Sitotoksosite Deneyleri	27
3.3.1. MTT ile sitotoksosite ölçümleri	27
3.3.2. WST-8 ile sitotoksosite ölçümleri	28
3.4. Apoptozisin belirlenmesi ve kaspaz aktivite ölçümleri	29
3.4.1. TUNEL Deneyleri	29
3.4.2. Kaspaz Deneyleri	31
3.4.2.1. Hücre lizatlarında Kaspaz-3 aktivitesinin ölçümü	31
3.4.2.2. Hücre lizatlarında Kaspaz-8 aktivitesinin ölçümü	32
3.4.2.3. Hücre lizatlarında Kaspaz-9 aktivitesinin ölçümü	34
3.5. Bax Deney Yöntemi	35
3.6. BRADFORD Protein Tayin Yöntemi	37
3.7. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. Osteosarkom Hücrelerinde Epoxomicinin Sitotoksitesi	38
4.2. Osteosarkom Hücrelerinde TRAIL'in Sitotoksitesi	39
4.3. TRAIL ve Epoxomicinin Kombine Dozlarının Sitotoksitesi	41
4.4. MG-63 ve Saos-2 Hücrelerinin Morfolojik Görüntüleri	43
4.5. TUNEL Apoptotik İndeks Değeri	47
4.6. Kaspaz Bulguları	50
4.7. Pro-apoptotik Bax Proteini Düzeyleri	52
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR	60
7. ÖZET	62
8. ABSTRACT	64
9. KAYNAKLAR	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	Apoptozis İnhibe Edici Faktör
Apaf-1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
APO-1	Apoptozisi Tetikleyen Reseptör-1
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin Trifosfat
Bcl-2	B Hücreli Lenfoma-2
BH	Bcl-2 Homologu
BT	Bilgisayarlı Tomografi
CAD	Kaspaz İle Aktive Edilen DNAaz
CED	C Elegans kaspaz
DED	Ölüm Efektör Birimi
DIABLO	Düşük pI İle Direk Olarak IAP Bağlayan Protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DR	Ölüm Reseptörü
EMEM	Eagle's Minimal Essential Medium
FADD	Fas İlişkili Ölüm Birimi
FasL	FasR Ligandı
FasR	Ölüm Reseptörü
FBS	Fetal Sığır Serum
FDA	Amerikan Food and Drug Administration

IAP	Apoptozis İnhibitör Proteinleri
ICAD	Kaspaz İle Aktive Edilen DNAaz İnhibitör
Kaspaz	SisteinAspartat Spesifik Proteaz
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asid
MTT	[3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid]
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NGF	Sinir büyüme faktörü
OS	Osteosarkom
PBS	Fosfat Tuzu Tamponu
rhTRAIL	Recombinant Human TRAIL
Smac/Diablo	Mitokondriden Türetilen İkinci Aktivatör
tBid	Kırılmış Bid
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TRAIL	TNF ile ilişkili Apoptozis İndükleyici Ligand
TRAIL-R	TRAIL reseptörü
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling
UV	Ultra Viyole Radyasyon
WST-8	2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolium monosodyum tuzu

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Apoptozisin ekstrinsik ve intrinsik yolları	12
2.2. Prokaspazın temel yapısı ve kaspaz aktivasyonu	13
2.3. Memeli kaspaz ailesi ve C. Elegans kaspaz CED-3	14
2.4. Bcl-2 protein ailesi	17
2.5. Ubikitin-proteazom yolağı	21
2.6. Epoxomicin (C ₂₈ H ₅₀ N ₄ O ₇) açık formülü	22
3.1. DNA fragmanlarının 3'-OH ucunun biotin ile işaretlenmesi ve HRP bağlanması	31
4.1. Farklı dozlardaki epoxomicin ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen MG-63 hücrelerinin% canlılığı. Deneyler 6 kez tekrarlandı (n=6) ve değerler ortalama±SD olarak gösterildi. 24 saatlik inkübasyon sonucu canlılık değerleri grafik üzerinde sayısal olarak verildi	38
4.2. Farklı dozlardaki epoxomicin ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen Saos-2 hücrelerinin% canlılığı. Deneyler 6 kez tekrarlandı (n=6) ve değerler ortalama±SD olarak gösterildi. 24 saatlik inkübasyon sonucu canlılık değerleri grafik üzerinde sayısal olarak verildi	39
4.3. Saos-2 hücrelerinde TRAIL sitotoksitesinin doz-zaman grafiğı	40
4.4. MG-63 hücrelerinde TRAIL sitotoksitesinin doz-zaman grafiğı	40
4.5. (a) MG-63 hücrelerinde TRAIL (T), epoxomicin (E) ve TRAIL-epoxomicin kombine (E-T) uygulamalarında canlılık yüzdeleri, (b) Saos-2 hücrelerinde TRAIL (T), epoxomicin (E) ve TRAIL-epoxomicin kombine uygulamalarında canlılık yüzdeleri. Harflerin yanındaki rakamlar ilaç dozlarını göstermektedir. Her çalışma altı kez tekrarlandı (n=6) ve değerler ort.±SD olarak verildi	42
4.6. MG-63 ve Saos-2 osteosarkom hücrelerinin 10X büyütme ile elde edilen mikroskopik görüntüleri. Canlı MG-63 ve Saos-2 hücreleri adherent ve iğsi şekilli hücrelerdir. Ölü hücreler ise medyum yüzeyinde yüzen yoğunlaşmış yuvarlak noktalar olarak ışık mikroskopunda görülmektedir	43

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.7. 10 ⁶ hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen ve herhangi bir madde ile inkübe edilmeyen MG-63 kontrol hücre grubunun, 24 saatlik medyum içindeki inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü. Canlı MG-63 hücreleri morfolojik olarak iğsi şekilli ve adherent hücreler olarak görülmektedir. Ölü MG-63 hücreleri ise yapışamayan, morfolojik yapısını kaybetmiş, koyulaşp, yuvarlaklaşmış, medyum yüzeyinde yüzen hücreler olarak görülmektedir	43
4.8. 10 ⁶ hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen MG-63 hücrelerinin, 100 ng/ml TRAIL ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü. Petriye yapışan canlı hücre yoğunluğu kontrol grubuna göre azalmış olarak görülmektedir	44
4.9. 10 ⁶ hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen MG-63 hücrelerinin, 100 nM epoxomicin ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü. Petriye yapışan canlı hücre yoğunluğu kontrol grubuna göre azalmış olarak görülmektedir	44
4.10. 10 ⁶ hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen MG-63 hücrelerinin, 100 ng/ml TRAIL + 100 nM epoxomicin kombine dozu ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü. Canlı hücre yoğunluğu diğer gruplara kıyasla oldukça azalmış olarak görülmektedir. Ölü hücreler yuvarlaklaşp yoğunlaşmıştır	45
4.11. 10 ⁶ hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen ve herhangi bir madde ile inkübe edilmeyen Saos-2 kontrol hücre grubunun 24 saatlik inkübasyon sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü. Canlı Saos-2 hücreleri morfolojik olarak iğsi şekilli ve adherent hücreler olarak görülmektedir. Ölü Saos-2 hücreleri ise yapışamayan, morfolojik yapısını kaybetmiş, yuvarlaklaşmış, medyum yüzeyinde yüzen hücreler olarak görülmektedir	45
4.12. 10 ⁶ hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen Saos-2 hücrelerinin, 100 ng/ml TRAIL ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü	46

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.13. 10 ⁶ hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen Saos-2 hücrelerinin, 100 nM epoxomicin ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü	46
4.14. 10 ⁶ hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilmiş Saos-2 hücrelerinin, 100 ng/ml TRAIL + 100 nM epoxomicin kombine dozu ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü. Canlı hücre sayısı oldukça azalmış olarak görülmektedir	47
4.15. Kontrol, TRAIL (100 ng/ml), epoxomicin (100 nM) veya TRAIL (100 ng/ml) + epoxomicin (100 nM) ile 24 saat inkübe edilen Saos-2 hücrelerinin apoptotik indeks yüzdeleri	48
4.16. Kontrol, TRAIL (100 ng/ml), epoxomicin (100 nM) veya TRAIL (100 ng/ml) + epoxomicin (100 nM) ile 24 saat inkübe edilen MG-63 hücrelerinin apoptotik indeks yüzdeleri	48
4.17. 40X ve 10X (sağ alt köşedeki resim) büyütmede TUNEL boyamalarından örnek resimler. Apoptozis gelişmekte olan birkaç hücre örnek olarak ok ile gösterilmektedir	49
4.18. MG-63 hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivite bulguları	51
4.19. Saos-2 hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivite bulguları	52
4.20. MG-63 ve Saos-2 hücrelerinde pro-apoptotik Bax protein düzeyleri (n=6, değerler ort.±SD olarak verildi)	53

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Osteosarkom en sık görülen primer malign kemik tümörüdür (1). Osteosarkom hastalarında, kemoterapinin dezavantajlarından ve yaklaşık olarak hastaların yarısının kemoterapötiklere karşı dirençli olmasından dolayı (2), daha etkin ve güvenli bir tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır. Kemoterapötik ilaçların çoğu hem normal hücrelere, hem de kanser hücrelerine hasar verirler. Kemoterapötik ilaçların oluşturduğu hücre hasar mekanizmalarından birisi, çeşitli basamaklar üzerinden kaspaz aktivasyonu ile apoptozisin aktive edilerek hücre ölümüne yol açılmasıdır. Apoptozis yollarının iyi anlaşılması, kanser hücrelerinde direkt olarak apoptozisi indükleyecek yeni tedavilerin geliştirilmesini sağlayabilir. Apoptotik mekanizmaların rasyonel bir şekilde manipüle edilmesi, kanser tedavisinin başarılı olmasını sağlayabilecektir. Bu nedenle alternatif bir tedavi yöntemi, sadece malign hücrelerde kaspazları direkt aktive edecek tedaviler geliştirmek olabilir.

TRAIL [Tümör Nekrozis Faktör (TNF) ile ilişkili Apoptozis İndükleyici Ligand]'ın normal doku ve organlara zarar vermemesinden dolayı tümör tedavilerinde yeni bir dönem açacağı düşünülmekte ve birçok tümörde TRAIL denenmektedir (3,4). Bazı osteosarkom tiplerinin TRAIL'e karşı dirençli olduğu bilinmektedir (5). Çeşitli kanser hücrelerinde proteazom inhibitörlerinin TRAIL hassasiyetini arttırdığını bildiren yayınlar vardır (6,7). Ancak TRAIL'e dirençli osteosarkom hücrelerinde proteazom inhibitörlerinden, epoxomicinin (epoksomisin) bu direnci nasıl etkilediği daha önce çalışılmamıştır. Ayrıca yaptığımız literatür taramasında epoxomicinin osteosarkom hücreleri üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Bu sebeple yaptığımız bu çalışmada TRAIL ve bir proteazom inhibitörü olan epoxomicinin osteosarkom hücreleri üzerindeki potansiyel sitotoksik etkilerini incelemeyi ve TRAIL ile epoxomicinin birlikte uygulanmalarının osteosarkom hücrelerindeki TRAIL direncine etkisini ortaya çıkarmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Osteosarkom ve Epidemiyolojisi

Osteosarkom (OS) osteoid üretmesi ile karakteristik olan primer bir malign kemik tümörüdür. Primer kemik maligniteleri arasında OS en sık görülendir (1). OS olgularının tanısında bilgisayarlı tomografi (BT) yararlı olmakla birlikte, hastaların ayrıntılı değerlendirmesinde (yumuşak doku uzanımı, eklem uzanımı, sinir-damar komşuluğu vs.) manyetik rezonans görüntüleme (MRG), özellikle dinamik MRG çok değerlidir. BT ve dinamik MRG değerlendirmeleri yapılan hastaya OS ön tanısıyla biyopsi (tru-cut) yapılır. Patolojik incelemede anaplastik stromal hücrelerin ve onların ürettiği osteoidin gösterilmesi ile kesin tanı konulur (8).

Hastaların yaklaşık %60'ı 25 yaşın altındadır. Ergenlik döneminde görülme sıklığı pik yapan bu tümör, iskelet büyümesinin hızlı olduğu yaşlarda sıktır. OS, pik insidansını 18 yaş civarında yapmakta ve genellikle çocukları ve adölesanları etkilemektedir (1, 9).

Klinikte en sık olarak ağrı (%90), kemikte şişlik (%50), hareket kısıtlılığı (%45), patolojik kırık (%8), ateş ve gece terlemeleri görülür. Bazen uzun kemiklerin hızlı büyümesi ve eklem efüzyonu nedeniyle eklem şişliği de görülebilir. En önemli tutulan alanlar yük binen eklemeye yakın tübüler kemiklerin metafizleri olup, femur distali (%50), tibia proksimali (%25) ve humerus proksimali (%10), fibula proksimali (%5)'dir. Nadiren diafizlerden de tümör başlayabilir. Ülkemizde hastaların çoğunda (%91) OS, ekstremitelere yerleşmektedir (8).

2.2. Osteosarkom Etyolojisi

OS'un etyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Çevresel etmenlerin OS'a yol açtığına dair güçlü kanıtlar yoktur. OS'a neden olduğu bilinen tek çevresel ajan iyonize radyasyondur. Radyasyon maruziyeti, OS'ların yaklaşık %2'sinde vardır (10). Alkilleyici ilaçlar da nadiren osteosarkoma yol açabilmektedir. Osteoblastom, osteokondrom gibi neoplastik; Paget hastalığı, kronik osteomyelit, metal protez varlığı gibi non-neoplastik durumların osteosarkoma neden olabileceği düşünülmüştür (11).

2.3. Osteosarkom Tedavisi

1970'lerden önce OS sadece cerrahi ampütasyon yapılarak tedavi edilen, survi kısa, hastaların %80'inin metastatik hastalıklardan öldüğü bir hastalıktı. OS, kemoterapinin tedaviye girmesinden önce yalnız cerrahi yapılan hastalarda 5 yıllık yaşam şansı %10-20 olan en agresif ve ölümcül kemik tümörleri grubunda yer alıyordu (12). Ayrıca OS'un tedavi zorluklarından biri de radyoterapinin sağaltıcı özelliğinin bu hastalık için olmamasıdır. Çünkü bu tümör için radyoterapinin etkili olabilmesi için 80 gray ve üzeri dozlar gerekir ki, bunun uygulanması da olası değildir (8).

Son 30 yılda, tümör davranışının daha iyi anlaşılması, yeni geliştirilen tedaviler, cerrahi teknikler ve implant tasarımları ile osteosarkomlu hastaların sağkalımında önemli bir artış olmuştur (13). Günümüzde OS tedavisindeki tedavi protokolü adjuvan, neo-adjuvan kemoterapi ve uzuv koruyucu cerrahidir. Kemoterapinin cerrahi tedaviye dahil olması ve tedavi protokollerinin gelişmesi ile prognozda iyileşmeler gözlenmiştir. Metastaz yapmamış, cerrahi olarak tüm lezyonu çıkartılmış kemoterapi alan hastada 5 yıllık yaşam yüzdesi %60-70'e yükselmiştir (14,15). Osteosarkomda en sık kullanılan kemoterapötik ilaçlar metotreksat, doksorubisin, sisplatin ve vinkristindir. Fakat bu kemoterapötiklerin normal doku ve organlara sitotoksik etkilerinin olması ve aynı zamanda vakaların sıklıkla kemoterapiye dirençli olması tedavinin majör problemleridir (16,17). Kemoterapiye dirençli osteosarkom hastaları için yeni, güvenli ve daha efektif anti-kanser tedavilerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu amaçla son yıllarda birçok tümörün tedavisinde denenen TRAIL'in osteosarkomda da denendiği çalışmalar mevcuttur (18-20). Bu çalışmaların çoğunda, osteosarkom hücrelerinin, TRAIL'in apoptozisi indükleyici etkisine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir (19).

2.4. MG-63 ve Saos-2 Osteosarkom Hücreleri

Epitelyal morfolojiye sahip olan Saos-2 (osteogenik sarkoma) hücreleri, 1973 yılında Fogh ve arkadaşları tarafından, 11 yaşındaki primer osteosarkomlu beyaz bir kız çocuğundan elde edilmiştir (21). 1987’de Rodan ve arkadaşları, Saos-2 hücrelerinin birçok osteoblastik özelliğinin olduğunu, osteoblast benzeri hücreler ve kemikle ilgili moleküller için sürekli bir kaynak oluşturabileceğini belirtmişlerdir (22). Saos-2 hücreleri, iyi tanımlanmış ve kısa ikilenme ömrü sayesinde çok miktarda üretilen kanser hücreleridir. Saos-2 hücreleri, normalde osteoblastik hücrelerin yapabildiği gibi tam olarak differansiye olabilirler. Saos-2 hücreleri mineralizasyona hazır bir ekstraselüler matriks üretebilirler. Bu özelliği sayesinde Saos-2 hücreleri, insan hücrelerinin osteoblastik dönüşümünün son evrelerinin incelenmesinde değerli bir model oluştururlar (23).

Fibroblastik morfolojiye sahip olan MG-63 (osteogenik sarkoma) hücreleri, 1977 yılında Billiau ve arkadaşları tarafından, 14 yaşındaki primer osteosarkomlu beyaz bir erkek çocuğundan elde edilmiştir (24).

2.5. Apoptozis

Apoptozis terimi, Kerr ve ark. tarafından programlı hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır (25,26). Apoptozis ‘apo’ =ayrı, ‘ptosis’ =düşmek kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuştur (27). Apoptozis kelimesi ilk kez Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür (25,28). Malignite, protoonkogenlerde, tümör supresör genlerde, apoptozisi düzenleyen genlerde ve DNA onarım genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Bu mutasyonlar sonucunda, büyüme sinyallerinin kendiliğinden üretilmesi, büyüme baskılayıcı sinyallerin inhibisyonu, hücrenin apoptozise girmemesi ve apoptozis mekanizmasının bozulması sonucu hücrenin sonsuz replikasyon yeteneği kazanması, malignite oluşumunun temel mekanizmalarını oluşturur. Apoptozis, yaşlanmış, hasarlı ya da gereksiz hücrelerin organizmadan uzaklaştırılmasına olanak sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptozis, hücre değişimi, doku yenilenmesi ve hasarlı hücrelerin uzaklaştırılması için gerekli bir mekanizmadır (29,30).

2.5.1. Hücre ölümünün iki şekli: Apoptozis ve nekrozis

Apoptozis ve nekrozis, farklı şartlarda indüklenen, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri farklı olan, hücre ölümünün iki değişik şeklidir (31). Nekrozis, geri dönüşümsüz hasar sonucu oluşan ve hücrenin ölümüne yol açan pasif bir olaydır. Nekrozis, aşırı stres koşulları veya toksik ajanların neden olduğu akut hücresel disfonksiyonun bir sonucudur ve hızlı ATP tüketimi kendisine eşlik eder (30). Nekrozisle ölen hücreler, şişerek lizize uğrar. Açığa çıkan hücre içerikleri, komşu hücreleri etkileyerek ve proinflamatuvar hücreleri lezyon alanına çekerek, daha ileri doku hasarına sebep olur ve inflamatuvar bir yanıt oluşturur (30,32).

Apoptozis, morfolojik ve biyokimyasal olarak farklı, yaşlanmış, hasarlı ya da gereksiz hücrelerin organizmadan uzaklaştırılmasına olanak sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Apoptozis, hücre değişimi, doku yenilenmesi ve hasarlı hücrelerin uzaklaştırılması için yaygın bir mekanizmadır (29,30). Nekrozis patolojik bir olaydır; apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşabilir. Apoptozisin nekroze göre birçok avantajı vardır. Apoptotik hücreler, fagositler tarafından temizlenip, intraselüler olarak parçalanırlar. Böylece inflamatuvar yanıtın indüksiyonu önlenerek çevre dokular hasardan korunur (32). Apoptozis, hücre büzülmesi, kromatin kondansasyonu, membran kabarcıklarının oluşumu (blebbing), oligonükleozomal DNA fragmentasyonu, komşu hücreler veya fagositler tarafından fagosit edilen apoptotik cisimlerin oluşumu ile karakterize edilen, iyi düzenlenmiş kompleks bir prosestir (30,32-36).

Apoptotik süreç, hem eksternal hem de internal faktörler tarafından başlatılabilir (37,38). İnternal faktörler sıklıkla reseptör aracılıdır ve FAS reseptörü, TNF ailesi reseptörleri ve purinerjik reseptör P_{2Z} apoptozisle ilgilidir. Büyüme faktörlerinin eksikliğinin ve hormon konsantrasyonlarının değişiminin lenfosit, memeli ve prostatik hücreler gibi hassas hücrelerde, apoptozisi başlattığı gösterilmiştir. Apoptozisi indükleyen eksternal tetikleyiciler, DNA hasarını, oksijen veya besin eksikliğini ve viral enfeksiyonları içermektedir. Oksidatif stres, iyonize ya da UV (ultraviyole) radyasyon, kemoterapötik ajanlar, yüksek ısı, büyüme faktörleri, hormon azalması, glukokortikoidler, sitokinler gibi birçok uyaran ve onarılamayan DNA hasarı apoptozisi başlatabilir (29,36).

DNA'ya hasar veren uyaranlara maruz kalındığında, bir hücrenin apoptozis ya da nekrozis tarafından öldürüleceği, DNA hasarının tipine, maruziyetin süresine ve konsantrasyonuna bağlıdır. Ayrıca apoptozis kurtarıcı moleküllerinin varlığına ve tetikleyici moleküllerin fonksiyonuna da bağlıdır (38). ATP'nin hücre içi konsantrasyonu, hücre ölüm şeklinin seçilmesinde önemlidir. ATP'nin yüksek konsantrasyonda olması apoptozisin baskın olmasına sebep olurken, ATP'nin düşük konsantrasyonda olması hücrenin nekroze doğru kaymasına sebep olur (28).

2.5.2. Apoptozisin aşamaları

Apoptozis 3 aşamaya ayrılabilir. İlk aşamada, hücre apoptotik bir sinyal alır. Hücreye, hem içten hem de dıştan gelen çeşitli uyaranlar, apoptotik yolları aktive edebilir. Bunlara örnek olarak, hücre yüzey reseptörlerinin bağlanma ile uyarılması, esansiyel büyüme faktörlerinin ortamdan uzaklaştırılması ya da hücrelerin çeşitli kimyasal ajanlara maruz bırakılması verilebilir. Bunlara ek olarak, hücrelerin UV ya da iyonize radyasyona, ısıya ve osmolarite değişikliklerine maruz kalmaları, apoptozisi uyarabilir.

Apoptozisin ikinci aşamasında hücreler tüm bu çeşitli sinyalleri toplar ve apoptozisi devam ettirir ya da ettirmez. Bu olaylar aktivasyon-inaktivasyon, serin/treonin ve tirozin kinaz, fosfataz ve seramidleri de içeren lipid ikincil mesajcıların sentezi, değişmiş gen ekspresyonları ve kaspaz olarak bilinen özel proteazların aktivasyonu gibi birçok sinyal yollarını içerir. Apoptozisin devamı için son karar, apoptotik ve hayati faktörlerin (Bcl-2 grubu proteinleri içerir) göreceli düzeyleri, hücrelerin metabolik durumları ve hücre siklus durumu gibi birçok faktöre bağlıdır. Son çalışmalar birçok apoptotik uyarının mitokondri tarafından alınıp değerlendirildiğini göstermiştir. Apoptozisin son aşamasında genel yıkıcı bir sinyal yolağı aktive olur ve apoptozis ile ilgili karakteristik morfolojik değişiklikler tetiklenir (25,37).

2.5.3. Apoptozisin önemi

Apoptozis, yaşamın gerekli bir parçasıdır. Bağışıklık sisteminde, gelişme ve hücrel homeostazis gibi birçok biyolojik süreçte, istenmeyen ya da fazla üretilmiş hücrelerin yok edilmesi için, apoptozis gereklidir. Apoptozisin regülasyonunun bozulması, kanser, otoimmünite, nörodejenaratif hastalıklar, hemopoyetik

bozukluklar ve infertilite gibi klinik bozukluklarla ilişkilidir (28,39). Belirli beyin nöronlarındaki kontrolsüz apoptozis, Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıkların oluşumunu destekleyebilir, tam tersine DNA hasarına maruz kalmış hücrelerin apoptozis ile yok edilememesi ise kanser oluşumuna neden olabilir (40).

Fizyolojik hücre ölümü, insan vücudunun büyümesinde ve sürekli yenilenmesinde önemli bir rol oynar. Sinir sistemi gelişiminde, uygun bağlantı oluşturamayan nöronlar bu yolla ölür. Fizyolojik hücre ölümü, enfekte hücrelerin sitotoksik T lenfositler tarafından ortadan kaldırılmalarında, oto-reaktif immün hücrelerin yok edilmelerinde, sindirim sisteminin, kıkırdak ve kemik gelişimlerinde de önemli rol oynar. Normalde gerçekleşmesi gereken fizyolojik hücre ölümü inhibe olursa, uygunsuz fizyolojik hücre ölümü gerçekleşebilir ve bu da birçok hastalığın temelini oluşturur. Örneğin, Alzheimer ve Parkinson gibi dejeneratif nöral hastalıklarda, bazı grup nöronlarda prematür hücre ölümü izlenir. AIDS hastalığındaki T lenfosit ölümü de bir çeşit fizyolojik hücre ölümü formudur. İmmün sistemde hücre ölümü inhibisyonu, oto-reaktif B ve T lenfositlerin varlığını devam ettirmesine ve buna bağlı olarak da oto-immün hastalıklara neden olur (41).

2.5.4. Apoptozisde meydana gelen biyokimyasal ve morfolojik değişimler

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü hücre büzüşmesi, kromatin kondansasyonu, nüklear fragmentasyon, membran cepcikleri ve apoptotik cisim oluşumu gibi morfolojik değişimler ile tanımlanır. Biyokimyasal olarak apoptotik hücreler, mitokondriyal transmembran potansiyelin azalması, hücre içi asidifikasyon, reaktif oksijen türlerinin üretimi, fosfotidilserinin membranın iç yüzünden dış tarafına çıkması gibi olaylarla karakterize edilir (26,42,43). Apoptozisin başlangıcında çok hafif değişiklikler meydana gelirken hücre membran bütünlüğü korunmaktadır. Daha sonra hücre, profesyonel fagositler (makrofaj ve dendritik hücreler) tarafından *in vivo* olarak alınan, membranla çevrili fragmentlere (apoptotik cisim) parçalanır. Apoptozisin geç döneminde, apoptotik cisimlerin plazma membranı, bütünlüğünü kaybeder ve bu olay sekonder nekroz olarak tanımlanır (44). Apoptotik hücrelerin bir başka özelliği, transglutaminazların ekspresyonu ve aktivasyonu ile meydana gelen yoğun protein çapraz bağlanmalarıdır. Kalsiyum ve magnezyuma bağlı endonükleazlar tarafından DNA'nın kırılması, 180-200 baz çiftlik DNA parçalarının oluşumu ile sonuçlanır. Bu kırıklar, UV ışığı altında etidyum

bromid boyasıyla agaroz jel elektroforezinde “DNA merdiveni” olarak tanımlanan karakteristik merdiven görüntüsünü verir (45). Sitozolik serbest kalsiyum ve magnezyumun artması ve sitozolik pH’nın ve potasyumun azalması apoptozise katkıda bulunmaktadır (46). Fosfotidil serinin plazma membranının dış tarafına çıkması apoptozise uğrayan hücrelerde gerçekleşen bir olaydır. Fosfotidilserinin membranın dış tarafında bulunması, büyük olasılıkla, nekrozda oluşan inflamasyondan farklı olarak, inflamasyona neden olmadan apoptotik hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması içindir. Fosfotidilserin, membranın iç tarafından dış tarafına aminofosfolipid translokazlar tarafından geçirilir. Bu mekanizma tamamen anlaşılamamıştır. Apoptozis sırasında membranın dış tarafında fosfotidilserinin görülmesinin, hem aminofosfolipid translokaz aktivitesinin kaybından, hem de fosfolipidlerin spesifik olmayan membran boyunca hareketinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (47). Nötral ya da asidik sfingomiyelinazların aktivasyonu, apoptozisin pek çok modelinde meydana gelmektedir. Bu olay sfingomiyelinden seramidin üretimine yol açar. Seramid, pro-apoptotik sinyal kaskadını aktive eder. Transglutaminazlar tarafından proteinlerin çapraz bağlanması, hücrenin parçalanması esnasında, apoptotik cisimlerin oluşmasında etkilidir (46).

Apoptozis, aynı zamanda mitokondriyal fonksiyonun kaybı ile de karakterizedir. Apoptozisle ölen hücreler, plazma membran bütünlüğünü korurlar. Ancak apoptotik hücrelerin plazma membranlarındaki değişim, fagositik hücreler tarafından alınmaları için sinyal verir ve böylece degradasyon süreci tamamlanır. Hücreler, apoptotik cisimlere parçalanarak fagositik hücreler tarafından fagosit edilirler. Apoptozisin önemli bir özelliği ölen hücrelerin inflamasyona yol açmadan ortadan kaldırılmasıdır. Buna karşın nekrotik hücreler, erken membran bütünlüklerini kaybederler. Bu da sitoplazmik içeriklerinin dış ortama sızması ve o bölgede inflamasyon gelişmesi ile sonuçlanır (48).

2.5.5. Apoptozis yolakları

Apoptozisi indükleyen iki ana yolak vardır. Bunlardan biri, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine ligand bağlanması ile başlar. Ekstrinsik ya da sitoplazmik yolak olarak bilinen bu yolak, TNF, Fas veya TRAIL reseptörleri ile meydana gelir. İkincisi, intrinsik ya da mitokondriyal yolak olarak adlandırılır ve çeşitli stimülasyonlarla mitokondriden sitokrom c salınımıyla, ölüm sinyalinin aktive

olduğu yolaktır (49). Apoptozisde ekstrinsik ve intrinsik yollar Şekil 2.1’de gösterilmektedir (4). Bu apoptotik yollara ek olarak endoplazmik retikulum-indüklü apoptozis ve kaspaz bağımsız apoptozis olmak üzere iki yolak daha vardır (44). Ayrıca T hücre aracılı sitotoksikite ve perforin granzim bağımlı hücre ölümü yolağı da vardır. Perforin/granzim yolağı, apoptozisi, ya granzim A ya da granzim B yoluyla aktive eder (30,50). Perforin ve granzim B, tümör hücrelerinde ve intraselüler patojenlerle enfekte olmuş hücrelerde, apoptozisi beraberce indükler. Perforin hücreleri geçirgen yaparak granzimin sitozole geçişini sağlar ve granzim de kaspaz-3’ü aktive eder. Ekstrinsik, intrinsik ve granzim B yolları aynı uçta birleşmektedir. Bu yolak, kaspaz-3’ün kırılması ile başlar ve DNA fragmentasyonu, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin degradasyonu, apoptotik cisimlerin oluşumu, fagositik reseptörler için ligandların ekspresyonu ve sonuç olarak fagositik hücreler tarafından alımı ile sonuçlanır (45). Ekstrinsik yolda rol oynayan ölüm reseptörleri, TNF reseptör süper ailesinin üyeleridir. Bu ailenin üyeleri hem sisteinden zengin hücre dışı birimlere, hem de ölüm birimi olarak bilinen hücre dışında bulunan sitoplazmik kısımları olan birimlere sahiptir. Ölüm reseptörlerinin kendi ligandları ya da agonistik antikörleri tarafından tetiklenmesi, reseptörün trimerize olması ve adaptör proteinlerin işe karışması ile sonuçlanır. Ekstrinsik yolda apoptozis, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanan, ölüm ligandları ile indüklenen kaspazlar tarafından kontrol edilir (30,51-57). Ölüm reseptörleri, ekstraselüler ölüm sinyallerinin varlığını algırlar ve saatler içinde hücrede apoptozise yol açacak kaspazları aktive ederler (40,58). Ölüm reseptörlerinin, sitoplazmada bulunan homolog sekans içeren ölüm domaini, hücrelerde apoptozisi başlatır (59). Ölüm reseptörleri CD95 (Fas ya da Apo 1), TNFR1 (p55 ya da CD120a); ölüm reseptörü 3 (DR3 aynı zamanda Apo3, WSL-1, TRAMP, ya da LARD olarak da bilinir); DR4; ve DR5 (aynı zamanda Apo2, TRAIL-R2, TRICK 2, ya da KILLER olarak da bilinir) ve DR6’dır (40,60). P75 sinir büyüme faktör (NGF) reseptörü de ölüm domaini içermektedir (61). NGF hariç, ölüm reseptörlerini aktive eden ligandlar, TNF gen süper ailesine bağlıdır (62). CD95 ligandı (CD95L) CD95’e bağlanır; TNF ve limfotoksin- α TNFR1’e bağlanır; Apo3 ligandı (Apo3L, TWEAK olarak da bilinir) DR3’e bağlanır; Apo2 ligandı (Apo2L, TRAIL olarak da bilinir) DR4 ve DR5’e bağlanır (40). Ligand bağlanması üzerine reseptörler, adaptor protein

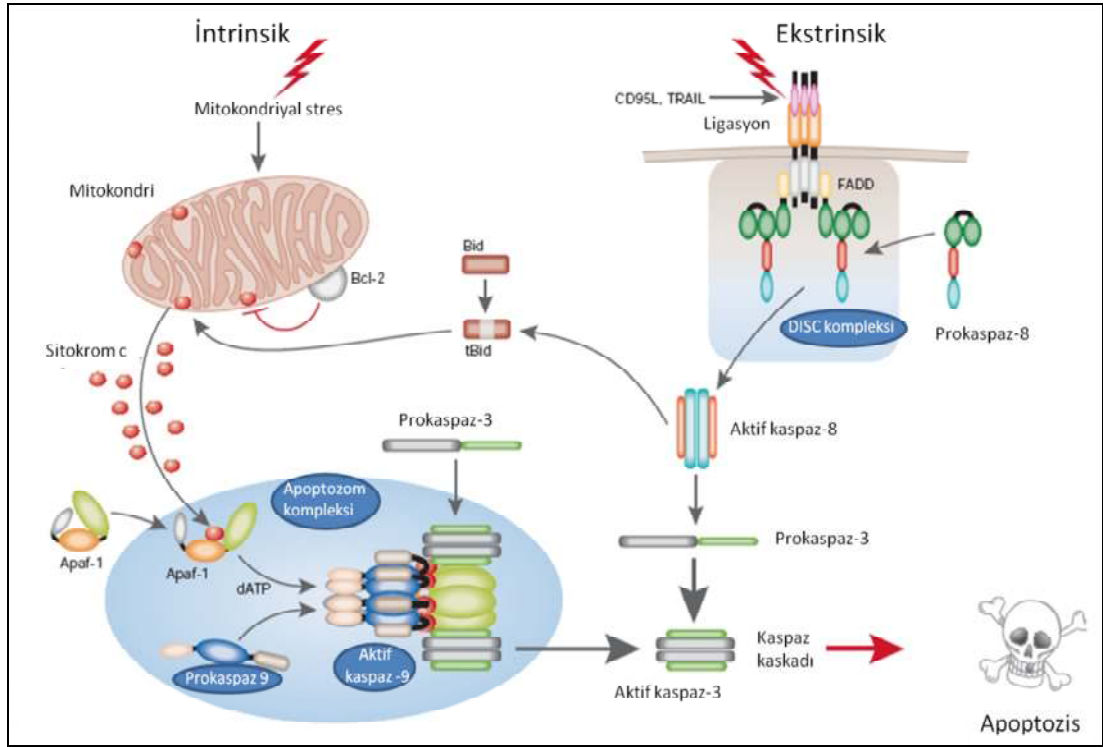
ile sitozolik bir kompleks oluşturur ve prokaspaz-8 ve -10 ile etkileşerek bu kaspazların aktivasyonunu sağlar (45,63). Kaspaz-8 doğrudan kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozise yol açar (64). Kaspaz-8 aktivasyonuna öncülük eden olaylar, ölüm reseptörlerinden birinin ligasyonu ile başlar, bunu reseptör trimerizasyonu ve adaptör molekülün reseptörün sitoplazmik domainine bağlanması takip eder (49,65). Multimerik bir protein olan, adaptör molekül, moleküler bir yapı iskelesi olarak davranır ve böylece birçok prokaspaz-8 molekülünü yanyana getirir. Bu da aktif kaspaz 8'in serbestleşmesine yol açar. Aktif kaspaz-8, prokaspaz-7 ve -3'ü yıkararak aktifleştirir. Aktif kaspaz-3 de prokaspaz-6'yı yıkar (49,66). Sitoplazmada kaspaz-3 tarafından inhibitöründen ayrılan, kaspaz bağımlı endonükleaz, nükleusa girer ve DNA'yı oligonükleozomal fragmanlara (180bp) parçalar (30,67). Birçok ölüm reseptörleri için farklı ligand ve adaptör molekülleri olmasına rağmen, aktive olan yollar benzerdir (49,65).

İntrinsik yolda, mitokondriden sitokrom c salınımı apoptozisi indükler ve bu yola hücre yüzey reseptörleri ile ilişkili değildir (30). Mitokondri apoptozis sinyal yolağında, önemli bir düzenleyici organelidir. Çoğu ölüm sinyali, mitokondrinin geri dönüşümsüz olarak fonksiyonunun bozulmasına yol açar. Böylece mitokondri membranları arasında bulunan sitokrom c, apoptozis inhibe edici faktör (AIF), Smac/DIABLO, Endo G ve Omi/HtrA2 gibi proteinler apoptotik hücre ölümünde aktivasyonlarını gösterecekleri sitozole ya da nükleusa geçer (68).

İntrinsik yola, Bcl-2 ailesinin kontrolü altındadır ve mitokondri membranları arasından sitokrom c ve Smac/DIABLO'nun salınması ile başlar. Smac/DIABLO apoptozis protein inhibitörlerine bağlanarak fonksiyon gösterir. Bu yüzden, apoptozis protein inhibitörlerinin, kaspaz-3, -7, -9'nin aktivitelerini durdurması engellenir (63). Mitokondri dış membranında lokalize anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin konformasyon ve/veya aktivasyonundaki değişikliklerin bir sonucu olarak, sitokrom c, mitokondri'deki membranlar arası boşluktan sitoplazmaya salınır ve sitoplazmada, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'e (Apaf-1) bağlanır (49,69,70). Bcl-2 ailesi, hücre canlılığının ve apoptozisin gerekli araçlarıdır. Bcl-2 ailesinin hem anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bfl-1/A1, Bcl-W, Bcl-G), hem de pro-apoptotik (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik, Bim, Bcl-XS, Krk, Mtd, Nip3, Noxa, Bcl-B) üyeleri tanımlanmıştır. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin oranını,

büyüme faktöründen yoksunluk, hipoksi, radyasyon, antikanser ilaçlar, oksidanlar ve aşırı kalsiyum gibi çeşitli apoptotik etkenlere direnç, ya da hassasiyetleri belirler. Bcl-2 ailesi proteinlerinin dimerizasyonu ve ekspresyonu, sitokrom c salınımını düzenler. Bcl-2 proteinleri aynı zamanda sitokrom c'den bağımsız olarak da kaspazlarla etkileşebilir. Anti-apoptotik protein Bcl-XL, kaspaz adaptörü Apaf-1'e bağlanır ve onu inaktive eder. Apaf-1, sitokrom c ve Datp için bağlanma yerleri içerir ve diğer Apaf molekülü ile oligomerize olur. Apaf-1, kaspaz-9 ve sitokrom c, apoptozom olarak adlandırılır. Oluşan kompleks, ATP veya dATP'ye bağımlı konformasyonel değişikliklere uğrayarak, Apaf-1'in, prokaspaz-9'a bağlanmasını sağlar (30). Bu etkileşim, zimojen formundaki prokaspaz-9'da konformasyonel değişikliklere yol açarak, proteolitik aktivitesini artırır. Mature kaspaz-9, multimerik kompleksten ayrılır ve daha uzaktaki kaspaz-3, -7 ve -6'yı aktive eder (49,71).

İki kaspaz aktivasyon yolağı arasında etkileşim olduğu ve bunun cevapları amplifiye ettiği bildirilmiştir (49,72). Antineoplastik ilaçlara direnci önlemek için, antikanser ilaçların hangi apoptotik yolağı aktive ettiğini bilmek çok önemlidir. Değişik neoplastik hücrelerde yapılan çalışmalar, birçok antikanser ilacının, Fas'a bağlanan FasL sentezini indükleyerek ve ölüm reseptör yolağını aktive ederek apoptozisi başlattığını göstermiştir (49,73,74). Doksorubisin, etopozid, tenipozid, metotreksat, sitarabin, sisplatin, ve Bleomisin, FasL mRNA'sını arttırdığı gösterilen kanser ilaçları arasındadır (49,73,74). Ölüm reseptör yolağının kemoterapinin indüklediği apoptoziste önemli bir rol oynadığına dair olan ilk düşünceler, mitokondriyel yolağın bulunmasından sonra oldukça değişmiştir. Yapılan çalışmalar, antikanser ilaçlarının çoğunluğunun sitokrom c/Apaf-1/kaspaz-9 yolağı ile apoptozisi başlattığını ortaya koymuştur (49,75).



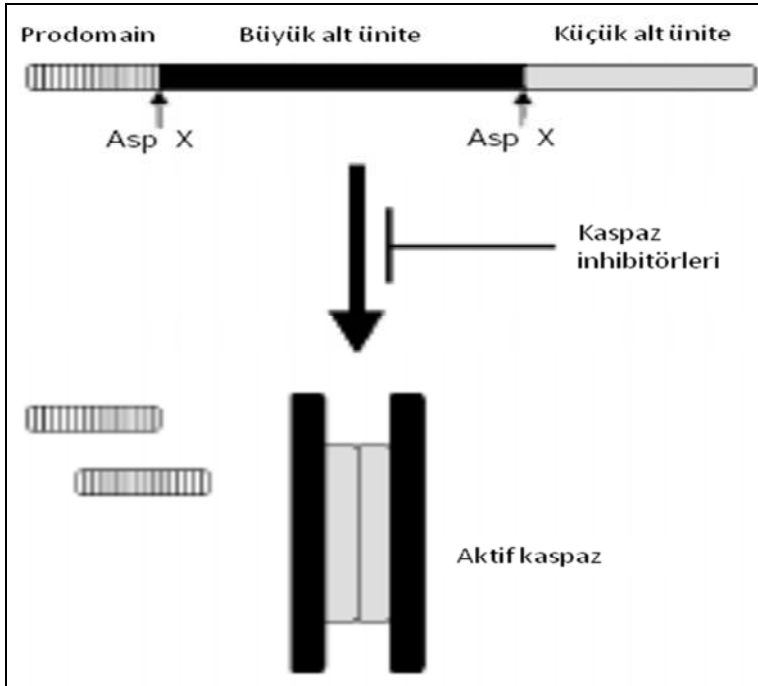
Şekil 2.1. Apoptozisin ekstrinsik ve intrinsik yolları.

2.5.6. Kaspazlar

Kaspazlar, apoptozisde önemli rol oynayan sistein içeren, aspartik asit-spesifik, sistein-proteaz ailesidir (76). Kaspaz aktivasyonu, apoptozisde anahtar bir basamaktır ve birçok uyaran kaspazları aktive eder (27). Apoptozise, kaspazlar denen spesifik proteazların aktivasyonu ve fosfotidilserin çıkışına yola açan membran fosfolipid asimetrisinin kaybı eşlik eder (36). Kaspazlar, aspartat substrat spesifiteleri ile birlikte, sistein aktif bölgeleri ile karakterize edilirler (77). Kaspazlar, kataliz için sistein kullanmaları ve sadece aspartat rezidülerinden sonra kırmaları yönleriyle diğer proteazlardan farklıdır. Bu alışılmadık aspartat substrat spesifitesi, sadece bir proteaz olan granzim B’de de bulunur (37). Kaspazlar, tüm hücrelerin nükleer matriksinde, mitokondride membranlar arası boşlukta ve sitoplazmada zimojen olarak bulunurlar (30,33).

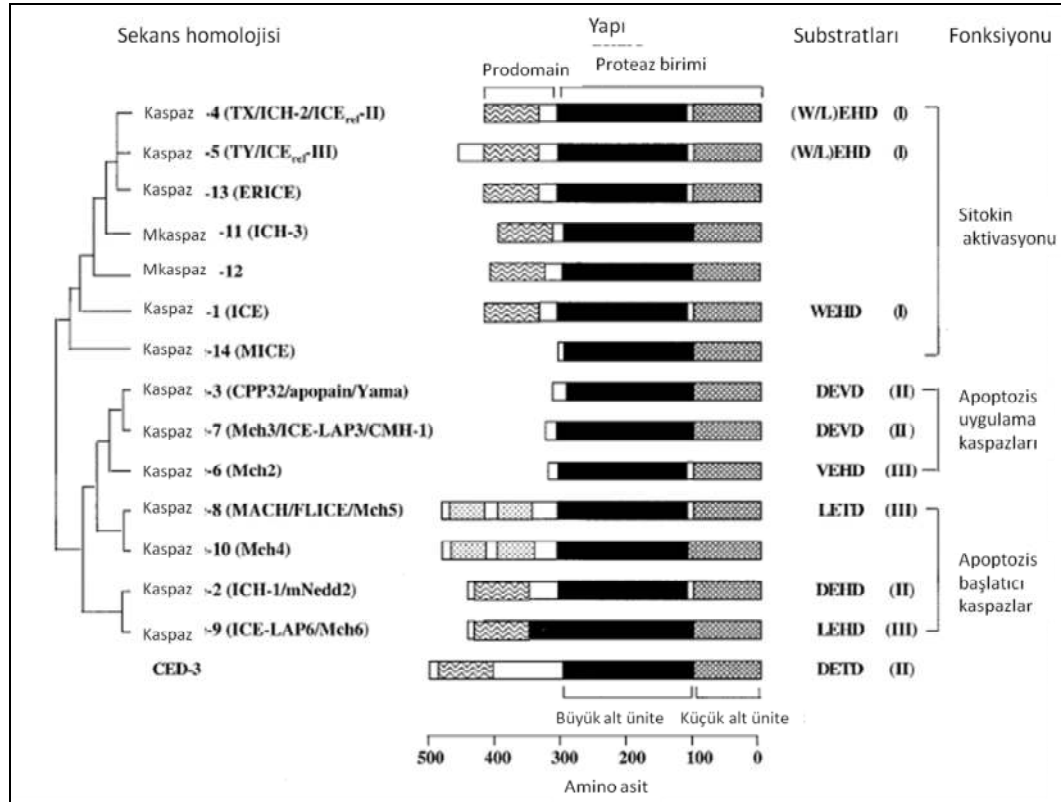
Kaspazlar, tek bir polipeptid zinciri ve inaktif bir zimojen olarak sentezlenirler (37). Sekans analizleri ve x-ray kristallografisi, tüm kaspazların ortak bir yapısı olduğunu göstermiştir. Her zimojen, bir N-terminal prodomain, korunmuş bir QACXG motif içinde aktif bölgesinde sistein bulunan büyük alt birim ve C

terminalinde küçük bir alt birim içermektedir. Aspartat kırılma bölgeleri, büyük alt ünite ile prodomain arasında ve büyük ve küçük alt ünite arasında bulunur (78). Aktivasyon sırasında her polipeptid zinciri, 20 kDa'luk bir büyük (p20) ve 10 kDa'luk bir de küçük alt üniteye (p10) ayrılır ve daha sonra dimerize olur. Enzimatik aktivitenin tam olması için, 2 küçük 2 büyük alt ünite gereklidir (37). Çoğu prokaspazda, büyük ve küçük alt ünite arasında, yaklaşık 10 aminoasitlik küçük bağlayıcı bir dizi vardır (79). Kaspazlar, spesifik aspartik asit rezidülerinden kırılarak hızlı bir şekilde aktive edilir (44,80). Her prokaspaz çeşitli uzunluklarda bir prodomain, büyük ve küçük alt ünite içerir. Efektör kaspazlarda 30'dan daha az amino asit bulunurken, başlatıcı kaspazlar ve inflamatuvar kaspazlarda 100 amino asidin üzerinde prodomain bulunmaktadır. Uzun prodomain özellikle ölüm efektör birimi (DED) ve kaspaz toplama birimi (CARD) gibi farklı motifler içermektedir. Ölüm indükleyici birim (DID) adı verilen yeni bir motif tanımlanmıştır. CARD birimi, kaspaz-1, -2, -4, -5 ve -9'da bulunurken, prokaspaz-8 ve prokaspaz-10, DED'in, iki çift kopyasını içermektedir. Bu birimler, prokaspazlar ve onların adaptörleri arasındaki homofilik etkileşimde aracıdır. Buna karşın uygulama kaspazlarının kısa prodomaini protein-protein etkileşimlerinde aracı değildir (81). Prokaspazın temel yapısı ve kaspaz aktivasyonu Şekil 2.2'de gösterilmektedir (82).



Şekil 2.2. Prokaspazın temel yapısı ve kaspaz aktivasyonu.

Kaspazlar, sekans benzerliklerine göre gruplandırılır. Sekans kimliklendirmesine göre kaspazlar 3 gruba ayrılır ve bu gruplandırma fizyolojik fonksiyonları ile uyumludur. Grup 1: inflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5); Grup 2: Efektör, uygulama kaspazlar (effector, downstream) (kaspaz-3, -6, -7); Grup 3: başlatıcı kaspazlar (initiator, upstream) (kaspaz-2, -8, -9, -10) (45,79).



Şekil 2.3. Memeli kaspaz ailesi ve C. Elegans kaspaz CED-3.

Kaspaz-3, -6, -7 gibi efektor (uygulama) kaspazları, apoptozis ile ilişkili karakteristik değişikliklerin meydana gelmesine yol açan substrat kırılmalarını oluşturan kaspazlardır. Kaspaz-8 ve -9 gibi başlatıcı kaspazlar ise efektor (uygulama) kaspazlarını aktive eder (83). Bazı kaspazlar diğer proteinlerle etkileşerek aktive olurlar. Örneğin kaspaz-8, Fas ilişkili ölüm birimi (FADD) ile, kaspaz-9 ise sitokrom c, dATP (veya ATP) ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1)'in etkileşimi ile aktive olur. Bir başka aktivasyon mekanizması da kaspazların diğer kaspazlarla aktivasyonudur. Örneğin hem aktif kaspaz-8 hem de kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktive ederler (37).

Kaspaz ailesinin birçok üyesi, primer yapıları ve substrat özgüllükleri (spesifiteleri) farklı olmasına rağmen, aynı özellikleri paylaşır (49,66). İnsan kaspaz ailesinin 12 üyesi mevcuttur ve bunlardan 6 tanesi (kaspaz-3, -6, -7, -8, -9, ve -10) apoptoziste rol alır (49). Başlatıcı (initiator, upstream) (kaspaz-8, -9, ve -10) kaspazlar, pro-apoptotik sinyallere cevaben proteolitik kaskadı başlatırlar. Memeli kaspaz ailesi ve C. Elegans kaspaz CED-3, Şekil 2.3’de gösterilmektedir (81).

Efektör (effector, downstream) (kaspaz-3, -6, ve -7) kaspazlar ise, aktive olduktan sonra çeşitli hücrel proteinleri parçalarlar. Efektör kaspazlar, etkilerini çeşitli stratejiler kullanarak gösterirler: **a)** Apoptozisin inhibitörlerini inaktive ederek, **b)** Hücre yapısını bozarak, **c)** Enzimin katalitik kısmı ile düzenleyici bölgesini ayırıp enzim aktivitesini bozarak. Kaspaz-8 ve -9, başlıca başlatıcı kaspazlardır. Aktive olduktan sonra kaspaz-8 ve -9, efektör kaspazları yıkma ve aktive etme yeteneği kazanır. Kaspaz-3, -6, ve -7, en önemli efektör kaspazlardır ve aktive oldukları zaman, apoptotik hücrelerdeki polipeptidlerin çoğunu proteolize uğratırlar (49, 66).

Kaspaz-3, spesifik bir endonükleaz olan, kaspaz ile aktive edilen DNAaz (CAD)’ı aktive eder. İnternükleozomal DNA yıkılımına, kaspaz-3 tarafından aktive edilen CAD denilen bir endonükleazın salınımı yol açar (49,84). Çoğalan hücrelerde CAD, inhibitörü olan, kaspaz ile aktive edilen DNAaz inhibitör (ICAD) ile birlikte bulunmaktadır. Apoptotik hücrelerde aktive edilmiş kaspaz-3, ICAD’ı kırarak CAD’ı serbest bırakır. Daha sonra CAD, çekirdekte kromozomal DNA’yı yıkar ve kromatin kondensasyonuna neden olur (45). Apoptotik kromatin kondensasyonu, apoptozis indükleyen faktör, topoizomerez II ve iki proteaz aktive edici faktör, CAD ve asinus denen kromatin kondensasyon faktörünün etkileri sonucu oluşur (49,85). Ek olarak asinus ve helikardın kırılması, kromatin kondensasyonuna neden olur. Normalde nükleusun yapısal bütünlüğünü sağlayan laminlerin ve nükleer/mitotik aparat proteininin kırılması, nükleus fragmentasyonuna yol açar. Apoptotik hücrelerdeki diğer proteolitik kırılmalar, DNA onarımını bozar ve hücre yaşamını inaktive eder (49,66).

ROCK-1 ve PAK-2 gibi kinazların yanı sıra gelsolinin gibi birçok substratın kırılması, apoptozisin karakteristik bir özelliği olan membran tomurcuklanmasına neden olur. Kaspazlar, bir ara filament olan sitokeratin 18 ve vimentin gibi hücre

iskeleti için gerekli olan birçok proteini de kırarlar. Bu kırılmalar, hücre şeklindeki apoptotik değişimlere yol açarlar (86).

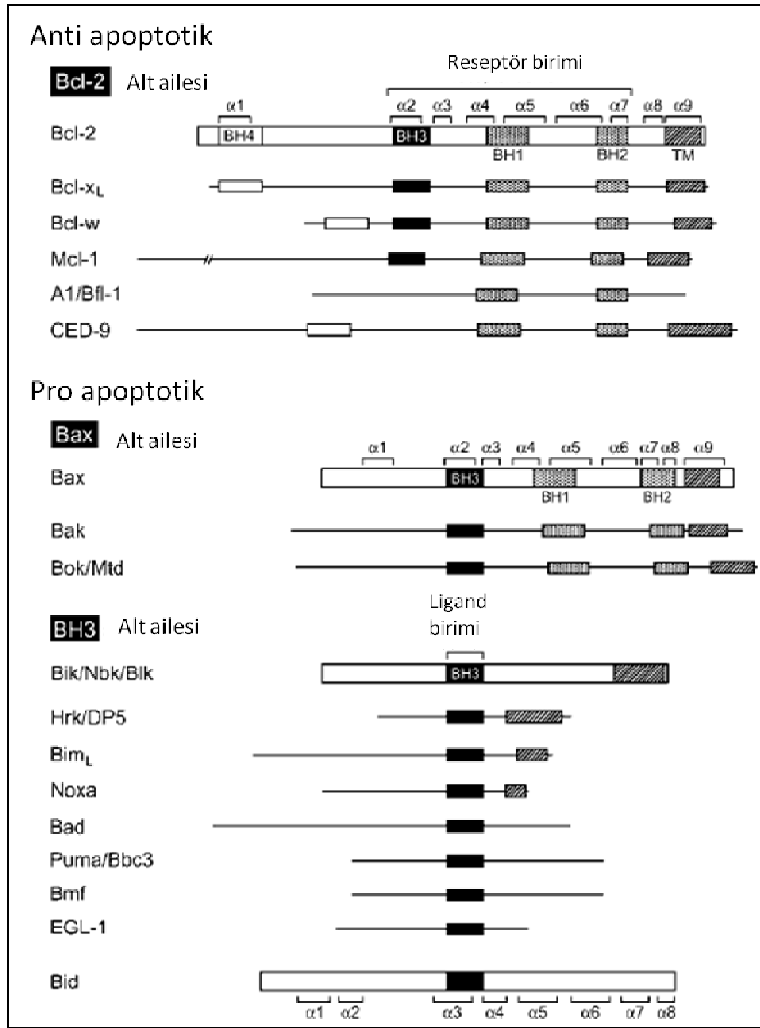
Kaspaz-3, aynı zamanda hücre iskeletinin tekrar organize olmasını ve hücrenin apoptotik cisimlere parçalanmasını indükler. Bir aktin bağlayıcı protein olan gelsolin, aktive kaspaz-3'ün anahtar substratlarından biridir. Gelsolin, karakteristik olarak aktin polimerizasyonu için önemli bir rol oynar. Kaspaz-3 gelsolini parçalar ve gelsolinin kırılması kalsiyumdan bağımsız bir şekilde aktin filamentlerini kırar. Bu olay hücre iskeletinin, hücre içi taşınmanın ve sinyal iletiminin bozulması ile sonuçlanır (45).

2.5.7. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesi üyeleri apoptozisde anahtar rol oynar. Bcl-2 protein ailesi hem anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-w, Mcl-1, A1, NR-13, BHRF1, LMW5-HL, ORF16, KS-Bcl-2, E1B-19K, ve CED-9) hem de pro-apoptotik (Bax, Bak, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, BimL, Bad, Bid, ve EGL-1) fonksiyona sahip proteinleri içermektedir (87). Bcl-2 protein ailesi Şekil 2.4'de gösterilmektedir (88).

Bcl-2 geni ilk olarak, kromozom 14 ile 18 arasındaki translokasyon alanında bulunan konumu sonucu keşfedilmiştir ve çoğu foliküler lenfomalarda bulunur. Başlangıçta onkogen olarak kabul edilen Bcl-2'nin, hücre siklusunun ilerlemesi ya da hücre çoğalması üzerinde arttırıcı etkisinin neredeyse hiç olmadığı saptanmıştır. Çeşitli uyaranlar sonucunda Bcl-2'nin aşırı ekspresyonunun, hücrelerde apoptozisin başlamasını engellediği belirlenmiştir (48). Bcl-2 nükleus, endoplazmik retikulum ve mitokondri dış membranında bulunur. Benzer şekilde, Bcl-Xl'nin de mitokondri dış membranında lokalize olduğu gösterilmiştir (89). Bcl-2 proteinleri 4 sekans alanı içermektedirler. Bunlar Bcl-2 homologu (BH) olarak adlandırılır (68). Bcl-2 ailesi BH ye göre 3 farklı grupta sınıflandırılabilirler. Bcl-2 ve Bcl-Xl gibi anti-apoptotik üyeler BH1'den BH4'e kadar tüm birimleri içerebilirler.

Pro-apoptotik üyeler 2 gruba ayrılabilirler: 1. grupta Bax ve Bak gibi BH1, BH2 ve BH3 birimleri içerenler; 2. grupta ise Bad ve Bim gibi sadece BH3 birimi içerenler yer alır. Bu kategorilere istisna oluşturan Bcl-Xs, Bcl-Xl'nin diziliminin bir kısmından ibaret olan bir pro-apoptotik proteindir ve BH3 ve BH4 birimleri içerir.



Şekil 2.4. Bcl-2 protein ailesi.

Bu sekansların fonksiyonel ve yapısal önemleri vardır. Pro-apoptotik aile üyelerinin BH3 birimi, anti-apoptotik proteinlerin BH1, BH2 ve BH3 birimleri tarafından oluşturulan hidrofobik yarıık ile etkileşime geçebilir ve bu etkileşim önemli bir düzenleyici mekanizma olabilir (68,90,91).

Pro-apoptotik proteinlerdeki BH3 birimi, Bcl-2 proteinleri ailesinin öldürücü etkisi için gereklidir. Bu proteinlerin aktivitesi, homo ve heterokompleks oluşumu ile düzenlenmektedir. Bu modelde, pro-apoptotik proteinlerle anti-apoptotik proteinler arasında kompleks oluşumu, aktivitelerini inhibe eder ve apoptozisi engeller. Böylece protein konformasyonundaki posttranslasyonel modifikasyonlar ve değişimler, çeşitli proteinler arasındaki afiniteyi değiştirir ve kompleks oluşumunu düzenler (92).

Birden çok birim içeren proapoptotik proteinler, mitokondri membranındaki kanalları indükleyebilmeleri sayesinde, mitokondrinin bütünlüğünü değiştirme yeteneğine sahiptir. Anti-apoptotik ve birden çok birim içeren proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri arasındaki oran, hücrenin ölüm uyarana hassasiyetini belirlemekte yardımcıdır (91). Ortaya çıkan kanıtlar, Bid'in mitokondrinin fonksiyonunun bozulmasını ve kaspaz aktivasyonunu sağlayarak, çeşitli apoptozis yollarında önemli rol oynadığını göstermiştir. Fas gibi ölüm reseptörleri, Bid'i kıran kaspazları aktive eder. Kırılmış Bid'in C terminal kısmının (tBid) daha sonra mitokondriye göç ettiği ve mitokondride sitokrom c ve diğer proteinlerin salınmasını indüklediği öne sürülmüştür. Bak eksikliğinde, kırılmış Bid tarafından sitokrom c'nin salınımının gerçekleşmemesi, kırılmış Bid ile Bak'ın etkileşiminin, en azından *in vitro* olarak önemli bir olay olduğunu göstermiştir (93). Bcl-2, Bax ve Bcl-XL, C terminal uçlarında, bir membran çapası olarak görev yaptığına inanılan hidrofobik bir kısım içerirler (89).

Mitokondri apoptozisde önemli bir rol oynar. Özellikle bu organelden apoptozis indükleyici faktör ve sitokrom c salınır. Daha sonra Apaf-1-kaspaz-9 kompleks oluşumu ile kaspaz-9 aktivasyonu tetiklenir. Bcl-2 ailesi üyeleri, sitokrom c salınımının düzenlenmesinde rol oynar. Bcl-2 ve Bcl-XL, sitokrom c salımını baskımlarken, Bax bu olayı stimüle eder (87). Bax pro-apoptotik bir Bcl-2 ailesi üyesidir, sitozolde bulunur ve apoptozis esnasında mitokondriye transloke olur. Bax, Bcl-2'nin apoptozisi bloke etme yeteneğini baskılar (94). Son zamanlarda Bax'ın, sitokrom c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu indüklediği *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir. Bu salınımın mitokondriyal permeabilite geçişinin indüksiyonuna bağlı olduğu rapor edilmiştir. Bax sağlıklı hücrelerde daha çok sitozolde bulunur ve apoptotik bir uyarana olduğunda mitokondriye transloke olur (68).

2.6. TRAIL

TRAIL ilk kez 1995 yılında TNF ailesinin bir üyesi olarak tanımlandı. TRAIL ya da diğer adıyla Apo2L,281 aminoasitten oluşan sitotoksik bir ligandır. TRAIL ile etkileşebilen 5 reseptör tanımlanmıştır. Bu reseptörler, iki apoptozis indükleyici reseptör TRAIL-R1(DR4), TRAIL-R2(DR5) ile bunun yanında tuzak yada yalancı reseptör olarak da adlandırılan, apoptozis sinyali göndermede yetersiz kalan iki bağlı reseptör olan TRAIL-R3(DcR1), TRAIL-R4(DcR2) ve çözülebilir bir reseptör olan osteoprotegerin (OPG)'dir. TRAIL, proapoptotik reseptörler olan TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 reseptörlerine bağlanarak apoptozise yol açar ve bu reseptörlere ayrıca ölüm reseptörleri (Death Receptor-DR) [TRAIL-R1(DR4), TRAIL-R2(DR5)] de denir. TRAIL'in, hücre ölümüne yol açmayan, fonksiyonel olmayan, ölüm domaini taşımayan solubl reseptör OPG veya tuzak reseptörlere (TRAIL-R3,TRAIL-R4) bağlanması apoptozise yol açmaz (95). Normal hücrelerde büyük bir yoğunlukta TRAIL-R3 ve TRAIL-R4 bulunurken, ölüm reseptörlerinin sadece transforme hücrelerde bulunduğu tespit edilmiştir (96). Bunun sayesinde TRAIL'in iki önemli özelliği vardır. İlk özelliği tümör hücrelerini ve transforme hücreleri seçici olarak tanınması ve bu anormal hücrelerde apoptozisi indüklemesidir. Diğer önemli özelliği ise, TRAIL'in normal hücrelerde apoptozisi indüklememesi ve normal hücrelere sitotoksitesininin minimal olmasıdır (4).

TRAIL-R1 ve/veya TRAIL-R2, ekstrinsik apoptozis yolağını indükler. Çalışmalarda kullanılan ve bizimde kullandığımız TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'yi spesifik olarak indükleyen TRAIL'in diğer ismi recombinant human TRAIL (rhTRAIL) olup, kısaca TRAIL olarak kullanılmaktadır. TRAIL'in TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'ye bağlanması, ölüm domaini içeren adaptor molekül Fas ile ilişkili ölüm domaini yoluyla apoptozis başlatıcı olan kaspaz-8 ve kaspaz-10'u aktive eder. Kaspaz-8 ve -10, sırasıyla efektör kaspazları (-3, -6, -7) aktive eder. Bazı kanser hücrelerinde kaspaz-3'ün, TRAIL indüklü aktivasyonu, daha çok intrinsik apoptozis yolağı ile arttırılır. Bu durumda kaspaz-8 ve -10, Bcl-2 ailesi üyesi proapoptotik Bid'i bölerek aktive eder. Bid, mitokondriden Smac/Diablo ve sitokrom c salınımını indüklemek için, Bax ve Bak gibi pro-apoptotik aile üyeleri ile etkileşir. Sitokrom c, Apaf-1 ile birlikte başlatıcı kaspaz-9'u aktive eder. Kaspaz-9'da, kaspaz-3, -6 ve -7'i aktive eder (58). TRAIL mRNA'sı çeşitli normal dokularda eksprese edilirken,

TRAIL proteinin fonksiyonel ekspresyonu daha çok immun hücrelerde (T hücreleri, natural killer hücreleri gibi) gözlenmektedir. TRAIL'ın fizyolojik rolü tam olarak anlaşılamamasına rağmen TRAIL'den yoksun fareler, otoimmün hastalıklara hassasiyet dışında büyük bir anormallik göstermemişlerdir. Bu TRAIL'ın başlıca immun sistemde rolünün olduğunu düşündürmektedir (55).

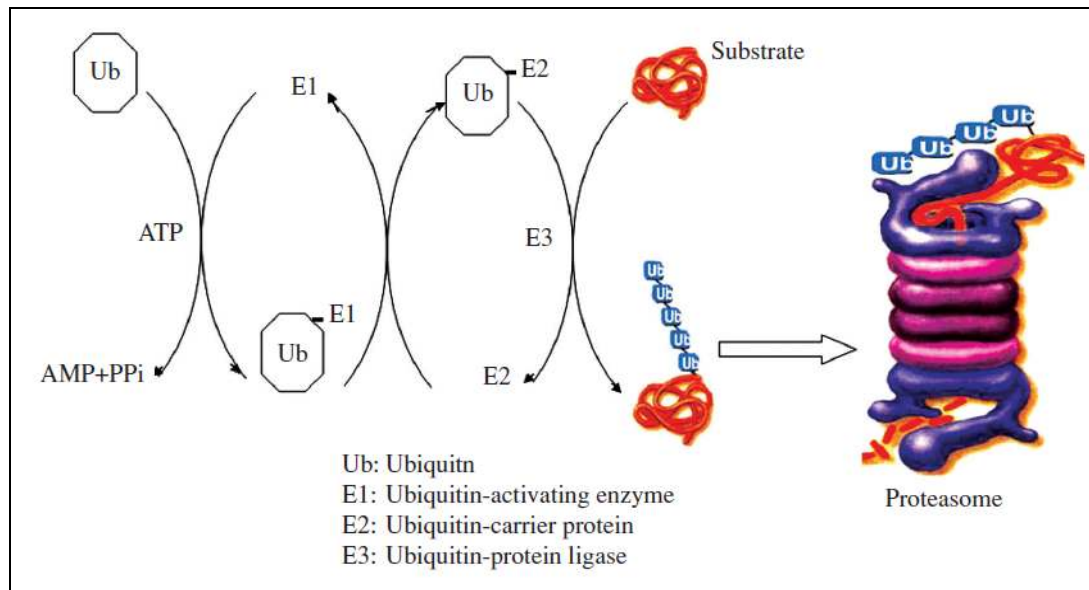
Yapılan pek çok çalışmada TRAIL'in, akciğer, meme, kolon ve prostat gibi çeşitli tümör hücre dizilerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. TRAIL hayvan ksenograftlarında *in vivo* olarak da test edilmiştir. Fare ve primatlarda ksenograftlar TRAIL ile tedavi edildiklerinde tümör büyümesi inhibe olmuş ve normal hücrelerde herhangi bir yıkıcı etki göstermeksizin, malignant hücrelerde apoptozis indüklenerek tümörün gerilemesi ile sonuçlanmıştır (97). Son yıllarda yapılan faz-I ve faz-II klinik çalışmalarda, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'yi spesifik olarak uyaran rhTRAIL'in normal hücrelerde önemli bir yan etki oluşturmada kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (98-100). Mezenkimal kökenli birçok kanserde TRAIL ile yeni tedavi yaklaşımları araştırılmaktadır (7, 101). Ayrıca yine son zamanlarda yapılan çalışmalar ile TRAIL'ın kanser metastazlarının tedavisinde de etkili olduğu gösterilmiştir (98,102). TRAIL'ın bu özellikleri kanserde yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmesi için oldukça ümit vericidir.

2.7. Ubikitin-Proteazom Yolu

Hücre içinde oluşan anormal proteinler (yanlış katlanmış) veya zamanla oluşan istenmeyen proteinler, ubikitinlerle işaretlenir ve proteazom kompleksi (26S proteazom) aracılığıyla yıkılır (103,104). Ubikitin, 76 aminoasit içeren bir protein olup hedef substratlara ubikitin aktifleştirici enzim (E1), ubikitin konjuge edici enzim (E2) ve ubikitin ligaz (E3) denen 3 enzimin sırasıyla etkinleşmesi ile bağlanan ve onları proteoliz için proteazom kompleksine yönlendiren küçük bir hücresel proteindir (Şekil 2.5). Ubikitin molekülü anormal bir hücrenin malign hücreye dönüşümüyle ilgili hücre içi sinyaller, hücre proliferasyonu, bağışıklık yanıtı ve transkripsiyonun düzenlenmesi gibi birçok moleküler homeostatik mekanizmaya katılır (105).

Proteazom kompleksi (26S), hücre siklusunun regülasyonunda ve ubikitin tarafından işaretlenen proteinlerin yıkımında önemli rol alan bir proteaz kompleksidir

ve okside olmuş, yapısı bozulmuş hücresel proteinleri aminoasit bileşenlerine kadar parçalayarak protein turnoverini sağlar (106). Substrat proteinin 26S proteazomal yıkıma yönlendirilebilmesi için en az dört ubiquitin molekülünden oluşan bir poliubiquitin zinciri ile bağlanmış olması gereklidir. Bir proteinin ubiquitin-proteazom yolağı aracılığı ile yıkılması iki aşamayla olur: Önce hedef substrat çoklu ubiquitin zincirlerine kovalent olarak tutunur, sonra ise tutunan protein, ubiquitini serbest bırakacak şekilde yıkılır (107) (Şekil 2.5).



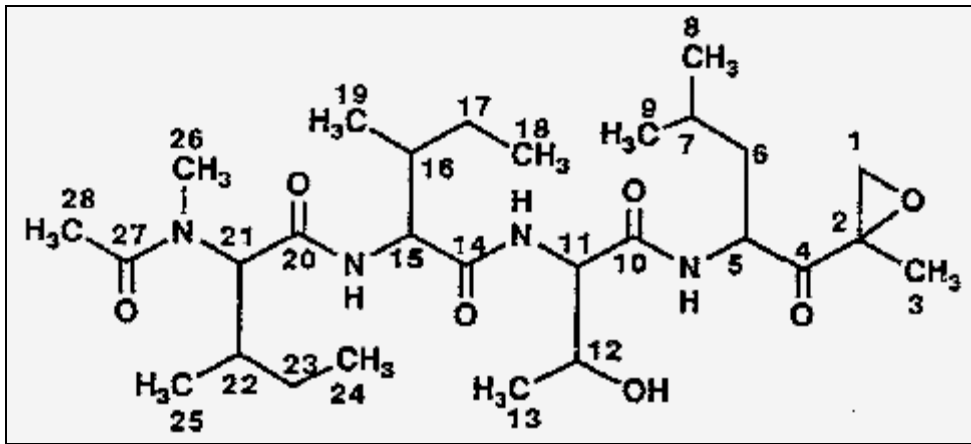
Şekil 2.5. Ubikitin-proteazom yolağı.

26S Proteazom, bir 20S ana yapıdan ve iki 19S düzenleyici yapıdan oluşan 40'dan fazla alt birim içeren 2400 kDa'luk bir proteaz kompleksidir (108). Proteazom kompleksinin çalışma şekli ve rolü son yıllarda aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Okside olmuş ya da yapısı bozulmuş proteinlerin yanında aynı zamanda birçok pro- ve anti-apoptotik protein de, proteazom kompleksinin substratı olarak tanımlanmıştır (7).

2.8. Proteazom İnhibitörleri ve Epoxomicin

Epoxomicin (epoksomisin), bortezomib, MG132 ve lactacystin (laktasistin) en iyi bilinen ve en önemli proteazom inhibitörleridir. Bunlar çeşitli etki mekanizmaları ile ubiquitin proteazom yolağını proteazom üzerinden inhibe etmektedirler. Proteozom inhibitörleri ile yapılan çalışmalar hücre içi proteinlerinin yaklaşık %80-90'ının yıkımı için proteazomun gerekli olduğunu göstermiştir. 26S proteazom tarafından yıkılan proteinler arasında poliamin biyosentez enzimleri; ornitin dekarboksilaz, S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz, hücre yaşamında anahtar rol oynayan proteinlerden transkripsiyon faktörü c-Fos, M-, S-, G1- fazı spesifik siklinleri, siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri, hücre apoptozisinde rol alan önemli proteinler, p53, NF-κB inhibitörü IκB ve onkogenler bulunmaktadır (109-111).

Epoxomicinin *vivo* ve *in vitro* olarak anti-inflamatuvar etkinliği iyi bilinen hücre içine geçebilen selektif irreversible bir proteazom inhibitörüdür (106). Epoxomicin, *Actinomyces* bakterilerinden izole edilmiş epoxy-keton yapısında doğal bir proteazom inhibitördür (112) (Şekil 2.6). Epoxomicinin doğal, yüksek derecede selektif ve irreversible olması önemli özelliklerindendir (106,113). Epoxomicin, proteazomal proteazlara selektif olmasına rağmen diğer bazı proteazom inhibitörleri, örneğin MG132 ve lactacystin, proteazomal proteazlara selektif değildir. Bunlar proteazomal proteazları geri dönüşümlü olarak inhibe etmesinin yanında katepsin B, kalpan, papain, kimotripsin ve tripsin gibi diğer bazı proteazları da inhibe etmektedirler (106,114).



Şekil 2.6. Epoxomicin (C₂₈H₅₀N₄O₇) açık formülü.

Proteazom inhibitörleri birçok çalışmada kanser hücrelerine karşı yeni bir tedavi seçeneği olarak denenmektedir (115,116). Bortezomib/PS (Velcade), Amerikan Food and Drug Administration (FDA) tarafından 2003 yılında Multiple Myeloma hastalarında kullanılmak üzere onaylanan ilk anti-kanser etkili proteazom inhibitörü olmuştur (117). En son olarak 2012 yılında, epoxomicin türevi olan epoxy-keton yapılı irreversible proteazom inhibitörü Carfilzomib yapılan klinik faz çalışmaları sonucu başarılı olarak bulunmuş ve plazma hücre kanseri olarak bilinen Multiple Myeloma hastalığında kullanılmak üzere FDA tarafından onay almıştır (118,119). Bu gelişmeler proteazom inhibitörlerinin anti-kanser ve pro-apoptotik etkilerinin araştırılmasını daha da cazip hale getirmektedir.

Ayrıca literatürde proteazom inhibitörlerinin Ewing sarkomu, kolon karsinomu, renal hücreli karsinom gibi birçok kanser tipinde TRAIL hassasiyetini arttırdığını bildiren çalışmalar vardır (120). Örneğin bir proteazom inhibitörü olan bortezomibin Ewing Sarkomu'na karşı etkinliğini, epoxomicinin kolon karsinomuna karşı TRAIL ile birlikteki etkinliğini araştıran çalışmalar mevcuttur (6,7). Ancak literatürde epoxomicinin osteosarkom hücrelerindeki etkilerini ve TRAIL hassasiyeti üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Bu nedenle epoxomicinin osteosarkom hücrelerinde apoptozis ve hücre sitotoksitesi üzerindeki etkilerini ve epoxomicinin TRAIL'a dirençli MG-63 ve Saos-2 hücre dizilerinde TRAIL hassasiyetini arttırıp arttırmadığını araştırdık.

3. MATERYAL ve METODLAR

3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. Hücre dizileri (MG-63 ve Saos-2) ve kullanılan ilaçlar

MG-63 hücreleri American Type Culture Collection (ATCC)'den, Saos-2 hücreleri ise Ankara Şap Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

Saos-2 hücreleri,%10 fetal sığır serumu, %1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren steril Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyerinde 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe kültür edilerek çoğaltıldı ve deneylerde kullanıldı.

MG-63 hücrelerini %10 fetal sığır serumu, %1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren steril Eagle's minimal essential medium (EMEM) besiyerinde 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe kültür edilerek çoğaltıldı ve deneylerde kullanıldı.

Recombinant human TRAIL, R&D Systems (USA&Canada)'den, Epoxomicin ise Cayman Chemical Company (USA)'den temin edildi.

3.1.2. Hücrelerin deneylere hazırlanması için gerekli çözeltiler

1. **DMEM ve EMEM:** ATCC'den alındı. Kullanılacağı zaman 50 ml steril, inaktive edilmiş FBS (Fetal Sığır Serumu) ve 5 ml steril penisilin-streptomisin çözeltisi eklendi. +4°C'de saklandı.
2. **FBS (Fetal Sığır Serumu):** 500 ml Sigma'dan inaktive edilmiş olarak temin edildi. 10'ar ml'lik tüplere bölünerek -20°C'de saklandı.
3. **Penisilin-streptomisin:** Biological Industries'den 100 ml alındı. Kullanılmadığı sürece -20°C'de saklandı.
4. **DMSO (Dimetil Sülfoksit):** Sigma'dan 100 ml alındı. Oda ısısında saklandı.
5. **Hücre dondurma çözeltisi:** %5 DMSO içeren medyum steril bir tüpte hazırlandı ve hücre pelleti üzerine 1 ml eklendi. Bu solüsyon hücreler dondurulacağı zaman taze olarak hazırlandı.
6. **Tripan mavisi çözeltisi (%0.5'lik):** Biological Industries'den hazır olarak alındı. Oda ısısında saklandı.

7. **Tripsin-EDTA:** Biological Industries'den hazır olarak alındı. Çözülerek kısımlara ayrıldı ve -20°C'de saklandı.

3.1.3. Hücrelerin çoğaltılması

Hücreler %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin çözeltisi içeren steril besiyerlerinde 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe kültür edilerek çoğaltıldı. Hücreler çok yoğunlaştıkları zaman yapıştıkları flasktan kaldırılarak yeni flasklara pasajlandı. İlk olarak medyum flaskdan uzaklaştırıldı ve atıldı. 25 cm²'lik flasklar için 1 ml Tripsin-EDTA eklendi ve hücreler kalkana kadar inverted mikroskop altında gözlendi. Flaska 6-8 ml uygun medyum eklenerek santrifüj tüpüne aktarıldı ve 150 x g'de 5-7 dakika santrifüj edilerek pellet elde edildi. Bu pellet medyum ile tekrar süspanse edilerek yeni flasklara dağıtıldı. Hücreler, 37°C'de, %5'lik CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe uygun medyum içinde inkübe edilerek üretildi. Haftada iki ya da üç kez konfluent olmadan ya da yüzeyden kalkmadan alt kültürleme yapıldı.

3.1.4. Hücrelerin dondurulması

Daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere hücrelerin bir kısmı stoklandı. Bunun için hücreler uygun şekilde donduruldu. Hücreler, Tripsin-EDTA ile flasktan uygun şekilde kaldırıldı ve medyum eklenerek 150 x g'de 5-7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kalan pellet, %95 tam hücre medyumuna ve %5 (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO)'dan oluşan dondurma medyumuna içerisinde tekrar süspanse edildi. Hücre süspanسیونları, cryo tüplere dağıtıldı ve kademeli dondurma yapmak için izopropil alkol içeren dondurma kabı (freezing container) içinde 4 saat -80°C'de tutuldu. 4 saatten sonra cryo tüpler sıvı nitrojen tankına transfer edildi.

3.1.5. Hücrelerin çözülmesi

Dondurulan bu hücreler deneylerde kullanılmak üzere hücreye ihtiyaç olduğunda çözüldü. Bu işlem aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi. Hücreleri içeren vial 37°C su banyosunda hafifçe sallanarak çözüldü. Kontaminasyon olasılığını azaltmak için suyun yüzeyinde tutuldu. Çözdürme işlemi hızlı bir şekilde yapıldı (Yaklaşık 2 dakika). İçeriği çözülür çözülmez vial su banyosundan uzaklaştırıldı ve vialin dışı

%70'lik alkolle silindi. Bu aşamadan sonraki işlemler sıkı aseptik koşullar altında yapıldı. Vial içeriği tüpe boşaltılıp üzerine damla damla medyum eklendi. 150 x g'de 7 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücre içeren pellet uygun medyumla tekrar süspanse edildi ve kültür flasklarına dağıtıldı. Hücreler, 37°C'de ve %5'lik CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edilerek üretildi.

3.2. Çalışma Grupları ve Deneyler

Deney 1. Epoxomicine karşı Saos-2 ve MG-63 hücrelerinin hassasiyetinin belirlenmesi

Saos-2 ve MG-63 hücrelerinin epoxomicinin 50-1000 nM arasında değişen farklı dozları ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonrası, MTT ve WST-8 sitotoksitesite testleri ile epoxomicin hassasiyetleri değerlendirildi. MG-63 ve Saos-2 hücreleri için epoxomicinin lethal doz 50 düzeyleri (LD₅₀) dozları hesaplandı.

Deney 2. TRAIL'a karşı Saos-2 ve MG-63 hücrelerinin hassasiyetinin belirlenmesi

Saos-2 ve MG-63 hücrelerinin, TRAIL'in 25-1000 ng/ml arasında değişen farklı dozları ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonrası, MTT ve WST-8 sitotoksitesite testleri ile TRAIL'a karşı hassasiyetleri değerlendirildi.

Deney 3. TRAIL ve epoxomicinin kombine dozlarına karşı sitotoksitesite ve canlılık testleri

Bu deneylerde Saos-2 ve MG-63 hücrelerinde, farklı doz kombinasyonlarında birlikte uygulanan TRAIL (25-100 ng/ml) ve epoxomicinin (25-100 nM) 24 saatlik hücre canlılığı üzerine etkisi araştırıldı.

Deney 4. Apoptozis ve Kaspaz deneyleri

Bu deneylerde aşağıdaki gibi gruplara ayrılmış OS hücrelerinde, TUNEL testi, pro-apoptotik protein olarak Bax proteini düzeyleri, efektör kaspaz olarak kaspaz-3, başlatıcı kaspaz olarak ise kaspaz-8, intrinsik yolak aktivasyonunu gösteren kaspaz olarak kaspaz-9 aktiviteleri ölçüldü.

Saos-2 hücreleri için gruplar:

- Grup 1.** Saos-2 kontrol hücre grubu
- Grup 2.** Sadece 100 ng/ml TRAIL ile inkübe edilen Saos-2 hücre grubu
- Grup 3.** Sadece 100 nM epoxomicin ile inkübe edilen Saos-2 hücre grubu
- Grup 4.** 100 ng/ml TRAIL + 100 nM epoxomicin ile inkübe edilen Saos-2 hücre grubu

MG-63 hücreleri için gruplar:

- Grup 1.** MG-63 kontrol hücre grubu
- Grup 2.** Sadece 100 ng/ml TRAIL ile inkübe edilen MG-63 hücre grubu
- Grup 3.** Sadece 100 nM epoxomicin ile inkübe edilen MG-63 hücre grubu
- Grup 4.** 100 ng/ml TRAIL + 100 nM epoxomicin ile inkübe edilen MG-63 hücre grubu

3.3. Hücre Canlılık ve Sitotoksosite Deneyleri

3.3.1. MTT ile sitotoksosite ölçümleri

Epoxomicinin MG-63 ve Saos-2 hücrelerinin yaklaşık %50'sini öldürücü dozu (LD₅₀), MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid] testi ile belirlendi ve 24, 48 ve 72. saatlerdeki LD₅₀ değeri bulundu.

MTT, canlı hücreler tarafından parçalanarak koyu mavi renkte formazan ürünü veren açık sarı renkli bir maddedir. Oluşan mavi rengin yoğunluğu hücre canlılığının bir ölçütüdür.

Kullanılan MTT kiti aşağıdaki 3 maddeyi içermektedir;

1. **Reaktif A:** MTT, (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difenil tetrasodyum bromid), 50 mg/kuyucuk.
2. **Solüsyon B:** PBS pH 7.4, 15 ml
3. **Solüsyon C:** 0.04 N HCl içeren izopropanol, 100 ml

Sitotoksosite deneyleri ile canlılık düzeyi ölçümü, inkübasyon gününe bağlı olarak 3 ile 5 gün arasında sürdü. Deneylerin birinci günü hücreler flasklardan tripsin ile kaldırıldı. Uygun medyum eklenerek 150 x g'de 7 dakika santrifüj edildi. Pellet 1 ml medyum ile tekrar süspanse edildi. Hücre süspanسیونundan 10 µl alınarak hücreler sayıldı. Bütün MTT çalışmalarında, 20.000 hücre/kuyu olacak şekilde

ayarlanarak hücreler kuyulara 100 µL medyum içerisinde ekildi. Hücrelerin kuyulara ekilmesinden 24 saat (hücrelerin kuyucuklara yapışması için gereken süre) sonra kuyulardaki medyum atılarak, belirlenen dozlardaki TRAIL ve/veya epoxomicin içeren medyum kuyulara uygulandı. Her TRAIL ve/veya epoxomicin dozları için en az 6 kuyucuğa ekim yapıldı ve her doz 6 farklı çalışma yapılarak değerlendirildi. Hücreler, belirlenen dozlardaki maddeler ile 24, 48 ve 72 saat süresince 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. Daha sonra bu hücrelerde TRAIL ve epoxomicin hassasiyeti, MTT sitotoksitesite kiti çalışılarak belirlendi.

Farklı TRAIL ve/veya epoxomicin dozları ile farklı zaman sürelerinde inkübe edilmiş hücre içeren her kuyuya 0.01 mL A+B solüsyonundan (MTT+PBS) eklendi ve 4 saat 37°C’de ve %5’lik CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. İnkübasyon sürecinin sonunda, canlı hücre içeren kuyularda MTT’den oluşan MTT formazan, kuyunun dibinde siyah, ince kristaller olarak görüldü. 0.1 mL solüsyon C’den her kuyuya eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Solüsyon C’deki izopropanol, formazanı çözerek absorbans ölçümü için uygun homojen mavi bir solüsyon meydana gelmesini sağladı. Solüsyon C eklendikten sonra 1 saat içinde, dalga boyu olarak 570 nm ELISA plak okuyucusunda plağın okuması yapıldı.

Kontrol (sadece hücre) ve TRAIL ve/veya epoxomicin uygulanmış kuyuların ortalama absorbans değerlerinden sadece medyum içeren kuyuların ortalama absorbans değerleri çıkartıldı. Yaşayan hücre yüzdesi; sadece hücre içeren kontrol grubunun ortalama absorbans değerlerinin ilaçlarla inkübe edilen hücrelerin ortalama absorbans değerleri ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar % kontrol olarak ifade edildi. Deneyler altı kere tekrarlandı.

3.3.2. WST-8 ile sitotoksitesite ölçümleri

Bu yöntem ekstrasellüler WST-8 [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2*H*-tetrazolium monosodyum tuzu]’in mitokondride üretilen NADH aracılığıyla azaltılması prensibine dayanır. WST-8’in ürettiği formazon kristalleri suda ve hücre kültürü medyumunda direkt olarak çözündüğü için çözücü solüsyona gerek yoktur. Bu kitin içinde sadece WST-8 reaktifi bulunmaktadır.

Sitotoksosite deneyleri ile canlılık düzeyi ölçümü, inkübasyon gününe bağlı olarak 3 ile 5 gün arasında sürdü. Deneylerin birinci günü hücreler flasklardan tripsin ile kaldırıldı. Uygun medyum eklenerek 150 x g'de 7 dakika santrifüj edildi. Pellet 1 ml medyum ile tekrar süspanse edildi. Hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak hücreler sayıldı. Bütün WST-8 çalışmalarında, 20.000 hücre/kuyu olacak şekilde ayarlanarak hücreler kuyulara 100 µL medyum içerisinde ekildi. Yapışmaları için 24 saat beklendi. 24 saat 37°C'de inkübasyon sonrası kuyulardaki medyumlar atılarak yenilendi. Her TRAIL ve/veya epoxomicin dozları için en az 6 kuyuya ekim yapıldı ve her doz 6 farklı çalışma yapılarak değerlendirildi. Hücrelerin kuyulara ekilmesinden 24 saat sonra medyum atılarak, belirlenen dozlardaki TRAIL ve/veya epoxomicin içeren medyum kuyulara uygulandı. Hücreler, belirlenen dozlardaki maddeler ile 24, 48 ve 72 saat süresince 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edildi. Gerekli inkübasyon sürelerinden sonra hücrelerin bulundukları kuyucuklara 10 µl WST-8 solüsyonu eklendi ve 4 saatlik inkübasyon periyodundan sonra 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Bu yöntemde hücre sayısı ile absorbans arasında doğru bir orantı bulunmaktadır. Absorbans değerlerine göre hücre canlılıkları değerlendirildi. Kontrol (sadece hücre) ve TRAIL ve/veya epoxomicin uygulanmış kuyularının ortalama absorbans değerlerinden sadece medyum içeren kuyuların ortalama absorbans değerleri çıkartıldı. Yaşayan hücre yüzdesi; sadece hücre içeren kontrol grubunun ortalama absorbans değerlerinin ilaçlarla inkübe edilen hücrelerin ortalama absorbans değerleri ile karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Sonuçlar % kontrol olarak ifade edildi. Deneyler altı kere tekrarlandı.

3.4. Apoptozisin Belirlenmesi ve Kaspaz Aktivite Ölçümleri

3.4.1. TUNEL deneyleri

Apoptozisin belirlenmesi, Terminal deoxynucleotidyl Transferase [(TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)] prensibine dayanan bir ticari kit (Calbiochem. Cat.No. QIA33) ile yapıldı.

Prensip: Bu kit, lam üzerine fikse edilmiş hücrelerde apoptotik nükleusların DNA'sının tanımlanmasına imkan vermektedir. Bu deneyde TdT(Terminal

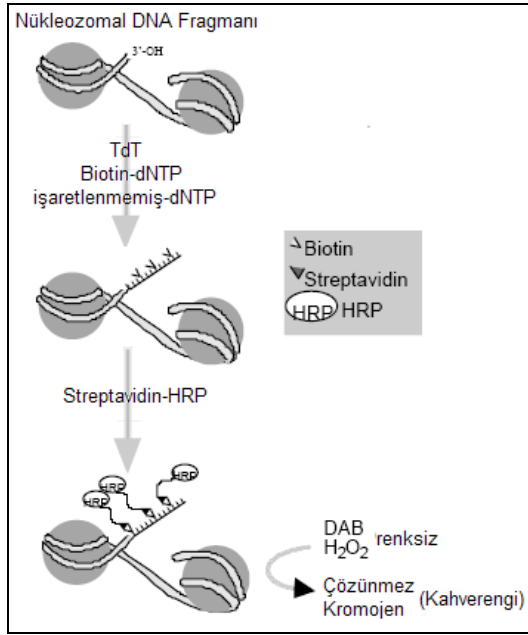
Deoksinükleotidil Transferaz), apoptotik sinyallere cevaben oluşan DNA fragmanlarının 3'-OH ucuna biotin ile işaretlenmiş deoksinükleotidlerin eklenmesini katalizler. Streptavidine bağlanmış haldeki horseradish peroksidaz (HRP) biotinlenmiş nükleotidlere bağlanır. Diaminobenzidin, DNA fragmantasyon bölgelerinde işaretlenmiş örnekler ile reaksiyona girerek çözünmeyen renkli bir substrat oluşturur. Apoptotik hücrelerde metilen yeşili (Metil green) koyu kahverengine dönüşür (Şekil 3.1).

Reaktifler:

1. Proteinaz K: 10 mM Tris içerisinde 2 mg/ml Proteinase K, pH 8
2. 5X TdT Denge Tamponu: 1 M Sodium Cacodilate, 0.15 M Tris, 1.5 mg/ml BSA(sığır serum albumin), 3.75 mM CoCl₂, pH 6.6
3. TdT enzimi
4. TdT işaretleme reaksiyon karışımı
5. Durdurma Tamponu: 0.5 M EDTA, pH 8
6. Bloklama Tamponu: PBS (Phosphate buffered saline) içerisinde %4 BSA
7. 50X Konjugat: Peroksidaz streptavidin konjugatı: 50-kat konsantre solüsyon
8. DAB Taletleri: 3,3'Diaminobenzidine (0.7 mg/tablet)
9. H₂O₂/Üre Taletleri: H₂O₂/üre (1.6 mg/tablet)
10. Metil Green boyası: %0.3 Metil green

Hücreler belirlenen dozlardaki maddelerle 24 saat inkübe edildikten sonra 10⁶/ml dansitesinde %4 formaldehit (1X PBS) çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek lam üzerine fikse edildi. Ardından oda ısısında 20 dakika Proteinaz K ile inkübe edildi ve TBS ile yıkandı. Örnekler 20 dakika süre ile 1 µg/µl DNase I ile inkübe edilip TBS ile yıkandı. Endojen peroksidazların inaktivasyonu için örnekler 5 dakika süre ile %3 H₂O₂ ile inkübe edilerek TBS ile yıkandı. Örnekler TdT Denge Tamponu ile oda ısısında 20 dakika kadar inkübe edildi. Ardından örnekler üzerine TdT ile işaretlenmiş DNA fragmanlarını optimize etmek için işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotid karışımı içeren TdT işaretleme reaksiyon karışımı eklendi ve durdurma tamponu ile reaksiyon durduruldu ve TBS ile yıkandı. Ardından örnekler 10 dakika DAB solüsyonu ile inkübe edildikten sonra distile su ile yıkandı. Örnekler metilen yeşili ile muamele edilerek önce %100 etanol

eklenip ardından ksilen içine alındı. Bu işlemden sonra ışık mikroskopunda incelenmek üzere lamalar lamel ile kapatıldı. Işık mikroskobu ile tüm numuneler değerlendirildi. Apoptozise uğramış hücreler DAB ile koyu kahverengi olarak gözlenirken, apoptozise uğramayan hücreler ise açık kahverengi olarak belli belirsiz boyandılar.



Şekil 3.1. DNA fragmanlarının 3'-OH ucunun biotin ile işaretlenmesi ve HRP bağlanması.

3.4.2. Kaspaz deneyleri

3.4.2.1. Hücre lizatlarında Kaspaz-3 aktivitesinin ölçümü

Saos-2 ve MG-63 hücrelerinde kaspaz-3 aktivite tayini ticari bir kit (Cat. KHZ0022. BioSource International, Inc.) ile yapıldı.

Prensip: Kaspaz-3, DEVD aminoasit sekansı ile tanımlanır. DEVD-*p*NA (Asp-Glu-Val-Asp-*p*-nitroanilide) substratının kaspaz-3 tarafından kırılması sonucu açığa çıkan serbest *p*NA 400-405 nm'de absorbans artışına neden olur.

Reaktifler:

1. Hücre Lizis Tamponu (25 ml ya da 100 ml): Tris tamponlu salin içeren deterjan içerir.
2. 2x Reaksiyon Tamponu (2 ml ya da 16 ml): Tamponlanmış salin, gliserol ve deterjan içerir.

3. Substrat (125 µl ya da 1000 µl): DMSO içerisinde 4 mM pNA kromoforuna konjuge sentetik peptid (sekans: DEVD) içerir.
4. Dilusyon Tamponu (25 ml ya da 200 ml): HEPES, Tris ve NaCl içeren tampon solüsyonu içerir.
5. DTT (100 µl ya da 800 µl): 1 M dithiothreitol içerir.

MG-63 ve Saos-2 hücrelerinin kontrol, 100 ng/ml TRAIL, 100 nM epoxomicin, 100 ng/ml TRAIL + 100 nM epoxomicin kombine doz gruplarının 24 saatlik inkübasyonlarını takiben hücreler sayılarak her örnek peletinde 3×10^6 hücre olacak şekilde ayarlandı. Hücreler 50 µL soğutulmuş lizis tamponu ile resüspanse edilerek 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Ardından $10,000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi. Sitozolik ekstrakt olan süpernatant yeni tüpe aktararak buz üzerine alındı. Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlendi. Her bir sitozolik ekstrakt 50 µL lizis tamponunda 50-200 µg konsantrasyonunda protein olacak şekilde dilüe edildi. Ölçülen örneklerin sayısı belirlenerek her örnekte 2x reaksiyon tamponundan 50 µL cam tüplere aktarıldı ve üzerine 1.0 M DTT'den 10 µL eklendi. Her örneğe 2x reaksiyon tamponundan 50 µL aktarıldı. 4 mM DEVD-pNA substratından 5 µL eklenerek 37°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon karanlıkta gerçekleştirildi. 400 nm'de mikropate okuyucuda okuma yapıldı.

Kaspaz-3 aktivitesi seviyesindeki katlı artış apoptozisin uyarımının yapılmadığı hiçbir madde ile inkübe edilmeyen kontrol hücreleri ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.4.2.2. Hücre lizatlarında Kaspaz-8 aktivitesinin ölçümü

Saos-2 ve MG-63 hücrelerinde kaspaz-8 aktivite tayini ticari bir kit (ApoTarget kit, code: KHZ0061: BioSource International, Inc.) ile yapıldı.

Prensip: Kaspaz-8, IETD(Ile-Glu-Thr-Asp) amino asid sekansını tanır. Bu sekans, inaktif 32 kDa'luk kaspaz-3 prekürsörünün (172-175. amino asidler) kırılma noktalarından birine karşılık gelir. Substrat olan IETD-pNA, *p*-nitroanilide (*p*-NA) kromoforu ve sentetik bir tetrapeptid olan IETD'yi içermektedir. IETD-pNA (Ile-Glu-Thr-Asp-*p*-nitroanilide) substratının kaspaz-8 tarafından kırılması sonucu açığa

ıkan serbest pNA, 405 nm’de absorbands artışına neden olur. Bu artışın kontrol ile karşılaştırılması, kaspaz 8 aktivitesini verir.

Reaktifler:

1. Hücre Lizis Tamponu (100 mL): deterjan içeren tris tamponlu serum fizyolojik.
2. Reaksiyon Tamponu (16 mL): serum fizyolojik, gliserol ve deterjan içeren tampon.
3. Substrat (1000  L): DMSO içerisinde 4 mM pNA kromoforuna konjuge edilmiş 4 mM sentetik peptid (IETD sekansı).
4. Dilüsyon Tamponu (200 mL): HEPES, Tris ve NaCl içeren tampon solüsyonu.
5. DTT (800  L): 1 M dithiothreitol

MG-63 ve Saos-2 hücrelerinin kontrol, 100 ng/ml TRAIL, 100 nM epoxomicin, 100 ng/ml TRAIL + 100 nM epoxomicin kombine doz gruplarının 24 saatlik inkübasyonlarını takiben hücreler sayılarak her örnek peletinde 3×10^6 hücre olacak şekilde ayarlandı. Kontrol hücrelerinde apoptozis uyarımı yapılmadı. Hücreler 50  L soğutulmuş lizis tamponu ile tekrar süspanse edilerek 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Ardından 10,000xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Sitozolik ekstrakt olan süpernatant, yeni tüpe aktarılarak buz üzerine alındı. Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlendi. Her bir sitozolik ekstrakt, 50  L lizis tamponunda 50-200  g konsantrasyonunda protein olacak şekilde (1-4 mg/mL) dilüe edildi. Çalışılacak her bir örnek için, reaksiyon tamponundan 50  L cam tüplere aktarıldı ve üzerine kullanımdan hemen önce DTT (dithiothreitol) eklendi (son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde, 1.0 M DTT Stok reaktifinden reaksiyon tamponunun 1 ml’sine 10  L eklendi). Her örneğe 10 mM DTT içeren Reaksiyon tamponundan 50  L aktarıldı. 4 mM IETD-pNA substratından (son konsantrasyon 200  M) 5  L eklenerek 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon karanlıkta gerçekleştirildi. 405 nm’de mikropalak okuyucuda okuma yapıldı.

Kaspaz-8 aktivite seviyesindeki artış apoptozis uyarımının yapılmadığı hiçbir madde ile inkübe edilmeyen kontrol hücrelerinin kaspaz-8 aktive seviyesi ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.4.2.3. Hücre lizatlarında Kaspaz-9 aktivitesinin ölçümü

Kaspaz-9 ölçümleri ticari bir kit (katalog no. KHZ0102. BioSource International, Inc.) ile yapıldı.

Prensip: Kaspaz-9 proteaz deneyi, LEHD (Leu-Glu-His-Asp) amino asid sekansını tanıır. Substrat olan LEHD-*p*NA, *p*-nitroanilide (*p*-NA) kromoforu ve sentetik bir tetrapeptid olan LEHD amino asid sekansını (Leu-Glu-His-Asp) içermektedir. LEHD-*p*NA(Leu-Glu-His-Asp-*p*-nitroanilide) substratının, kaspaz-9 tarafından kırılması sonucu açığa çıkan serbest *p*NA, 405 nm’de absorbands artışına neden olur. Bu artışın kontrol ile karşılaştırılması, kaspaz-9 aktivitesini verir.

Reaktifler:

1. Hücre LizisTamponu (100 mL): deterjan içeren tris tamponlu serum fizyolojik.
2. Reaksiyon Tamponu (16 mL): serum fizyolojik, gliserol ve deterjan içeren tampon.
3. Substrat (1000 µL): DMSO içerisinde *p*NA kromoforuna konjuge edilmiş 4 mM sentetik peptid (sekans: LEHD).
4. Dilusyon Tamponu (200 mL): HEPES, Tris ve NaCl içeren tampon solüsyonu.
5. DTT (800 µL): 1 M dithiothreitol.

MG-63 ve Saos-2 hücrelerinin kontrol, 100 ng/ml TRAIL, 100 nM epoxomicin, 100 ng/ml TRAIL + 100 nM epoxomicin kombine doz gruplarının 24 saatlik inkübasyonlarını takiben hücreler sayılarak her örnek peletinde 3×10^6 hücre olacak şekilde ayarlandı. Kontrol hücrelerinde apoptozis uyarımı yapılmadı. Hücreler 50 µL soğutulmuş lizis tamponu ile tekrar süspanse edilerek 10 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Ardından $10,000 \times g$ ’de 1 dakika santrifüj edildi. Sitozolik ekstrakt olan süpernatant yeni tüpe aktararak buz üzerine alındı. Protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlendi. Her bir sitozolik ekstrakt, 50 µL lizis tamponunda 50-200 µg konsantrasyonunda protein olacak şekilde (1-4 mg/mL) dilüe edildi. Çalışılacak her bir örnek için, reaksiyon tamponundan 50 µL cam tüplere aktarıldı ve üzerine kullanımdan hemen önce DTT eklendi (son konsantrasyon 10 mM olacak şekilde, 1.0 M DTT stok reaktifinden reaksiyon tamponunun 1 ml’sine 10 µL eklendi). Her

örneğe 10 mM DTT içeren reaksiyon tamponundan 50 µL aktarıldı. 4 mM LEHD-pNA substratından (son konsantrasyon 200 µM) 5 µL eklenerek 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon karanlıkta gerçekleştirildi. 405 nm’de mikropalak okuyucuda okuma yapıldı.

Kaspaz-9 aktivite seviyesindeki artış apoptozis uyarımının yapılmadığı hiçbir madde ile inkübe edilmeyen kontrol hücrelerinin kaspaz-9 aktive seviyesi ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.5. Bax Deney Yöntemi

Bax ölçümleri ticari bir kit (katalog no. 900-138 Assay Designs) ile yapıldı.

Prensip: Standart ve örneklerde bulunan Bax proteini, mikropalak kuyu yüzeyine immobilize edilmiş olan monoklonal Bax antikoruna bağlanır. Kit, insan rekombinan Bax-α standardı içermektedir. Kısa bir inkübasyonu takiben, fazla örnek ve standartlar yıkanarak uzaklaştırılır. Bunu takiben biyotinlenmiş monoklonal Bax antikoru eklenir. Bu antikor, plak üzerinde yakalanmış Bax’a bağlanır. Kısa bir inkübasyonu takiben, fazla antikor uzaklaştırılır. Streptavidin ile konjuge edilmiş HRP eklenir. Streptavidin ile konjuge edilmiş HRP, biyotinlenmiş monoklonal Bax antikoruna bağlanır. Bağlanamayan fazla streptavidin ile konjuge edilmiş HRP atılır. Substrat eklenir. Kısa bir inkübasyonu takiben, enzim reaksiyonu durdurularak oluşan renk 450 nm’de okunur.

Reaktifler:

1. Bax Antikoru (10 mL): Sarı renkli Bax’a karşı biyotinlenmiş monoklonal antikor. 3-16 amino asitli bu antikor sadece insanlarda aktivite gösterir.
2. Deney Tamponu (100 mL): Deterjan ve protein içeren tris tamponlu serum fizyolojik (TBS).
3. Bax Konjugatı (10 mL): HRP konjuge edilmiş mavi renkli Streptavidin solüsyonu.
4. Yıkama Tamponu (100 mL): Deterjan içeren tris tamponlu serum fizyolojik (TBS). 950 mL deiyonize su ile dilüe ederek kullanılır.

5. İnsan Bax standardı: rekombinant insan Bax (20.000 pg/ml) solüsyonu. 6 standard polipropilen tüp hazırlanır. Birinci tüpe 900 µl, iki-altıncı tüplere 500 µl deney tamponu konur. Birinci tüpe 20.000 pg/ml standarttan 100 µl konur ve vortekslenir. Birinci tüpten 500 µl ikinci tüpe transfer edilir ve vortekslenir. Altıncı tüpe kadar bu işlem tekrarlanır.
6. TMB Substratı (10 mL): 3,3',5,5'Tetrametilbenzidin (TMB) ve H₂O₂ solüsyonu.
7. Durdurma solüsyonu (10 mL): 1N Hidroklorik asit solüsyonu.
8. Hücre Lizis Tamponu (100 ml): 100 mM PBS, pH 7.3, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, %0.5 Triton X-100 and %0.005 Tween 20. Kullanmadan hemen önce Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, son konsantrasyon 1 mM) ve Protease Inhibitor Cocktail (PIC, 0.5 µL/mL) eklenir.

Hücreler 1 ml'de 4×10^6 hücre olacak şekilde ayarlandıktan sonra lizis tamponu ile parçalandı ve deney tamponu ile dilüe edildi. Yüzeyi Bax antikoru ile kaplanmış kuyulara her örnek ve standarttan 100 µL pipetlendi. Kör kuyularına 100 µL deney tamponu kondu. Daha sonra plak kapatılıp, 1 saat süresince plak çalkalayıcısında 500 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonu takiben kuyular boşaltıldı ve 400 µl yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandılar. Seri yıkamaların ardından, 100 µL Bax'ı tanıyan biyotinlenmiş sarı antikor, kör hariç bütün kuyulara pipetlendi. Plak kapatıldı ve 1 saat plak çalkalayıcısında 500 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonu takiben kuyular boşaltıldı ve 400 µl yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandılar. Seri yıkamaların ardından streptavidin konjuge HRP'den 100 µL, kör hariç bütün kuyulara pipetlendi Plak kapatıldı ve 30 dak 500 rpm'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben kuyular boşaltıldı ve 400 µl yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandılar. Bütün kuyulara 100 µL substrat eklendi ve oda ısısında 30 dakika 500 rpm'de inkübe edildiler. Bütün kuyulara durdurma solüsyonundan 100 µL eklenerek 450 nm'de okuma yapıldı.

Standart ve numunelerin ortalama optik dansitelerinden (OD), köre ait ortalama OD çıkartılarak ortalama net OD bulundu. Standartlara ait OD değerlerine karşılık Bax konsantrasyon grafiğini çizilerek, numunelerin Bax konsantrasyonlarını bu grafikten hesaplık.

3.6. BRADFORD Protein Tayin Yöntemi

Protein ölçümleri ticari bir kit (Coomassie Plus Kit No. 22236) ile yapıldı. Coomassie Plus Kit, protein kantitasyonunda kullanıma hazır, hızlı bir kolorimetrik yöntemdir.

Standart ve Deney Reaktiflerinin Hazırlanması

Sığır albumin standardı, değişik oranlarda dilue edilerek farklı konsantrasyonlarda protein standartları elde edildi. Coomassie Plus Reaktif, kullanılmadan hemen önce şişe alt üst edilerek karıştırıldı. Kullanılacak miktar ayrıldı ve kullanmadan önce oda ısısına getirildi.

Deneyin Yapılışı

Standard ve örneklerden 10 µl, mikropak kuyularına pipetlendi. Her kuyuya 300 µl Coomassie Plus Reaktif eklendi ve 30 saniye plak karıştırıcısında karıştırıldı. Plak karıştırıcıdan alındı ve oda ısısında 10 dakika bekletildi. Plak okuyucusunda standard ve örneklerin absorbansları 595 nm’de ölçüldü.

Standartların absorbanslarından körün absorbansı çıkartılarak net standart absorbansları hesaplandı. Net standart absorbanslarına karşı standart konsantrasyon grafiği çizildi. Örneklerin protein konsantrasyonları bu grafikten yararlanarak hesaplandı.

3.7. İstatistiksel Analiz

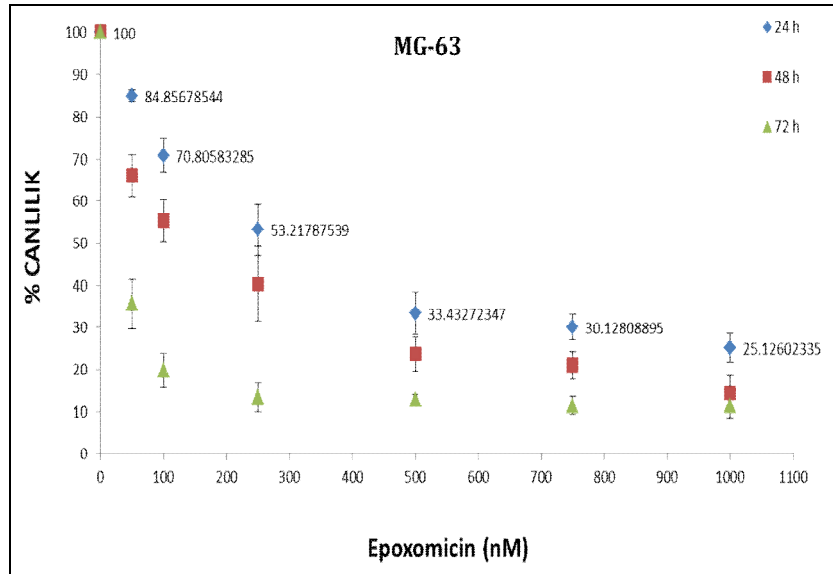
İstatistiksel analizler için SPSS 18.0 istatistik programı ve lojistik regresyon model ile lethal doz 50 düzeyleri (LD₅₀) hesaplanması için Graphpad Prism version 5.0 programı kullanıldı. Her bir deney için kullanılan istatistik yöntemi ve açıklamaları ilgili deney bölümünde ayrıntılı olarak anlatıldı. Çalışmalarımızda her deney altı kez (n=6) tekrarlandı ve veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunuldu. P<0.05 istatistik olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Osteosarkom Hücrelerinde Epoxomicinin Sitotoksitesi

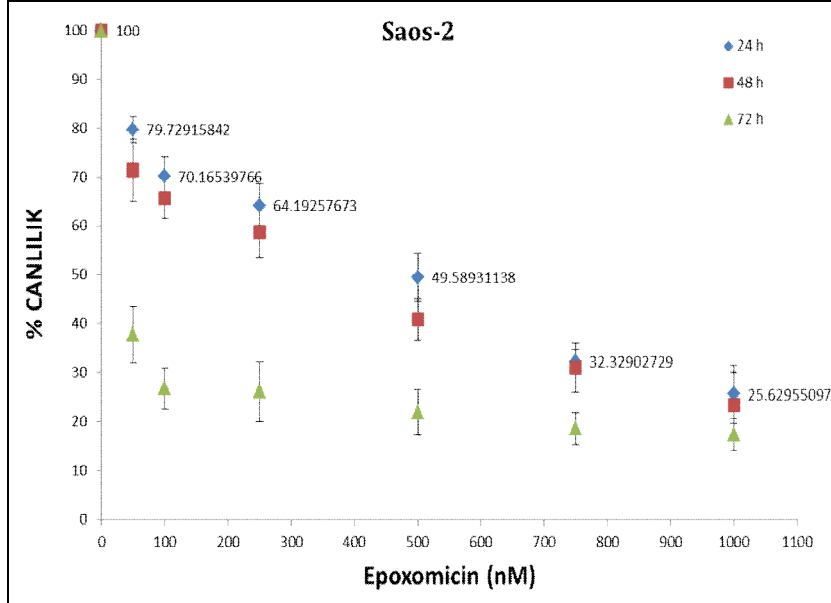
Canlılık çalışmaları için MG-63 ve Saos-2 hücrelerinde bağımsız 6 deney yapıldı ve sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. Yaptığımız sitotoksite deneylerinde osteosarkom hücrelerini epoxomicin ile 50-1000 nM doz aralığında, 24, 48 ve 72 saat süresince inkübe ettik. Yaptığımız One Sample Kolmogorov Smirnov testleriyle grupların kendi içerisindeki veriler birbiriyle uyumlu çıktı ($P>0,05$). Bulduğumuz deney sonuçlarına göre, Graphpad Prism version 5.0 programı kullanarak yaptığımız lojistik regresyon model ile %95 güven aralığında (%95 CI) epoxomicinin, MG-63 ve Saos-2 hücreleri üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik LD₅₀ (kanser hücrelerinin %50'sini öldüren doz) dozlarını hesapladık (121).

MG-63 hücrelerinde epoxomicinin LD₅₀ dozlarını, farklı epoxomicin dozlarıyla 24 saatlik inkübasyon sonrası 272 nM (%95 CI; 235-315), 48 saatlik inkübasyon sonrası 124 nM (%95 CI; 100-151) ve 72 saatlik inkübasyon sonrası 12 nM (%95 CI; 3-44) olarak bulduk ($P<0.001$, Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Farklı dozlardaki epoxomicin ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen MG-63 hücrelerinin % canlılığı. Deneyler 6 kez tekrarlandı (n=6) ve değerler ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. 24 saatlik inkübasyon sonucu canlılık değerleri grafik üzerinde sayısal olarak verildi.

Saos-2 hücrelerinde epoxomicin LD₅₀ dozlarını, farklı epoxomicin dozlarıyla 24 saatlik inkübasyon sonrası 355 nM (%95 CI; 238-532), 48 saatlik inkübasyon sonrası 255 nM (%95 CI; 172-376) ve 72 saatlik inkübasyon sonrası 7 nM (%95 CI; 2-30) olarak bulduk (P<0.001, Şekil 4.2).



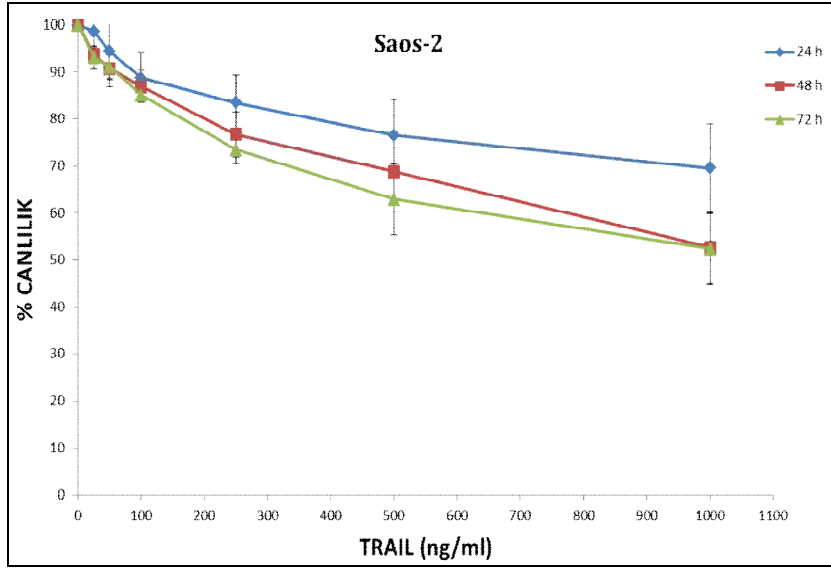
Şekil 4.2. Farklı dozlardaki epoxomicin ile 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen Saos-2 hücrelerinin % canlılığı. Deneyler 6 kez tekrarlandı (n=6) ve değerler ortalama±SD olarak gösterildi. 24 saatlik inkübasyon sonucu canlılık değerleri grafik üzerinde sayısal olarak verildi.

4.2. Osteosarkom Hücrelerinde TRAIL'in Sitotoksitesi

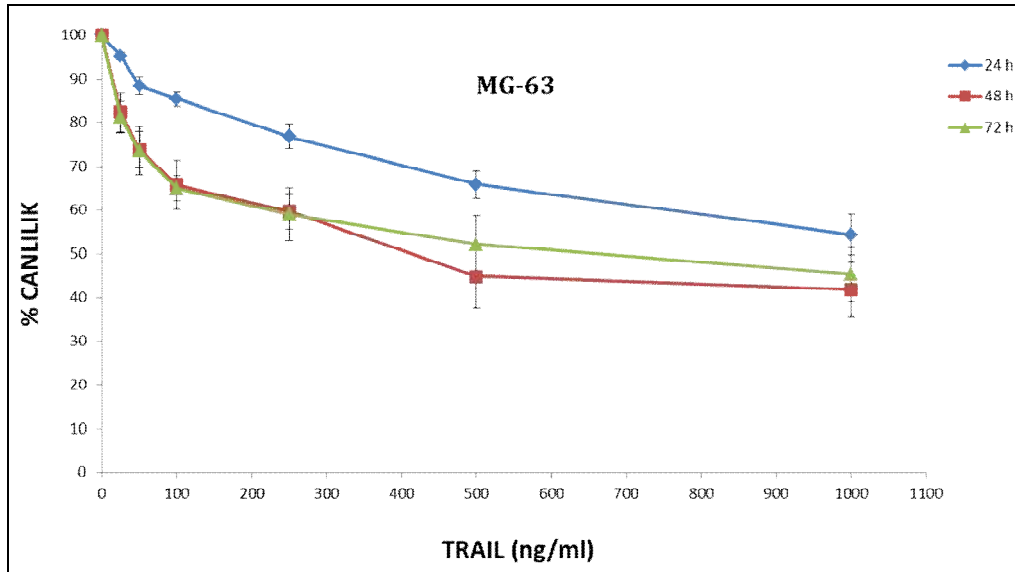
MG-63 ve Saos-2 hücrelerinin hücre canlılıkları, farklı konsantrasyonlardaki TRAIL (25-1000 ng/ml) ile 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarından sonra değerlendirildi.

Saos-2 hücreleri yaptığımız çalışmada MG-63 hücrelerine göre TRAIL'in apoptozisi indükleyici etkisine daha dirençli olarak bulundu. Saos-2 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyonlarda deneğimiz en yüksek dozdaki (1000 ng/ml) canlılık oranı %69.55±9.4 (ort.±SD) olarak tespit edilirken, MG-63 hücrelerinin ise aynı doz ve süredeki canlılık oranı %54.4±4.6 olarak tespit edildi (p<0.05). Başka bir deney sonucu olarak, en yüksek dozda (1000 ng/ml) ve en uzun inkübasyon süresinde (72 saat) bile Saos-2 hücrelerinin canlılık değerleri %50'nin altına belirgin olarak inmedi

(%52.33±7.57) (Şekil 4.3). MG-63 hücreleri için ise aynı canlılık oranı (%52.2±6.5) aynı sürede 500 ng/ml TRAIL dozunda tespit edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Saos-2 hücrelerinde TRAIL sitotoksitesinin doz-zaman grafiği.



Şekil 4.4. MG-63 hücrelerinde TRAIL sitotoksitesinin doz-zaman grafiği.

Hücre canlılığında %10-15 oranında belirgin bir düşüş, her iki hücre grubunda da 24 saatlik 100 ng/ml TRAIL uygulanan gruplarda görüldü (Şekil 4.3 ve 4.4). Her iki hücre dizisinde de, 24 saatlik 100 ng/ml TRAIL uygulanan grubun hücre canlılığı, kontrol grubunun 24 saatlik hücre canlılığına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0.01$, her iki hücre dizisi için). 100 ng/ml TRAIL

dozu daha önceki çalışmalarda da kombinasyonlar ile ilgili mekanizmalar araştırılırken kullanılan ve tavsiye edilen dozdur (1, 16). Bundan dolayı TRAIL ve epoxomicinin kombine inkübasyonlarında, 100 ng/ml TRAIL dozunu ve yine belirlediğimiz LD₅₀ dozunun altında hücre ölümüne neden olan 100 nM epoxomicin dozu uyguladık. Kontrol, TRAIL, epoxomicin ve TRAIL ve epoxomicin gruplarında kaspaz-3, -8, -9 aktivite ölçümlerini, Bax proteini düzeyi ölçümünü ve TUNEL deneylerimizi yaptık.

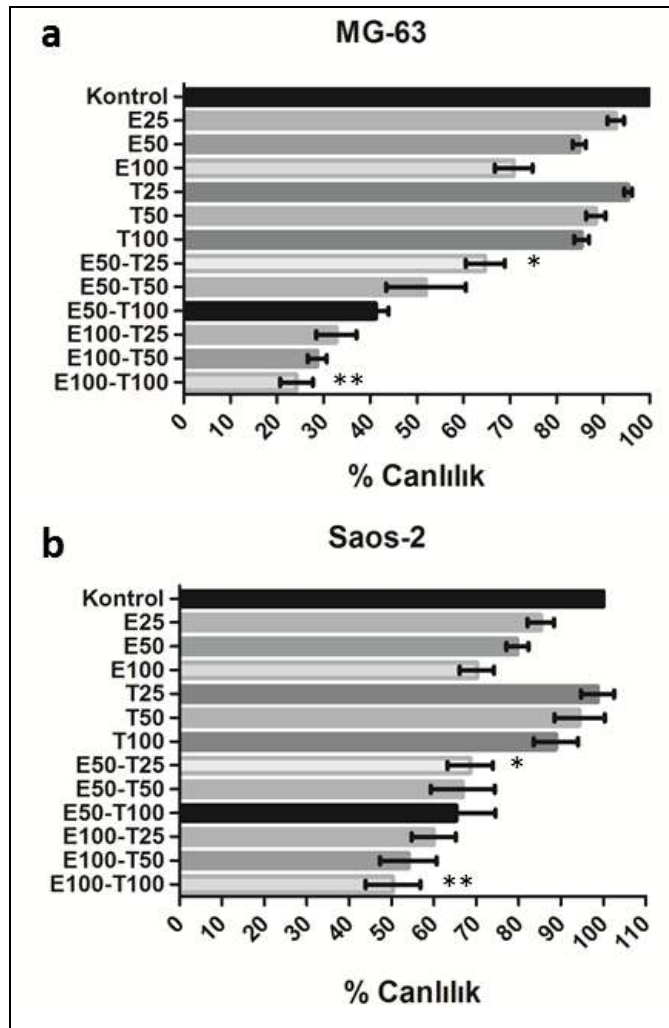
4.3. TRAIL ve Epoxomicinin Kombine Dozlarının Sitotoksitesi

Saos-2 ve MG-63 OS hücrelerini, TRAIL'ın (25-100 ng/ml) ve epoxomicinin (25-100 nM) farklı doz kombinasyonlarında 24 saat inkübe ettik ve bu inkübasyon süresi sonunda hücre canlılıklarını MTT canlılık testi ile inceledik. Sonuçlarımıza göre, her iki osteosarkom hücresinde de TRAIL ve epoxomicinin tüm kombinasyonları, bu dozların tek uygulanmalarına oranla çok belirgin olarak hücre ölümünü artırdı. Bütün kombinasyon dozları bu dozların tek tek uygulamasına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde sitotoksik bulundu ($p < 0.05$). En düşük doz kombinasyonu olan 50 nM epoxomicin + 25 ng/ml TRAIL (E50-T25) kombinasyonunda bile MG-63 osteosarkom hücrelerinin hücre canlılığının $64.6 \pm 4.2\%$ 'e, Saos-2 osteosarkom hücrelerinin hücre canlılığının $68.5 \pm 5.3\%$ 'e indiği tespit edildi (E50-T25 grubu, E50 ve T25 gruplarıyla karşılaştırıldığında her iki hücre grubu içinde Şekil 4.5'te görüldüğü gibi $*p < 0.001$).

MG-63 hücrelerinin, 100 nM epoxomicin + 100 ng/ml TRAIL (E100-T100) kombinasyonunda 24 saatlik inkübasyon sonrası hücre canlılığı oldukça azaldı ($24.1 \pm 3.5\%$). E100-T100 kombinasyonu, sadece 100 ng/ml TRAIL (T100) uygulanan grubun hücre canlılığı ($85 \pm 1.6\%$) ya da sadece 100 nM epoxomicin (E100) uygulanan grubun hücre canlılığı ($70.8 \pm 4\%$) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak çok anlamlı düzeyde düşük bulundu ($**p < 0.0005$) (Şekil 4.5). Aynı şekilde, Saos-2 hücrelerinin de 100 nM epoxomicin + 100 ng/ml TRAIL (E100-T100) kombinasyonunda 24 saatlik inkübasyon sonrası hücre canlılığı ($50.3 \pm 6.4\%$) sadece 100 ng/ml TRAIL (T100) uygulanan grubun hücre canlılığı ($88.8 \pm 5.2\%$) ya da sadece 100 nM epoxomicin (E100) uygulanan grubun hücre canlılığı ($79.7 \pm 2.5\%$) ile

karşılaştırıldığında istatistiksel olarak çok anlamlı düzeyde düşük bulundu (** $p < 0.0005$) (Şekil 4.5).

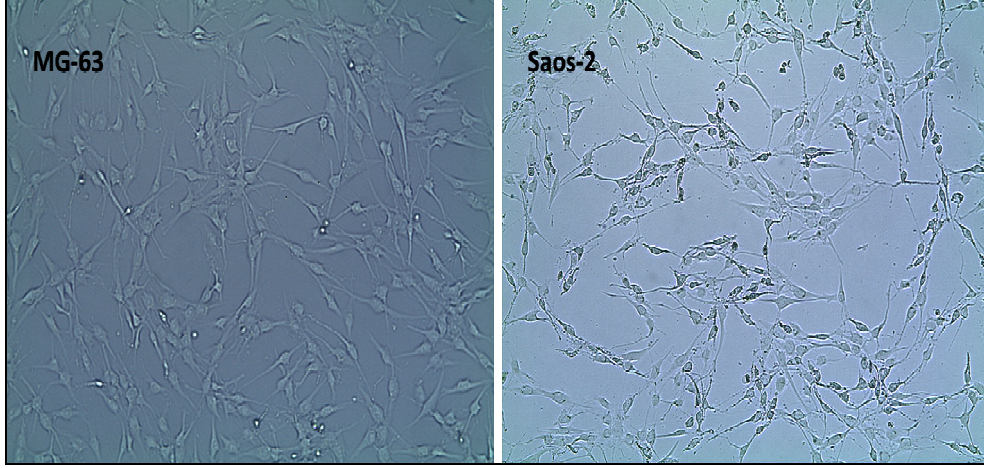
Bu iki ilacın birlikte etkisi ayrıca izobol tekniği ile değerlendirildiğinde de bu iki ilaç arasında potansiyalizasyon ya da başka bir değişle sinerjizm olduğu açıkça görülmektedir (122). Bu sinerjizmin potansiyel apoptotik mekanizmasını araştırmak için belirlediğimiz ortak dozu (E100-T100), kaspaz deneyleri, pro-apoptotik Bax protein düzeyi ölçümü ve apoptozisin belirlenmesi için TUNEL metodu ile yaptığımız deneylerimizde kullandık.



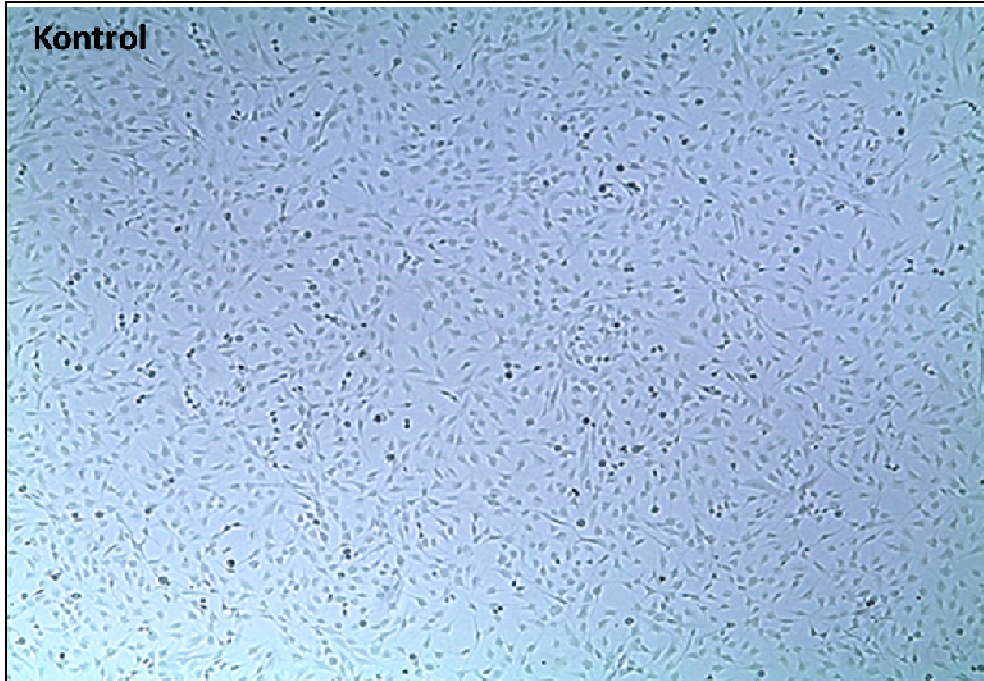
Şekil 4.5. (a) MG-63 hücrelerinde TRAIL (T), epoxomicin (E) ve TRAIL-epoxomicin kombine (E-T) uygulamalarında canlılık yüzdeleri, **(b)** Saos-2 hücrelerinde TRAIL (T), epoxomicin (E) ve TRAIL-epoxomicin kombine uygulamalarında canlılık yüzdeleri. Harflerin yanındaki rakamlar ilaç dozlarını göstermektedir. Her çalışma altı kez tekrarlandı (n=6) ve değerler ort. $\pm$ SD olarak verildi.

4.4. MG-63 ve Saos-2 Hücrelerinin Morfolojik Görüntüleri

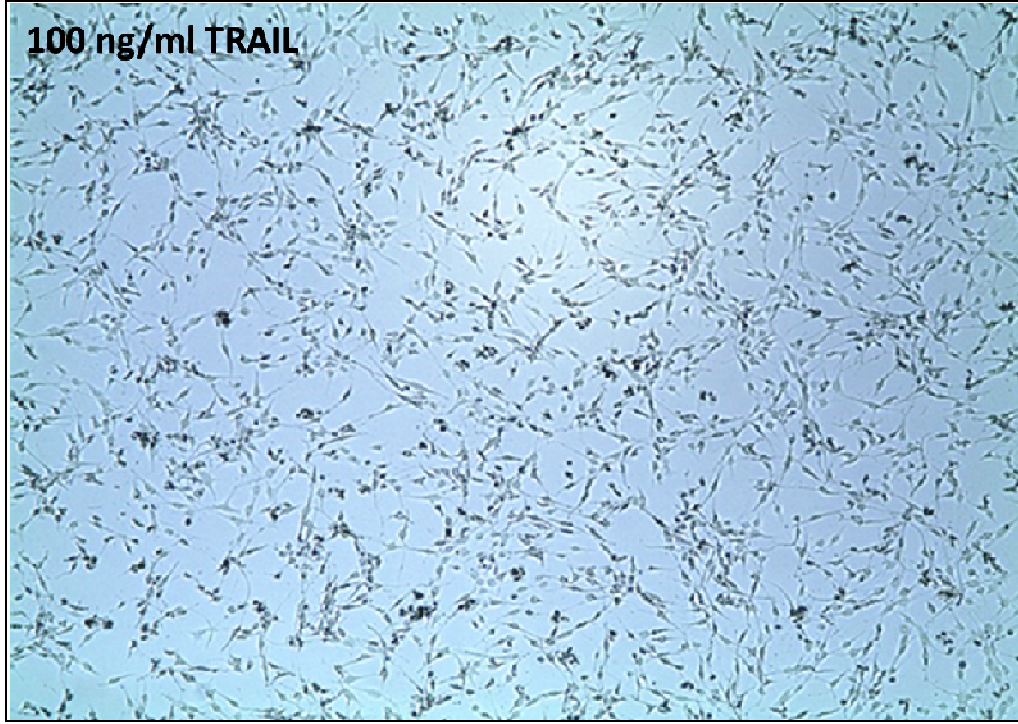
MG-63 ve Saos-2 hücrelerinin inverted mikroskop ile çekilen resimleri yaptığımız canlılık testlerinin sonuçlarını destekler niteliktedir.



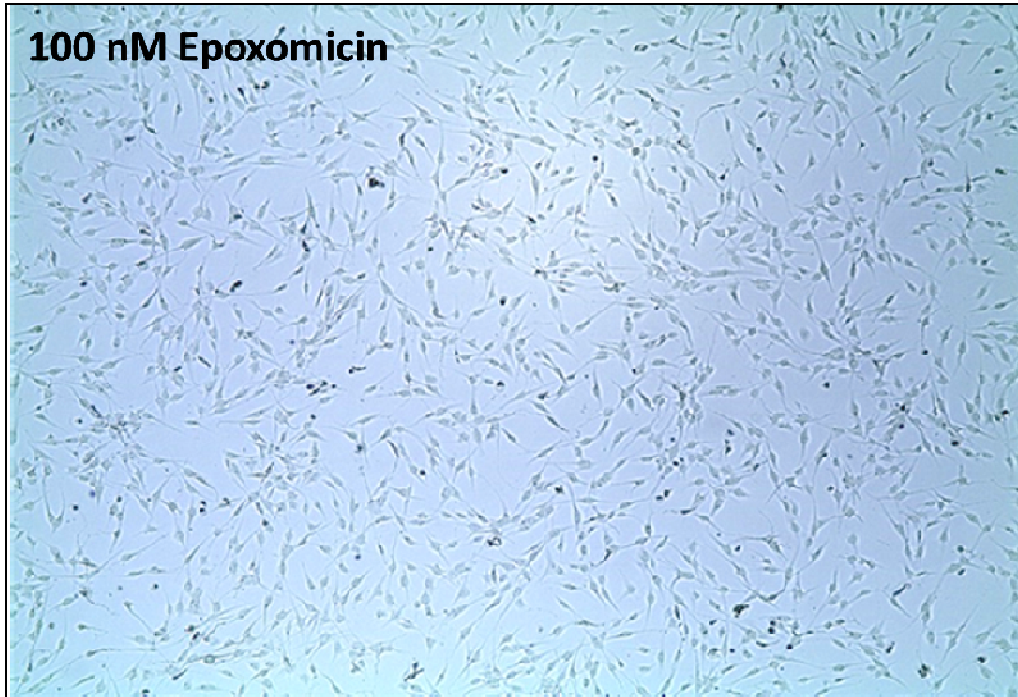
Şekil 4.6. MG-63 ve Saos-2 osteosarkom hücrelerinin 10X büyütme ile elde edilen mikroskopik görüntüleri. Canlı MG-63 ve Saos-2 hücreleri adherent ve iğsi şekilli hücrelerdir. Ölü hücreler ise medyum yüzeyinde yüzen yoğunlaşmış yuvarlak noktalar olarak ışık mikroskopunda görülmektedir.



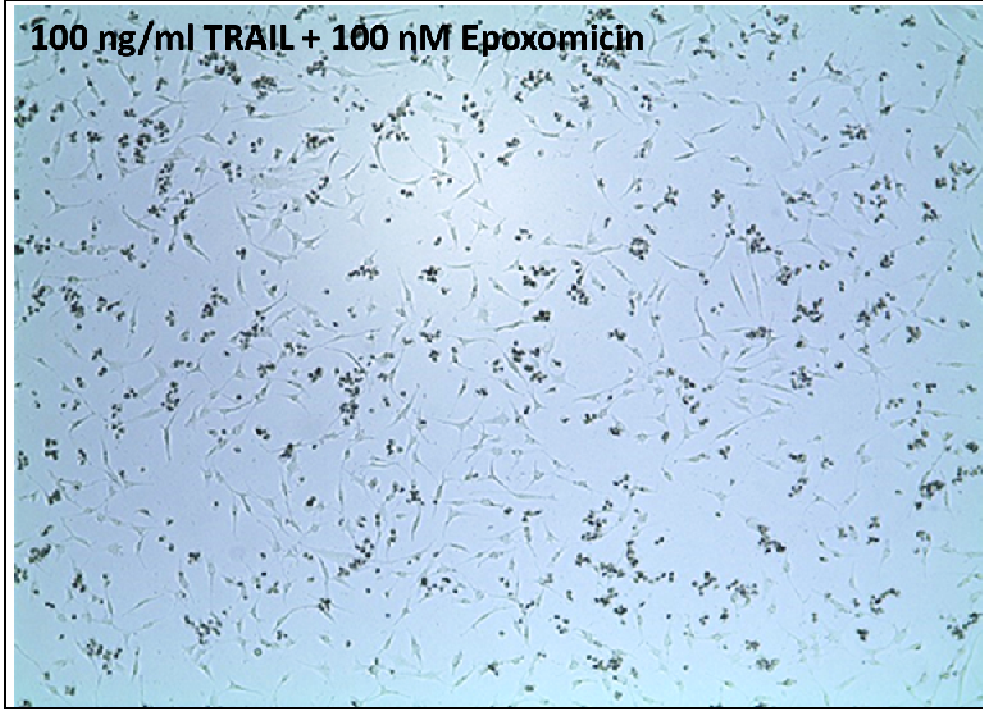
Şekil 4.7. 10^6 hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen ve herhangi bir madde ile inkübe edilmeyen MG-63 kontrol hücre grubunun, 24 saatlik medyum içindeki inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü. Canlı MG-63 hücreleri morfolojik olarak iğsi şekilli ve adherent hücreler olarak görülmektedir. Ölü MG-63 hücreleri ise yapışamayan, morfolojik yapısını kaybetmiş, koyulaşmış, yuvarlaklaşmış, medyum yüzeyinde yüzen hücreler olarak görülmektedir.



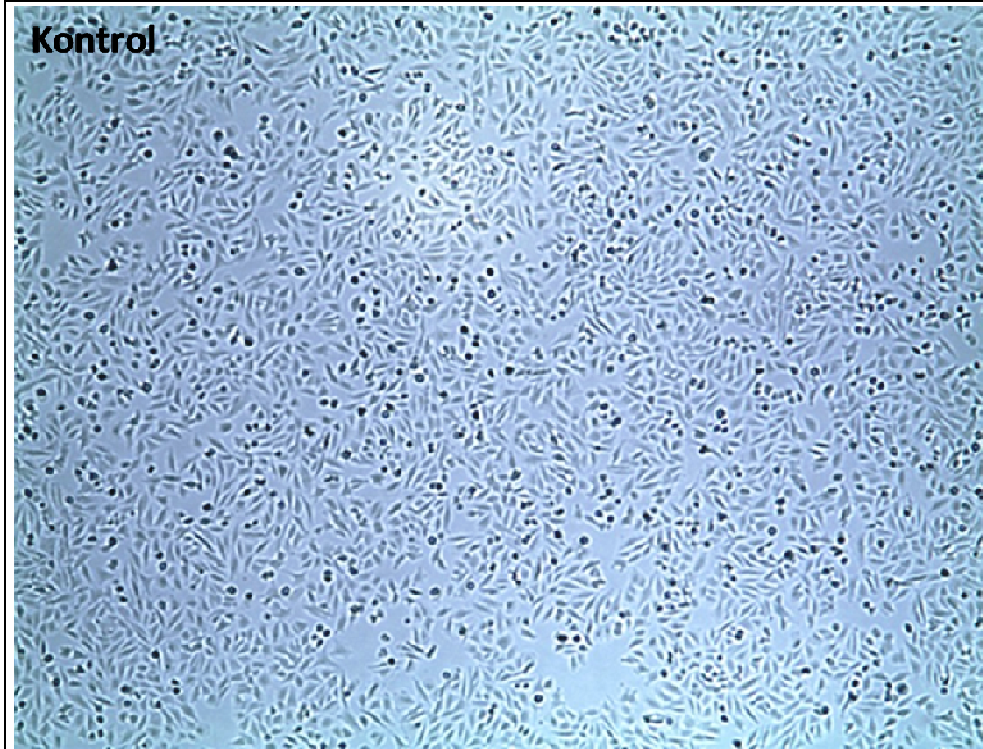
Şekil 4.8. 10^6 hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen MG-63 hücrelerinin 100 ng/ml TRAIL ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü. Petriye yapışan canlı hücre yoğunluğu kontrol grubuna göre azalmış olarak görülmektedir.



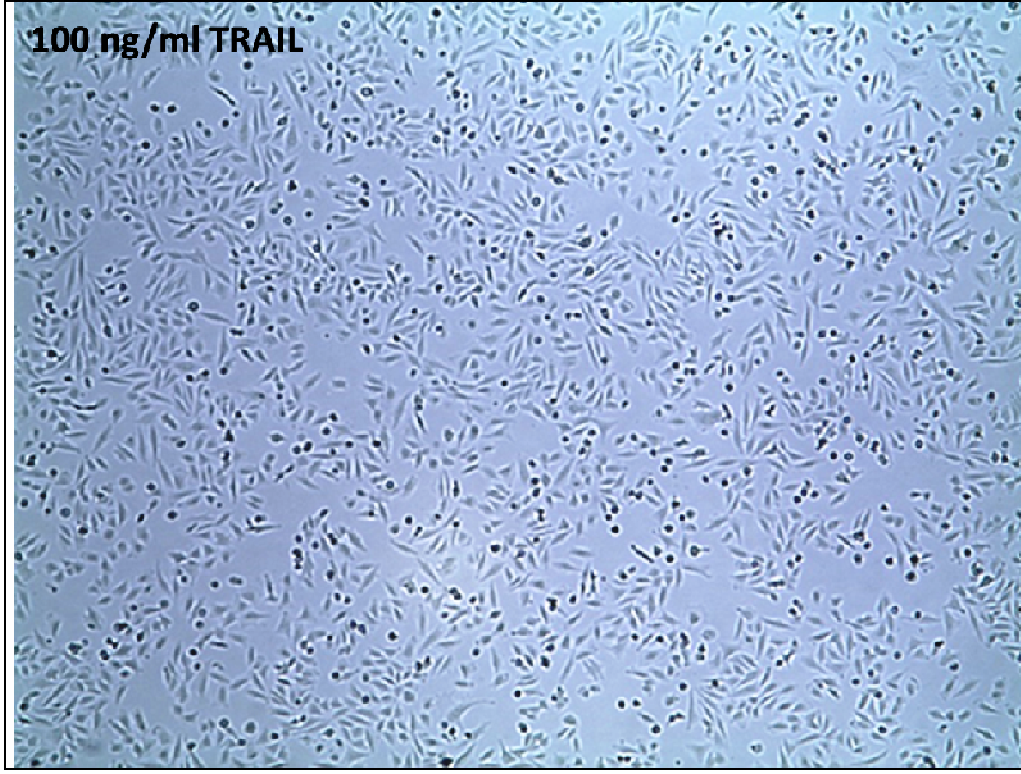
Şekil 4.9. 10^6 hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen MG-63 hücrelerinin 100 nM epoxomicin ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü. Petriye yapışan canlı hücre yoğunluğu kontrol grubuna göre azalmış olarak görülmektedir.



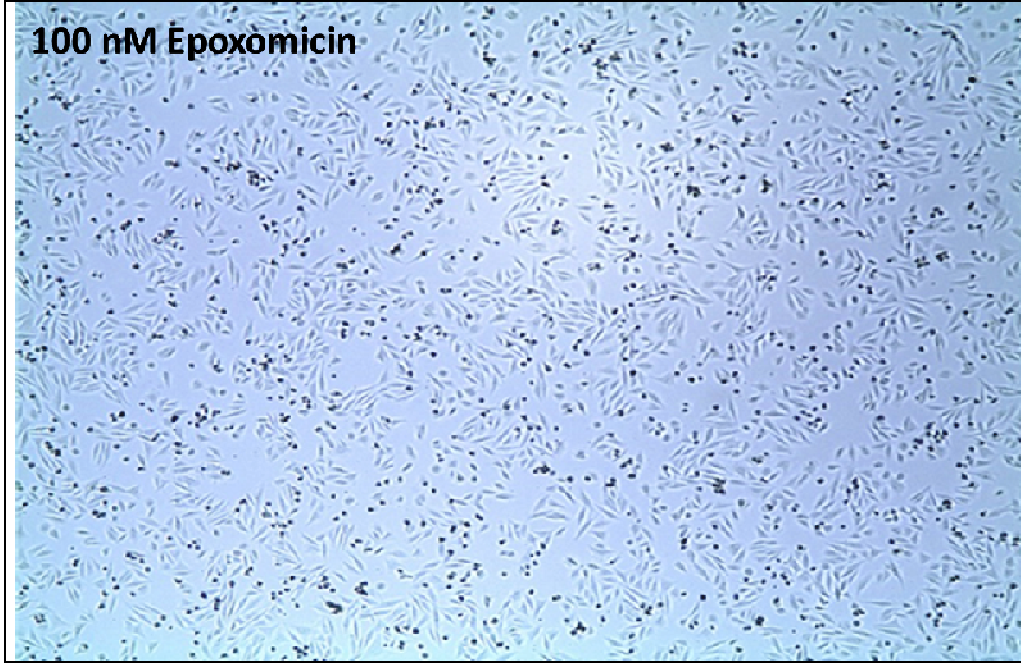
Şekil 4.10. 10^6 hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen MG-63 hücrelerinin 100 ng/ml TRAIL + 100 nM epoxomicin kombine dozu ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü. Canlı hücre yoğunluğu diğer gruplara kıyasla oldukça azalmış olarak görülmektedir. Ölü hücreler yuvarlaklaşıp yoğunlaşmışlardır.



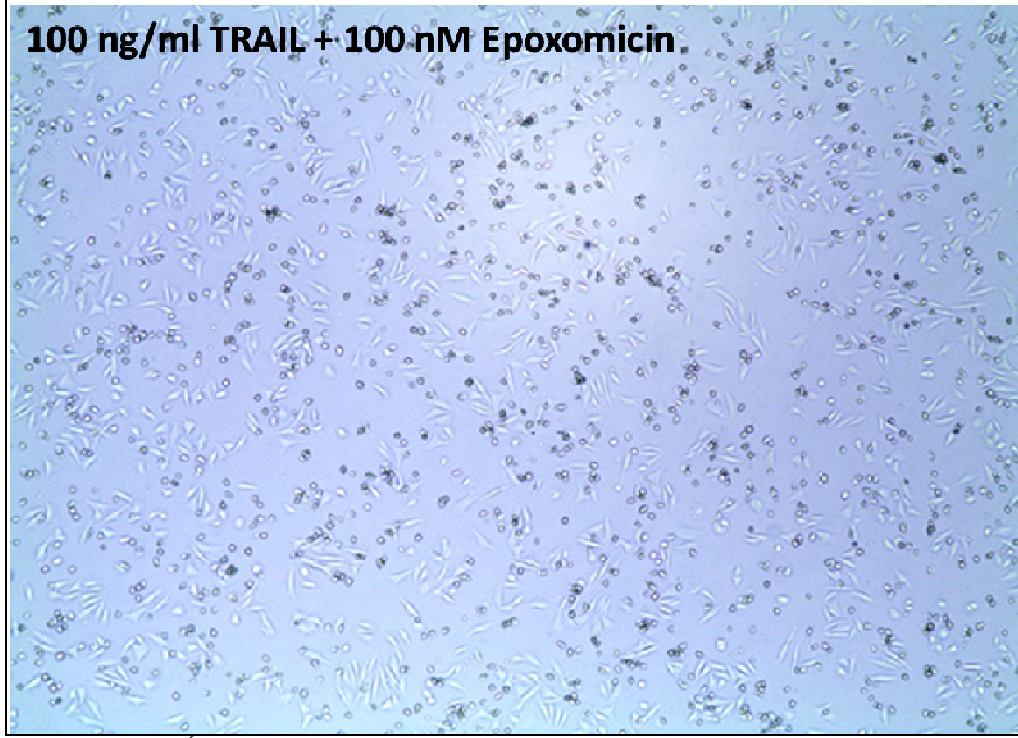
Şekil 4.11. 10^6 hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen ve herhangi bir madde ile inkübe edilmeyen Saos-2 kontrol hücre grubunun 24 saatlik inkübasyon sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü. Canlı Saos-2 hücreleri morfolojik olarak iğsi şekilli ve adherent hücreler olarak görülmektedir. Ölü Saos-2 hücreleri ise yapışamayan, morfolojik yapısını kaybetmiş, yuvarlaklaşmış, medyum yüzeyinde yüzen hücreler olarak görülmektedir.



Şekil 4.12. 10^6 hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen Saos-2 hücrelerinin, 100 ng/ml TRAIL ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.13. 10^6 hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilen Saos-2 hücrelerinin, 100 nM epoxomicin ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.14. 10^6 hücre/ml hücre yoğunluğunda petriye ekilmiş Saos-2 hücrelerinin 100 ng/ml TRAIL + 100 nM epoxomicin kombine dozu ile 24 saatlik inkübasyonu sonucu 4X büyütme ile elde edilen mikroskop görüntüsü. Canlı hücre sayısı oldukça azalmış olarak görülmektedir.

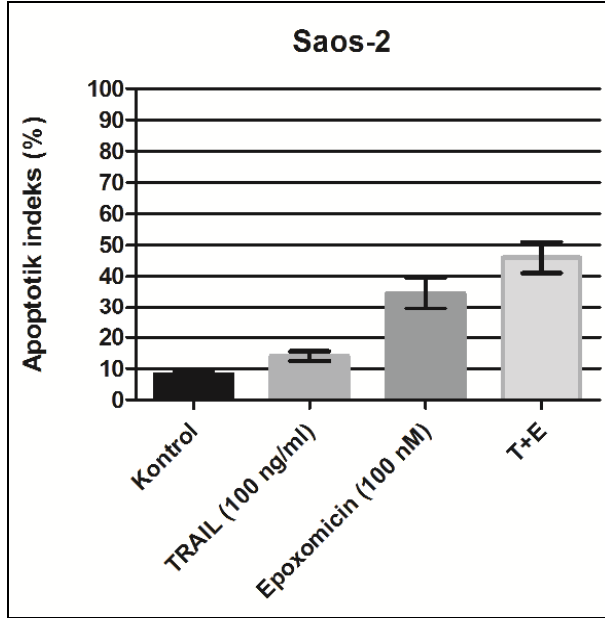
4.5. TUNEL Apoptotik İndeks

Kontrol, sadece TRAIL (100 ng/ml), epoxomicin (100 nM) veya TRAIL + epoxomicin kombine dozu (100 ng/ml TRAIL + 100 nM epoxomicin) uygulanan MG-63 ve Saos-2 hücre gruplarında 24 saatlik inkübasyon sonrasında TUNEL methodu ile apoptotik hücreler boyandı. Apoptotik İndeks (AI), daha önceki çalışmalarda yapıldığı gibi (123) her grup için lam üzerinde rastgele seçilen iyi boyanmış beş bölgede sayım yapıldı ve aşağıdaki formüle göre her grubun Apoptotik İndeksi yüzde (%) olarak hesaplandı

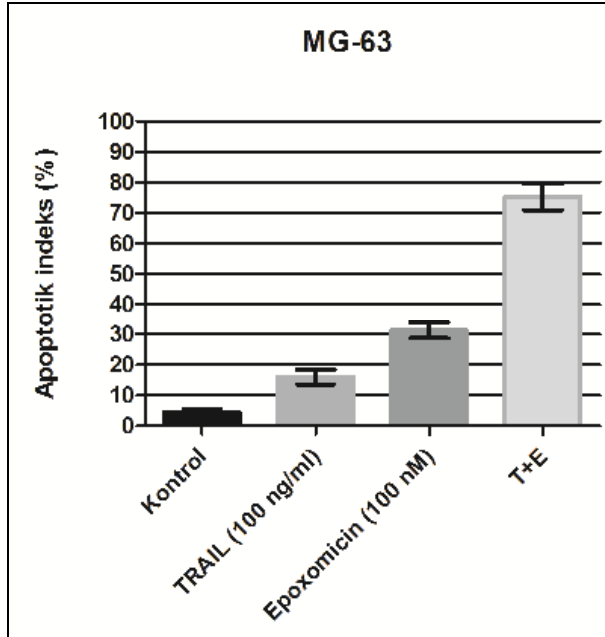
$$AI (\%) = (\text{TUNEL-pozitif boyanan hücre sayısı} / \text{Total hücre sayısı}) \times 100$$

Kombine doz (T+E grubu) uygulanan gruplarda, Saos-2 hücreleri için apoptotik indeks 46 ± 4.9 (Şekil 4.15), MG-63 hücreleri için ise 75.2 ± 4.3 olup (Şekil 4.16) belirgin bir şekilde yüksek bulundu. Bu sonuçlar daha önce yapılan kaspaz aktiviteleri ölçümleriyle ve hücre canlılığı testleri ile de uyumlu olarak bulundu. Ayrıca kombine doz uygulanması sinerjik etki gösterip, her iki hücre

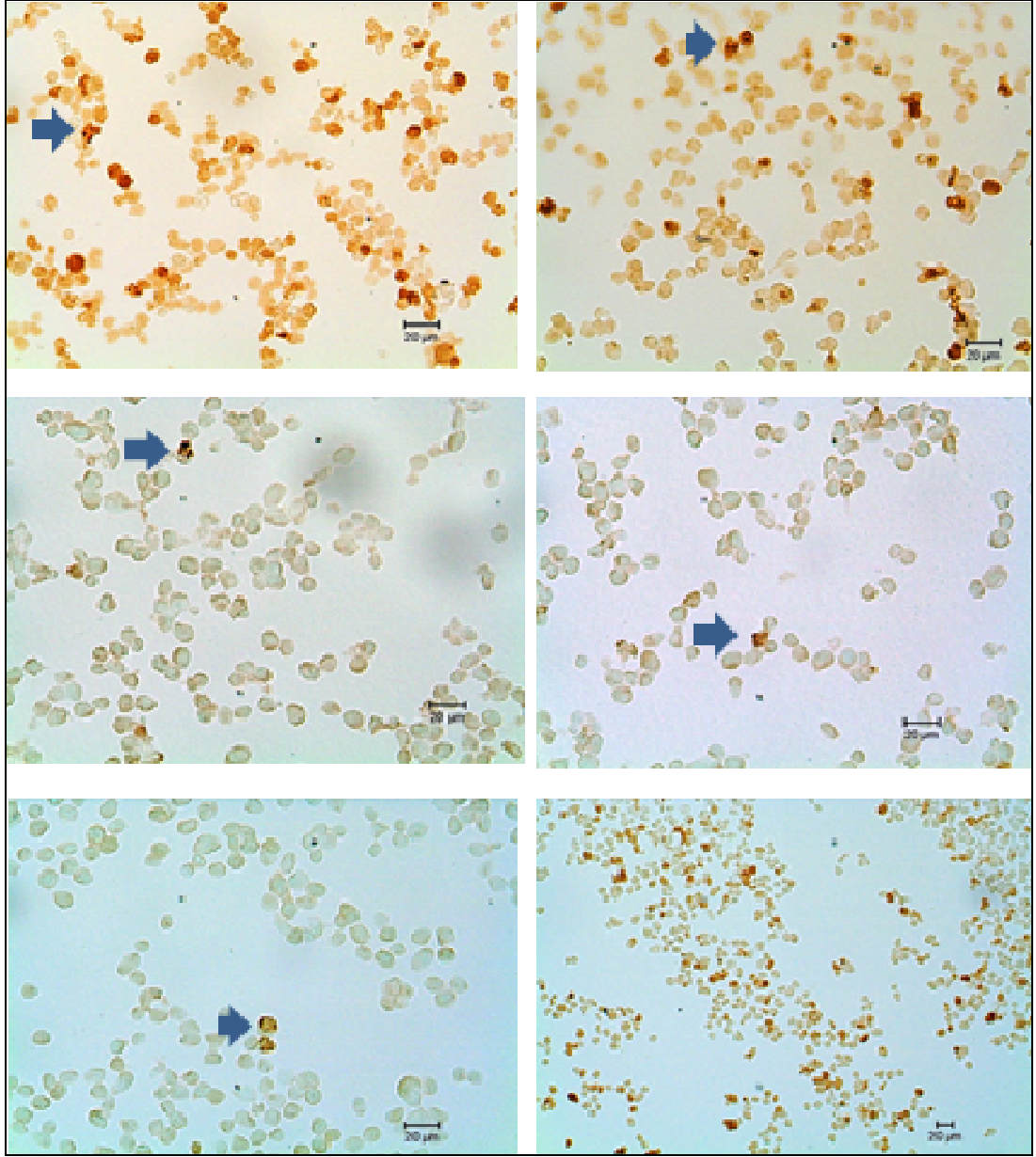
grubunda da, sadece 100 ng/ml TRAIL uygulanan grupla karşılaştırıldığında ($p<0.001$) veya sadece 100 nM epoxomicin uygulanan grupla karşılaştırıldığında ($p<0.001$) hücre apoptozisini yüksek oranda indüklediği tespit edildi.



Şekil 4.15. Kontrol, TRAIL (100 ng/ml), epoxomicin (100 nM) veya TRAIL (100 ng/ml) + epoxomicin (100 nM) ile 24 saat inkübe edilen Saos-2 hücrelerinin apoptotik indeks yüzdeleri.



Şekil 4.16. Kontrol, TRAIL (100 ng/ml), epoxomicin (100 nM) veya TRAIL (100 ng/ml) + epoxomicin (100 nM) ile 24 saat inkübe edilen MG-63 hücrelerinin apoptotik indeks yüzdeleri.



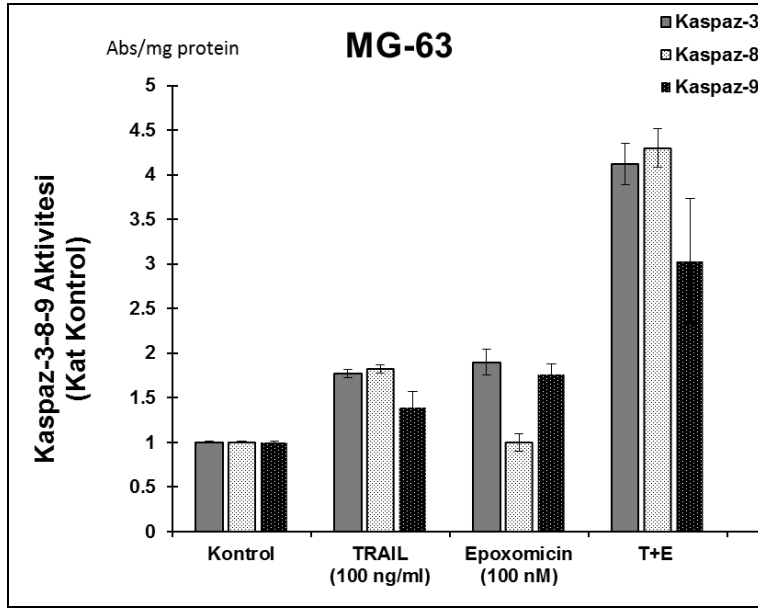
Şekil 4.17. 40X ve 10X (sağ alt köşedeki resim) büyütmede TUNEL boyamalarından örnek resimler. Apoptozis gelişmekte olan birkaç hücre örnek olarak ok ile gösterilmektedir.

4.6. Kaspaz Bulguları

MG-63 ve Saos-2 hücrelerinin kontrol, 100 ng/ml TRAIL, 100 nM epoxomicin ve kombine doz (100 ng/ml TRAIL + 100 nM epoxomicin) deney gruplarında kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ölçümü yapıldı. Bu deneyler için 24 saatlik inkübasyonlar yapıldı. Her petride ortalama 3×10^6 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve her gruptan 6 petri çalışıldı.

MG-63 hücre gruplarında kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivitesi için Kruskal-Wallis Test ile yapılan istatistik sonucunda deney grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu (p değerleri sırasıyla $p < 0.0001$, $p < 0.0002$, $p < 0.0001$). MG-63 hücrelerinin sadece 100 ng/ml TRAIL ve kombine doz uygulanan gruplarında kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivitelerindeki artış Mann Whitney Test ile yapılan istatistik sonucunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kontrol grubuyla aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p değerleri < 0.005). 100 nM epoxomicin uygulanan grupta ise kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesindeki artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Ancak 100 nM epoxomicin uygulanan grubun kaspaz-8 aktivitesindeki artış, Mann Whitney Test ile yapılan istatistik sonucunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0.92$).

MG-63 osteosarkom hücrelerinde, kombine doz uygulanan grupta kontrole göre kaspaz-3 aktivitesi 4.12 ± 0.23 , kaspaz-8 aktivitesi 4.30 ± 0.22 ve kaspaz-9 aktivitesi 3.0 ± 0.71 kat artmış olarak bulundu. Kombine doz uygulanan grubun kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivitelerindeki artış, diğer bütün gruplarla tek tek karşılaştırıldığında bu artışlar istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu ($p < 0.005$) (Şekil 4.18).

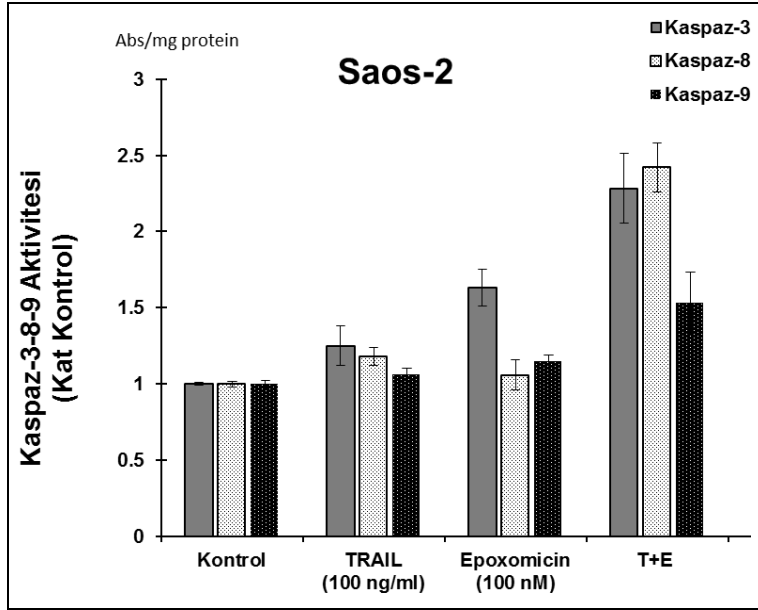


Şekil 4.18. MG-63 hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivite bulguları.

Saos-2 hücre gruplarında kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivitesi için Kruskal-Wallis Test ile yapılan istatistik sonucunda bu gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu (p değerleri sırasıyla $p<0.0001$, $p<0.0004$, $p<0.0001$).

MG-63 hücrelerinde olduğu gibi Saos-2 hücrelerinde de 100 nM epoxomicin uygulanan grupta kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesindeki artış, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Ancak 100 nM epoxomicin uygulanan grubun kaspaz-8 aktivitesindeki artış minimum olup, Mann Whitney Test ile yapılan istatistik sonucunda, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.29$). Bu veri epoxomicinin apoptozisi özellikle intrinsik yolak üzerinden aktive ettiğini kanıtlar niteliktedir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlardan, TRAIL'in bilindiği gibi apoptozisi ekstrinsik yoldan aktive ettiği gibi minimal olarak intrinsik yolağı da aktive ettiği görülmektedir (Şekil 4.19).

Saos-2 osteosarkom hücrelerinde, kombine doz uygulanan grupta kontrol göre, kaspaz-3 aktivitesi 2.28 ± 0.23 , kaspaz-8 aktivitesi 2.42 ± 0.16 ve kaspaz-9 aktivitesi 1.53 ± 0.22 kat artmış olarak bulundu. Kombine doz uygulanan grubun kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivitelerindeki artış, diğer bütün gruplarla tek tek karşılaştırıldığında bu artışlar istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu ($p<0.005$).

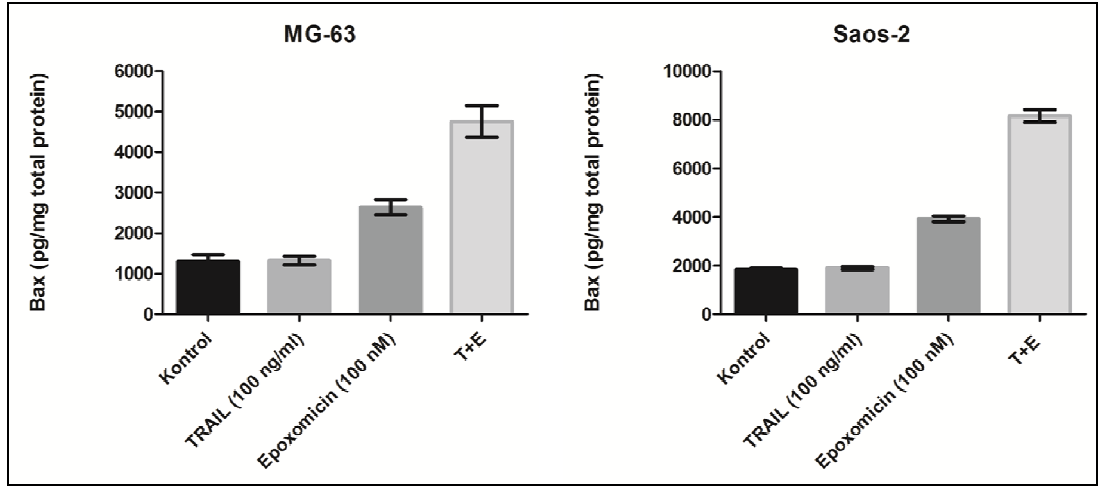


Şekil 4.19. Saos-2 hücrelerinde kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivite bulguları.

4.7. Pro-apoptotik Bax Proteini Düzeyleri

Kontrol (herhangi bir madde uygulanmayan), sadece TRAIL (100 ng/ml), epoxomicin (100 nM) veya TRAIL + epoxomicin kombine dozu (100 ng/ml TRAIL + 100 nM epoxomicin) uygulanan MG-63 ve Saos-2 hücre gruplarında 24 saatlik inkübasyon sonrasında Bax proteini düzeyleri ölçüldü.

MG-63 ve Saos-2 hücrelerinde sadece 100 ng/ml TRAIL uygulanan grubun intrinsik yolağın majör aktivatörü olan pro-apoptotik Bax proteini düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p değerleri sırasıyla $p=0.8$, $p=0.07$). Her iki hücre için de, sadece 100 nM epoxomicin veya kombine doz uygulanan gruplarda, Bax protein düzeylerinin kontrol grubu ve sadece TRAIL uygulanan grup ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak arttığı tespit edildi ($p<0.001$). Kombine dozlarda bu artış daha da belirgin olup diğer gruplara göre daha anlamlı olarak artmış bulundu ($p<0.001$) (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. MG-63 ve Saos-2 hücrelerinde pro-apoptotik Bax protein düzeyleri (n=6, değerler ort.±SD olarak verildi).

5. TARTIŞMA

Yaptığımız bu çalışmada bir proteazom inhibitörü olan epoxomicinin ve TRAIL'in MG-63 ve Saos-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini doz ve zaman bağımlı olarak inceledik. Yaptığımız deneylerdeki hücre canlılığı düşüşünü destekler nitelikteki kaspaz aktivitesi artışları ile epoxomicinin en sık rastlanan malign kemik kanseri olan osteosarkoma hücreleri için potent bir sitotoksik, pro-apoptotik ve anti-kanser etkili ajan olduğunu gösterdik.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda proteazom inhibitörleri deri, over, akciğer, kolon, prostate, mesane, pankreas tümörleri, Ewing's sarkomu ve multiple myeloma gibi birçok kanser türünde anti-kanser ajan olarak araştırılmış ve umut vaadeden sonuçlar vermiştir (6,116,124,125).

Bortezomib/PS (Velcade), 2003 yılında FDA tarafından anti-kanser ilaç olarak plazma hücre kanseri olan Multiple Myeloma'da kullanılmaya başlanmasından sonra epoxomicinin bir türevi olan carfilzomib yapılan klinik çalışmalar sonucu başarılı bulunmuş ve Multiple Myeloma hastalarının tedavisinde 2012 yılında FDA tarafından onay alarak klinik uygulamaya giren ikinci proteazom inhibitörü olmuştur (106,117,118).

Faz-I ve faz-II klinik çalışmalarda, TRAIL'in normal hücrelerde önemli bir yan etki oluşturmadan kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir (98-100). TRAIL'in normal hücrelere önemli ölçüde sitotoksik olarak etki etmeksizin sadece kanser hücrelerini apoptozise uğratabilmesi, yeni tedaviler için umut vermektedir. TRAIL gibi sadece kanser hücrelerine zarar veren bir ajanın kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanılması, tedavinin etkinliğini artırarak, kemoterapötik ilaçların dozunun azaltılması açısından yeni bir tedavi stratejisi olabilir. Kullanılan kemoterapötik ilaçların hastada oluşturduğu yan etkilerden dolayı, en azından bu ilaçların dozunun azaltılması, hastanın yaşam kalitesini yükseltebilir. Literatürde, kanser tedavisinin etkinliğini arttırmak amacıyla, kemoterapötiklerle TRAIL'in birlikte kullanımının hem *in vivo*, hem de *in vitro* olarak apoptozisi arttırdığı bildirilmiştir (126,127). *İn vivo* ve *in vitro* olarak birçok kanser türünde yapılan çalışmalarda, çeşitli kanser ilaçlarının TRAIL ile birlikte apoptozisi tetiklediği, tümör büyümesini durdurduğu ve hatta geriletmediği

gösterilmiştir. Ayrıca son yıllarda mezenkimal kökenli birçok kanserde TRAIL ile yeni tedavi yaklaşımları araştırılmaktadır (7,101). Fakat bazı kanser hücrelerinde TRAIL'ın apoptozis indükleyici etkisine karşı direnç gelişmiştir. Kanser hücrelerinin TRAIL'e dirençliliğinin farklı sebepleri olabildiği bilinmektedir. AD Şanlıoğlu ve ark. yaptıkları bir çalışmada prostat kanser hücre hatlarında TRAIL'a dirençlilik mekanizmalarını araştırmış ve prostat kanser hücrelerinde TRAIL yalancı reseptör dağılımının (TRAIL-R3 ve TRAIL-R4) ve NF-kB aktivitesinin bu hücrelerdeki TRAIL direncine katkıda bulunduğunu ortaya koymuşlardır (54). Ayrıca kanser hücrelerindeki TRAIL dirençliliğinin, farklı TRAIL reseptör sentez oranlarına bağlı olabileceği, hücre içi anti-apoptotik moleküllerin yüksek sentez oranlarına veya pro-apoptotik protein sentezinin az oluşuna veya azalmış Bax proteini düzeylerine de bağlı olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (51-54, 128-130).

Kemoterapötik ilaçlar ve radyasyonun, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak, TRAIL'in indüklediği apoptozisi arttırdığı yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir (131-133). Kemoterapötiklerin tümör hücrelerinin TRAIL'a duyarlılığını arttırmasının, moleküler düzeyde TRAIL-R1 ve/veya TRAIL-R2 reseptör ekspresyonlarında meydana gelen artışa bağlı olduğu gösterilmiştir. Bu reseptörler, Bcl-2, Bcl-XL veya FLIP gibi anti-apoptotik moleküllerin azalmasını, ya da Bax, Bak, kaspazlar veya FADD gibi pro-apoptotik moleküllerin artmasını sağlar (62). Multiple myeloma hücre dizilerinde, doksorubisin ile ön muamelenin TRAIL'ın apoptotik etkisini arttırdığı, bu etkinin de TRAIL-R2 ekspresyonundaki artış ile gerçekleştiği gösterilmiştir (134). Prostat kanser hücre dizilerinde paklitaksel, vinkristin, vinblastin, etoposid, doksorubisin ve kamptotesinin, TRAIL-R1, TRAIL-R2, Bax ve Bak düzeylerini arttırarak ve kaspaz aktivasyonunu tetikleyerek apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir (135,136). Mitokondriyal yolağın, bu ilaçlar ve TRAIL arasındaki sinerjistik etkiyi arttırdığı bildirilmiştir. Multiple myeloma fare modellerindeki *in vivo* çalışmalarda, kemoterapötik ilaç ve TRAIL'in birlikte kullanımının apoptozisi ve yaşam süresini arttırdığı bildirilmiştir (136).

Önceki çalışmalarda, osteosarkom hücrelerinin birçoğunun TRAIL'in etkisine karşı dirençli olduğu gösterilmiş ve bu direnci aşmak için osteosarkom hücrelerinde doksorubisin, sisplatin, metotreksat gibi bazı kemoterapötikler veya iyonize radyasyon veya bifosfonat gibi maddeler, TRAIL ile kombine tedavi

modelleri olarak denenmiştir (1,17,137). Alternatif bir tedavi yönteminin bulunması açısından TRAIL ile yapılan çalışmalar önemlidir. Brooks ve ark. bir proteazom inhibitörü olan bortezomibin, renal hücreli karsinomda, TRAIL direncini kaspaz-8'i yüksek oranda aktive ederek aştığını göstermiştir (120). Ayrıca yapılan başka çalışmalarda da proteazom inhibitörlerinin birçok kanser türünde TRAIL direncinin üstesinden gelerek, TRAIL'ın indüklediği apoptozisi arttırdığı rapor edilmiştir (7,138). Ancak TRAIL'a dirençli osteosarkom hücrelerinde proteazom inhibitörlerinden, epoxomicinin bu direnci nasıl etkilediği daha önce çalışılmamıştı. TRAIL'in kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin artırılması yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir. Bundan dolayı daha önce osteosarkom hücrelerinde denenmeyen epoxomicinin tek olarak ve TRAIL ile kombine olarak osteosarkom hücreleri üzerine olan etkilerinin ortaya çıkarılması yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi açısından önemlidir. Ayrıca literatürde proteozom inhibitörleri birçok kanser türünde tedavi açısından denenmiştir, fakat bir proteozom inhibitörü olan epoxomicin osteosarkom hücreleri üzerindeki etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Li ve ark., TRAIL ve bir proteazom inhibitörü olan MG132'in kombine şekilde sinerjik etki göstererek, OS732 osteosarkom hücrelerine uygulanmasının, bu hücrelerde apoptozisi DR5ekspresyon artışına, kazpaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesi artışına bağlı olarak arttırdığını rapor etmişlerdir (139). Bu çalışmanın paralelinde, TRAIL'in ve proteazom inhibitörlerinin tek başlarına kanser ilacı olarak umut vadetmelerinin yanı sıra kombinasyonlarının da sinerjik etki gösterebileceklerini bizde yaptığımız çalışma ile gösterdik. TRAIL (100 ng/ml) ve epoxomicin (100 nM) kombinasyonunun apoptozisi yüksek oranda arttırdığını TUNEL metodu ile belirledik. Ayrıca birçok doz kombinasyonlarında kanser hücrelerinin ölümünde TRAIL ve epoxomicinin sinerjik etki gösterdiğini yaptığımız canlılık testleri ile ortaya koyduk. Örnek vermek gerekirse, MG-63 ve Saos-2 hücreleri için 50 ng/ml TRAIL ve 50 nM epoxomicin (E50-T50 grubu) uygulanan gruplarda, bu dozlar kanser hücrelerinde sırasıyla >%50 ve >%35 sitotoksositeye sebep olmuşken, bu dozlar tek olarak uygulandığında sitotoksik etkileri minimal oldu. MG-63 ve Saos-2 hücreleri için E50-T50 grubu, E50 grubuyla veya T50 grubu sitotoksosite açısından

karşılaştırıldığında, p değerleri bütün karşılaştırmalarda $p < 0.001$ olarak bulundu (Şekil 4.5).

TRAIL reseptörlerinin up-regülasyonunun (özellikle DR4 ve DR5) ve Bax, Bid, Bak gibi Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinin sentezinin artışının, tümör hücrelerinin TRAIL'ın indüklediği apoptozise karşı hassasiyetinin arttmasında önemli rol aldığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (1, 140). Yaptığımız deneylerde epoxomicinin sub-LD₅₀ dozda, osteosarkom hücrelerinde yüksek düzeyde kaspaz-3 ve kaspaz-9'ü aktive ederek intrinsik yolağı uyardığını ve Bax proteini düzeylerini anlamlı düzeyde arttırarak osteosarkom hücrelerinin TRAIL'a karşı olan hassasiyetini arttırdığını tespit ettik. İntrinsik yolağın aktivasyonun güçlendirilmesi, TRAIL sensitivitesinin arttırılmasına olanak sağlamıştır.

Bax, pro-apoptotik bir Bcl-2 ailesi üyesidir ve sağlıklı hücrelerde sitozolde latent olarak bulunur ve çeşitli sinyaller sonucu aktive olmasıyla birlikte mitokondriye transloke olur. Bax, transloke olarak pro-apoptotik mitokondrial proteinlerin (Smac/DIABLO ve sitokrom c gibi) sitozole salgılanmasını ve bunların intrinsik apoptotik yolağı aktive etmesini sağlar (94). Son zamanlarda Bax'ın, sitokrom c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu indüklediği *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir (68). Bax aracılı sitokrom c salınımı apoptozom formasyonun oluşmasına, kaspaz-9 aktivasyonuna ve kaspazların downstream aktive olup kaspaz-3 aktivasyonuna neden olarak intrinsik apoptozise yol açmasına sebep olur. Yapılan çalışmalar da Bax proteini ekspresyonu olmayan (Bax-deficient) hücrelerde sitokrom-c salınımı ve kaspaz-9 aktivasyonu olmamış ve intrinsik yolak üzerinden apoptozis gerçekleşmemiştir (141,142). Epoxomicinin, intrinsik yolak üzerinden apoptozise yol açtığını çalışmalarımızda Bax protein düzeyini arttırdığını ve kaspaz-9, kaspaz-3 aktivasyonunu arttırdığını göstererek ispatladık. Yüksek düzeyde Bax proteininin ekspresyonu intrinsik yolağın aktivasyonu ve kaspaz aktivasyon zincirinin devamlılığı için gereklidir. Bax ve Bak proteini açısından double knockout yapılan hayvan çalışmasında TRAIL'ın sitokrom c'yi indükleyemediği ve intrinsik yolak üzerinden apoptozisin gerçekleşmediği, murin embriyonik fibroblast hücrelerinde gösterilmiştir (143).

Yapılan çalışmalar, Bax translokasyonun pro-apoptotik mitokondrial Smac/DIABLO'un salınımı için gerekli olduğunu ve TRAIL-kaspaz-8-tBid-Bax

kaskadının oluşması kaspazların IAP ailesi tarafından inhibisyonunun azaltması ve apoptozisin devamının sağlaması açısından gerekli olduğunu göstermiştir (144,145). IAP ailesinin, Bax sayesinde inhibisyonu gösterilmiş ve bu TRAIL'a hassasiyetini arttırmıştır. Deng ve ark., Bax bağımlı intrinsik yolağın Smac/DIABLO üzerinden ölüm reseptörleri aracılı apoptozise yani ekstrinsik apoptozise katkı sağladığını göstermişlerdir (142). Bizim yaptığımız çalışmada da, Bax artışı paralelinde osteosarkom hücrelerinde TRAIL hassasiyeti artmıştır.

Le Blanc ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Bax-eksik (deficient) insan kolon karsinomu hücreleri, TRAIL'in indüklediği apoptozise dirençli olarak bulunurken, Bax-eksprese eden insan kolon karsinomu hücreleri ise, TRAIL tedavisine karşı sensitif bulunmuştur (141). Başka bir çalışmada araştırmacılar tarafından, Bax proteini eksprese edemeyen kanser hücrelerine, Bax proteini eksprese etme yeteneği kazandırıldıktan sonra, TRAIL sensitivitesinin arttığı rapor edilmiştir (142). Bizim çalışmamızda, TRAIL ve epoxomicin kombinasyonunun Bax proteini düzeylerini yüksek oranda arttırması, TRAIL direncinin kırılmasında önemli bir adım olmuştur. Artmış Bax proteini, IAP ailesinin etkisini azaltmakta ve kaspaz aktivasyonunu amplifiye ederek TRAIL'in indüklediği apoptozise hücreleri hassas hale getirmektedir. Kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivasyonu sırasıyla ekstrinsik ve intrinsik apoptozis yolları için en önemli rolü oynamaktadır (146). Artmış kaspaz-8 aktivasyonu az da olsa Bid ve Bax üzerinden mitokondriyal sitokrom c salınımına sebep olarak intrinsik yolağı aktive eder (147,148). Bu intrinsik ve ekstrinsik yolağı tamamen birbirinden ayırmanın mümkün olmadığını, az da olsa etkileşimin olduğunu gösterir. Kim ve arkadaşları, TRAIL'a dirençli ve duyarlı hücre dizilerinde yapmış oldukları çalışmalarda, TRAIL'a direncin, reseptör düzeyi veya FLIP düzeyleri ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar, doksorubisinin, TRAIL'e dirençli hücrelerde, TRAIL-R2 reseptör seviyelerini arttırarak, dirençli hücreleri TRAIL indüklü apoptozise hassaslaştırdığını göstermişlerdir. Doksorubisin ve TRAIL'ın birlikte uygulanmasının, dirençli hücrelerde kaspaz aktivasyonlarını arttırdığını gözlemlemişlerdir. Buna zıt olarak, doksorubisin ve TRAIL tek başına uygulandıklarında ise kaspaz aktivasyonları gözlenmemiştir (149). Bizim yaptığımız çalışmada ise kombine dozlarda TRAIL ve epoxomicin, kaspaz-8, -9 ve -3 aktivitesini, sadece TRAIL veya sadece epoxomicinin uygulanmasıyla

karşılaştırıldığında yüksek oranda arttırdığını tespit ettik. Başka bir deyişle, kombine doz, hem intrinsik hem ekstrinsik apoptotik yolağı sinerjik bir şekilde aktive ederek osteosarkom hücrelerinde TRAIL direncini azaltmıştır. Yaptığımız bu çalışmada hücre canlılığı testlerimiz, TUNEL ve kaspaz deneylerini destekler bilgiler sundu. Ayrıca yaptığımız epoxomicin doz çalışmaları ve epoxomicinin osteosarkom hücreleri üzerine etkileri ileri de yapılacak deneylere ışık tutabilecek niteliktedir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda epoxomicinin osteosarkom hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliği belirlendi. Epoxomicinin apoptozis üzerine etkileri araştırıldı. Yeni bir tedavi stratejisi ortaya çıkarmak amacıyla TRAIL ile etkileşimi araştırıldı.

Bulduğumuz deneysel verilere göre sonuçlarımızı şu şekilde özetleyebiliriz:

- 1) Epoxomicinin osteosarkom hücrelerindeki zaman-doz bağımlı olarak sitotoksik etkisi belirlendi ve lethal dozları (LD₅₀) saptandı. MG-63 hücreleri için LD₅₀ dozları 24 saatlik inkübasyon sonrası 272 nM (%95 CI; 235-315), 48 saatlik inkübasyon sonrası 124 nM (%95 CI; 100-151) ve 72 saatlik inkübasyon sonrası 12 nM (%95 CI; 3-44) olarak bulundu. Saos-2 hücreleri için LD₅₀ dozları 24 saatlik inkübasyon sonrası 355 nM (%95 CI; 238-532), 48 saatlik inkübasyon sonrası 255 nM (%95 CI; 172-376) ve 72 saatlik inkübasyon sonrası 7 nM (%95 CI; 2-30) olarak bulundu. Bu doz çalışmaları ileri yapılacak olan sitotoksisite çalışmalarına ışık tutacak niteliktedir.
- 2) 1000 ng/ml'ye kadar değişen dozlarda TRAIL ile 24, 48, 72 saatlik inkübasyonlar sonucu, osteosarkom hücrelerinde canlılık yüzdeleri hesaplandı. Saos-2 hücreleri yaptığımız çalışmada MG-63 hücrelerine göre TRAIL'in etkisine daha dirençli bulundu.
- 3) TRAIL ve epoxomicin, yaptığımız kombine doz sitotoksisite çalışmalarında sinerjik etkili olarak bulundu.
- 4) Yaptığımız apoptozis ve kaspaz deneyleri sonucu epoxomicinin pro-apoptotik özelliğini büyük oranda intrinsik yolak üzerinden, TRAIL'in ise ekstrinsik yolak üzerinden gerçekleştirdiğini tespit ettik.
- 5) İntrinsik yolak aktivasyonunun kilit noktasında olan Bax proteinlerinin epoxomicin uygulamasıyla arttığı ve bu artışı TRAIL ile kombine dozunsinerjik etki göstererek daha da arttırdığını tespit ettik. Bu Bax artışı, kaspaz aktivasyonlarının artışına sebep olup, her iki osteosarkom hücresinde de apoptozisin artmasına neden olduğunu tespit ettik.
- 6) TRAIL'a dirençlilikleri farklı olan bu osteosarkom hücrelerinde, epoxomicinin, TRAIL ile sinerjistik etki göstermesi, TRAIL ve epoxomicinin beraber uygulanmasının TRAIL'in düşük dozda uygulanmasını sağlaması

yönünden önemlidir. Bu sonuçlara göre epoxomicinin TRAIL'e dirençli hücrelerde TRAIL hassasiyetini arttırdığını tespit ettik.

- 7) Yaptığımız çalışma epoxomicinin osteosarkom hücrelerine etki mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlamıştır. Epoxomicinin hem tek başına hemde TRAIL ile kombine olarak osteosarkom hücreleri üzerine sitotoksik etkili olduğunu tespit ettik. Epoxomicinin osteosarkom hücrelerine etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için *in vivo* çalışmalar literatüre katkı sağlayacaktır.

7. ÖZET

Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) ve Epoxomicin'in Osteosarkom Hücrelerinde Apoptozis Üzerine Etkileri

Osteosarkom hastalarında, kemoterapinin dezavantajlarından ve bazı hastalarda gelişen dirençten dolayı, yeni ve daha güvenli bir tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır. Tümör tedavilerinde yeni bir dönem açacağı düşünülen TRAIL birçok tümörde denenmektedir. Osteosarkom hücrelerinin TRAIL'a karşı dirençli olduğu bilinmektedir. Bazı kanser hücrelerinde proteazom inhibitörlerinin TRAIL hassasiyetini arttırdığını bildiren yayınlar vardır. Ancak TRAIL'e dirençli osteosarkom hücrelerinde proteazom inhibitörlerinden epoxomicinin (epoxomicin) bu direnci nasıl etkilediği daha önce çalışılmamıştır. Ayrıca yaptığımız literatür taramasında epoxomicinin osteosarkom hücreleri üzerine etkisini araştıran bir çalışmaya rastlamadık. Bu nedenlerden dolayı epoxomicinin osteosarkom hücrelerinde apoptozis ve hücre sitotoksitesi üzerindeki etkilerini ve epoxomicinin TRAIL'a dirençli MG-63 ve Saos-2 hücre dizilerinde TRAIL hassasiyetini arttırıp arttırmadığını araştırdık.

Epoxomicin ve/veya TRAIL ile inkübe edilen hücrelerde hücre canlılıkları kolorimetrik yöntem prensibiyle ölçüm yapan MTT ve WST-8 kitleri ile tespit edildi. Kaspaz-3, -8 ve -9 aktiviteleri ve pro-apoptotik Bax protein düzeyleri spektrofotometrik kitler ile ölçüldü. Apoptozis oluşumu immunokimyasal olarak TUNEL metodu ile değerlendirildi.

MG-63 ve Saos-2 hücre canlılıkları üzerindeki TRAIL ve/veya epoxomicin etkisini, doza ve zamana (24, 48, 72 saat) bağımlı olarak değerlendirdik. MG-63 hücrelerinde epoxomicin LD₅₀ dozlarını, 24 saatlik inkübasyon sonrası 272 nM, 48 saatlik inkübasyon sonrası 124 nM ve 72 saatlik inkübasyon sonrası 12 olarak bulduk. Saos-2 hücrelerinde ise epoxomicin LD₅₀ dozlarını, 24 saatlik inkübasyon sonrası 355 nM, 48 saatlik inkübasyon sonrası 255 nM ve 72 saatlik inkübasyon sonrası 7 nM olarak bulduk. TRAIL ve epoxomicinin kombine olarak uygulandığı grupta kaspaz-3,-8,-9 aktiviteleri ve Bax proteini düzeyleri, sadece TRAIL veya epoxomicin uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında, anlamlı düzeyde artmış olarak

bulundu ($p<0.01$). Bulgularımız, TRAIL ve epoxomicin kombinasyonlarının düşük dozlarının bile sinerjistik etki göstererek, osteosarkom hücrelerindeki TRAIL dirençliliğinin azalmasında etkili olduğunu ortaya koydu.

Çalışmamızda, epoxomicinin osteosarkom hücreleri üzerine sitotoksik etkili olduğunu tespit ettik. Bulgularımız, osteosarkom hücrelerinde TRAIL direncinin epoxomicin ile kırılabilceğini gösteren ilk araştırma olması açısından da önemlidir. Yaptığımız araştırmanın, TRAIL ile geliştirilebilecek tedavi yaklaşımlarına katkı sağlayacağını kanıslındayız.

Anahtar kelimeler: Osteosarkom, TRAIL, Epoxomicin, Apoptozis, MG-63, Saos-2.

8. ABSTRACT

Effects of TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) and Epoxomicin on Apoptosis in Different Types of Osteosarcoma Cells

Osteosarcoma (OS) is one of the most frequent primary malignant tumors of bone. Despite recent improvement in therapy, there is inherent or acquired resistance to chemotherapeutic agents in some OS cases. In addition, the other disadvantages of the chemotherapeutic agents are their cytotoxic effects to normal tissues and organs. Novel therapeutic approaches are needed for improvement of OS treatment. The purpose of our study was to determine the effects of epoxomicin on TRAIL resistance in MG-63 and Saos-2 osteosarcoma cells with an attempt to find novel anti-cancer agents that target cancer cells or confer synergy with TRAIL.

We determined the cytotoxic effect of epoxomicin and TRAIL in Saos-2 and MG-63 OS cell lines using MTT and WST-8 assays. We measured apoptosis markers such as caspase -3, -8, -9 activities and pro-apoptotic Bax levels. We demonstrated apoptosis immunochemically using TUNEL assay. We found LD₅₀ doses of epoxomicin on MG-63 cells viability as 272 nM, 124 nM and 12 nM after incubations for 24, 48, and 72 h, respectively ($P < 0.001$). We found LD₅₀ doses of epoxomicin on Saos-2 cells viability as approximately 355 nM, 255 nM and 7 nM after incubations for 24, 48, and 72 h, respectively. Incubation with TRAIL and epoxomicin for 24 h significantly increased caspase -3, -8, -9 activities and Bax levels compared to the cells incubated separately with TRAIL or epoxomicin ($p < 0.01$). We determined cell viabilities of MG-63 and Saos-2 upon incubation with different doses of TRAIL and Epoxomicin. This dose study gives us useful information for further apoptosis studies.

Our data demonstrated that combining TRAIL with epoxomicin enhanced apoptosis and overcome TRAIL resistance which promises improvement in future OS treatment modalities.

Key words: Osteosarcoma, TRAIL, Epoxomicin, Apoptosis, MG-63, Saos-2.

9. KAYNAKLAR

1. Hori T, Kondo T, Kanamori M, Tabuchi Y, Ogawa R, Zhao QL, et al. Ionizing radiation enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through up-regulations of death receptor 4 (DR4) and death receptor 5 (DR5) in human osteosarcoma cells. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 2010; 28(6): 739-45. Epub 2009/12/31.
2. Wu X, Cai M, Ji F, Lou LM. The impact of COX-2 on invasion of osteosarcoma cell and its mechanism of regulation. *Cancer Cell International* 2014; 14(1): 27. Epub 2014/03/29.
3. Pei N, Jie F, Luo J, Wan R, Zhang Y, Chen X, et al. Gene Expression Profiling Associated with Angiotensin II Type 2 Receptor-Induced Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. *PloS one* 2014; 9(3): e92253. Epub 2014/03/25.
4. MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicology Letters* 2003; 139(2-3): 89-97. Epub 2003/03/12.
5. Evdokiou A, Bouralexis S, Atkins GJ, Chai F, Hay S, Clayer M, et al. Chemotherapeutic agents sensitize osteogenic sarcoma cells, but not normal human bone cells, to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis. *International Journal of Cancer Journal International du Cancer* 2002; 99(4): 491-504. Epub 2002/05/07.
6. Lu G, Punj V, Chaudhary PM. Proteasome inhibitor Bortezomib induces cell cycle arrest and apoptosis in cell lines derived from Ewing's sarcoma family of tumors and synergizes with TRAIL. *Cancer Biology&Therapy* 2008; 7(4): 603-8. Epub 2008/01/29.
7. Nagy K, Szekely-Szuts K, Izeradjene K, Douglas L, Tillman M, Barti-Juhasz H, et al. Proteasome inhibitors sensitize colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via enhanced release of Smac/DIABLO from the mitochondria. *Pathology Oncology Research POR* 2006; 12(3): 133-42. Epub 2006/09/26.
8. Kantar M. Osteosarkom. *Klinik Gelişim Dergisi* 2007; 20(2): 120-4.
9. Fleuren ED, Versleijen-Jonkers YM, Boerman OC, van der Graaf WT. Targeting receptor tyrosine kinases in osteosarcoma and Ewing sarcoma: Current hurdles and future perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 1845(2): 266-76. Epub 2014/03/04.

10. Finkel MP, Reilly CA Jr, Biskis BO. Pathogenesis of radiation and virus-induced bone tumors. Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres Dans Les Recherches Sur le Cancer 1976; 54: 92-103. Epub 1976/01/01.
11. Yuzer G. Osteosarkom, Ewing sarkomu ve Rabdomiyosarkomda C-Kit, C-Erb B2 ekspresyonunun prognostik öneminin araştırılması ve klinik parametrelerle karşılaştırılması. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Uzmanlık Tezi 2008.
12. Glasser DB, Lane JM, Huvois AG, Marcove RC, Rosen G. Survival, prognosis, and therapeutic response in osteogenic sarcoma. The Memorial Hospital experience. Cancer 1992; 69(3): 698-708. Epub 1992/02/01.
13. Hugate R, Sim F. Innovations in musculoskeletal oncology: 2004. Journal of orthopaedic science: official journal of the Japanese Orthopaedic Association 2005; 10(3): 331-40. Epub 2005/06/02.
14. Oto M. Osteosarkom ve varyantlarında tanısal yaklaşım modaliteleri. Pamukkale Tıp Dergisi 2008; 1: 59-64.
15. Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. Cancer 1995; 75(1 Suppl): 203-10. Epub 1995/01/01.
16. Hotta T, Suzuki H, Nagai S, Yamamoto K, Imakiire A, Takada E, et al. Chemotherapeutic agents sensitize sarcoma cell lines to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced caspase-8 activation, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society 2003; 21(5): 949-57. Epub 2003/08/16.
17. Moon MH, Jeong JK, Seo JS, Seol JW, Lee YJ, Xue M, et al. Bisphosphonate enhances TRAIL sensitivity to human osteosarcoma cells via death receptor 5 upregulation. Experimental & Molecular Medicine 2011; 43(3): 138-45. Epub 2011/02/08.
18. Picarda G, Lamoureux F, Geffroy L, Delepine P, Montier T, Laud K, et al. Preclinical evidence that use of TRAIL in Ewing's sarcoma and osteosarcoma therapy inhibits tumor growth, prevents osteolysis, and increases animal survival. Clin Cancer Res 16(8): 2363-74. Epub 2010/04/08.
19. Moon MH, Jeong JK, Seo JS, Seol JW, Lee YJ, Xue M, et al. Bisphosphonate enhances TRAIL sensitivity to human osteosarcoma cells via death receptor 5 upregulation. Exp Mol Med 43(3): 138-45. Epub 2011/02/08.
20. Mirandola P, Sponzilli I, Gobbi G, Marmioli S, Rinaldi L, Binazzi R, et al. Anticancer agents sensitize osteosarcoma cells to TNF-related apoptosis-inducing

- ligand downmodulating IAP family proteins. *Int J Oncol* 2006; 28(1): 127-33. Epub 2005/12/06.
21. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute* 1977; 59(1): 221-6. Epub 1977/07/01.
 22. Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Research* 1987; 47(18): 4961-6. Epub 1987/09/15.
 23. Greco F, de Palma L, Specchia N, Jacobelli S, Gaggini C. Polymethylmethacrylate-antiblastic drug compounds: an in vitro study assessing the cytotoxic effect in cancer cell lines--a new method for local chemotherapy of bone metastasis. *Orthopedics* 1992; 15(2): 189-94. Epub 1992/02/01.
 24. Billiau A, Edy VG, Heremans H, Van Damme J, Desmyter J, Georgiades JA, et al. Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1977; 12(1): 11-5. Epub 1977/07/01.
 25. Simstein R, Burow M, Parker A, Weldon C, Beckman B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228(9): 995-1003.
 26. Carmody RJ, Cotter TG. Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep* 2001; 6(2): 77-90.
 27. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 1997; 21(1): 88-101.
 28. Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta* 2002; 326(1-2): 27-45.
 29. Haddad JJ. Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment. *Int Immunopharmacol* 2004; 4(4): 475-93.
 30. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(3-4): 323-33.
 31. Lee YJ, Shacter E. Oxidative stress inhibits apoptosis in human lymphoma cells. *J Biol Chem* 1999; 274(28): 19792-8.
 32. Shacter E, Williams JA, Hinson RM, Senturker S, Lee YJ. Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. *Blood* 2000; 96(1): 307-13.

33. Thornberry NA. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem Biol* 1998; 5(5): 97-103.
34. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281(5381): 1312-6.
35. Aslan M, Freeman BA. Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. *Immunol Res* 2002; 26(1-3): 107-18.
36. Mates JM, Sanchez-Jimenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32(2): 157-70.
37. Blatt NB, Glick GD. Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorg Med Chem* 2001; 9(6): 1371-84.
38. Guchelaar HJ, Vermes A, Vermes I, Haanen C. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. *Pharm World Sci* 1997; 19(3): 119-25.
39. Hunot S, Flavell RA. Apoptosis. Death of a monopoly? *Science* 2001; 292(5518): 865-6.
40. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281(5381): 1305-8.
41. Kataoka S, Tsuruo T. Physician Education: Apoptosis. *Oncologist* 1996; 1(6): 399-401.
42. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003; 15(11): 983-92.
43. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 1998; 17(25): 3237-45.
44. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 2005; 84(10): 627-39.
45. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495-516.
46. Jones RH, Vasey PA. Part I: testicular cancer--management of early disease. *Lancet Oncol* 2003; 4(12): 730-7.
47. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 1997; 272(42): 26159-65.
48. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267(5203): 1456-62.

49. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000; 256(1): 42-9.
50. Yang X, Stennicke HR, Wang B, Green DR, Janicke RU, Srinivasan A, et al. Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *J Biol Chem* 1998; 273(51): 34278-83.
51. Sanlioglu AD, Aydin C, Bozcuk H, Terzioglu E, Sanlioglu S. Fundamental principals of tumor necrosis factor-alpha gene therapy approach and implications for patients with lung carcinoma. *Lung Cancer* 2004; 44(2): 199-211.
52. Sanlioglu AD, Dirice E, Aydin C, Erin N, Koksoy S, Sanlioglu S. Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells. *BMC Cancer* 2005; 5(1): 54.
53. Sanlioglu AD, Koksall IT, Ciftcioglu A, Baykara M, Luleci G, Sanlioglu S. Differential expression of TRAIL and its receptors in benign and malignant prostate tissues. *J Urol* 2007; 177(1): 359-64.
54. Sanlioglu AD, Koksall IT, Karacay B, Baykara M, Luleci G, Sanlioglu S. Adenovirus-mediated IKKbeta expression sensitizes prostate carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Gene Therapy* 2006; 13(1): 21-31. Epub 2005/07/30.
55. Yagita H, Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Okumura K. TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 2004; 95(10): 777-83.
56. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 2004; 16(2): 139-44.
57. Dejoze M, Ramp U, Mahotka C, Krieg A, Walczak H, Gabbert HE, et al. Sensitivity to TRAIL/APO-2L-mediated apoptosis in human renal cell carcinomas and its enhancement by topotecan. *Cell Death Differ* 2000; 7(11): 1127-36.
58. Kelley SK, Ashkenazi A. Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4(4): 333-9.
59. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88(3): 355-65.
60. Schneider P, Bodmer JL, Thome M, Hofmann K, Holler N, Tschopp J. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett* 1997; 416(3): 329-34.
61. Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *Embo J* 1997; 16(16): 4999-5005.
62. Cretney E, Shanker A, Yagita H, Smyth MJ, Sayers TJ. TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer. *Immunol Cell Biol* 2006; 84(1): 87-98.

63. Call JA, Eckhardt SG, Camidge DR. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment. *Lancet Oncol* 2008; 9(10): 1002-11.
64. Kim R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* 2005; 103(8): 1551-60.
65. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(2): 255-60.
66. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.
67. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391(6662): 96-9.
68. Yamaguchi H, Wang HG. Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome C release independent of interacting with Bax or BimEL. *J Biol Chem* 2002; 277(44): 41604-12.
69. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, et al. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 1999; 144(5): 891-901.
70. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, et al. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 1999; 144(5): 903-14.
71. Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* 1999; 274(13): 8359-62.
72. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999; 144(2): 281-92.
73. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 1996; 2(5): 574-7.
74. Muller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann WJ, et al. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* 1997; 99(3): 403-13.

75. Kaufmann SH, Gores GJ. Apoptosis in cancer: cause and cure. *Bioessays* 2000; 22(11): 1007-17.
76. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* 2002; 265(1-2): 49-72.
77. Abdel-Latif MM, Raouf AA, Sabra K, Kelleher D, Reynolds JV. Vitamin C enhances chemosensitization of esophageal cancer cells in vitro. *J Chemother* 2005; 17(5): 539-49.
78. Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; 274(29): 20049-52.
79. Graf D, Bode JG, Haussinger D. Caspases and receptor cleavage. *Arch Biochem Biophys* 2007; 462(2): 162-70.
80. Hill MM, Adrain C, Martin SJ. Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv* 2003; 3(1): 19-26.
81. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64(4): 821-46.
82. Amarante-Mendes GP, Green DR. The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(9): 1053-61.
83. D'Amelio M, Tino E, Cecconi F. The apoptosome: emerging insights and new potential targets for drug design. *Pharm Res* 2008; 25(4): 740-51.
84. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998; 391(6662): 43-50.
85. Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y. Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 1999; 401(6749): 168-73.
86. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2003; 10(1): 76-100.
87. Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 2000; 20(3): 929-35.
88. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22(53): 8590-607.
89. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(8): 3668-72.

90. Harris MH, Thompson CB. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death Differ* 2000; 7(12): 1182-91.
91. Moreau C, Cartron PF, Hunt A, Meflah K, Green DR, Evan G, et al. Minimal BH3 peptides promote cell death by antagonizing anti-apoptotic proteins. *J Biol Chem* 2003; 278(21): 19426-35.
92. Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 2001; 306(3): 347-61.
93. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292(5517): 727-30.
94. White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996; 10(1): 1-15.
95. LeBlanc HN, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death and Differentiation* 2003; 10(1): 66-75. Epub 2003/03/26.
96. Mahmood Z, Shukla Y. Death receptors: targets for cancer therapy. *Experimental Cell Research* 2010; 316(6): 887-99. Epub 2009/12/23.
97. Abdollahi T, Robertson NM, Abdollahi A, Litwack G. Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by IL-8 is mediated by the p38-MAPK pathway in OVCAR3 cells. *Apoptosis : an International Journal on Programmed Cell Death* 2005; 10(6): 1383-93. Epub 2005/10/11.
98. de Bruyn M, Bremer E, Helfrich W. Antibody-based fusion proteins to target death receptors in cancer. *Cancer Letters* 2013; 332(2): 175-83. Epub 2011/01/11.
99. Herbst RS, Eckhardt SG, Kurzrock R, Ebbinghaus S, O'Dwyer PJ, Gordon MS, et al. Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010; 28(17): 2839-46. Epub 2010/05/12.
100. Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008; 26(21): 3621-30. Epub 2008/07/22.
101. Ciavarella S, Dominici M, Dammacco F, Silvestris F. Mesenchymal stem cells: a new promise in anticancer therapy. *Stem Cells Dev* 20(1): 1-10. Epub 2010/07/31.

102. Mitchell MJ, Wayne E, Rana K, Schaffer CB, King MR. TRAIL-coated leukocytes that kill cancer cells in the circulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014; 111(3): 930-5. Epub 2014/01/08.
103. Yewdell JW. Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends in Cell Biology* 2001; 11(7): 294-7. Epub 2001/06/20.
104. Strous GJ, Gent J. Dimerization, ubiquitylation and endocytosis go together in growth hormone receptor function. *FEBS Letters* 2002; 529(1): 102-9. Epub 2002/10/02.
105. Spataro V, Norbury C, Harris AL. The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *British Journal of Cancer* 1998; 77(3): 448-55. Epub 1998/02/24.
106. Meng L, Mohan R, Kwok BH, Eloffsson M, Sin N, Crews CM. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(18): 10403-8. Epub 1999/09/01.
107. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews* 2002; 82(2): 373-428. Epub 2002/03/28.
108. Wu WK, Cho CH, Lee CW, Wu K, Fan D, Yu J, et al. Proteasome inhibition: a new therapeutic strategy to cancer treatment. *Cancer Letters* 2010; 293(1): 15-22. Epub 2010/02/06.
109. Pagano M. Cell cycle regulation by the ubiquitin pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1997; 11(13): 1067-75. Epub 1997/11/21.
110. Tu Y, Chen C, Pan J, Xu J, Zhou ZG, Wang CY. The Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2012; 5(8): 726-38. Epub 2012/10/17.
111. He H, Qi XM, Grossmann J, Distelhorst CW. c-Fos degradation by the proteasome. An early, Bcl-2-regulated step in apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(39): 25015-9. Epub 1998/09/17.
112. Hanada M, Sugawara K, Kaneta K, Toda S, Nishiyama Y, Tomita K, et al. Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *The Journal of Antibiotics* 1992; 45(11): 1746-52. Epub 1992/11/01.

113. Hetschko H, Voss V, Seifert V, Prehn JH, Kogel D. Upregulation of DR5 by proteasome inhibitors potently sensitizes glioma cells to TRAIL-induced apoptosis. *The FEBS Journal* 2008; 275(8): 1925-36. Epub 2008/03/18.
114. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends in Cell Biology* 1998; 8(10): 397-403. Epub 1998/10/28.
115. Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005; 23(3): 630-9. Epub 2005/01/22.
116. Sorolla A, Yeramian A, Dolcet X, Perez de Santos AM, Llobet D, Schoenenberger JA, et al. Effect of proteasome inhibitors on proliferation and apoptosis of human cutaneous melanoma-derived cell lines. *The British Journal of Dermatology* 2008; 158(3): 496-504. Epub 2008/01/22.
117. Chauhan D, Hideshima T, Mitsiades C, Richardson P, Anderson KC. Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics* 2005; 4(4): 686-92. Epub 2005/04/14.
118. McCormack PL. Carfilzomib: in relapsed, or relapsed and refractory, multiple myeloma. *Drugs* 2012; 72(15): 2023-32. Epub 2012/09/22.
119. Fostier K, De Becker A, Schots R. Carfilzomib: a novel treatment in relapsed and refractory multiple myeloma. *OncoTargets and Therapy* 2012; 5: 237-44. Epub 2012/10/12.
120. Brooks AD, Jacobsen KM, Li W, Shanker A, Sayers TJ. Bortezomib sensitizes human renal cell carcinomas to TRAIL apoptosis through increased activation of caspase-8 in the death-inducing signaling complex. *Molecular Cancer Research: MCR* 2010; 8(5): 729-38. Epub 2010/05/06.
121. Szczepanski MA, Grzanka A, Litwiniec A, Gackowska L, Kubiszewska I, Grzanka D. Cytoskeletal changes during cellular response of the A549 lung cancer cells to continuous cisplatin treatment. *Cell Biology International* 2010; 34(2): 197-211. Epub 2009/12/02.
122. Yoon MH, Yaksh TL. Evaluation of interaction between gabapentin and ibuprofen on the formalin test in rats. *Anesthesiology* 1999; 91(4): 1006-13. Epub 1999/10/16.
123. Li W, Liu ML, Cai JH, Tang YX, Zhai LY, Zhang J. Effect of the combination of a cyclooxygenase-1 selective inhibitor and taxol on proliferation, apoptosis and angiogenesis of ovarian cancer in vivo. *Oncology Letters* 2012; 4(1): 168-74. Epub 2012/07/19.

124. Adams J. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4(5): 349-60. Epub 2004/05/04.
125. Johnson TR, Stone K, Nikrad M, Yeh T, Zong WX, Thompson CB, et al. The proteasome inhibitor PS-341 overcomes TRAIL resistance in Bax and caspase 9-negative or Bcl-xL overexpressing cells. *Oncogene* 2003; 22(32): 4953-63. Epub 2003/08/07.
126. Ray S, Bucur O, Almasan A. Sensitization of prostate carcinoma cells to Apo2L/TRAIL by a Bcl-2 family protein inhibitor. *Apoptosis* 2005; 10(6): 1411-8.
127. Gliniak B, Le T. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11. *Cancer Res* 1999; 59(24): 6153-8.
128. Sanlioglu AD, Dirice E, Elpek O, Korcum AF, Balci MK, Omer A, et al. High levels of endogenous tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression correlate with increased cell death in human pancreas. *Pancreas* 2008; 36(4): 385-93.
129. Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997; 277(5327): 818-21.
130. Mellier G, Huang S, Shenoy K, Pervaiz S. TRAILing death in cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 2010; 31(1): 93-112. Epub 2009/12/10.
131. Mizutani Y, Yoshida O, Miki T, Bonavida B. Synergistic cytotoxicity and apoptosis by Apo-2 ligand and adriamycin against bladder cancer cells. *Clin Cancer Res* 1999; 5(9): 2605-12.
132. Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenee WK, Huang HJ. Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2000; 60(4): 847-53.
133. Chinnaiyan AM, Prasad U, Shankar S, Hamstra DA, Shanaiah M, Chenevert TL, et al. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(4): 1754-9.
134. Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, Shima Y, Richardson P, Schlossman R, et al. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and overcomes drug resistance in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2001; 98(3): 795-804.

135. Kelly MM, Hoel BD, Voelkel-Johnson C. Doxorubicin pretreatment sensitizes prostate cancer cell lines to TRAIL induced apoptosis which correlates with the loss of c-FLIP expression. *Cancer Biology & Therapy* 2002; 1(5): 520-7. Epub 2002/12/24.
136. Shankar S, Chen X, Srivastava RK. Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo. *The Prostate* 2005; 62(2): 165-86. Epub 2004/09/25.
137. Sun J, Fu ZM, Fang CQ, Li JH. Induction of apoptosis in osteogenic sarcoma cells by combination of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand and chemotherapeutic agents. *Chinese Medical Journal* 2007; 120(5): 400-4. Epub 2007/03/23.
138. Ganten TM, Koschny R, Haas TL, Sykora J, Li-Weber M, Herzer K, et al. Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells, but not human hepatocytes, to TRAIL. *Hepatology* 2005; 42(3): 588-97. Epub 2005/07/23.
139. Li X, Huang T, Jiang G, Gong W, Qian H, Zou C. Proteasome inhibitor MG132 enhances TRAIL-induced apoptosis and inhibits invasion of human osteosarcoma OS732 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013; 439(2): 179-86. Epub 2013/09/03.
140. Cheong HJ, Lee KS, Woo IS, Won JH, Byun JH. Up-regulation of the DR5 expression by proteasome inhibitor MG132 augments TRAIL-induced apoptosis in soft tissue sarcoma cell lines. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association* 2011; 43(2): 124-30. Epub 2011/08/04.
141. LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Schow P, et al. Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nature Medicine* 2002; 8(3): 274-81. Epub 2002/03/05.
142. Deng Y, Lin Y, Wu X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes & Development* 2002; 16(1): 33-45. Epub 2002/01/10.
143. Kandasamy K, Srinivasula SM, Alnemri ES, Thompson CB, Korsmeyer SJ, Bryant JL, et al. Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release. *Cancer Research* 2003; 63(7): 1712-21. Epub 2003/04/03.

144. Gill C, Dowling C, O'Neill AJ, Watson RW. Effects of cIAP-1, cIAP-2 and XIAP triple knockdown on prostate cancer cell susceptibility to apoptosis, cell survival and proliferation. *Molecular Cancer* 2009; 8: 39. Epub 2009/06/25.
145. Symanowski J, Vogelzang N, Zawel L, Atadja P, Pass H, Sharma S. A histone deacetylase inhibitor LBH589 downregulates XIAP in mesothelioma cell lines which is likely responsible for increased apoptosis with TRAIL. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2009; 4(2): 149-60. Epub 2009/01/31.
146. Yang J, Yang Y, Tian L, Sheng XF, Liu F, Cao JG. Casticin-induced apoptosis involves death receptor 5 upregulation in hepatocellular carcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2011; 17(38): 4298-307. Epub 2011/11/18.
147. Wallach-Dayana SB, Izbicki G, Cohen PY, Gerstl-Golan R, Fine A, Breuer R. Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 2006; 290(4): 790-6. Epub 2005/11/25.
148. Tang D, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(13): 9303-7. Epub 2000/03/29.
149. Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, el-Deiry WS. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000; 6(2): 335-46.