

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**TRAIL (TNF İLE İLİŞKİLİ APOPTOZİSİ AKTİVE
EDEN LİGAND) LİGAND VE RESEPTÖR
PROFİLLERİNİN ROMATOİD ARTRİT İLE İLİŞKİSİ**

Dr. Atıl BİŞGİN

Doktora Tezi

Antalya, 2010

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

**TRAIL (TNF İLE İLİŞKİLİ APOPTOZİSİ AKTİVE
EDEN LİGAND) LİGAND VE RESEPTÖR
PROFİLLERİNİN ROMATOİD ARTRİT İLE İLİŞKİSİ**

Dr. Atıl BİŞGİN

Doktora Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2008.03.0122.001

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında doktora (PhD) tezi olarak kabul edilmiştir. / /2010

Tez Danışmanı: **Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Gen Tedavi Ünitesi Başkanı
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Üye : **Prof. Dr. Gülseren BAĞCI**
Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Üye : **Prof. Dr. Güven LÜLECI**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Mustafa Ender TERZİOĞLU**
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun/...../ 2010 tarih ve/..... Sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstitü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı Senato kararı gereğince ‘‘Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavlarına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği’’ ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır.

- 1) Terzioğlu E*, **Bişgin A***, Sanliođlu AD, Ulker M, Yazısız V, Tuzuner S, Sanliođlu S. Concurrent gene therapy strategies effectively destroy synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2007 May;46(5):783-9. Epub 2007 Feb 19

*Terzioğlu E. ve Bişgin A. ilk yazar sırasını paylaşmaktadırlar

ÖZET

Romatoid Artrit (RA), kronik otoimmün inflamatuvar hastalıklar içerisinde en yaygın görülen romatizmal hastalıktır. Günümüzde halen RA' nın etiopatogenezi açıklığa kavuşturulmamış olmasına rağmen, hastalığın gelişim sürecinde T hücrelerinin önemli bir rol aldığı bilinmektedir. Bu etkilerini makrofaj ve B hücrelerinin aktivasyonu aracılığı ile gösterirler. Merkezi ve periferal T hücrelerinin, immün yanıt esnasında oluşan aktiviteleri programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozis ile düzenlenmektedir. TRAIL (TNF ile ilişkili apoptozisi aktive eden ligand) ekspresyonundaki bozukluk sonucu oluşan timosit apoptozisi, otoimmün hastalıklarla sonuçlanmaktadır. Biz de burada T hücrelerinin yüzeyindeki TRAIL reseptör ve ligand kompozisyonlarını belirleyerek, RA' lı hastalarda TRAIL' in hastalığın gelişim ve ilerlemesindeki rolünün saptanması ve bunun hastalığın seyri ile ilişkisini araştırmayı amaçladık. Bu sayede RA' nın patofizyolojik mekanizmasında TRAIL ve reseptörlerinin T hücrelerinin fonksiyonunu nasıl etkilediği belirlendi.

Bu amaçla yapılan akış sitometrisi analizleri sonucunda RA' lı hastalarda sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T hücrelerinde TRAIL ligand ve hem ölümcül (DR4/DR5) hem de dekoj reseptör (DcR1/DcR2) ekspresyonlarında belirgin şekilde artış saptandı. Bu artışlar, RA' nın klinik değerlendirmesinde, hastalığın aktivite skoru olarak kullanılan DAS28 skorlaması ile karşılaştırıldı. Burada özellikle CD8⁺ T hücrelerindeki, en fazla DcR1 olmak üzere DR4 ve DcR2 ekspresyonundaki artışın DAS28 ile korele olduğu saptandı.

Sonuç olarak, T hücre yüzeyindeki TRAIL ligand ve reseptör ekspresyon profillerindeki farklılıklar, TRAIL' in RA patogenezinde önemli bir role sahip olabileceğine göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: TRAIL, Moleküler Tanı, DAS28 Skoru, Romatoid Artrit

ABSTRACT

Rheumatoid Arthritis (RA) is the most common, chronic autoimmune inflammatory disorder. Although the pathogenesis of the disease is unclear, it is well known that T cells play a major role in both development and perpetuation of RA through activating macrophages and B cells. Apoptosis or programmed cell death regulates central and peripheral T cells' activity during the immune response. Since the lack of TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) expression resulted in defective thymocyte apoptosis leading to an autoimmune disease, we explored evidence for alterations in TRAIL/TRAIL receptor expressions on peripheral T lymphocytes in the molecular mechanism of RA development.

Accordingly, we performed a flow cytometric analysis to examine the T cell associated TRAIL and its receptors' expression profile in patients with RA. Significant up-regulation of TRAIL and its receptors (both death and decoy) was detected on both CD4⁺ and CD8⁺ T cells in RA patients compared to control individuals. The correlation between TRAIL and its' receptor expression profile was compared with clinical RA parameters such as RA activity (DAS28) scoring. Intriguingly, only the CD8⁺ T cell associated DR4 death receptor and both decoy receptors (DcR1 and DcR2) displayed a positive correlation with patients' DAS scores.

In conclusion, differential alteration of TRAIL death and decoy receptor expression profiles on T cells indicates that these profiles might be important in revelation of RA pathogenesis.

Key Words: TRAIL, Molecular Diagnostics, DAS scores, Rheumatoid Arthritis

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince gösterdiği yakın ilgi ve akademik kariyerimin şekillenmesindeki yol göstericiliği için saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU' na,

Tez çalışmalarına önerileri ile katkıda bulunan sayın hocam Prof. Dr. Ender TERZİOĞLU' na,

Desteği için anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI' ya,

Tez savunma sınavımda jüri üyeliği yapan sayın hocalarıma,

Hasta grubumun oluşturulması aşamasında desteğinden dolayı Dr. Veli YAZISIZ' a ve Romatoloji-İmmünoloji Bilim Dalı hemşirelerine,

Çalışmam süresince gösterdikleri güler yüz, destek ve yardımları için Tıp Fakültesi Gen Tedavi Ünitesi ekibi Doç. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU, Uzm. Dr. Burçak YOLDAŞ ÇELİKTEN, Uzm. Dr. Ercüment DİRİCE, Arş. Gör. Çiğdem AYDIN ACAR, Arş. Gör. Sevim KAHRAMAN DİRİCE ve Arş. Gör. Fatma Zehra HAPİL' e,

Doktora tez çalışmam ile ilgili resmi işlemleri yürüten Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Ve hayatımın her anında olduğu gibi, doktora eğitimim süresince karşılaştığım her tür zorlukla mücadelede ve çalışmalarım süresince her konudaki desteği ile her zaman yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Romatoid Artrit	2
2.1.1. Romatoid Artrit' in Yaygınlığı	2
2.1.2. Genetiğin Romatoid Artrit Üzerindeki Etkisi	2
2.1.3. Romatoid Artrit Patofizyolojisi	3
2.1.4. Romatoid Artrit' in Tanısı	4
2.1.5. Romatoid Artrit' in Tedavisi	5
2.2. Romatoid Artrit Oluşum Mekanizmasında İmmün Sistem	5
2.3. TRAIL Ölüm Ligandı ve TRAIL Sinyal Yolu	8
2.4. TRAIL' in Otoimmün Hastalıklardaki Rolü	10
2.5. Romatoid Artrit' de TRAIL ve Reseptörlerinin Fonksiyonel Rolü	11
2.6. Çözünebilir TRAIL (sTRAIL)	12
MATERYAL ve METODLAR	13
3.1. Hastaların Seçimi	13
3.2. Kontrol Grubu Seçimi	13
3.3. Hastaların DAS-28 Skorlarının Hesaplanması	13
3.4. Akış Sitometrisi Analizi	14
3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar	14
3.4.2. İşlemler	14
3.5. ELISA Deneyi	16
3.5.1. Kullanılan Kit	16
3.5.2. Kullanılan Solüsyonlar	16
3.5.3. İşlemler	17
3.5.4. Sonuçların Değerlendirilmesi	19
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	19

BULGULAR	20
4.1. Romatoid Artrit' li Hastaların Klinik Değerlendirmesi	20
4.2. Periferel Kan Örneklerinin Akış Sitometrisi İle Değerlendirilmesi	21
4.3. Romatoid Artrit' te CD4 ⁺ T Lenfositlerin TRAIL Ligand ve Reseptör Profilleri	23
4.4. Romatoid Artrit' li Hastaların CD8 ⁺ T Hücre Yüzeylerindeki TRAIL Ligand ve Reseptör Ekspresyon Düzeyleri	26
4.5. T Lenfosit TRAIL Ligand ve Reseptör Ekspresyon Profillerinin RA Hastalık Aktivitesi İle İlişkisi	30
4.6. Romatoid Artrit'li Hastalarda Serum sTRAIL Düzeylerinin Önemi	32
TARTIŞMA ve SONUÇLAR	35
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	47
EKLER	48
Ek-1. Terzioğlu E, Bisgin A , Sanlioęlu AD, Ulker M, Yazisiz V, Tuzuner S, Sanlioęlu S. Concurrent gene therapy strategies effectively destroy synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis.Rheumatology (Oxford). 2007 May;46(5):783-9. Epub 2007 Feb 19	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACR	: American College of Rheumatology
ALPS	: Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
Apo-2L	: Apo2 Ligand
BCL- xL	: B-cell lymphoma-extra large
CD	: Cluster of differentiation
CD95L	: Human FAS(CD95) ligand
cFLIP	: The cellular form of FLICE-inhibitory protein
cIAP	: Cellular inhibitor of apoptosis protein
CRP	: C-reactive protein
DAS	: The Disease Activity Score
DeR	: Decoy receptor
DMARD	: Disease-modifying antirheumatic drug
DR	: Death receptor
ECD	: PE-Texas Red
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESR	: Erythrocyte sedimentation rate
FasL	: Fas ligand
FITC	: fluorescein isothiocyanate
FLICE	: FADD-like IL-1 β -converting enzyme
GMCSF	: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
gp39	: Human cartilage glycoprotein 39
HLA	: Human Leukocyte Antigens
HRP	: Methylated Lysine (mono methyl, di methyl) antibody
IFN-α	: Interferon-alpha
IFN-γ	: Interferon-gamma
IgG	: Immunoglobulin G

IL	: Interleukin
KİA	: Kollajen indüklü Artrit
MS	: Multiple Skleroz
NF-κB	: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	: Natural killer
OPG	: Osteoprotegerin
PBS	: Phosphate buffered saline
PE	: Phycoerythrin
RA	: Romatoid Artrit
RF	: Rheumatoid factor
SEM	: The standard error of the mean
SLE	: Systemic Lupus Erythematosus
sTRAIL	: Soluble TRAIL
Th1	: T-helper1
TNF-α	: Tumor necrosis factor alpha
TRAIL	: TNF-related apoptosis-inducing ligand
VEGF	: Vascular endothelial growth factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. RA patofizyolojisi	3
2.2. RA' nın gelişim mekanizması	6
2.3. TRAIL reseptörlerinin şematik gösterimi	8
2.4. TRAIL ölüm reseptörleri aracılığı ile hücre ölümü	9
4.1. CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T hücre oranları	22
4.2. CD4 ⁺ T lenfositlerindeki TRAIL ligand ve reseptör ekspresyon düzeyleri	23
4.3. CD4 ⁺ T lenfositlerindeki TRAIL ligand ve reseptörlerinin akış sitometri ile analizine birer örnek	24
4.4. RA' lı hastaların CD4 ⁺ T hücrelerindeki TRAIL ligand ve reseptör ekspresyon miktarları	25
4.5. CD8 ⁺ T hücrelerindeki TRAIL ligand ve reseptör düzeyleri	27
4.6. CD8 ⁺ T lenfositlerindeki TRAIL ligand ve reseptörlerinin akış sitometri ile analizine birer örnek	28
4.7. RA' lı hastaların CD8 ⁺ lenfositlerine bağlı TRAIL ligand ve reseptörlerinin artış miktarı	29
4.8. CD8 ⁺ T hücresi ilişkili DR4, DcR1 ve DcR2 ekspresyonları ile RA hastalarının DAS28 skorları arasındaki ilişki	31
4.9. RA' lı hastalar ile sağlıklı bireylerin serum sTRAIL konsantrasyonları	33

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. ACR' nin 1987' de belirlediği ve 2002' de gözden geçirilmiş olarak yayımladığı RA tanı kriterleri	5
4.1. RA' lı olguların ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılımı	20
4.2. RA' lı hastaların DAS-28 skorları ve klinik bulguları	21
4.3. CD4 ⁺ CD25 ⁺ ve FoxP3 ⁺ hücre yüzdeleri ile RA' lı ve sağlıklı kontrollerin akış sitometrisi sonuçlarının karşılaştırılması	22
4.4. RA hastalarından elde edilen CD4 ⁺ T hücrelerindeki TRAIL ligand ve reseptörlerinin birbirleri ile olan Spearman Rho analizi sonuçları	26
4.5. CD8 ⁺ T hücre ilişkili TRAIL ligand ve reseptör ekspresyonlarının RA' lı hastalardaki korelasyon analizi	30
4.6. Yeni RA tanısı konmuş hastalarla, sağlıklı bireylerde saptanan serum çözünebilir TRAIL düzeyleri	33

GİRİŞ VE AMAÇ

Romatoid Artrit (RA), en yaygın görülen romatizmal hastalıktır. Kadınlarda daha sık olmakla birlikte toplumun % 1' inde görülür. RA' nın özellikleri arasında, kronik inflamasyon sonucu ortaya çıkan sinovyal hücre hiperplazisi ve sinovyal eklemlerde lenfositler, makrofajlar ve plazma hücrelerinden oluşan infiltrasyon vardır. Bunların sonucunda da kıkırdak doku ve kemiklerde harabiyet oluşur.

Günümüzde ne RA' ya sebebiyet veren faktörler ne de eklemlerdeki zararı giderecek herhangi bir tedavi edici metod bulunmamaktadır. Bu sebeple RA etiopatolojisine ve patogenezinin aydınlatılmasına yönelik olarak yapılan araştırmamız ile hastalığın primer etkenlerinden olduğu veya en azından etyolojisinde önemli bir rol aldığı bilinen CD4⁺ T yardımcı hücreleri ile yine T hücre grubunun bir alt grubu olan CD8⁺ T hücrelerinin, TRAIL ligand ve reseptör kompozisyonları belirlendi. Bu amaçla, yeni RA tanısı almış ve herhangi bir DMARD kullanmamış hastalardan ve kontrol grubundan periferik tam kan örnekleri toplandı. Bu örneklerde akış sitometrisi yöntemi ile T hücre yüzeyindeki TRAIL ligand ve reseptör sentez seviyeleri belirlendi. Burada, herbir TRAIL reseptör alt tipine ve ligandına karşı spesifik olarak geliştirilmiş monoklonal antikolar kullanıldı. Ayrıca T hücrelerinin alt gruplarının, ayrı ayrı analiz edilebilmesi için de T hücre reseptörlerine (CD4⁺, CD8⁺) bağlanan monoklonal antikolar kullanıldı. RA' lı hastalarda TRAIL' in hastalığın gelişim ve ilerlemesindeki rolü ve hastalarda sTRAIL serum düzeylerinin hastalık ile ilişkisi saptandı. Burada elde edilen veriler ışığında hastaların DAS28 hastalık aktivite skorları ile T hücre ilişkili TRAIL ligand ve reseptör profili arasındaki korelasyona, normal sağlıklı bireylerle karşılaştırmalı olarak bakıldı. Bu sayede TRAIL ve TRAIL reseptör kompozisyonlarına bağlı olarak, RA' lı hastalarda TRAIL' in RA patofizyolojisindeki T hücreleri ile olan ilişkisi belirlendi.

GENEL BİLGİLER

2.1. Romatoid Artrit

Romatoid Artrit (RA), romatizmal hastalıklar içerisinde en yaygın görülenidir. Kronik inflamasyon ile karakterize bir hastalık olan RA, primer olarak sinovyal dokuları hedef alır. Hastalığın genel seyrinde, sinovyal hücrelerin hiperplazisi ve sinovyal eklemlerin lenfositler, makrofajlar ve plazma hücrelerince infiltrasyonu sonucu oluşan kıkırdak doku ve kemiklerde harabiyet görülür [1-4]. Sistemik bir hastalık olan RA, vücuttaki tüm organları etkiler ve hastalarda yorgunluk, hafif derecede ateş, anemi ve akut faz reaktanlarının yükselmesi (eritrosit sedimentasyon hızı ESR veya C-reaktif protein CRP) gibi sistemik bulgulara yol açar [5].

2.1.1. Romatoid Artrit' in Yaygınlığı

Tüm dünyada yaklaşık % 0,5-1' lik bir prevalansla seyreder [6]. Tam olarak bilinmeyen nedenlerle kadınlarda, erkeklere oranla iki-üç kat daha fazla görülür. RA herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir, ancak en çok 35-60 yaşlarında başlayıp yaşla birlikte insidansında artış görülür [1, 6].

2.1.2. Genetiğin Romatoid Artrit Üzerindeki Etkisi

Genetik faktörler, hem RA gelişme riskinin hem de hastalığın ciddiyetinin belirlenmesinde anlamlı bir rol oynar. Hastalık aynı aile içinde birden çok kişide görülebilir. Örneğin, birinci derece akrabaları arasında RA' lı bir hasta bulunan kişide hastalığın gelişme riski, genel topluma göre 16 kat artmıştır. RA' lı bir kişinin birinci derece akrabaları arasında hastalık bulunma sıklığı ise % 10 kadardır [7-9]. Tek yumurta ikizleri arasında hastalığın birlikte görülme sıklığı % 30, çift yumurta ikizlerinde ise % 5 oranındadır [9, 10].

İnsan lökosit antijenleri (HLA), özellikle de HLA-DR4 romatoid artrite yatkınlık yaratan genlerin başında gelir [11]. DR molekülleri antijen sunan hücrelerin yüzeyinde bulunurlar ve T hücrelerinin DR aracılığıyla antijeni tanımasını sağlarlar. RA ile ilişkili bulunan allellerin hepsinin yapısında, benzer amino asit dizilimi gösteren bir bölge vardır. Ortak ya da paylaşılan epitop olarak adlandırılan bu bölgenin RA' ya genetik yatkınlığı yarattığı düşünülmektedir. HLA-DR4 ile ilişkili

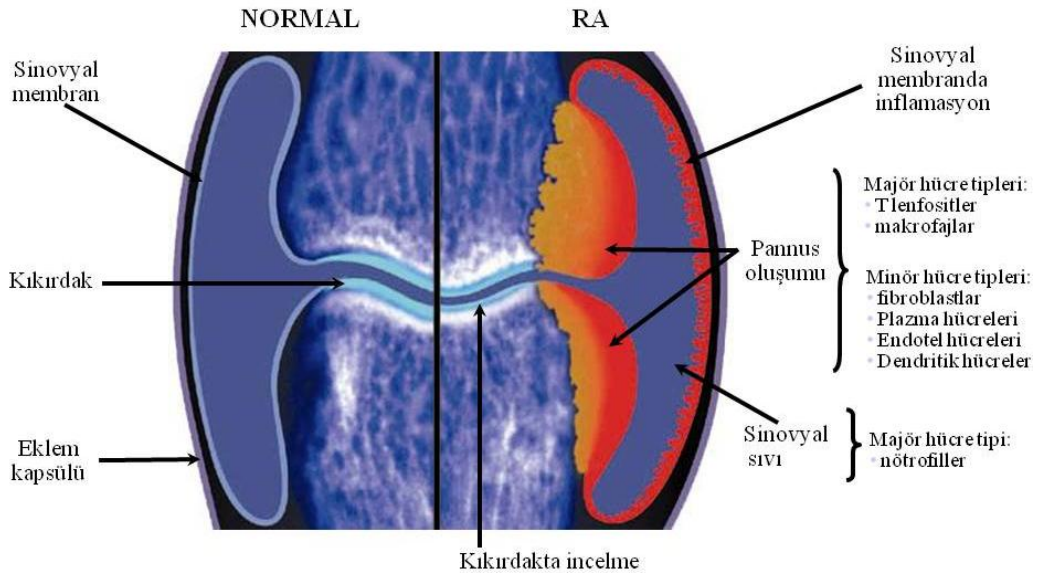
olan ortak epitopun iki kopyasını barındıran bireylerde daha ciddi ve destrüktif tipte RA gelişir. Özel bir antijen tanıma bölgesi ile ilgili olan bu durumun, ortak epitopun belli artrojenik antijenlerin tanınmasını engellediğinden dolayı RA gelişimi ile yakından ilgili olduğu gösterilmiştir. RA' da, belli DR tiplerinin ön plana çıkması hastalık patogenezinde T hücrelerinin kesin bir şekilde yer aldıklarını göstermektedir [12, 13].

Popülasyon çalışmaları HLA bölgesi ile ilişkili olan RA' nın, hastalığın genetik riskinin sadece üçte birini oluşturduğunu göstermiştir [7, 11]. Son zamanlarda da özellikle tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve RA arasındaki ilişkiyi incelemeye yönelik çalışmalar dikkat çekmektedir [14-17].

2.1.3. Romatoid Artrit Patofizyolojisi

Hastalığın etiyojisi henüz tam olarak bilinmemektedir. RA genetik faktörlerin, immün sistemin, sinovyal dokuların ve çevresel faktörlerin karmaşık bir etkileşimi sonucu gelişir.

Sinovyal dokular RA' daki otoimmün inflamatuvar sürecin ana hedefidir, ancak bunu başlatan neden bilinmemektedir. RA başladığında, vücuttaki tüm sinovyal dokular T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar ve sinovyal hücrelerin karmaşık bir etkileşim alanı haline gelirler. Sonuçta da açığa çıkan sinovyal doku proliferasyonu (sinovit), aşırı miktarda sinovyal sıvı üretimine ve pannus formasyonuna neden olur. Sinovit sonucu da kıkırdak ve kemik dokuda harabiyet, tendon ve bağlarında gerginlik ve yırtılmalar oluşur. Bütün bunlar, RA' nın klinik tablosunu oluşturmaktadır (Şekil 2.1) [1-3].



Şekil 2.1. RA patofizyolojisi. RA' da klinik tabloyu oluşturan karakteristik özellikler [18].

Hücrel ve hüneral immünitenin her ikisi de RA' nın başlanmasında ve devamında önemli rollere sahiptir. T hücreleri, özellikle de aktive olmuş yardımcı T hücreleri tip 1 (Th1) sinovyal dokularda etkindir [19, 20]. Bu T hücreleri, DR aracılı olarak makrofajlar, B hücreleri veya sinovyositlerce sunulan henüz bilinmeyen bazı antijenler tarafından aktive edilmekte ve çeşitli sitokinleri salgılamaktadırlar. Makrofaj kaynaklı sitokinlerin, özellikle de interlökin-1 (IL-1) ve TNF- α ' nın bu inflamatuvar süreçte önemli rol aldıkları, bu sitokinlere karşı oluşturulan biyolojik ürünlerin hayvan modelleri ve hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda ortaya koydukları etkinlikleriyle ispatlanmıştır [16, 21, 22].

RA' nın patogeneğinde hüneral bağışıklık da rol almaktadır. Romatoid faktör (RF), RA' nın uzun süredir bilinen ve en yaygın kullanılan serolojik belirteçidir [9]. Hastalarda RF' nin neden çok yükseldiği ve tam olarak oynadığı rol bilinmemektedir. RF üretimi kompleman aktivasyonunu arttırabilir ve lizozomal enzimlerin, kininlerin ve serbest oksijen radikallerinin salınımına neden olabilir. RA için göreceli olarak daha özgül olan diğere bir otoantikör grubu yakın zamanda bildirilmiştir ve tip II kollajen, insan kıkırdığı gp39 ve sitrulinize proteinlere karşı oluşan otoantikörleri içerir. Pek çok vakada, bu antikörlerin düzeyi daha ciddi hastalıklarla ilişkili olsa da, tam olarak önemleri henüz anlaşılammıştır [5, 23-25].

2.1.4. Romatoid Artrit' in Tanısı

RA' nın başlama şekli hastadan hastaya farklılıklar gösterir. Hastaların yaklaşık %70' inde birkaç hafta ve hatta birkaç aya yayılmış sinsi bir başlangıç söz konusudur. Bu süre içerisinde hafif bir ateşin de eşlik ettiği halsizlik, yorgunluk, kilo kaybı ve bir veya birkaç küçük eklemde ağrı vardır. Bu sebeple fizik muayenede RA' ya patognomik bir bulgu yoktur [9]. Bunun yerine RA' nın tanısı klinik olarak konur. Amerikan Romatoloji Koleji' nin (ACR) 1987 yılında yayınladığı tanı kriterleri (Tablo 2.1), tek bir hastaya tanı koymaktan ziyade klinik çalışmalarda benzer özellikler taşıyan hastaları bir araya getirmek amacı ile geliştirilmiş olsa da, bugün için RA' yı tanımlayan tek araçtır. RA tanısı konulabilmesi için ilk dört kriterin en az altı haftadır olması gerekmektedir [26].

Ana Kriter	Klinik Özelliği
Sabah tutukluğu Üç veya daha fazla eklemden artrit	Eklemler ve çevrelerinde, en az 1 saat Bir hekim tarafından tespit edilen, en az 6 haftadır süregelen eklem şişliği veya sıvısı
El eklemlerinde Artrit	El bileği, MCF ve PİF eklemlerinde en az 6 haftadır süregelen şişlik
Simetrik Artrit	Vücudun her iki yanındaki eklemlerde simetri gösteren ve en az 6 haftadır süren tutulma
Romatoid nodül	Eklem kenarları ve temas bölgelerinde bir hekim tarafından tespit edilen deri altı nodülleri
Romatoid faktör	Normal kontrollerde %5' den daha az pozitif bulunan bir yöntemle bakılmalıdır
Radyolojik değişiklikler	Ön-arka planda çekilmiş düz el grafilerinde görülen erozyonlar ve periartiküler osteoporoz

Tablo 2.1. ACR' nin 1987' de belirlediği ve 2002' de gözden geçirilmiş olarak yayınladığı RA tanı kriterleri. Tanı için en az dört koşulun bir arada bulunması gereklidir.

2.1.5. Romatoid Artrit' in Tedavisi

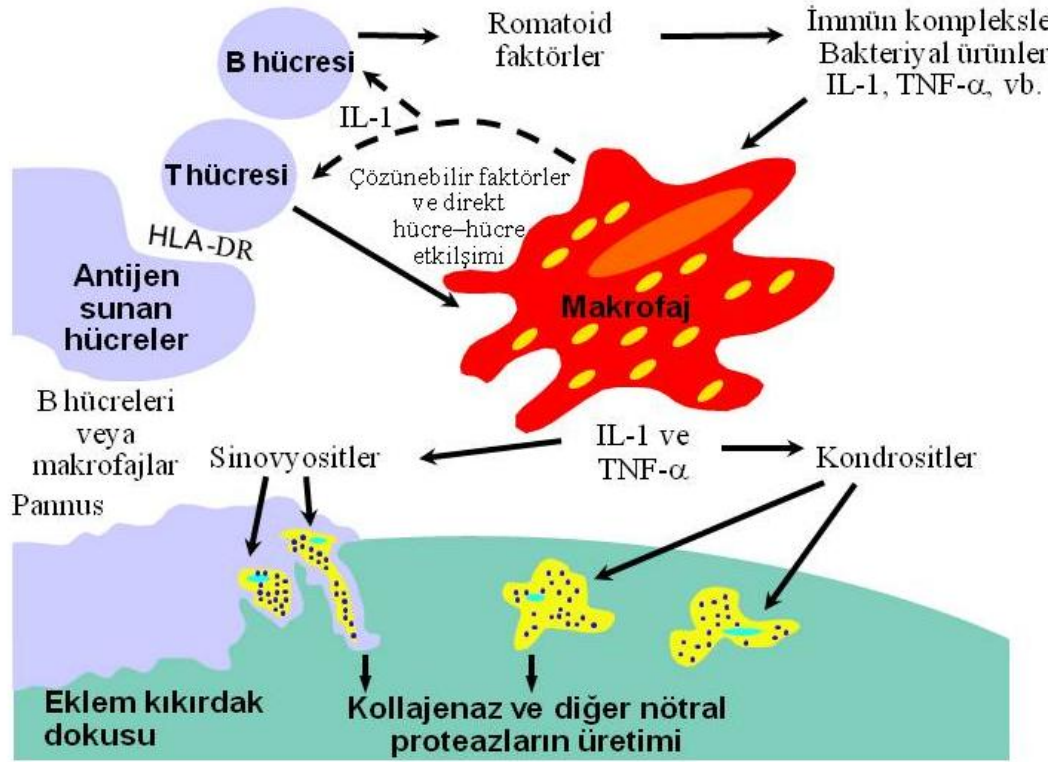
RA hastalarında hedef, hastalığın ilk üç ayı içerisinde tanıyı koymak ve hastalığı değiştiren anti-romatizmal ilaç (DMARD) tedavisine başlamaktır [27]. DMARD' lar, RA' nın sakatlıklara neden olan potansiyelini değiştirme veya modifiye etme özelliğine sahip bir grup ilaçtır. Bu grupta yer alan ilaçlar arasında metotreksat, sülfasalazin, altın, antimalaryaller, leflunomid, azatiopürin, penicilamin ve minosiklin yer almaktadır [28]. Son yıllarda da özellikle TNF- α ve IL-1 olmak üzere çeşitli sitokinlerin RA' nın patofizyolojisinde önemli roller oynadıkları ortaya çıkmıştır. Bu çalışmalar sonucunda da biyolojik DMARD olarak isimlendirilen TNF- α (etanercept ve infliksimab) ve IL-1'e karşı (anakinra) yönlendirilmiş ajanlar geliştirilerek klinik kullanıma sunulmuştur [16, 29, 30].

RA hastalarında bir diğer sorun da hastalara uygulanan tedavilerin etkinliğinin bireysel farklılıklar göstermesidir. Bugün için tedavi öncesi ve sonrasında, verilen tedavinin değerlendirilmesinde hastalık aktivite skorları (DAS-28) hesaplanarak, klinik sonuç değerlendirmesi yapılmaktadır [31]. Bu değerlendirmedeki ana eksiklik de, hastalarda direkt oluşan eklem harabiyetinin değil fonksiyonel durumun sorgulanmasıdır.

2.2. Romatoid Artrit Oluşum Mekanizmasında İmmün Sistem

Günümüzde ne RA' nın etiyojisi tam olarak bilinmekte ne de hastalığın seyrini yavaşlatıp eklem hasarından koruyucu bir tedavi metodu bilinmektedir.

Ancak hastalığın sebebi ile ilişkili olarak genetik faktörler ve otoimmünite süreçleri ile bağlantılar mevcuttur. Hastalığın başlangıç sürecinde immün sisteme ait hücreler aktif hale gelerek bir otoimmünite süreci başlatırlar (Şekil 2.2). Bu süreç birkaç adımda gerçekleşir. İlk olarak lenfositler aktif hale gelir. Hastalığın oluşumundan sonraki adımlarda ise sinovyal zar ve sinovyum, başlıca mononükleer hücrelerden oluşan bir inflamatuvar infiltrat ile karakterize olur. Bu inflamasyon, hücreler arasında iletişimi sağlayan sitokinler tarafından yönetilmektedir. RA patogenezinde rol alan bu sitokinlerin görevleri iyi bilinmektedir. Ancak hastalığın karakteristik patolojik özelliklerini asıl etkileyen pro- ve anti-inflamatuvar sitokinler arasındaki dengedir. Makrofajlar, B lenfositler, fibroblast benzeri hücreler ve endotelial hücrelerden TNF- α , IL-1, IL-6, IL-15, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktörü (GM-CSF) gibi birçok inflamatuvar medyatörün salınmasında primer sorumlu olarak T hücreleri düşünülmektedir [20, 32]. T hücresi, hücre-hücre kontağı ile direkt olarak veya inflamatuvar sitokinler aracılığıyla aktive olarak interferonlar (IFN), IL-18, IL-17 gibi sitokinler aracılığı ile de indirekt olarak makrofajları stimüle edebilir [33, 34]. Eklemlerde meydana gelen harabiyette birçok sitokinin bir arada rolü olmasına rağmen, IL-1 kırıkda harabiyetinden esas sorumlu sitokindir [35, 36].



Şekil 2.2. RA'nın gelişim mekanizması. İmmün sistem hücreleri ve bunlardan salınan sitokinlerin RA oluşumundaki etkileri [37].

Sonuç olarak, RA oluşumunda ilk olay T lenfositlerin antijen bağımlı olarak aktivasyonudur. T lenfositlerin aktivasyonu bir çok etkiye, sinovyal ve endotelial proliferasyona öncülük eder. Kemik iliğı ve kan dolaşımında bulunan birçok

proinflamatuvar hücrenin aktivasyonu ile makrofajlardan ve fibroblast benzeri sinovyal hücrelerden çeşitli sitokinler ve proteazlar salgılanır ve bunun sonucunda da otoantikorlar yapılır [33, 34, 38-40]. RA' da T lenfosit aktivasyonuna neden olan başlangıç antijeni ya da antijenleri henüz bilinmemektedir. Bu antijenin ekzojen (enfeksiyöz ajanlar gibi) olabileceği gibi endojen de (otoantijen) olabileceği düşünülmektedir. Endojen antijen olarak tip II kollajen, kıkırdak glikoprotein-39, immünoglobulin G ve sitrüllemiş protein ve peptidler sorumlu tutulmaktadır [41-44].

Romatoid artritli hasta sinovyumundaki inflamatuvar infiltratı oluşturan mononükleer hücreler; T hücreleri ve T hücreleri ile yakın ilişkide olan kuvvetli HLA-DR pozitifliği gösteren, antijen sunan hücrelerden oluşur [38, 45]. Lenfositlerin oluşturduğu lenfoid follikül benzeri yapılarda B hücreleri de bulunur. Ancak B lenfosit veya plazma hücreleri %5 gibi düşük bir oranda bulunurlar. T hücresi, hastalığın seyrinde etkin olan çoklu inflamatuvar yolakların başında rol oynamakta ve inflamasyon özellikle CD4⁺ T hücresine ve kısmen de IFN sekresyonuna bağımlı olarak oluşmaktadır [1, 18, 34, 41].

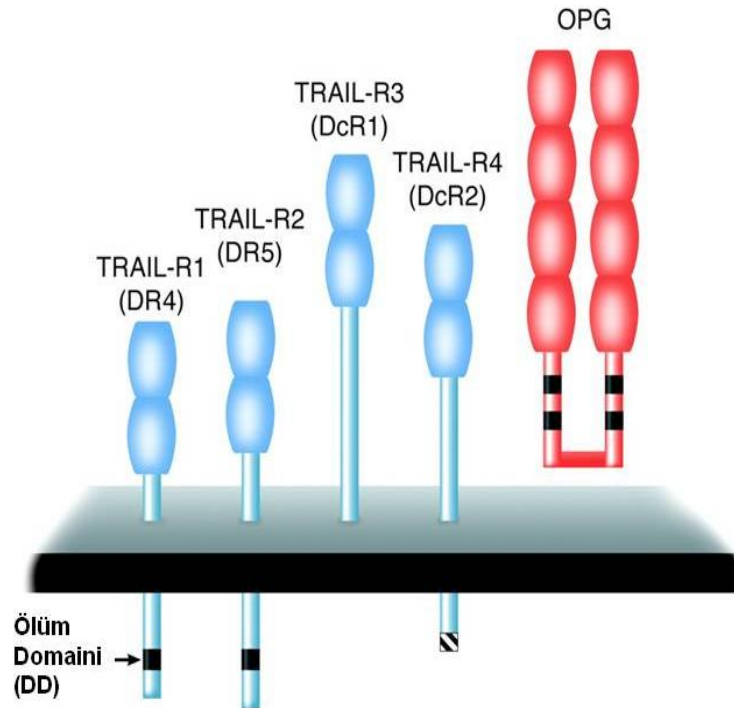
RA' da hümmoral immünitenin de rol aldığı RA' lı hastaların %80' inden fazlasında otoantijen olarak saptanan RF nedeniyle iyi bilinmektedir [46-48]. RF, IgG' nin Fc parçasına karşı gelişmiş bir antikordur ve RA' da otoimmün fenomenin en önemli bileşkenidir. RA' da RF' nin bulunması, immün toleransın kaybedildiğini düşündürmektedir. RF, RA için spesifik olmayıp diğer romatolojik hastalıklarda, kronik inflamasyon ile seyreden durumlarda ve bazı normal kimselerde bulunabilir. RF üreten B hücrelerinin fizyolojik rolü tam anlaşılmış değildir. İnfeksiyöz ajanlara karşı bir konakçı yanıtı olduğu ileri sürülmüştür. Bakteriyel ve parazitik enfeksiyonlarla birlikte sık görülür veya bakteriyel/viral antijenlerle immünizasyondan sonra geçici olarak pozitif bulunur. RF negatif olan hastaların ise sinovyal sıvılarında gizli ya da kompleks formda RF' ler bulunabilmektedir. RF' ler *in vitro* ortamda, komplemanı klasik yoldan aktive edebilmektedir. Bunun sonucu olarak da sinovyal inflamasyon bölgelerinde immün kompleks oluşumunun maksimum olduğu ve RA' lı hastaların sinovyal sıvılarında serumdan daha fazla miktarda kompleman aktivasyonu olduğu görülür. RA' da, B hücrelerinin antijen sunumunda da önemli rolleri vardır. RF üreten B hücreleri, immün kompleksler içindeki antijenleri, antijen spesifik T hücrelerine sunarak bölgesel olarak immün yanıtı artırır ve sinovyal RF yapımını çoğaltırlar. Son zamanlarda yapılan bu çalışmalar, B lenfositlerin de RA patogeneğinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir [49-51]. Ayrıca RA' da B lenfosit sayısının azaltılmasını amaçlayan tedavi metodları da geliştirilmeye çalışılmaktadır [32, 48, 52].

RA' da sinovyal hücreler fenotipik olarak transforme olup aşırı derecede çoğalarak kıkırdak ve kemik dokusunu istila ederler [18]. Apoptozise dirençli ve aktive olmuş sinovyal hücreler yüksek miktarlarda proinflamatuvar sitokinleri ve metalloproteinaz enzimleri üreterek doku hasarına yol açarlar [53]. Bu nedenle, sinovyal hücrelerin aşırı derecede çoğalması ile lenfosit ve makrofajların anormal aktivasyonu, RA' nın iki karakteristik özelliği olarak tanımlanırlar [54]. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozis, merkezi ve periferel T hücrelerinin immün

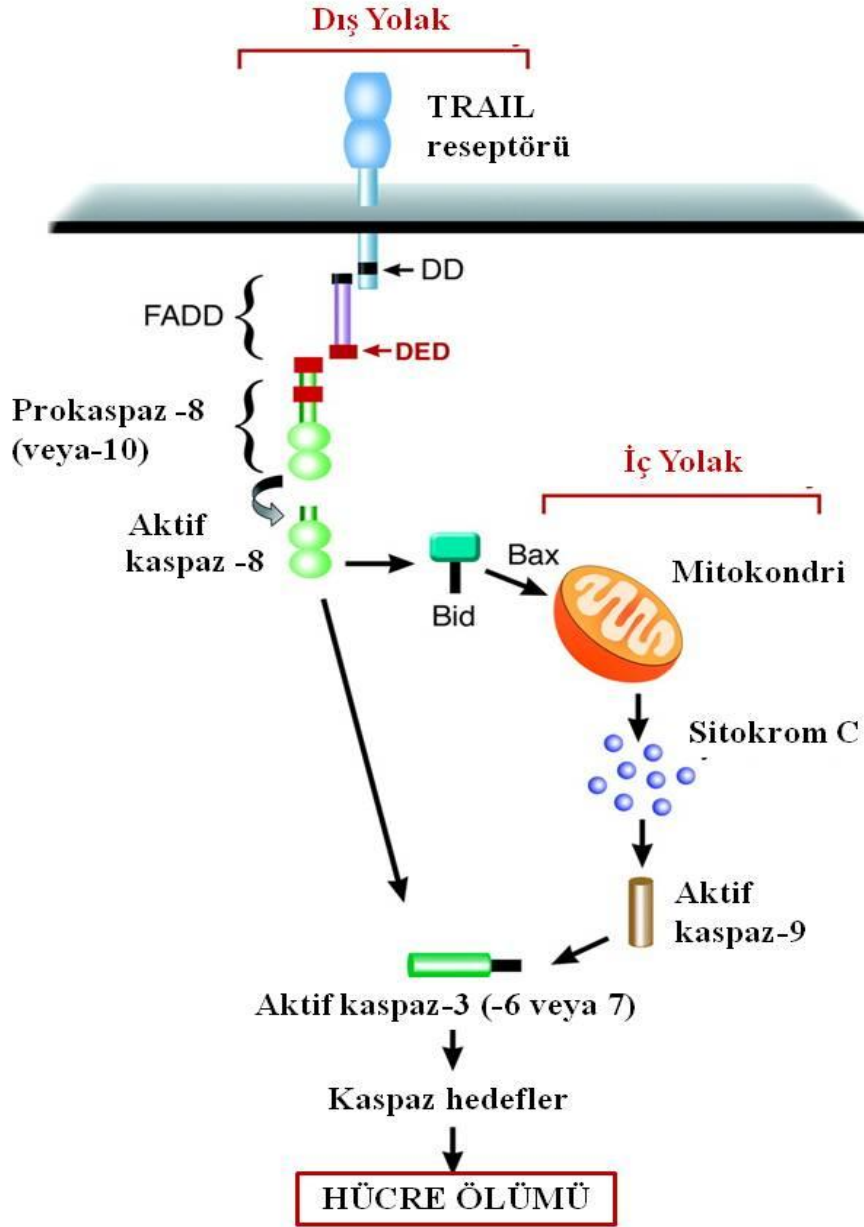
yanıt esnasındaki aktivitelerini düzenler. Apoptozisteki düzensizlikler veya eksiklikler insanlarda otoimmün lenfo-proliferatif sendrom (ALPS) gibi immün hastalıklara yol açar [55]. ALPS' de Fas aracılı oluşan apoptozisteki kalıtsal bozukluklardan dolayı aşırı bir lenfosit birikmesi görülür. Bu bulgular Fas (CD95/APO-1), TNF ve TNF ile ilişkili apoptozisi aktive eden ligand (TRAIL) gibi ölümcül ligandların antijen aktivasyonunu takiben lenfosit ölümlerine sebebiyet verebildiklerini gösterir [56-59]. TNF- α süper ailesi üyeleri, yapısal olarak benzer proteinler içeren aynı zamanda hücre ölümü, immün yanıt ve inflamasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynayan sitokinlerdir. Bu ailenin çok iyi tanımlanmış ilk üyesi TNF- α ' dır. Bunun dışında yine bu ailenin bir üyesi olan ve aynı zamanda APO-2L olarak da bilinen TRAIL, en yüksek amino asit benzerliğini CD95L/FasL üyesi ile paylaşmaktadır.

2.3. TRAIL Ölüm Ligandı ve TRAIL Sinyal Yolu

TRAIL, TNF süper ailesine mensup bir tip II membran proteindir [60]. TRAIL; TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) ve osteoprotegryn (OPG) olmak üzere beş değişik reseptöre bağlanabilme özelliğine sahiptir (Şekil 2.3) [61, 62]. Bir hücrede birden fazla TRAIL reseptörünün olması, TRAIL' in hücre içinde pek çok işlev gördüğünü düşündürse de sağlıklı ve hasta insanlarda TRAIL' in birbirinden farklı olarak ne fonksiyon gördüğü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. DR4 ve DR5 ölüm reseptörü olarak fonksiyon görmelerine rağmen, DcR1 ve DcR2 ölümcül sinyal göndermemekte ve sadece dekok (yalancı) reseptör olarak işlev görürler (Şekil 2.4) [63, 64].



Şekil 2.3. TRAIL reseptörlerinin şematik gösterimi [65]



Şekil 2.4. TRAIL ölüm reseptörleri aracılığı ile hücre ölümü [65]

TRAIL ve TRAIL reseptörleri çok çeşitli dokularda normalde de sentez edilirler. Ancak transforme olmamış hücrelerde, TRAIL apoptozise neden olmaz [66, 67]. Günümüzde bile bu dirençlilikten sorumlu tek bir mekanizma ortaya çıkarılamamıştır. Ancak gözlemlenen TRAIL dirençliliğini, kısmen de olsa açıklayabilecek iki farklı hipotez ileri sürülmüştür.

İlk hipotez, normal hücrelerin yalancı TRAIL reseptörleri (DcR1 ve DcR2) taşıdığını ve bunların da apoptozisi indükleyen ölümcül TRAIL reseptörleriyle (DR4 ve DR5) TRAIL ligandına bağlanmak için yarıştığını ileri sürer [66, 67]. Bu

hipotezde yalancı reseptörlerin ya bağlanarak serbest TRAIL ligandlarının sayısını azalttığı (DcR1 gibi) ya da hücrelere anti-apoptotik sinyaller göndererek (DcR2 gibi) TRAIL direnci sağladığı düşünülmektedir. Daha önce yayınlanan araştırmalarda, TRAIL-DcR2 ilişkisinin, anti-apoptotik NF-κB sinyal yolunu aktive ederek TRAIL aracılı apoptozisi inhibe edebildiği bildirilmiştir [68]. Fakat diğer taraftan, DR4 ve DR5 ölümcül reseptörlerinin TRAIL ile aktivasyonu sonucunda da NF-κB sinyal yolu uyarılmaktadır [69, 70]. Bu nedenle, bir hücrede anti-apoptotik sinyaller varken bu hücrede apoptozisin ne şekilde gerçekleşebildiği tam olarak anlaşılamamıştır. NF-κB, aynı zamanda yalancı bir reseptör olan DcR1 sentezini, BCL-xL ve cIAP' lar gibi bazı apoptozis inhibitörlerinin sentezini de arttırarak, TRAIL aracılı apoptozisin engellenmesinde rol oynamaktadır [71-74]. Böylece, NF-κB aktivasyonu, hücreleri TRAIL' e dört değişik yoldan dirençli kılar.

İkinci hipotez ise, apoptozis inhibisyonunun bu hücrelerde yer alan bazı inhibitör proteinlerden kaynaklandığını savunur. Böyle bir molekül olan FLICE inhibitör protein (cFLIP), bir kaspaz-8 homoloğu olup ölüm ligandları tarafından uyarılan apoptozisi inhibe eder [75, 76]. Ayrıca, NF-κB yolunu uyarın ajanların cFLIP sentezini de arttırdığı bildirilmiştir [77]. Nitekim adenovirus aracılı FasL transferi ile RA makrofajlarında, yüksek oranda olan FLIP sentezinden dolayı apoptozis bu yolla indüklenememektedir [78, 79]. Grubumuz tarafından yapılan daha önceki çalışmalarda da, TRAIL geni taşıyan adenovirüslerin RA vakalarından izole edilmiş sinovyal hücreleri üzerinde, değişen TRAIL reseptör kompozisyonuna bağlı olarak RA tedavisinde yeni bir yöntem olarak kullanılabileceği gösterilmişti [80].

2.4. TRAIL' in Otoimmün Hastalıklardaki Rolü

Sağlıklı insanlarda yapılan çalışmalarda CD3⁺/CD19⁻ T lenfositlerinde DR4, DR5 ve DcR1 ekspresyonu gözlenmezken, DcR2 ekspresyonunun olduğu; CD3⁻/CD19⁺ B lenfositlerinde de DR4' ün yüksek oranda ekspresyonuna rağmen DR5, DcR1 ve DcR2' nin orta düzeyde eksprese edilebildiği gösterilmiştir. Nötrofillere bakıldığında ise yüksek oranda DcR1 ekspresyonu ve çok düşük miktarda da DR5 ekspresyonu mevcuttur. Monositlerde ise sadece DR5 ekspresyonu gerçekleşir. Ayrıca, lenfositlerin alt tiplerine yönelik yapılan çalışmalarda da DcR2' nin CD8⁺ T lenfositlerinde eksprese edildiği, CD4⁺ T lenfositlerin ise DR4,DR5,DcR1 ve DcR2 eksprese etmedikleri, TRAIL' e dirençlilik gösterdikleri görülmüştür. Ayrıca CD56⁺/CD3⁺ NK T lenfositlerinden de aşırı miktarda DcR2 eksprese edilmektedir. CD56⁺/CD3⁻ hücrelerden ise düşük miktarlarda DcR2 ekspresyonu saptanmıştır. İstirahat halindeki CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositlerinde TRAIL reseptörlerinin ekspresyonu zayıf iken, uyarıldıkları takdirde ise CD8⁺ T lenfositlerde her iki dekey reseptör ekspresyonunun da arttığı ve bu sayede de TRAIL' e dirençli olabildikleri gösterilmiştir [81-84].

Kronik hepatit B ile TRAIL ilişkisine yönelik yapılan araştırmalarda da özellikle CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerindeki membrana bağlı TRAIL' in yüksek miktardaki ekspresyonu hastalardaki karaciğer hasarlanması ile ilişkilidir. Bu TRAIL ekspresyonundaki artış hem viral uyarıma hem de inflamatuvar bir sitokin olan IFN-γ' nın artışına bağlı olarak gerçekleşir [85].

Diğer TNF ailesi üyelerine kıyasla (FasL ve TNF' ye göre) TRAIL' in, apoptozisi indüklemeye daha farklı özellikleri mevcuttur. Örneğin otoimmün hastalıkları başlatıp daha da ilerlemesine neden olan TNF- α ' nın aksine TRAIL immün yanıtı baskılamaktadır. Bu nedenle, TRAIL' in lenfositlerin fonksiyonunu nasıl etkilediğini ortaya çıkarmak için BALB/c farelerden izole edilen splenositlerde çalışmalar yapılmıştır [86]. Aktive olmuş T hücreleri CD95L' nin etkisiyle apoptozise uğrarken, TRAIL bu hücrelerde yalnızca bölünmeyi durdurabilir. Ayrıca TRAIL, DNA sentezini de inhibe ederek hücrelerin G1'den S fazına geçmesini de önler. Bu durumda, TNF ve CD95L' nin aksine TRAIL lenfositlerde ölüme sebebiyet vermeden onların aktivasyonunu ve çoğalmalarını engellemektedir. Ayrıca, TRAIL geni sentez etmeyen (knock-out) farelerde aktive olmuş T hücre yanıtı bastırılmadığından dolayı bu farelerin kollajen indüklü artrite (KİA) daha duyarlı olması da, bu bulguları desteklemektedir [87].

TRAIL' in otoimmün inflamasyon ve hücre siklusuyla ilgili henüz transformasyona uğramamış hücreler üzerindeki etkilerini araştıran çok az çalışma mevcuttur. Yeni izole edilen T hücreleri, ancak tip I interferon ve CD3 ile uyarılmalarından sonra TRAIL sentez edebilirler [88, 89]. Ayrıca, IFN- γ ve IFN- α ile uyarılan periferik monositlerde, dendritik hücrelerde ve NK hücrelerinde TRAIL sentezi gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar TRAIL' in ancak bir stimülasyon sonrasında T hücrelerinde, monosit ve makrofajlarda sentezlendiğinin göstergesidir [90, 91]. Bunun yanında, dinlenme halindeki T hücrelerinin aksine IL-2 ile uyarılan T hücreleri, TRAIL aracılı apoptozise duyarlıdır. Bu durum, TRAIL' in periferik T hücrelerinin eliminasyonunda da görev alabileceğini düşündürmektedir [92]. Ayrıca, otolog CD4⁺ T hücreleri makrofajları kısmen de olsa TRAIL aracılığıyla apoptozise uğratabilmektedirler [93, 94]. TRAIL sentezi olmayan farelerden izole edilen CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin, anti-CD3 antikoru aracılı hücre ölümlerine dirençlilik göstermesi, TRAIL' in timusta T hücrelerinin negatif seleksiyonunda üstlenmiş olduğu önemli rolünden dolayıdır [87].

2.5. Romatoid Artrit' te TRAIL ve Reseptörlerinin Fonksiyonel Rolü

RA' lı hastaların sinovyal fibroblastlarında DR5 ekspresyonunun arttığı ve DR5 aracılı apoptozisin artmış olabileceği, bunun da kemik erozyonu ve kırıkta hasarında önemli rol alabileceği daha önce yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir [81, 95]. Ayrıca daha önce yapılan grubumuza ait çalışmalarda da artrosentez ile elde ettiğimiz sinovyal hücrelerde TRAIL reseptör kompozisyonlarının değişkenlik gösterdiği ve TRAIL direncinin DcR2' nin hücre yüzeyindeki ekspresyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir [80]. Buna ek olarak, diğer yapılan çalışmalarda da, RA' lı hastaların sinovyal sıvılarındaki mononükleer hücrelerden ve lenfositlerden DR4, DR5, DcR1 ve DcR2 ekspresyonunun değişen miktarlarda olduğu gözlemlenmiştir [79].

Her ne kadar bazı hücrelerin ölümü fonksiyonel yetersizliklere yol açsa da, bir kısım efektör hücrelerin artmış sağ kalımları da doku hasarına yol açar ve çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynarlar [96]. Antijene bağımlı immün yanıtın oluşabilmesi için T hücrelerinin aktivasyonu gereklidir. T hücrelerinde meydana gelen bu olaylar sonucu da doku hasarı oluşmakta ve artan sitokin salınımına bağlı olarak da kimi zaman otoimmün hastalıklar oluşurlar. Bu sebeple buna benzer

etkilerin oluşmasını önlemek ve doku hasarını durdurmak için T hücrelerinin ortamdan uzaklaştırılması gereklidir. İşte tam bu noktada, T hücrelerinin apoptotik ölümü devreye girer [97]. Daha önceki çalışmalarda CD4⁺ T hücrelerinin, CD8⁺ T hücreleriyle etkileşime girerek etkin bir immün yanıtın oluşturulmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. CD4⁺ hücrelerinin böyle bir etkileşime giremediği durumlarda ise CD8⁺ T hücreleri TRAIL eksprese etmekte ve apoptozise gitmektedirler [98-100]. Dolayısı ile de TRAIL ve reseptörlerinin CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerindeki ekspresyon düzeylerindeki değişimler aracılığıyla immün yanıtta önemli bir kontrol mekanizması olabileceği düşünülmektedir.

2.6. Çözünbilir TRAIL (sTRAIL)

TRAIL' in hücre membranına bağlı formunun dışında çözünbilir formu da (sTRAIL) dolaşımında bulunur. sTRAIL, birçok kanser türünde ve otoimmün hastalıklarda ölüm reseptörleri aracılığıyla apoptozisi indüklemektedir.

Yapılan çalışmalarda sTRAIL konsantrasyonu Sistemik Lupus Eritematozuslu (SLE) hastalarda yüksek bulunmuş, TRAIL yüksekliğinin nötropeni ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. SLE' li hastalarda yapılan bu çalışmada kontrol grubu olarak RA' lı hastalar araştırmaya dahil edilmiş ve bu hastaların serum TRAIL konsantrasyonlarının sağlıklı kontrollerle benzer olduğu, SLE' li hastalardan ise düşük olduğu tespit edilmiştir [101, 102]. Ayrıca yine SLE' li hastalarda yapılan çalışmalarda sTRAIL' in DR4 ve DR5 ile etkileşime girmesi sonucu lenfosit ve monositlerin yüksek oranlarda apoptozise uğradığı ve bunun da apoptotik hücre birikimine yol açarak otoimmüniteyi artırdığı gözlenmiştir [103]. Psöriatik artritli hastalarda yapılan incelemede de TRAIL serum seviyesinin, bir pozitif reaktan olan serum CRP seviyesindeki artış ve kemik mineral yoğunluğundaki kayıp ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir [104]. Ancak diğer otoimmün hastalıklardaki durumu hakkında halen bir bulgu bulunmamaktadır.

Yine tarafımızdan yapılan bir diğer çalışmada da sTRAIL düzeyleri ile metastatik kolon ve meme kanseri olgularının sağkalım süreleri ve almış oldukları tedaviye verdikleri yanıt açısından değerlendirmeleri yapılmıştır. Metronomik tedavi alan metastatik meme kanserli hastalarda sTRAIL düzeylerinin bireyler arasında farklılık gösterdiği ancak bu değişikliklerin sağ kalım sürelerine etkisi ya da tedaviye yanıt ile konsantrasyon miktarı arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır. Ancak yine yaptığımız diğer bir çalışmada, vasküler endotelial büyüme faktörüne (VEGF) yönelik anti-VEGF monoklonal antikoru olan BevacizumAb ile tedavi gören metastatik kolon kanserli hastalarda tedavi öncesi ve sonrası serum sTRAIL konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda ise sTRAIL' in serum düzeyindeki artışı, bevacizumAb tedavisi alan olgularda hastalığın iyi seyri ile ilişkili bulunmuştur.

Bütün bu bilgiler ışığında, sTRAIL' in hastalık prognozunun izlenmesinde ve kullanılan ilaçların tedavi etkinliğinin belirlenmesinde değerli bir belirteç olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

MATERYAL ve METODLAR

Bu çalışmada 20 yeni romatoid artrit tanısı almış olguda, periferik kanda eritrosit sedimentasyon oranı, serum C reaktif protein düzeyi ve romatoid artrit ile ilişkili DAS skorları belirlendikten sonra eş zamanlı olarak alınan periferik kan örneklerinde T hücre ilişkili TRAIL ligand ve reseptör profillerini belirleyebilmek için akış sitometrisi yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca kontrol grubu olarak da benzer yaş ve cinsiyet dağılımı gösteren 16 sağlıklı bireyin periferik kan örneklerinde T hücre ilişkili TRAIL ligand ve reseptör profilleri yine akış sitometrisi yöntemi ile belirlenmiştir.

3.1. Hastaların Seçimi

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı'na başvuran 20 hastadan oluşmaktadır. Tüm hastalar başlangıçta uzman bir doktor tarafından değerlendirilmiş, medikal öyküleri alınmış ve fizik muayeneleri yapılmıştır. Çalışmaya daha önce anti-TNF tedavisi almamış ve yeni romatoid artrit tanısı alan 20 birey dahil edilmiştir. Bu hastalar Amerikan Romatoloji Koleji kriterlerine (Tablo-1) göre değerlendirilmiş ve romatoid artrit tanısı almıştır. Çalışma için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alınmış, çalışmaya dahil edilen tüm hastalara çalışma hakkında bilgi verilmiş, yazılı ve sözlü aydınlatılmış onam formu şahit huzurunda imzalatıldıktan sonra çalışmaya başlanmıştır.

3.2. Kontrol Grubu Seçimi

Çalışmaya dahil edilen kontrol grubu olacak bireyler, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji ve İmmünoloji Polikliniği'ne müracaat eden, uzman doktor tarafından yapılan muayene ve incelemelerinde herhangi bir otoimmün hastalığı olmayan, ciddi hayatı tehdit edici sağlık problemi (kronik kalp, akciğer ve karaciğer hastalığı tespit edilmeyen) saptanmayan ve aydınlatılmış onam formu alınan gönüllülerden oluşmuştur. Kontrol grubunun seçiminde ayrıca, çalışmaya alınan hasta grubu ile benzer yaş ve cinsiyet dağılımı göstermelerine dikkat edilmiştir.

3.3. Hastaların DAS28 Skorlarının Hesaplanması

Çalışmaya dahil edilen hastaların, romatoid artrit için hastalık aktivasyon göstergesi olarak kullanılan DAS-28 skorları aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Burada hastaların şiş ve hassas eklem sayıları uzman doktor tarafından yapılan muayene sonucunda belirlendi. Hastaların eritrosit sedimentasyon oranları da çalışma için alınan örneklerle eş zamanlı alınan periferik kan örneklerinden çalışıldı.

DAS28 Skoru = $[0,56 \cdot \sqrt{\text{Hassas eklem sayısı}} + 0,28 \cdot \sqrt{\text{Şiş eklem sayısı}} + 0,70 \cdot \text{Ln}(\text{Eritrosit sedimentasyon oranı})] \cdot 1,08 + 0,16$

3.4. Akış Sitometrisi Analizi

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji ve İmmünoloji Bilim Dalı polikliniğine başvuran sağlıklı kontrol ve RA' lı bireylerden alınan periferik kan örneklerinde akış sitometrisi yöntemiyle T hücre alt grupları saptanarak, bunlardaki TRAIL ligand ve reseptör ekspresyon profilleri belirlendi.

Akış sitometrik analizler, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Akış Sitometrisi Ünitesinde bulunan Epics Altra, Beckman Coulter cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Akış sitometrisi ile yapılacak analizler için tam kan yöntemi kullanılmıştır.

3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar

İsoton II azide-free balanced electrolyte solution (Beckman Coulter, 8448022)

PBS (1000 ml' sinde 8 g. NaCl, 1,15 g. Na₂HPO₄, 0,2 g. KCl ve 0,2 g. KH₂PO₄ içerecek şekilde hazırlandı.)

Reagent I (Fixation, IntraPrep, Beckman Coulter, A07803)

Reagent II (Permeabilization, IntraPrep, Beckman Coulter, A07803)

3.4.2. İşlemler

1. Her hastadan ve kontrol bireyden K3EDTA' lı tüplere 8-10 cc periferik kan örnekleri alındı.

2. Kan örnekleri, vericilerden alınmalarını takiben en geç 30 dakikalık süre içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.

3. 25'er µl. kan örneği, 25'er µl. PBS ile test tüpünde sulandırıldı.

4. Üzerine 3'er µl. monoklonal yüzeyel antikorlar eklendi. Çalışma grubundan her bir örnek için toplam 10 test tüpü hazırlandı. Bunlardan ilk beşine CD4 FITC (Fluorescein isothiocyanate) (Beckman Coulter, IM1281) ve TRAIL Ligand ve reseptörleri PE (E-Bioscience: DR4; 12-6644-73, DR5; 12-9908-73, DcR1; 12-6238-73, DcR2; 12-6239-73, TRAIL; 12-9927-73); sonraki beşine de CD8 FITC (Beckman Coulter, IM0451) ve TRAIL ligand ve reseptörleri PE (E-Bioscience: DR4; 12-6644-73, DR5; 12-9908-73, DcR1; 12-6238-73, DcR2; 12-6239-73, TRAIL; 12-9927-73) eklendi. İlk 5 tüpün üzerine 3' er µl. CD25-ECD antikor (CD25 ECD; Beckman Coulter, 6607112) eklendi.

5. Her bir tüp vorteksle karıştırıldı.

6. 30 dakika oda ısısında ve karanlıkta inkübe edildi.
7. Süre sonunda her bir tüpe 100 µl. Reagent I eklendi.
8. Tüpler vorteksle iyice karıştırıldı.
9. 15 dakika oda ısısında ve açıkta bekletildi.
10. Süre bitiminde 4'er ml. PBS ilave edildi.
11. 300 g' de 5 dakika oda ısısında santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-22R Centrifuge cihazında) yapıldı.
12. Santrifüj sonunda üstte kalan süpernatanı atıldı.
13. İlk 5 tüpte (CD4 FITC ve CD25 ECD ile boyanmış olan), dipte kalan hücrelerin üzerine 100'er µl. Reagent II yavaşça eklendi.
14. 5 dakika oda ısısında, vorteksle karıştırmadan ve sallamadan, ışıhta bekletildi.
15. Süre bitiminde tüpler yavaşça, elle, 2-3 saniye karıştırıldı.
16. Reagent II eklenmiş olan ilk 5 tüpün üzerine 3' er µl. monoklonal intrasitoplazmik antikor (APC-anti-human Foxp3; eBioscience, 17-4776-73) eklendi.
17. Tüpler 20 dakika oda ısısında, karanlıkta bekletildi.
18. Sonrasında 4' er ml. PBS ilave edildi.
19. 300 g' de 5 dakika oda ısısında santrifüj yapıldı.
20. Üstte kalan süpernatant dökülerek atıldı.
21. Tüpün dibinde kalan hücrelerin üzerine 1,5 ml izoton eklenip analize hazır hale getirildi.

Akış sitometrisi Flow-Check Fluorospheres (Beckman Coulter) ile kalibre edildikten sonra örnekler cihazda analiz edildi. Analiz bölgesinde negatif izotipik kontrolün floresansından daha yoğun floresans gösterenlerin total hücre popülasyonu içerisindeki yüzdeleri (ilgili antijeni taşıyan hücre yüzdesi) saptandı. Analiz programı olarak Windows ile uyumlu çalışan Expo32 Flow Analyser programı kullanıldı.

3.5. ELISA Deneyi

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) deneyi için hasta ve kontrol bireylerinden akış sitometrisi deneyi için alınan kan örneği ile eş zamanlı olarak biyokimya tüpüne 8-10 cc alınan kan örnekleri kullanıldı. Tam kan örneklerinden santrifügasyon yöntemi ile serum ayrıştırıldı. Çalışılan örneklerde serum çözünebilir TRAIL konsantrasyonları saptandı. Her bir hasta ve sağlıklı birey için bu deney iki kez tekrarlanmıştır.

3.5.1. Kullanılan Kit

sTRAIL ELISA Kit (Diaclone, 850.770.192)

Kit İçeriği:

2 adet 96 kuyucuklu yüzeyi anti-TRAIL kaplı ELISA plate
Liyofilize formda standart TRAIL
Liyofilize formda kontrol TRAIL
Biotinli anti-TRAIL
Streptavidin-HRP
Standart dilüent buffer 10X
Washing buffer 200X

3.5.2. Kullanılan Solüsyonlar

Standart Buffer Dilüent 10X:

Kit içerisinden çıkan 25 ml buffer solüsyonu cam bir şişede 225 ml distile su ile dilüe edilir.

Standart TRAIL:

Kit içerisinden çıkan standart olarak kullanılacak olan liyofilize formdaki TRAIL, 1,87 ml standart buffer dilüent 10X ile sulandırılır. Final konsantrasyonu 3000 pg/ml' dir.

Kontrol TRAIL:

Pozitif kontrol olarak kullanılması amaçlanan kit içerisinden çıkan liyofilize formdaki TRAIL, 0,3 ml standart buffer dilüent 10X ile sulandırılır.

Biotinli anti-TRAIL:

96 kuyucuklu bir ELISA plate' i çalışmak için kit içeriğinden çıkan biotinli anti-TRAIL antikorundan 240 µl. alınarak steril bir cam şişeye konulur. Üzerine de 6360 µl. biotinli antikor dilüent solüsyonu eklenir.

Streptavidin-HRP Solüsyonu:

Kit içerisinde çıkan 5 µl. streptavidin-HRP üzerine, yine kit içerisinde çıkan 0,5 ml HRP dilüent eklenir. 96 kuyucuklu bir ELISA plate' i çalışmak için bu dilüe edilmiş olan streptavidin-HRP stoğundan 150 µl. steril bir cam şişeye alınır. Üzerine 10 ml. Streptavidin-HRP dilüent ilave edilerek tekrardan dilüe edilerek kullanıma hazır hale getirilir.

Washing Buffer 200X:

Deney sırasında yıkama işlemlerinde kullanılacak olan solüsyon için, kit içerisinde çıkan konsantr haldeki washing bufferdan 10 ml alınarak distile su ile 2000 ml' ye tamamlanır.

3.5.3. İşlemler

1. Deney için kit içeriğinden çıkan sTRAIL antikoru ile kaplanmış 96 kuyucuklu plate kullanıldı. Dikey sıralar rakamla, yatay sıralar ise harfle isimlendirilmiştir.

2. İlk iki sütun dışındaki her bir kuyucuğa 100' er µl. serum örneği konuldu. Her bir hasta ve kontrol birey örneği deney güvenilirliği açısından çift olarak çalışıldı.

3. Plate'in ilk iki sütunu standart eğrinin belirlenmesinde kullanılacak olan dilüsyonlar ve pozitif ve negatif kontrol amaçlı kullanıldı. Plate sütunları rakamla, sıraları ise harfle belirtilmiştir.

4. İlk 2 sütunun ilk sırasına (A1 ve A2) 200' er µl. standart konuldu.

5. A1 ve A2' den 100' er µl. B1 ve B2' ye aktarıldı.

6. B1 ve B2 kuyucuklarına 100' er µl. standart dilüent buffer eklenerek dilüe edildi.

7. B1 ve B2' den 100' er µl. C1 ve C2' ye aktarıldı.

8. C1 ve C2 kuyucuklarına 100' er µl. standart dilüent buffer eklenerek dilüe edildi.

9. C1 ve C2' den 100' er µl. D1 ve D2' ye aktarıldı.

10. D1 ve D2 kuyucuklarına 100' er µl. standart dilüent buffer eklenerek dilüe edildi.

11. D1 ve D2' den 100' er µl. E1 ve E2' ye aktarıldı.

12. E1 ve E2 kuyucuklarına 100' er µl. standart dilüent buffer eklenerek dilüe edildi.

13. E1 ve E2' den 100' er µl. F1 ve F2' ye aktarıldı.

14. F1 ve F2 kuyucuklarına 100' er µl. standart dilüent buffer eklenerek dilüe edildi.

15. F1 ve F2' den 100' er µl. mikropipet yardımı ile çekilerek atıldı.

16. Negatif kontrol olarak kullanılmak üzere G1 ve G2 kuyucuklarına sadece 100' er µl. standart dilüent buffer konuldu.

17. H1 ve H2 kuyucuklarına pozitif kontrol olması amacıyla 100' er µl. kontrol TRAIL eklendi.

18. Her bir kuyucuğa taze olarak hazırlanmış olan biotinli anti-TRAIL' den 50' şer µl. eklendi.

19. Plate' in üstü parafilm ile kapatıldı ve 3 saat, oda ısısında beklemeye bırakıldı.

20. Süre sonunda üstü açılan plate' deki her bir kuyucuğun içerisindeki solüsyon multikanal mikropipet yardımı ile boşaltıldı.

21. Her bir kuyucuğa 0,3' er ml daha önceden hazırlanmış olan washing buffer eklendi ve mikropipet ile aspire edildi. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.

22. Her bir kuyucuğa taze hazırlanan, streptavidin-HRP solüsyonundan 100'er µl. eklendi.

23. Plate' in üstü parafilm ile kapatılarak, 30 dakika, oda ısısında beklemeye bırakıldı.

24. Süre bitiminde üstü açılan plate daha önce tarif edildiği şekilde 3 kez yıkama işlemine tabi tutuldu.

25. Yıkama işlemini takiben her bir kuyucuğa 100' er µl. TMB substrat solüsyonu eklendi.

26. Plate' in üstü alüminyum folyo yardımı ile kapatıldı. 15-20 dk süreyle oda ısısında, karanlıkta beklemeye bırakıldı.

27. Süre sonunda üstü açılan plate' deki her bir kuyucuğa stop solüsyonu olarak 100' er µl. H₂SO₄ eklendi.

28. Renk reaksiyonu verene kadar bekletildi (en fazla 1 saat).

29. Plate, 450 nm' de ELISA reader (Biotek ELX800)' da okutuldu.

3.5.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

Yapılan ELISA deneyi sonucu 450 nm'de elde edilen okuma değerlerinin ng cinsinden değerleri hesaplandı. Bu hesaplama işleminde, Microsoft Office Excel 2007 programı yardımı ile standart dilüsyonların okuma değerlerinden elde edilen standart eğri formülü kullanıldı.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçların istatistiksel testleri Windows SPSS (The statistical package for social sciences) 13.0 versiyonu (SPSS Inc., Chicago, Ill) ve GraphPad Prism 5. Versiyonu (La Jolla, CA, USA) kullanılarak yapıldı. Ortalama değerlendirmeler için tanımlayıcı testler, normalite testleri için Shapiro-Wilk metodu, non-parametrik karşılaştırmalar için Mann Whitney-U testi ve korelasyonlar için Spearman's Rho korelasyon testi kullanıldı. Bazı grafiklerin oluşturulması sırasında da SmartDraw Health Science Edition (San Diego, CA, USA) kullanıldı.

BULGULAR

Bu çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıklar Anabilim Dalı Romatoloji Polikliniği' ne başvuran ve burada ilk kez RA tanısı alan 20 olgu ve Romatoloji ve İmmünoloji Polikliniği' ne başvuran sağlıklı bulunan 16 gönüllü dahil edilmiştir.

4.1. Romatoid Artrit' li Hastaların Klinik Değerlendirmesi

ACR' nin belirlemiş olduğu kriterler doğrultusunda ilk kez RA tanısı alan toplam 20 ve yaş-cinsiyet dağılımı yönünden benzerlik gösteren sağlıklı 16 birey çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta grubunda yer alan olguların yaş aralığının 29-73 arasında (ortalama yaş: 51,4) olduğu görülmüş ve 20 hastanın 5' i erkek, 15' i kadınlardan oluşmaktadır. Hasta ve kontrol grubunda yer alan gönüllülerin genel özellikleri Tablo 4.1' de özetlenmiştir.

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Kontrol No	Cinsiyet	Yaş
1	K	42	1	K	71
2	E	73	2	K	62
3	E	57	3	K	64
4	K	53	4	E	48
5	K	29	5	E	33
6	E	43	6	K	50
7	K	53	7	K	52
8	K	47	8	E	43
9	K	40	9	K	47
10	K	52	10	K	57
11	K	43	11	E	54
12	K	37	12	K	52
13	E	57	13	K	49
14	K	72	14	K	56
15	K	48	15	K	65
16	K	65	16	K	30
17	K	57			
18	K	50			
19	K	62			
20	E	49			

Tablo 4.1. RA' lı olguların ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyet dağılımı

RA' lı hastaların klinik değerlendirmeleri uzman bir romatolog tarafından yapılmış olup özgeçmişinde herhangi bir DMARD kullanımı ve kronik başka bir hastalık öyküsü olmayanlar arasından seçilmişlerdir. Hastaların yapılan fizik muayene ve laboratuvar testleri sonucunda hastalık aktiviteleri DAS-28 (şiş eklem sayısı, hassas eklem sayısı ve ESR içerikli) formülü kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.2).

Hasta No	Şiş Eklem Sayısı	Hassas Eklem Sayısı	ESR	CRP	DAS-28 Skoru
1	2	1	26	0,43	3,66
2	4	2	5	0,09	2,84
3	0	0	24	0,32	2,56
4	2	1	46	1,25	4,09
5	2	2	23	1,73	3,81
6	0	0	8	0,06	1,73
7	0	1	6	0,11	2,11
8	2	2	10	0,04	3,18
9	0	0	8	0,83	1,73
10	0	0	2	0,02	0,68
11	2	10	35	0,36	5,18
12	1	1	8	0,01	2,64
13	3	5	36	0,83	4,74
14	2	4	76	2,56	5
15	2	6	24	0,21	4,46
16	6	10	76	2,76	6,08
17	4	10	48	1,67	5,6
18	5	7	10	0,04	4,17
19	6	8	49	1,25	5,55
20	0	0	25	0,59	2,59

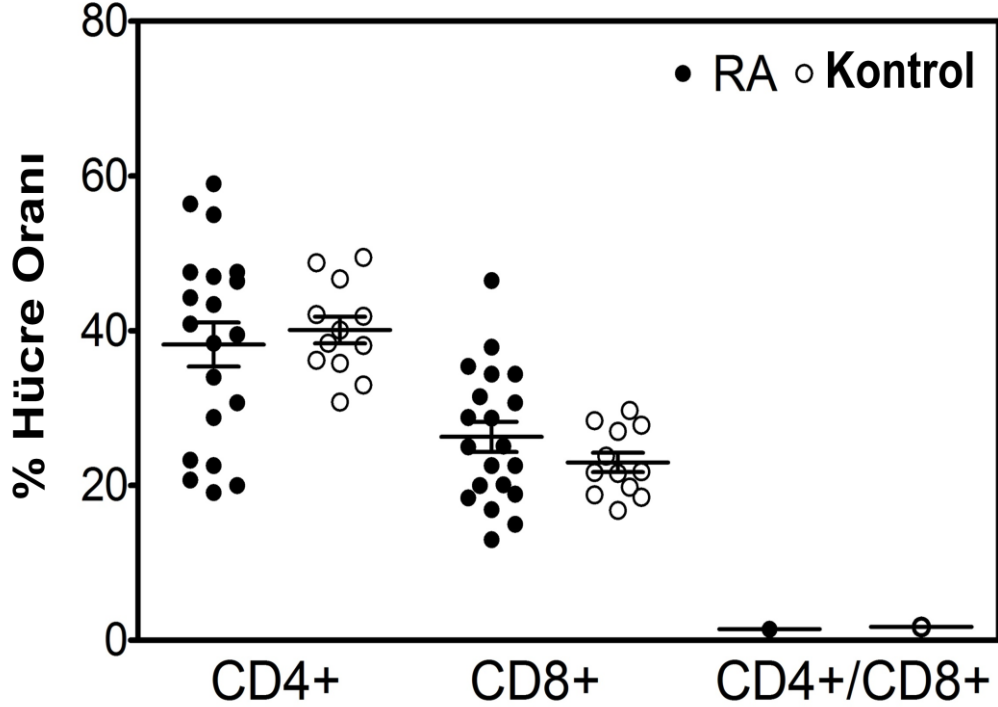
Tablo 4.2. RA' lı hastaların DAS-28 skorları ve klinik bulguları

4.2. Periferik Kan Örneklerinin Akış Sitometrisi İle Değerlendirilmesi

RA' nın heterojenik özellikler gösteren bir otoimmün hastalık olmasından ve daha önce SLE ile yapılan bir çalışmada T hücre alt tiplerinden CD4⁺ ve CD8⁺ hücre oranlarında sağlıklı bireylere kıyasla farklılıklar gözlenmesi nedeniyle periferik kan örneklerinde öncelikle T lenfosit alt tiplerinin oranları saptanmıştır. Burada yüzde olarak hücre oranlarının belirlenmesi ve sağlıklı bireylerle kıyaslanabilmesi için akış sitometrisi yöntemi kullanılmıştır. Çalışılan hasta örnekleri, sağlıklı kontrol bireylerden elde edilen sonuçlarla bağımsız gruplar için yapılan nonparametrik student t testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Çalışılan 20 RA' lı hasta ile kontrol grubu arasında ne CD4⁺ (p=0,63) ne de CD8⁺ (p=0,22) T lenfositlerinin oranı yönünden herhangi istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.1). Bu durum SLE' nin aksine RA' lı hastalarda,

hastalığın seyri ile T lenfosit alt tiplerinin oranlarının etkilenmediğini göstermektedir.



Şekil 4.1. CD4⁺/CD8⁺ T hücre oranları. RA' lı hastalarda CD4⁺/CD8⁺ hücre oranı sağlıklı bireylerle aynı saptandı. Her bir nokta bir hastanın sonucunu göstermektedir. Şekil üzerinde ortalama ± SEM değerleri hata çubuğu olarak gösterilmiştir.

Çalışmamıza dahil edilen RA' lı hastalara ait CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ lenfosit yüzde oranları ile kontrol grubu arasında fark bulunmazken, literatürle uyumlu bir şekilde CD4⁺ CD25⁺ T lenfosit sayısının sağlıklı bireylerden fazla olduğu (p=0,001) yapılan akış sitometri deneyleri sonucunda belirlenmiştir. Bu deneye ait sonuçlar Tablo 4.3' de verilmiştir.

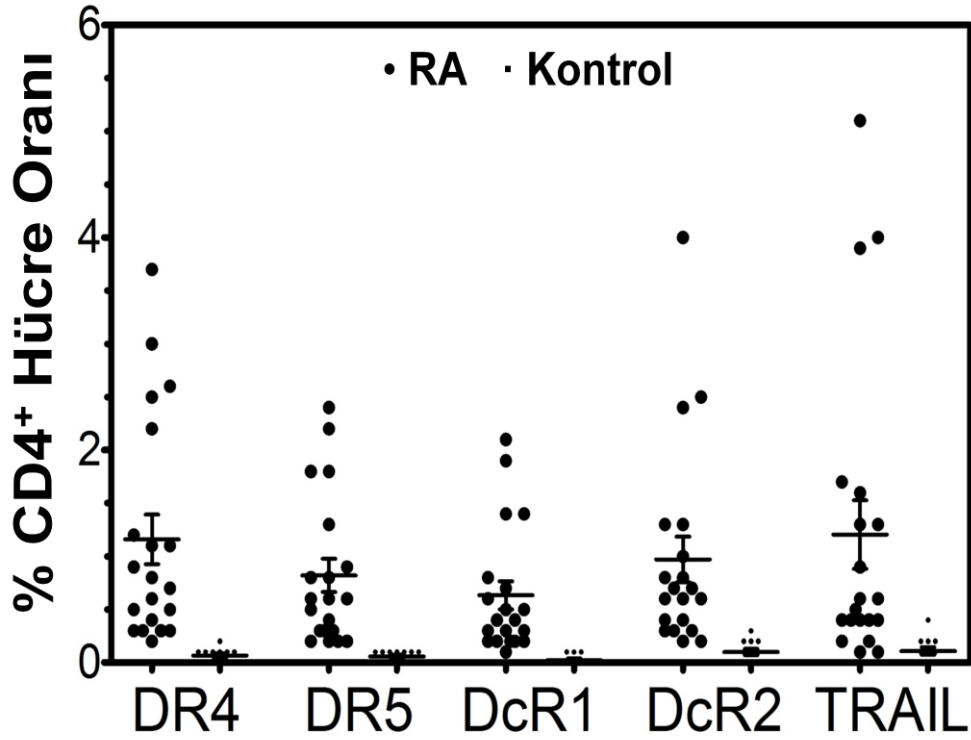
	RA	Kontrol	p Değeri
CD4 ⁺ CD25 ⁺	4,9 ± 2,9	3,1 ± 2,0	0,001
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	0,8 ± 1,9	0,6 ± 0,4	0,259

Tablo 4.3. CD4⁺ CD25⁺ ve FoxP3⁺ hücre yüzdeleri ile RA' lı ve sağlıklı kontrollerin akış sitometrisi sonuçlarının karşılaştırılması.

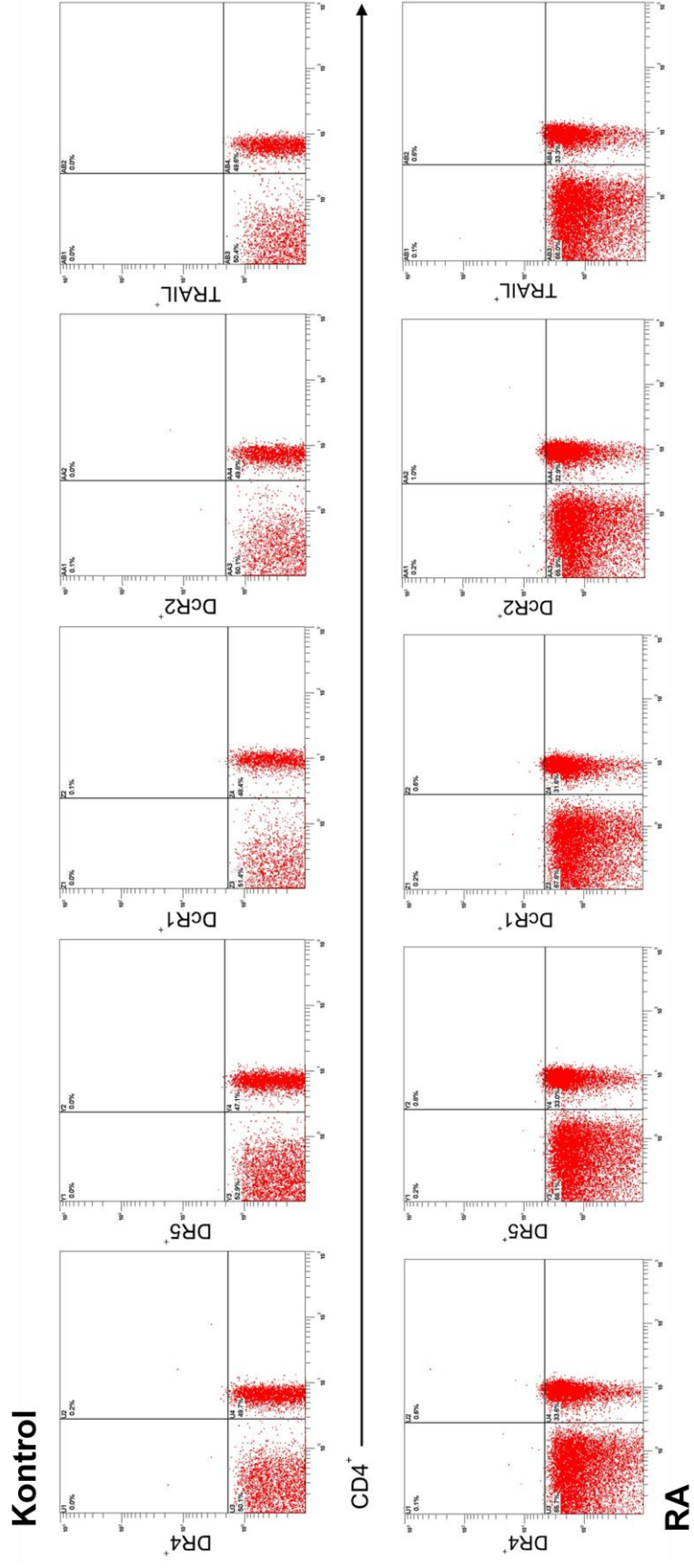
4.3. Romatoid Artrit' de CD4⁺ T Lenfositlerin TRAIL Ligand ve Reseptör Profilleri

RA' nın gelişimi sırasında henüz bilinmeyen bir antijenik uyarım sonucu CD4⁺ T hücrelerinin aktif hale geçerek immün yanıtı başlattığı ve bunun sonucunda da sinovyal inflamasyon ve eklemlerde harabiyet oluştuğu bilinmektedir. CD4⁺/CD8⁺ lenfosit oranlarında sağlıklı bireyler ile RA' lı olgular arasında fark saptanmamasından dolayı her bir T hücre alt tipinin hücre yüzeyi TRAIL ligand ve reseptör profilleri akış sitometrisi yöntemi kullanılarak belirlendi. Her iki grup arası yüzdesel hücre oranları bağımsız gruplar için kullanılan student t testi ile karşılaştırıldı (p<0,05).

Şekil 4.2' de gösterildiği üzere, CD4⁺ T hücrelerinden elde edilen sonuçlara göre RA' lı hasta grubunda sağlıklı kontrol bireylere göre hem TRAIL ligand hem de her iki grup (ölümcül ve yalancı) reseptörlerinin yüzey ekspresyonlarında belirgin bir artış saptandı. Yapılan analizlere örnek olarak bir RA' lı hasta bir de sağlıklı bireyden çalışılan periferik kan örneklerine ait akış sitometrisi sonuçları Şekil 4.3' de gösterilmiştir.

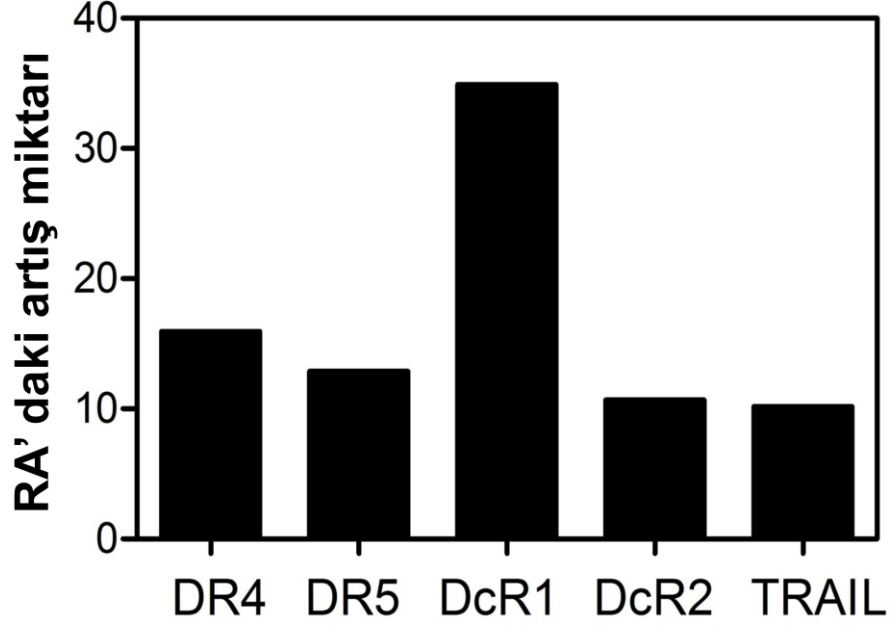


Şekil 4.2. RA' lı hastaların CD4⁺ T lenfositlerindeki TRAIL ligand ve reseptör ekspresyon düzeyleri sağlıklı bireylere göre yüksek bulundu. Her bir nokta bir hastayı temsil etmektedir. Şekildeki hata çubukları \pm SEM değerlerini ifade etmektedir.



Şekil 4.3. Periferik kandan elde edilen örneklerde CD4⁺ T lenfositlerindeki TRAIL ligand ve reseptörlerinin akış sitometri ile analizine birer örnek. Alt panelde RA' lı bir hastanın, üst panelde ise sağlıklı bir kişinin analizi görülmektedir.

Bu gözlenen artışların her bir reseptör ve ligand için kontrol grubuna göre kaç kat olduğu hesaplanarak Şekil 4.4' de verilmiştir. Burada özellikle diğer reseptörler ve liganddaki artış miktarı 10-15 kat iken DcR1 ekspresyonundaki artışın 35 kat olduğu dikkat çekmektedir.



Şekil 4.4. RA' lı hastaların CD4⁺ T hücrelerindeki TRAIL ligand ve reseptör ekspresyon miktarlarının sağlıklı bireylere göre kaç kat arttığı görülmektedir.

Ayrıca RA hastalarına ait CD4⁺ T hücre yüzeyi TRAIL ligand ve reseptör ekspresyonlarının birbirleri ile olan etkileşimleri de Spearman Rho korelasyon analizi ile değerlendirildi. Özellikle DR4 ekspresyonundaki artışın hem DR5 hem de TRAIL' in kendisindeki artış ile korele olduğu görüldü. Yine yalancı reseptörler arasında da (DcR1 ve DcR2) bir korelasyon saptandı (Tablo 4.4).

RA-CD4 Spearman's Rho		DR4	DR5	DcR1	DcR2	TRAIL
DR4	correlation Coefficient	1.000	.620(**)	.116	.255	.764(**)
	Sig. (2-tailed)	.	.004	.626	.277	.000
	N	20	20	20	20	20
DR5	correlation Coefficient	.620(**)	1.000	.470(*)	.416	.374
	Sig. (2-tailed)	.004	.	.037	.068	.104
	N	20	20	20	20	20
DcR1	correlation Coefficient	.116	.470(*)	1.000	.639(**)	.086
	Sig. (2-tailed)	.626	.037	.	.002	.718
	N	20	20	20	20	20
DcR2	correlation Coefficient	.255	.416	.639(**)	1.000	.414
	Sig. (2-tailed)	.277	.068	.002	.	.070
	N	20	20	20	20	20
TRAIL	correlation Coefficient	.764(**)	.374	.086	.414	1.000
	Sig. (2-tailed)	.000	.104	.718	.070	.
	N	20	20	20	20	20

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

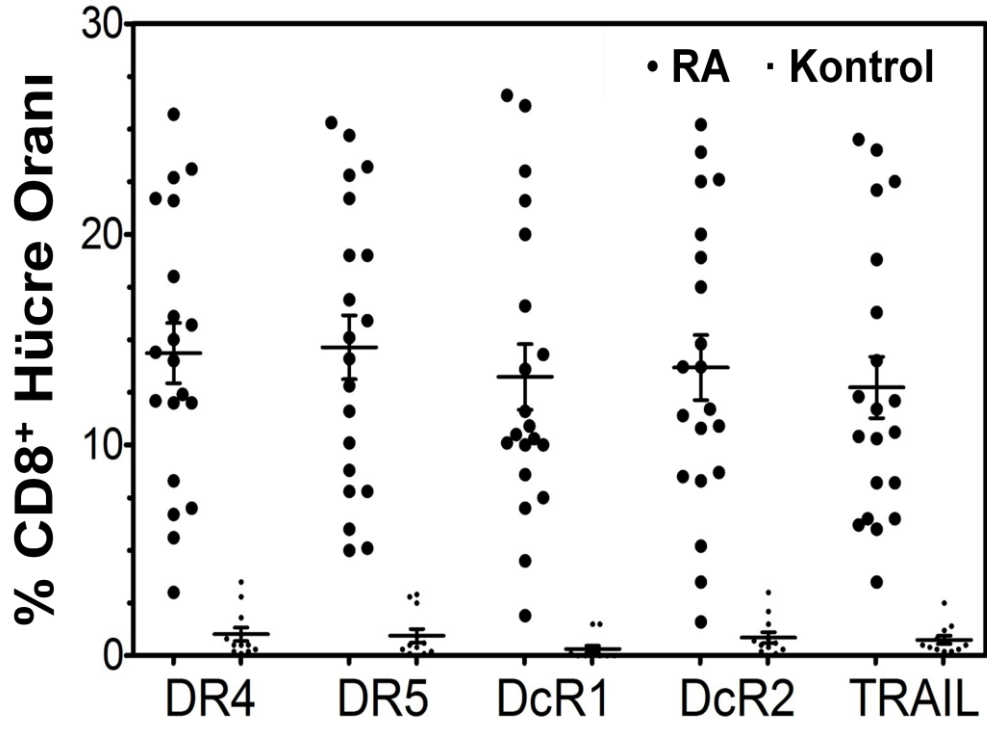
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tablo 4.4. RA hastalarından elde edilen CD4⁺ T hücrelerindeki TRAIL ligand ve reseptörlerinin birbirleri ile olan Spearman Rho analizi sonuçları.

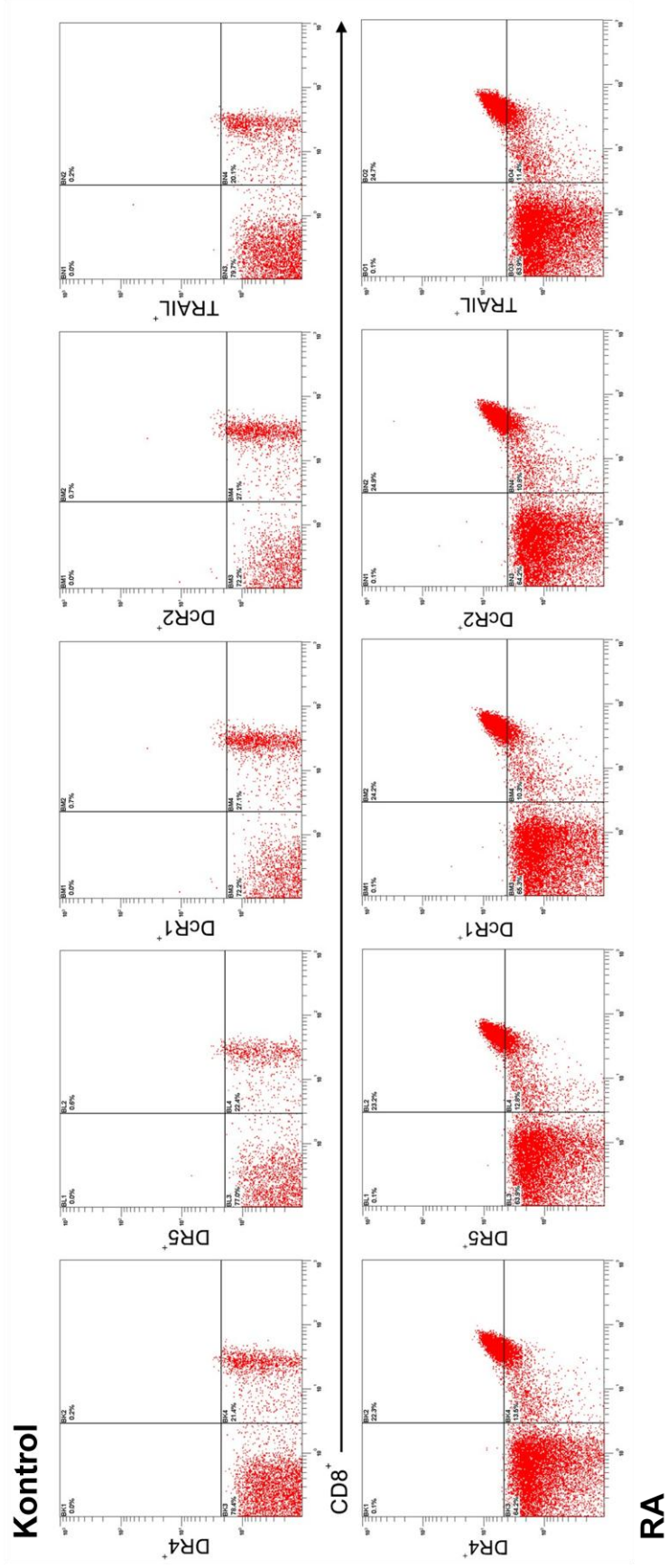
4.4. Romatoid Artrit' li Hastaların CD8⁺ T Hücre Yüzeylerindeki TRAIL Ligand ve Reseptör Ekspresyon Düzeyleri

RA' nın gelişimi sırasında T hücrelerinin merkezi rollerinden dolayı, RA' lı hastaların periferik kan örneklerinde bir sonraki aşama olarak CD8⁺ lenfositlerde TRAIL ligand ve reseptör profilleri akış sitometrisi kullanılarak belirlendi.

Şekil 4.5' de görüldüğü üzere sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunda CD8⁺ lenfosit ilişkili TRAIL ligand ve reseptörlerinin ekspresyon düzeyleri %1 oranında iken RA' lı hastalarda bu oran ortalama %14' tür. Her iki gruba ait örnek akış sitometrisi grafikleri Şekil 4.6' da verilmiştir. Her iki grup arasındaki bu farkın istatistiksel analizi student t testi kullanılarak yapılmıştır (p<0,05).

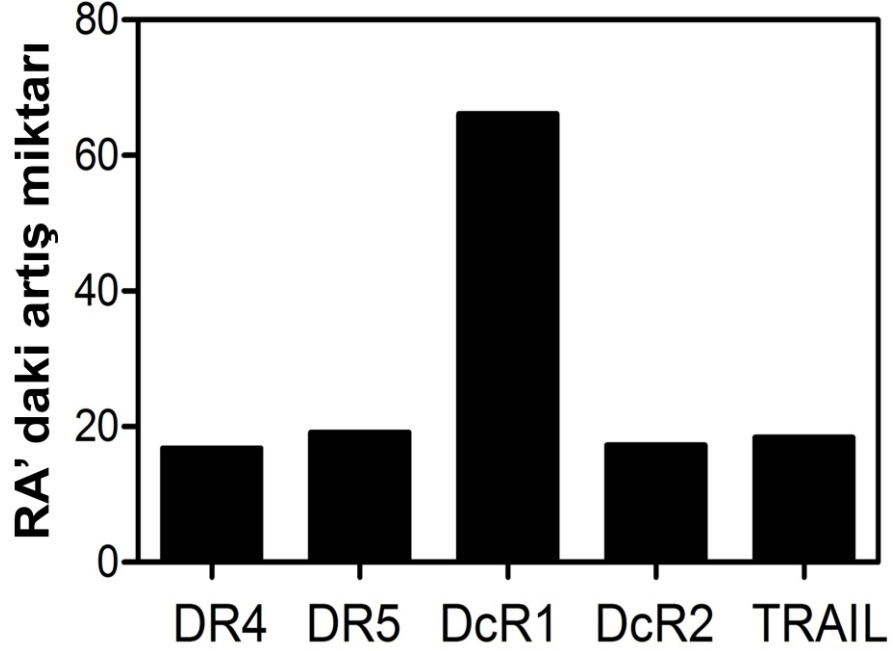


Şekil 4.5. Kontrol grubu ile RA' lı hasta grubundaki olguların CD8⁺ T hücrelerindeki TRAIL ligand ve reseptör düzeyleri. Şekil üzerinde ortalama \pm SEM değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.6. CD8⁺ lenfositlerdeki TRAIL ligand ve reseptörler ekspresyonlarını tespit etmede kullanılan akış sitometrisi analizinden her iki gruba ait birer örnek. Üst sıra kontrol grubundan bir örneğe ait iken, alt sıra RA hasta grubundan bir olguya aittir.

Artış miktarları bakımından incelediğinde CD8⁺ T hücrelerinde özellikle yalancı reseptörlerden DcR1 ekspresyonununun 66 kat arttığı gözlemlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. RA' lı hastaların CD8⁺ lenfositlerine bağlı TRAIL ligand ve reseptörlerinin kontrol grubuna göre artış miktarı.

Tablo 4.5' te CD8⁺ lenfosit yüzeyindeki TRAIL Ligand ve reseptör ekspresyon düzeylerinin birbiri ile korelasyonunu gösteren Spearman Rho korelasyon analizi sonuçları verilmiştir. Burada hem yalancı reseptörlerin hem ölüm reseptörlerinin hem de TRAIL ligandının birbirleri ile yüksek oranda ilişkili olduğu görülmektedir.

RA-CD8 Spearman's Rho		DR4	DR5	DcR1	DcR2	TRAIL
DR4	correlation Coefficient	1.000	.868(**)	.948(**)	.740(**)	.744(**)
	Sig. (2-tailed)	.	.004	.000	.000	.000
	N	20	20	20	20	20
DR5	correlation Coefficient	.868(**)	1.000	.784(**)	.738(**)	.632(**)
	Sig. (2-tailed)	.000	.	.000	.000	.003
	N	20	20	20	20	20
DcR1	correlation Coefficient	.948(**)	.784(**)	1.000	.773(**)	.689(**)
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.	.000	.001
	N	20	20	20	20	20
DcR2	correlation Coefficient	.740(**)	.738(**)	.773(**)	1.000	.525(*)
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.	.017
	N	20	20	20	20	20
TRAIL	correlation Coefficient	.744(**)	.632(**)	.689(**)	.525(*)	1.000
	Sig. (2-tailed)	.000	.003	.001	.017	.
	N	20	20	20	20	20

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

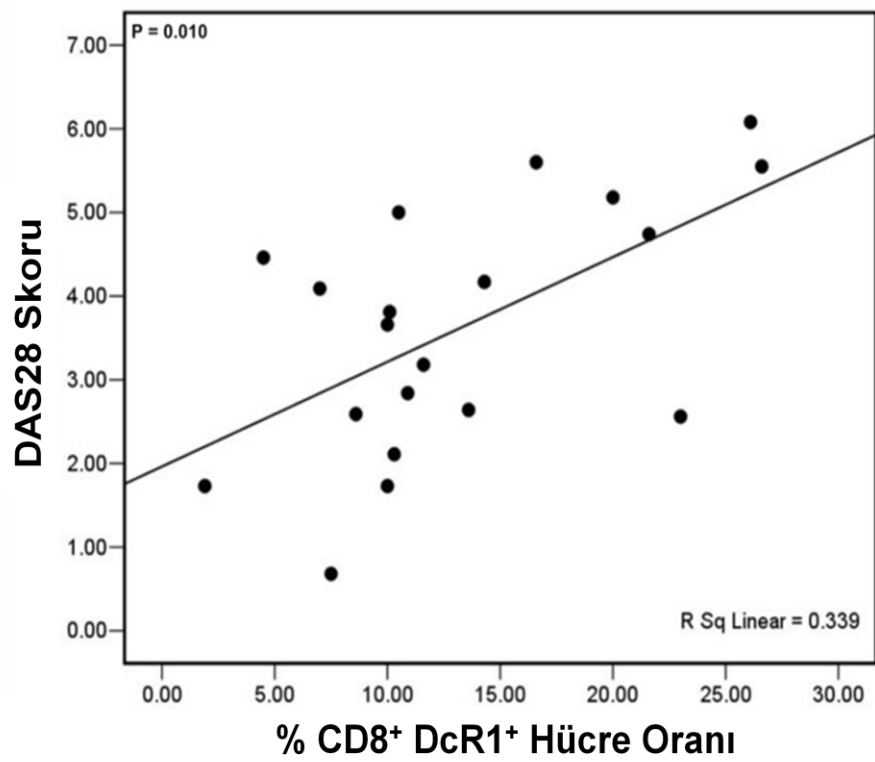
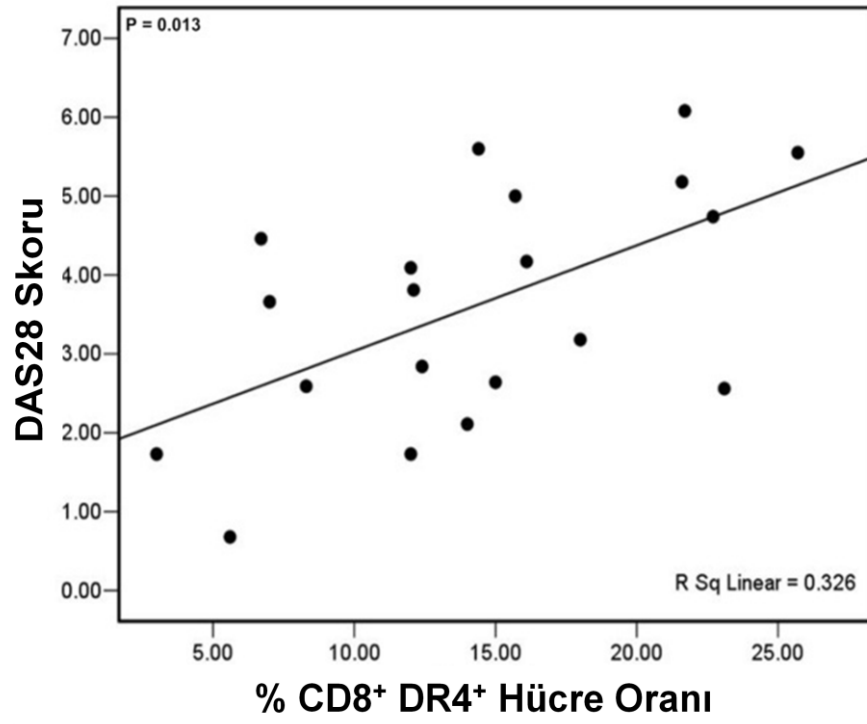
* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

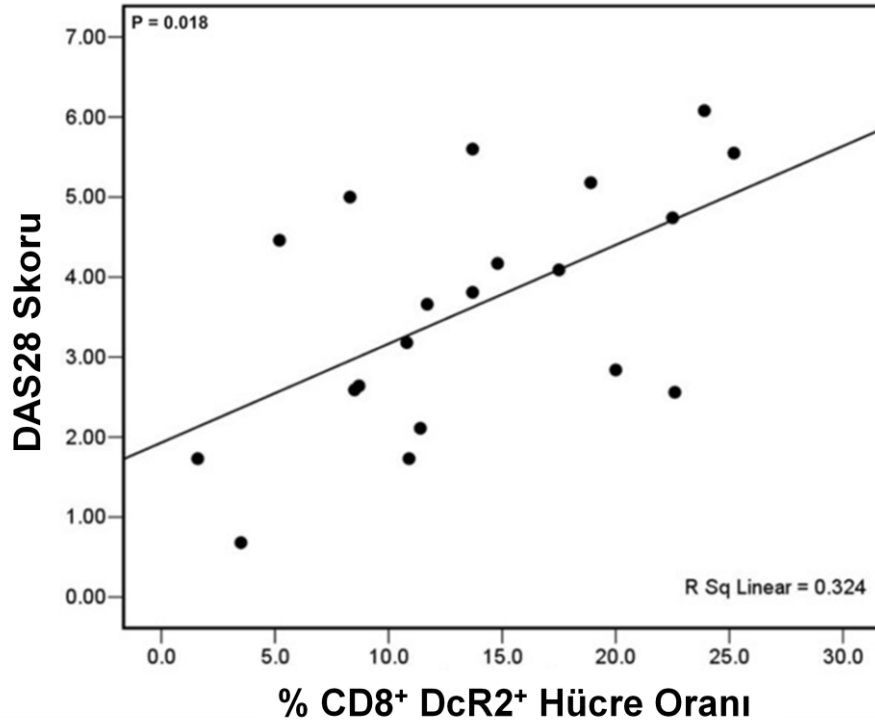
Tablo 4.5. CD8⁺ T hücre ilişkili TRAIL ligand ve reseptör ekspresyonlarının RA' lı hastalardaki korelasyon analizi.

4.5. T Lenfosit TRAIL Ligand ve Reseptör Ekspresyon Profillerinin RA Hastalık Aktivitesi İle İlişkisi

Elde ettiğimiz sonuçlar ışığında T lenfosit TRAIL ve reseptör ekspresyon profilleri ve RA' lı hastalarda gözlenen artışlar, hastaların hastalığın şiddeti ve aktivitesi ile ilişkisi Spearman Rho korelasyon analizi ile değerlendirildi. Bu analizde hastalığın aktivitesinin göstergesi olarak DAS-28 skoru kullanıldı.

Burada özellikle CD8⁺ T hücrelerindeki, en fazla DcR1 olmak üzere DR4 ve DcR2 ekspresyonundaki artışın DAS28 ile korele olduğu saptanırken, CD4⁺ T hücrelerindeki ekspresyon artışları ile ilgili herhangi bir ilişki bulunmadı (Şekil 4.8).





Şekil 4.8. CD8⁺ T hücresi ilişkili ölüm reseptörü DR4 ve yalancı reseptörler DcR1 ve DcR2 ekspresyonlarındaki artışlar, RA hastalarının DAS28 skorları ile korele bulundu.

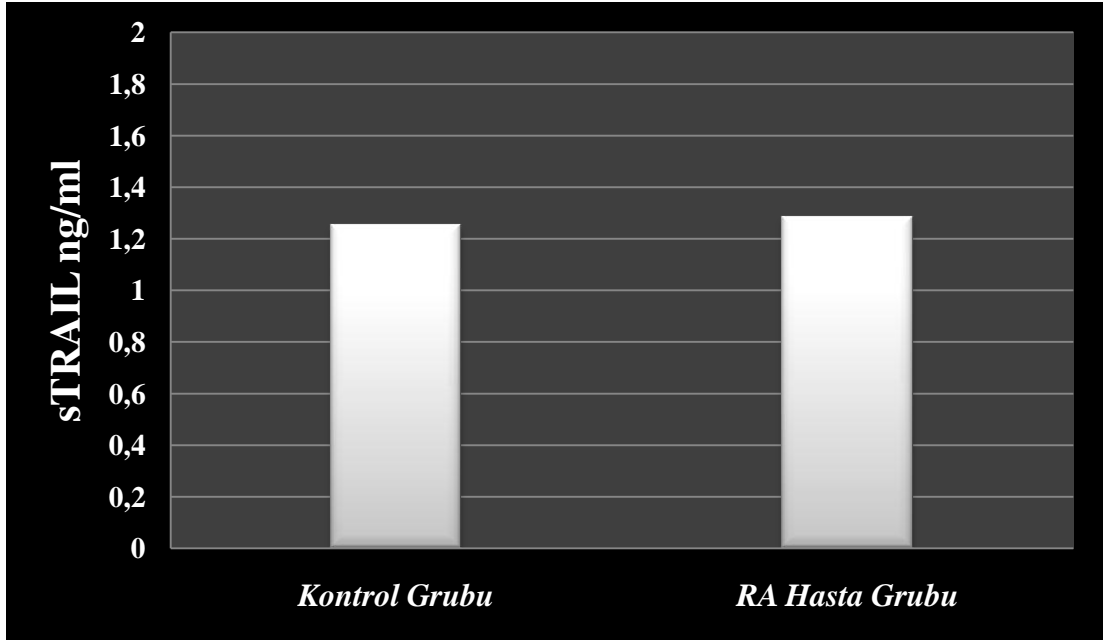
4.6. Romatoid Atrit' li Hastalarda Serum sTRAIL Düzeylerinin Önemi

Literatürde RA ile benzer bulguları olan başka bir otoimmün hastalık olan SLE ile yapılan bir çalışmada, SLE hastalarında serum sTRAIL konsantrasyonunun arttığı ve bu artışın SLE patofizyolojisinde önemli bir role sahip olabileceği vurgulanmıştır. Biz de bu çalışmamızda sistemik çözünebilir TRAIL' in, yeni RA tanısı almış hastalarda diyagnostik bir öneminin olup olmadığını ortaya çıkarmayı amaçladık. Burada ELISA yöntemi kullanılarak gerekli ölçümler yapıldı.

RA' lı hasta grubu ile sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu karşılaştırıldığında, serum sTRAIL konsantrasyonları açısından bir farklılık belirlenmedi (Tablo 4.6). Ortalama serum sTRAIL konsantrasyonları kontrol grubunda 1.25 ng/ml, RA' lı hastalarda 1.28 ng/ml olarak hesaplandı (Şekil 4.9). Ortalama değerler student t test kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi.

Hasta No	sTRAIL miktarı	Kontrol No	sTRAIL miktarı
1	1,098	1	1,159
2	0,799	2	1,023
3	1,198	3	0,956
4	2,998	4	1,049
5	0,969	5	0,941
6	1,054	6	1,977
7	1,396	7	0,910
8	1,254	8	1,411
9	1,239	9	1,000
10	0,828	10	1,365
11	1,877	11	1,458
12	1,275	12	1,586
13	1,707	13	1,175
14	0,622	14	1,566
15	1,411	15	1,450
16	1,249	16	1,500
17	0,684		
18	1,110		
19	1,162		
20	1,301		

Tablo 4.6. Yeni RA tanısı konmuş hastalarla, sağlıklı bireylerde saptanan serum çözünebilir TRAIL düzeyleri.



Şekil 4.9. RA' lı hastalar ile sağlıklı bireyler karşılaştırıldığında, serum sTRAIL konsantrasyonları açısından herhangi bir farklılık belirlenmedi.

Elde ettiğimiz bulgularımız sonucunda sTRAIL' in RA' lı hastaların tanısında diyagnostik bir öneminin olmadığı görüldü. Ancak çözünebilir TRAIL' in hastalığın prognozu ve tedaviye vereceği yanıtı gösteren bir belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağını tespit etmek için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Romatoloji Bilim Dalı öncülüğünde ortaklaşa yürüttüğümüz başka bir çalışmada, önceden RA tanısı almış ve DMARD kullanmakta olan 20 RA hastası çalışıldı. Bu çalışmada 2 kontrol grubu kullanıldı, 20 sağlıklı bireyden oluşan bir grup ve 20 Sjögren Sendrom' lu hastadan oluşan diğer bir grup. Burada DMARD kullanan RA hasta grubunda sTRAIL konsantrasyonu hem sağlıklı kontrol grubuna göre hem de Sjögren Sendrom' lu hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış bulundu. Sjögren Sendrom' lu grupla sağlıklı kişiler arasında ise herhangi bir fark gözlenmedi. Saptanan sTRAIL düzeyleri kontrol grubunda 1,25 ng/ml, Sjögren Sendrom' lu hastalarda 1,27 ng/ml ve DMARD kullanan RA' lı olgularda 1,75 ng/ml' dir.

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile prostat, akciğer, meme ve sinovyal dokular ile ilişkili hastalıklarda TRAIL ve reseptörlerinin ekspresyon profillerinin belirlenmesi hastalığın tanı, prognoz ve tedavisinin yönlendirilmesinde önem kazanmıştır [80, 105-107]. Kansere karşı olan etkinliğine ilaveten TRAIL' in T hücreleri üzerinde de etkisi vardır.

TRAIL proteininin, otoreaktif T hücrelerinin timusta gerçekleşen negatif seleksiyonunda rol aldığı, başka gruplar tarafından daha önce iddia edilmişti [108]. Ayrıca TRAIL' den yoksun fare modellerinde T hücrelerinin timik delesyonunun gerçekleşmediği ve bu farelerin kollajen indüklü artrit geliştirmeye yatkın oldukları da bildirilmiştir [93].

Gen tedavi alanındaki çalışmalar, TRAIL' in aşırı ekspresyonunun otoimmün hastalıklardaki fonksiyonel rolünü ortaya çıkarmaya yardımcı oldu [80]. Örneğin, romatoid artrit tavşan modellerinin *in vivo* adenovirüs aracılı gen aktarımına duyarlılığının yanı sıra, romatoid artritli hastalarından izole edilen sinovyal hücrelerin de TRAIL gen aktarımını karşı duyarlı olduğu gözlemlendi [106, 109].

Periferal kan lenfositleri yüzeyindeki TRAIL ekspresyonu, sinovyal hücreler üzerindeki ekspresyonundan daha farklı bir etkiye yol açabilir. TRAIL, sinovyal hücrelerin apoptozisine neden olabilirken, lenfositler üzerinde ise baskılayıcı bir etki oluşturabilir [110].

Otoimmün hastalıkların ötesinde, TRAIL/TRAIL reseptör etkileşimlerinin kanserde hastalık aktivasyonunun bir göstergesi olarak kullanılabilmesi daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin prostat kanserli hastalarda DcR2 ekspresyonu kötü prognozu işaret ederken, invaziv duktal karsinomlu hastalarda ise yüksek DR4 ekspresyonu hastalığın evresi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir [107, 111]. Bunlara ek olarak, otoimmün bir hastalık olan tip 1 diyabet üzerine yapılan bazı çalışmalarda da yüksek miktardaki endojen TRAIL ekspresyonunun insan pankreas dokusunda oluşan hücre ölümü ile ilişkili olduğu ve otoimmün yanıtın başlamasında etkin bir role sahip olabileceği düşünülmüştü [112, 113]. Ancak bugüne kadar bir diğer otoimmün hastalık olan RA gelişimi ile TRAIL/TRAIL reseptör ilişkisini ortaya koyabilecek herhangi bir çalışma yapılmadığı dikkat çekmiştir.

Çalışmamızda, toplam 20 RA' lı hasta ve 16 sağlıklı bireydeki periferal T hücrelerinin yüzeyindeki TRAIL ve reseptör kompozisyonları akış sitometrisi ile belirlendi. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında RA' lı hastalarda, her iki T hücre alt

tipinde de (CD4⁺ ve CD8⁺ lenfositler) TRAIL ve reseptörlerinin ekspresyonlarında belirgin artış gözlemlendi. Daha önceki çalışmalarda prostat kanserinde, prostat dokusundaki TRAIL ve reseptör ekspresyon düzeylerinin benign prostat hipertrofisi ile kanser ayırımında kullanılabilmesi bildirilmiştir [105]. Benzer bir durumu gözlemlediğimiz RA' da da hastalığın tanısında ve seyrinde periferal lenfositlerdeki TRAIL/TRAIL reseptörlerinin ekspresyonlarının takip edilmesi faydalı olabilir.

RA' lı hastalarda, kontrollere göre en belirgin farklılık, hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T hücrelerinde artan DcR1 ekspresyonudur. Daha önce buna benzer bir durum, başka gruplar tarafından multiple skleroz (MS) hastalarında da bildirilmiştir [114]. MS hastalarında, DcR1 ekspresyon artışı gösteren antijen spesifik T hücre klonlarının, TRAIL aracılı apoptozise dirençli oldukları saptanmıştır. Bu bulgulardan yola çıkarak, otoreaktif T hücre klonlarının sağ kalımlarını DcR1 up-regülasyonu ile sağlıyor olabilecekleri sonucuna varılabilir.

Bilindiği üzere RA' lı hastaların aktiviteleri DAS28 skorlaması ile belirlenmektedir. Bizim çalışmamız sonucunda, hastalardaki DAS28 skoru ile TRAIL ligand ve reseptör ekspresyonları arasındaki korelasyona bakıldığında, sadece CD8⁺ T hücre ilişkili DR4, DcR1 ve DcR2 reseptör ekspresyonlarındaki artışlar hastalık aktivasyonu ile ilişkili bulundu. Dolayısı ile bu sonuçlardan yola çıkarak, CD8⁺ T hücrelerindeki TRAIL ve reseptörlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişimler hastalık aktivitesinin değerlendirilmesinde CD4⁺ T hücrelerinden daha önemli olabilir.

Sonuç olarak, RA' nın patogeneğinde en önemli rolü üstlenen hücre grubu olarak CD8⁺ T hücrelerinin yüzeylerindeki TRAIL ligand ve reseptör kompozisyonu ile hastalığın moleküler patogeneğinde önemli bir rol oynadığını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Harris, E.D., Jr., *Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy*. N Engl J Med, 1990. **322**(18): p. 1277-89.
2. Koch, A.E., *Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(6): p. 951-62.
3. Walsh, D.A., *Angiogenesis and arthritis*. Rheumatology (Oxford), 1999. **38**(2): p. 103-12.
4. Yin, G., et al., *Endostatin gene transfer inhibits joint angiogenesis and pannus formation in inflammatory arthritis*. Mol Ther, 2002. **5**(5 Pt 1): p. 547-54.
5. Pincus, T. and T. Sokka, *Laboratory tests to assess patients with rheumatoid arthritis: advantages and limitations*. Rheum Dis Clin North Am, 2009. **35**(4): p. 731-4, vi-vii.
6. Tobon, G.J., P. Youinou, and A. Saraux, *The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis*. Autoimmun Rev, 2009.
7. Dieude, P., *Rheumatic diseases: Environment and genetics*. Joint Bone Spine, 2009.
8. Clarke, A. and T.J. Vyse, *Genetics of rheumatic disease*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(5): p. 248.
9. Scherer, H.U. and G.R. Burmester, *A clinical perspective of rheumatoid arthritis*. Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2044-8.
10. Dooley, M.A. and S.L. Hogan, *Environmental epidemiology and risk factors for autoimmune disease*. Curr Opin Rheumatol, 2003. **15**(2): p. 99-103.
11. Reveille, J.D., *Genetic studies in the rheumatic diseases: present status and implications for the future*. J Rheumatol Suppl, 2005. **72**: p. 10-3.

12. Barton, A. and J. Worthington, *Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: an emerging picture*. *Arthritis Rheum*, 2009. **61**(10): p. 1441-6.
13. Plenge, R.M., *Rheumatoid arthritis genetics: 2009 update*. *Curr Rheumatol Rep*, 2009. **11**(5): p. 351-6.
14. Hoffmann, M., S. Hayer, and G. Steiner, *Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis; induction of arthritogenic autoimmune responses by proinflammatory stimuli*. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1173**: p. 391-400.
15. Kawahata, K., *[Historical review of rheumatology and future directions]*. *Nippon Rinsho*, 2009. **67**(3): p. 445-57.
16. Ebert, E.C., *Infliximab and the TNF-alpha system*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. **296**(3): p. G612-20.
17. Klareskog, L., A.I. Catrina, and S. Paget, *Rheumatoid arthritis*. *Lancet*, 2009. **373**(9664): p. 659-72.
18. Feldmann, M., F.M. Brennan, and R.N. Maini, *Rheumatoid arthritis*. *Cell*, 1996. **85**(3): p. 307-10.
19. Yamada, H., et al., *Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(9): p. 1299-304.
20. Xie, Y.D., L. Jin, and Q.W. Yu, *[The role of IFN-gamma, IL-10, IL-12 and TRAIL in sera and synovium fluids from patients with rheumatoid arthritis]*. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2007. **23**(6): p. 536-7.
21. Atzeni, F. and P. Sarzi-Puttini, *Anti-cytokine antibodies for rheumatic diseases*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009. **10**(11): p. 1204-11.
22. Khalifeh, M.S., et al., *Investigation of the role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β , interleukin-10, nitric oxide and rheumatoid factor-immunoglobulin M in a rat model of arthritis*. *Lab Anim*, 2009.
23. Panayi, G.S., *Targeting of cells involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 1999. **38 Suppl 2**: p. 8-10.

24. Hueber, W., et al., *Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(9): p. 2645-55.
25. Vojdani, A., *Antibodies as predictors of complex autoimmune diseases*. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2008. **21**(2): p. 267-78.
26. Banal, F., et al., *Sensitivity and specificity of the American College of Rheumatology 1987 criteria for the diagnosis of rheumatoid arthritis according to disease duration: a systematic literature review and meta-analysis*. *Ann Rheum Dis*, 2009. **68**(7): p. 1184-91.
27. Hakala, M., et al., *[Rheumatoid arthritis (updated Current Care guideline)]*. *Duodecim*, 2009. **125**(19): p. 2131-2.
28. Grijalva, C.G., et al., *Initiation of rheumatoid arthritis treatments and the risk of serious infections*. *Rheumatology (Oxford)*. **49**(1): p. 82-90.
29. Gibbons, L.J. and K.L. Hyrich, *Biologic therapy for rheumatoid arthritis: clinical efficacy and predictors of response*. *BioDrugs*, 2009. **23**(2): p. 111-24.
30. Singh, J.A., et al., *Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2009(4): p. CD007848.
31. Fransen, J. and P.L. van Riel, *The Disease Activity Score and the EULAR response criteria*. *Rheum Dis Clin North Am*, 2009. **35**(4): p. 745-57, vii-viii.
32. Hart, B.A. and H.G. Otten, *Prospects of immunotherapy for rheumatoid arthritis*. *Pharm World Sci*, 1995. **17**(6): p. 178-85.
33. Brennan, F. and A. Foey, *Cytokine regulation in RA synovial tissue: role of T cell/macrophage contact-dependent interactions*. *Arthritis Res*, 2002. **4 Suppl 3**: p. S177-82.
34. Burger, D., *Cell contact-mediated signaling of monocytes by stimulated T cells: a major pathway for cytokine induction*. *Eur Cytokine Netw*, 2000. **11**(3): p. 346-53.
35. Brett, S., et al., *Repopulation of blood lymphocyte sub-populations in rheumatoid arthritis patients treated with the depleting humanized monoclonal antibody, CAMPATH-1H*. *Immunology*, 1996. **88**(1): p. 13-9.

36. Neidhart, M., et al., *Flow cytometric characterisation of the "false naive" (CD45RA+, CD45RO-, CD29 bright+) peripheral blood T-lymphocytes in health and in rheumatoid arthritis*. *Rheumatol Int*, 1996. **16**(2): p. 77-87.
37. Arend, W.P., *The innate immune system in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(10): p. 2224-34.
38. Burger, D. and J.M. Dayer, *The role of human T-lymphocyte-monocyte contact in inflammation and tissue destruction*. *Arthritis Res*, 2002. **4 Suppl 3**: p. S169-76.
39. Monaco, C., et al., *T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases*. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2004. **3**(1): p. 35-42.
40. Strober, S. and J. Holoshitz, *Mechanisms of immune injury in rheumatoid arthritis: evidence for the involvement of T cells and heat-shock protein*. *Immunol Rev*, 1990. **118**: p. 233-55.
41. Chen, L.N., et al., *[The changes of CD4(+) CD25(high) regulatory T cells in the course of rheumatoid arthritis and their significances]*. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2007. **23**(4): p. 331-4.
42. Scanu, A., et al., *[Synoviocyte cultures from synovial fluid]*. *Reumatismo*, 2007. **59**(1): p. 66-70.
43. Steiner, G., *Auto-antibodies and autoreactive T-cells in rheumatoid arthritis: pathogenetic players and diagnostic tools*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2007. **32**(1): p. 23-36.
44. Burrage, P.S., K.S. Mix, and C.E. Brinckerhoff, *Matrix metalloproteinases: role in arthritis*. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 529-43.
45. Xue, C.S., Y. Dong, and M.X. Yu, *[The abnormalities of the cellular immunity in rheumatoid synovium]*. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 1994. **33**(9): p. 601-4.
46. Scott, D.L., *Prognostic factors in early rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2000. **39 Suppl 1**: p. 24-9.
47. Vittecoq, O., et al., *Rheumatoid factor is the strongest predictor of radiological progression of rheumatoid arthritis in a three-year prospective*

- study in community-recruited patients. Rheumatology (Oxford), 2003. 42(8): p. 939-46.*
48. Weyand, C.M. and J.J. Goronzy, *Pathogenesis of rheumatoid arthritis. Med Clin North Am, 1997. 81(1): p. 29-55.*
 49. Cheema, G.S., et al., *Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. Arthritis Rheum, 2001. 44(6): p. 1313-9.*
 50. Ermel, R.W., et al., *Molecular analysis of rheumatoid factors derived from rheumatoid synovium suggests an antigen-driven response in inflamed joints. Arthritis Rheum, 1993. 36(3): p. 380-8.*
 51. Magalhaes, R., et al., *Morphological and molecular pathology of the B cell response in synovitis of rheumatoid arthritis. Virchows Arch, 2002. 441(5): p. 415-27.*
 52. Martinez-Gamboa, L., et al., *Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: rationale of B cell-directed therapy. Autoimmun Rev, 2006. 5(7): p. 437-42.*
 53. Takayanagi, H., et al., *Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. J Clin Invest, 1999. 104(2): p. 137-46.*
 54. Vaishnav, A.K., J.D. McNally, and K.B. Elkon, *Apoptosis in the rheumatic diseases. Arthritis Rheum, 1997. 40(11): p. 1917-27.*
 55. Fisher, G.H., et al., *Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. Cell, 1995. 81(6): p. 935-46.*
 56. Ju, S.T., et al., *Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. Nature, 1995. 373(6513): p. 444-8.*
 57. Ettinger, R., et al., *Fas ligand-mediated cytotoxicity is directly responsible for apoptosis of normal CD4+ T cells responding to a bacterial superantigen. J Immunol, 1995. 154(9): p. 4302-8.*
 58. Dhein, J., et al., *Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). Nature, 1995. 373(6513): p. 438-41.*

59. Brunner, T., et al., *Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas*. *Nature*, 1995. **373**(6513): p. 441-4.
60. Chernajovsky, Y., et al., *Gene therapy for rheumatoid arthritis. Theoretical considerations*. *Drugs Aging*, 1998. **12**(1): p. 29-41.
61. Jorgensen, C. and S. Gay, *Gene therapy in osteoarticular diseases: where are we?* *Immunol Today*, 1998. **19**(9): p. 387-91.
62. Chernajovsky, Y., et al., *Immunotherapy of auto-immune diseases by gene transfer*. *Biochem Soc Trans*, 1999. **27**(6): p. 869-73.
63. Mageed, R.A., et al., *Prevention of collagen-induced arthritis by gene delivery of soluble p75 tumour necrosis factor receptor*. *Gene Ther*, 1998. **5**(12): p. 1584-92.
64. Yang, J., et al., *Genetic redox preconditioning differentially modulates AP-1 and NF kappa B responses following cardiac ischemia/reperfusion injury and protects against necrosis and apoptosis*. *Mol Ther*, 2003. **7**(3): p. 341-53.
65. Younes, A. and M.E. Kadin, *Emerging applications of the tumor necrosis factor family of ligands and receptors in cancer therapy*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(18): p. 3526-34.
66. Pan, G., et al., *An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL*. *Science*, 1997. **277**(5327): p. 815-8.
67. Sheridan, J.P., et al., *Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors*. *Science*, 1997. **277**(5327): p. 818-21.
68. Degli-Esposti, M.A., et al., *The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain*. *Immunity*, 1997. **7**(6): p. 813-20.
69. Schneider, P., et al., *TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB*. *Immunity*, 1997. **7**(6): p. 831-6.
70. Chaudhary, P.M., et al., *Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway*. *Immunity*, 1997. **7**(6): p. 821-30.

71. Bernard, D., et al., *Rel/NF-kappaB transcription factors protect against tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by up-regulating the TRAIL decoy receptor DcR1*. J Biol Chem, 2001. **276**(29): p. 27322-8.
72. Ravi, R., et al., *Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 409-16.
73. Hatano, E. and D.A. Brenner, *Akt protects mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis through NK-kappa B activation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(6): p. G1357-68.
74. Mitsiades, N., et al., *Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4525-30.
75. Irmeler, M., et al., *Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 190-5.
76. Griffith, T.S., et al., *Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 2833-40.
77. Kreuz, S., et al., *NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 3964-73.
78. Perlman, H., et al., *Rheumatoid arthritis synovial macrophages express the Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-inhibitory protein and are refractory to Fas-mediated apoptosis*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(1): p. 21-30.
79. Perlman, H., et al., *Rheumatoid arthritis synovial fluid macrophages express decreased tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand R2 and increased decoy receptor tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand R3*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(11): p. 3096-101.
80. Terzioglu, E., et al., *Concurrent gene therapy strategies effectively destroy synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(5): p. 783-9.
81. Griffith, T.S., et al., *Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL*. J Exp Med, 1999. **189**(8): p. 1343-54.

82. Renshaw, S.A., et al., *Acceleration of human neutrophil apoptosis by TRAIL*. J Immunol, 2003. **170**(2): p. 1027-33.
83. Daigle, I. and H.U. Simon, *Alternative functions for TRAIL receptors in eosinophils and neutrophils*. Swiss Med Wkly, 2001. **131**(17-18): p. 231-7.
84. Hasegawa, H., et al., *Restricted expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 4 in human peripheral blood lymphocytes*. Cell Immunol, 2004. **231**(1-2): p. 1-7.
85. Chen, G.Y., et al., *Association between TRAIL expression on peripheral blood lymphocytes and liver damage in chronic hepatitis B*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(26): p. 4090-3.
86. Oligino, T., et al., *Intra-articular delivery of a herpes simplex virus IL-1Ra gene vector reduces inflammation in a rabbit model of arthritis*. Gene Ther, 1999. **6**(10): p. 1713-20.
87. Nita, I., et al., *Direct gene delivery to synovium. An evaluation of potential vectors in vitro and in vivo*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(5): p. 820-8.
88. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis*. Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
89. Abe, K., et al., *The complexity of TNF-related apoptosis-inducing ligand*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **926**: p. 52-63.
90. Sheikh, M.S. and A.J. Fornace, Jr., *Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis*. Leukemia, 2000. **14**(8): p. 1509-13.
91. Meng, R.D., et al., *The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis*. Mol Ther, 2000. **1**(2): p. 130-44.
92. Song, K., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression*. J Exp Med, 2000. **191**(7): p. 1095-104.
93. Lamhamedi-Cherradi, S.E., et al., *Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 255-60.

94. Kayagaki, N., et al., *Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs*. J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1451-60.
95. Kayagaki, N., et al., *Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2639-47.
96. Akdis, C.A., et al., *Immune regulation in atopic dermatitis*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(6): p. 641-6.
97. Akdis, C.A., *New insights into mechanisms of immunoregulation in 2007*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(4): p. 700-9.
98. Shedlock, D.J. and H. Shen, *Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory*. Science, 2003. **300**(5617): p. 337-9.
99. Griffith, T.S., et al., *Apoptotic cells induce tolerance by generating helpless CD8+ T cells that produce TRAIL*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2679-87.
100. Janssen, E.M., et al., *CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death*. Nature, 2005. **434**(7029): p. 88-93.
101. Lub-de Hooge, M.N., et al., *Soluble TRAIL concentrations are raised in patients with systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(6): p. 854-8.
102. Rus, V., et al., *Increased expression and release of functional tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) by T cells from lupus patients with active disease*. Clin Immunol, 2005. **117**(1): p. 48-56.
103. White, S. and A. Rosen, *Apoptosis in systemic lupus erythematosus*. Curr Opin Rheumatol, 2003. **15**(5): p. 557-62.
104. Hofbauer, L.C., et al., *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and osteoprotegerin serum levels in psoriatic arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(10): p. 1218-22.
105. Sanlioglu, A.D., et al., *Differential expression of TRAIL and its receptors in benign and malignant prostate tissues*. J Urol, 2007. **177**(1): p. 359-64.

106. Aydin, C., et al., *Decoy receptor-2 small interfering RNA (siRNA) strategy employing three different siRNA constructs in combination defeats adenovirus-transferred tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in lung cancer cells*. Hum Gene Ther, 2007. **18**(1): p. 39-50.
107. Sanlioglu, A.D., et al., *TRAIL death receptor-4 expression positively correlates with the tumor grade in breast cancer patients with invasive ductal carcinoma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. **69**(3): p. 716-23.
108. Tsokos, G.C., Tsokos, M., *The TRAIL to arthritis*. J Clin Invest. 2003;112(9):1315-7.
109. Yao, Q., Wang S., Gambotto A., et al., *Intra-articular adenoviral-mediated gene transfer of trail induces apoptosis of arthritic rabbit synovium*. Gene Ther. 2003;10(12):1055-60.
110. Liu, Z., Xu, X., Hsu H.C., et al., *CII-DC-AdTRAIL cell gene therapy inhibits infiltration of CII-reactive T cells and CII-induced arthritis*. J Clin Invest. 2003;112(9):1332-41.
111. Koksall, I.T., Sanlioglu, A.D., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-R4 decoy receptor expression is correlated with high Gleason scores, prostate-specific antigen recurrence, and decreased survival in patients with prostate carcinoma*. Urol Oncol. 2008;26(2):158-65.
112. Sanlioglu, A.D., Dirice, E., Elpek, O., 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.
113. Sanlioglu, A.D., Dirice, E., Elpek, O., et al., *High TRAIL Death Receptor 4 and Decoy Receptor 2 Expression Correlates With Significant Cell Death in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients*. Pancreas. 2009;38(2):154-60.
114. Wendling, U., Walczak, H., Dorr, J., et al., *Expression of TRAIL receptors in human autoreactive and foreign antigen-specific T cells*. Cell Death Differ. 2000;7(7):637-44.

ÖZGEÇMİŞ

Atıl BİŞGİN, 12.06.1979 tarihinde Ceylanpınar' da doğmuştur. 1996 yılında Adana Anadolu Lisesi'nden mezun olmuştur. Aynı yıl girdiği Öğrenci Seçme Sınavı ve Öğrenci Yerleştirme Sınavı' nda göstermiş olduğu başarı sonucu burslu olarak, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi'ni kazanmıştır. Tıp eğitimi sırasında içlerinde İngiltere, Almanya gibi ülkelerinde yer aldığı birçok ülkede gerek eğitimin bir parçası olarak gerekse yaz stajı kapsamında bulunmuştur. Tıp eğitimi boyunca da kurucusu olduğu Bilimsel Araştırma Kolları aracılığıyla çeşitli alanlarda gerek Ulusal gerekse Uluslararası Tıp Öğrencileri Kongresi' ni bir ilk olarak düzenlemiş ve kongre başkanlığı görevini üstlenmiştir. 2002 yılında tıp eğitimini tamamlamış, aynı yıl Adana Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Servisi' nde göreve başlamıştır. 2004 yılında zorunlu hizmetini yapmak üzere Adana Ceyhan Devlet Hastanesi Acil Servisi' ne 112 Acil Yardım Hizmeti sorumlu uzman hekimi olarak atanmıştır. 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı' nda Tıbbi Genetik doktora programına başlamış ve araştırma görevlisi olarak atanmıştır.

Doktora eğitimine başladıktan sonra 2005 yılında yapmış olduğu çalışmalarla Abbott Romatoloji Ödülü almıştır. Haziran 2006'da İstanbul' da yapılan 31. FEBS Kongresi' nde TÜBİTAK tarafından verilen kongre katılım bursuna layık görülmüştür. 2008 Nisan ayında Avrupa Sitogenetik Birliği' nden kazandığı bursla Fransa' da Klasik Sitogenetik ve Moleküler Sitogenetik Kursu' nu başarıyla tamamlamış, yapılan sınavları da geçerek Avrupa Diploması almaya hak kazanmıştır. 2009 yılına gelindiğinde doktora eğitimi boyunca yapmış olduğu çalışmaların meyvesi olarak birçok ödül almıştır. Temmuz 2009' da Çek Cumhuriyeti' nde düzenlenen 34. FEBS kongresin bir ayağı olan FEBS Young Scientist Forum' da Genç Araştırmacı Ödülü' ne ve FEBS kongresi düzenleme kurulu tarafından da destek bursuna layık görülmüştür. Biyoteknoloji alanına da göstermiş olduğu özel ilgi sayesinde Novartis BioCamp'09 Türkiye Finalisti olmuştur. Ekim 2009' a geldiğimizde de 11. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi' nde bilimsel saygınlığı yüksek olan ve sekizincisi verilen Prof. Dr. Altan GÜNALP 3.' lük ödülünü kazanmıştır.

EKLER

Concurrent gene therapy strategies effectively destroy synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis

E. Terzioglu^{1,2*}, A. Bisgin^{1,3*}, A. D. Sanlioglu^{1,3}, M. Ulker¹, V. Yazisiz^{1,2}, S. Tuzuner^{1,4} and S. Sanlioglu^{1,3}

Objectives. Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by the chronic inflammation of the synovial joints resulting from the hyperplasia of synovial cells and the infiltration of lymphocytes, macrophages and plasma cells. Currently, the aetiology of RA is not known, and new treatment modalities are needed to prevent the disease progression. Apoptosis induction of synovial cells through the use of death ligands has been explored as a treatment modality for RA. Thus, the primary objective of this study was the testing of the efficacy of adenovirus delivery of human TRAIL (Ad5hTRAIL) for the treatment of patients with RA.

Methods. Primary synovial cell cultures were established from eight patients with RA. Adenovirus permissiveness of synovial cells was determined by the infection of synoviocytes with adenovirus vector encoding green fluorescent protein (AdEGFP). TRAIL sensitivity of synoviocytes was assessed through the infection with Ad5hTRAIL vector using Live/Death Cellular Viability/Toxicity kit from Molecular Probe. TRAIL receptor profiles of synoviocytes were revealed by real-time RT-PCR assays followed by flow cytometric analyses.

Results. While the presence of TRAIL death receptors were necessary for the induction of cell death, high levels of TRAIL-R4 decoy receptor expression on surface were correlated with TRAIL resistance. A DcR2 siRNA approach in combination with Ad5hTRAIL infection eliminated apoptosis-resistant RA synovial fibroblasts.

Conclusion. Because a DcR2 siRNA approach in combination with Ad5hTRAIL infection exterminated RA synoviocytes to a greater extent than Ad5hTRAIL alone, the modulation of TRAIL receptor expression might be a new gene therapy strategy to sensitize RA synoviocytes to TRAIL.

KEY WORDS: Rheumatoid arthritis, Adenovirus, TRAIL, siRNA.

Rheumatoid arthritis (RA) is a disease in which synovial cells are phenotypically transformed to proliferate abnormally invading both bone and cartilage [1]. In RA, apoptosis-resistant synovial cells provoke tissue degradation through the production of elevated levels of pro-inflammatory cytokines and metalloproteinases [2]. Therefore, abnormal synoviocyte proliferation and lymphocyte–macrophage activation are the two major pathogenic hallmarks of RA [3]. Several strategies including gene therapy were explored for the treatment of RA in order to overcome current drug delivery problems to articular tissues [4]. With this perspective, prospected goals were to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines [1] and matrix degrading enzymes [5] to prevent the activation of specific signal transduction pathways such as NF- κ B [6] and finally to promote apoptosis in synoviocytes and immune cells [7].

Induction of apoptosis is a common property of death ligands, which belong to tumour necrosis factor (TNF) family. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) is a type II membrane protein of the TNF super family [8]. Five different receptors were identified to interact with TRAIL and these are TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) and osteopontin [9, 10]. While the existence of multiple TRAIL receptors indicates that TRAIL is involved in multiple processes in the cell, the precise role of TRAIL in health and disease is unclear at this moment [11]. While TRAIL-R1 and TRAIL-R2 function as authentic death receptors inducing

apoptosis, TRAIL-R3 and TRAIL-R4 are unable to induce such signalling but can serve as decoy receptors [12]. Compared with the other members of TNF family such as FasL and TNF, TRAIL has some distinct apoptosis-inducing properties. For example, unlike TNF- α , which initiated and exacerbated autoimmune diseases, TRAIL was reported to down-regulate immune responses. This was demonstrated in TRAIL null mice, which were more susceptible to collagen-induced arthritis (CIA) due to the failure to properly silence activated T cells [13].

Even though, TRAIL and TRAIL receptors are expressed constitutively in various tissues, TRAIL does not induce apoptosis of most non-transformed cells [11, 14, 15]. Even today, no single mechanism is thought to be responsible for the TRAIL resistance in normal cells. There are at least two different hypotheses claimed for TRAIL resistance. The first hypothesis supports that normal cells carry decoy receptors (TRAIL-R3, TRAIL-R4), which compete with apoptosis-inducing TRAIL receptors (TRAIL-R1, TRAIL-R2) for binding to TRAIL [14, 15]. Here it is thought that decoy receptors either serve to dilute out TRAIL ligands (like TRAIL-R3) or provide anti-apoptotic signals (like TRAIL-R4) to cells. For instance, TRAIL-R4 binding activated anti-apoptotic NF- κ B signalling pathway, which led to the obstruction of TRAIL-mediated apoptosis [16]. More interestingly, activation of death receptors such as TRAIL-R1 and TRAIL-R2 also activated NF- κ B pathway [17, 18]. Under these circumstances, how cells undergo apoptosis despite the induction of both apoptotic and anti-apoptotic pathways is not known. The second hypothesis proposes the presence of apoptosis inhibitory substances. Such a molecule, cFLIP (FLICE inhibitory protein), a caspase 8 homologue, was shown to obstruct death ligand-induced apoptosis before [19, 20]. Despite these hypotheses, no clear evidence to account for TRAIL resistance has been asserted yet.

As gene delivery vehicles, vectors derived from retrovirus [21], adenovirus [2] and herpes simplex virus [22] as well as cationic liposomes and naked plasmid DNA were all tested to deliver

¹Human Gene Therapy Unit, ²Department of Rheumatology—Allergy and Immunology, ³Department of Medical Biology and Genetics and ⁴Department of Orthopedic Surgery, Akdeniz University Faculty of Medicine, Antalya 07070, Turkey.

Submitted 16 October 2006; revised version accepted 16 October 2006.

Correspondence to: S. Sanlioglu, Director of the Human Gene Therapy Unit, Akdeniz University, Faculty of Medicine, B-Block, 1st floor, Campus, Antalya 07070, Turkey. E-mail: sanlioglu@akdeniz.edu.tr

*The first two authors E.T. and A.B. contributed equally to this article.

therapeutic genes into the synovial lining of rabbit joints. Among the ones tested, adenovirus was found to be the most effective gene delivery vehicle [23]. Thus, in this study, adenovirus was chosen as gene delivery vector to transfer hTRAIL (Ad5hTRAIL) into synovial cells as a treatment modality for patients with RA. Furthermore, TRAIL receptor compositions of synoviocytes established from RA patients were analysed using real-time RT-PCR assays and flow cytometric analyses. DcR2 siRNA strategy was employed in order to alter the TRAIL receptor composition of RA synoviocytes. A putative connection between TRAIL sensitivity and TRAIL receptor profiles of RA synoviocytes was explored in this study.

Patients and methods

Synovial cell isolation and culturing from patients with RA

Synoviocyte cultures were established from eight patients diagnosed with RA based on the American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of RA [24]. RA synovial tissues were obtained at the time of knee/hip arthroplasty or arthroscopy in the Department of Orthopedic Surgery of Akdeniz University. The disease activity scores in 28 joints (DAS28) of eight patients were in the range of 3.8–6.5 (average 4.6). This study was approved by the Akdeniz University Hospital Committee on Ethics. In addition, patients' written consents based on Helsinki Declaration were obtained prior to the operation. Single-cell suspensions were prepared from the isolated human synovial tissues digested with 0.2% collagenase P as described earlier [25, 26].

Amplification of the first generation recombinant adenovirus vectors to deliver transgenes into RA synoviocytes

First generation recombinant adenovirus vectors used in the infections such as Ad5hTRAIL [27], AdEGFP [28] and AdCMVLacZ [29] were amplified as described previously [30]. Adenoviral vectors were stored at -80°C in 10 mM Tris containing 20% glycerol following CsCl banding and vector purification. The Ad5hTRAIL construct was used to overexpress hTRAIL in RA synoviocytes. Adenovirus vectors expressing β -galactosidase gene (AdCMVLacZ) was used as a negative control in the assays. The particle titres of adenoviral stocks, which were in the range of 10^{13} DNA particles/ml for each prep were determined by A260 measurements. Plaque titration on 293 cells and expression assays for encoded proteins were performed to obtain functional titres. In our purifications, the particle/plaque forming unit ratio was generally equal to 50.

The efficacy of adenovirus transduction of human synoviocytes

Briefly, synovial cells were incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 2.2 g/l sodium bicarbonate, 1 mM L-glutamine and 1% penicillin–streptomycin–amphotericin mixture (PSA) in Thermo SteriCult incubators. Adenovirus vectors expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) reporter gene (AdEGFP) were infected into synoviocytes at an increasing multiplicity of infection (MOI) and synoviocytes were incubated at 37°C in RPMI 1640 without FBS for 2 h. After that, an equal volume of RPMI 1640 supplemented with 20% FBS was added to increase the serum concentration in the media to 10%. The percentage of EGFP (+) cells was assessed under a fluorescent microscopy and subsequently by flow cytometry 48 h after the infection. Cell viability was monitored using propidium iodide exclusion technique.

Live/dead cellular viability and toxicity assays

Live/Dead Cellular Viability/Cytotoxicity Kit from Molecular Probes (Eugene, OR, USA) was used to discriminate live cells from dead cells. Calcein AM and ethidium homodimer-1 (EthD-1) are the two molecular reporters in the kit. The intracellular calcein esterase activity was assessed using calcein AM, a fluorogenic substrate. In this assay, active esterases present only in live cells with intact membranes, convert Calcein AM to a green fluorescent compound (calcein), which serves as a marker for viable cells. On the other hand, EthD-1 is a red fluorescent nucleic acid stain only taken up by cells with damaged membrane. Here unharmed cells with intact membranes do not allow EthD-1 to enter inside the cell; therefore, live cells do not get stained with EthD-1. However, harmed cells with damaged membrane up-take the dye and stain positive. Cellular viability assays were conducted 35 h following the infections.

Quantitative real-time RT-PCR assays for synovial cells established from RA patients

SDS 7500 ABI Prism instrument was used to perform relative quantities of TRAIL receptor mRNAs. Total RNA was extracted from RA synoviocytes using TRIzol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). A $2\mu\text{g}$ of total RNA was included in each reverse transcription reaction using TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems Cat. N8080234). Primer and probe sequences of TRAIL death receptors [31] and TRAIL decoy receptors [32, 33] used for the real-time RT-PCR assays were recently reported. In addition, ribosomal RNA (rRNA) primers and probes, which serve as an internal control in the same reaction, were acquired from PE Applied Biosystems (Cat. 4308329). $\Delta\Delta\text{Ct}$ method is employed to obtain the relative quantities of TRAIL receptors. The TaqMan PCR assays were performed as suggested by the manufacturer (Applied Biosystems Cat. N8080228). Reverse transcription step included a $50\mu\text{l}$ reaction mixture prepared in reverse transcription buffer with 2.25 mM MgCl_2 , 50 μM from each dNTP, 2.5 μM Random Hexamer, 0.6 U/ μl RNase inhibitor and 1.25 U/ μl reverse transcriptase. The thermal cycling conditions for the reverse transcription reactions were 10 min at 25°C , followed by 60 min at 48°C . TaqMan PCR assay was executed using TaqMan Universal Master Mix with 50 pmol of primer and probe mixture and 250 ng of cDNA. For the real-time RT-PCR step; the thermal cycling conditions are as follows: 2 min at 50°C , 10 min at 95°C , followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C . Here each reaction produced a specific threshold cycle (Ct). Then, ΔCt values were estimated for each receptor by taking the difference between the Ct values of the TRAIL receptors and that of rRNA internal controls. Moreover, a standard curve was generated using serial dilutions of rRNA. The comparative $\Delta\Delta\text{Ct}$ calculation was computed then by finding the difference between each receptor's ΔCt value and that of 25 pg of rRNA. Final relative expression levels were computed by the formula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Thus, relative expression levels of TRAIL receptors were normalized to that of 25 pg of rRNA.

Flow cytometric analyses of TRAIL receptor protein expression profiles in RA synoviocytes

Anti-TRAIL receptor flow cytometry kit (Cat. ALX-850-273-KI01) was used to detect the surface TRAIL receptor expression profiles of synoviocytes. 100 μg of MAb to TRAIL-R1 (clone HS101, Cat. 804-297A), TRAIL-R2 (clone HS201, Cat.804-298A), TRAIL-R3 (clone HS301, Cat. 804-344A) and TRAIL-R4 (clone HS402, Cat. 804-299A) were included in each kit. Primary antibodies were used at 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration. Since the secondary antibody was the biotinylated goat anti-mouse IgG1 (Cat. ALX-211-202), the streptavidin-PE conjugate

(Cat. ANC-253-050) was added before the flow cytometric analysis. All the flow assays were performed in duplicates and repeated at least twice to confirm the observation ($n=4$). Newly acquired Beckman Coulter EPICS ALTRA (HyPerSort™) instrument of the Human Gene Therapy Unit of Akdeniz University Hospitals was used to perform the flow cytometric analyses. The marker distribution (immune staining) based on flow cytometric quantification of TRAIL and its receptors was analysed similar to the one described recently [11]. The marker distribution was scored as 0 (–, negative), <10%; 1 (+, weak), between 10% and 40%; 2 (++, moderate), between 40% and 70% and 3 (+++, strong), >70% of the synoviocytes stained. Surface TRAIL expression was analysed using a monoclonal antibody to TRAIL (human) (ALX-804-296-C100) followed by a polyclonal antibody to mouse IgG1 (R-PE) (ALX-211-201-CO50).

Down-regulation of TRAIL-R4 expression by a DcR2 siRNA approach

A DcR2 siRNA kit (sc-35185), siRNA transfection medium (sc-36868) and siRNA transfection reagent (sc-29528) were used to perform DcR2 siRNA experiments as described by the manufacturer (Santa Cruz Biotechnology). Gene Bank Access Number: NM_003840. A fluorescein conjugated control siRNA (sc-36869) was used to determine the transfection efficiency under the fluorescent microscope prior to analysis. More than 97% of the cells were transfected by this procedure. As a negative control, control siRNA-A (sc-37007) containing scrambled sequences which did not lead to the specific degradation of any cellular RNA was used in siRNA experiments. Transfections were performed 35 h prior to the infections. The efficacy of the siRNA approach was measured 30 h after the transfection using real-time RT-PCR assay and flow cytometry.

Results

Adenovirus transduction of RA synovial cells

Recombinant adenovirus vectors carrying AdEGFP were infected into synovial cells established from patients with RA. The percentage of GFP (+) cells was determined 48 h after the infection by both fluorescent microscopy (Fig. 1A) and flow cytometry (Fig. 1B). Flow cytometric analyses of synoviocytes isolated from eight patients suggested that >90% of the cells (± 7) were transduced at an MOI of 5000 DNA particles/cell of AdEGFP vectors. Almost all synoviocytes were GFP-positive ($97 \pm 2\%$) when the MOI of AdEGFP virus was increased to the MOI of 10 000 DNA particles/cell as shown in Fig. 1, Panel B. Since no patient's synoviocytes exhibited resistance to adenovirus infection, it was concluded that synoviocytes isolated from RA patients were readily transducible by recombinant adenovirus vectors.

TRAIL receptor compositions of RA synovial cells

In order to reveal TRAIL receptor profiles in patients with RA; real-time RT-PCR assays and flow cytometric analyses (Table 1) were employed. TRAIL-R1 death receptor mRNA expression was detectable in the synoviocytes of six out of eight RA patients, but only two of these synovial cultures displayed TRAIL-R1 death receptor protein expression on the surface. On the other hand, TRAIL-R2 death receptor mRNA expression was noticeable in all RA patients' synoviocytes and all synoviocytes displayed TRAIL-R2 death receptor protein to varying degrees on their cell surface. Furthermore, while TRAIL-R3 decoy receptor mRNA expression was evident in all patients to some degrees, low levels of TRAIL-R3 surface protein expression were measurable only in two out of eight patients. RA synoviocytes isolated from three out of eight

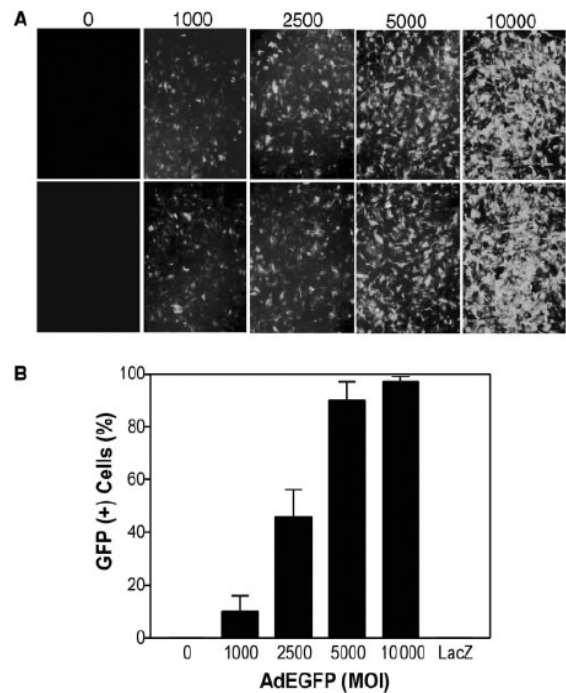


Fig. 1. Adenovirus transduction of RA synoviocytes. Panel A indicates fluorescent micrographs of RA synoviocytes infected with various MOIs of AdEGFP vectors. MOI values used in the infection are provided above each panel. Fluorescent micrograph images are provided in duplicates from only one patient out of eight. Quantitative results of the flow cytometric analyses of eight patients are given in Panel B. Values represent the mean (\pm s.e.m.) of 32 independent data points ($n=32$). The percentage GFP (+) cells is illustrated on y-axis. Viral doses applied as MOI values in DNA particles/cell are shown below x-axis. AdCMVLacZ infections are carried out at an MOI of 10 000 DNA particles/cell.

RA patients showed evidence of an expression of TRAIL-R4 decoy mRNA in the cell and these cells were also positive for TRAIL-R4 protein expression on the cell surface. As strong TRAIL-R2 death receptor mRNA expression was correlated with the prominent protein expression on the surface of RA synoviocytes in some patients, even low TRAIL-R2 mRNA expression inside the cell still generated detectable levels of the surface protein expression in other patients. Similarly, as shown in Figs 4 and 5, strong TRAIL-R4 decoy receptor mRNA expression inside the cell was linked to high levels of surface TRAIL-R4 decoy receptor expression. While synoviocytes of three out of eight patients exhibited all four TRAIL receptors on mRNA levels (Figs 3–5), synoviocytes isolated from none of these RA patients demonstrated both the death and the decoy receptors as a complete set on the surface.

TRAIL sensitivity profiles of RA synoviocytes

Molecular Probes Live/Dead Cellular Viability/Toxicity kit was used to determine the cellular viability of RA synoviocytes following the infection with Ad5hTRAIL vector. Those synovial cells with strong death receptor expression especially TRAIL-R2 on the surface either without the decoy receptor expression (Fig. 2) or low levels of TRAIL-R4 decoy receptor expression (Fig. 3), showed the highest degree of TRAIL sensitivity upon infection. One patient displayed very low levels of TRAIL-R2 death receptor on the surface which were resistant to the cytotoxic effects of Ad5hTRAIL. But in this case, TRAIL resistance can be attributed to the insufficient amounts of death receptor expression on the cell surface but not to the presence of decoy receptors.

TABLE 1. TRAIL receptor expression profile of synoviocytes isolated from patients with RA.

Patient number	TRAIL receptor			
	TR1	TR2	TR3	TR4
1	-	+++	-	-
2	++	+++	-	-
3	+	+++	-	-
4	-	+	-	-
5	-	++	+	-
6	-	+	++	+++
7	-	+++	-	+++
8	-	+++	-	+

Flow cytometric analysis and quantifications were performed as described in 'Patients and methods' section. Numbers on the left refer to the patient number (1-8). TRAIL receptor subtype (TR1-TR4) is given at the top of each column.

The patient who displayed low levels of both TRAIL-R2 death receptor and TRAIL-R3 decoy receptor expression on synoviocytes were still partly sensitive to Ad5hTRAIL infection. In this case TRAIL-R2 expression was slightly higher than TRAIL-R3 despite the fact that both were low. This suggested that low levels of TRAIL-R3 did not protect cells from TRAIL cytotoxicity. However, the TRAIL resistance was restored in synoviocytes with elevated TRAIL-R4 decoy receptor expression (but low levels of TRAIL-R2 death receptor expression) on surface (Fig. 4). Interestingly, a DcR2 siRNA approach employed for the patient displayed on Fig. 5, lowered TRAIL-R4 decoy receptor expression on the surface (Fig. 6, Panel A, label 4 to the left) and this sensitized RA synoviocytes to Ad5hTRAIL as shown in Fig. 6, Panel B. RA synoviocytes of this particular patient exhibited $82 \pm 6\%$ decrease in surface TRAIL-R4 expression and $89 \pm 5\%$ reduction in TRAIL-R4 transcripts following DcR2 siRNA approach as demonstrated by flow cytometry and real-time RT-PCR assays, respectively. By deploying the DcR2 siRNA approach, TRAIL resistance of synovial cells was reduced from $73 \pm 5\%$ to $20 \pm 6\%$. Neither a reduction in TRAIL-R4 expression (Fig. 6, Panel A, label 4 to the right) nor a sensitization was noticeable when siRNA-A was used in the transfection instead of DcR2 siRNA.

Discussion

Neither TRAIL receptor expression profiles nor the mechanism of TRAIL resistance in RA synoviocytes are clearly known yet. In one recent study, the lack of TRAIL receptor gene expression was blamed for the failure to induce TRAIL-mediated apoptosis on cultured RA synovial fibroblasts [34]. In another study, the presence of high levels of TRAIL-R2 death receptor expression was reported in synovial fibroblasts of RA patients using flow cytometry [35]. As the presence of all four TRAIL receptors in synovial fibroblasts were also confirmed by western blotting, increased AKT activity was pointed out as an inhibitor of TRAIL-mediated cytotoxicity [36]. Although both the intra-articular adenovirus delivery of TRAIL and/or recombinant TRAIL administration induced apoptosis and reduced inflammation in a rabbit model of arthritis [37, 38], TRAIL was reported to cause cell death only in a small fraction of RA synovial fibroblasts (30%); conversely, the remaining apoptosis resistant synoviocytes were stimulated to proliferate by TRAIL [39]. Thus, TRAIL resistance manifested by synovial cells remains as a major challenge for any adenovirus-mediated TRAIL gene therapy approach. Nevertheless, a histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, was reported to sensitize RA synoviocytes to TRAIL [40]. Therefore, in terms of the mechanisms, both the TRAIL sensitivity status and the TRAIL receptor composition of RA synoviocytes deserve an extensive investigation.

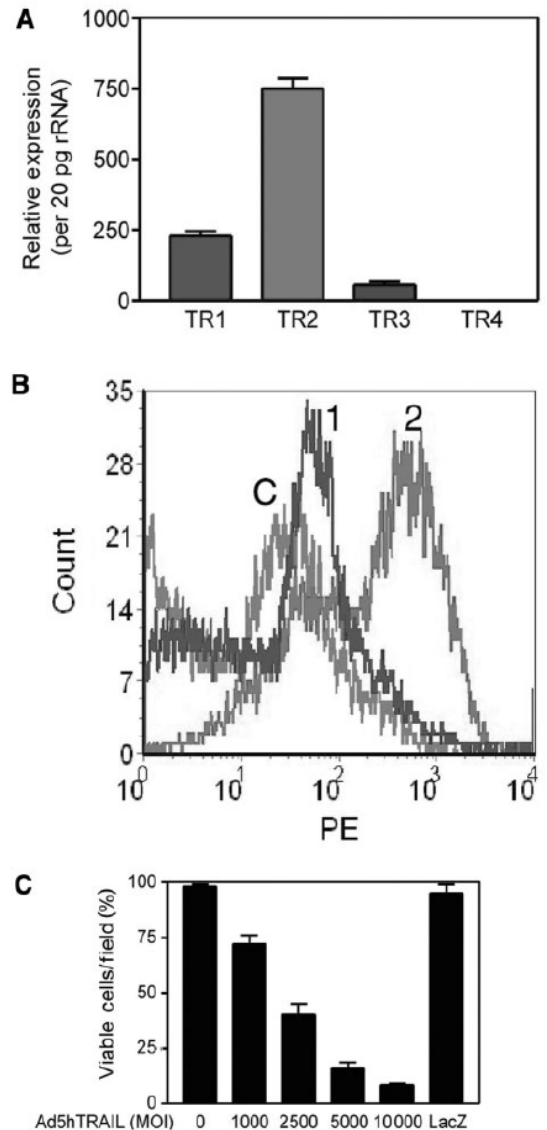


Fig. 2. Death receptor gene expression on surface is the main modulator of TRAIL sensitivity. While intracellular mRNA composition of TRAIL receptors is given in Panel A, extra-cellular protein composition is provided in Panel B. As shown in Panel B, C represents isotype control staining and the number above the each peak displays particular TRAIL receptor. Each histogram represents 10^4 gated cells. Cell survival analysis following infection with Ad5hTRAIL is provided in Panel C. AdCMVLacZ infections (LacZ) are performed at an MOI of 10 000 DNA particles/cell. Values represent the mean (\pm s.e.m.) of six independent data points. These data (Panels A-C) belong to one patient only.

For this purpose, real-time RT-PCR and conventional flow cytometric analyses were employed in order to determine TRAIL receptor profiles of patients with RA. There were mainly two purposes for performing these two assays in order. First, mRNA levels do not necessarily correlate with the protein expression on the cell surface, which is a more relevant issue for TRAIL sensitivity. Second, an mRNA for a gene might still be expressed in the cell even if the protein expression is undetectable on the cell surface using flow cytometry. For example, while all TRAIL receptors are expressed inside the cell displayed for the patients depicted in Figs 3-5, surface TRAIL receptor expression is present

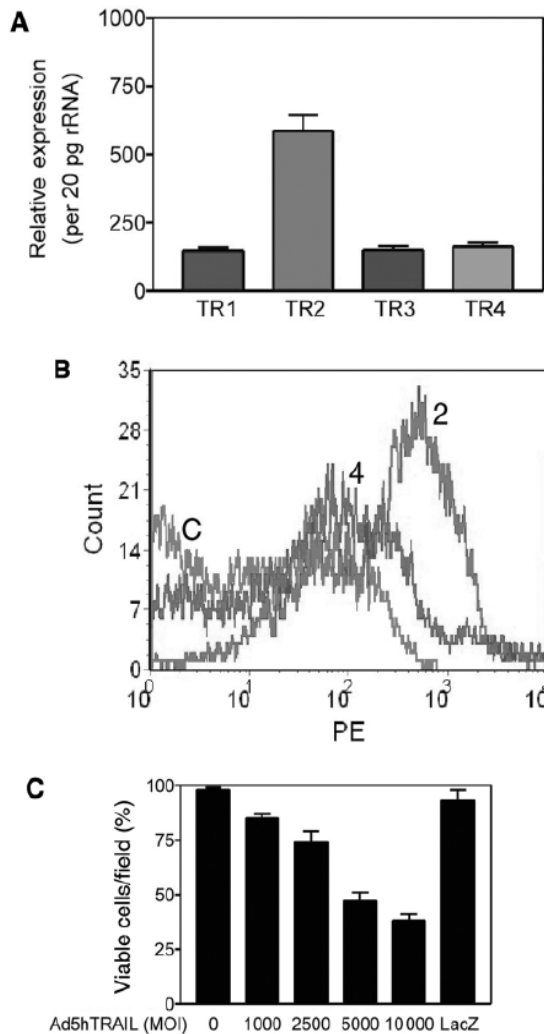


FIG. 3. Low levels of TRAIL-R4 expression on the surface cannot protect cells from TRAIL induced cell death. While real-time RT-PCR analysis is given in Panel A, Panel B shows a flow cytometric assessment of synovial cells. Isotype staining is shown as C, numbers above the each peak indicate each TRAIL receptor subtype in Panel B. 10^4 cells are gated for each histogram. The assay is repeated twice to confirm the observation. Ad5hTRAIL infection results in cell death of synovial cells (Panel C). As a control, an adenovirus expressing β -galactosidase gene (AdCMVLacZ) is infected at an MOI of 10 000 DNA particles/cell into synoviocytes. Data represent the mean (\pm s.e.m.) of three independent assays. Panels A–C represent a single patient only.

as a complete set (1–4) in none of these patients. Thus, our result proposes that intracellular TRAIL receptor compositions do not necessarily match to the surface TRAIL receptor expression profiles. Furthermore, Ad5hTRAIL infection mainly killed RA synoviocytes with high levels of TRAIL-R2 death receptor expression on the surface (Figs 2 and 3). The fact that synovial fluid fibroblast express functionally active TRAIL-R2 death receptor is also confirmed by a recent report [41]. On the other hand, synoviocytes with considerable levels of TRAIL-R4 decoy receptor expression (Figs 4 and 5) are resistant to TRAIL-mediated cell killing. It is intriguing to note that the level of TRAIL resistance is correlated with the amount of TRAIL-R4 decoy receptor expression on surface. This result also supports

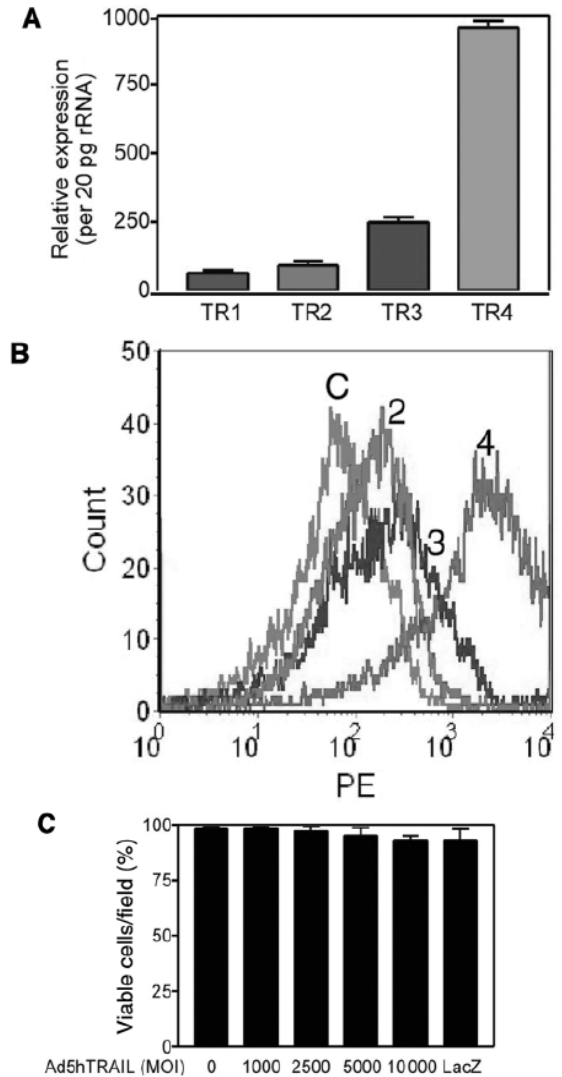


FIG. 4. Synovial cells expressing high levels of TRAIL-R4 decoy receptor is resistant to the cytotoxic effects of hTRAIL. Panel A shows an intracellular TRAIL receptor mRNA profile while Panel B indicates surface TRAIL receptor expression pattern of synovial cells. 10^4 cells are gated for the flow cytometric analyses. Live/Dead cellular viability and cytotoxicity assay is provided in Panel C. AdCMVLacZ (LacZ) infections are performed at an MOI of 10 000 DNA particles/cell. The assay is repeated three times to confirm the experimental findings. These panels (A–C) are derived from a single patient.

previous reports on surface TRAIL-R4 decoy receptor expression pattern and its connection to TRAIL resistance as demonstrated in prostate and breast cancer cells [32, 33]. A DcR2 siRNA strategy but not an siRNA-A transfection in combination with Ad5hTRAIL infection were necessary to destroy TRAIL-resistant RA synoviocytes. Intriguingly, endogenous TRAIL death ligand expression could not be detected on RA synoviocytes isolated from the patients using flow cytometry (data not shown). This is in accordance with that recently reported by Morel *et al.* [39].

Due to its antigenic properties and transient gene expression, adenovirus is the most commonly used viral vector in the clinical trials of cancer gene therapy [42]. In addition, delivering adenovirus into each cell appears to be quite easy in a laboratory

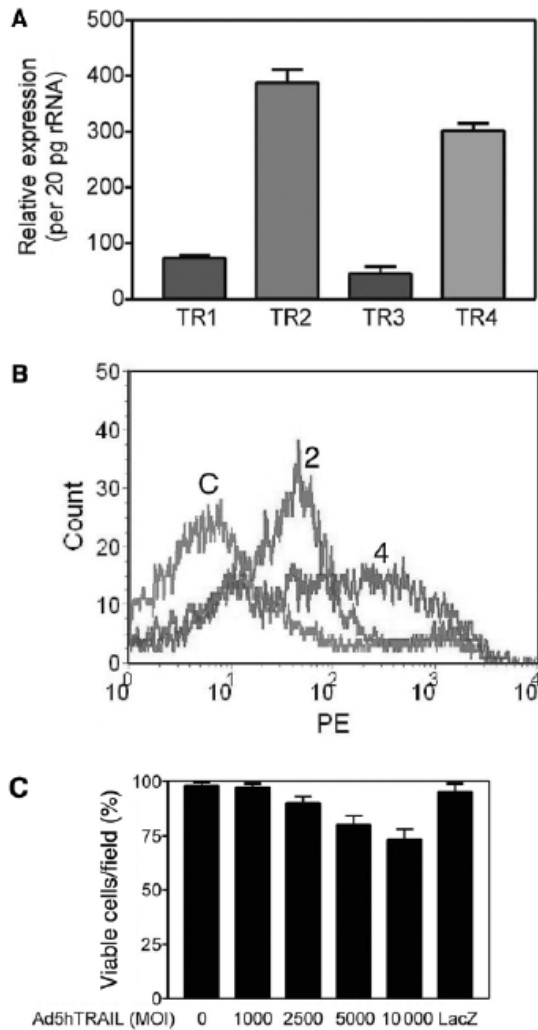


FIG. 5. High levels of TRAIL-R4 decoy receptor expression confer some degree of TRAIL resistance in synoviocytes despite the expression of TRAIL-R2 death receptor on the surface. Intracellular mRNA composition is provided in Panel A and the surface TRAIL receptor expression profile is given in Panel B. Each histogram represents 10^4 gated cells. Treatment conditions are shown above the each peak. The assay is repeated twice but only one is given for clarity. TRAIL sensitivity profile of synovial cells expressing both the decoy receptor (TRAIL-R4) and the death receptor (TRAIL-R2) on surface is given in Panel C. LacZ implies AdCMV/LacZ infections performed at an MOI of 10 000 DNA particles/cell. Only one out of the three independent assays is shown. Panels A–C are composed of data from a single patient.

setting. On the other hand, despite its high transduction properties, targeting each cell is a challenging task to accomplish under a clinical setting. Furthermore, the effect of the siRNA approach is transient. Thus, both of these concurrent gene therapy modalities have a short period of time to exert their action. If TRAIL resistant cells are not completely eliminated along the process, these cells may overtake the synovium. Then, a different serotype of adenovirus carrying hTRAIL has to be administered in combination with DcR2 siRNA due to the presence of neutralizing antibodies in the patient's sera. Since RA is characterized by the constant proliferation of synoviocytes, these cells but not the chondrocytes have to be targeted for the apoptosis inducing

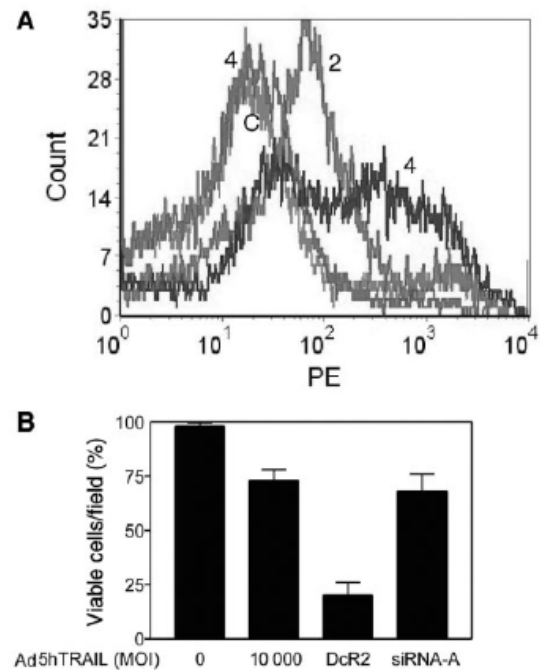


FIG. 6. Down-regulation of TRAIL-R4 expression further sensitized RA synoviocytes to Ad5hTRAIL. Panel A is a flow cytometric analysis of TRAIL receptor composition of synoviocytes following a siRNA approach. C represents isotype control staining. Numbers above the each peak represent TRAIL receptor subtype. Peak labelled as 4 (far right) received siRNA-A while the rest of the samples received DcR2 siRNA. 10^4 cells are gated for each histogram. Panel B is the cell viability assay following either DcR2 siRNA or siRNA-A approach. Both DcR2 and siRNA treated samples are also infected with an Ad5hTRAIL virus at an MOI of 10 000 DNA particles/cell. Panels A and B are composed of data from a single patient.

therapeutic approaches. In order to confirm our findings, experiments have to be performed on a larger group of patients with a wide spectrum of disease progression. In addition, while TRAIL-R2 was the predominant receptor type expressed in RA synoviocytes, other TRAIL receptors exhibited a heterogeneous expression profile for a given patient (Table 1). This might raise a concern in the efficacy of Ad5hTRAIL application as a single treatment modality since only a certain fraction of RA synoviocytes was TRAIL sensitive, and therefore TRAIL resistance cells might prevail in the long run due to cellular proliferation stimulated by the TRAIL as reported previously [39]. Although, our study demonstrated that the DcR2 siRNA approach in combination with Ad5hTRAIL delivery was effective in reducing the number of TRAIL-resistant cells, whether such an approach is useful in eliminating TRAIL resistant cells in the long term remains to be seen.

Rheumatology key messages

- Synoviocytes of RA patients express various TRAIL receptors on the surface and these surface TRAIL receptor profiles mainly influence whether RA synoviocytes are sensitive or resistant to TRAIL.
- A DcR2 siRNA approach in combination with Ad5hTRAIL infection eliminated apoptosis-resistant RA synoviocytes to a greater degree than Ad5hTRAIL alone.

Acknowledgements

We are thankful to RA patients for their enrollment in the study. This work is supported by grants from Akdeniz University Scientific Administration Division.

The authors have declared no conflicts of interest.

References

- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996;85:307–10.
- Takayanagi H, Juji T, Miyazaki T *et al*. Suppression of arthritic bone destruction by adenovirus-mediated csk gene transfer to synoviocytes and osteoclasts. *J Clin Invest* 1999;104:137–46.
- Vaishnav AK, McNally JD, Elkon KB. Apoptosis in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 1997;40:1917–27.
- Chernajovsky Y, Annenkov A, Herman C *et al*. Gene therapy for rheumatoid arthritis. Theoretical considerations. *Drugs Aging* 1998;12:29–41.
- Jorgensen C, Gay S. Gene therapy in osteoarticular diseases: where are we? *Immunol Today* 1998;19:387–91.
- Tomita T, Takeuchi E, Tomita N *et al*. Suppressed severity of collagen-induced arthritis by *in vivo* transfection of nuclear factor kappaB decoy oligodeoxynucleotides as a gene therapy. *Arthritis Rheum* 1999;42:2532–42.
- Chernajovsky Y, Gould D, Annenkov A *et al*. Immunotherapy of auto-immune diseases by gene transfer. *Biochem Soc Trans* 1999;27:869–73.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ *et al*. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673–82.
- Abe K, Kurakin A, Mohseni-Maybodi M, Kay B, Khosravi-Far R. The complexity of TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Ann N Y Acad Sci* 2000;926:52–63.
- Sheikh MS, Fornace AJ Jr. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia* 2000;14:1509–13.
- Sanlioglu AD, Koksali 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;177:359–64.
- Meng RD, McDonald ER, 3rd, Sheikh MS, Fornace AJ Jr, El-Deiry WS. The TRAIL decoy receptor TRUND (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 over-expression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis. *Mol Ther* 2000;1:130–44.
- Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng SJ, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. *Nat Immunol* 2003;4:255–60.
- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997;277:815–8.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM *et al*. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277:818–21.
- Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, Waugh JY, Smith CA, Goodwin RG. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 1997;7:813–20.
- Schneider P, Thome M, Burns K *et al*. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 1997;7:831–6.
- Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwala A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 1997;7:821–30.
- Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P *et al*. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190–5.
- Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, Lynch DH, Kubin MZ. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol* 1998;161:2833–40.
- Mageed RA, Adams G, Woodrow D, Podhajcer OL, Chernajovsky Y. Prevention of collagen-induced arthritis by gene delivery of soluble p75 tumour necrosis factor receptor. *Gene Ther* 1998;5:1584–92.
- Oligino T, Ghivizzani S, Wolfe D *et al*. Intra-articular delivery of a herpes simplex virus IL-1Ra gene vector reduces inflammation in a rabbit model of arthritis. *Gene Ther* 1999;6:1713–20.
- Nita I, Ghivizzani SC, Galea-Lauri J *et al*. Direct gene delivery to synovium. An evaluation of potential vectors *in vitro* and *in vivo*. *Arthritis Rheum* 1996;39:820–8.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA *et al*. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315–24.
- Perleman H, Bradley K, Liu H *et al*. IL-6 and matrix metalloproteinase-1 are regulated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in synovial fibroblasts. *J Immunol* 2003;170:838–45.
- Perleman H, Georganas C, Pagliari LJ, Koch AE, Haines K 3rd, Pope RM. Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *J Immunol* 2000;164:5227–35.
- Griffith TS, Anderson RD, Davidson BL, Williams RD, Ratliff TL. Adenoviral-mediated transfer of the TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand gene induces tumor cell apoptosis. *J Immunol* 2000;165:2886–94.
- Sanlioglu AD, Aydin C, Bozcuk H, Terzioğlu E, Sanlioglu S. Fundamental principals of tumour necrosis factor-alpha gene therapy approach and implications for patients with lung carcinoma. *Lung Cancer* 2004;44:199–211.
- Sanlioglu S, Engelhardt JF. Cellular redox state alters recombinant adeno-associated virus transduction through tyrosine phosphatase pathways. *Gene Ther* 1999;6:1427–37.
- Engelhardt JF, Yang Y, Stratford-Perricaudet LD *et al*. Direct gene transfer of human CFTR into human bronchial epithelia of xenografts with E1-deleted adenoviruses. *Nat Genet* 1993;4:27–34.
- Karacay B, Sanlioglu S, Griffith TS, Sandler A, Bonthius DJ. Inhibition of the NF-kappaB pathway enhances TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Gene Ther* 2004;11:681–90.
- Sanlioglu AD, Koksali IT, Karacay B, Baykara M, Luleci G, Sanlioglu S. Adenovirus-mediated IKKbeta expression sensitizes prostate carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Gene Ther* 2006;13:21–31.
- Sanlioglu AD, Dirice E, Aydin C, Erin N, Koksaly S, Sanlioglu S. Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells. *BMC Cancer* 2005;5:54.
- Perleman H, Nguyen N, Liu H *et al*. Rheumatoid arthritis synovial fluid macrophages express decreased tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand R2 and increased decoy receptor tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand R3. *Arthritis Rheum* 2003;48:3096–101.
- Ichikawa K, Liu W, Fleck M *et al*. TRAIL-R2 (DR5) mediates apoptosis of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2003;171:1061–9.
- Miyashita T, Kawakami A, Tamai M *et al*. Akt is an endogenous inhibitor toward tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis in rheumatoid synovial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:397–404.
- Yao Q, Wang S, Gambotto A *et al*. Intra-articular adenoviral-mediated gene transfer of trail induces apoptosis of arthritic rabbit synovium. *Gene Ther* 2003;10:1055–60.
- Yao Q, Seol DW, Mi Z, Robbins PD. Intra-articular injection of recombinant TRAIL induces synovial apoptosis and reduces inflammation in a rabbit knee model of arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;8:R16.
- Morel J, Audo R, Hahne M, Combe B. Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation through mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *J Biol Chem* 2005;280:15709–18.
- Jungel A, Baresova V, Ospelt C *et al*. Trichostatin-A sensitizes rheumatoid arthritis synovial fibroblasts for TRAIL-induced apoptosis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:910–12.
- Miranda-Carus ME, Balsa A, Benito-Miguel M, De Ayala CP, Martin-Mola E. Rheumatoid arthritis synovial fluid fibroblasts express TRAIL-R2 (DR5) that is functionally active. *Arthritis Rheum* 2004;50:2786–93.
- Sanlioglu AD, Koksali T, Baykara M, Luleci G, Karacay B, Sanlioglu S. Current progress in adenovirus mediated gene therapy for patients with prostate carcinoma. *Gene Ther Mol Biol* 2003;7:113–33.