

TRAIL bağı altın nanoparçacıkların glioblastoma TRAIL direncindeki etkisinin incelenmesi

Ilknur Sur Erdem ^{1,2}

¹ Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi, Koç Üniversitesi, İstanbul, Türkiye
² Nuffield Kadın ve Üreme Sağlığı Departmanı, Tıp Bilimleri Bölümü, Oxford Üniversitesi, Oxford, Birleşik Krallık, İngiltere

(Alınış / Received: 06.06.2022, Kabul / Accepted: 20.08.2022, Online Yayınlanma / Published Online: 23.08.2022)

Anahtar Kelimeler

Glioblastoma
TRAIL,
İlaç direnci,
Altın nanoparçacık,
Hücre canlılığı

Öz: Glioblastomalar, cerrahi tedavideki gelişmelere rağmen, sonrasında uygulanan kemoterapiye ve radyoterapiye direnç gösterdikleri için alternatif tedavi yaklaşımlarına büyük ihtiyaç duyulmaktadır. Glioblastomalarda hayatta kalma ve apoptoz mekanizması aynı madalyonun iki farklı yüzü olarak görüldüğünde, mevcut tedavi stratejilerinin doğru tümör hücre popülasyonlarını hedef alıp almadığı sorusu gündeme gelmektedir. TRAIL, sadece tümör hücrelerinde apoptozu indükleyen en iyi ajanlardan biridir ancak tümör hücreleri TRAIL'e farklı duyarlılık göstermektedir. Bu çalışmada, TRAIL, altın nanoparçacıklar yüzeyinde aktive edilip, TRAIL'e duyarlı ve dirençli glioblastoma hücrelerde canlılığı, ve kaspaz aktivitesini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, gelecekte glioblastoma için etkili tedavilerin tasarımında faydalı olacaktır.

Investigation of TRAIL conjugated gold nanoparticles` s effect on glioblastoma TRAIL resistance

Keywords

Glioblastoma,
TRAIL,
Drug resistance,
Gold nanoparticles,
Cell Viability

Abstract: Despite advances in surgical treatment, glioblastomas are resistant to chemotherapy and radiotherapy, so there is a great need for alternative treatment approaches. When the mechanism of survival and apoptosis in glioblastomas is seen as two different sides of the same coin, the question arises whether current treatment strategies target the right tumor cell populations. TRAIL is one of the best agents to induce apoptosis in only tumor cells, but tumor cells show different sensitivity to TRAIL. In this study, it was investigated how TRAIL was activated on the surface of gold nanoparticles and affected the viability and caspase activity of TRAIL sensitive and resistant glioblastoma cells. The findings from this study will be useful in the design of effective glioblastoma therapies in the future.

*İlgili Yazar, email: ilknursur@gmail.com

1. Giriş

Glioblastoma, yetişkinlerin merkezi sinir sisteminde en sık görülen ve en kötü olan tümörlerden birisidir. Glioblastoma tedavisinde, cerrahi operasyon sonrası temozolomid ve radyasyon uygulaması kombine standart yöntem uygulanmakta, ancak bu uzun vadeli tümör kontrolünde başarısızlıkla sonuçlanmaktadır [1,2]. Uygulanan radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yöntemler sonrasında glioblastoma hücrelerinin yeniden beyinde yayılması veya bu yöntemlere direnç göstermesinden dolayı, tedavide kesin başarıya ulaşılamamıştır [3,4]. Bu nedenle, glioblastoma tümör gruplarında paradoks halini alan tedavi direncini ortadan kaldırılabilecek alternatif tedavi stratejileri geliştirmek çok önemlidir.

Tumor Nekroz Faktör (TNF) ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL, Apo2L), 281 aminoasitten oluşan TNF gen ailesinin üyesidir ve sadece kanserli hücrelerde apoptoza sebep olduğu için gelecek vaat eden bir kanser terapi ajanıdır [5,6]. TRAIL'in anti-tümör aktivitesi, insan kanser hücresi aşılanmış hayvan modellerinde bildirilmiştir

[7-9]. TRAIL, dört plazma zarı reseptörlerine ve bir çözünebilir reseptöre, yani sırasıyla TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) ve osteoprotegerine bağlanabilir [10]. DR4 ve DR5, TRAIL'e bağlandıktan sonra ölüm indükleyici sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. DISC'te bulunan adaptör protein FADD, DR ve Procaspase 8 bağlanarak kendi kendine kaspaz aktivasyonunu gerçekleştirir. DISC tarafından aktive edilmiş kaspaz 8, iki şekilde apoptotik ölüm mekanizmasını yürütmektedir. Tip I hücrelerde, DISC yeterli miktarda kaspaz 8'i harekete geçirir ve bu aşağı yollardaki diğer kaspazları da aktive eder. Tip II hücrelerinde, DISC küçük miktarlarda kaspaz 8 aktive eder ve mitokondriyal apoptotik mekanizması aracılığıyla apoptotik sinyalin amplifikasyonunu gerektirir. Bu mitokondriyal amplifikasyon döngüsü aktivasyonu, Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyesi olan Bid'in kesilmesiyle meydana gelir [11]. Kesilmiş Bid, Bax ve Bak'a bağlanır ve mitokondriden sitokrom-c gibi apoptogenik faktörlerin salgılanmasına neden olur.

TRAIL, protein ve peptid ilaçlarında olduğu gibi, in vivo olarak hızla deaktive edilir, düşük stabilite ve çözünürlüğe sahiptir ve hızlı bir şekilde böbrek yolu ile atılır; bu özellikler TRAIL'in klinik uygulamadaki zorluklarını temsil etmektedir [12]. TRAIL'in tek başına yeterli olmadığı kanser tiplerinde, istenilen kanserli hücre ölümüne ulaşılması için birleşimsel yaklaşımlar geliştirilmektedir. Rekombinant TRAIL, sadece kanser hücre hatlarında apoptozu indükleyip, normal dokuları etkilemeden güçlü anti-tümör aktivitesi sergilediği için kanser tedavisi için ümit vaadeden yaklaşımlardan birisidir [13]. TRAIL'in tümörlere taşınması ve etkisi için kullanılacak en iyi ajanlardan birisi, nanoparçacıklar olabilir [14]. Nanoparçacıklar, kanser tedavisinde tümörü hedefleme, çok hücre içine alınma özelliği, beyin kan bariyeri ve çoklu ilaç direncinden kaçış gibi yeteneklerinden dolayı birçok yarar sağlamaktadır [15-19]. Nanoparçacıkların hedefli verilmesi, onların tümörlü bölgede birikimine neden olup, sistemik toksisiteyi azaltarak tedavinin etkisini arttırmaktadır. Önceki çalışmada, TRAIL bağı demir oksit nanoparçacık sentezlenmiş, ve sentezlenen bu ligandın, in vitro olarak glioblastoma hücrelerinde apoptozu, in vivo olarak glioma hücrelerini hedeflemedeki yeteneğini önemli derecede arttırdığı görülmüştür [14]. En yaygın kullanılan altın nanoparçacıkların (AuNPs) ilaç salınımında, kanser hücrelerini teşhisi ve öldürme yöntemlerinden biri olan fototermal terapi gibi uygulamalarda kullanımının güvenli olduğu görülmüştür [20-26]. Buna rağmen, AuNPs bağı TRAIL'lerin glioblastoma TRAIL duyarlı ve dirençli hücreleri üzerindeki etkileri henüz araştırılmamıştır.

Bu çalışmada, glioblastoma gibi kötü huylu bir kanser türünün, TRAIL gibi klinik uygulamalar için önemli bir yer teşkil eden bir faktöre duyarlılığının nanoparçacık teknolojileri kullanarak moleküler düzeyde araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmadan çıkan sonuçlarla, tedavi duyarlılığın iyileştirecek yöntemler belirlendiğinde, yeni ilaç tasarımları ve yeni ajan geliştirmek daha kolay olacaktır.

2. Materyal ve Metot

Altın (III) klorit trihidrat (Sigma Aldrich, ABD), sodyum sitrat dihidrat (Sigma Aldrich, ABD), Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, USA), Fetal sıgır serumu (FBS, Gibco, USA) penisilin/streptomisin (Gibco, USA), kullanılmıştır.

2.1. TRAIL üretimi

his-TRAIL içeren pQE vektörü bakterilere transform edildikten sonra, bakteriler 100 ug/ml ampicilin içeren sıvı Luria-Bertani (LB) besiyerine konuldu. Gece boyunca 37°C'de sallanarak 250 ml besiyerinde büyütüldü. Ertesi gün çoğalan bakterilerden, her 250 ml LB (ampicilin) içerisine 10 ml olacak şekilde bakteri konulduktan sonra 37°C'de sallanmaya bırakıldı. Çoğalan bakterinin 600 nm dalga boyunda OD değeri 0.6 olunca, 0.1 mM olacak şekilde IPTG eklendi.

25°C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra, santrifüj tüplerine aktarılan bakteriler 7000 rpm'de 4°C'de 10 dakika boyunca santrifüj edilip bakterilerin çökmesi sağlandıktan sonra 10 ml lysis solüsyonunda çözüldü. Buz içinde 1 saat tutulduktan sonra, buz içindeyken 2 dakika sonike edildi. Daha sonra 30 dakika 12000 rpm'de santrifüjlendi. Proteinin saflaştırılmasında, santrifüj sonucu oluşan supernatant Ni-NTA resiniyle inkübe edildi. Sonrasında kolon birkaç defa yıkandıktan sonra kolona HisTag aracılığıyla bağı olan protein kolondan saf olarak elde edildi. Elüsyon çözeltisinin içinde bulunan his-TRAIL, gece boyu PBS içerisinde diyalize bırakıldı, etkili bir diyaliz için PBS en az 3 kez değiştirildi.

2.2. AuNP sentezi ve Nanoparçacıkların TRAIL ile etkileşimi

AuNPs'ler sodyum sitratın $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ile indirgenmesi yoluyla hazırlanır [27]. 50 nm AuNPs sentezi için, 0.05 gr HAuCl_4 500 ml içinde çözüldü. Kaynayınca kadar ısıtılan bu çözeltiye, 4 ml 38.8 mM sodyum sitrat çözeltisi hızlıca eklendikten sonra, 15 dakika daha kaynatıldı.

Sentezlenen 50 nm AuNPs ve saflaştırılan değişik konsantrasyondaki (25 ng/ml ve 50 ng/ml) his-TRAIL proteinini gece boyunca 4°C'de inkübe edilip, etkili bağlanmanın gerçekleştiği konsantrasyon aralığı tespit edildi.

2.3. Hücre kültürü

Çalışmalarda kullanılacak glioblastoma hücre hattı (T98G) American Type Culture Collection (ATCC)'dan satın alınmıştır. Dr. Tuğba Bağcı-Önder'in laboratuvarında bu hücre dizisinden TRAIL'e değişik duyarlılıklarda yeni hücre alt popülasyonları (T98G-TRAIL Dirençli ve T98G-TRAIL Duyarlı hücreler) üretilmiştir [28]. Tüm hücreler, DMEM (Gibco, USA), % 10 FBS (Gibco, USA), % 1 L-glutamine (Gibco, USA), ve % 1 penicillin-streptomycin (Gibco, USA) içeren besiyerlerinde ve 37°C ve 5% CO₂ olan inkubatorde büyütülmüştür.

2.4. Canlılık Analizi

T98G TRAIL Dirençli ve T98G TRAIL Duyarlı hücrelerde yapılan hücre canlılık testi, canlı hücrelerdeki ATP miktarının lüminesans olarak ölçülmesine dayanan Cell TiterGlo (Promega) (CTG) kiti ile yapıldı. Bunun için 96-kuyucuklu tabaklara 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekildi. İkinci günde kontrol değişik kontrasyonlarda AuNPs, TRAIL ve TRAIL bağı AuNPs olacak şekilde TRAIL uygulandı. 24 saatin sonunda kitin protokolüne uygun olarak CTG uygulandı ve plate okuyucuda sonuçlar görüntülendi.

2.5. Kaspaz 3/7 aktivitesi

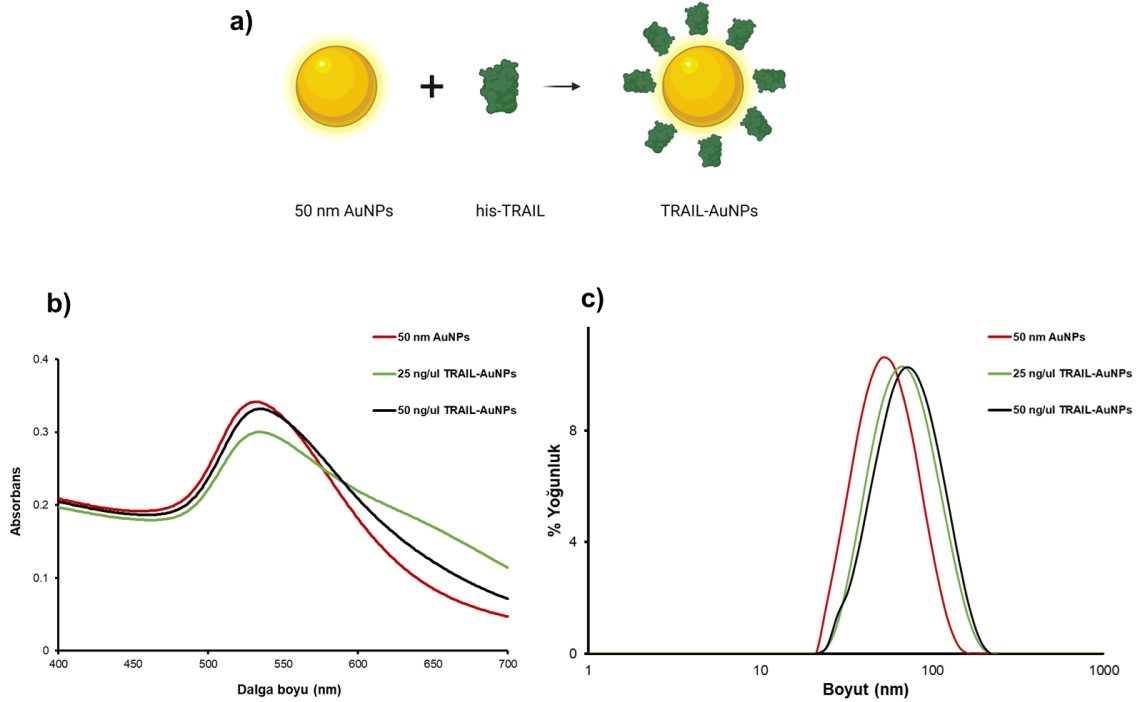
Kaspaz 3/7 aktivitesi testi için Caspase-GLO 3/7 (Promega) kiti kullanıldı. Tetrapeptit sekansına sahip bir prolüminesans kaspaz 3/7 substratı olan DEVD, aktif kaspaz 3/7 tarafından kesildiğinde lusiferaz enzimi substratı olan aminoluciferin açığa çıkmaktadır. Kit bunun lüminesans olarak ölçülmesine dayanır. Kaspaz 3/7 aktivitesi testi için 96-kuyucuklu tabaklara 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekildi. İkinci günde kontrol (0 ng TRAIL/ml), ve değişik kontrasyonda diğer ligandlar ile muamele edildi. 3 saatin sonunda kitin protokolüne uygun olarak Caspase-GLO 3/7 solüsyonu uygulandı ve plate okuyucuda sonuçlar görüntülendi.

2.6. Veri analizi

İstatistiksel analiz Student's t testi kullanılarak yapıldı ve veriler, grup başına üç numuneden elde edilen ortalama \pm SD'dir. $p < 0,05$ (*), $< 0,001$ (**), $< 0,0001$ (***) değerleri anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

Saflaştırılan his-TRAIL proteini Coomassie, Ponceau boyaması ile önceki çalışmamızda gösterilmiştir [29]. Penta His antikoru ile yapılan western blotlama sonucunda da beklenen boyutta his-TRAIL (23 kDa) proteinin başarılı bir şekilde saflaştırıldığı tespit edilmiştir [29].

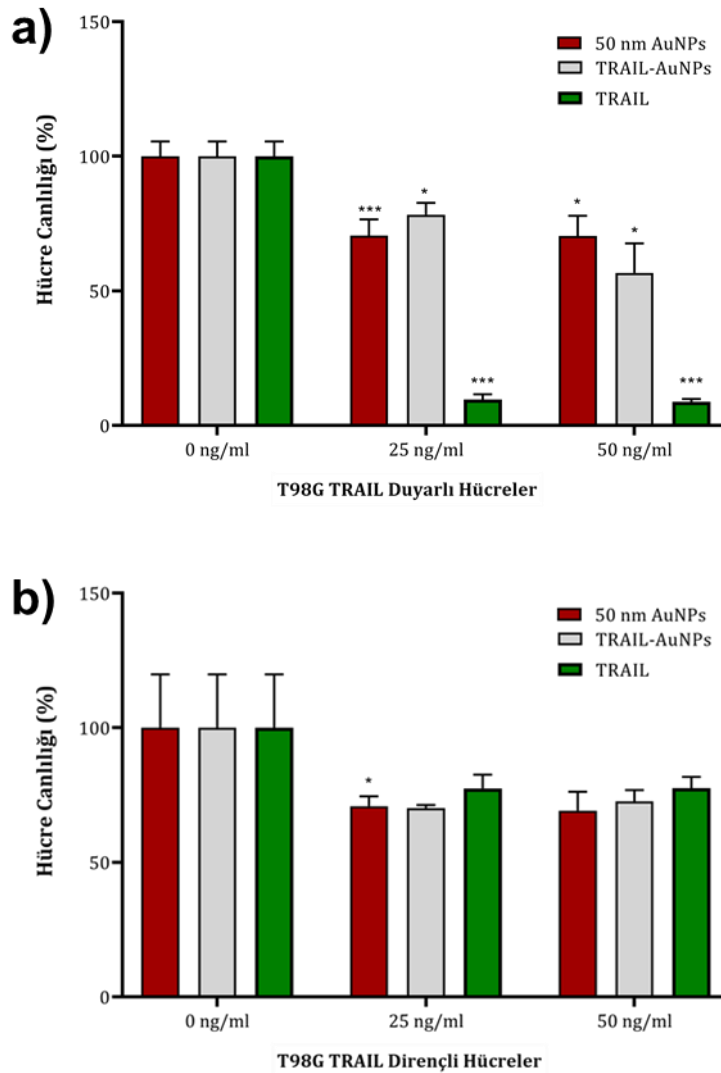


Şekil 1. TRAIL-AuNPs'lerin karakterizasyonu. (a) Şematik gösterimi (b) UV/Vis spektrumu ve hidrodinamik boyutun artması, (c) DLS boyut dağılım grafiği

Sentezlenen AuNPsler, UV-Vis Spektrofotometre ve DLS ile karakterize edilmiştir (**Şekil 1a, 1b, 1c**). 50 nm AuNPs 532 nm dalgaboyunda tek bir UV absorbans tepe değerine sahiptir (**Şekil 1b**). TRAIL, AuNPs üzerinde zayıf bağlı sitrat iyonlarının değiştirilmesi veya AuNPs'in yüzeyinde pozitif yüklü his-TRAIL ve negatif yüklü sitrat iyonlarının iyonik etkileşimleri yoluyla TRAIL'in amino ve karboksilik asit fonksiyonel gruplarının spesifik olmayan etkileşimi yoluyla AuNPs yüzeyinde konjuge edildi.

50 nm AuNPs TRAIL ile birlikte absorbans değeri değiştiği görülmüştür. 50 nm AuNPs'in doğru büyüklük aralığında olduğu DLS ile gösterilmiştir (**Şekil 1c**). Sentezlenen ligandlara DLS ile büyüklüklerine bakıldığında, 50 nm AuNPs'nin his-TRAIL ile bağlanmasıyla birlikte, hidrodinamik boyutun artması ile TRAIL bağı nanoparçacıkların 50 nm'den daha büyük olduğu görülmüştür (**Şekil 1c**).

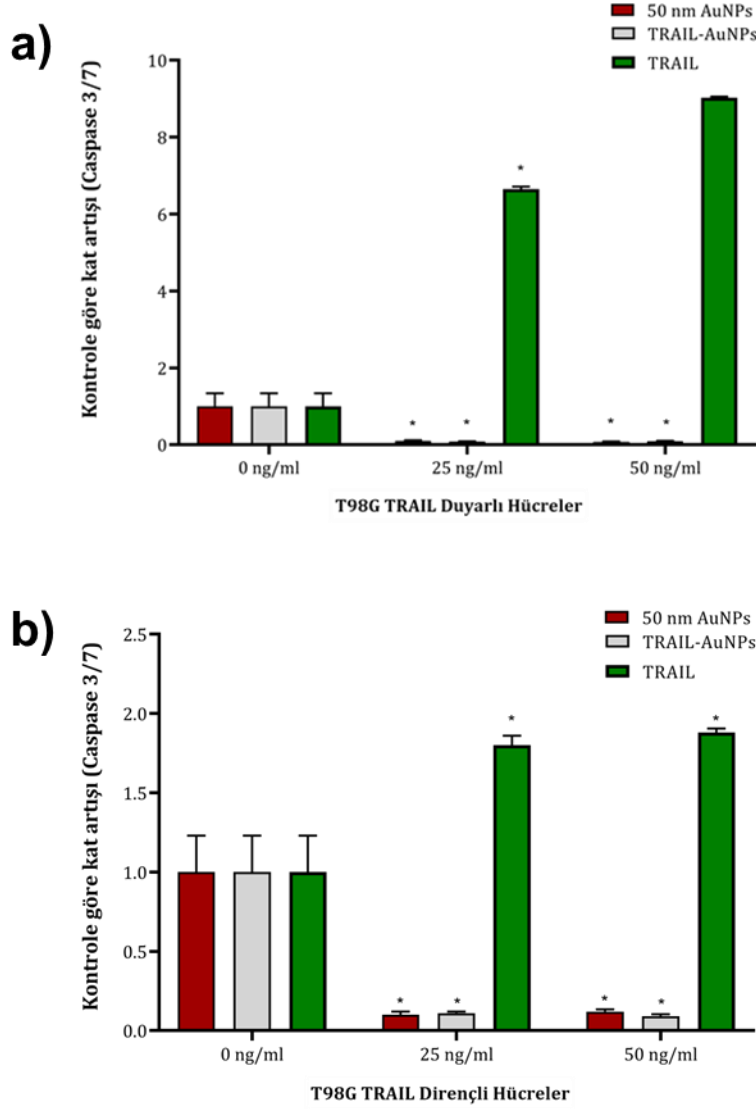
50 nm AuNPs, TRAIL-AuNPs, ve TRAIL için yapılan hücre canlılık deneyi sonuçlarına göre TRAIL dirençli hücrelerde canlılık 25 ve 50 ng/ml TRAIL-AuNPs ile %75'in altına düşerken sadece TRAIL verilen dirençli hücrelerde %75'in üzerinde canlılık görüldü. TRAIL duyarlı hücrelerde ise, sadece TRAIL ile muamele sonucu hücre canlılığının %10'un altında olduğu tespit edildi (**Şekil 2**).



Şekil 2. T98G TRAIL duyarlı (A) ve dirençli (B) hücrelerde 24 saat 50 nm AuNPs, TRAIL-AuNPs, ve TRAIL maruz kalması sonucu doza (0 ng/ml, 25 ng/ml ve 50 ng/ml) bağlı hücre canlılık (%) analizi. Herhangi bir uygulama yapılmayan (0 ng/ml) hücreler kontrol olarak kullanıldı ve her grubun (0 ng/ml) hücreleri ile karşılaştırmalar yapılmıştır. Veriler, her grubun 0 ng/ml kontrolüne göre normalleştirildi (*p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001).

T98G hücrelerinden seçilen TRAIL dirençli alt-popülasyonlara AuNPs, TRAIL, TRAIL-AuNPs uygulanmasının ardından kaspaz 3/7 aktivitesindeki artış özellikle 25 ng/ml ve 50 ng/ml'de 2 kate yakinen 50 nm AuNPs ve

TRAIL-AuNPs verilen gruplarda 1 katın altında olarak bulundu (Şekil 3). Genel olarak da AuNPs'nin yalnızca çok yüksek konsantrasyonlarda hücreleri apoptoza götürdüğü gösterilmiştir [30,31]. Başka bir grup tarafından yapılan araştırmada ise altın nanoparçacıkla yapılan modifikasyonlar sonrası hücrelerin apoptoza geç girdiği gösterilmiştir [32]. Bu çalışmada görülen altın nanoparçacık konsantrasyonunun hücrelerdeki kaspaz aktivitesini geciktirmiş olması gerek AuNPs konsantrasyon düşüklüğünden gerekse apoptoza girme süresinin geç olmasından kaynaklanmış olabilir.



Şekil 3. T98G TRAIL duyarlı (A) ve dirençli (B) hücrelerde 24 saat 50 nm AuNPs, TRAIL-AuNPs, ve TRAIL maruz kalması sonucu doza (0 ng/ml, 25 ng/ml ve 50 ng/ml) bağlı kaspaz 3/7 aktivite analizi. Herhangi bir uygulama yapılmayan (0 ng/ml) hücreler kontrol olarak kullanıldı. Veriler, 0 ng/ml kontrole göre normalleştirildi (*p<0.05).

T98G TRAIL duyarlı hücrelerde de en fazla kat artışı 50 ng/ml TRAIL'de görülmüştür (Şekil 3). 50 nm AuNPs, ve TRAIL-AuNPs'nin kaspaz 3/7 aktivitesine önemli bir etkisi olmamıştır.

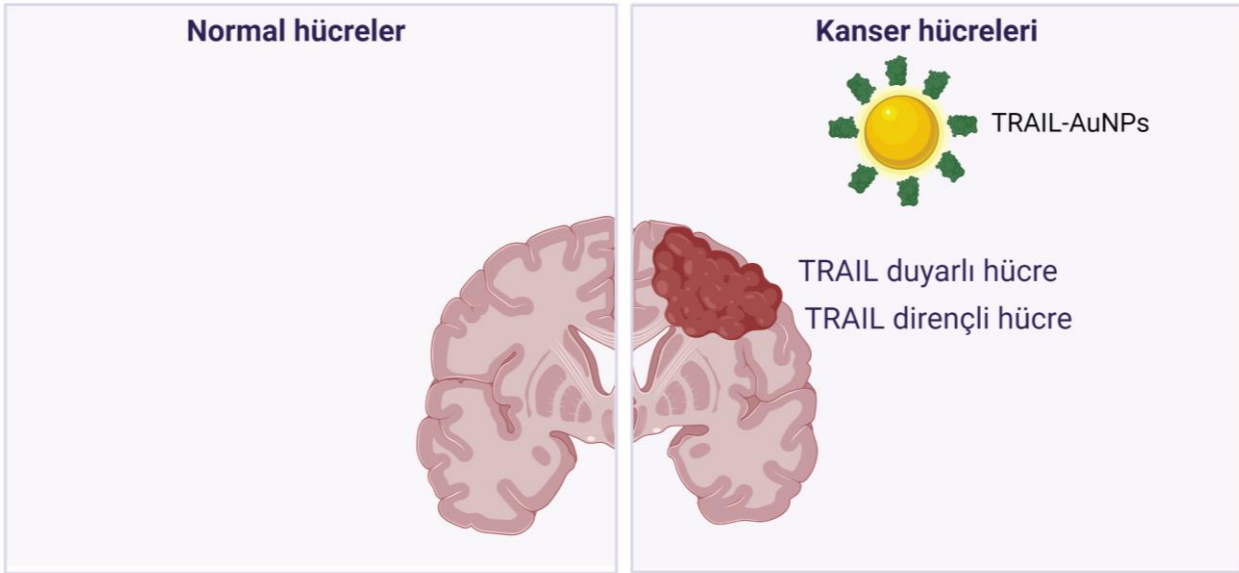
4. Tartışma ve Sonuç

Glioblastoma, beyin tümörleri arasında en sık görülen ve en agresif primer beyin tümörüdür. Farklı moleküler, genetik değişimlerin ve epigenetik profillerin değişik tip gliomalarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Cerrahi işlemi takiben kombine TMZ ve radyasyon uygulaması, glioblastoma hastalarında standart olarak uygulanan tedavi şeklidir. Son yıllarda glioblastoma hücrelerinde TRAIL direncini duyarlı hale getirmek için büyük çaba sarf edilmiştir. Ancak, hücrelerde ortaya çıkan TRAIL direncinden dolayı, klinikte uygulanması için çok sayıda soru cevapsız kalmaktadır. Dolayısıyla TRAIL dirençli hücrelerin, direnç göstermesine sebep olan mekanizmaları tespit

edip, bu dirençli hücreleri duyarlı hale getirebilecek alternatif yolları araştırmak önem teşkil etmektedir. Bu çalışmada, TRAIL-AuNPs konjugasyonunun hücre canlılığı, kaspaz aktivitesi üzerine etkisi ve TRAIL direncindeki önemi araştırılmıştır.

Nanoparçacıklar, kan beyin bariyerini geçtikleri için gerek kanser tedavisi gerekse kanser teşhisi için önemlidirler. Son zamanlarda, nanopartikülün boyutu ve şeklinin, in vitro hücresel alımla ilgili olarak önemli olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmada, küresel şekilli nanopartiküller, çubuk şekilli partiküllere göre artan bir alıma sahip olduğu gözlenmiştir [33]. Yazarlar ayrıca, 50 nm küresel altın nanoparçacıklarının (AuNPs), çalışılan tüm nanoparçacıkların en iyi hücre içine alınma özelliğine sahip olduğunu keşfettiler. Bu özelliğinden dolayı bu çalışmada 50 nm AuNPs kullanılmıştır. Dikkat çekici bir şekilde, AuNPs tıpta tarih boyunca kullanılmış ve günümüz teknolojisinde de kullanılmaya devam etmektedir [34]. Son zamanlarda, AuNPs hedeflenen ligandlarla ve radyoterapinin in vitro ve in vivo etkinliğini artırma yeteneğinden dolayı kanserde potansiyel bir araç olarak çok dikkat çekti [35–40]. Teşhis olarak, altının yüksek atom numarası ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI), aktif ajanlarla konjugasyon yeteneği tümör dokusunun hassas ve spesifik görüntülenmesini sağlamıştır [41–44]. Tedavi açısından, AuNPs ve radyoterapi birlikte kullanıp, tümör dokusunda kalıcı olan AuNPs bağlı radyosensitizörler ile kanser hücrelerini radyoterapiye duyarlı hale getirebilir. Çeşitli çalışmalar, AuNPs modifikasyonlarının hem hücresel hem de hayvan çalışmalarında radyo-duyarlılaştırıcı etkilerini daha önce göstermiştir [45–50].

TRAIL ile TRAIL-AuNPs`nin kanser hücrelerine hedefli taşınması



AuNPs yüzeylerinin kanser membran reseptörlerini tanıyan TRAIL ile kaplanması

Nanoparçacıkların tümörlü bölgeye hedefli olarak taşınması

Bu bölgede radyoterapi ve fototerml terapi gibi alternatif tedavilerin etkisini artırmak

Şekil 4. Çalışmanın özeti (Şekil Biorender kullanılarak hazırlanmıştır)

Bu çalışmada, sitrat kaplı AuNPs yüzeyine konjuge edilen his-TRAIL proteini, TRAIL dirençli hücrelerin duyarlılığını artırmak etkin bir şekilde aktive etmek için kullanılmıştır (**Şekil 4**). Bulgularımız, TRAIL konjuge altın nanoparçacıkları kullanan çalışma ile tutarlı olup, modifiye edilmemiş TRAIL'e kıyasla TRAIL-AuNPs ile inkübe edilen TRAIL dirençli hücrelerde daha fazla ölüm kaydedilmiştir [51]. Bu sonuçların, aynı zamanda akciğer kanserinde AuNP'ler ve TRAIL'in birlikte tedavisi üzerine hücre canlılığında bir azalmayı gösteren önceki bulgularla da uyumlu olduğu görülmüştür [52]. Ancak gözlenen TRAIL-AuNPs muamelesi ile TRAIL dirençli hücre canlılığındaki azalma daha çok yapılan TRAIL bağı gümüş nanoparçacıklarında (TRAIL-AgNPs) görüldüğü kadar çok büyük fark olmadığı için TRAIL-AuNPs konjugasyonun fototerml terapi veya radyoterapi etkinliğini artırmak için kullanılabilir [29].

Sonuç olarak AuNPs yüzeylerinin kanser membran reseptörlerini tanıyan TRAIL ile kaplanması, nanoparçacıkların tümörlü bölgeye hedefli olarak taşınmasını sağlayıp, bu bölgede kullanılacak radyoterapi ve fototerml terapi gibi alternatif tedavilerin etkisini artırmaya yardımcı olabilir. Glioblastoma tedavisinde, TRAIL direncinin üstesinden gelmek için TRAIL-AuNP'leri kullanmak yeni kombinasyon tedavilerinin önünü açabilecektir.

Teşekkür

Bu çalışmayı yapmamda destek olan Prof.Dr.Mustafa Çulha, Prof.Dr.İhsan Solaroğlu, ve Prof.Dr. Tuğba Bağcı Önder, ve Ahmet Cingöz'e teşekkürü bir borç bilirim. Bu çalışma TÜBİTAK (Proje No: 116C011) tarafından desteklenmiştir.

Kaynakça

- [1] Furnari, F.B., Fenton, T., Bachoo, R.M., Mukasa, A., Stommel, J.M., Stegh, A., Hahn, W.C., Ligon K.L., Louis D.N., Brennan C., Chin L., DePinho R.A., Cavenee, W.K. 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*, 21:2683–2710.
- [2] Parsons, D.W., Jones, S.N., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B.A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D.A., Tekleab, H., Diaz, L.A., Hartigan, J., Smith, D.R., Strausberg, R.L., Marie, S.K., Shinjo, S.M., Yan, H., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321:1807–1812.
- [3] Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.O. 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTCNCIC trial. *Lancet Oncol*, 10:459–466.
- [4] Vredenburgh, J.J., Desjardins, A., Reardon, D.A., Peters, K.B., Herndon, J.E. 2nd., Marcello J, Kirkpatrick, J. P., Sampson, J.H., Bailey, L., Threath, S., Friedman, A.H., Bigner, D.D., Friedman, H.S. 2011. The addition of bevacizumab to standard radiation therapy and temozolomide followed by bevacizumab, temozolomide, and irinotecan for newly diagnosed glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 17:4119–4124.
- [5] LeBlanc HN, and Ashkenazi A. 2003. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ*, 10:66–75.
- [6] Me´rino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Solary, E., Micheau, O. 2007. TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. *Expert Opin. Ther. Targets*, 11:1299–1314.
- [7] Roth, W., Isenmann, S., Naumann, U., Kugler, S., Bahr, M., Dichgans, J., Ashkenazi, A., Weller, M. 1999. Locoregional Apo2L/TRAIL eradicates intracranial human malignant glioma xenografts in athymic mice in the absence of neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 265:479–483.
- [8] Kelley, S.K., Harris, L.A., Xie, D., DeForge, L., Totpal, K., Bussiere, J., Fox, J.A. 2001. Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J Pharmacol Exp Ther*, 299:31–38.
- [9] Saito, R., Bringas, J.R., Panner, A., Tamas, M., Pieper, R.O., Berger, M.S., Bankiewicz, K.S. 2004. Convection-enhanced delivery of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand with systemic administration of temozolomide prolongs survival in an intracranial glioblastoma xenograft model. *Cancer Res*, 64:6858–6862.
- [10] Kelley, S.K., Ashkenazi, A. 2004. Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 4:333–339.
- [11] Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94:481–490.
- [12] Nitsch, R., Bechmann, I., Deisz, R.A., Haas, D., Lehmann, T.N., Wendling, U, Zipp, F. 2000. Human brain-cell death induced by tumour-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet*, 356:827–828.

- [13] Chinnaiyan, A.M., Prasad, U., Shankar, S., Hamstra, D.A., Shanaiah, M., Chenevert, T.L. 2000. Combined effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and ionizing radiation in breast cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:1754–1759.
- [14] Perlstein, B., Finniss, S.A., Miller, C., Okhrimenko, H., Kazimirsky, G., Cazacu, S., Lee, H.K., Lemke, N., Brodie, S., Umansky, F., Rempel, S.A., Rosenblum, M., Mikklesen, T., Margel, S., Brodie, C. 2013. TRAIL conjugated to nanoparticles exhibits increased anti-tumor activities in glioma cells and glioma stem cells in vitro and in vivo. *Neuro Oncol.*, 15:29-40.
- [15] Sur, I., Cam, D., Kahraman, M., Baysal, A., Culha, M. 2010. Interaction of multi-functional silver nanoparticles with living cells. *Nanotechnology*, 21:175104.
- [16] Sur, I., Altunbek, M., Kahraman, M., Culha, M. 2012. The influence of the surface chemistry of silver nanoparticles on cell death *Nanotechnology*, 23:10.1088/0957-4484/23/37/375102.
- [17] Sanvicens, N., Marco, M.P. 2008. Multifunctional nanoparticles–properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol*, 26: 425–433.
- [18] Aggarwal, P., Hall, J.B., McLeland, C.B., Dobrovolskaia, M.A., McNeil, S.E. 2009. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 61:428–437.
- [19] Bahrami, B., Hojjat-Farsangi, M., Mohammadi, H., Anvari, E., Ghalamfarsa, G., Yousefi, M., Jadidi-Niaragh, F. 2017. Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. *Immunol. Lett.*, 190:64–83.
- [20] Ajnai, G., Chiu, A., Kan, T., Cheng, C.C., Tsai, T.H., Chang, J. 2014, Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy. *J. Exp. Clin. Med.*, 6:172–178.
- [21] Kong, F.Y., Zhang, J.W., Li, R.F., Wang, Z.X., Wang, W.J., Wang, W. 2017. Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications. *Molecules*, 22:1445.
- [22] Brown, S.D., Nativo, P., Smith, J.A., Stirling, D., Edwards, P.R., Venugopal, B., Flint, D.J., Plumb, J.A., Graham, D., Wheate, N.J. 2010. Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin. *J. Am. Chem. Soc.*, 132:4678–4684.
- [23] Dreaden, E.C., Austin, L.A., Mackey, M.A., El-Sayed, M.A. 2012. Size matters: Gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. *Ther. Deliv.*, 3:457–478.
- [24] Dickerson, E.B., Dreaden, E.C., Huang, X., El-Sayed, I.H., Chu, H., Pushpanketh, S., McDonald, J.F., El-Sayed, M.A. 2008. Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice. *Cancer Lett.*, 269:57–66.
- [25] El-Sayed, I.H., Huang, X., El-Sayed, M.A. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. 2006. *Cancer Lett.*, 239:129–135.
- [26] Pissuwan, D., Valenzuela, S.M., Cortie, M.B. 2006. Therapeutic possibilities of plasmonically heated gold nanoparticles. *Trends Biotechnol.*, 24, 62–67.
- [27] Handley, D.A., Hayat MA (ed). 1989. In colloidal gold: principles, methods, and applications. Academic, New York, 131s.
- [28] Cingoz, A., Ozyerli-Goknar, E., Morova, T., Seker-Polat, F., Selvan, M.E., Gümüş Z.H., Bhare, D., Shah, K., Solaroglu, I., Bagci-Onder, T. 2021. Generation of TRAIL-resistant cell line models reveals distinct adaptive mechanisms for acquired resistance and re-sensitization. *Oncogene* 40 (18), 3201-3216.
- [29] Sur-Erdem, I., Muslu, K., Pınarbası, N., Altunbek, M., Seker-Polat, F., Cingöz, A., Aydın, S.O., Kahraman, M., Culha, M., Solaroglu, I., Bagci-Onder, T. 2020. TRAIL-conjugated silver nanoparticles sensitize glioblastoma cells to TRAIL by regulating CHK1 in the DNA repair pathway. *Neurological Research* 42: 1061-1069.

- [30] Selim, M. E., Hendi, A. A. 2012. Gold Nanoparticles Induce Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *Asian. Pac. J. Cancer. Prev.* 13: 1617–1620.
- [31] Lan, M.Y., Hsu, Y.B., Hsu, C.H., Ho, C.Y., Lin, J.C., Lee, S.W. 2013. Induction of Apoptosis by High-Dose Gold Nanoparticles in Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Auris, Nasus, Larynx*, 40:563– 568.
- [32] Fytianos, K., Chortarea, S., Rodriguez-Lorenzo, L., Blank, F., Von Garnier, C., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., 2017. Aerosol delivery of functionalized gold nanoparticles target and activate dendritic cells in a 3D lung cellular model. *ACS nano* 11: 375-383.
- [33] Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., Chan, W.C.W. 2006. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters* 6(4):662–668.
- [34] Pricker, S. 1996. Medical uses of gold compounds: Past, present and future. *Gold Bull* 29:53–60.
- [35] Albanese, A., Tang, P.S., Chan, W.C.W. 2012. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu Rev Biomed Eng* 14:1–16.
- [36] Liu, C.J., Wang, C.H., Chien, C.C., Yang, T.Y., Chen, S.T. 2008. Enhanced x-ray irradiation-induced cancer cell damage by gold nanoparticles treated by a new synthesis method of polyethylene glycol modification. *Nanotechnology* 19:295104.
- [37] Liu, C.J., Wang, C.H., Chen, S.T., Chen, H.H., Leng, W.H. 2010. Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles. *Phys Med Biol* 55: 931–945.
- [38] Hainfeld, J.F., Slatkin, D.N., Smilowitz, H.M. 2004. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol* 49:N309–N315.
- [39] Hainfeld, J.F., Dilmanian, F.A., Zhong, Z., Slatkin, D.N., Kalef-Ezra, J.A. 2010. Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. *Phys Med Biol* 55: 3045–3059.
- [40] Zhang, X.D., Wu, D., Shen, X., Chen, J., Sun, Y-M. 2012. Size-dependent radiosensitization of PEG-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy. *Biomaterials* 33: 6408–6419.
- [41] Cai, Q-Y, Kim, S.H., Choi, K.S., Kim, S.Y., Byun, S.J. 2007. Colloidal gold nanoparticles as a blood-pool contrast agent for x-ray computed tomography in mice. *Invest Radiol* 42: 797–806.
- [42] Kircher, M.F., de la Zerda, A., Jokerst, J.V., Zavaleta, C.L., Kempen, P.J., I. 2012. A brain tumor molecular imaging strategy using a new triple-modality MRI/photoacoustic-Raman nanoparticle. *Nat Med* 18: 829–834.
- [43] Jin, Y.D., Jia, C.X., Huang, S.W., O'Donnell M., Gao, X.H. 2010. Multifunctional nanoparticles as coupled contrast agents. *Nat Commun* 1: 41.
- [44] Park, J.A., Reddy, P.A.N., Kim, H.K., Kim, I.S., Kim, G.C. 2008. Gold nanoparticles functionalised by Gd-complex of DTPA-bis(amide) conjugate of glutathione as an MRI contrast agent. *Bioorgan Med Chem Lett* 18: 6135–6137.
- [45] Liu, C.J., Wang, C.H., Chen, S.T., Chen, H.H., Leng, W.H. 2010. Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles. *Phys Med Biol* 55: 931–945.
- [46] Hainfeld, J.F., Slatkin, D.N., Smilowitz, H.M. 2004. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol* 49: N309–N315.
- [47] Hainfeld, J.F., Dilmanian, F.A., Zhong, Z., Slatkin, D.N., Kalef-Ezra, J.A. 2010. Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. *Phys Med Biol* 55: 3045–3059.
- [48] Jain, S., Coulter, J.A., Hounsell, A.R., Butterworth, K.T., McMahon, S.J. 2011. Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Int J Radiat Onc* 79: 531–539.
- [49] Rahman, W.N., Bishara, N., Ackerly, T., He, C.F., Jackson, P. 2009. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. *Nanomed-Nanotechnol* 5: 136–142.

- [50] Chattopadhyay, N., Cai, Z., Pignol, J.P., Keller, B., Lechtman, E. 2010. Design and characterization of HER-2-targeted gold nanoparticles for enhanced x-radiation treatment of locally advanced breast cancer. *Mol Pharm* 7: 2194–2206.
- [51] Huang, Y.J., Hsu, S.H. 2017. TRAIL-functionalized gold nanoparticles selectively trigger apoptosis in polarized macrophages. *Nanotheranostics*, 1[3]:326-337.
- [52] Ke, S., Zhou, T., Yang, P., Wang, Y., Zhang, P., Chen, K., Ren, L., Ye, S. 2017. Gold Nanoparticles Enhance TRAIL Sensitivity Through Drp1-Mediated Apoptotic and Autophagic Mitochondrial Fission in NSCLC Cells. *Int J Nanomed.*, 12:2531-2551.