

67299

T.C  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**FAS STİMULASYONUNUN DERİ VE SİNOVYAL  
FİBROBLASTLARA ETKİSİ**

**ROMATOLOJİ UZMANLIK TEZİ  
UZM. DR. NURULLAH AKKOÇ**

**TEZ YÖNETİCİSİ  
PROF. DR. GÜRBÜZ GÜMÜŞDİŞ**

**İZMİR-1998**

## **ÖNSÖZ**

Bugüne kadar, eğitimime katkıda bulunan yurt içindeki ve yurtdışındaki bütün hocalarıma teşekkür ederim.

Uzm. Dr. Nurullah Akkoç

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. ÖZET	I
2. İNGİLİZCE ÖZET	II
3. GİRİŞ VE AMAÇ	1
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. ROMATOİD ARTRİT	4
4.1.1. Patogenez	4
4.1.2. İmmunogenetik	5
4.1.3. T hücreleri	5
4.1.4. Fibroblastlar	6
4.2. APOPİTOZ	8
4.2.1. Sistein proteazların apopitozdaki rolü	11
4.2.2. Apopitozun düzenleyicileri	12
4.2.3. Protein sentezi ve apopitoz	13
4.2.4. Fas, ölüm faktörü	13
4.2.5. Fas, Fas ligandı ve otoimmünite	14
5. MATERYEL VE METOD	16
6. BULGULAR	21
7. TARTIŞMA	26
8. SONUÇLAR	30
9. KAYNAKLAR	31

## 1. ÖZET

Fas aracılıklı apoptozun RA patogeneğinde rol oynadığı tahmin edilmektedir. Fibroblastlarda Fas reseptörünün genellikle apoptotik sinyaller gönderdiği iddia edilmesine rağmen, Fas stimülasyonunun proliferasyona yol açabileceği de bildirilmiştir. Bu çalışmada deri, normal ve romatid sinovyumdan yapılan fibroblast kültürlerinin 2-9. pasajlarından elde edilen hücreler anti-Fas-IgM (CH11) ile stimüle edilerek bu stimülasyonun, fibroblastlarda apoptoza mı yoksa proliferasyona mı yol açtığı araştırıldı. Bu amaçla, fibroblastlar değişik konsantrasyonlarda anti-Fas ile (100 ng/ml - 10 µg/ml) 24-72 saat enkübe edildiler. Apoptozun tesbiti inversiyonlu faz kontrast mikroskopu kullanılarak morfolojik değerlendirme ile ve flow sitometre kullanılarak PI boyanması ve anneksin V-FITC bağlanması ile yapıldı. Proliferasyonun ölçülmesinde H<sup>3</sup> timidin tutulum testi kullanıldı. Bu testte elde edilen ölçüm sonuçlarının küçük olması, hücre ölümünün bir işaretidir. Flow sitometre ile her tip fibroblastta artmış Fas ekspresyonu gösterildi. Kontrol olarak kullanılan Jurkat hücrelerinde anti-Fas stimülasyonu ile apoptoz görülmesine rağmen, kullanılan metodların hiçbiri ile fibroblastlarda artmış bir apoptoz belirlenemedi. H<sup>3</sup> timidin tutulum testi sonuçları, Fas stimülasyonunun fibroblastlarda proliferasyona yol açtığını düşündürdü. Daha sonraki deneylerde hücreler romatoid sinovyumdaki sitokinlerle (IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-17, TNF-α, IFN-γ, TGF-β, GM-CSF, PDGF-AA, FGF) uygun konsantrasyonlarda 24-72 saat süreyle enkübe edildiler. Ne TNF-α, ne de başka bir sitokin tek başına apoptoza yol açmadı. Flow sitometre ölçümlerinden TNF-α, IFN-γ ve GM-CSF'in fibroblastlarda Fas ekspresyonunu arttırdığı anlaşıldı. Ancak, sitokin stimülasyonu ile Fas ekspresyonu arttırılan fibroblastlarda bile, anti-Fas stimülasyonu apoptoza yol açmadı. Sonuç olarak, anti-Fas-IgM insan fibroblastlarında güvenilir bir apoptoz uyarıcısı değildir. Ayrıca, Fas reseptörü fibroblastlara ölüm sinyalleri kadar proliferasyon sinyallerinin iletilmesinde de rol oynuyor gibi görünmektedir. Bazı sitokinlerle arttırılan Fas ekspresyonunun Fas stimülasyonu ile görülebilen proliferasyona duyarlılığı arttırıp arttırmadığı ilerideki çalışmaların konusu olabilir.

## 2. SUMMARY

Fas mediated apoptosis is considered to be involved in the pathogenesis of RA. Although it is generally suggested that the Fas antigen transmits apoptotic signals to fibroblasts, it has been also reported that it may play a role in proliferation. In this study cultured fibroblasts from 2<sup>nd</sup> to 9<sup>th</sup> passage obtained from skin and normal or rheumatoid synovium were stimulated by anti-Fas-IgM (CH11) and it was tested whether this stimulation leads to apoptosis or proliferation. For this reason, fibroblasts were exposed to anti-Fas at different concentrations (100 ng/ml - 10 µg/ml) for 24-72 h. Detection of apoptosis was done morphologically by inverted phase contrast microscopy, PI staining, annexin-V-FITC binding measured by flow cytometry. To detect proliferation, H<sup>3</sup> thymidine uptake assay was used. In this assay low count measurements are also an indication of apoptosis. All fibroblasts from any source have been shown to express Fas antigen by flow cytometry. Although anti-Fas-IgM induced apoptosis in Jurkat control cells, none of the methods revealed increased apoptosis in any type of fibroblasts after Fas stimulation. Instead, it resulted in increased proliferation as detected by H<sup>3</sup> thymidine uptake assay. In further experiments we treated the fibroblasts for 24-72 h in appropriate concentrations with different cytokines and growth factors (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF, PDGF-AA, FGF) present in the rheumatoid synovium. Neither TNF- $\alpha$  nor any other cytokine alone led to apoptosis. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and GM-CSF increased Fas expression markedly as measured by FC. However, stimulation of fibroblasts by anti-Fas even after pretreatment with these cytokines did not result in sensitivity to apoptosis. We conclude that anti-Fas IgM is not a reliable Fas inducing agent in human fibroblasts and that Fas receptor may play a role in transmitting growth signals as well as death signals to fibroblasts. Whether increased Fas expression by some cytokines results in higher sensitivity to proliferation by Fas stimulation is a subject of further studies.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Hayatın karşıtı gibi gözükmekle birlikte, biyolojik bir bakış açısından ölüm, hayatın vazgeçilmez bir parçasıdır. Gerek çok hücreli basit organizmalarda, gerekse yüksek organizma türlerinde ölümü programlayan karmaşık bir sistem vardır. Canlının genetik olarak belirlenen sınırlı hayat süresi, jenerasyonların yenilenmesine olanak verir. Somatik hücrelerde süreklilik gösteren bir ölüm sürecinin varlığı organizmanın hayatîyetinin devamını sağlar. Somatik hücrelerde süregelen bu ölüm sürecine "programlı hücre ölümü" (PHÖ) denir. PHÖ denmesinin nedeni, hücrenin kendi genlerini kullanmak suretiyle intrinsek bir hücre ölüm programını aktive ederek kendi ölümüne yol açmasıdır. Bu süreç, "apoptoz" terimi ile de ifade edilebilir. Başlangıçta hücre ölümünün özel bir morfolojik görünümünü tanımlamak için ortaya atılan bu terim bugün PHÖ'ye alternatif olarak kullanılmaktadır (1). İntrinsek olarak işletilen bu hücre ölümü sürecinden farklı bir başka hücre ölümü çeşidi de nekrozdur. Fiziksel, kimyasal veya ozmotik zararlanmalar internal ve eksternal hücre membranlarını harap ederek nekroz yolu ile hücre ölümüne yol açarlar. Litik nekroz sonucu denatüre proteinler ve DNA fragmanları intersellüler boşluğa salınır ve böylece lokal inflamatuvar bir reaksiyon gelişir. Bunun aksine, PHÖ sürecindeki hücreler, metabolik intihar sürecinin geç dönemlerine kadar intakt sayılabilecek bir eksternal membrana sahiptirler. Hücre membran bütünlüğü kaybolmadan, endojen hücre enzimleri aracılığı ile hücre ölümü gerçekleşir. Apoptoz yolu ile ölen hücreler, içerikleri çevreye salınıp lokal inflamatuvar bir olayı tetiklemeden etraftaki fagositer hücreler tarafından temizlenirler.

PHÖ'nün bütün yüksek ökaryotlarda (bitkilerde, mantarlarda, nematodlarda, insektlerde ve vertebralılarda) tanımlanmış olması, bu sürecin fizyolojik önemini ortaya koyar (2). Apoptoz genlerinin genetik veya sonradan kazanılmış regülasyon bozuklukları majör patolojilere yol açar. *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) adlı nematoda, organogenez sırasında apoptoz sürecinde ortaya çıkan bir başarısızlık, malformasyonların

gelişimine neden olur (3). İnsektlerde ve memelilerde de buna benzer bir durum gösterilmiştir (2). Öte yandan, anti-apopitotik proto-onkogen bcl-2'nin artmış ekspresyonu, normalde apopitoz ile temizlenen öz-reaktif lenfositlerin hayatta kalarak organizmaya zarar vermesine, lenfoid hiperplaziye ve lenfomalara yol açar. Apopitoz düzenleyici onkosupresör p53 mutasyonlarının insan kanserlerinin hemen hemen %50'sinde görülmesi, apopitozun fizyolojik önemine işaret eden bir diğer bulgu olarak gösterilebilir.

Apopitoza fazla duyarlı olmanın da dramatik sonuçları vardır. Bcl-2 genini taşımayan fareler, postnatal hayatları boyunca lenfoid dokularını kaybederler (4). HIV ile infekte hastalarda periferik T hücreleri apopitoz yoluyla yok olurlar (5).

Kısaca özetlemek gerekirse; artmış apopitoz dejeneratif hastalıkların, azalmış apopitoz ise otoimmün hastalıkların ve kanserlerin gelişiminde rol oynar.

Bu bilgiler ışığında, apopitozun romatoid artrit (RA) patogenezinde rol oynayabileceğini düşünmemek için bir neden yoktur. Bilindiği gibi RA'da karakteristik patolojik bulgu; sinovyal hiperplazidir. Sinovyal hiperplaziyi açıklamaya çalışanlar, genellikle klasik modellere odaklanmışlardır. Buna göre makrofaj akümüasyonu kemik iliğinden daha fazla hücrenin migrasyon yapmasına, fibroblast akümüasyonu da sitokinle uyarılmış proliferasyona veya otonom fibroblast proliferasyonuna bağlıdır. Ancak, bu aslında olası mekanizmalardan bir tanesi olup bugüne kadar kanıtlanamamıştır. Dokuda biriken hücrelerin daha doğru bir şekilde formülasyonu şöyle ifade edilebilir: Sinovyal doku kitlesi = (hücre proliferasyonu + dokuya göç eden hücreler) - (hücre ölümü + dokudan göç eden hücreler)

Bu formül göz önüne alındığında, fibroblastlardaki proliferasyon ve PHÖ arasındaki dengenin bozulmasının ve özellikle romatoid fibroblastlarda azalmış bir apopitozun RA patogenezinde rol oynayabileceğini düşünmek akla yatkındır. Eğer bu doğru ise, sinovyal fibroblastlardaki apopitozu hızlandırabilecek modalitelerin bulunması, RA tedavisinde yeni olanakların ortaya çıkması demektir. Bu nedenle, RA'lı hastalarda sinovyal fibroblastlarda apopitoz, son zamanlardaki bazı araştırmalara konu olmaktadır (6-9). Bu çalışmalarda,

sinovyal fibroblastların fizyolojik apoptozda rol oynadığı düşünölen Fas antijenini eksprese ettiği ve anti-Fas antikoru ile apoptozun uyarıldığı bildirilmiştir (6-9). Bazı çalışmalarda osteoartrozlu hastalardan elde edilen fibroblastların Fas aracılığıyla olan apoptoza romatoid fibroblastlardan daha dirençli olduğu iddia edilse de (6), diğer çalışmalarda böyle bir fark gösterilememiştir (7-9). Fas aracılığıyla olan apoptozun TGF- $\beta$  ve IL-1 $\beta$  ile inhibe edildiği ve bu sitokinlerin romatoid fibroblastlarda sinovyal hiperplaziden sorumlu olabilecekleri de ileri sürölmüştür (8,9). Öte yandan, Fas stimölasyonunun insan fibroblastlarında proliferasyona yol açtığını iddia eden bir çalışma da vardır (10).

Romatoid sinovyal hücrelerde apoptozu araştırmak amacıyla planlanan bu çalışmada, kontrol olarak sinovyal ve deri fibroblastları kullanılmış ve şu iki sorunun cevabı aranmıştır:

1. Sinovyal ve deri fibroblastlarında Fas stimölasyonu apoptoza mı yoksa proliferasyona mı yol açmaktadır?
2. Romatoid sinovyumda bulunan sitokinler bu cevabı nasıl etkilemektedir?



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. ROMATOİD ARTRİT

RA kronik, inflamatuvar sistemik bir hastalıktır. En belirgin bulgularını oynak eklemlerde gösterir. Periferik eklemlerde inatçı ve ilerleyici sinovit ile karakterizedir. İnflamatuvar cevabı başlatan sorumlu etken hala bilinmemektedir. İnfeksiyöz bir etiyojijiyi göstermeye yönelik çalışmalar, bütün gayretlere rağmen başarısız olmuştur. Bunun nedeni, belki de farklı hastalarda farklı etkenlerin olayı başlatmasıdır. Genetik ve çevresel faktörler ortaya çıkan inflamatuvar cevabın ilerleyişini, derecesini ve şeklini tayin ederek heterojen klinik bulguların görülmesinden sorumludurlar. Hastalığın başlangıcı ve seyri, eklem ve eklem dışı tutulumun şiddeti hastadan hastaya çok farklılık gösterebilir.

#### 4.1.1 Patogenez

RA'da olayları başlatan etken hala bilinmemektedir. Israrlı çalışmalara rağmen bakteriyel veya viral bir etken gösterilememiştir. Hayvan modellerinde infeksiyöz etkenler kronik artrit oluşturabilirler. Bu modellerde sinovyal dokuda bakteriyel ürünlerin birikmesi ve kronik infeksiyonun gelişmesi sinovyal inflamasyondan sorumludur. Bu konsept, çeşitli infeksiyöz etkenlerin insanlarda kronik artropatiye yol açtığıının bulunması ile daha da çok ilgi çekmeye başlamıştır. Örneğin, Lyme hastalığının bir spiroket infeksiyonu olduğu anlaşılmıştır. Parvovirüs enfeksiyonları erişkinlerde akut ve bazen uzamış poliartritlere yol açabilir. HTLV-1 ile birlikteki artropatide görülen sinovyal hiperplaziden, tax geninin sinovyositlere inkorporasyonunun sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (11). Ancak, bunlara rağmen RA'ya yol açan bir infeksiyöz etken ne izole edilebilmiş, ne de elektron mikroskopisi veya moleküler biyolojik tekniklerle gösterilebilmiştir. Belki de RA'nın tek bir primer nedeni yoktur ve birbirinden farklı etkenler, benzer doku yaralanmasına ve sinovyal inflamasyona yol açarlar. Olayı başlatan neden konusundaki belirsizliğe rağmen, eklem destrüksiyonu ile sonuçlanan primer inflamatuvar cevabı arttıran genetik, moleküler ve hücresel faktörler konusundaki bilgilerimiz son yıllarda giderek artmıştır.

#### 4.1.2. İmmunogenetik

Aileler, tek ve çift yumurta ikizleri üzerindeki çalışmalar RA'nın inkomplet penetrans, genetik varyans gösteren ve multipl geni ilgilendiren kompleks bir genetik hastalık olduğunu düşündürmektedir. İlk çalışmalar RA'nın HLA-DR4 haplotipi ile ilişkisini göstermiştir (12). HLA-D bölgesindeki genetik organizasyon ve allelik polimorfizmin moleküler karakterizasyonu ile bu konudaki bilgilerimiz daha da artmıştır. Hastalığın, aslında HLA-DRB1 geni üzerindeki 67-74. aminoasitler arasındaki kısa bir dizilim ile ilişkisi sözkonusudur (13,14). RA ile bazı HLA-DRB1 allellerinin sık birlikteliğini değişik etnik populasyonlarda yapılan çalışmalar da desteklemektedir. Ancak, bu HLA allellerinin neden olduğu hastalığa duyarlılık bazı etnik gruplarda düşüktür. Yani, HLA molekülünün yanısıra genetik arka plan da önemlidir. Duyarlılığı artırdığı gösterilen HLA-DRB1 allellerinin dizilimlerinin karşılaştırılması, bu allelerin hepsinin 3. hipervariabl bölgedeki kısa bir aminoasit segmentini paylaştıklarını göstermiştir. HLA-DR molekülünün kristalografik yapısı düşünüldüğünde; bu aminoasitlerin yerleşimi T hücre reseptörü ile HLA molekülü interaksiyonunu etkileyebilecek bir bölgededir.

DR4 alleli taşımayanlarda hastalığın hafif gitmesi (15), buna karşılık iki ayrı HLA-DRB1-04 alleleline sahip hastalarda ekstrarartiküler bulgularla beraber ağır bir artrit seyretmesi, hastalığın progresyonunda da HLA-DR4'ün önemi olduğunu düşündürür (16).

#### 4.1.3. T hücreleri

Sinovyumu infiltre eden hücrelerin önemli bir kısmı T hücreleri olup, bunların önemli bir kısmını CD4+ T hücreleri oluşturmaktadır. Bilindiği gibi CD4+ T hücreleri HLA-DR molekülü içindeki antijenik peptidi tanır. Gerek RA'nın bazı HLA-DRB1 alleleriyle birlikteliği, gerekse sinovyumda görülen CD4+ T hücre infiltrasyonu RA patogenezinde CD4+ T hücrelerinin merkezi bir rol oynadığını düşündürür (17). Romatoid sinovyumda T hücre migrasyonunun anlaşılmasında oldukça önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Adezyon ve migrasyonu mümkün kılan çeşitli reseptör ve ligandlar belirlenmiştir. Bu reseptör ve ligandlar sinovyumdaki inflamasyona özgü olmayıp diğer

organlardaki kronik inflamasyonlarda da görülür (18). Sinovyal dokuda T hücresi-makrofaj arasında hücreden hücreye interaksiyon gösterilmiştir (19). Bu T hücresinin lokal bir antijeni tanıyıp aktive olduğunu düşündürür.

Ancak, bazı bulgular T hücrelerinin RA patogeneğinde önemli bir rol oynadığı tezini zayıflatırlar. Örneğin, sinovyumda aktive olmuş T lenfositlerinin oranı küçüktür. Sinovyal CD4+ T hücrelerinin sadece %10'u IL-2 reseptörü  $\alpha$  zinciri taşırlar. Ayrıca, sinovyal inflamasyonda T hücresinden salgılanan sitokinlerin rol oynadığını söyleyebilmek zordur (20). Hastalar arasında T hücresi repertuarının farklılık göstermesi ve T hücrelerini yok eden tedavilerle etkin sonuçlar elde edilememiş olması da T hücresinin patogeneğinde önemli bir rol oynadığı tezini zayıflatır. SCID fare modelinde, T hücrelerinin tamamen elimine edilmiş olduğu bir ortamda fibroblastlarla kıkırdak erozyonlarının oluşturulabilmiş olması hastalığın patogeneğinde fibroblastlara yönelik ilgiyi daha da arttırmıştır.

#### 4.1.4. Fibroblastlar

Sinovyal intimal tabaka makrofaj benzeri tip A sinovyositler ve fibroblast benzeri tip B sinovyositlerden oluşur. Gerek normal intima, gerekse hiperplastik romatoid dokuda tip A sinovyositler çoğunluğu oluşturur. Fibroblastlar eksprese ettikleri çeşitli adezyon molekülleri ile ekstrasellüler matrikse tutunurlar ve sinovyal sıvı boşluğuna hücre hareketini sağlarlar.

RA'da sinovyal membranda görülen hiperplazinin gerek tip A ve gerek tip B sinovyositlerin proliferasyonuna bağlı olduğu düşünülür. Ancak, dokuda belirgin mitozun görülmemesi, sinovyal hücrelere timidin inkorporasyonunun az olması bu düşünceye terstir (21). İmmunohistokimyasal yöntemlerle de dokuda aktif proliferasyon belirleyicileri gösterilememiştir (22). Ancak, erken destrüktif RA'lı hastaların sinovyal dokusunda c-myc gibi proliferasyon göstergesi genlerin artmış olarak eksprese olduğunu bildiren çalışmalar da vardır (23). Kıkırdak dokusunu destrükte eden MMP (*matrix metalloproteinase*) enzimlerinin önemlice bir kısmının kaynağı sinovyal intimal tabakadır. İn situ hibridizasyon

çalışmalarında, kollajenaz ve stromelizin mRNA'sı hemen sadece fibroblastlarda gösterilmiştir. MMP'lerin dokudaki doğal inhibitörleri olan TIMP (*tissue inhibitors of matrix metalloproteinase*) sinovyal tabakada bulunur. RA sinovyal hücrelerinde OA'ya göre kollajenaz ve stromelizin TIMP'e göre daha çok bulunması, bu hücrelerin daha destrüktif davranışını açıklayabilir (24). Kültüre edilmiş fibroblastların MMP salgıladıkları gösterilmiştir (25-26). Sinovyal sıvıda bulunan IL-1 ve TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerin kültür ortamına eklenmesiyle, MMP gen ekspresyonu ve protein yapımı artar (25,27,28). TGF- $\beta$  ve IFN- $\gamma$ , MMP üretimini azaltır ve matriksi koruyucu etki gösterirler (29,30). Katepsinler gibi diğer proteazlar da aktive fibroblastlar tarafından yapılır (31).

Romatoid sinovyumda, T hücresinden ziyade fibroblast veya makrofaj benzeri sinovyositler tarafından yapılan sitokinler bulunur (32). Makrofaj benzeri sinovyal hücreler IL-1, TNF- $\alpha$ , GM-CSF ve kemokin (33,34) yaparlar. IL-6 ve anjiyojenik etkileri olan fibroblast growth faktör (FGF) ve vasküler endotelial growth faktör (VEGF) fibroblast benzeri hücreler tarafından yapılır. IL-1 ve TNF- $\alpha$ , fibroblastları aktive ederek ilave GM-CSF ve IL-8 yapımını ve inflamasyonun medyatörleri olan proteazların ve küçük moleküllerin salınımını stimüle eder (35,36). Bu bilgilere dayanarak T hücresi ve makrofajlar tarafından salgılanan sitokinlerle fibroblastların uyarıldığı, inflamasyonun geliştiği ve kıkırdak doku destrüksiyonunun oluşmasında fibroblastların önemli rol oynadığı ileri sürülebilir.

Bir başka görüşe göre; romatoid fibroblastlar bir şekilde transforme olmuş, neoplastik davranış gösteren hücrelerdir. Bu hücrelerin, c-myc ve diğer onkogenleri önemli miktarda eksprese etmeleri bu görüşü destekler (37). Ancak, romatoid fibroblastların transformasyonunu destekleyen en önemli delil SCID fare modelidir. Bu fareler immun sistemleri olmadıklarından ksenograftları uzun süre için kabul edebilirler. Normal kıkırdakla beraber SCID fareye implante edilen romatoid sinovyal doku kıkırdak matriksini invaze ederek pannus benzeri görünüm oluşturur (38). Kontrol OA fibroblastları ise kıkırdağı invaze etmezler. Bu bulgular romatoid fibroblastların bir şekilde transforme

olarak otonomi kazandığını düşündürür. Sonuç olarak; çeşitli çalışmalar mekanizması ne olursa olsun fibroblastların RA patogeneğinde önemli bir rol üstlenmekte olduklarını düşündürmektedir.

## 4.2. APOPİTOZ

Çoğu hayvan hücreleri, kendilerine daha fazla ihtiyaç duyulmadığında veya ciddi hasara uğradıklarında intrensek bir hücre intihar programını harekete geçirerek, etrafa zarar vermeden kendi kendilerini yok etme yeteneğine sahiptirler. Bu ölümün gerçekleşmesi esnasında, hücrede karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler olur. Bu tip hücre ölümüne apoptoz veya PHÖ dendiğini giriş bölümünde ifade etmiştik. Hücre bu süreç içinde ölürken, morfolojik değişiklikler üç aşamada gerçekleşir (39). İlk aşamada, kromatin nükleusun periferinde kresentik kepler şeklinde kondanse olur. Nükleolus dağılır ve nükleer hacim küçülür. Total hücre hacminde azalma, hücre yoğunluğunda artma, sitoplazmik organellerde kompaktlaşma ve endoplazmik retikulumda dilatasyon gözlenir. Fakat mitokondriyumlar morfolojik olarak normal kalır. İkinci aşamada, sitoplazma ve nükleustan köken alan küçük, membrana bağlı, hücre yüzeyinden tomurcuklanıp daha sonra kopan çok sayıda apoptotik cisimcikler oluşur. Üçüncü aşamada ise geriye kalan nükleer ve sitoplazmik yapılarda dejenerasyon gelişir. Apoptotik hücre ve apoptotik cisimcikler makrofajlar veya komşu hücreler tarafından süratle fagosite edilerek sindirilirler. Bu şekilde ölü hücreler süratle temizlenerek zararlı ve doku için tehlikeli içerikleri etrafa yayılmamış olur. Bunun aksine, diğer bir ölüm şekli olan nekroz sırasında hücreler şişer, litik olarak parçalanır ve inflamatuvar bir cevabı tetikleyecek olan sitoplazmik materyel etrafa saçılır.

Apoptoz sırasında nükleazlar aktive olur ve kromozomal DNA önce büyük (50-300 kilobaz) ve daha sonra küçük oligonukleozomal fragmanlara parçalanır (40). Apoptoz, organizmanın gelişimi ve homeostazi için son derece önemlidir. Organizmanın şekillenmesinde ve hücre sayısının regülasyonunda majör bir rol oynar (41-43). Ayrıca, organizma için istenmeyen veya potansiyel tehlike taşıyan öz reaktif lenfositler, virüsle

enfekte olmuş hücreler, tümör hücreleri de bu yolla uzaklaştırılır (2,44,45). Tahmin edilebileceği gibi apoptozun başlaması oldukça dikkatli bir şekilde kontrol edilir. Hücrenin içinden veya dışından gelen birçok sinyal, hayat ve ölüm arasındaki verilecek karar üzerinde etkili olur. Bu sinyaller arasında iyonizan radyasyon veya viral infeksiyonla oluşan hücre hasarı, ekstrasellüler büyüme faktörleri, hücre etkileşimleri ve hormonlar sayılabilir (42,43,46). Bu sinyaller ölüm programını aktive ederler ya da suprese ederler. Bir hücre tipinde ölüm programını aktive eden bir sinyal, diğer bir hücre tipinde apoptozu engeller (47).

Apoptoz gelişimi, evolüsyon boyunca kısmen korunmuş gibi gözükken bir mekanizma ile olmaktadır. Bu nedenle vertebralılardaki apoptoz mekanizmalarının anlaşılması için, daha kolay elde edilebilen omurgasız hayvan modelleri kullanılmıştır. Aslında, bizim apoptoz genleri konusundaki bilgilerimizin çoğu bir nematod olan *C. elegans*'ta yapılan genetik çalışmalara dayanmaktadır. *C. elegans*'ta PHÖ, 4 basamakta gelişir.

1. Hücre ölecek mi yoksa yaşayacak mı kararının verilmesi
2. Hücrenin ölmesi
3. Ölen hücrenin fagositer hücreler tarafından fagosite edilmesi
4. Fagosite edilen materyelin degradasyonu

Bu basamakların her birini etkileyen mutasyonlar tesbit edilmiştir. Bütün somatik hücrelerde hücre ölümünü etkileyen üç gen gösterilmiştir ki bunlar; ced-3, ced-4 ve ced-9'dur. Bunlardan ilk ikisinin aktivitesi hücre ölümünün gerçekleşmesi için gereklidir. Sonuncusu olan ced-9 ise hücreyi apoptozu karşı korur, yani hücre ölümünü engeller (48). Bu gen, hücre ölümünü regüle eden bcl-2 ailesine homolog bir proteini kodlar (49,50). İnsan bcl-2 ekspresyonu ile nematodda hücre ölümü engellenebilir (49,51). Bu sonuçlar, hayvan evolüsyonu boyunca apoptotik yolun en azından bir kısmının iyi muhafaza edildiğini gösterir. Bu görüşü destekleyen bir başka bulgu da; *baculovirus*'a ait



antiapoptotik p35 proteini ile insekt, nematod ve memeli nöronlarında hücre ölümünün engellenmiş olmasıdır (52).

Hücrede protein sentezi ve mRNA sentezinin inhibisyonu ile hücre ölümünün engellendiğini bildiren çalışmalar, apoptozun aktif bir hücre intiharı olduğu konusundaki düşüncenin ilk dayanakları olmuşlardır (53). Ancak daha sonra diğer bazı sistemlerde protein sentezi ve mRNA sentezinin inhibisyonu ile hücre ölümünün engellenemediği ve hatta apoptozun uyarıldığı gösterilmiştir (43). Bu, apoptotik efektör moleküllerin çoğunun memeli hücrelerinde bulunduğu işaret eder. Bunu destekleyen en önemli bulgu da, nükleuslarından ayrılmış hücrelerde yapılan deneylerde elde edilmiştir (54). Bu sitoplastlar büyüme faktörlerinden yoksun bırakıldıklarında veya protein kinaz inhibitörü olan staurosporin'e maruz bırakıldıklarında apoptozun bütün karakteristik sitoplazmik morfolojik değişikliklerini gösterirler. Bcl-2 proteininden zengin hücrelerden hazırlanan sitoplastlar ise bu apoptotik değişikliklerden korunurlar. O halde, apoptozun önemli bir bölümü için yeni bir gen transkripsiyonu gerekli olmayıp, bcl-2 nükleus yokluğunda bile hücreyi bu sürece karşı korumaktadır.

Eğer, efektör apoptotik proteinler canlı hücrelerde hazır bulunuyorlarsa, onların potansiyel öldürücü etkisi sürekli baskılanmalıdır. Bir görüşe göre hücreler aslında ölüme programlanmışlardır. Hayatta kalmak için diğer hücrelerden sürekli yaşama sinyallerine ihtiyaç gösterirler. Gerçekten, memelilerdeki birçok hücre hayatta kalmak için başka hücreler tarafından salgılanan ekstrasellüler faktörlere muhtaçtırlar (42-43). Belirli bir dokuda farklı tipteki hücrelerin birbiriyle uyumlu oranlarda idamesi böyle bir sosyal kontrolle sağlanmaktadır.

Çeşitli hayatta kalma faktörleri ve reseptörleri moleküler düzeyde tanımlanmıştır (55). Fakat, aktive olmuş reseptörlerin apoptotik programı nasıl regüle ettiği hala net değildir. Hayatta kalma faktörleri, zararlı efektör ölüm faktörlerinin aktivitesini veya miktarını zararsız düzeylere düşürerek ya da bcl-2 gibi antiapoptotik proteinlerin sentezini uyarak hücre ölümüne karşı koyarlar.

Apoptotik hücre ölümünün nedeni ve mekanizması hala bilinmemektedir. Hücre ölümünün erken dönemlerinden itibaren nükleer değişikliklerin görülmesine dayanılarak, hücrelerin endonükleolitik yoldan DNA'larının parçalanmasının sorumlu olabileceği iddia edilmiştir (40,56). Ancak, nükleuslarından ayrılmış hücreler önemli bir süre fizyolojik fonksiyonlarını koruyarak uyarıldıklarında apoptozun karakteristik sitoplazmik değişikliklerini gösterirler. Ayrıca, izole nükleuslar hücre dışı ortamda kondansasyon ve DNA degradasyonu gösterebilirler (57). Bu gözlemler, birden fazla faktörün ölüme katkıda bulunduğunu ve değişik hücre kompartmanlarının birbirinden bağımsız olarak apoptozun yapısal değişikliklerini gösterebildiklerini düşündürür.

Bcl-2'nin peroksidle oluşan hücre ölümünü, bazı antioksidanların sitokin deprivasyonu ile uyarılan apoptozu engellemeleri nedeniyle, reaktif oksijen radikallerinin apoptozu açabileceği ve bu sürecin bcl-2 ile regüle edilebileceği iddia edilmiştir (58). Ancak, mitokondriyal respirasyon olmadan da apoptoz ve bcl-2 korunması gösterilebilmiştir (59).

Apoptoz ve hücre siklusu arasında birçok benzerlikler vardır. Aşırı sayılabilecek bir görüşe göre apoptoz aberan bir mitozdur (60). Apoptoz ve mitoz arasındaki ilişkiyi destekleyen bir bulgu; hücre proliferasyonunda rol oynayan bazı genlerin (ör. p53, c-myc, E1A, cyclin D1, c-fos) apoptozun gelişiminde de rol oynamasıdır (45,61,62). Bu genlerden bazıları özel durumlarda apoptozu etkilerler. Örneğin kromozal bir hasar olduğunda apoptozun gelişmesi için p53 gerekir (63). Hücre proliferasyonu ile ilişkili c-myc aberan ekspres edildiğinde apoptozu açabilir (62). Öte yandan myc ile uyarılan hücre ölümü için p53 gereklidir (3). Apoptozun bazı komponentleri mitoz dahil diğer hücre olaylarla bazı ortak süreçleri paylaşıyor gibi görünmektedir.

#### **4.2.1. Sistein proteazların apoptozdaki rolü**

Nematod *C.elegans* ile yapılan genetik çalışmalar bütün somatik hücrelerin ölümü için gerekli iki genin saptanmasına yol açmıştır ki bunlar; ced-3 ve ced-4'dür (65). Bunlardan birisi inaktive edilirse, gelişim sırasında normal olarak ölmesi gereken hücreler



hayatta kalır. Genetik mozaik çalışmalar bu iki genin ölmekte olan hücrede otonom faaliyete geçerek hücre ölümüne aracılık ettiğini düşündürür (66). Bu iki genden birinin mutasyonu, ced-9 genini taşımayan hayvanlarda ektopik hücre ölümünü engeller (48). Ced-3 ve ced-4 genleri klonlanarak moleküler olarak tanımlanmıştır. Ced-4, diğer polipeptidlere benzemeyen 63 kD büyüklüğünde bir proteindir. Ced-3 ise ICE (*IL-1 $\beta$ -converting enzyme*), edd-2/Ich-1, ve CPP32'nin dahil olduğu sistein proteinaz ailesine benzer bir proteindir (66-70). Birçok çalışmadan elde edilen sonuçlar, ICE veya onunla ilişkili bir proteinin memeli hücre ölümüne yol açtığını düşündürür. Gerçekten de, ICE inhibitörü olan bir cowpox geni olan crm-a'nın ekspresyonu, büyüme faktörü yoksunluğu ile gelişecek olan apoptozu engeller (71). Poly(A)DP riboz polimeraz, laminler ve U1-70 kd proteolitik enzimlerin hedefi olan üç proteindir.

ICE, proteinlerdeki asparajin-aminoasit bağlarını böler. Bu özelliği ile *granzyme-B*'ye benzer. *Granzyme-B* sitotoksik T lenfositlerinin (CTL) yol açtığı, apoptozda rol oynayan bir serin proteazdır. Nematodlarda PHÖ'nün başlamasında rol oynayan 3 genden ikisi olan ced-3 ve ced-4'ün benzerleri memelilerdeki apoptozda da rol oynamaktadır.

#### 4.2.2. Apoptozun düzenleyicileri

Öyle gözüküyor ki; birbirinden farklı birçok sinyal yollarının bulunduğu ortak bir apoptotik yol vardır. Bcl-2 ve *baculovirus* proteini p35 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu birçok öldürücü sinyalin etkisini inhibe eder (50,52). O halde, bu proteinler farklı sinyalizasyon yollarındaki ortak komponentler ile ilişkili olmalı veya ortak bir apoptotik yola ulaşıldıktan sonraki bir basamağı engellemeliler. Farklı sinyal yollarının ortak bir apoptotik yolda konverjansını anlamaya yönelik çalışmalar bir meyve sineği olan *Drosophila Melanogaster*'den elde edilmiştir. Bu canlıdan elde edilen bir gen olan *reaper* geni, farklı sinyalizasyon yollarındaki bilgiyi ortak bir apoptotik yola entegre eder (72). Bu genin delesyonu, bilinen bütün apoptotik sinyaller ile apoptozu engeller. Öte yandan bu genin ekspresyonu, *Drosophila*'da apoptozu indükler (72). Bu sonuçlar, *Drosophila*'da *reaper* geninin genel bir apoptoz aktivatörü olduğunu düşündürür. Çalışmalar bu genin

ölüm efektörü olan bir regülatör olarak fonksiyon gördüğünü düşündürür. Bunu da, ced3/ICE benzeri proteazları aktive ederek veya ced-9/bcl-2 gibi antiapoptotik genleri ya da ürünlerini inhibe ederek yapmaktadır.

#### 4.2.3. Protein sentezi ve apoptoz

*Drosophila*'da apoptozun gelişmesi için *reaper* geninin transkripsiyonu şart olmasına karşın memeli hücrelerinde durum farklı gözükmemektedir. Çünkü, memeli hücrelerinde, *de novo* protein sentezi olmadan da apoptoz gelişebilir. Bu, *Drosophila* ve memeli hücreleri arasındaki farktan ileri gelebilir. Bir görüşe göre, hücrenin hayatiyeti için bazı koruyucu anti-apoptotik proteinlerin sürekli sentezi gereklidir. Protein sentezi inhibe edildiğinde hem koruyucu proteinler, hem de apoptotik proteinler azalmaya başlar. Protein sentezi inhibe edildiği anda hücredeki proteinlerin rölatif miktarına, aktivitelerine ve stabilitelere göre farklı hücrelerde farklı sonuçlar ortaya çıkar. Protein sentezi veya mRNA sentezinin inhibisyonu ile, bazı hücrelerde apoptoz inhibe olurken bazı hücrelerde apoptoz gelişmesinin bugünkü bilgilere göre tek akla yakın açıklaması budur.

#### 4.2.4. Fas, ölüm faktörü

1989 yılında iki grup, çeşitli hücre hatları için sitolitik monoklonal antikorlar elde ettiler (73,74). Bu antikorlar tarafından tanınan hücre yüzey proteinlerine Fas ve APO-1 dendi. Daha sonra da Fas komplementer DNA'sı izole edildi. APO-1'in cDNA'sı da izole edilince, onun da Fas ile aynı protein olduğu anlaşıldı. Farelerde insan Fas antijenini taşıyan, transforme olmuş hücrelerde Fas antikoruna ile 5 saat içinde apoptoz geliştiği görülerek bu proteinin fonksiyonu anlaşıldı.

Fas, TNF ve NGF (*nerve growth factor*) reseptörleri ailesine aittir (75-77). Bu ailede TNF-R1, TNF-R2, NGF reseptörü, CD40, OX 40, CD 27, 4-1BB, ve CD30 bulunur (78). Bu aile üyelerinin ekstrasellüler bölgeleri, sisteinden zengin 3-6 kısımdan oluşur. Bunların ekstrasellüler aminoasit dizilimi birbirlerine benzer. İntrasitoplazmik kısımlar arasında ise sadece TNF-R1 ve Fas arasında benzerlik vardır. Bu kısım apoptotik sinyalin transduksiyonu için gereklidir (79).

İnsanlarda Fas geni 10. kromozomun uzun kolu üzerindedir (80). Birçok doku ve hücre hatları değişen miktarlarda Fas eksprese ederler. IFN- $\gamma$ , değişik hücre hatlarında Fas ekspresyonunu artırır (74,75,77). TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  kombinasyonu, B lenfositlerinde hem Fas ekspresyonunu, hem de anti-Fas ile sitotoksik etkiyi artırır (74). Fas antijeninin yapısı, onun bilinmeyen bir sitokin reseptörü olduğunu düşündürmüştür. Yapılan çalışmalar sonucu Fas ligandı izole edilmiştir (81). Fas reseptörünün Fas ligandı veya Fas antikoru ile uyarılması ile sitoplazma ve nükleus kondansasyonu, DNA fragmentasyonu gibi karakteristik bulgularıyla apoptoz gelişmektedir. Apoptozun gelişmesi için Fas ekspresyonu yeterli değildir. Hücredeki bcl-2 ve hücre ölümünü modüle eden diğer faktörler de önemlidir.

Fas ve TNF-R1'in intrasitoplazmik ölüm kısımları ortak olmasına rağmen, Fas ve TNF-R1 transdüksiyonu ile gelişen hücre ölümleri arasında farklar vardır (82-84). Ancak, Fas yolunda da TNF stimülasyonunda olduğu gibi muhtemelen sfingomiyelinaz aktivasyonu ile ceramid bir ikincil *messenger* olarak ortaya çıkar ve bu da protein kinazı aktive eder (85).

#### 4.2.5. Fas, Fas ligandı ve otoimmünite

Fas sistemi, normal aktive olmuş lenfositlerin ve bazı virüslerle enfekte olmuş hücrelerin eliminasyonunda rol oynar. Fas veya Fas ligandında mutasyon, lenfositlerin akumulasyonuna ve farede otoimmün hastalıkların ortaya çıkmasına yol açar. Fas antikorlarının fareye enjeksiyonu birkaç saat içinde ölümle sonuçlanır (86). Bu bulgular Fas sisteminin insanda iki şekilde hastalığa yol açabileceğini düşündürür:

1. Fas antijeninin eksik fonksiyonu ile hastalıklar ortaya çıkabilir. Farelerdeki lpr (lenfoproliferatif) ve gld (genel lenfadenopati) mutasyonları bu kategoride olup lpr farelerdekine benzer fenotipe sahip birçok hasta bildirilmiştir (87). Bu hastaların kusurlu Fas veya Fas ligandına sahip olmaları mümkündür. Lpr ve gld fareleri otoantikorlar dahil, bol miktarda immünglobulin yaparak insandaki SLE (sistemik lupus eritematozus) benzeri bir hastalığa yakalanırlar. Nitekim, bazı SLE li hastaların serumunda artmış miktarda solubl

Fas antijeni bulunmuştur (89). Solubl Fas, Fas ligandını bloke ederek apoptozu, dolayısıyla aktive lenfositlerin eliminasyonunu engelleyerek SLE fenotipine yol açıyor olabilir (89).

2. Fas sistemiyle ilişkili ikinci bir hastalık kategorisi Fas sisteminin aşırı aktivitesine bağlı olabilir. HIV enfeksiyonu sırasında CD4+ T lenfositlerin eliminasyonunda Fas'ın rol oynadığına dair giderek artan bulgular bildirilmektedir. Nitekim HIV ile enfekte olan çocukların lenfositlerinde belirgin olarak artmış Fas ekspresyonu gösterilmiştir (90).



## 5. MATERYEL VE METOD

**Hücre kültürü:** RA'lı üç hastadan sinovektomi ile ve sağlıklı bir kişiden postmortem olarak alınan sinovyal dokudan ve sağlıklı 3 kişinin derisinden fibroblast kültürleri elde edildi. Sinovyal doku yağdan temizlendikten sonra, bistüri ile küçük parçalara bölünerek önceden hazırlanmış dispaz solüsyonuna kondu. Dispaz solüsyonu 150 mg Dispaz (Boehringer-Mannheim) 100 ml Joklik medyumuna (Gibco BRL, Eggenstein, Almanya) koyarak elde edildi. Bu solüsyon kullanılmadan önce 0.2 µ kalınlığındaki filtreden geçirilerek sterilize edildi. Parçalanmış sinovyal doku steril bir flaska konuldu. Üzerine 10 ml dispaz solüsyonu eklenerek 37°C'de 200/dakika sallanacak şekilde 60 dakika enkübe edildi. Sıvı kısım toplanarak 2000'g de 10 dakika santrifüje edildikten sonra hücre çökeltisi komplet DMEM ( Dulbecco's Modified Eagle's Medium ; Gibco BRL, Eggenstein, Almanya) vasatı içinde çözüldü. Dokunun enzimatik parçalanma işleminin sonuna kadar buz üzerinde bekletildi. Kalan doku parçaları ise gene 10 ml Dispaz solüsyonunda 30 dakika daha bekletildi. Süpernatant tekrar santrifüje edilerek hücre çökeltisi tekrar komplet DMEM içinde çözüldü. Bu işlem son kez tekrarlandıktan sonra, elde edilen hücre süspansiyonları karıştırılarak hücre sayısı  $1-2 \times 10^6$  milyon/ml olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra, 75 cm<sup>2</sup>'lik steril flaslara konup büyümeye bırakıldı. Hücreler, ekildikleri flask yüzeyini doldurduklarında yeni pasajlar yapıldı. Çalışmada, ikinci-dokuzuncu pasajlar kullanıldı. Pasaj yapılırken hücrelerin yapıştıkları flask yüzeyinden ayrılabilmesi için tripsinizasyon gerekti. Bunun için flastaki beklemiş vasat uzaklaştırıldı. Flask PBS (fosfat tamponlu solüsyon) ile yıkandıktan sonra içine 7 ml Trypsin-EDTA (Gibco BRL, Eggenstein, Almanya) konarak 37°C'de 8 dakika enkübe

edildi. Üzerine 15 ml inkomplet DMEM vasatı ilave edilerek tripsin inaktive edildi. Hücre süspansiyonu 2000 g'de santrifüj edildikten sonra, fibroblastlar tekrar 45 ml komplet DMEM vasatı içinde çözünerek her bir yeni flaska 15 ml konuldu. Böylece, her pasajda bir flasktan üç yeni flask hücre kültürü elde edilmiş oldu.

**Komplet DMEM vasatı:** DMEM, %10 FCS, 1.5 mM L-Glutamine, 100 U/ml penisilin, 100 u/ml streptomisin, 10 mM H HEPES tampomu ( Gibco BRL, Eggenstein, Almanya). Hücrelerin büyümeye bırakıldıkları durumda daima komplet DMEM vasatı kullanıldı.

**İnkomplet DMEM vasatı:** L- glutamin içermeyen komplet DMEM vasatı. İnkomplet vasat hücre pasajları yapılırken tripsin inaktivasyonu yapılması için kullanıldı.

**Sitokinler:** Sitokinler satın alındıkları firma (PeproTech, EC Londra, İngiltere) tarafından, biyolojik etkinlikleri için tavsiye edilen maksimal konsantrasyonlarda kullanıldılar: IL-1 $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), IL-10 (20 ng/ml), IL-17 (20 ng/ml), TNF- $\alpha$  (20 ng/ml), IFN- $\gamma$  (10 ng/ml), GM-CSF (5 ng/ml), PDGF-AA (10 ng/ml), bFGF (10 ng/ml), TGF- $\beta$  (5 ng/ml). Sitokin stimülasyonu iki amaçla yapıldı:

1. Sitokin stimülasyonundan 24- 72 saat sonra fibroblastların Fas ekspresyonunda bir değişiklik olup olmadığını,
2. Fas stimülasyonundan 24 saat önce yapılan sitokin stimülasyonu ile Fas-IgM'e hücrelerin apoptotik cevabında bir azalma veya artış olup olmadığını araştırmak.

**Fas ekspresyonunun flow sitometri (FC) ile değerlendirilmesi:** Sinovyal hücreler, %10 FCS'li DMEM içinde  $2 \times 10^5$ /kuyu fibroblast olacak şekilde 6 kuyulu plaklara (Costar, Cambridge, MA) ekilerek büyümeye bırakıldı. Yukarıda adı geçen sitokinlerle stimüle edilen ve edilmeyen hücreler kısa bir tripsinizasyon ile plaklardan toplandı. PBS ile bir kez yıkandıktan sonra FITC ile konjuge anti-Fas IgG antikorunu (PharMingen, Almanya) ile boyandı. Bunun için  $2 \times 10^5$  hücre, 2.5  $\mu$ l antikor ile +4°C'de karanlıkta 30 dakika enkübe edildi. PBS ile bir kez yıkandıktan sonra, 300  $\mu$ l PBS içinde

çözünerek EPICS Profile II model , Coulter FC ile ( Coulter, Hamburg, Almanya) analiz edildi. FITC ile konjuge izotipik bir antikor kontrol olarak kullanıldı. Sitokinlerle olan Fas ekspresyonu induksiyonu ortalama kanal floresanlarından (OKF) şöyle hesaplandı: rölatif OKF=  $(OKF_{sitokin}-OKF_{kontrol})/(OKF_{medyum}-OKF_{kontrol})$ . Sitokinler, Fas ekspresyonunun induksiyonu için yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda 24-72 saat enkübe edildiler. Ancak, 24, 48, 72 saat arasındaki enkübasyonlarda bir fark görülmemesi üzerine, sonraki enkübasyonlar hep 24 saatte yapıldı.

**Fas Stimülasyonu:**Altı kuyulu veya 96 kuyulu plaklar içinde komplet DMEM ile büyüyen fibroblastlar son konsantrasyon 1000 ng/ml olacak şekilde anti-Fas IgM ( Klon CH-11; Coulter,Almanya) ile 48 saat stimüle edildiler. Altı kuyulu plaklar apopitoz, 96 kuyulu plaklar ise proliferasyon deneylerinde kullanıldılar.

**Apoptozun belirlenmesi:** Fas stimülasyonundan sonra apoptozun gelişip gelişmediği aşağıdaki metodlarla araştırıldı. Fas antikorunun etkinliğini kontrol etmek için Jurkat hücreleri, fibroblastlarda apoptozu saptamada kullanılan yöntemlerin kontrolü için ise 0.5 µg/ml konsantrasyonunda Actinomisin-D (Act-D; Alexis Corporation, Almanya) kullanıldı. Jurkat hücrelerinin Fas antikoruna ile, fibroblastların ise Act-D ile apoptoza uğradıkları bilinmektedir (6).

**a) Morfolojik değerlendirme:** Morfolojik olarak apoptoza uğrayan hücreler inversiyonlu faz kontrast mikroskopisi ile incelendiğinde, fibroblastlarda iğsi görünüm kaybolur. Hücre yuvarlak bir şekil kazanır ve hücre, plak tabanına adheransını kaybederek kültür vasatı içinde yüzmeye başlar (Resim 1). Fibroblastlardaki bu karakteristik değişikliklerden yararlanarak, apoptozun tesbitinde inversiyonlu faz kontrast mikroskopisi kullanılmıştır.

**b) Anneksin bağlanması:** Apoptotik hücreler yüzeylerinde fosfatidil serini eksprese ederler. Anneksin V fosfatidil serine kuvvetle bağlandığı için, floresanla işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak apoptotik hücreler flow sitometre ile ölçülebilir (91). Bunun için, fibroblastlar PBS ile yıkandıktan sonra hücre dansitesi  $2-5 \times 10^5$ /ml olacak



şekilde Anneksin bağlama tamponu ile (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 µm delikli filtre ile filtre edilmiş) sulandırıldı. 195 µl hücre süspansiyonu üzerine 5µl Anneksin FITC (Alexis Corporation, Almanya) konarak 10 dakika karanlıkta bekletildi. Hücreler bir kez yıkandıktan sonra, tekrar 300 µl bağlama tamponunda sulandırılarak FC ile analiz edildi.

**c) PI boyanması :** Altı kuyulu plaklarda Fas stimülasyonu yapıldıktan sonra fibroblastlar tripsinize edilerek toplandı. Hücreler 50µl/ml PI (Propidyum Iodid; Sigma, Almanya), %0.1 sodyum sitrat ve %0.1 Triton X-100 içeren hipotonik bir solüsyonda leze edilerek, nükleusları PI ile boyandı (92). PI ile DNA'sı boyanan nükleusların floresansları Coulter flow sitometre ile ölçüldü. Bu metod kullanıldığında, apoptotik olmayan hücreler hücre siklusunun G<sub>0</sub> ve G<sub>1</sub> fazını temsil eden yüksek floresans intensitesinde dar bir tepe şeklinde (diploid tepe) ve hiperdiploid DNA içeriği olanlar (S ve G<sub>2</sub>/M fazı) ise daha yüksek bir floresan intensitesinde (tetraploid tepe) kendilerini gösterirler. Bunun aksine apoptotik hücreler, parçalanmış DNA materyelinin bir kısmını kaybettiği için daha az DNA içeriğine sahiptirler . Bu yüzden PI ile daha az boyanarak, diploid hücrelerden daha düşük floresan şiddetinde geniş bir tepe (hipodiploid) gösterirler. Apoptotik hücre yüzdesi şu formülasyona göre hesaplanır: Apoptotik hücre% = (hipodiploid hücre % /hipodiploid, diploid, hiperdiploid hücre%)x100

**H<sup>3</sup> timidin proliferasyon deneyi:** Proliferasyon deneyleri Vilcek Tarafından tarif edildiği şekilde yapıldı (93). Kısaca, fibroblastlar, 100 µl komplet DMEM içinde 5x10<sup>3</sup>/kuyu olacak şekilde 96 lık düz dipli hücre plaklarına ekildiler (Nunc, Kamstrup, Danimarka). CO<sub>2</sub> enkübatöründe 37<sup>0</sup>C'de bir gece bekletildikten sonra, test edilecek kuyulara son konsantrasyon 1000 ng/ml olacak şekilde anti-Fas IgM veya kontrol kuyularına medyum eklendi. Yetmişiki saatlik enkübasyonun son 24 saatinde her kuyuda 0.5 µCi olacak şekilde H<sup>3</sup> timidin (Amersham, Braunschweig, Almanya) ilave edildi. Yarı-otomatik bir hücre harmanlayıcısı (*cell harvester*) kullanarak cam filtrelerde hücreler harmanlandıktan sonra inkorpore olmuş H<sup>3</sup> timidin beta sayacı ile ölçüldü. Sonuçlar



triplikat ölçümlerin ortalaması olarak belirtildi. Eğer anti-Fas stimülasyonu hücre ölümüne yol açıyorsa H<sup>3</sup> timidin tutulumunda bir azalma olması gerekiyordu.

**İstatistiksel analiz:** Sitokin ile stimülasyon yapılan ve yapılmayan fibroblastların FC ile ölçülen OKF değerleri ve anti-Fas ile stimülasyon yapılan ve yapılmayan fibroblastların H<sup>3</sup> timidin testi sonuçları Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Aynı test kullanılarak deri ve sinovyal fibroblastlar arasında bir fark olup olmadığı araştırıldı. P değeri < 0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## 6. BULGULAR

**Fibroblastlarda Fas antijen ekspresyonu:** FITC ile işaretli anti-Fas antikorları ile fibroblastlar boyandıktan sonra, FC ile yapılan ölçümlerde elde edilen ortalama OKF değerleri ( $1.60 \pm 1.57$ ) kontrol antikoruyla elde edilen ortalama OKF değerlerine ( $0.47 \pm 0.44$ ) göre daha yüksekti ( $n=45$ ,  $p<0.000001$ ). Bu sonuçlar fibroblastların Fas antijenini eksprese ettiklerini açıkça ortaya koydu. Anti-Fas ile boyanan sinovyal fibroblastların ortalama OKF değerleri ( $n=22$ ,  $1.77 \pm 2.03$ ) ve deri fibroblastlarınınkiler arasında anlamlı bir fark yoktu ( $n=23$ ,  $1.38 \pm 0.82$ ).

**Fibroblastlarda apoptoz:** Kullanılan yöntemlerin hiçbiri ile Fas stimülasyonu ile artmış sinovyal veya deri fibroblastlarında artmış bir apoptoz saptanmadı.

*Morfolojik olarak* normal fibroblastlar iğsi yapıda olup, kültür plağının tabanına yapışır (Resim 1a). Act-D ile enkübe edilerek apoptoza uğrayan fibroblastlar ise yuvarlak bir şekil alırlar, sitoplazmaları küçülür ve adheranslarını kaybederek kültür vasatı içinde yüzer durumu gelirler (Resim 1c). Ani-Fas stimülasyonu ile fibroblastlarda bu morfolojik değişiklikler görülmedi (Resim 1b).

*PI boyanması* ve sonrasında yapılan FC ölçümlerinde Fas stimülasyonu ile artmış bir apoptoz saptanmadı (Şekil 1). Fas ile stimüle edilen hücrelerin ortalama % 91'i (ORT  $\pm$  SD;  $91 \pm 3$ ,  $n=10$ ), stimülasyon yapılmayan hücrelerin ise % 93'ü (ORT  $\pm$  SD;  $93 \pm 4$ ,  $n=10$ ) non-apoptotikti. Dermal ve sinovyal fibroblastlar arasında bir fark yoktu.

*Anneksin V boyanması* ve sonrasında yapılan sitometrik ölçümlerde de artmış bir apoptoz görülmedi (Şekil 1). Fas ile stimüle edilen hücrelerin ortalama % 90'ı (ORT  $\pm$

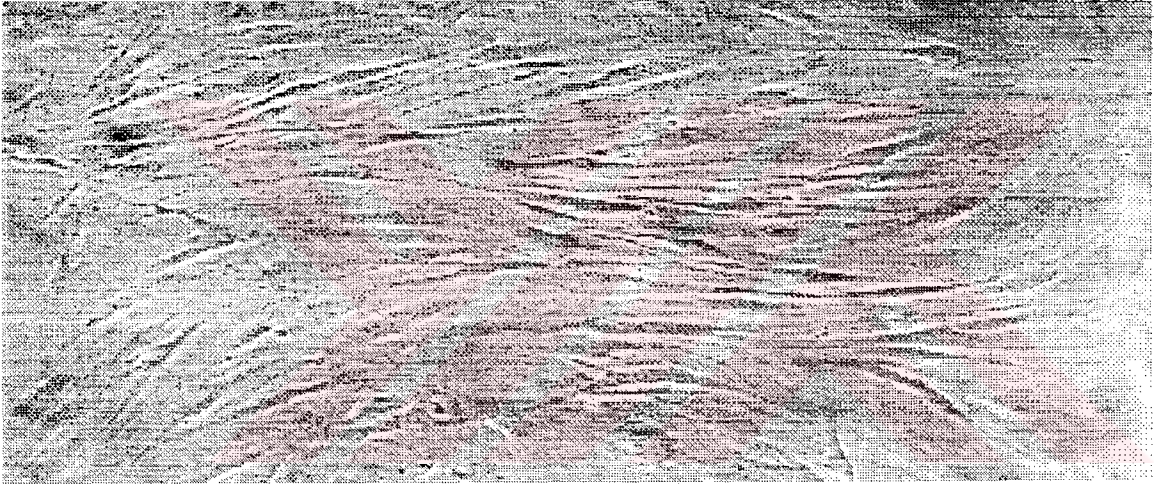
SD;  $90 \pm 3$ , n=10), stimölasyon yapılmayan hücrelerin ise % 94'ü (ORT  $\pm$  SD;  $94 \pm 4$ , n=10) non-apoptotikti. Dermal ve sinovyal fibroblastlar arasında bir fark yoktu.

**Sitokin stimölasyonu:** Kullanılan sitokinlerin hiçbirini ile fibroblastlarda artmış apoptoz görülmedi. Ancak, Fas ekspresyonu için FC ile yapılan ölçümlerde elde edilen OKF değerleri, kontrollere göre ortalama TNF- $\alpha$  ile 2.8 kat ( $2.8 \pm 2.1$ , n=20, p< 0.001) ve IFN- $\gamma$  ile 2.3 kat ( $2.3 \pm 1.9$ , n=20, p< 0.01), IL-1 $\beta$  ile 1.7 kat ( $1.7 \pm 0.4$ , n=20, p< 0.001), IL-1 $\alpha$  ile de 1.6 kez ( $1.6 \pm 0.5$ , n=20, p< 0.001) arttı (Şekil 2). Deri ve sinovyal fibroblastlar arasında herhangi bir fark bulunmadı. Sitokinlerle Fas ekspresyonunun artırılmasından sonra da Fas reseptörü uyrılması apoptoza yol açmadı (Şekil 3).

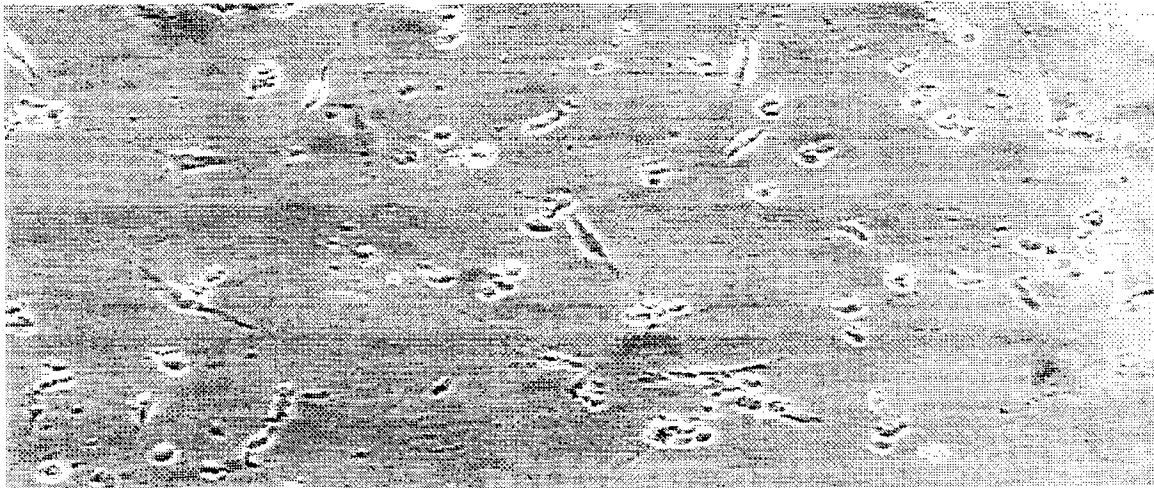
**H<sup>3</sup> timidin proliferasyon deneyi:** Fas stimölasyonu ile hem deri hem de sinovyal fibroblastlarda H<sup>3</sup> timidin tutulumunda küçük, fakat anlamlı bir artış saptandı. Ortalama ccpm değerleri, stimölasyon yapılan deri fibroblastlarında ( $5148 \pm 637$ ) ve sinovyal fibroblastlarda ( $2010 \pm 780$ ) kontrollere göre daha yüksekti (sırasıyla,  $4606 \pm 1157$ ;  $1731 \pm 1070$ ) (Şekil 4).



**Resim 1a:** Fibroblastlar kültür vasatında 48 saat beketildiler

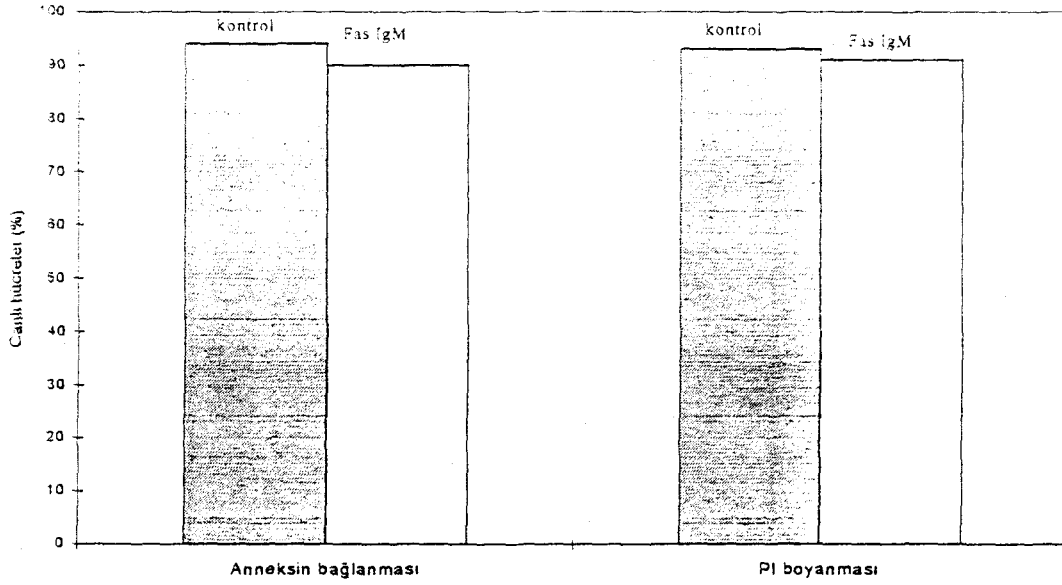


**Resim 1b:** Fibroblastlar anti-Fas-IgM (1000 ng/ml) ile 48 saat enkübe edildiler

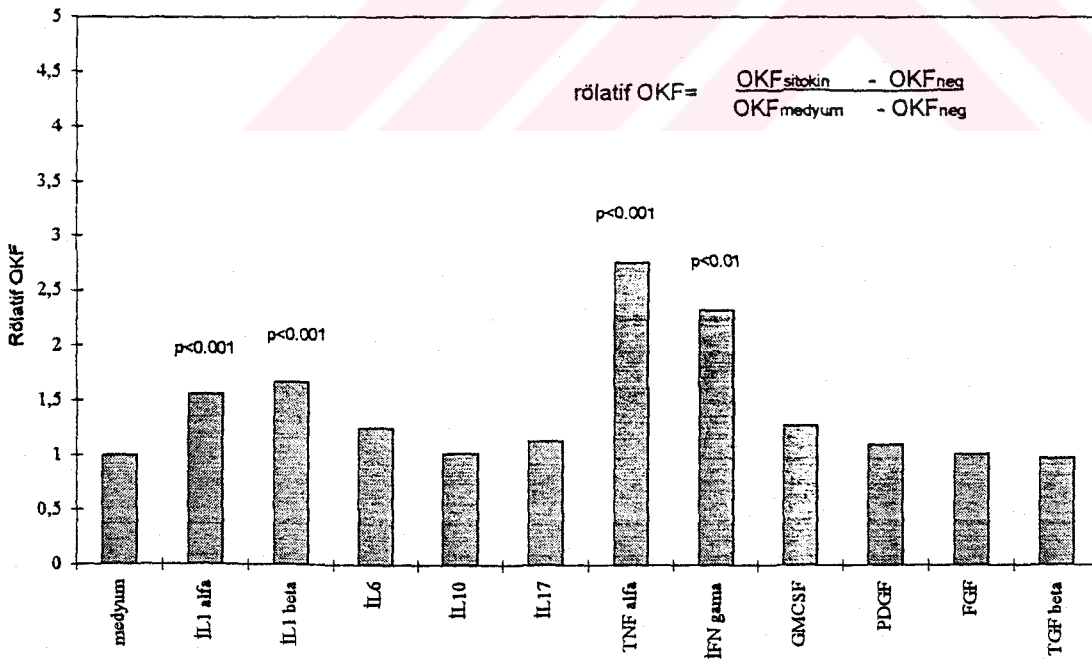


**Resim 1c:** Fibroblastlar 48 saat Act-D (0.5µg/ml) enkübe edildiler

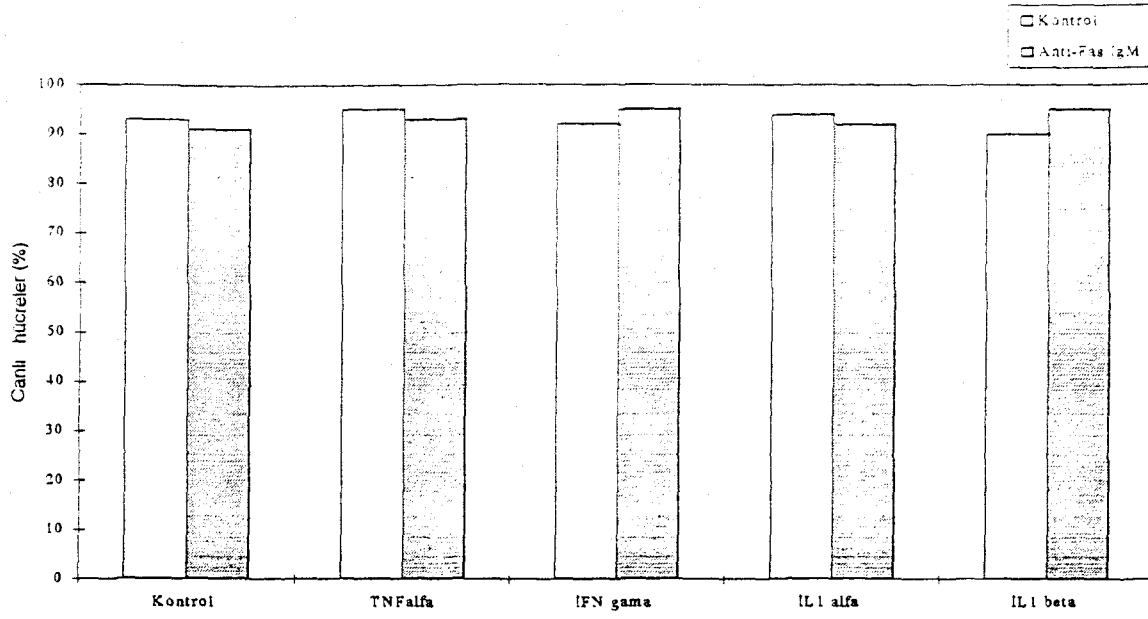




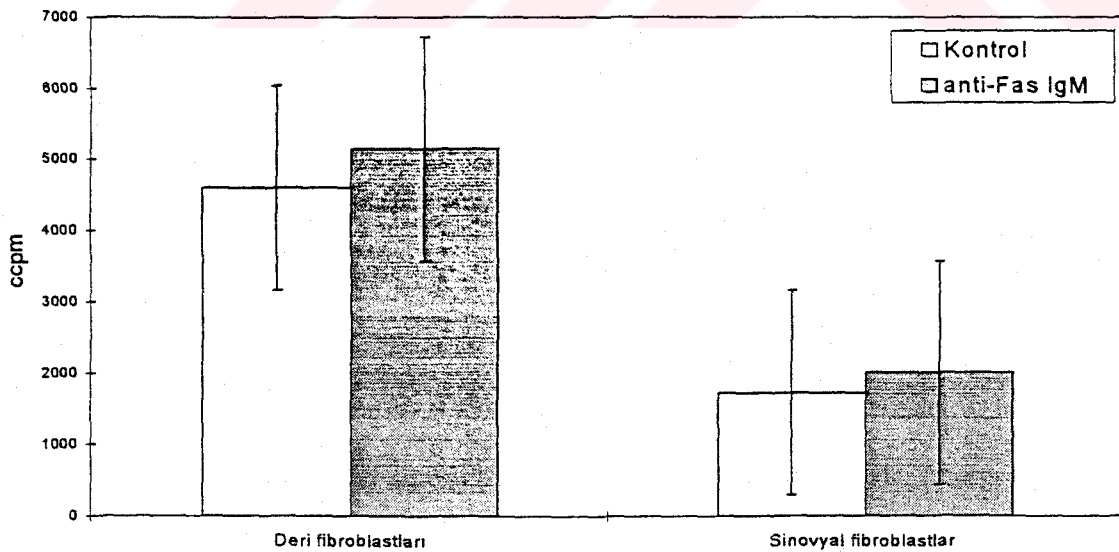
**Şekil 1.** Anti-Fas IgM (1000 ng/ml) ile 48 saat stimülasyondan sonra fibroblastlarda apoptoz annexin bağlanması ve PI boyanması yapılarak FC ile ölçüldü (n=10). Non-apoptotik hücreler canlı hücre olarak kabul edildi



**Şekil 2.** Deri ve sinovyal fibroblastlar çeşitli sitokinlerle 24 saat stimüle edildikten sonra Fas ekspresyonundaki rölatif artış FC ile ölçüldü(n=20).



**Şekil 3:** Fibroblastların Fas ekspresyonunu arttıran sitokinlerle önceden enkübe edilmesi anti-Fas duyarlılığına yol açmadı. Apoptoz PI boyanması ve FC ile ölçüldü (n=4). Non-apoptotik hücreler canlı hücre olarak kabul edildi.



**Şekil 4:** Fibroblastların anti-Fas IgM ile stimülasyonu H<sup>3</sup> tutulum testine göre anlamlı proliferasyona yol açtı (p<0.05). Sonuçlar ortalama ± SD olarak gösterilmiştir (n=11).

## 7. TARTIŞMA

Romatoid artrit, sinovyal doku hiperplazisi, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kemik erozyonları ile karakterize bir hastalıktır. Sinovyal dokudaki artmış hiperplaziden, sinovyal proliferasyonunun yanısıra azalmış apoptozun da sorumlu olabileceği düşüncesiyle, son yıllarda sinovyal dokudaki değişikliklerde apoptozun rolü araştırılmaktadır.

Bu amaçla, RA'lı hastalardan elde edilen sinovyal lenfositlerde ve fibroblastlarda apoptoz araştırılmıştır. Bir çalışmada, sinovyal sıvı ve sinovyal doku lenfositlerinin CD 95 (Fas antijeni) eksprese ettikleri ve CD 95 uyarılması ile apoptoza uğradıkları, ancak Fas ligandını eksprese etmedikleri ya da çok az eksprese ettikleri bildirilmiş ve kusurlu Fas ligandı ekspresyonu nedeniyle aktive olmuş T lenfositlerinin ortadan kaldırılmasındaki yetersizliğin RA patogenezinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (94). Buna karşılık bir başka çalışmada, sinovyal dokudaki lenfositlerin % 40 ile 60'ının Fas antijenini eksprese ettikleri, sinovyal dokuya infiltre olmuş T lenfositlerinde ise artmış Fas ligandı ekspresyonu olduğu ve Fas uyarılması ile selektif olarak otoreaktif T lenfositlerinin apoptoza duyarlı oldukları ileri sürülmüştür (95). Sinovyumdaki T lenfositlerinde artmış Fas antijeni ve Fas ligandı ekspresyonunun ve Fas reseptörünün uyarılmasıyla gelişen apoptozun, OA'da görülmeyen, RA'ya özgü bir bulgu olduğu da bildirilmiştir (96,97).

Sinovyal fibroblastlarda yapılan çalışmaların sonuçları da çelişkilidir. İlk çalışmalarda, sinovyal fibroblastların Fas reseptörünü eksprese ettiği ve Fas stimülasyonu ile apoptoz geliştiği ve bunun RA patogenezinde rol oynayabileceği bildirilmiştir (6,7). Ancak, bu çalışmalarda in vivo olarak sinovyal fibroblastlarda apoptoz nadir bulunmuştur (6,7). Bir başka çalışmada da, romatoid sinovyal dokuda apoptozun nadir de olsa görüldüğü ve artmış bcl-2 ekspresyonunun apoptozu engelleyerek sinovyal hiperplaziye yol açabileceği ileri sürülmüştür (98).

Bu çalışmada, daha önceki çalışmalara uygun olarak hem deri fibroblastlarında, hem de normal veya romatoid sinovyal fibroblastlarda Fas ekspresyonu olduğu gösterildi.

Ancak, fibroblastlarda anti-Fas IgM (1000 ng/ml) stimülasyonu ile, bu çalışmada kullanılan apoptoz saptama metodlarından hiçbiri ile artmış bir apoptoz saptanamadı. Kullanılan antikor, daha önceki çalışmalarda kullanılanla aynı idi. Üstelik bu antikorla Jurkat hücreleri stimüle edildiğinde 100 ng/ml ile 12 saatte hücrelerin % 90'ından fazlasının ölmesi antikorun etkin olduğunu, antikorla ilgili bir problemin olmadığını düşündürmektedir. Birkaç deneyde daha yüksek konsantrasyonlarda (10 µg/ml) anti-Fas denenmesine rağmen, artmış bir apoptoz saptanamadı. Fibroblastlar Act-D ile enkübe edildiklerinde ise hücre ölümü hem morfolojik olarak, hem de diğer kullanılan yöntemlerle saptanabildi. Fibroblast kültürlerindeki Fas stimülasyonu ile apoptoz geliştiğini bildiren ilk iki çalışmada, düşük konsantrasyondaki antikor stimülasyonu ile bile fibroblastlarda apoptoz gelişmiştir (6,7). Nishioka ve arkadaşlarının çalışmasında fibroblastlar 100 ng/ml anti-Fas IgM ile 37°C'de 15 saat enkübe edildiklerinde, RA sinovyal hücrelerinde %90'ın üzerinde, osteoartrozlu hastalardan elde edilen sinovyal fibroblastlarda ise % 30 civarında bir hücre ölümü olduğu gösterilmiştir (6). Firestein ve arkadaşlarının çalışmasında da 16 saatlik 80 ng/ml anti-Fas IgM stimülasyonu ile sinovyal hücrelerde ortalama % 42 apoptoz olduğu bulunmuştur (7). İlk çalışmalarda kullanılan düşük konsantrasyondaki anti-Fas antikorunu ile sinovyal hücrelerde % 45-90 düzeyinde bildirilen apoptoza rağmen, sonraki çalışmalarda 1000 ng/ml gibi, ilk bildirilenin 10 misli yüksek konsantrasyonların kullanılmak zorunda kalınması dikkat çekicidir (8,9,99). Bizzat Nishioka ve arkadaşlarının romatoid sinovyal fibroblastlarda JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinaz) aktivasyonu ile apoptoz geliştiğini bildirdikleri daha sonraki bir çalışmada, ilk çalışmalarından 10 misli yüksek konsantrasyonda anti-Fas kullanmalarına rağmen 15 saatteki apoptoz oranı % 15'in biraz üzerindedir (99). Bu, ilk çalışmada bildirilen % 90 apoptotik hücre oranından oldukça düşüktür. Aicher ve arkadaşları da bizim çalışmamızda olduğu gibi Fas stimülasyonu ile romatoid sinovyal hücrelerde artmış bir apoptoz saptayamadılar.

Terapötik önemi olabileceği düşünülerek, bu çalışmada, romatoid sinovyal hücrelerdeki sitokinlerin fibroblastlarda apoptozu modifiye edip etmediği de araştırıldı. Firestein ve



arkadaşları IL-1 ve TNF- $\alpha$  stimölasyonu ile sinovyositlerde apopitoz geliştii ve IFN- $\gamma$ 'nın, IL-1 ve TNF- $\alpha$ 'nın apopitotik etkisini azalttığını bildirmişlerdir. Ancak, bir başka çalışmada, IL-1 $\beta$  ve TGF- $\beta$ 'nin sinovyositlerde Fas ekspresyonunu azalttığı ve Fas aracılığıyla olan apopitozu inhibe ettiği iddia edilmiştir (8,9). Biz çalışmamızda, IL-1 $\beta$  dahil, kullanılan sitokinlerden hiçbiri ile fibroblastlarda artmış bir hücre ölümü saptamadık. IL-1 $\beta$  veya TGF- $\beta$  stimölasyonu ile fibroblastlarda Fas ekspresyonda azalma olmadı. IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$ 'nin yanısıra IL-1 $\beta$ , çalışmamızda Fas ekspresyonunu arttırdığı bulunan sitokinlerden biriydi. TNF- $\alpha$ 'nın fibroblastlarda Fas ekspresyonunu arttırdığı daha önce de bildirilmiştir (6). Çalışmamızda fibroblastlar IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  ile enkübe edilerek artmış Fas ekspresyonunun fibroblastları anti-Fas'ın apopitotik etkisine duyarlı hale getirip getirmediği de araştırıldı. Ancak artmış Fas ekspresyonuna rağmen, Fas stimölasyonu ile yine de artmış bir apopitoz saptanamadı.

TNF reseptörlerinin uyarılmasının, insan diploid fibroblastlarında proliferasyona yol açtığı bildirilmiştir. Fas reseptörü ile TNF reseptörleri arasındaki benzerlik gözönüne alınarak Fas reseptörünün uyarılmasının fibroblastlarda proliferasyona yol açıp açmadığı da H<sup>3</sup> timidin tutulum testi ile araştırıldı. Bu test ile anti-Fas ile enkübe edilen kuyularda eğer apopitoz gelişseydi, kontrol kuyularına göre daha düşük ölçümlerin elde edilmesi gerekirdi. Ancak, tam aksine Fas stimölasyonu yapılan kuyularda artmış bir proliferasyona işaret eden artmış H<sup>3</sup> timidin tutulumunu saptandı. Nitekim, bir çalışmada Fas stimölasyonunun insan deri fibroblastlarında proliferasyona yol açtığı bildirilmiştir (10). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar da, sinovyal fibroblastların Fas stimölasyonuna dermal fibroblastlara benzer bir yanıt verdiklerini göstermektedir. Artmış Fas ekspresyonunun, Fas stimölasyonu ile görülen proliferasyonu daha da arttırıp arttırmayacağı ise daha ilerideki çalışmaların konusu olabilir.

RA sinovyal hücrelerinde Fas stimölasyonu ile hücrelerin apopitoz veya proliferasyon yönünde cevap vermesine yol açan mekanizmaların anlaşılması RA tedavisinde yeni olanaklar yaratabilecektir.

## 8. SONUÇLAR

1. Anti-Fas IgM ile stimölasyon, fibroblastlarda apopitoza yol açmayıp, proliferasyona yol açmaktadır.
2. Romatoid sinovyumda bulunan sitokinler fibroblastlarda apopitoza yol açmaz.
3. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$ , fibroblastlarda Fas ekspresyonunu önemli miktarda arttırmaktadır. Ancak, sitokin uyarımı ile Fas ekspresyonu artırılan fibroblastlarda da, anti-Fas stimölasyonu ile apopitoz gelişmez.
4. Deri, normal ve romatoid sinovyal fibroblastlar arasında anti-Fas veya sitokin stimölasyonuna cevap bakımından bir fark yoktur.



## 9. KAYNAKLAR

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging tissue implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26, 239-257
2. Vaux DL, Haeccker G, Strasser A: An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994; 76: 777-779
3. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR: Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 663-698
4. Oltvai ZN, Korsmeyer SJ: Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell* 1994; 79: 189-192
5. Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijnster MJ, Keet RP, Miedema F: Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 1992; 257: 217-219
6. Nakajima T, Aono H, Hasunuma T, Yamamoto K, Shirai T, Hirohata K, Nishioka K: Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 1995; 38: 485-491
7. Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ: Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest* 1995; 96: 1631-1638
8. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, Tsuboi M, Kawabe Y, Aoyagi T, Nagataki S: Inhibition of Fas antigen-mediated apoptosis of rheumatoid sinovyal cells in vitro by transforming growth factor beta 1. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1267-1276
9. Tsuboi M, Eguchi K, Kawakami A, Matsuoka N, Kawabe Y, Aoyagi T, Maeda K, Nagataki S: Fas antigen expression on sinovyal cells was down-regulated by interleukin 1 beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218: 280-285
10. Aggarwal BB, Singh S, LaPushin R, Totpal K: Fas antigen signals proliferation of normal human diploid fibroblast and its mechanism is different from tumor necrosis factor receptor. *FEBS Lett.* 1995; 364: 5-8
11. Nakajima T, Aono H, Hasunuma T, Yamamoto K, Maruyama I, Nosaka T, Hatanaka M, Nishioka K: Overgrowth of human sinovyal cells driven by the human T cell leukemia virus type I tax gene. *J Clin Invest.* 1993; 92: 186-193
12. Stastny P: Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1978; 298: 869-871
13. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ: The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1205-1213

14. Nepom GT, Nepom BS: Prediction of susceptibility to rheumatoid arthritis by human leukocyte antigen genotyping. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 785-792
15. Weyand CM, McCarthy TG, Goronzy JJ: Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1995; 95: 2120-2126
16. Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ: The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1992; 117: 801-806
17. Harris ED Jr: Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1277-1289
18. Liao HX, Haynes BF: Role of adhesion molecules in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1995; 21: 715-740
19. Kurosaka M, Ziff M: Immunoelectron microscopic study of the distribution of T cell subsets in rheumatoid synovium. *J Exp Med* 1983; 158: 1191-1210
20. Firestein GS: The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1991; 3: 398-406
21. Nykanen P, Bergroth V, Raunio P, Nordstrom D, Kontinen YT: Phenotypic characterization of <sup>3</sup>H-thymidine incorporating cells in rheumatoid arthritis synovial membrane. *Rheumatol Int* 1986; 6: 269-271
22. Lalor PA, Mapp PI, Hall PA, Revell PA: Proliferative activity of cells in the synovium as demonstrated by monoclonal antibody, Ki 67. *Rheumatol Int* 1987; 7: 183-186
23. Trabandt A, Gay RE, Gay S: Oncogene activation in rheumatoid synovium. *APMIS* 1992; 100: 861-875
24. Firestein GS, Paine MM, Littman BH: Gene expression (collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinases, complement, and HLA-DR) in rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovium. Quantitative analysis and effect of intraarticular corticosteroids. *Arthritis Rheum* 1991; 34: 1094-1105
25. MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI: Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *J Biol Chem* 1990; 265: 17238-17245

26. Boyle DL, Sajjadi FG, Firestein GS: Inhibition of synoviocyte collagenase gene expression by adenosine receptor stimulation. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 923-930
27. Kumkumian GK, Lafyatis R, Remmers EF, Case JP, Kim SJ, Wilder RL: Platelet-derived growth factor and IL-1 interactions in rheumatoid arthritis: regulation of synoviocyte proliferation, prostaglandin production, and collagenase transcription. *J Immunol* 1989 143: 833-837
28. Dayer JM, Beutler B, Cerami A: Cachectin /tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E<sub>2</sub> production by human sinovyal cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med* 1985;162: 2163-2168
29. Overall CM, Wrana JL, Sodek J:Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1989; 264:1860-1869
30. Unemori EN, Bair MJ, Bauer EA, Amento EP: Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts: dissociable control of two metalloproteinases by interferon- $\gamma$ . *J Biol Chem* 266: 23477-23482
31. Huet G, Flipo RM, Colin C, Janin A, Hemon B, Collyn-d'Hooghe M, Lafyatis R, Duquesnoy B, Degand P: Stimulation of the secretion of latent cysteine proteinase activity by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 772-780
32. Firestein GS: How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum* 1990; 33: 768-773
33. Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R: Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis *J Immunol* 1990; 144 :3347-3353
34. Arend WP, Dayer JM: Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis: *Arthritis Rheum* 1990; 33: 305-315
35. Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Brown CB, Kaushansky K, Firestein GS: Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the sinovyal cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 1991; 146: 3365-3371
36. Koch AE, Kunkel SL, Burrows JC, Evanoff HL, Haines GK, Pope RM, Strieter RM: Sinovyal tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J Immunol* 1991; 147: 2187-2195

37. Bucala R, Ritchlin C, Winchester R, Cerami A: Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. *J Exp Med* 1991; 173: 569-574
38. Geiler T, Kriegsmann J, Keyszer GM, Gay RE, Gay S: A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1664-1671
39. Wyllie AH: Apoptosis. *ISI Atlas Science: Immunology* 1988; 1: 192-196
40. Roy C, Brown DL, Little JE, Valentine BK, Walker PR, Sikorska M, Leblanc J, Chaly N: The topoisomerase II inhibitor teniposide (VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes. *Exp Cell Res* 1992; 200: 416-424
41. Hammar SP, Mottet NK: Tetrazolium salt and electron-microscopic studies of cellular degeneration and necrosis in the interdigital areas of the developing chick limb. *J Cell Sci* 1971; 8: 229-251
42. Raff MC: Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 397-400
43. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD: Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 1993; 262: 695-700
44. Golstein P, Ojcius DM, Young JD: Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 1991; 121: 29-65
45. Debbas M, White E: Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev* 1993; 7: 546-554
46. Steller H, Grether ME: Programmed cell death in *Drosophila*. *Neuron* 1994; 13: 1269-1274
47. Robinow S, Talbot WS, Hogness DS, Truman JW: Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. *Development* 1993; 119: 1251-1259
48. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR: *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 1992; 356: 494-499
49. Hengartner MO, Horvitz HR: *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. *Cell* 1994; 76: 665-676



50. Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462
51. Vaux DL, Weissman IL, Kim SK: Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 1992; 258: 1955-1957
52. Hay BA, Wolff T, Rubin GM: Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* 1994 120: 2121-2129
53. Oppenheim RW, Prevette D, Tytell M, Homma S: Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidence for the role of cell death genes. *Dev Biol* 1990; 138: 104-113
54. Jacobson MD, Burne JF, Raff MC: Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J* 1994; 13: 1899-1910
55. Snider WD: Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 1994; 77: 627-638
56. Cohen JJ, Duke RC: Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 1984; 132: 38-42
57. Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC: Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* 1994; 79: 353-364
58. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer-SJ: Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75: 241-251
59. Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC: Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 1993; 361: 365-369
60. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M: Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352: 345-347
61. Freeman RS, Estus S, Johnson EM Jr: Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of Cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* 1994; 12: 343-355
62. Askew DS, Ashmun A, Simmons BC, Cleveland JL: Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 1991; 6: 915-922
63. Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T : P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847-849

64. Hermeking H, Eick D: Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* 1994; 265: 2091-2093
65. Yuan J, Horvitz HR: The *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-4* encodes a novel protein and is expressed during the period of extensive programmed cell death. *Development* 1992; 116: 309-320
66. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van-Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, et-al: Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1992; 256: 97-100
67. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR: The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993; 75: 641-652
68. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al: A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992; 356: 768-774
69. Kumar S, Tomooka Y, Noda M: Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185: 1155-1161
70. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES: CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein *Ced-3* and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 1994; 269: 30761-30764
71. Ray CA, Black-RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS, Pickup DJ: Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 1992; 69: 597-604
72. White K, Grether ME, Abrams JM, Young L, Farrell K, Steller H: Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 1994; 264: 677-683
73. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH: Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; 245: 301-305
74. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M: A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1989; 169: 1747-1756



75. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-243
76. Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas-C, Li -Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, et-al: Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 1992; 267: 10709-10715
77. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S: The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992; 148: 1274-1279
78. Smith CA, Farrah T, Goodwin RG: The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994; 76: 959-962
79. Itoh N, Nagata S: A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993; 268: 10932-10937
80. Inazawa J, Itoh N, Abe T, Nagata S: Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. *Genomics* 1992; 14: 821-8222
81. Suda T, Nagata S: Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med* 1994; 179: 873-879
82. Wong GH, Goeddel DV: Fas antigen and p55 TNF receptor signal apoptosis through distinct pathways. *J Immunol* 1994; 152 : 1751-1755
83. Hug H, Enari M, Nagata S: No requirement of reactive oxygen intermediates in Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett* 1994; 351(3): 311-313
84. Clement MV, Stamenkovic I: Fas and tumor necrosis factor receptor-mediated cell death: similarities and distinctions. *J Exp Med* 1994; 180: 557-67
85. Kolesnick R, Golde DW: The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* 1994; 77: 325-328
86. Ogasawara J, Watanabe Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S: Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice . *Nature* 1993; 364: 806-809
87. Sneller MC, Straus SE, Jaffe ES, Jaffe JS, Fleisher TA, Stetler-Stevenson M, Strober W: A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine lpr/gld disease. *J Clin Invest* 1992; 90: 334-341

88. Cohen PL, Eisenberg RA: Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 243-269
89. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD: Protection from Fas mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263: 1759-1762
90. Debatin KM, Fahrig-Faissner A, Enenkel-Stoodt S, Kreuz W, Benner A, Krammer PH: High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood* 1994; 83: 3101-3103
91. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V: *J Immunol Methods* 1995; 184: 39-51
92. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, ve Ricardi C: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; 139: 271-279
93. Vilcek J, Palombella VJ, Henriksen-DeStefano D, Swenson C, Feinman R, Hirai M, ve Tsujimoto M: Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 1986; 163: 632-643
94. Cantwell MJ, Hua T, Zvaifler NJ, Kipps TJ: Deficient Fas ligand expression by synovial lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997 Sep; 40: 1644-1652
95. Sumida T, Hoa TT, Asahara H, Hasunuma T, Nishioka K: T cell receptor of Fas-sensitive T cells in rheumatoid synovium. *J Immunol* 1997; 158: 1965-1970
96. Hoa TT, Hasunuma T, Aono H, Masuko K, Kobata T, Yamamoto K, Sumida T, Nishioka K: Novel mechanisms of selective apoptosis in synovial T cells of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996; 23: 1332-1337
97. Hasunuma T, Hoa TT, Aono H, Asahara H, Yonehara S, Yamamoto K, Sumida T, Gay S, Nishioka K: Induction of Fas-dependent apoptosis in synovial infiltrating cells in rheumatoid arthritis. *Int Immunol* 1996; 8: 1595-1602
98. Sugiyama M, Tsukazaki T, Yonekura A, Matsuzaki S, Yamashita S, Iwasaki K: Localisation of apoptosis and expression of apoptosis related proteins in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 442-449

99. Okamoto K, Fujisawa K, Hasunuma T, Kobata T, Sumida T, Nishioka K: Selective activation of the JNK/AP-1 pathway in Fas-mediated apoptosis of rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 919-926
100. Aicher WK, Peter HH, Eibel H: Human synovial fibroblasts are resistant to anti-CD95 (fas) induced apoptosis. *Arthritis Rheum* 1996; 39 (suppl): 75

