

# TRAIL Molekülünün İn Vitro Beta Hücre Kültüründe Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

THE EFFECT OF TRAIL MOLECULE ON CELL VIABILITY IN IN VITRO BETA CELL CULTURE

Işıl TEKME<sup>1</sup>, Doğan ÖZYURT<sup>1</sup>, Çetin PEKÇETİN<sup>1</sup>, Şermin GENÇ<sup>2</sup>, Kemal Kürşad GENÇ<sup>2</sup>, Zişan BULDAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

<sup>2</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, ARLAB

### ÖZET

**Amaç:** İnsüline bağımlı (Tip 1) diabetes mellitus (T1DM) pankreas beta adacık otoantijenlerine spesifik otoreaktif T hücrelerinin aracılık ettiği organa spesifik bir otoimmün hastalıktır. Bu hastalıkta beta hücrelerinin %90'dan fazlası kayba uğramaktadır ve bu hücre ölümüne soluble ya da membrana bağlı formda hücre ölüm ligandlarının aracılık etmesi olasıdır. Bu moleküllerden biri tümör nekrozis faktör-alfa (TNF $\alpha$ ) süperalesine ait bir hücre ölüm ligandı olan TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) olabilir. Bu çalışmada TRAIL molekülünün erişkin sıçan pankreas beta hücre kültürlerinde ve INS-1E sıçan insulinoma hücre hattı kültürlerinde sitotoksik etkiye yol açıp açmadığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve yöntemler:** Bu çalışmada hücre hasarı modeli 10, 100 ve 1000 ng konsantrasyonlarda TRAIL ile oluşturuldu. Hücre canlılığının değerlendirilmesinde 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi kullanıldı.

**Bulgular:** Herhangi bir toksik madde eklenmeyen kontrol kültürleriyle karşılaştırıldığında TRAIL eklenen kültürlerde hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediği saptandı.

**Sonuç:** Bu sonuçlar TRAIL molekülünün pankreas beta hücre kültürlerinde ve INS-1E sıçan insulinoma hücre hattı kültürlerinde anlamlı sitotoksik etkiye yol açmadığını göstermektedir. Bu hücre kültürü sisteminde TRAIL ile indüklenen hücre ölümüne direncin mekanizmalarının araştırılması açısından INS-1E hücre hattı hücrelerinde TRAIL reseptörlerinin ve doğal apoptoz inhibitörü proteinlerin ekspresyonunun belirlenmesi uygun olacaktır.

**Anahtar sözcükler:** Tip 1 diabetes mellitus; INS-1E hücre hattı; sitotoksosite; sıçan; TRAIL; MTT; otoimmünite

### SUMMARY

**Objective:** Insulin-dependent (Type 1) diabetes mellitus (T1DM) is an organ-specific autoimmune disease which is mediated by autoreactive T cells that are specific against pancreatic beta islet autoantigens. In this disorder, above 90% of beta cells undergo loss and it is likely that soluble or membrane-bound cell death ligands mediate beta cell loss. One of these putative molecules may be TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) that is a cell death ligand and member of TNF superfamily. In this study, it was aimed to evaluate whether TRAIL molecule results in cytotoxicity in adult rat pancreatic beta cell cultures and INS-1E rat insulinoma cell line cultures.

**Material and methods:** In the present study, cell injury was induced by TRAIL at

Işıl TEKME

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji AD

35340 Inciraltı, İZMİR

Tel: (232) 4124554

e-posta: isil.tekmen@deu.edu.tr

10, 100 and 1000 ng concentrations. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test was used to evaluate cell viability.

**Results:** In the present study, it was found that TRAIL does not induce statistically significant cytotoxicity in beta cell and INS-1E cell line cultures.

**Discussion:** The results of the present study show that TRAIL does not result significant cytotoxicity in pancreas beta cell and INS-1E rat insulinoma cell line cultures. To clarify the mechanisms of resistance of this cell line against TRAIL-induced cell death, the expression of TRAIL receptors and natural apoptosis inhibitor proteins should be evaluated in beta cell cultures and INS-1E cell line.

**Key words:** Type 1 diabetes mellitus, INS-1E cell line, cytotoxicity, rat, TRAIL, MTT, autoimmunity

Tip 1 diabetes mellitus (T1DM) otoreaktif T hücrelerinin aracılık ettiği otoimmün bir hastalıktır ve pankreas beta hücrelerinin ölümüyle karakterizedir (1). Bu hastalık tablosunda beta hücre ölümüne tümör nekrozis faktör alfa (TNF $\alpha$ ) ve Fas gibi hücre ölüm ligandlarının aracılık ettiğine ilişkin bulgular saptanmıştır (2-10). TNF süperailisine ait başka moleküller de beta hücre ölümünü indükleyebilir. Bu maddelerden biri de TNF related-apoptosis-inducing ligand (TRAIL) olabilir (11-13). Bu hipotezi sınamak amacıyla bu çalışmada solumable TRAIL molekülünün in vitro sıçan beta hücre kültürlerinde ve INS-1E sıçan insulinoma hücre hattı kültürlerinde hücre canlılığı üzerine etkisinin bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmada TRAIL ile indüklenen hücre hasarının değerlendirilmesinde 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5 - diphenyltetra - zolium bromide (MTT) hücre canlılığı testi kullanıldı.

T1DM, dünya üzerinde çok yaygın morbidite ve mortaliteye yol açan kronik bir hastalıktır. Bu hastalığın kesin mekanizmalarının anlaşılması daha etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olabilir. T1DM'da hedef hücre olan beta hücrelerinin in vitro canlılığı üzerine değişik maddelerin etkilerinin araştırılması sık olarak kullanılan bir yöntemdir. In vitro çalışmaların avantajı çalışma kolaylığı, yeniden üretilme (reproducibility) oranının yüksek olması ve sistem değişkenlerinin kontrol altında tutulabilmesidir. In vitro çalışmaların sonuçları in vivo çalışmaların planlanmasında yol gösterici olmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada TRAIL molekülünün beta hücre canlılığı üzerine etkisinin ilk planda in vitro modelde araştırılması planlanmıştır.

TRAIL molekülü TNF süperailisinden bir hücre ölüm ligandıdır ve bu molekülün CD4 ve natural killer (NK) sitotoksik etkisine aracılık edebildiği gösterilmiştir (14,15). Ayrıca bu madde pankreas hücre hattı hücrelerinin de ölümüne yol açmaktadır. Her ne kadar TRAIL, TNF süperailisinden bir ölüm ligandıysa da, apoptozu indükleyen ve inhibe eden membran reseptörlerinin bulunması, hücre siklusunun inhibisyonu gibi apoptozdan bağımsız etkilerinin bulunması ve türler arasında belirgin fonksiyonel farklılıklar göstermesi açısından ilginç özellikler taşımaktadır. Homoloji bulunmasına karşın TRAIL-TRAIL-R sistemi ile diğer ölüm ligandı (TNF ve CD95) sistemleri arasında bazı çarpıcı ayrılıklar vardır. TRAIL'in indüklediği hücre ölümü kemirgenler ve insan arasında farklılıklar göstermektedir. Fakat bu maddenin pankreas beta hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri bugüne kadar araştırılmamıştır.

Bu çalışmada hücre hasarı modeli 10, 100 ve 1000 ng konsantrasyonlarda TRAIL ile oluşturuldu. Hücre canlılığının değerlendirilmesinde 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5 - diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi kullanıldı.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Hücre Kültürü

Bu çalışmada INS-1E sıçan insulinoma hücre hattı ve erişkin sıçan beta hücre kültürleri kullanıldı. INS-1E hücre hattı İsviçre'den (Division of Clinical Biochemistry, Department of Internal Medicine, University Medical Center) Dr. Wollheim'dan temin edildi. Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul komitesinin onayını almıştır.

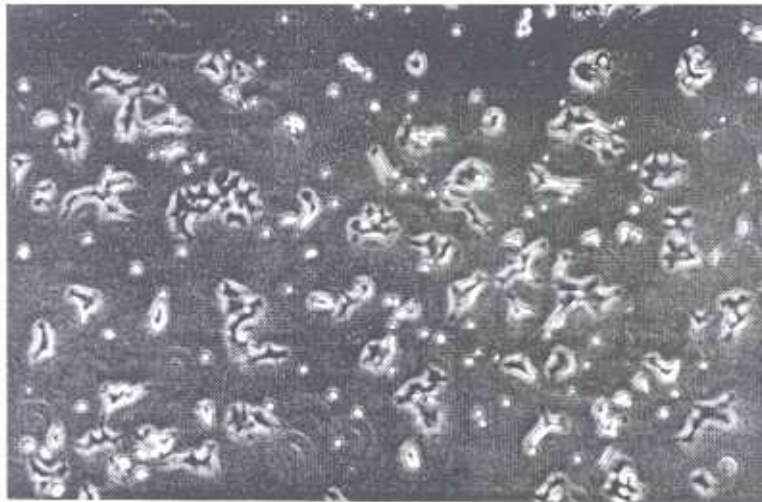
Kültürler için 75 cm<sup>2</sup>lik kültür flaskları (Greiner), MIT testi için ise 96 kuyucuklu kültür plakları (Greiner) kullanıldı.

Kültür kaplarının ve lamellerin kaplanmasında poli-lizin (PLL) ya da poli-D-lizin (PDL) (Sigma) kullanıldı. 10 µg/ml konsantrasyonda PDL ya da PLL eklenen kültür kapları ve lameller laminar flow kabinet altında bir saat süreyle bekletildikten sonra kaplama malzemesi çekilerek kültür kapları ve lameller birkaç kez steril, distile su (Biochrom KG) ile yıkandı. Ardından laminar flow kabinet altında kültür kaplarının kapakları açık bırakılarak kurutuldu ve ağızları parafilm ile sarılarak hücrelerin ekimine kadar saklandı (7,16).

INS-1E hücre hattı kültürleri için kültür ortamı olarak RPMI1640 kültür ortamı, %10 fetal dana serumu ve penisilin-streptomisin karışımı kullanıldı. Kültür kapları 37°C sıcaklığa ayarlanmış, nemli ve %5 oranında karbondioksit içeren karbondioksit enkübatörüne konuldu. Kültürlerin ortamı 3. gün taze kültür ortamıyla değiştirildi. Bu işlem daha sonra her iki günde bir tekrarlandı (3). Kültürler her gün mikroskopik olarak (ortam rengi, kontaminasyon açısından)

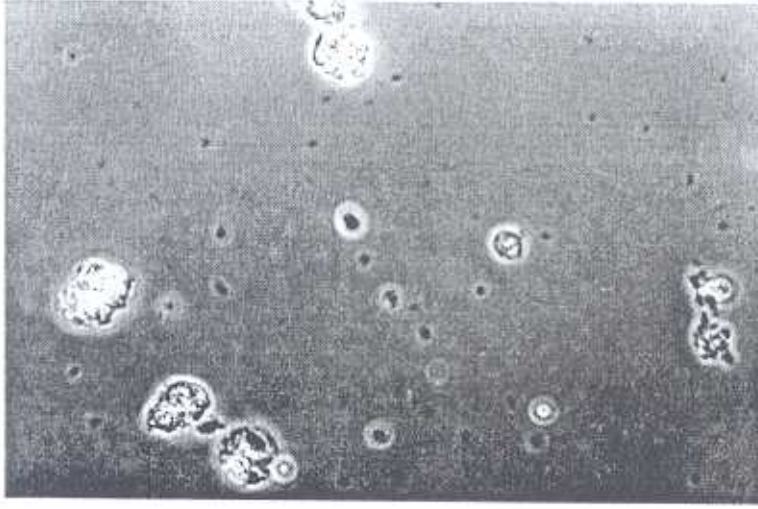
gözle ve her besleme gününde mikroskopik olarak faz-kontrast inverted mikroskop altında hücrelerin gelişimi, kültürlerin sıklık (confluency) durumu ve kontaminasyon açısından değerlendirildi (Resim 1). Kültürler sıkışığa yakın bir yoğunluğa erişince hücreler kültür kaplarından Tripsin/EDTA karışımı ile kaldırılarak santrifüj edildi. Ardından kültür ortamıyla resüspansiyon sonrası yeni kültür kaplarına ekim yapıldı. Pasaj oranı 1/4 olarak tutuldu.

Erişkin Wistar sıçan pankreas dokusu eter anestezisi altında ve steril koşullarda çıkartıldı. Doku çıkartıldıktan sonra deney hayvanı derin eter anestezisiyle sakrifiye edildi. Pankreas dokusu steril petri kabında bulunan soğuk RPMI 1640 kültür ortamı içine alındı. Mekanik ve enzimatik (kollagenaz) disosiasyonla doku disosiyeye edildi. Doku süspansiyonu santrifüj edildikten sonra pellet kültür ortamıyla resüspende edildi ve adacık süspansiyonu kültür kaplarına ekildi (7,16). Karbondioksit enkübatöründe bir günlük enkübasyon sonrasında pankreas adacıklarının kültür kaplarına yapışmış olduğu izlendi (Resim 2).



Resim 1. INS- 1E hücre hattı kültürünün faz-kontrast mikroskopik görüntüsü (x 20).

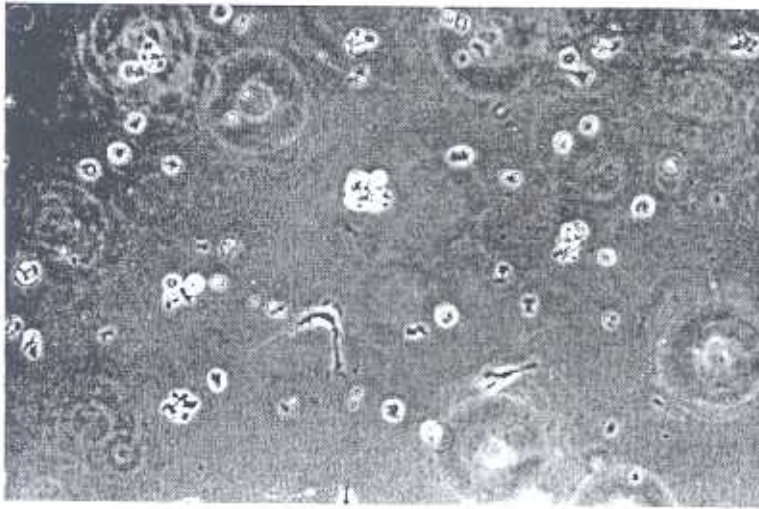
100 ng/ml TRAIL ile enkübe edilmiş kültürde hücre hasarı görülmemektedir.



Resim 2. TRAIL eklenmemiş kontrol kültürüne ait faz-kontrast mikroskopik görüntü (x100)

Adacık hücre kültürleri adacık kültürlerine enzimatik dispersiyon uygulanarak elde edildi. Bu amaçla adacık kültürlerine %0,02 tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37°C sıcaklıkta enkübe edildi. Adacıkların dispersiyonu faz-kontrast mikroskop altında kontrol edildi ve enzimatik dispersiyon fetal dana serum eklenerek sonlandırıldı (Resim 3). *In vitro* deneyler için adacık hücreleri 96 kuyucuklu kültür plaklarına 10<sup>5</sup> hücre/kuyucuk yoğunlukta ve CMRL 1066 serumuz kültür ortamı kullanılarak ekildi.

*In vitro* deneyler için INS-1E hücreleri 96 kuyucuklu kültür plaklarına % 2 fetal dana serumu içeren kültür ortamı içinde ve 100 000 hücre/kuyucuk/ 200 µl ortam yoğunlukta ekildi. Ekimin ertesi günü kültürlere TRAIL proteini (10-1000 ng/ml konsantrasyonda) ve potentiator eklendi. Bütün deneylerde her ayrı kültür koşulu için en az üç eş örnek (triplicate) kullanıldı. Kültürler 24 saat süreyle enkübe edildikten sonra MITI testi ile hücre canlılığı değerlendirildi.



Resim 3. 1000ng/ml TRAIL ile enkübe edilmiş pankreas adacık hücre kültürüne ait faz-kontrast mikroskopik görüntü (x 20). Hücre hasarı izlenmemektedir.

### MTT Analizi

MTT yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondriyonun MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon frajil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondriyon fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondriyon fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla enkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün solubilize edilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır. Ayrıntılı deney basamakları şu şekildedir:

100 mg MTT (Sigma) maddesi 20 ml hacimde PBS içinde çözülerek %0,5'lik (5 mg/ml konsantrasyonda) stok MTT solüsyonu steril ve karanlık koşullarda hazırlandı. Solüsyon 0,22 µm'lik filtre ile süzülerek debrisler uzaklaştırıldı. Bu solüsyon karanlık ortamda ve 4°C sıcaklıkta bir ay kadar bir süre saklanabilmektedir. Deneylerde herhangi bir toksik ya da koruyucu ajan eklenmeyen kültür koşulları kontrol olarak kullanıldı. 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekilen ve TRAIL'in değişik dozlarıyla karşılaştırılan kültürler hedeflenen enkübasyon süresinin sonunda 20 µl / kuyucuk hacimde MTT solüsyonu eklendi. Kültür plakları alüminyum folyo ile sarılarak %5 karbondioksitli nemli hava içeren karbondioksit enkübatöründe 34°C sıcaklıkta 4 saat süreyle tutuldu. Enkübasyon süresinin sonunda faz-kontrast "inverted" mikroskop altında canlı hücrelerde mor renkte formazan kristallerinin oluştuğu, ölü hücrelerin ise boyanmadığı saptandı. Kültür plağı, plak rotoru kullanılarak 1250 rpm hızda 5 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Formazan kristallerini solubilize duruma getirmek için önceden hazırlanmış solubilizasyon solüsyonu 100 µl/kuyucuk hacimde eklendi. Bu solüsyon isopropranolol içinde hazırlanmış 0,04 N HCl solüsyonundan oluşmakta ve oda sıcaklığında

saklanmaktadır. Kültür plağı ELISA plak okuyucusuna konularak absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda okutuldu. Referans dalga boyu olarak 650 nm dalga boyu kullanıldı. Herhangi bir ajan eklenmeyen kontrol kültürlerinden elde edilen absorbans değerlerinin aritmetik ortalaması %100 olarak kabul edildi. TRAIL eklenen kültür koşullarından elde edilen absorbans değerlerinin herbiri ortalama kontrol absorbans değerine oranlandı ve bu değerlerin yüzdesi olarak gösterildi.

### İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmada verilerin istatistik analizi için SPSS programı (version 8.0) kullanıldı. İstatistik analizde değişik kültür koşullarında saptanan hücre canlılığı oranı parametre olarak seçildi. Grupların ortalama değerleri Students' t testiyle karşılaştırıldı. 0,05'den küçük p değerleri anlamlı kabul edildi. Sonuçlar aritmetik ortalama ± standart hata biçiminde verildi.

### BULGULAR

TRAIL molekülünün beta hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla MTT testi kullanıldı. MTT testinin sonuçlarına göre 24 saatlik enkübasyon süresinin sonunda değişik konsantrasyonlarda TRAIL molekülü hücre canlılığı üzerine anlamlı inhibitör etki göstermemektedir. Bazal (TRAIL eklenmeyen) kültür koşullarında elde edilen ortalama absorbans değerleri %100 kabul edildiğinde 10, 100 ve 1000 ng TRAIL dozlarında elde edilen ortalama hücre canlılığı değerleri sırasıyla %82,4 ± 6,5, %80,6 ± 7,1 ve 83,4 ± 6,8 bulundu. Kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında (Resim 2) bu değerler anlamlı istatistik farklılık göstermemektedir (Resim 3).

TRAIL molekülünün INS-1E sıçan insulinoma hücre hattının canlılığı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla MTT testi kullanıldı. MTT testinin sonuçlarına göre 24 saatlik enkübasyon süresinin sonunda değişik konsantrasyonlarda TRAIL molekülü hücre canlılığı üzerine anlamlı inhibitör etki göstermemektedir. Bazal (TRAIL eklenmeyen) kültür koşullarında elde edilen ortalama absorbans değerleri %100 kabul edildiğinde 10, 100 ve 1000 ng TRAIL dozlarında elde edilen ortalama hücre canlılığı değerleri sırasıyla %92,5

$\pm 7,1$ ,  $90,7 \pm 8,1$  ve  $93,2 \pm 5,3$  bulundu. Kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında bu değerler anlamlı istatistik farklılık göstermemektedir ( $p > 0,05$ ) (Resim 1).

## TARTIŞMA VE SONUÇ

TRAIL, çeşitli tümör hücre hatlarında apoptotik hücre ölümünü indüklemektedir. Fakat son zamanlarda bu molekülün normal hücrelerde de apoptozu indüklediği gösterilmiştir (11).

Apoptotik sinyal ileten TRAIL-R1 ve -R2 reseptörlerinin insan pankreas kanser dokularında bulunduğu in situ olarak gösterilmiştir (17,18). TRAIL pankreatik kanser hücre hatlarında ölümü indüklemektedir (17,19,20). Sıçan pankreatik stellat hücrelerinde TRAIL reseptörü ekspresyonu saptanmıştır ve bu hücrelerde TRAIL apoptozu indüklemektedir (17). TRAIL, protein sentezinin inhibe edildiği koşullarda normal hücrelerde de apoptozu yol açmaktadır. Bu hücrelerin önceden IFN $\gamma$  ile muamele edilmesi TRAIL ile indüklenen hücre ölümünü uyarmaktadır ve bu durumda protein sentezinin inhibisyonu gerekmemektedir. Bizim çalışmamızda solüble TRAIL protein sentezi inhibe edilmeksizin hücre canlılığında azalmaya yol açmamıştır. Bu durum TRAIL sinyal ileti yolunun endojen inhibitörlerinin apoptotik sinyal iletimini engelleyebildiğini düşündürmektedir. Benzer bulgular NOD fare primer beta hücre kültürleri ve Min6 fare insülinoma hücre hatı kültürlerinde de saptanmıştır (21). Ancak insan beta hücreleri ve insülinoma hücre hatı hücrelerinin TRAIL aracılıklı hasara duyarlı olduğu bildirilmiştir (22). Bu farklılıklar türe bağlı olabilir. Bu konunun açıklığa kavuşturulması için bundan sonraki çalışmalarda TRAIL'in sikloheksimid ya da aktinomisin D gibi protein sentez inhibitörleriyle ve in vivo inflamatuvar koşulları in vitro yaratmak amacıyla IFN $\gamma$  birlikte kullanımı planlanmaktadır.

İnsan beyninin kesit kültürlerinde TRAIL nöronal ve glial hücrelerin apoptotik ölümüne yol açmaktadır (11). Nöroinflamasyon koşullarında TRAIL kaynağı hücreler T hücreleri olabilir ve TRAIL eksprese eden nöroinflamatuvar T hücreleri beyin dokusunda apoptozu yol açabilir. Bu hipotetik mekanizma multipl skleroz tedavisinde bir hedef olabilir (11). Benzer bi-

çimde pankreasın organa spesifik otoimmün hastalığı olan T1DM'da da inflamatuvar T hücreleri TRAIL molekülü aracılığıyla beta hücrelerinin hasarına katkı yapabilir. Gerçekten de TRAIL salgılayan CD4 ve CD8 (+) T hücrelerinin in vitro insan beta hücre hasarına katıldığı bildirilmiştir (22). Ancak TRAIL aynı zamanda diabetojenik T hücrelerinin çoğalmasını da bastırmaktadır (21). TRAIL defektif farelerde deneysel otoimmün diabete bağlı inflamasyon azalmaktadır (23). Bu nedenle TRAIL'in T hücrelerinin kendisi üzerine de etkisi bulunabilir. Otoreaktif (antijene spesifik) insan T hücreleri ise TRAIL-R1 ve -R2 reseptörlerini eksprese etmelerine karşın in vitro solüble TRAIL ile ölüme dirençli bulunmuştur (24). TRAIL aktivasyonu otoantijene spesifik insan T hücrelerinde kalsiyum influsunu, proliferasyonu inhibe etmektedir. Proliferasyonunun inhibisyonu cdk4 downregülasyonuna bağlanabilir ve bu bulgu hücre siklusunun G1 evresinde arrest olduğunu düşündürmektedir. Deneysel multipl skleroz ve romatoid artırt modellerinde TRAIL klonal anerji ya da apoptozla delesyon gibi periferik tolerans gelişimi mekanizmalarına katkıda bulunmaktadır (25, 26).

Sonuç olarak TRAIL molekülünün T1DM'da hedef hücre (beta hücresi) hasarında ya da efektör hücrelerin (T hücreleri) ortadan kaldırılmasındaki olası iki ters yönlü etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi in vivo deneylerle olanaklı olabilecektir. Bu mekanizmaların ayrıntılı araştırılması TRAIL aracılı yeni tedavi yöntemlerini gündeme getirebilecektir.

*Bu çalışma; Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı ve Türk Diabet Derneği tarafından desteklenmiştir.*

## KAYNAKLAR

1. Eizirik DL and Darville ML. Beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. *Diabetes* 2001; 50: 64-69.
2. Kagi D, Ho A, Odermatt B, Zakarian A, Ohashi PS, Mak TW. TNF receptor 1-dependent beta cell toxicity as an effector pathway in autoimmune diabetes. *J Immunol* 1999;162:4598-4605.

3. Stephens LA, Thomas HE, Ming L et al. Tumor necrosis factor-alpha-activated cell death pathways in NIT-1 insulinoma cells and primary pancreatic beta cells. *Endocrinology* 1999; 140:3219-3227.
4. Harison M, Dunger AM, Berg S et al. Growth factor protection against cytokine-induced apoptosis in neonatal rat islets of Langerhans: role of Fas. *FEBS Lett* 1998;435:207-210.
5. Itoh N, Imagawa A, Hanafusa T et al. Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1997;186:613-618.
6. Loweth AC, Williams GT, James RF, Scarpello JH, Morgan NG. Human islets of langerhans express Fas ligand and undergo apoptosis in response to interleukin-1beta and Fas ligation. *Diabetes* 1998; 47: 727-732.
7. Stassi G, Torado M, Richiusa P et al. Expression of apoptosis-inducing CD95 (Fas/Apo-1) on human beta-cells sorted by flow-cytometry and cultured *in vitro*. *Transplant Proc* 1995;27:3271-3275.
8. Stassi G, De Maria R, Trucco G et al. Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1997;186:1193-1200.
9. Suarez-Pinzon W, Sorensen O, Bleackley RC, Elliott JF, Rajotte RV, Rabinovitch A. Beta-cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on beta-cells and proinflammatory cytokine expression in islets. *Diabetes* 1999;48:21-28.
10. Yamada K, Takane-Gyotoku N, Yuan X, Ichikawa F, Inada C, Nonaka K. Mouse islet cell lysis mediated by interleukin-1-induced Fas. *Diabetologia* 1996;39:1306-1312.
11. Griffith TS, Lynch DH. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1998;10:559-563.
12. Kwon B, Youn BS, Kwon BS. Functions of newly identified members of tumor necrosis factor receptor/ligand superfamilies in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 1999;11:340-345.
13. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673-682.
14. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, et al. Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1999;162:2639-2647.
15. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, et al. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* 1999;163:1906-1913.
16. Iwahashi H, Hanafusa T, Eguchi Y, et al. Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2. *Diabetologia* 1996; 39:530-536.
17. Klonowski-Stumpe H, Fischer R, Reinehr R, Luthen R, Haussinger D. Apoptosis in activated rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:819-826.
18. Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and its receptor expression and the pathway of apoptosis in human pancreatic cancer. *Pancreas* 2001;23:251-258.
19. Ibrahim SM, Ringel J, Schmidt C, et al. Pancreatic adenocarcinoma cell lines show variable susceptibility to TRAIL-mediated cell death. *Pancreas* 2001;23:72-79.
20. Thomas RP, Farrow BJ, Kim S, May MJ, Hellmich MR, Evers BM. Selective targeting of the nuclear factor-kappaB pathway enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated pancreatic cancer cell death. *Surgery* 2002;132:127-134.
21. Mi QS, Ly D, Lamhamedi-Cherradi SE, et al. Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2003 ;52 :1967-1975.
22. Ou D, Metzger DL, Wang X, Huang J, Pozzilli P, Tingle AJ. TNF-related apoptosis-inducing ligand death pathway-mediated human beta-cell destruction. *Diabetologia* 2002 ;45:1678-1688.
23. Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng S, Tisch RM, Chen YH. Critical roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes. *Diabetes* 2003 ;52 : 2274-2278.

24. Wendling U, Walczak H, Dorr J, et al. Expression of TRAIL receptors in human autoreactive and foreign antigen-specific T cells. *Cell Death Differ* 2000;7:637-644.
25. Hilliard B, Wilmen A, Seidel C, Liu TS, Goke R, Chen Y. Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2001;166:1314-1319.
26. Lanemann JD, Waiczies S, Ehrlich S, et al. Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto) antigen-specific T cells. *J Immunol* 2002; 168: 4881-4888.