

FAS STİMÜLASYONUNUN DERMAL VE SİNOVYAL FİBROBLASTLARA ETKİSİ

Nurullah AKKOÇ*, Thomas GEILER**, Joachim R. KALDEN**

Dokuz Eylül Tıp Fakültesi, İç hastalıkları Anabilim Dalı*
Erlangen Üniversitesi, Dahiliye III ve Klinik İmmünoloji-Romatoloji Enstitüsü**

ÖZET

Fas aracılıklı apoptozun, RA patogenezinde rol oynayabileceği sanılmaktadır. Bu çalışmada; deri, normal ve romatoid sinovyumdan yapılan fibroblast kültürleri 2-9. pasajlarından elde edilen hücreler, anti-Fas IgM (CH-11) ile stimüle edilerek, bu stimülasyonun apoptoza mı, yoksa proliferasyona mı yol açtığı araştırıldı. Apoptozun tespiti, inversiyonlu faz kontrast mikroskopu kullanarak morfolojik değerlendirme ile ve PI boyanması ve annexin-V-FITC bağlanması ile flow sitometre kullanılarak yapıldı. Proliferasyon, H³ timidin tutulum testi ile ölçüldü. Kullanılan metodların hiçbiri ile fibroblastlarda artmış bir apoptoz belirlenemedi. Aksine, H³ timidin tutulum testi sonuçları, Fas stimülasyonunun fibroblastlarda proliferasyona yol açtığını düşündürdü.

Anahtar sözcükler: Fas, fibroblast, proliferasyon, apoptoz

SUMMARY

Fas mediated apoptosis is considered to be involved in the pathogenesis of RA. In this study, cultured fibroblasts from 2nd to 9th passage obtained from skin and normal or rheumatoid synovium were stimulated by anti-Fas IgM (CH-11) and it was tested whether this stimulation leads to apoptosis or proliferation. Detection of apoptosis was done morphologically by inverted phase contrast microscopy, PI staining, annexin-V-FITC binding measured by flow cytometry. To detect proliferation, H³ thymidine uptake assay was used. None of the methods revealed increased apoptosis, in any type of fibroblasts, after Fas stimulation. Instead, it resulted in increased proliferation as detected by H³ uptake assay.

Key words: Fas, fibroblast, proliferation, apoptosis

Hücresinin kendi genlerini kullanarak, intrinsek bir ölüm programını aktive etmesi ile gerçekleştirdiği kendi ölümüne apoptoz denir. Apoptoz çok hücreli canlıların gelişiminde önemli bir süreçtir (1). Çeşitli stimuluslar apoptozu uyabilir veya baskılayabilir. Apoptozun önemli uyarıcılarından birisi Fas antijenidir (Apo-1) (2). Tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör ailesine ait olan bu molekül, T hücrelerinin timik seleksiyonunda önemli bir rol oynar (3). Fas antijeni; myeloid hücreler, T-lenfoblastoid hücreleri ve fibroblastlar gibi çeşitli insan hücreleri tarafından eksprese edilirler (4). Fas antijeni ile etkileşen ligandın izolasyonu yapılmış ve tip II transmembran proteini olan bu

polipeptidin, TNF ailesine ait olduğu anlaşılmıştır (5). Fas ligandının bağlanmasıyla, Fas reseptörleri oligomerler oluşturarak 70 aminoasit uzunluğunda bir sitoplazmik ölüm kıvrımı (*death domain*) aracılığıyla hücreye ölüm sinyali gönderir. Bu ölüm kıvrımı Fas reseptörü ve TNF reseptörü arasında ortaktır. Hücre ölümü ligandın veya anti-CD-95 antikörlerinin Fas reseptörüne bağlanmasıyla uyarılır. Fas antijenine karşı geliştirilmiş anti-Fas antikörünün, Fas eksprese eden hücrelere karşı sitolitik etkili olduğu gösterilmiştir (4).

Apoptoz sürecindeki bir bozukluk otoimmüniteye yol açabilir. Fizyolojik apoptozda rolü olan Fas

genindeki bir mutasyona sahip olan MRL/lpr farelerinde sistemik lupus eritematozus (SLE) benzeri bir otoimmün hastalık görülür. Bu farelerdeki kusurlu Fas geni fizyolojik apoptoz sürecinde bir aksamaya, bu da masif lenfosit akümülyasyonuna, lenfadenopatiye ve anti-dsDNA antikoru dahil birçok patojenik yeni antikoru yapımına yol açar (6,7). Fas molekülünün solubl bir formu (sFas), SLE'li hastaların serumlarında bulunmuş ve periferik lenfositlerde azalmış bir apoptoza yol açtığı iddia edilmiştir (8).

Bilindiği gibi, romatoid artritteki (RA) karakteristik patolojik bulgu; sinovyal hiperplazidir. Sinovyal hiperplaziyi açıklamaya çalışan klasik modellere göre; makrofaj akümülyasyonu, kemik iliğinden daha fazla hücrenin migrasyon yapmasına, fibroblast akümülyasyonu da, sitokinle uyarılmış proliferasyona veya otonom fibroblast proliferasyonuna bağlıdır. Ancak, fibroblast proliferasyonu aslında olası mekanizmalardan bir tanesi olup, bugüne kadar kesin olarak 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 apoptoz arasındaki dengenin bozulmasının ve özellikle romatoid fibroblastlarda azalmış bir apoptozun RA patogeneğinde rol oynayabileceğini düşünmek akla yatkındır. Eğer bu doğru ise, sinovyal fibroblastlardaki apoptozu hızlandırabilecek modalitelerin bulunması, RA tedavisinde yeni olanakların ortaya çıkması

demektir. Bu nedenle, RA'lı hastalarda sinovyal fibroblastlarda apoptoz, son zamanlardaki bazı araştırmalara konu olmuştur (9-12). Bu çalışmalarda, sinovyal fibroblastların fizyolojik apoptozda rol oynadığı düşünülen Fas antijenini eksprese ettiği ve anti-Fas antikoru ile apoptozun uyarıldığı bildirilmiştir (9-12). Bazı çalışmalarda, osteoartröz hastalardan elde edilen fibroblastların Fas aracılıklı apoptoza, romatoid fibroblastlardan daha dirençli olduğu iddia edilse de (9), diğer çalışmalarda böyle bir fark gösterilememiştir (10-12). Öte yandan, Fas stimülasyonunun insan fibroblastlarında proliferasyona yol açtığını iddia eden bir çalışma da vardır (13). Biz de bu çalışmada deri fibroblastlarında ve normal ve RA'lı kişilerden elde edilen sinovyal ve deri fibroblastlarının, Fas stimülasyonuna verdikleri yanıtı araştırdık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre kültürü: RA'lı üç hastadan sinovektomi ile ve sağlıklı bir kişiden postmortem olarak alınan sinovyal dokudan ve sağlıklı 3 kişinin derisinden elde edilen dokuların enzimatik dispersiyonu ile fibroblast kültürleri elde edildi. Kısaca, deri veya sinovyal doku, bistüri ile küçük parçalara ayrıldıktan sonra, üzerine 10 ml dispaz solüsyonu [100 ml Joklik medyum (Gibco BRL, Eggenstein, Almanya) içinde 150 mg Dispaz (Boehringer-Mannheim)] konarak 37°C'de 200/dakika sallanacak şekilde 60 dakika enkübe edildi. Geniş gözenekli naylon bir filtreden süzülen sıvı kısım toplanarak, 2000'g de 10 dakika santrifüje edildi. Elde edilen hücre çökeltisi %10 FCS, 1.5 mM L-Glutamine, 100 U/ml penisilin, 100 U/ml

streptomisin, 10 mM Hepses-tamponu (Gibco BRL, Eggenstein, Almanya) içeren komplet DMEM vasatı (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco BRL, Eggenstein, Almanya) içinde çözündü. Hücre sayısı $1-2 \times 10^6$ milyon/ml olacak şekilde ayarlandı ve 75 cm² lik steril flasklara konup büyümeye bırakıldı. Hücreler, ekildikleri flask yüzeyini doldurduklarında yeni pasajlar elde edildi. Pasaj yapılırken hücrelerin yapıştıkları flask yüzeyinden ayrılabilmesi için, Tripsin-EDTA (Gibco BRL, Eggenstein, Almanya) ile tripsinasyon yapıldı. Çalışmada, 2-9. pasajlar kullanıldı.

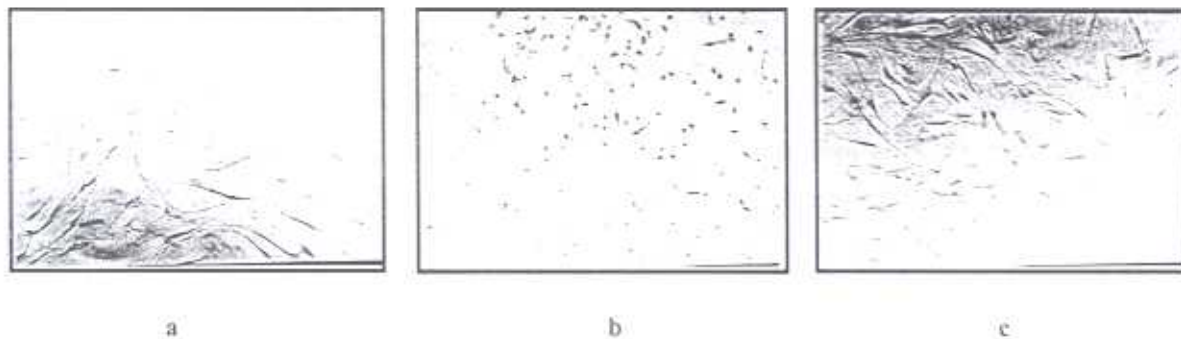
Fas ekspresyonunun FC ile ölçümü: Fibroblastlar, FITC ile işaretli anti-FasIgG antikorunu (Pharmingen, Hamburg) ile 4°C'de 30 dakika enkübe edildikten sonra PBS ile yıkanarak flow sitometre (FC) (Epics Profile II, Coulter) ile analiz edildiler. FITC ile işaretli izotipik bir monoklonal antikor negatif kontrol olarak kullanıldı.

Apoptozun belirlenmesi: 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) kullandı. Jurkat hücrele-

rinin Fas antikorunu ile, fibroblastların ise Act-D ile apoptozu uğradıkları bilinmektedir (10). Fas stimülasyonundan sonra apoptozun gelişip gelişmediği aşağıdaki metodlarla araştırıldı.

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

b) Anneksin bağlanması: 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 CaCl₂; 0.2 µm delikli filtre ile filtre edilmiş) sulandırıldıktan sonra, 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 (Epics Profile II, Coulter) ile analiz edildi.



Şekil 1. Fibroblastların (a) kültür vasatında (b) Act-D (0.5µ g/ml) (c) anti-Fas-IgM (1000 ng/ml) ile 48 saat enkübasyon sonrası inversiyonlu faz mikroskopisi ile görünüşleri

c) Propidyum Iodid (PI) boyanması : Altı kuyulu plaklarda Fas stimülasyonu yapıldıktan sonra fibroblastlar tripsinize edilerek toplandı. Hücreler 50µg/ml PI (Sigma, Almanya), %0.1 sodyum sitrat ve %0.1 Triton X-100 içeren hipotonik bir solüsyonda leze edilerek, nükleusları PI ile boyandı [14]. PI ile DNA'sı boyanan nükleusların floresanları FC (Epics Profile II, Coulter) ile ölçüldü.

H³ timidin proliferasyon deneyi: Proliferasyon deneyleri Vilcek Tarafından tarif edildiği şekilde yapıldı (15). Kısaca, fibroblastlar, 100 µl komplet DMEM içinde 5x10³/kuyu olacak şekilde 96'lık düz dipli hücre plaklarına ekildiler (Nunc, Kamstrup, Danimarka). Nemlendirilmiş, %5 CO₂ atmosfer içeren enkübatörde 37⁰C'de bir gece bekletildikten sonra, test edilecek kuyulara son konsantrasyon 1000 ng/ml olacak şekilde anti-Fas IgM ilave edildi. Kontrol kuyularına ise, DMEM vasatı eklendi. Yetmişiki saatlik enkübasyonun son 24 saatinde, her kuyuda 0.5 µCi olacak şekilde H³ timidin (Amersham, Braunschweig, Almanya) ilave edildi. Yarı-otomatik bir hücre harmanlayıcısı (cell harvester) kullanarak cam filtrelerde hücreler harmanlandıktan sonra, inkorpore olmuş H³ timidin beta sintilasyon sayacı ile ölçüldü. Sonuçlar tripliklat ölçümlerin ortalaması olarak belirtildi.

İstatistiksel analiz: Anti Fas antikoru ile stimüle edilen deri ve sinovyal fibroblastların H³ timidin testi ile ölçülen cpm sonuçları kontrol kuyularda elde edilen sonuçlarla, Wilcoxon işaretli mertebeler testi kullanılarak karşılaştırıldı. P değeri < 0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

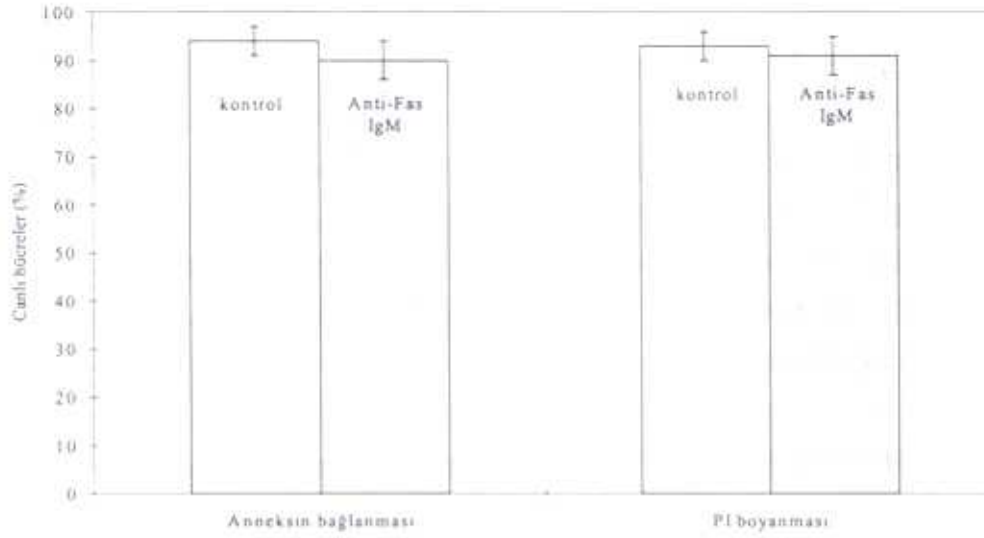
BULGULAR

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

Morfolojik olarak normal fibroblastlar iğsi yapıda olup, kültür plağının tabanına yapışırılar (Şekil 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 (Şekil 1b). Ani-Fas stimülasyonu ile fibroblastlarda bu morfolojik değişiklikler görülmedi (Şekil 1c).

FITC ile işaretli anti-Fas antikolar kullanılarak, FC ile fibroblastların Fas antijenini eksprese ettikleri gösterildi. Ancak Fas stimülasyonu sonrası, FC ile PI boyanması sonrası yapılan ölçümlerde, Fas stimülasyonu ile sinovyal fibroblastlarda artmış bir apoptoz saptanmadı (Şekil 2). Fas ile stimüle edilen hücrelerin ortalama % 91'i (ORT ± SD; 91 ± 3, n=10), stimülasyon yapılmayan hücrelerin ise % 93'ü (ORT ± SD; 93 ± 4, n=10) non-apoptotikti. Dermal ve sinovyal fibroblastlar arasında Fas stimülasyonuna verilen apoptotik cevap bakımından bir fark yoktu (veriler gösterilmemiştir).

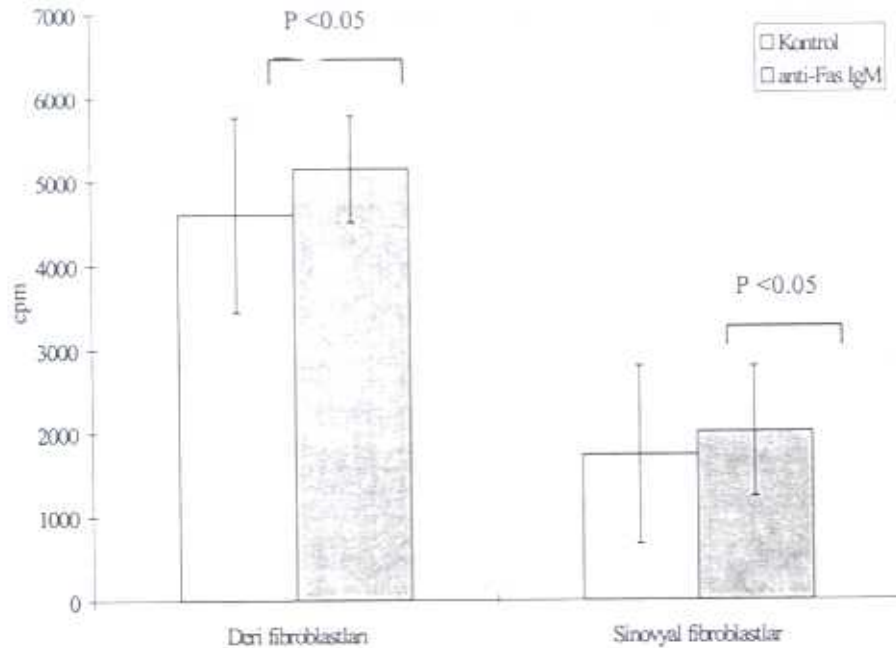
Anneksin V boyanması ve sonrasında yapılan sitometrik ölçümlerde de artmış bir apoptoz görülmedi (Şekil 2). Fas ile stimüle edilen sinovyal fibroblastların ortalama % 90'ı (ORT ± SD; 90 ± 3, n=10), stimülasyon yapılmayan hücrelerin ise % 94'ü (ORT ± SD; 94 ± 4, n=10) non-apoptotikti. Dermal fibroblastlarla elde edilen bulgular da benzerdi (veriler gösterilmemiştir).



Şekil 2. Anti-Fas IgM (1000 ng/ml) ile 48 saat stimülasyondan sonra fibroblastlarda apoptoz anneksin bağlanması ve PI boyanması yapılarak FC ile ölçüldü (n=10). Non-apoptotik hücreler canlı hücre olarak kabul edildi.

H³ timidin proliferasyon deneyi: Fas stimülasyonu ile hem deri hem de sinovyal fibroblastlarda H³ timidin tutulumunda küçük, fakat anlamlı bir artış saptandı. Ortalama cpm

değerleri, stimülasyon yapılan deri fibroblastlarında (5148 ± 637) ve sinovyal fibroblastlarda (2010 ± 780) kontrollere göre daha yüksekti (sirasıyla, 4606 ± 1157; 1731 ± 1070)(Şekil 3).



Şekil 3. Deri ve sinovyal fibroblastlar anti-Fas IgM veya kontrol vasatı ile stimüle edilerek H³ tutulum testi ile yapılan cpm ölçümleri.

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 bildirilmiştir. Bir çalışmada, kusurlu Fas ligandı ekspresyonu nedeniyle aktive olmuş T lenfositlerinin ortadan kaldırılmasındaki yetersizliğin RA patogenezinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (16). 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 uğradıkları bildirilmiştir (17). Sinovyumdaki T lenfositlerinde Fas antijeni ve Fas ligandı ekspresyonunun artmış olduğu ve Fas reseptörünün uyarılmasıyla gelişen apoptozun, osteoartrozda görülmeyen, RA'ya özgü bir bulgu olduğu da ileri sürülmüştür (18-19).

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 (9-10). Ancak, bu çalışmalarda in vivo olarak sinovyal fibroblastlarda apoptoz nadir bulunmuştur. Bir başka çalışmada da, romatoid sinovyal dokuda apoptozun nadir de olarak görüldüğü ve artmış bcl-2 ekspresyonunun apoptozu engelleyerek sinovyal hiperplaziye yol açabileceği ileri sürülmüştür (20).

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 (9-10). Nishioka ve arkadaşlarının çalışmasında fibroblastlar 100 ng/ml anti-Fas IgM ile 37°C'de 15 dakika enkübe edildiklerinde, RA sinovyal hücrelerinde %90'ın üzerinde, osteoarozlu hastalardan elde edilen sinovyal fibroblastlarda ise %30 civarında bir hücre ölümü olduğu gösterilmiştir (9). Firestein ve arkadaşlarının çalışmasında da 16 saatlik 80 ng/ml anti-Fas IgM stimülasyonu ile sinovyal hücrelerde ortalama % 42 apoptoz olduğu bulunmuştur (10). İlk çalışmalarda kullanılan düşük konsantrasyondaki anti-Fas antikoru ile sinovyal hücrelerde %45-90 düzeyinde bildirilen apoptoza rağmen, sonraki çalışmalarda 1000 ng/ml gibi, ilk bildirilenin 10 misli yüksek konsantrasyonun kullanılmak zorunda kalınması dikkat çekicidir (11,12,21). Bizzat Nishioka ve arkadaşlarının romatoid sinovyal fibroblastlarda JNK (c-Jun NH₂-terminal protein kinaz) aktivasyonu ile apoptoz geliştiğini bildirdikleri daha sonraki bir çalışmasında, ilk çalışmalarından 10 misli yüksek konsantrasyonda anti-Fas kullanmalarına rağmen 15 saatteki apoptoz oranı % 15'in biraz üzerindedir (21). 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 saptayamamışlardır (22).

TNF reseptörlerinin, insan diploid fibroblastlarında proliferasyona yol açtığı bildirilmiştir (15). Fas reseptörü ile TNF reseptörleri arasındaki benzerlik gözönüne alınarak, Fas reseptörünün uyarılmasının fibroblastlarda proliferasyona yol açıp açmadığı da H³ timidin tutulma testi ile araştırıldı. Bu test ile, anti-Fas ile enkübe edilen kuyularda eğer apoptoz gelişseydi, kontrol kuyularına göre daha düşük ölçümlerin elde edilmesi gerekirdi. Ancak, tam aksine Fas stimülasyonu yapılan kuyularda artmış bir proliferasyona işaret eden artmış H³ timidin tutulumunu saptandı. Nitekim, bir çalışmada Fas stimülasyonunun insan deri fibroblastlarında proliferasyona yol açtığı bildirilmiştir (13). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar da, sinovyal fibroblastların Fas stimülasyonuna dermal fibroblastlara benzer bir yanıt verdiklerini göstermektedir. Artmış Fas ekspresyonunun, Fas stimülasyonu ile görülen proliferasyonu daha da artırıp arttırmayacağı ise daha ilerideki çalışmaların konusu olabilir.

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

KAYNAKLAR

1. Gerschenson LE, Rotello RJ: Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J* 1992; 6: 2450-2455.
2. Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al.: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-243.
3. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S: Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; 356: 314-317.
4. 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.
5. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S: Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993; 75: 1169-1178.
6. Watson ML, Rao JK, Gilkeson GS, et al.: Genetic analysis of MRL-lpr mice: relationship of the fas apoptosis gene to disease manifestations and renal disease-modifying loci. *J Exp Med* 1992; 176: 1645-1656.
7. Takasashi T, Tanaka M, Brannan CI, et al.: generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994; 76: 969-976.
8. Cheng J, Zhou T, Liu C, et al.: Protection from fas mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263: 1759-1762.
9. Nakajima T, Aono H, Hasunuma T, et al.: Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 485-491.
10. Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ: Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest* 1995; 96: 631-638.
11. Kawakami A, Eguchi K, Matsuoka N, et al.: Inhibition of Fas antigen-mediated apoptosis of rheumatoid synovial cells in vitro by transforming growth factor beta 1. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1267-1276.
12. Tsuboi M, Eguchi K, Kawakami A, et al.: Fas antigen expression on synovial cells was down-regulated by interleukin 1 beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218: 280-285.
13. 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; 64: 5-8.
14. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, 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.
15. Vilcek J, Palombella VJ, Henriksen-DeStefano D, et al.: Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 1986; 163: 632-643.
16. Cantwell MJ, Hua T, Zvaifler NJ, Kipps TJ: Deficient Fas ligand expression by synovial lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1644-1652.

17. 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.
18. Hasunuma T, Hoa TT, Aono H, et al.: Induction of Fas-dependent apoptosis in synovial infiltrating cells in rheumatoid arthritis. *Int Immunol* 1996; 8: 1595-1602.
19. Hoa TT, Hasunuma T, Aono H, et al.: Novel mechanisms of selective apoptosis in synovial T cells of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996; 23: 1332-1337.
20. 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.
21. 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.
22. Aicher W: Human synovial fibroblasts are resistant to anti-CD95 (fas) induced apoptosis. *Arthritis Rheum* 1996; 39(suppl): 75.