

Dr. Şermin GENÇ¹
Dr. Sefa
KIZILDAĞ¹ Dr.
Kürşad GENÇ¹ Dr.

ÖZET

Son yıllarda yapılan çalışmalar merkezi sinir sisteminin makrofajları olan mikroglial hücrelerin Alzheimer Hastalığı (AH) ve Parkinson hastalığı gibi kronik nörodejeneratif hastalıkların pato-genezine katkıda bulunduğunu göstermiştir. Kronik nörodejene-rasyon sürecinde aktive duruma geçen mikroglial hücreler salgıladıkları nörotoksik faktörler aracılığıyla nöronal hasara yol açmaktadır. Bu faktörler yanı sıra Tümör Nekrozis Faktör (TNF) ailesinden olan TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gibi hücre ölüm ligandları da mikroglia aracılıklı nörotoksik etkiye aracılık ediyor olabilir. TRAIL'i n monositer seri hücrelerinde inf-lamatuvar uyarılarla indüklenen ekspresyonunun bulunduğu ve sitotoksik etkilerine aracılık ettiği saptanmıştır. Bu çalışmada N9 fare mikroglial hücre hattı hücrelerinde in vitro bazal ve inflamatuvar uyarılarla [lipopolisakkarid (LPS) ve interferon gamma (IFNy)] indüklenilen TRAIL proteini ve mRNA ekspresyonu araştırıldı. Protein ekspresyonu için immünpresipitasyon -immuno-blotting, mRNA ekspresyonu için Reverse Transcriptase- Poly-merase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemleri kullanıldı. Çalışmanın sonuçları N9 hücrelerinde bazal TRAIL protein ve mRNA ekspresyonunun bulunduğunu ve bu ekspresyon düzeylerinin LPS ve IFNy uyarımıyla arttığını gösterdi. Her iki ajanın TRAIL proteini ve mRNA ekspresyonunu indükleyici etkisinin sinerjistik olduğu bulundu. Bu sonuçlar N9 mikroglial hücre hattı hücrelerinde bazal ve inflamatuvar uyarılarla indüklenilen TRAIL protein ve mRNA ekspresyonunun varlığını işaret etmektedir. İnflamatuvar koşullarda aktive olan mikroglial hücrelerde artış, gösteren TRAIL bu hücrelerin hedef hücreler üzerine sitotoksik etki oluşturmalarına katkıda bulunuyor ve nörodejeneratif süreçlerde rol oynuyor olabilir.

Anahtar Sözcükler Alzheimer Hastalığı, Nörotoksisite, Mikroglia, TRAIL, N9 hücre hattı.

ARAŞTIRMA

İNFLAMATUVAR UYARANLARIN MİKROGLİAL TRAIL EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

THE EFFECT OF INFLAMMATORY STIMULI ON MICROGLIAL TRAIL EXPRESSION

ABSTRACT

Recent studies showed that microglial cells which are macrophages of central nervous system, contribute to the pathogenesis of chronic neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease. Microglia activated in chronic neurodegeneration process result in neuronal injury by secreted neurotoxic factors. In addition to these soluble factors, cell death ligands such as Tumor Necrosis Factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) from TNF superfamily might mediate microglia-induced neurotoxicity. It has been found that monocyte lineage cells express basal and inflammatory stimuli-induced TRAIL and this molecule mediates their cytotoxic effect. In this study, basal and inflammatory stimuli [lipopolysaccharide (LPS) and interferon gamma (IFNy)]-induced TRAIL expression has been investigated in N9 murine microglial cell line in vitro. Immunoprecipitation-immunoblotting for protein expression and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for mRNA expression have been used. Results of study showed that basal TRAIL and mRNA expression exist and these expression levels increase by LPS and IFNy stimulation in N9 cells it has been found that both agents have synergistic inducing effect on TRAIL protein and mRNA expression. These results point the presence of basal and inducible TRAIL protein and mRNA expression in N9 microglial cell line. TRAIL that is increased on microglial cells activated in inflammatory conditions might be involved in cytotoxic effect of these cells on target cells and play role in neurodegenerative process.

Key Words: Alzheimer's Disease, Neurotoxicity, Microglia, TRAIL, N9 cell line.

Geliş: 15/10/2001

Kabul: 28/02/2002

¹ Dr. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

²Fizyoloji Anabilim Dalı

İletişim: Dr. Serinin GENÇ, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Inciraltı, 35340, İzmir

GİRİŞ

Alzheimer Hastalığı (AH), dünyada milyonlarca kişiyi etkileyen ve demans tablosunun en sık nedeni olan kronik nörodejeneratif bir hastalıktır.¹ Hastalık nöropatolojik olarak beyin dokusunda amiloid plakların ve nörofibriler yumakların bulunmasıyla karakterizedir. Bu patolojik bulgulara astroglial ve mikrogliyal aktivasyonun eşlik etmesi ve plakların çevresinde akut faz proteinleri, stokinler, kompleman elemanları ve proteazlar gibi inflamasyon sürecine katılan bir çok maddenin varlığının saptanmış olması AH'da inflamatuvar süreçlerin ve glial aktivasyonun da patojenik sürecin bir parçası olduğunu ya da en azından hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.^{1,2} Öne sürülen patojenik mekanizmalardan biri amiloid peptid ve inflamatuvar uyarılarla aktive olan mikrogliyal hücrelerden salınan proinflamatuvar sitokinlerin ve nörotoksinlerin nöronal hasara yol açması ya da şiddetlendirmesidir. AH "da inflamatuvar süreçlerin katkısını destekleyen bulgulardan biri de anti-inflamatuvar tedavi yaklaşımlarının bu hastalıkta kısmen yarar göstermesidir.

Mikrogliyal hücreler beyin parankimi fagositer hücreleridir ve diğer dokulardaki makrofajlara benzer biçimde aktive oldukları da fagositoz, antijen sunumu ve çeşitli inflamatuvar ve nörotoksik faktörlerin salınımı gibi özellikler göstermektedir.² İn vitro deney koşullarında mikrogliyal hücrelerden salınan nitrik oksid, ok-sidatif radikaller, inflamatuvar sitokinler gibi maddelerin nöron hasarına yol açtığı gösterilmiştir.² Fakat mikrogliyal hücrelerin diğer monosit-makrofaj soyundan hücrelere benzer biçimde yüzeylerinde ekspresye ettikleri hücre ölüm reseptörü ligandları aracılığıyla da hedef hücre ölümünü tetiklemesi olasıdır. Tümör Nekrozis Faktör (TNF) ailesinden olan TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) bunlardan birisidir. TRAIL, 32 kDa ağırlığında bir proteindir ve 4 değişik reseptöre bağlanabilmektedir.¹¹⁻¹⁴ Bu molekül, vücudun çeşitli patojenlerden ve prekanseröz hücrelerden korunmasında rolü olan monosit, makrofaj, dendritik hücreler, natural killer hücreleri ve sitotoksik T lenfositler gibi hücrelerde ekspresye edilmektedir ve bu hücrelerin gösterdiği sitotoksik etkiye aracılık etmektedir.^{4-6,8} İnflamatuvar uyarılar monositer hücrelerde TRAIL ekspresyonunu arttırmaktadır.⁶ Monositer hücreler ile aynı kökenden gelişen ve merkezi sinir sisteminin makrofajları olarak adlandırılan mikrogliyal hücrelerin de aktivasyon sonucunda TRAIL ekspresye ederek, hedef hücreleri bu yolla apoptotik ölüme sokmaları olasıdır. İnsan astrositleri ile yapılan in vitro bir çalışmada, interlökin-1 ve TNF- α ile indüksiyon sonucunda TRAIL mRNA ekspresyonun artmış olduğu gösterilmiştir.³ Ayrıca nöron al ve glial hücrelerin in vitro kültür ortamına katılan TRAIL'in hücre ölümüne yol açtığı bildirilmiştir.^{9,10} Deneysel beyin iskemisi modelinde apoptotik nöronların bulunduğu bölgelerde TRAIL ekspresyonu artmış olarak saptanmıştır.⁷ İskemik hasara bağlı apoptotik nöron ölümüne Fas ve TRAIL hücre ölüm li-gandlarının aracılık ettiği düşünülmektedir.⁹ Bu bulgular patolojik

koşullarda TRAIL molekülünün nöron ölümüne aracılık eden mekanizmalardan birini oluşturduğunu düşündürmektedir. Fakat beyin TRAIL ekspresyonunun hücresel kaynağı bilinmemektedir. Bir olasılık TRAIL'in mikrogliya kökenli olmasıdır. Ancak mikrogliyal hücrelerde bazal ve indüklenbilir TRAIL proteini ve mRNA ekspresyonunun olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Bu nedenle bu çalışmada fare N9 mikrogliyal hücre hattı hücrelerinde bazal ve inflamatuvar uyarılarla [lipopolisakarid (LPS) ve interferon gamma (IFNy)] indüklenbilir TRAIL protein ekspresyonunun immunpresipitasyon-immunoblotting yöntemiyle. TRAIL mRNA ekspresyonunun ise Reverse Transcriptase-Poly-merase Chain Reaction (RT-PCR) yöntemiyle araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kimyasallar

LPS (E. coli) Sigma firmasından; Western-blotting molecular marker Novex firmasından, rekombinan fare IFNy, PVDF blot-ting membran, first strand cDNA sentez kiti ve PCR core kiti Roche firmasından; anti-TRAIL antikoru Santa Cruz firmasından; yağsız süt tozu Nestle firmasından; ECL ki ti Amersham firmasından; Kodak X-mat film Kodak firmasından; RPMI 1640 kültür ortamı, L-glutamin, penisilin ve streptomisin Biochrom KG firmasından; kültür kapları Greiner firmasından sağlandı. Pozitif kontrol olarak Dr. Hideo Yagita (Japonya) tarafından sağlanan fare TRAIL cDNA'sı kullanıldı.

N9 Hücre Kültürü

N9 hücre hattı Ur. Paola Riccardi-Castagnoli (İtalya) tarafından sağlandı. Deneylerde bu hücre hattının 20—40 arasındaki pasajları kullanıldı. N9 hücreleri kültür kaplarına 1×10^5 hücre/ cm^2 yoğunluğunda ekildi. Kültür ortamı olarak % 5 oranında ısıyla inaktive edilen ve 0. 45 mm filtreyle süzülen fetal dana serumu, % 1 oranında L-glutamin. 100 U/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin içeren RPMI 1640 ortamı kullanıldı. Ekim sonrası kültürler % 5 karbondioksitli nemli hava içeren $37^\circ C$ sıcaklıkta enkübatöre konuldu.

İN VİTRO DENEYLER

N9 hücreleri sıkışığa yakın bir duruma geldiğinde in vitro deneylere geçildi. Kültürlere 100 ng/ml konsantrasyonda LPS ve 100 U/ml konsantrasyonda IFNy birlikte ya da ayrı ayrı eklendi. Bu maddelerin eklenmediği kültürler bazal TRAIL ve TRAIL mRNA ekspresyonunu araştırmak için kullanıldı. Ardından kültürler karbondioksit enkübatöründe 4-48 saat arasında değişen süreyle enkübe edildi. Enkübasyon süresinin sonunda hücreler kültür kaplarından hücre kazıyıcısı ile kaldırıldı.

İmmünpresipitasyon-immunoblotting

Değişik sitokinlerle enkübasyon sonrasında hücreler proteaz inhibitörü bulunan Lysis buffer'ı ile lize edilerek protein ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Örneklerdeki protein miktarı BCA prote-

in assay ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Her bir örneğe 100 mg anti-TRAIL antikoruna eklenecek şekilde 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Gamma bind sefaroza ile 2 saat enkübe edilerek spesifik olarak TRAIL antikoruna bağlanan proteinler elde edildi. Her bir koşul için eşit miktarda kuyulara yüklenen proteinler % 12'lik SDS PAGE elektroforezi ile ayrıldı ve elektroforetik olarak PVDF membrana aktarıldı. Non-spesifik bağlanmaların önlenmesi için % 5 yağsız süt tozu kullanıldı. Örneklerdeki TRAIL miktarının belirlenmesi için primer antikor olarak rabbit anti-TRAIL antikoruna ile bütün gece enkübasyon yapıldı. Ardından örnekler sekonder antikor olarak anti-tavşan IgG-HRP ile 1 saat enkübe edildi. Görüntüleme kemilüminesans esasına dayanan ECL kiti ve Kodak X-mat film kullanılarak gerçekleştirildi.

RT-PCR

TRAIL mRNA'sının gösterilmesi için kültür sonunda toplanan hücrelerden Nucleospin RNA izolasyon kitiyle RNA elde edildi. Daha sonra MMV-Reverse Transkriptazı ve random hexamerler kullanılarak c-DNA elde edildi. Ardından G3PDH ve TRAIL'e özgül primerlerle PCR yapıldı. G3PDH primerleri ile yapılan PCR amplifikasyonunun amacı RNA izolasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi ve TRAIL amplifikasyonunda eşit cDNA kullanılıp kullanılmadığının kontrolüdür. PCR siklusu olarak başlangıç denatürasyonu 93°C'de 4 dk, denatürasyon 93°C'de 30 sn; annealing 57°C'de 30 sn; ekstansiyon 72°C'de 2 dk olacak şekilde 30 siklus ve son ekstansiyon olarak 72°C'de 5 dk olarak gerçekleştirildi. PCR ürünleri etidium bromide içeren % 2 agaroz jelde yürütülerek görüntülendi. Pozitif kontrol olarak fare TRAIL cDNA'sı kullanıldı.

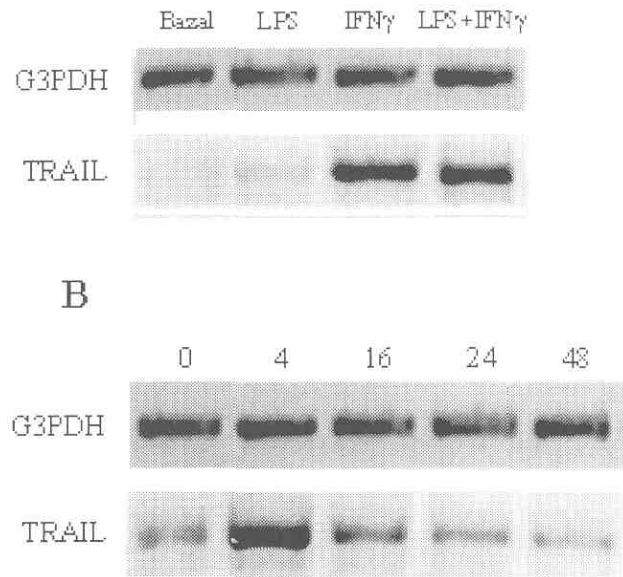
BULGULAR

Bu çalışmada elde edilen bulgular N9 fare mikroglial hücre hatlı hücrelerinde bazal TRAIL mRNA ekspresyonunun bulunduğunu gösterdi. LPS ve IFN γ ile 24 saat uyarılan hücrelerde bu ekspresyonun belirgin arttığı saptandı (Şekil 1A). LPS ile indüklenbilir TRAIL mRNA ekspresyonunun zaman içinde değişiminin incelendiği deneylerde aktivasyon sonrası mRNA ekspresyonunun hızlı bir artış gösterdiği (indüksiyondan 4 saat sonra) ve 48 saat sonrasında transkripsiyonun halen devam ettiği bulundu (Şekil 1B).

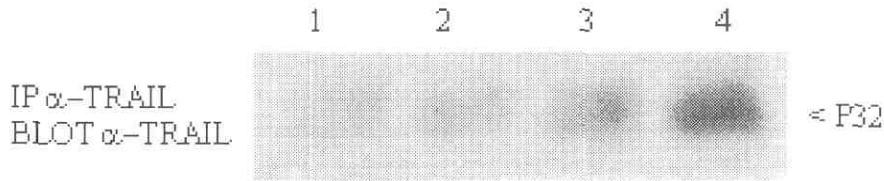
İmmünpresipitasyon-immunoblotting yöntemi N9 hücrelerinde bazal TRAIL protein ekspresyonunun varlığını ortaya koydu (Şekil 2). N9 hücrelerinin birlikte ya da ayrı ayrı LPS ve IFN γ ile 24 saat aktivasyonunun ardından yapılan immünpresipitasyon-immunoblotting incelemesinde ise TRAIL protein ekspresyonunun arttığı ve bu artışın her iki maddenin birlikte uygulandığı koşulda daha belirgin olduğu saptandı.

TARTIŞMA

Mikroglial hücreler merkezi sinir sisteminin mononükleer fagositer hücreleridir. Fetal yaşamın erken evrelerinde beyin dokusuna yerleşen bu kan kökenli hücreler erişkin yaşamda normalde inaktif durumlarını sürdürmektedir.² İnflamatuvar olaylarda aktive olan mikroglia'nın fagositoz ve antijen sunma özellikleri artmakla, salgıladığı sitokinler, kemokinler, oksidatif radikaller, nitrik oksid, arasonik asit ürünleri ve matris metalloproteinazlar



Şekil-1: N9 hücrelerinde bazal ve inflamatuvar uyarılarla indüklenen TRAIL mRNA ekspresyonu. A. LPS ve IFN γ indüksiyonu sonrasında G3PDH ve TRAIL mRNA ekspresyonu.



Şekil-2: LPS ve IFN γ 'ın N9 hücrelerinde TRAIL protein ekspresyonunu artırıcı etkisi. 1 indüksiyon uygulanmayan (bazal), 2 yalnız LPS indüksiyonu yapılan, 3 yalnız IFN γ indüksiyonu yapılan, 4 LPS ve IFN γ 'nın indüksiyon için birlikte kullanıldığı örneklerle ait immünpresipitasyon-immunoblotting sonuçlarını göstermektedir.

aracılığıyla immün yanıtı katılmaktadır. Fakat AH gibi patolojik süreçlerde mikroglial aktivasyon bu ürünler aracılığıyla nöron hasarına katılmakta ya da en azından nöron hasarını arttırmaktadır.¹ AH'da mikroglial aktivasyon sonucu gelişen bu sürecin hastalığın patogenezinde primer mi, yoksa sekonder bir olay mı olduğu henüz kesinlik kazanmamıştır. AH patogenezinin sorumlu tutulan amiloid-beta peptidin mikroglial aktivasyonun güçlü uyarıcılarından biri olduğu bilinmektedir. Sekonder ya da primer olsun yine de mikroglial aktivasyon sürecini baskılamaya yönelik tedavi yaklaşımları AH'da en azından hastalığın ilerlemesini yavaşlatabilir.

Mikroglial hücrelerin aynı soydan olduğu periferik mononükleer fagositler hücreler yukarıda belirtilen salgılanma ürünleri yanısıra immün yanıtı yüzeylerinde ekspresyon ettikleri ve inflamasyon koşullarında ekspresyonu artan TRAIL gibi hücre ölüm ligandları aracılığıyla da katılmaktadır. Benzeri bir mekanizma glial hücreler için de geçerli olabilir. Gerçekten de astroglial hücrelerde interlökin-1 ve TNF- α ile indüksiyon sonucunda TRAIL mRNA ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir.³ Fakat mikroglial hücrelerde TRAIL ekspresyonu ile ilgili bir çalışma yayınlanmamıştır. Biz bu çalışmada mikroglial hücrelerde TRAIL ekspresyonunun varlığını ilk kez gösterdik. Çalışmada kullanılan N9 fare mikroglial hücreleri primer mikroglia ile aynı fenotipik özellikleri gösteren hücrelerdir ve bu çalışmada uygulanan moleküler biyolojik yöntemler için fazla sayıda hücre gerekmesi nedeniyle hücre hattı kullanılması avantaj sağlamaktadır. Hücre hattının bir başka avantajı hücrelerin saf olmasıdır. Ancak saydığımız bu avantajları nedeniyle tercih edilen N9 hücre hattında yapılan bu deneylerin primer mikroglia kültürlerinde de tekrarlanması uygun olacaktır.

Bu çalışmada mikroglial hücrelerde minimal düzeyde bazal TRAIL protein ve mRNA ekspresyonu saptandı. Bu durum monosit ve makrofajlarda saptanan bulgularla aynı doğrultudadır.⁶ Yine monosit ve makrofajlara benzer biçimde inflamatuvar uyarıların mikroglial TRAIL ekspresyonunu arttırdığı bulundu.^{5,6} Çalışmada in vitro mikroglial aktivasyon için LPS ve IFN γ seçilmiştir. LPS özellikle doğal immün yanıtın güçlü bir uyarıcısıdır ve mikroglial hücrelerde proinflamatuvar aracı maddelerin salınmasını indüklemektedir. Çalışmamızda IFN γ 'nın LPS'den daha güçlü olarak TRAIL ekspresyonunu arttırdığı saptandı. İnsan monosit hücrelerinde yapılan iki çalışmadan birinde 5 ng/ml dozda LPS'in TRAIL ekspresyonu üzerine etkisinin olmadığı saptanmış, diğer çalışmada ise 10-100 ng/ml dozda LPS'in indükleyici etkisi gösterilmiştir.^{5,6} Bu çalışmada ise 100 ng/ml LPS'in mikroglial TRAIL ekspresyonunu indükleyici etkisi bulundu. Bu doz mikroglial aktivasyon çalışmalarında kullanılan mutad dozdur. Literatür bulgularıyla birlikte bu sonuçlar LPS'in TRAIL ekspresyonu üzerine doza bağımlı bir etkisine işaret etmektedir. LPS'in mikroglial TRAIL'in transkripsiyonel kontrolü üzerine et-

kisini araştırdığımız zaman içinde değişim analizinde de insan makrofajlarında bildirilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edildi. LPS, uygulandıktan 4 saat kadar sonra TRAIL mRNA ekspresyonu nda artışa yol açmakta ve bu ekspresyon düzeyi 48. saate kadar sürmektedir. Bu yönüyle mikroglial TRAIL ekspresyonunun transkripsiyonel kontrolü bazal mRNA ekspresyonun güçlü olduğu monositlerden çok bazal ekspresyonun minimal olduğu ve LPS ile belirgin uyarıldığı periferik makrofajlardakine benzemektedir.

İnflamatuvar uyarımlarla belirgin indüklenen mikroglial TRAIL ekspresyonunun fonksiyonel anlamı henüz bilinmemektedir. Aktive olduğunda TRAIL ekspresyonu artan mikroglial hücreler bu yolla merkezi sinir sisteminde immün yanıtı uyarıcı ya da baskılayıcı yönde katkıda bulunabilir. Periferik monositler seri hücrelerinedekine benzer biçimde mikroglia kaynaklı TRAIL, en-fekte hücrelerin ya da tümör hücrelerinin apoptoz ile elenmesine katılabilir ya da aktive olmuş T lenfositlerinde apoptotik hücre ölümünü uyararak immün yanıtları sınırlayıcı özellik gösterebilir. Bir başka olasılık da mikroglial TRAIL'in nöronal ve oligodendroglial hücrelerin apoptotik ölümüne yol açarak AH ya da multipl skleroz gibi nörodejeneratif ve nöroinflamatuvar hastalık süreçlerini hızlandırmasıdır. Gerçekten de nöronal ve glial hücrelerin kültür ortamına eklenen TRAIL aracılıklı ölüme duyarlı olduğu in vitro çalışmalarla gösterilmiştir.^{9,10} Fakat mikroglia kaynaklı TRAIL'in benzeri bir sonuca yol açıp açmadığının saptanması için fonksiyonel deneylerin yapılacağı mikroglia-nöron ve mikroglia-oligodendrosit ko-kültür çalışmalarına gerek vardır. Sonuç olarak bu çalışma bazal ve indüklenbilir mikroglial TRAIL ekspresyonunun varlığını in vitro olarak gösteren ilk çalışmadır. Bu çalışmayı tamamlayıcı fonksiyonel deneylerin sonuçları mikroglial hücrelerde TRAIL ekspresyonunun nörotoksitesiteyle olası bağlantısını ortaya koyabilir ve bu mekanizmayı baskılamaya yönelik girişimler AH'nın tedavisine yeni bir yaklaşım getirebilir

KAYNAKLAR

1. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mucke R, Mucke IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000; 21:383-421.
2. Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM. Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2001; 39:381-391.
3. Choi C, Park JY, Lee J, Lim JH, Shin EC, Ahn YS, Kim

- CH. Kim SJ. Kim JD, Choi IS. Choi IH. Fas ligand and fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF- α , or IFN-g. *J Immunol* 1999;162:1889-1895.
4. Fanger NA. Maliszewski CR, Schootey K. Gritfuh TS, H uman dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med*. 1999;190:1155-1164.
 5. Griffith TS. Wiley SR. Kubin MZ. Sedger LM, Malisze wski CR. Fanger NA. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med*. 1999;189:1343-1354.
 6. Halaas O. Vik R. Ashkenazi A. Espevik T. Lipopolysacc- haride induces expression of APO2 ligand/TRAIL in hu- man monocytes and macrophages. *Scand J Immunol*. 2000: 51244-250.
 7. Herr I. Martin-Villalba A. Kurz E. Roncaioli P. Schenkel J.Cifone MG.Debatin KM. FK506 prevents stroke-indu- ced generation of ceramide and apoptosis signaling. *Brain Res* 1999: 826:210-219.
 8. Kayagaki N. Yamaguchi N, Nakayamu M. Takeda K. Akiba H. Tsutsui H. Okamura H. Nakanishi K, Okamura K. Yagita H. Expression and function of the TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* 1999;163:1906-1913.
 9. Manin-Villalba A, Herr I. Jeremias I. Haline M. Brandt R. Vogel J. Schenkel J. Herdegen T. Debalin KM. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis- inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci*. 1999;19:3809-3817
 10. Nitsch R, Bechmann I. Deisz RA. Haas D. Lehmann TN. Wendling U, Zipp F, Human brain cell death induced by tumour necrosis factor-related upoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Lancet*.2000. 356:827-828.
 11. PanG.O'Rourke K.Chinnaiyan AM. Geniz R, Ebner R. Ni J. Dixit VM, The receptor for the cytosolic ligand TRAIL. *Science* 1997;276:111-113.
 12. Pan G, Ni J. Wei YF. Yu G. Geniz R. Dixit VM, An an- tagonist decoy receptor and death domain-containing re- ceptor for TRAIL. *Science* 1997;277:815-818.
 13. Sheridan JP. Marsters SA, Pitti RM.Gurney A. Skubatch M. Baldwin D, Ramakrishnan L. Gray CL. Baker K. Wood WI, Goddard AD. Godowski P, Ashkenazi A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. 1997;277:818-821.
 14. Wiley SR. Schooley K. Smolak P.I. Din WS. Huang CP. Nicholl JK. Suthedand GR. Smith TD, Rauch C. Smith CA. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673- 682.