

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:**  
**NEFROLOGIA**  
Mestrado e Doutorado

**PAPEL PRÓ-INFLAMATÓRIO DO RECEPTOR CD40**  
**EM ILHOTAS PANCREÁTICAS**

Tese de Doutorado

**FLORENCIA MARÍA BARBÉ-TUANA**

Porto Alegre, janeiro de 2006.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:**  
**NEFROLOGIA**  
Mestrado e Doutorado

**PAPEL PRÓ-INFLAMATÓRIO DO RECEPTOR CD40**  
**EM ILHOTAS PANCREÁTICAS**

**FLORENCIA MARÍA BARBÉ-TUANA**

Tese de Doutorado apresentada como pré-requisito para a obtenção do título de DOUTOR  
em Ciências Médicas: Nefrologia.

Orientador: Professor Doutor David Saitovitch

Co-orientador: Professor Doutor Luiz Felipe Santos Gonçalves.

Porto Alegre, janeiro de 2006.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Marcus, a quem amo e admiro profundamente, por ter me estimulado a ficar tão longe e ao mesmo tempo senti-lo tão perto.

Aos meus pais, Kitty e Enrique e meus irmãos Nicolás, Valentina e Magdalena, pelo contínuo contato longe de casa.

Ao meu orientador e amigo David Saitovitch, pelo estímulo e apoio para fazer pesquisa fora do Brasil. Por acreditar em mim, por me fazer parte de seus projetos.

Agradeço ao meu co-orientador nos Estados Unidos no *Diabetes Research Institute*, Dr. Ricardo L. Pastori, cuja contínua troca de idéias, contínuo estímulo, confiança, desafio e supervisão ajudaram-me a desenvolver espírito crítico e tenacidade para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Camillo Ricordi e ao Dr. Rodolfo Alejandro, por terem-me permitido continuar minha formação profissional no renomado *Diabetes Research Institute*, da *University of Miami*.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na figura dos Dres. Luis Felipe S. Gonçalves, Roberto Ceratti Manfro e Elvino Guardião Barros e da Sra. Rute Santos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Profissionais de Nível Superior (CAPES), pelo seu apoio na concessão da bolsa de doutorado sanduíche, apoio financeiro que possibilitou minha estadia no exterior.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	III
RESUMO .....	VI
ABSTRACT .....	VIII
ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XII
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Diabetes Mellitus e Transplante de Ilhotas de Langerhans .....	1
1.2. Isolamento e Inflamação .....	5
1.3. Interação entre Células Apresentadoras de Antígeno e os Linfócitos T....	7
1.4. O Receptor de CD40.....	10
1.5. Transdução de Sinais Após a Ativação do CD40 .....	12
1.5.1. MAPK: via Raf/MEK/ERK1/2 .....	13
1.5.2. Fator de Transcrição NF-kB .....	15
1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
2. OBJETIVOS .....	29
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos .....	29
3. TRABALHO 1	
3.1. O antígeno CD40 é funcional e constitutivamente expresso em células beta pancreáticas.....	30

4.	TRABALHO 2	
4.1.	Sinalização do CD40 na linhagem de células $\beta$ NIT-1 e conseqüências após a ativação .....	56
4.2.	CD40 signaling in the mouse insulinoma $\beta$ cell line NIT-1 and consequences upon activation .....	83
5.	TRABALHO 3	
5.1.	A interação CD40-CD40 ligante em ilhotas pancreáticas ativa uma via pró-inflamatória que induz morte nas células $\beta$ .....	110
5.2.	CD40-CD40 ligand interaction in pancreatic islets activates a pro-inflammatory pathway that induces $\beta$ -cell death .....	136
6.	DISCUSSÃO DO CONJUNTO DOS TRABALHOS .....	162
7.	CONCLUSÕES .....	169
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	170
	ANEXO A: Trabalhos científicos publicados.....	173
	ANEXO B: Resumos publicados em congressos. ....	174

## RESUMO

O transplante de ilhotas humanas, utilizado como reposição das células produtoras de insulina em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1, está se tornando uma importante prática clínica. Entretanto, eventos inflamatórios não específicos presente nas ilhotas, são responsáveis pela vulnerabilidade das mesmas, e contribuem à diminuição do número celular durante o processo de isolamento e posterior transplante.

CD40 é um membro da família do receptor de necrose tumoral, descrito em uma variedade de células. Em condições fisiológicas, o CD40 presente nas células apresentadoras de antígenos participa como molécula co-estimulatória na ativação dos linfócitos T. Porém, o CD40 também foi descrito em condições patológicas, como psoríase, aterosclerose e fibrose cística, onde sua expressão está envolvida em eventos crônicos inflamatórios. É interessante ressaltar que, o CD40 também tem sido descrito em neurônios, células que apresentam uma variedade de moléculas similares às expressas nas células  $\beta$  pancreáticas.

Em vista desses achados, tentou-se determinar se a células  $\beta$  também poderiam expressar o receptor de CD40, e se presente, determinar possíveis conseqüências pró-inflamatórias após a sua ativação. Utilizaram-se diversas técnicas como RT-PCR, *western blot*, citometria de fluxo, imuno-histoquímica assim como imunofluorescência, para detectar a expressão de CD40 em ilhotas de camundongo, macaco e humano, e também na linhagem de células  $\beta$  NIT-1. Determinaram-se as vias de transdução de sinais de CD40 por *western blot* e ensaios com gene repórter. Foi determinada por tecnologia luminex, a secreção de citocinas e quimiocinas dependente de CD40 em ilhotas humanas, estimuladas

com a proteína recombinante CD40L e em alguns casos confirmada por RT-PCR e imunofluorescência.

Os resultados demonstram a expressão de CD40 nas células  $\beta$ , que pode ser aumentada pela ação de citocinas pró-inflamatórias, cuja ativação induz a secreção de mais citocinas e quimiocinas (IL-6, IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$ ) dependentes das vias de transdução de sinais Raf/MEK/ERK e NF- $\kappa$ B. A interação CD40-CD40L aumentou a expressão de ICAM-1 e a induziu morte celular nas células  $\beta$  pancreáticas.

Nesse sentido, a ativação de CD40 induz a secreção de mediadores solúveis pró-inflamatórios que podem comprometer a viabilidade das células  $\beta$ . O cenário pró-inflamatório sustentado pela ação de CD40 sugere que o mesmo poderia ter um papel ativo orquestrando um processo inflamatório.

## **ABSTRACT**

Human islet transplantation, used as biological replacement of insulin producing cells in patients with severe type 1 Diabetes mellitus, is becoming an important clinical practice. However, non specific inflammatory events, activated in the islet cells contribute for the vulnerability of islets and cell number diminution during an islet isolation and posterior transplant.

CD40 is a tumor necrose factor receptor family member, described in a variety of different cells. In physiological conditions, CD40 present in antigen professional cells participates as a co-stimulatory molecule in the activation of T lymphocytes. However, CD40 has also been described in pathological conditions, like psoriasis, atherosclerosis and cystic fibrosis, where its expression is involved in chronic inflammatory events. Interestingly, CD40 has also been described in neurons, cells that express many similar molecules with the pancreatic  $\beta$  cells.

In view of these findings, we wanted to address whether  $\beta$  cells could also express the CD40 receptor and if so, the possible pro-inflammatory consequences upon activation. We used different techniques as RT-PCR, western blot, flow cytometry, immunochemistry as well as immunofluorescence to detect CD40 expression in mouse, monkey and human islet cells, as well as the insulinoma cell line NIT-1. We also addressed CD40 signal transduction by western blot and gene reporter assays. CD40 dependent secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines in human islets stimulated with a recombinant CD40L molecule was evaluated by luminex technology and in some cases confirmed by RT-PCR and immunofluorescence.



Our results show CD40 expression in  $\beta$  cells that can be enhanced by the action of pro-inflammatory cytokines, whose activation induce more cytokine and chemokine secretion (IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ) dependent of the Raf/MEK/ERK and NF- $\kappa$ B pathways. CD40-CD40L interaction induced enhancement of ICAM-1 expression and cell death induction in pancreatic  $\beta$  cells.

In this regard, CD40 engagement induces CD40 dependent secretion of pro-inflammatory soluble mediators that can compromise  $\beta$  cell viability. The pro-inflammatory scenario supported by CD40 dependency suggests that CD40 could play an active role in orchestrating an inflammatory process.

## ABREVIATURAS

%	percentagem
µm	micra
µg	micrograma
µl	microlitro
7-AAD	7-Amino actinomicina D
APC	aloficocianina
APC	célula apresentadora de antígenos
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	albumina sérica bovina
CD40	receptor de CD40
CD40L	ligante de CD40
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPBS	solução tamponada com fosfato de Dulbecco
ERK1/2	quinase regulada extracelularmente
EtBr	brometo de etídeo
FBS	soro fetal bovino
DFB	soro fetal bovino dializado
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FITC-VAD-FMK	fluorometilcetona Valina-Alanina-Ácido Aspártico fluorometil cerone conjugado a isotiocianato de fluoresceína
GFP	proteína verde fluorescete
h	hora
ICAM	molécula de adesão intracelular
IDAC	deteção intracelular das caspases ativadas
IEQ	equivalente de ilhotas
IκB	inibidor de kappa B
IL	interleucina

IFN	interferon
mAb	anticorpo monoclonal
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	proteína quimioatraente de macrófago-1
MEKK	quinase quinase extracelular ativada por mitógeno
MEKKK	quinase quinase quinase extracelular ativada por mitógeno
MEK	quinase extracelular ativada por mitógeno
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
MIP-1 $\beta$	proteína inflamatória de macrófago-1 $\beta$
min	minutos
ml	mililitros
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NF-kB	fator nuclear kappa B
NG	<i>Newport green</i>
NOD	diabéticos não-obesos
°C	graus centígrados
pb	pares de bases
PBS	solução tamponada com fosfato
NO	óxido nítrico
PCR	reação em cadeia da polimerase
PI	iodeto de propídeo
RIP	promotor de rato inducível
RT	transcrição reversa
s	segundos
SAPK	proteína quinase ativada por stress
T <sub>m</sub>	temperatura de fusão
TNF	fator de necrose tumoral
TNFR	receptor do fator de necrose tumoral
TF	fator tecidual
zVAD-(OMe)-FMK	inibidor de pan-caspases enzyloxycarbonyl Valina-Alanina-Ácido Aspártico metil-fluorometil cetona

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transplante de ilhotas.....	3
Figura 2. Papel dos sinais 1 e 2 na ativação as células T.....	8
Figura 3. Moléculas de superfície envolvidas na ativação dos linfócitos T. ....	10
Figura 4. Sinalização na cascata MAPK.....	15
Figura 5. Via de sinalização na cascata do NF-kB. ....	17

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Diabetes Mellitus e Transplante de Ilhotas de Langerhans

O Diabetes mellitus (DM) compreende um grupo de doenças secundárias e mecanismos patogênicos distintos, para os quais a hiperglicemia é o denominador comum. Esta ocorre por deficiência de insulina, que pode ser total, parcial ou relativa, quando analisada no contexto da resistência à insulina co-existente. A falta do efeito da insulina exerce um papel determinante nas anormalidades metabólicas ligadas ao diabetes, sendo a hiperglicemia sustentada o principal fator ligado às complicações crônicas associadas à doença.

O DM é reconhecido como uma ameaça à saúde pública mundial, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade prematura. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (WHO), existiam aproximadamente no ano 2000, 171 milhões de pessoas com DM no mundo, e esse número poderá superar os 366 milhões no ano 2030, aumentando sua prevalência majoritariamente nos países em desenvolvimento (1).

No Brasil, esses dados são igualmente alarmantes. No ano 2000 existiam aproximadamente 4,5 milhões de casos e as estimativas prevêm que para o ano 2030 esse número poderá superar os 11 milhões de doentes (2). O aumento na prevalência do DM acarreta também um impacto socioeconômico negativo no custo direto envolvido com a doença em hospitalização, cuidados médicos, tratamentos, assim como também custos indiretos associados à incapacidade de trabalhar e morte prematura.

Tanto os pacientes com DM dependente de insulina ou tipo 1 (DM1) como os não dependentes de insulina ou tipo 2 (DM2), são vulneráveis às complicações características

específicas da doença que incluem retinopatias, nefropatias, neuropatias e vasculopatias (3). Embora a prevenção das complicações associadas à DM1 seja difícil, os estudos clínicos realizados pelo *Diabetes Control and Complications Trial* e o *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* demonstraram que o controle rigoroso dos níveis de glicose no sangue, junto com, tratamento intensivo de insulina, suporte nutricional e psicológico adequado e exercícios, ajudam a estacionar ou adiar a progressão das doenças secundárias decorrentes da hiperglicemia (4, 5).

No entanto, embora novos produtos a base de insulina e sistemas de administração e dosagem estão sendo constantemente aprimorados, persistem ainda problemas associados aos regimes baseados em insulina exógena. O estrito controle da normoglicemia é laborioso, difícil de executar e em várias ocasiões limitado de forma paralela pelos crescentes episódios de hipoglicemia grave, o que coloca em risco a vida dos pacientes. Uma alternativa mais eficiente com respeito ao uso contínuo de insulina exógena para o DM1 complicado é a reposição das ilhotas pancreáticas (ilhotas de Langerhans) por meio do transplante vascularizado do pâncreas. Este melhora a qualidade de vida do paciente e estaciona ou estabiliza, reverte ou melhora as complicações secundárias decorrentes do diabetes (6-11).

Entretanto, alguns centros transplantadores têm iniciado uma nova era de transplante clínico em humanos, ainda considerada experimental pela *Food and Drug Administration*. Essa terceira opção terapêutica para pacientes com DM1 propõe agora o isolamento e posterior alotransplante das ilhotas de Langherans no receptor. Este tem a vantagem de ser um procedimento mais simples, rápido e seguro, onde as ilhotas são infundidas via percutânea pela veia porta ao fígado (Figura 1). Este procedimento (não

livre de complicações) permite se necessário, a manipulação das ilhotas antes de ser realizado o transplante, além de requerer uma dose menor de drogas imunossupressoras.

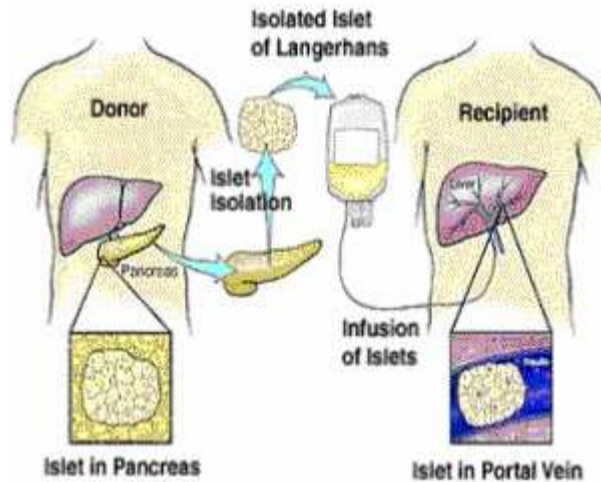


Figura 1. Transplante de ilhotas. O pâncreas do doador (usualmente cadavérico) é removido, no laboratório de isolamento celular, as ilhotas são purificadas, e infundidas através de um cateter na veia porta ao fígado.

O conceito de transplantar porções ou extratos pancreáticos a pacientes com DM com o objetivo de substituir a função endócrina tem mais de 100 anos, e foi introduzido e realizado primeiramente em 1893 por P. W. Williams, após a descoberta feita por Minkowski em 1892 em cachorro, de que a remoção de pâncreas causava DM. Na experiência de Williams (12), porções de pâncreas de ovelha foram transplantadas sob a pele de um menino de 15 anos. Porém, a falta de imunossupressão levou à morte do paciente três dias após o transplante, quando foi rejeitado o xenotransplante.

Quase um século mais tarde, e após a introdução da enzima colagenase para o isolamento das ilhotas pancreáticas, Ballinger e Lacy reportaram em 1972, a reversão do diabetes em ratos, pela infusão de ilhotas purificadas de ratos normais (13). Esse resultado mostrou o potencial do transplante de ilhotas para restabelecer o controle metabólico e

impulsionou a sua reprodução. Em 1974 foi realizado o primeiro transplante de ilhotas pancreáticas em humanos na Universidade de Minnesota (14), ao qual se continuaram trabalhos novos reportando sucesso em casos isolados, porém, com taxas de sucesso total muito inferiores à do transplante vascularizado de pâncreas (10% -vs- 78%) (15, 16).

O aprimoramento da técnica empregada no isolamento das ilhotas pancreáticas, descrita inicialmente por Paul Lacy em 1967 (17) e modificada e automatizada em 1988 por Camillo Ricordi (18), assim como também dos regimes de imunossupressão, estimularam novos avanços na área do transplante celular e fomentaram a busca por novos protocolos.

Assim, o grande impacto provocado na área do transplante de ilhotas pancreáticas ocorreu após a publicação dos resultados obtidos na Universidade de Alberta, no Canadá. Nesse centro, sete pacientes receberam de duas a quatro infusões de ilhotas de doador alogênico utilizando um protocolo de drogas imunossupressoras livre de corticosteróides. A taxa de sucesso obtido foi de 100% e os pacientes permaneceram independentes de insulina por mais de um ano (19). Hoje em dia, o protocolo de Edmonton já foi utilizado em mais de 750 transplantes de ilhotas realizados por novos centros transplantadores ao redor do mundo, em pacientes com DM1 de alto risco, com uma taxa de sucesso superior a 90% após o primeiro ano de vida nos pacientes de Edmonton liderado pelo Dr. Shapiro (20).

Porém, embora os resultados sejam encorajadores, os esforços continuam, já que ainda persistem diferenças importantes entre os diversos centros transplantadores. No ano passado o *Collaborative Islet Transplant Registry* publicou os resultados da experiência clínica conjunta de 12 centros médicos nos Estados Unidos e no Canadá, no qual foram



incluídos 86 pacientes entre 1999-2003 utilizando o protocolo de Edmonton. Nesse estudo, os pacientes, com DM1 em média por 30 anos, receberam 158 infusões de ilhotas pancreáticas isoladas de 173 doadores. Vinte e oito pacientes receberam uma única infusão, 44 receberam duas, e 14 receberam três. Após 6 meses da primeira infusão, 61% dos pacientes eram insulino-independentes, e 58% após 1 ano (21).

Recentemente, o grupo de Edmonton apresentou os resultados obtidos de 65 pacientes pertencentes ao seu centro, com taxas de seguimento de 5 anos com insulino-independência de apenas 11 % (22). Um dado interessante, também apresentado por estes autores é a presença de níveis séricos adequados de peptídeo C em 82% dos receptores de ilhotas pancreáticas, em longo prazo. Este fato indica que há produção residual de insulina, apesar de insuficiente para manter normoglicemia, o que sinaliza para um controle mais fácil de glicemia com insulina como terapia exógena (em doses mais baixas) e menor risco de hipoglicemias severas e assintomáticas.

As perspectivas geradas com a nova terapia experimental são entusiasmantes, porém salientam a necessidade de aprimorar ainda mais os protocolos, para que o transplante de ilhotas possa se tornar um tratamento viável para todos os pacientes com DM1 em longo prazo.

## **1.2. Isolamento e Inflamação**

A experiência recolhida até hoje tem demonstrado que para atingir insulino-independência, é necessário transplantar um número suficiente de ilhotas, geralmente superior a 10.000 IEQ/kg do receptor (23). Apesar dos significativos avanços nos métodos empregados no isolamento e purificação das ilhotas, o rendimento total é sempre relativamente baixo, não superando o 50% do total das ilhotas (24). Vários fatores prévios

ao processo de isolamento e purificação contribuem para este fenômeno, incluindo as características do doador, captação, remoção e preservação do pâncreas (25-29). Por tal motivo, este número elevado de ilhotas é dificilmente obtível durante um único isolamento, sendo mais frequentemente atingido pela infusão seqüencial de ilhotas de preparações obtidas de diferentes doadores (19, 30-32).

Entretanto, o transplante de ilhotas humanas em pacientes com DM1, utilizado como reposição biológica das células  $\beta$  produtoras de insulina está se tornando uma prática cada vez mais atraente e possível de ser realizada (19, 23, 33). Porém, o procedimento per se, o qual consiste em uma digestão enzimática auxiliada por um procedimento mecânico, pode potencialmente danificar as ilhotas (27), e expô-las a fatores de stress associados a condições ambientais não fisiológicas (34), as quais podem induzir um estado geral pró-inflamatório nas ilhotas. Mais ainda, após o transplante, as ilhotas podem sofrer por hipóxia e eventos inflamatórios não específicos, majoritariamente mediados por células do sistema imune do receptor, os quais podem também, comprometer a função biológica e a viabilidade das células  $\beta$ .

As ilhotas pancreáticas são um aglomerado de células de natureza extremamente vulnerável. Durante o transplante, as ilhotas infundidas pela veia porta entram em contato direto com o sangue, e expressam certas proteínas cuja ativação gera conseqüências negativas para as mesmas (35-38). Embora a cascata de eventos que contribui à disfunção das células  $\beta$  não seja totalmente conhecida, sabe-se que, as ilhotas podem expressar a glicoproteína de membrana TF (fator tecidual) (36), cuja ativação induz uma reação denominada de *Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction*. Este processo ativa a cascata de coagulação, o sistema do complemento, as plaquetas e a mobilização e

infiltração de leucócitos nas ilhotas (39, 40). Como consequência, existe uma perda considerável da morfologia, massa e função das ilhotas transplantada, parcialmente atribuída também, à secreção de citocinas pro-inflamatórias como interleucina-1 (IL-1), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (41-43), além do óxido nítrico (NO) (44). Outra grande variedade de moléculas pró-inflamatórias induzidas são os receptores para citocinas (45), receptor semelhante a Toll e lipopolissacarídeo (LPS, também chamados de CD14) (46), proteína quimioatraente de macrófagos-1 (MCP-1) (47), e proteína induzível por interferon (IP-10) (48). Esses fatores podem induzir quimioatração, ativação, proliferação, e diferenciação de células do sistema imune ao sítio do implante, e assim comprometer a viabilidade do enxerto das ilhotas pancreáticas.

### **1.3. Interação entre Células Apresentadoras de Antígeno e os Linfócitos T**

O potencial processo de ativação do sistema imune inicia com a interação das células apresentadoras de antígeno (APC) com os linfócitos T. Como representado na figura 2, as moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) apresentando um peptídeo previamente processado, são reconhecidas pelo receptor dos linfócitos T (TCR).

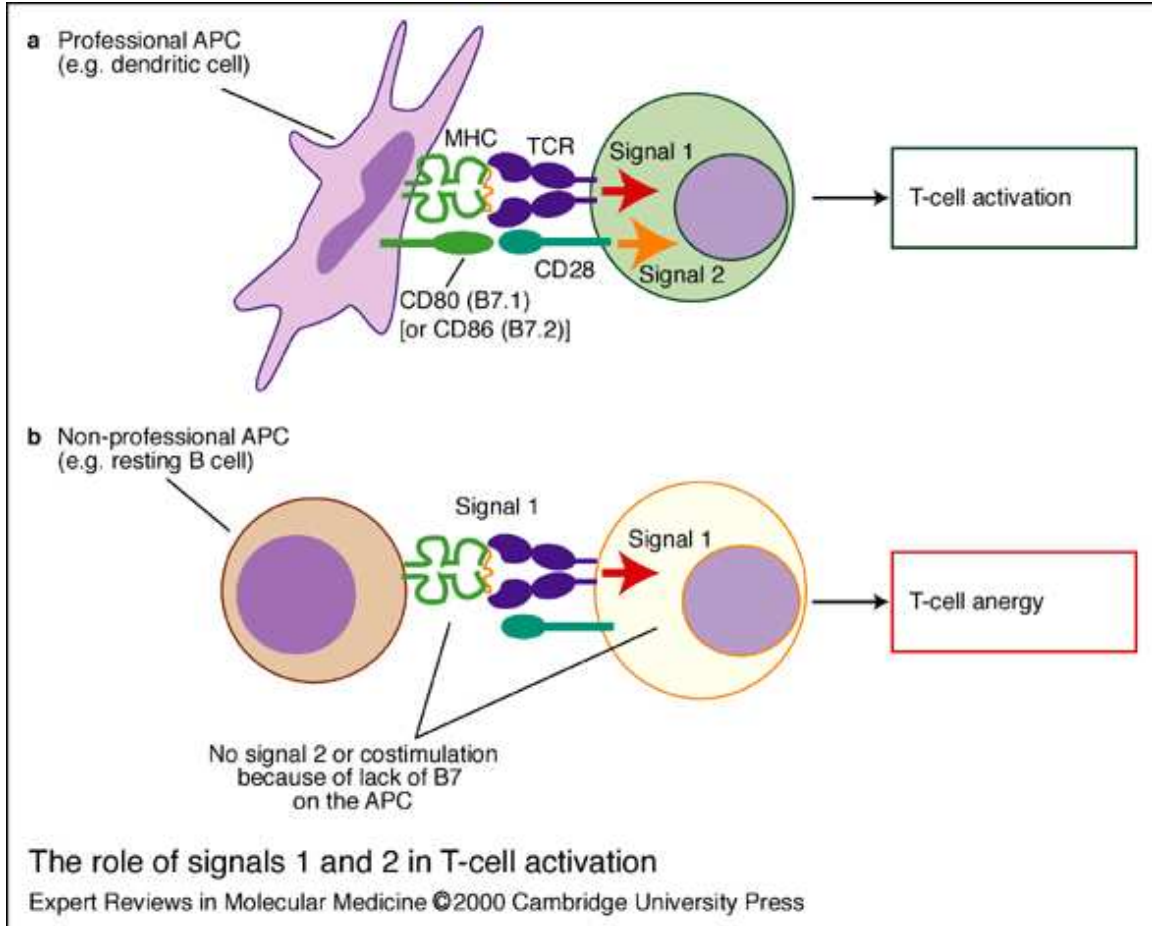


Figura 2. Papel dos sinais 1 e 2 na ativação as células T. As células apresentadoras de antígenos profissionais (APC) provem os sinais 1 e 2, e ativam os linfócitos T eficientemente. Em contraposição, APC não profissionais, que também podem prover o sinal 1, induzem anergia na ausência do sinal 2 (49).

Uma segunda interação denominada de segundo sinal ou co-estimulador, entre moléculas acessórias presentes em ambos os tipos celulares, é necessária para induzir uma resposta imune ativa. No sinal co-estimulatório, a expressão do CD28 nos linfócitos T vírgens induz a expressão do seu ligante B7.1 ou B7.2 (CD80 ou CD86) nas APC. Essa interação induz a expressão do CD40L nos linfócitos T que vai interagir com o CD40 presente na APC (Figura 3) (50).

O processo de ativação dos linfócitos T torna-se então, um processo de interação seqüencial. A ausência de algum destes sinais, leva aos linfócitos T ao estado de não responsividade ou anergia (49, 51, 52). Vários trabalhos têm relatado diversos métodos de imunomanipulação com o objetivo de indução de não-responsividade pela administração de anticorpos para bloqueio da via co-estimulatória, anti-CD28, anti-B7, anti-CD40, anti-CD40L (52, 53), CTLA4-Ig ou através de terapia gênica (54).

Além das clássicas moléculas co-estimulatórias, o bloqueio das via CD28-CD80/86 junto com CD134-CD134L (também chamado de OX40L), cuja ativação induz a sobrevivência de células T de memória, foi capaz de prolongar a sobrevivência de alotransplante cardíaco em ratos (55). Porém, até o momento não foram reportados trabalhos nos quais foi utilizado um modelo clinicamente relevante para o transplante de ilhotas pancreáticas como são os camundongos obesos não diabéticos (NOD).

A importância da interação entre o receptor do CD40 e seu ligante CD40L foi demonstrada na área dos transplantes por diversos pesquisadores (56, 57), destacando-se o trabalho de Kirk e cols. (58), empregando estratégias que bloqueiam a via CD40-CD40L em modelos pré-clínicos em primatas não humanos. A utilização de anticorpos monoclonais anti-CD40 resultou na ausência de rejeição após transplante de rim (59) ou pele (60) na ausência de drogas imunossupressoras. Sobrevida aumentada do transplante de ilhotas de Langerhans de doador geneticamente diferente entre macacos rhesus (59), babuínos (61) e roedores (62) também foi observada.

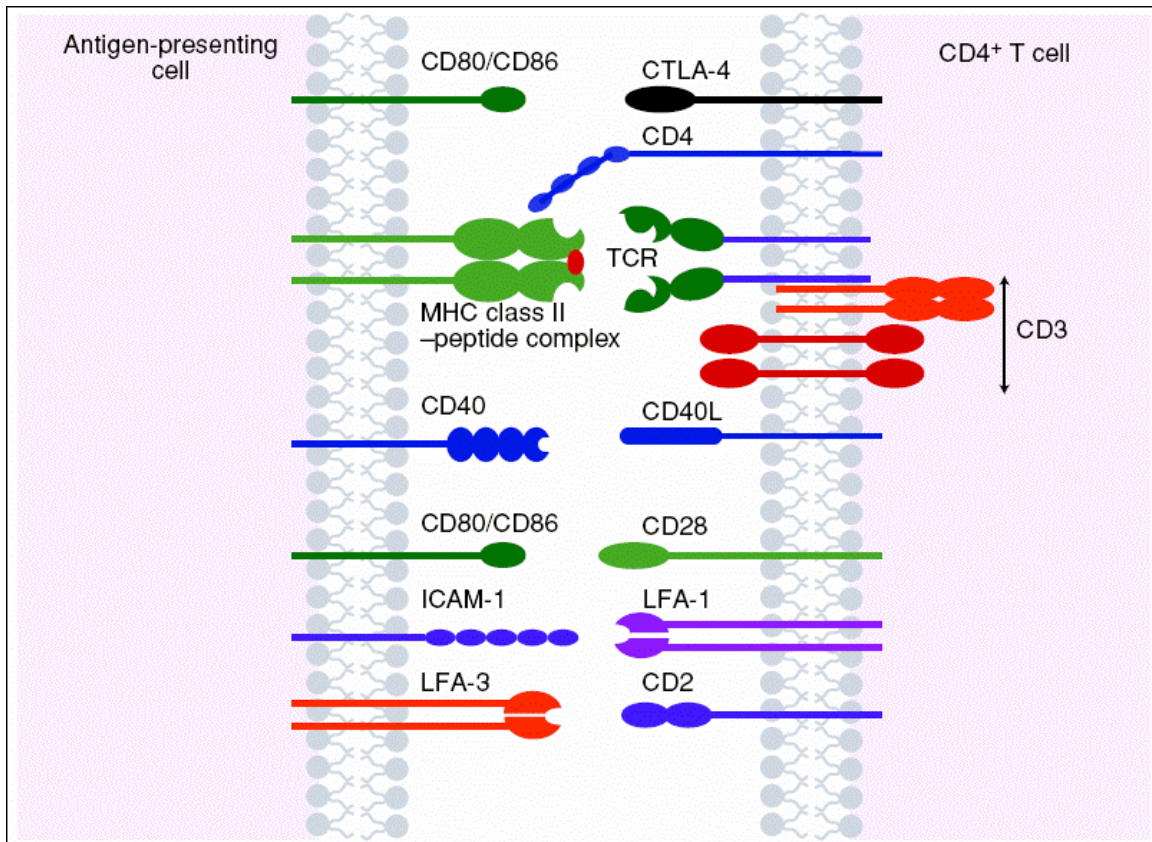


Figura 3. Moléculas de superfície envolvidas na ativação dos linfócitos T. A interação entre o receptor das células T (TCR) e o peptídeo-complexo de histocompatibilidade principal (MHC) é fundamental para a ativação das células T. Porém, interações adicionais entre as células T e as células apresentadoras de antígenos (APC) são essenciais para a efetiva função das células T. As interações mais importantes são: (1) CD80 (ou CD86) e CD28, (2) CD40L (CD154) e CD40 e (3) ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) e LFA-1 (antígeno-1 de função associada a linfócitos 1) (63).

#### 1.4. O Receptor de CD40

As evidências acima apresentadas sugerem que a via co-estimulatória CD40-CD40L tem um papel fundamental no processo de ativação imunológica.

O receptor de CD40 humano é uma glicoproteína fosforilada integral de membrana de 45 a 50 kDa e 277 aminoácidos (aa) com 22 resíduos de cisteína na sua porção extracelular, conservados em humanos, bovinos e murinos. O gene do CD40 esta

localizado no cromossomo 20q11-2-q13-2. As proteínas do CD40 humano e murino apresentam uma homologia de 62% e são membros da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) (64).

Em situações fisiológicas, a interação de CD40 com o seu ligante, CD40L também chamado de CD154, tem um papel fundamental no sistema imune, induzindo sobrevivência, proliferação, diferenciação celular, além de induzirem troca isotópica nos linfócitos B (52). Seu papel co-estimulatório na interação entre linfócitos T e B e a sua importância fisiológica foi demonstrada nos pacientes com mutações no gene do CD40L, que apresentam a síndrome de imunodeficiência de IgM (HIGM1). Nesta, os pacientes não são capazes de montar repostas celulares T, dependentes de linfócitos B (65). Deficiências similares foram encontradas em camundongos nocaute para o receptor do CD40 (66).

Achava-se, inicialmente, que a expressão do CD40 era restrita às células de origem hematopoiética especializadas como linfócitos B, macrófagos, e APC profissionais. Atualmente, porém, sabe-se que o CD40 também é expresso em células de origem não hematopoiética, como células endoteliais, tímicas epiteliais, células presentes em neoplasias e linhagens celulares transformadas, além de células do ducto pancreático (67-73), onde sua expressão está majoritariamente associada à amplificação e regulação de respostas inflamatórias. Esses eventos não específicos sugerem que o CD40 poderia estar contribuindo à indução, síntese e secreção de citocinas e quimiocinas, assim como também de moléculas co-estimulatórias, resultando no recrutamento e ativação das células hematopoiéticas.

Nesse sentido, vários trabalhos sugerem que a interação CD40-CD40L não só contribui com as respostas fisiológicas celulares previamente enumeradas, mas também em

condições patológicas, levando ao aparecimento de eventos inflamatórios crônicos. Já foi demonstrado que a estimulação do receptor de CD40 tem um papel crítico em doenças de origem auto-imune inflamatória como psoríase, aterosclerose e fibrose cística (74-79), o qual também é reconhecido na área dos transplantes (56, 57), e confirmado utilizando animais transgênicos e nocautes (64).

É interessante salientar que até o presente momento, não há trabalhos que descrevam a presença de CD40 nas ilhotas pancreáticas. Entretanto, já foram relatados estudos demonstrando a expressão aumentada da molécula ligante do CD40, o CD40L, em soro, como também na superfície celular de plaquetas ativadas (80) em pacientes com DM1 (81-83).

### **1.5. Transdução de Sinais Após a Ativação do CD40**

Trabalhos recentes utilizando células não hematopoiéticas tem demonstrado uma quantidade significativa de genes induzidos pela ativação de CD40, geralmente associados com sinais co-estimulatórios (84), secreção de citocinas (73, 85, 86), indução de apoptose (87, 88) ou sobrevivência celular (68, 89). Essa plasticidade de sinais decorrentes de sua ativação sugere que CD40 tem a capacidade de transduzir sinais a diferentes vias intracelulares.

Porém, a cauda citoplasmática da molécula de CD40 não apresenta domínio quinase e portanto não possui atividade catalítica. A conversão do sinal extracelular em sinal intracelular, ou transdução de sinais após a ativação do CD40, é realizada através de moléculas adaptadoras chamadas fatores associados ao receptor TNF (TRAF) 2, 3, 5 e 6 que, são recrutadas e acopladas ao domínio citoplasmático do CD40 após união do ligante e multimerização do receptor (90). Assim, são capazes de transmitir sinais às vias



inferiores (91-95). A partir desse ponto, essas vias agem de forma conjunta com as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (96-98) e o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), ativando fatores de transcrição a nível nuclear nas diferentes vias de sinalização (94).

### **1.5.1. MAPK: via Raf/MEK/ERK1/2**

As MAP quinases controlam vários eventos celulares complexos como embriogênese, proliferação, diferenciação e morte celular, assim como alterações transitórias necessárias para a homeostase celular (99-101). Em mamíferos, têm sido encontradas vários cDNAs que codificam para mais de 20 MAPKs.

Características peculiares dessa família de enzimas são: o motivo de aa (Thr-Xxx-Tyr) necessário para ser considerada uma MAPK, a necessidade de cada quinase ser ativada por uma cascata de proteínas quinases que contenha ao menos duas quinases previas às MAPKs, e a necessidade de fosforilação dos resíduos de tirosina e treonina, ambos catalisados pelas quinases reguladas extracelularmente por mitógeno (MEKs) para ser tornarem ativas ou com maior atividade (102). A fosforilação é um processo reversível, catalisado no sentido contrario por fosfatases capazes de reverter o processo de ativação e levar a célula novamente ao estado basal de repouso, ou de baixa atividade (102).

ERK1 (quinase-1 regulada extracelularmente) e ERK2, também denominadas de p44 e p42, contêm 88% de homologia na seqüência de aa. Essas MAPKs são expressas em uma grande variedade de tecidos, incluídas células terminalmente diferenciadas como as células  $\beta$  pancreáticas (103, 104), e linhagens de células  $\beta$  (104, 105), sendo ativadas pelos estímulos que regulam a função primária do tecido específico, como é a concentração de glicose nessas células. A sinalização intracelular gerada como resultado da ativação de CD40 é capaz de translocar fatores de transcrição específicos, como o fator de transcrição

Elk-1, que possui um sítio de união para ERK1/2, e é alvo de fosforilação nos seus resíduos de serina e treonina.

MEK1 e MEK2 são membros da família das quinases que fosforilam especificamente ERK1/2. As interações entre MEK1/2 e ERK1/2 são complexas e envolvem varias regiões de contato que determinam a especificidade e a eficiência da interação. Essas interações não enzimáticas parecem ser essenciais para a transmissão de sinais a través desta “cascata molecular” (102).

As quinases que fosforilam as MEKs denominam-se MEKK. In vivo, as isoformas dessas enzimas, as Rafs, parecem ser as únicas que fosforilam MEK1/2. A regulação da ativação das Rafs é mais complexa que a das MEKs ou MAPKs, e requer não só a sua fosforilação (que ocorre em vários resíduos), assim como também da união ao GTP. A estável interação entre Raf com MEK1/2 parece ser essencial na interação como ERK1/2. Um esquema detalhado da via de ativação das proteínas envolvidas na via de sinalização das MAPK é representado a seguir na Figura 4.

A importância da sinalização do CD40 através da inibição da via de ativação Raf/MEK/ERK em respostas inflamatórias em monócitos e macrófagos, já está bem documentada (86, 91, 106). Assim, a utilização do potente inibidor específico PD98059, que evita a ativação de MEK1 por c-Raf (107), possibilita que a sinalização desta via seja estudada e, desta forma, que conseqüências dependentes da ativação do CD40, como a indução e ou secreção de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias sejam determinadas.

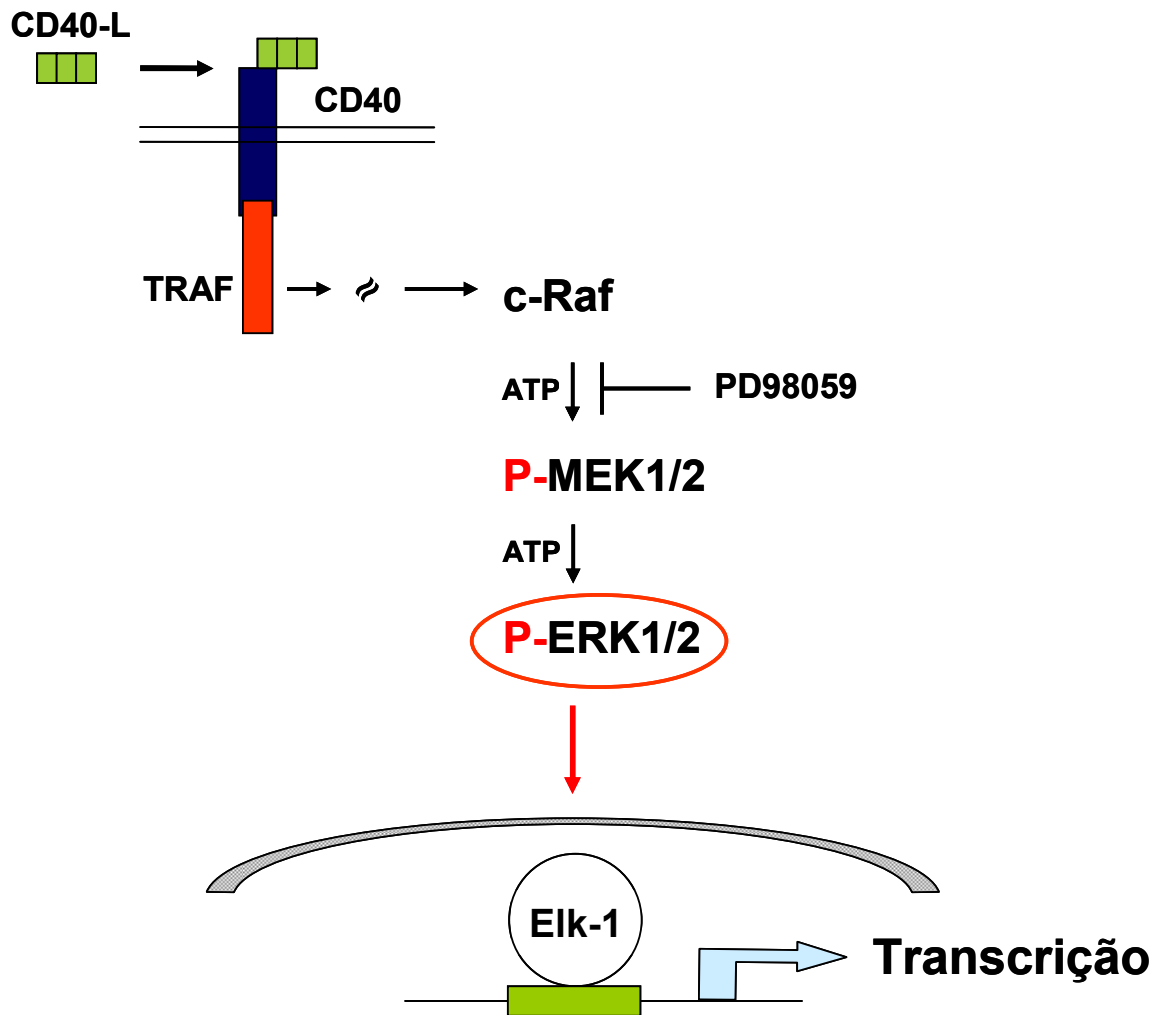


Figura 4. Sinalização na cascata MAPK. Diferentes ligantes a nível extracelular, são capazes de desencadear a via das MAPK. Neste caso, a interação CD40-CD40L, ativa a quinase c-Raf (MAPKKK) que por sua vez fosforila a quinase MEK1/2 (MAPKK), que fosforilam as ERK1/2 (MAPK). Uma vez fosforiladas, ERK2 é capaz de se translocar até o núcleo e induzir a ativação de certos fatores de transcrição, como Elk1, cuja ação determinará conseqüências a nível celular.

### 1.5.2. Fator de transcrição NF-κB

O fator de transcrição NF-κB consiste em uma família de fatores, conservados desde a *Drosophila* até seres humanos (108), que regulam uma variedade de aspectos fisiológicos celulares como a resposta imune, a inflamação, o crescimento celular e a apoptose (109-112). As subunidades de NF-κB contêm uma seqüência homóloga central

denominada, domínio Rel, envolvido na união ao DNA (sítios  $\kappa$ B de 10 pares de bases), interação com as proteínas inibidoras I $\kappa$ B e a dimerização (113). Embora diferentes formas diméricas de NF- $\kappa$ B tenham sido descobertas em mamíferos, p50/p105, p65/RelA, c-Rel, RelB, e p52/p105, o dímero majoritariamente encontrado nos diferentes tipos celulares é o p65/RelA e as subunidades de p50.

O NF- $\kappa$ B pode ser ativado em minutos por uma variedade de estímulos que variam desde citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1, LPS, fatores de crescimento, de indução de stress, até a ativação do receptor do CD40 (94). O NF- $\kappa$ B está presente de forma constitutiva no citoplasma associado a proteínas inibidoras, I $\kappa$ B, que cobrem o sítio de união do NF ao DNA. Quando existe um estímulo, o I $\kappa$ B é fosforilado nos resíduos de serina 32 e 36, por um complexo denominado quinase do inibidor de  $\kappa$ B, IKK. Dessa forma, o inibidor fosforilado é alvo de degradação a nível proteossômico e o NF- $\kappa$ B pode, então, se translocar até o núcleo, promovendo a atividade transcricional (Figura 5).

Em células primárias, terminalmente diferenciadas, como as células  $\beta$  pancreáticas, a ativação do NF- $\kappa$ B pela ação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1  $\beta$  e IFN- $\gamma$ , é capaz de induzir a expressão de outras citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão celular (114). Estudos recentes sugerem que a ativação do NF- $\kappa$ B em células  $\beta$ , parece estar associada majoritariamente a um papel pró-apoptótico (115, 116).

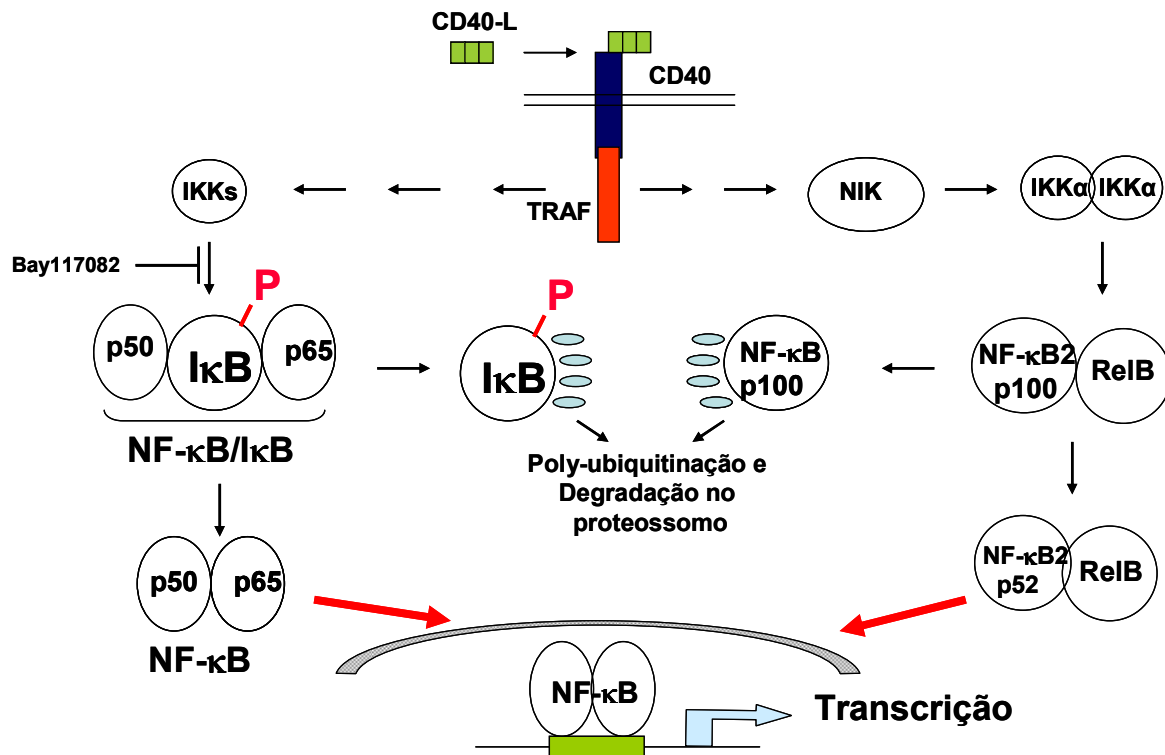


Figura 5. Via de sinalização na cascata do NF-κB. A ativação de CD40, pelo seu ligante a nível extracelular, o CD40L, é capaz de induzir na via clássica ou canônica, a fosforilação de IκB, ubiquitinação e degradação no proteossomo. Na via não canônica, NIK ativa as IKK que por sua vez ativam o heterodímero p100/RelB, marcando p100 para clivagem, ubiquitinação e degradação no proteossomo. O NF-κB liberado no citosol (p50/p65 ou p52/RelB) é capaz de transitar livremente até o núcleo e induzir genes cuja expressão seja ativada por NF-κB ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)).

Entretanto, as cascatas de ativação induzidas em resposta à ativação de CD40 em células β pancreáticas não foram caracterizadas, já que até o presente momento a molécula de CD40 ainda não foi descrita nestas células. A maioria dos modelos de transdução de sinais têm sido gerados a partir de experimentos realizados em monócitos e/ou macrófagos (106), linfócitos B (117, 118), células transfectadas (96, 119), além de modelos de superexpressão de certas proteínas (120) ou interações protéicas realizadas in vitro (121). As generalizações dentre as vias de sinalização utilizando diferentes células são difíceis de

serem realizadas, já que as atividades biológicas diferenciais podem ser atribuídas à natureza diferente das células, heterogeneidade nas cascatas de ativação após a ligação, ou diferente grau de multimerização após a ligação.

## 1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053.
2. 2005. Prevalence of diabetes worldwide. [www.who.int/diabetes/facts/world\\_figures/en/](http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/).
3. Nathan, D.M. 1993. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328:1676-1685.
4. 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 329:977-986.
5. 2003. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *Jama* 290:2159-2167.
6. Allen, R.D., Al-Harbi, I.S., Morris, J.G., Clouston, P.D., O'Connell, P.J., Chapman, J.R., and Nankivell, B.J. 1997. Diabetic neuropathy after pancreas transplantation: determinants of recovery. *Transplantation* 63:830-838.
7. Fioretto, P., Steffes, M.W., Sutherland, D.E., Goetz, F.C., and Mauer, M. 1998. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med* 339:69-75.
8. La Rocca, E., Fiorina, P., di Carlo, V., Astorri, E., Rossetti, C., Lucignani, G., Fazio, F., Giudici, D., Cristallo, M., Bianchi, G., et al. 2001. Cardiovascular outcomes after kidney-pancreas and kidney-alone transplantation. *Kidney Int* 60:1964-1971.
9. Pai, R.P., Mitchell, P., Chow, V.C., Chapman, J.R., O'Connell, P.J., Allen, R.D., and Nankivell, B.J. 2000. Posttransplant cataract: lessons from kidney-pancreas transplantation. *Transplantation* 69:1108-1114.
10. Pearce, I.A., Ilango, B., Sells, R.A., and Wong, D. 2000. Stabilisation of diabetic retinopathy following simultaneous pancreas and kidney transplant. *Br J Ophthalmol* 84:736-740.
11. Tyden, G., Bolinder, J., Solders, G., Brattstrom, C., Tibell, A., and Groth, C.G. 1999. Improved survival in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and end-stage diabetic nephropathy 10 years after combined pancreas and kidney transplantation. *Transplantation* 67:645-648.
12. Williams, P.W. 1894. Notes on diabetes treated with extract and by grafts of sheep's pancreas. *British Medical Journal* 2:1303-1304.
13. Ballinger, W.F., and Lacy, P.E. 1972. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 72:175-186.
14. Najarian, J.S., Sutherland, D.E., Matas, A.J., Steffes, M.W., Simmons, R.L., and Goetz, F.C. 1977. Human islet transplantation: a preliminary report. *Transplant Proc* 9:233-236.
15. Largiader, F., Kolb, E., and Binswanger, U. 1980. A long-term functioning human pancreatic islet allotransplant. *Transplantation* 29:76-77.
16. Tzakis, A.G., Ricordi, C., Alejandro, R., Zeng, Y., Fung, J.J., Todo, S., Demetris, A.J., Mintz, D.H., and Starzl, T.E. 1990. Pancreatic islet transplantation after upper abdominal exenteration and liver replacement. *Lancet* 336:402-405.
17. Lacy, P.E., and Kostianovsky, M. 1967. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16:35-39.
18. Ricordi, C., Lacy, P.E., Finke, E.H., Olack, B.J., and Scharp, D.W. 1988. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37:413-420.

19. Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., and Rajotte, R.V. 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343:230-238.
20. Ault, A. 2003. Edmonton's islet success tough to duplicate elsewhere. *Lancet* 361:2054.
21. [www.cureautoimmunity.org](http://www.cureautoimmunity.org).
22. Ryan, E.A., Paty, B.W., Senior, P.A., Bigam, D., Alfadhli, E., Kneteman, N.M., Lakey, J.R., and Shapiro, A.M. 2005. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54:2060-2069.
23. Shapiro, A.M., Ricordi, C., and Hering, B. 2003. Edmonton's islet success has indeed been replicated elsewhere. *Lancet* 362:1242.
24. Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. 1990. Islets of Langerhans: the puzzle of intransit interactions and their relevance to diabetes. *J Clin Invest* 85:983-987.
25. Benhamou, P.Y., Watt, P.C., Mullen, Y., Ingles, S., Watanabe, Y., Nomura, Y., Hober, C., Miyamoto, M., Kenmochi, T., Passaro, E.P., et al. 1994. Human islet isolation in 104 consecutive cases. Factors affecting isolation success. *Transplantation* 57:1804-1810.
26. Brandhorst, H., Brandhorst, D., Hering, B.J., Federlin, K., and Bretzel, R.G. 1995. Body mass index of pancreatic donors: a decisive factor for human islet isolation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103 Suppl 2:23-26.
27. Lakey, J.R., Burridge, P.W., and Shapiro, A.M. 2003. Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transpl Int* 16:613-632.
28. Lakey, J.R., Warnock, G.L., Rajotte, R.V., Suarez-Alamazor, M.E., Ao, Z., Shapiro, A.M., and Kneteman, N.M. 1996. Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation* 61:1047-1053.
29. Zeng, Y., Torre, M.A., Karrison, T., and Thistlethwaite, J.R. 1994. The correlation between donor characteristics and the success of human islet isolation. *Transplantation* 57:954-958.
30. Hering, B.J., Kandaswamy, R., Ansite, J.D., Eckman, P.M., Nakano, M., Sawada, T., Matsumoto, I., Ihm, S.H., Zhang, H.J., Parkey, J., et al. 2005. Single-donor, marginal-dose islet transplantation in patients with type 1 diabetes. *Jama* 293:830-835.
31. Markmann, J.F., Deng, S., Huang, X., Desai, N.M., Velidedeoglu, E.H., Lui, C., Frank, A., Markmann, E., Palanjian, M., Brayman, K., et al. 2003. Insulin independence following isolated islet transplantation and single islet infusions. *Ann Surg* 237:741-749; discussion 749-750.
32. Shapiro, A.M., and Ricordi, C. 2004. Unraveling the secrets of single donor success in islet transplantation. *Am J Transplant* 4:295-298.
33. Ricordi, C., and Strom, T.B. 2004. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. *Nat Rev Immunol* 4:259-268.
34. Bottino, R., Balamurugan, A.N., Tse, H., Thirunavukkarasu, C., Ge, X., Profozich, J., Milton, M., Ziegenfuss, A., Trucco, M., and Piganelli, J.D. 2004. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes* 53:2559-2568.
35. Johansson, U., Olsson, A., Gabrielsson, S., Nilsson, B., and Korsgren, O. 2003. Inflammatory mediators expressed in human islets of Langerhans: implications for islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 308:474-479.
36. Moberg, L., Johansson, H., Lukinius, A., Berne, C., Foss, A., Kallen, R., Ostraat, O., Salmela, K., Tibell, A., Tufveson, G., et al. 2002. Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. *Lancet* 360:2039-2045.
37. Nagata, M., Mullen, Y., Herrera, M., and Matsuo, S. 1990. Non-specific vs. autoimmune destruction of islet grafts in mice. *Horm Metab Res Suppl* 25:153-156.



38. Nagata, M., Mullen, Y., Matsuo, S., Herrera, M., and Clare-Salzler, M. 1990. Destruction of islet isografts by severe nonspecific inflammation. *Transplant Proc* 22:855-856.
39. Badet, L., Titus, T., Metzen, E., Handa, A., McShane, P., Chang, L.W., Giangrande, P., and Gray, D.W. 2002. The interaction between primate blood and mouse islets induces accelerated clotting with islet destruction. *Xenotransplantation* 9:91-96.
40. Bennet, W., Sundberg, B., Groth, C.G., Brendel, M.D., Brandhorst, D., Brandhorst, H., Bretzel, R.G., Elgue, G., Larsson, R., Nilsson, B., et al. 1999. Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation? *Diabetes* 48:1907-1914.
41. Baker, M.S., Chen, X., Rotramel, A., Nelson, J., and Kaufman, D.B. 2003. Proinflammatory cytokines induce NF-kappaB-dependent/NO-independent chemokine gene expression in MIN6 beta cells. *J Surg Res* 110:295-303.
42. Corbett, J.A., Kwon, G., Turk, J., and McDaniel, M.L. 1993. IL-1 beta induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. *Biochemistry* 32:13767-13770.
43. Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Strynadka, K., Lakey, J.R., and Rajotte, R.V. 1996. Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3197-3202.
44. Xenos, E.S., Stevens, R.B., Sutherland, D.E., Lokeh, A., Ansite, J.D., Casanova, D., Gores, P.F., and Platt, J.L. 1994. The role of nitric oxide in IL-1 beta-mediated dysfunction of rodent islets of Langerhans. Implications for the function of intrahepatic islet grafts. *Transplantation* 57:1208-1212.
45. Eizirik, D.L., and Mandrup-Poulsen, T. 2001. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44:2115-2133.
46. Vives-Pi, M., Somoza, N., Fernandez-Alvarez, J., Vargas, F., Caro, P., Alba, A., Gomis, R., Labeta, M.O., and Pujol-Borrell, R. 2003. Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin Exp Immunol* 133:208-218.
47. Piemonti, L., Leone, B.E., Nano, R., Sacconi, A., Monti, P., Maffi, P., Bianchi, G., Sica, A., Peri, G., Melzi, R., et al. 2002. Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation. *Diabetes* 51:55-65.
48. Baker, M.S., Chen, X., Rotramel, A.R., Nelson, J.J., and Kaufman, D.B. 2003. Interferon regulatory factor-1 down-regulates cytokine-induced IP-10 expression in pancreatic islets. *Surgery* 134:134-141.
49. Harber, M., Sundstedt, A., and Wraith, D. 2000. The role of cytokines in immunological tolerance: potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2000:1-20.
50. Gunzer, M., Schafer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zanker, K.S., Brocker, E.B., Kampgen, E., and Friedl, P. 2000. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* 13:323-332.
51. Chambers, C.A. 2001. The expanding world of co-stimulation: the two-signal model revisited. *Trends Immunol* 22:217-223.
52. Lederman, S. 2001. The role of CD154 (CD40-ligand) in costimulation. *Transplant Proc* 33:202-206.
53. Niimi, M., Shirasugi, N., Ikeda, Y., Kan, S., Takami, H., and Hamano, K. 2001. Operational tolerance induced by pretreatment with donor dendritic cells under blockade of CD40 pathway. *Transplantation* 72:1556-1562.
54. Austyn, J.M. 2000. Antigen-presenting cells. *Experimental and clinical studies of dendritic cells. Am J Respir Crit Care Med* 162:S146-150.

55. Yuan, X., Salama, A.D., Dong, V., Schmitt, I., Najafian, N., Chandraker, A., Akiba, H., Yagita, H., and Sayegh, M.H. 2003. The role of the CD134-CD134 ligand costimulatory pathway in alloimmune responses in vivo. *J Immunol* 170:2949-2955.
56. Larsen, C.P., Alexander, D.Z., Hollenbaugh, D., Elwood, E.T., Ritchie, S.C., Aruffo, A., Hendrix, R., and Pearson, T.C. 1996. CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway. *Transplantation* 61:4-9.
57. Parker, D.C., Greiner, D.L., Phillips, N.E., Appel, M.C., Steele, A.W., Durie, F.H., Noelle, R.J., Mordes, J.P., and Rossini, A.A. 1995. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9560-9564.
58. Kirk, A.D., Burkly, L.C., Batty, D.S., Baumgartner, R.E., Berning, J.D., Buchanan, K., Fechner, J.H., Jr., Germond, R.L., Kampen, R.L., Patterson, N.B., et al. 1999. Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med* 5:686-693.
59. Kenyon, N.S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranunoli, A., Oliveira, M., Wagner, J.L., Kirk, A.D., Harlan, D.M., Burkly, L.C., and Ricordi, C. 1999. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8132-8137.
60. Elster, E.A., Xu, H., Tadaki, D.K., Montgomery, S., Burkly, L.C., Berning, J.D., Baumgartner, R.E., Cruzata, F., Marx, R., Harlan, D.M., et al. 2001. Treatment with the humanized CD154-specific monoclonal antibody, hu5C8, prevents acute rejection of primary skin allografts in nonhuman primates. *Transplantation* 72:1473-1478.
61. Kenyon, N.S., Fernandez, L.A., Lehmann, R., Masetti, M., Ranunoli, A., Chatzipetrou, M., Iaria, G., Han, D., Wagner, J.L., Ruiz, P., et al. 1999. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in baboons treated with humanized anti-CD154. *Diabetes* 48:1473-1481.
62. Molano, R.D., Berney, T., Li, H., Cattani, P., Pileggi, A., Vizzardelli, C., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Burkly, L.C., and Inverardi, L. 2001. Prolonged islet graft survival in NOD mice by blockade of the CD40-CD154 pathway of T-cell costimulation. *Diabetes* 50:270-276.
63. Bushnell, A., and Wood, K.J. 1999. Permanent survival of organ transplants without immunosuppression: Experimental approaches and possibilities for tolerance induction in clinical transplantation. *Expert Rev Mol Med* 1999:1-31.
64. van Kooten, C., and Banchereau, J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67:2-17.
65. Villa, A., Notarangelo, L.D., Di Santo, J.P., Macchi, P.P., Strina, D., Frattini, A., Lucchini, F., Patrosso, C.M., Giliani, S., Mantuano, E., et al. 1994. Organization of the human CD40L gene: implications for molecular defects in X chromosome-linked hyper-IgM syndrome and prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2110-2114.
66. Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Kikutani, H. 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1:167-178.
67. Galy, A.H., and Spits, H. 1992. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol* 149:775-782.
68. Hess, S., and Engelmann, H. 1996. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J Exp Med* 183:159-167.
69. Karmann, K., Hughes, C.C., Schechner, J., Fanslow, W.C., and Pober, J.S. 1995. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4342-4346.
70. Klein, D., Barbe-Tuana, F., Pugliese, A., Ichii, H., Garza, D., Gonzalez, M., Molano, R.D., Ricordi, C., and Pastori, R.L. 2005. A functional CD40 receptor is expressed in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 48:268-276.

71. Smith, T.J., Sciaky, D., Phipps, R.P., and Jennings, T.A. 1999. CD40 expression in human thyroid tissue: evidence for involvement of multiple cell types in autoimmune and neoplastic diseases. *Thyroid* 9:749-755.
72. Sugimoto, K., Shiraki, K., Ito, T., Fujikawa, K., Takase, K., Tameda, Y., Moriyama, M., and Nakano, T. 1999. Expression of functional CD40 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 30:920-926.
73. Vosters, O., Beuneu, C., Nagy, N., Movahedi, B., Aksoy, E., Salmon, I., Pipeleers, D., Goldman, M., and Verhasselt, V. 2004. CD40 expression on human pancreatic duct cells: role in nuclear factor-kappa B activation and production of pro-inflammatory cytokines. *Diabetologia* 47:660-668.
74. Falco, A., Romano, M., Iapichino, L., Collura, M., and Davi, G. 2004. Increased soluble CD40 ligand levels in cystic fibrosis. *J Thromb Haemost* 2:557-560.
75. Ohta, Y., and Hamada, Y. 2004. In situ Expression of CD40 and CD40 ligand in psoriasis. *Dermatology* 209:21-28.
76. Urbich, C., and Dimmeler, S. 2004. CD40 and vascular inflammation. *Can J Cardiol* 20:681-683.
77. Balasa, B., Krahl, T., Patstone, G., Lee, J., Tisch, R., McDevitt, H.O., and Sarvetnick, N. 1997. CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 159:4620-4627.
78. Berney, T., Pileggi, A., Molano, R.D., Poggioli, R., Zahr, E., Ricordi, C., and Inverardi, L. 2003. The effect of simultaneous CD154 and LFA-1 blockade on the survival of allogeneic islet grafts in nonobese diabetic mice. *Transplantation* 76:1669-1674.
79. Mohan, C., Shi, Y., Laman, J.D., and Datta, S.K. 1995. Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *J Immunol* 154:1470-1480.
80. Yngen, M., Ostenson, C.G., Hu, H., Li, N., Hjendahl, P., and Wallen, N.H. 2004. Enhanced P-selectin expression and increased soluble CD40 Ligand in patients with Type 1 diabetes mellitus and microangiopathy: evidence for platelet hyperactivity and chronic inflammation. *Diabetologia* 47:537-540.
81. Harding, S.A., Sommerfield, A.J., Sarma, J., Twomey, P.J., Newby, D.E., Frier, B.M., and Fox, K.A. 2004. Increased CD40 ligand and platelet-monocyte aggregates in patients with type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 176:321-325.
82. Targher, G., and Zoppini, G. 2004. Soluble CD40L in young type 1 diabetic individuals without clinical microvascular and macrovascular complications. *Diabetes Care* 27:1236-1237.
83. Varo, N., Vicent, D., Libby, P., Nuzzo, R., Calle-Pascual, A.L., Bernal, M.R., Fernandez-Cruz, A., Veves, A., Jarolim, P., Varo, J.J., et al. 2003. Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones. *Circulation* 107:2664-2669.
84. Yang, Y., and Wilson, J.M. 1996. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 273:1862-1864.
85. Harigai, M., Hara, M., Kawamoto, M., Kawaguchi, Y., Sugiura, T., Tanaka, M., Nakagawa, M., Ichida, H., Takagi, K., Higami-Ohsako, S., et al. 2004. Amplification of the synovial inflammatory response through activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappaB using ligation of CD40 on CD14+ synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:2167-2177.
86. Suttles, J., Milhorn, D.M., Miller, R.W., Poe, J.C., Wahl, L.M., and Stout, R.D. 1999. CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an ERK1/2-dependent pathway. A target of interleukin (il)-4 and il-10 anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274:5835-5842.
87. Gallagher, N.J., Eliopoulos, A.G., Agathangelo, A., Oates, J., Crocker, J., and Young, L.S. 2002. CD40 activation in epithelial ovarian carcinoma cells modulates growth, apoptosis, and cytokine secretion. *Mol Pathol* 55:110-120.

88. Wingett, D.G., Vestal, R.E., Forcier, K., Hadjokas, N., and Nielson, C.P. 1998. CD40 is functionally expressed on human breast carcinomas: variable inducibility by cytokines and enhancement of Fas-mediated apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 50:27-36.
89. Ghia, P., Boussiotis, V.A., Schultze, J.L., Cardoso, A.A., Dorfman, D.M., Gribben, J.G., Freedman, A.S., and Nadler, L.M. 1998. Unbalanced expression of bcl-2 family proteins in follicular lymphoma: contribution of CD40 signaling in promoting survival. *Blood* 91:244-251.
90. Mazzei, G.J., Edgerton, M.D., Losberger, C., Lecoanet-Henchoz, S., Graber, P., Durandy, A., Gauchat, J.F., Bernard, A., Allet, B., and Bonnefoy, J.Y. 1995. Recombinant soluble trimeric CD40 ligand is biologically active. *J Biol Chem* 270:7025-7028.
91. Mukundan, L., Bishop, G.A., Head, K.Z., Zhang, L., Wahl, L.M., and Suttles, J. 2005. TNF receptor-associated factor 6 is an essential mediator of CD40-activated proinflammatory pathways in monocytes and macrophages. *J Immunol* 174:1081-1090.
92. Pullen, S.S., Labadia, M.E., Ingraham, R.H., McWhirter, S.M., Everdeen, D.S., Alber, T., Crute, J.J., and Kehry, M.R. 1999. High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry* 38:10168-10177.
93. Rothe, M., Xiong, J., Shu, H.B., Williamson, K., Goddard, A., and Goeddel, D.V. 1996. I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8241-8246.
94. Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Azuma, S., Yamamoto, T., and Inoue, J. 1999. Two differently regulated nuclear factor kappaB activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1234-1239.
95. Urbich, C., Mallat, Z., Tedgui, A., Clauss, M., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. 2001. Upregulation of TRAF-3 by shear stress blocks CD40-mediated endothelial activation. *J Clin Invest* 108:1451-1458.
96. Davies, C.C., Mason, J., Wakelam, M.J., Young, L.S., and Eliopoulos, A.G. 2004. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and ERK MAPK-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of CD40 ligation in carcinoma cells. *J Biol Chem* 279:1010-1019.
97. Tan, J., Town, T., Mori, T., Obregon, D., Wu, Y., DelleDonne, A., Rojiani, A., Crawford, F., Flavell, R.A., and Mullan, M. 2002. CD40 is expressed and functional on neuronal cells. *Embo J* 21:643-652.
98. Wen, L., Wong, F.S., Tang, J., Chen, N.Y., Altieri, M., David, C., Flavell, R., and Sherwin, R. 2000. In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes. *J Exp Med* 191:97-104.
99. Hill, C.S., and Treisman, R. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80:199-211.
100. Hunter, T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80:225-236.
101. Marshall, C.J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.
102. Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M.H. 2001. MAP kinases. *Chem Rev* 101:2449-2476.
103. Khoo, S., Griffen, S.C., Xia, Y., Baer, R.J., German, M.S., and Cobb, M.H. 2003. Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 278:32969-32977.
104. Longuet, C., Broca, C., Costes, S., Hani el, H., Bataille, D., and Dalle, S. 2005. Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology* 146:643-654.
105. Arnette, D., Gibson, T.B., Lawrence, M.C., January, B., Khoo, S., McGlynn, K., Vanderbilt, C.A., and Cobb, M.H. 2003. Regulation of ERK1 and ERK2 by glucose and peptide hormones in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 278:32517-32525.

106. Pearson, L.L., Castle, B.E., and Kehry, M.R. 2001. CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Int Immunol* 13:273-283.
107. Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., and Saltiel, A.R. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270:27489-27494.
108. Sen, R., and Baltimore, D. 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 47:921-928.
109. Baeuerle, P.A. 1998. IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. *Cell* 95:729-731.
110. Baeuerle, P.A. 1998. Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF-kappaB puzzle? *Curr Biol* 8:R19-22.
111. Baldwin, A.S., Jr. 2001. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 107:3-6.
112. Nichols, T.C., Fischer, T.H., Deliargyris, E.N., and Baldwin, A.S., Jr. 2001. Role of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. *Ann Periodontol* 6:20-29.
113. Baldwin, A.S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649-683.
114. Cardozo, A.K., Heimberg, H., Heremans, Y., Leeman, R., Kutlu, B., Kruhoffer, M., Orntoft, T., and Eizirik, D.L. 2001. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276:48879-48886.
115. Giannoukakis, N., Rudert, W.A., Trucco, M., and Robbins, P.D. 2000. Protection of human islets from the effects of interleukin-1beta by adenoviral gene transfer of an Ikappa B repressor. *J Biol Chem* 275:36509-36513.
116. Heimberg, H., Heremans, Y., Jobin, C., Leemans, R., Cardozo, A.K., Darville, M., and Eizirik, D.L. 2001. Inhibition of cytokine-induced NF-kappaB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kappaB super-repressor prevents beta-cell apoptosis. *Diabetes* 50:2219-2224.
117. Calderhead, D.M., Kosaka, Y., Manning, E.M., and Noelle, R.J. 2000. CD40-CD154 interactions in B-cell signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 245:73-99.
118. Dadgostar, H., Zarnegar, B., Hoffmann, A., Qin, X.F., Truong, U., Rao, G., Baltimore, D., and Cheng, G. 2002. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1497-1502.
119. Eliopoulos, A.G., Davies, C., Knox, P.G., Gallagher, N.J., Afford, S.C., Adams, D.H., and Young, L.S. 2000. CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily. *Mol Cell Biol* 20:5503-5515.
120. Hess, S., Gottfried, E., Smola, H., Grunwald, U., Schuchmann, M., and Engelmann, H. 1998. CD40 induces resistance to TNF-mediated apoptosis in a fibroblast cell line. *Eur J Immunol* 28:3594-3604.
121. Ishida, T.K., Tojo, T., Aoki, T., Kobayashi, N., Ohishi, T., Watanabe, T., Yamamoto, T., and Inoue, J. 1996. TRAF5, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor family protein, mediates CD40 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9437-9442.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Determinar a expressão da molécula de CD40 e avaliar o papel pró-inflamatório decorrente de sua ativação em ilhotas pancreáticas.

### **2.2. Objetivos específicos**

Determinar a expressão da molécula da molécula de CD40 em ilhotas pancreáticas.

Determinar a via de transdução de sinais a partir da molécula de CD40 em células  $\beta$  pancreáticas.

Determinar conseqüências celulares decorrentes da ativação de CD40 em células  $\beta$  pancreáticas.

**O antígeno CD40 é funcional e constitutivamente expresso  
em células beta pancreáticas**

D. Klein, F. Barbé-Tuana, A. Pugliese, D. Garza, M. Gonzalez, R. D. Molano, C. Ricordi  
and R. L. Pastori. Diabetes Research Institute, University of Miami School of Medicine.

Por favor correspondência para:

R.L. Pastori, Ph.D.

Diabetes Research Institute

University of Miami School of Medicine

1450 NW 10th Avenue, Miami, FL 33136, USA

Tel: (305) 243-5349

Fax: (305) 243-4404

Endereço e-mail: [rpastori@med.miami.edu](mailto:rpastori@med.miami.edu)

**Abreviações:** 7-AAD: 7-Amino actinomicina D, APC: alofococyanina, APC: célula apresentadora de antígenos, CD40L: ligante do CD40, FITC: isotiocianato de fluoresceína, IEQ: equivalente de ilhotas, LCMV: Vírus linfocítico corio meningítico, mAb: anticorpo monoclonal, NF-kB: fator nuclear kappa B, NG: *Newport green*, NOD: diabéticos não-obesos,  $T_m$ : temperatura de fusão, TNFR: receptor do fator de necrose tumoral.

## Resumo

**Objetivos/Hipóteses.** Apesar das diferenças de função e origem embrionária, as células das ilhotas pancreáticas e os neurônios expressam proteínas pertencentes à superfamília do receptor do fator de necrose tumoral. Enquanto os neurônios expressam o receptor do CD40, não se sabe se as células das ilhotas também o expressam. O objetivo deste estudo foi investigar a expressão do CD40 em ilhotas pancreáticas humanas e de camundongo, assim como também em células de insulinoma NIT-1.

**Métodos.** A expressão do CD40 foi estudada por transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase, citometria de fluxo, imuno-histoquímica, e *immunoblot*. As respostas mediadas pelo CD40 foram avaliadas por ensaio de gene repórter utilizando a luciferase, após estimulação com um anticorpo agonista contra o CD40.

**Resultados.** Nós detectamos expressão do CD40 em ilhotas pancreáticas humanas e de camundongo. O CD40 é expresso em células beta, e a sua expressão é aumentada por citocinas pro-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ). A sinalização do CD40 nas células de insulinoma NIT-1 ativa o fator nuclear kappa B, demonstrando que o CD40 é funcional.

**Conclusões/interpretação.** Nós apresentamos evidência que, junto com as células do sistema imune, a sinalização através deste receptor ativa o NF-kB. Nós sugerimos que os efeitos do estímulo inflamatório que afetam a função e sobrevivência das células beta podem também estar mediados pela sinalização através do receptor CD40. Portanto, o CD40 pode ter um papel em processos associados à auto-imunidade das ilhotas e transplante.

**Palavras chaves:** Célula beta, CD40, Diabetes mellitus, ilhotas, NIT-1, fator nuclear kappa B.



## Introdução

O receptor do CD40 é uma glicoproteína de membrana que pertence à família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). Seu ligante natural, o ligante CD40 (CD40L ou CD154), é uma proteína transmembrana tipo II e é membro da família das proteínas do TNF- $\alpha$  (1-3). O CD40 é expresso na superfície dos linfócitos B e células apresentadoras de antígenos (APC) e media sinais co-estimulatórios para a ativação dos linfócitos T (4).

Durante o curso de uma resposta imune, o receptor das células T reconhece o MHC:antígeno na superfície das APCs. O reconhecimento antigênico é seguido pela expressão do CD40L nos linfócitos T. A interação do CD40L com o CD40 induz a expressão de outras moléculas co-estimuladoras na superfície das APCs. Esses incluem CD80 e CD86 (5, 6), as quais interagem com o CD28 expresso pelas células T (4, 7). Essa cascata de eventos resulta na produção de IL-2 e ativação das células T. O papel crítico do CD40 na ativação das células T é reconhecido também na área do transplante (8-11) e auto-imunidade (12, 13), e tem sido confirmado utilizando camundongos transgênicos e nocautes (14).

A interferência da via do CD40 usando anticorpos contra o CD40L inibe o desenvolvimento espontâneo do diabetes nos camundongos não diabéticos (NOD) e prolonga a sobrevivência do aloenxerto de ilhotas em primatas não humanos na ausência de drogas imunossupressoras (8, 12). Achados similares têm sido demonstrados em outros transplantes (9-11).

Mais ainda, a união do CD40 com seu ligante o CD40L pode afetar dramaticamente a sobrevivência dos linfócitos B, levando à proliferação celular ou morte dependendo se o estímulo é causado por um antígeno próprio ou estranho (15, 16). O CD40/CD40L também

tem um papel na troca de isotipo e mutação somática (14). A expressão do CD40 tem sido relatada em células T diabetogênicas e clones de células T nos camundongos NOD (17).

Células não-imunes como células endoteliais (18), células do epitélio do timo (19), neurônios (20), células normais e neoplásicas da tireóide (21), carcinomas (22), linhagens celulares transformadas (23) e células do ducto pancreático também expressam o CD40 (24). Os efeitos da sinalização do CD40 em células não-imunes não são totalmente compreendidos. Porém, vários trabalhos indicam que a sinalização através do receptor do CD40 pode induzir sobrevivência (25, 26) ou inibição do crescimento e aumento da apoptose em vários tipos de células não-imunes (27, 28).

Apesar das diferenças de função e origem embrionária, as células das ilhotas pancreáticas e os neurônios expressam proteínas pertencentes à superfamília do TNFR, como TNF-R1 e o receptor do fator de crescimento do nervo (27-33). Como os neurônios expressam o CD40, nós especulamos que as células das ilhotas também podem expressar esse membro da superfamília do TNFR. Neste estudo nós investigamos a expressão do CD40 em ilhotas de camundongo e humanos e na linhagem celular NIT-1.

## **Métodos**

**Tecidos e células.** Estudamos pâncreas e ilhotas de camundongos C57BL/6, BALB/c e NOD. As ilhotas humanas foram obtidas de doadores cadavéricos. As células NIT-1 foram obtidas da American Type Culture Collection (CRL 2055, ATCC, Manassas, Virginia, USA) e mantidas em cultura de acordo às instruções da ATCC.

**Isolamento de ilhotas.** Os métodos para o isolamento de ilhotas de humanos e murinas têm sido previamente descritos (34, 35). As ilhotas humanas foram supridas pelo cGMP no Diabetes Research Institute, Universidade de Miami, e isoladas pelo método automatizado desenvolvido por Ricordi e cols (36). As ilhotas de camundongo foram isoladas da seguinte maneira: os animais foram sacrificados sob anestesia geral, o abdome foi aberto, o pâncreas foi exposto e injetado com uma solução de colagenase 0.8 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) através do ducto biliar principal até que foi atingida a total distensão do órgão. Este procedimento foi aprovado pelo Comitê de Utilização e Cuidados de Animais da Universidade de Miami. O tecido pancreático previamente distendido foi removido cirurgicamente e imerso em uma solução de colagenase. A digestão foi realizada a 37°C durante 17 min com suave agitação. A cinética enzimática foi reduzida pela adição da solução balanceada salina de Hanks suplementada com 10% de soro fetal bovino (Hyclone, Logan, UT, USA). A disrupção mecânica do tecido pancreático digerido foi realizada com uma agulha calibre 14-G até que a completa liberação das ilhotas foi observada pelo microscópio. O tecido foi depois filtrado através de um filtro de 450 µm. As ilhotas foram purificadas por centrifugação a 900 g por 11 min em gradientes descontínuos de Euro-ficoll. Esse método proveu de forma rotineira de ilhotas com uma pureza superior a 90 % como atestado pela coloração com ditizona (Sigma-Aldrich). As

ilhas foram contadas e agrupadas de acordo ao seu tamanho. Foi utilizado um algoritmo para o cálculo do número de ilhotas equivalentes (IEQ) tomando como medida padrão o diâmetro de 150  $\mu\text{m}$ . Os experimentos foram realizados utilizando ilhotas purificadas.

**Extração de RNA e síntese do cDNA.** O RNA total foi isolado utilizando o kit RNAsasy (Qiagen Inc, Los Angeles, CA, USA). As amostras foram tratadas com DNase I (Ambion, Austin, TX, USA) para remover vestígios de DNA genômico. A síntese do cDNA foi realizada utilizando oligo(dT) e a enzima transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen, Chicago, IL, USA).

**Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real.** O cDNA de ilhotas de camundongo foi amplificado utilizando um par de iniciadores específicos (CD40F e CD40R) para os éxons 7 e 9, respectivamente (CD40F: TGG TCA TTC CTG TCG TGA TG e CD40R: CTC TAC CCA TCA TTC CAC TAC). Como controles negativos foram incluídas reações nas quais a enzima transcriptase reversa foi omitida. Para determinar os parâmetros para a aquisição dos dados de fluorescência, realizamos curvas de fusão preliminares. A análise da curva de fusão foi realizado aquecendo a 95  $^{\circ}\text{C}$ , esfriando a 55  $^{\circ}\text{C}$  a 20  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ , seguido de um aquecimento a 94  $^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de 0,2  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  e adquirindo a fluorescência de forma contínua. Essa análise permitiu-nos determinar a temperatura de fusão específica para o produto da PCR de nosso interesse. Os dados da fluorescência foram coletados 1,5  $^{\circ}\text{C}$  abaixo da temperatura de fusão ( $T_m$ ) do produto específico para evitar a contribuição da fluorescência gerada por produtos não específicos. A identidade dos produtos da PCR foi verificada eletroforese em gel de agarose ao 1%. A amplificação da PCR foi realizada em um termociclador de fluorescência (LightCycler; Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN, USA) em um volume final de 20  $\mu\text{l}$

contendo 3mmol/l de MgCl<sub>2</sub>, 0,5µmol/l de cada iniciador, 2 µl do mistura de reação (Ready-to-use reaction mix 10xDNA Master SYBR Green I, Roche Molecular Biochemicals) e o cDNA alvo. A reação foi previamente incubada por 5 min a temperatura ambiente com 0,55 µg do anticorpo TaqStart (Clontech, Palo Alto, CA, USA). O programa de amplificação foi o seguinte: taxa de transição a 20 °C/s para todos os passos envolvidos, 1 ciclo de desnaturação a 94 °C por 5 s, anelamento a 55 °C por 5 s, e extensão a 72 °C por 10 s; aquisição da fluorescência pelo aquecimento a 87 °C por 1 s.

**PCR do cDNA de células beta humanas purificadas.** A amplificação da PCR dos transcritos de CD40 humano foi realizada como o iniciador direito ACAATACTGCGACCCCAAC (compreende os éxons 3 e 4) e o iniciador reverso AAAGACCAGCACCAAGAGGA (éxon 7). As condições da PCR foram 1 ciclo de 1 min a 95 °C, 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s a 55 °C, e 45 s a 72 °C. Foi realizada uma elongação final por 3 min a 72 °C. A banda de 404 pb foi digerido com StuI, gerando fragmentos de 104 e 300 pb. Reações na qual a enzima transcriptase reversa foi omitida foram incluídas como controles negativos.

**Imuno-histoquímica.** As células NIT-1 foram cultivadas em lâminas, lavadas com PBS, e fixadas com formalina. As células foram coradas utilizando o kit ABC de acordo às instruções do fabricante (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) com 5 µg/ml de anticorpo polyclonal de coelho contra o CD40 de camundongo (L-17; Santa Cruz Biotechnology Inc.) como anticorpo primário. Os controles negativos incluíram cortes que foram marcados com o anticorpo controle de isotipo, e cortes incubados com o anticorpo secundário na ausência do primário.

**Imunofluorescência de tecido de camundongo.** Cortes dos pâncreas de camundongos NOD, C57BL/6 e BALB/c foram fixados em solução de Bouin (Sigma-Aldrich) e embebidos em parafina. Logo, os cortes de tecido foram incubados com 5 µg/ml de anticorpo polyclonal (coelho contra o CD40 de camundongo) seguido por um anticorpo secundário contra coelho feito em cabra conjugado com AlexaFluor488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Nos experimentos de coloração dupla, os cortes também foram corados com um anticorpo contra insulina de porco feito em porco da índia (Zymed Laboratories, Inc. South San Francisco, CA, USA) ou com um anticorpo monoclonal (mAb) contra glucagon porcino (K79bB10, Sigma-Aldrich) que tem reação cruzada contra insulina e glucagon de camundongo, respectivamente. A coloração da insulina ou glucagon foi feita pela incubação com um anticorpo secundário de cabra contra porco da índia ou cabra contra camundongo conjugados com AlexaFluor568. As reações controle incluíram a coloração com controles de isotipo, assim como também combinações cruzadas de anticorpos primários e secundários. A imunofluorescência foi analisada por microscopia confocal utilizando um microscópio laser confocal de scan Zeiss LSM-510 (Carl Zeiss Inc. Thornwood, NY, USA).

**Imuno-marcação de tecido pancreático humano e ilhotas isoladas.** Os péletes de ilhotas humanas ou cortes de pâncreas foram congelados em OCT (Sakura Finetek Torrance, CA, USA) e cortados. Os cortes foram secados e lavados em PBS antes de serem fixados (Histochoice Tissue Fixative, Amresco, Sólón, OH, USA). Após lavagem em PBS, as amostras foram tratadas com o bloqueador (Universal blocker, Biogenex, San Ramon, CA, USA) para prevenir reações não-específicas. Os cortes foram incubadas com mAb murino contra CD40 humano (MAB89; Beckmann Coulter, Hialeah, FL, USA), lavados, e

incubados com anticorpo secundário de cabra contra camundongo conjugado com AlexaFluor488. A coloração para insulina foi realizada utilizando o mesmo protocolo, utilizando anticorpo secundário de cabra contra coelho conjugado com AlexaFluor568.

**Citometria de fluxo.** Um milhão de células NIT-1 ou células de ilhotas pancreáticas dissociadas foram incubadas com 1µg/100µl de mAb de hamster contra CD40 murino (HM40-3; BD/Pharmingen, San Diego, CA, USA) conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) por 30 min no gelo, lavadas e avaliadas por citometria de fluxo. As ilhotas de camundongo ou humanas foram dissociadas até formar uma suspensão celular de células individuais pela incubação de alíquotas de 500- 1000 IEQ em 1 ml de uma solução de acutase (Accutase, Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, USA) a 37 °C por 5-15 min e subseqüentemente dispersas por pipetagem. As ilhotas humanas dissociadas foram incubadas com 1µmol/l de Newport Green (NG) (Molecular Probes) por 30-60 min a 37 °C em PBS sem Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>. Após lavagem, as células foram incubadas em gelo por 20 min com anticorpo anti-CD40 conjugado com aloficocianina (APC) ou anti-CD40-ficoeritrina (HB14; Caltech, CA, USA; e clone MAB89, Beckman-Coulter), respectivamente. Finalmente, as células foram coradas com 7-amino de actinomicina D (7-AAD, Invitrogen, La Jolla, CA, USA) a uma concentração de 10 µg/ml. O marcador de DNA 7-AAD é capaz de se ligar às células mortas, permitindo, portanto, sua exclusão seletiva. A análise de citometria de fluxo foi realizada utilizando o programa CellQuest em um instrumento FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA).

**Incubação das ilhotas humanas com citocinas pró-inflamatórias.** As ilhotas humanas purificadas foram incubadas por 12-18 h com uma combinação de IL-1β (5x10<sup>4</sup>

U/l), IFN- $\gamma$  ( $10^6$  U/l) e TNF- $\alpha$  ( $10^6$  U/l). Após foram lavadas, dissociadas e analisadas por citometria de fluxo como descrito acima.

**Separação de células.** Após a dissociação até a suspensão celular, as células foram coradas com NG e 7-AAD. A separação das células foi realizada em um FCASvantage (Becton-Dickinson). Foram obtidas duas populações celulares, NG brilhantes e NG foscas/negativas.

**Western blot.** Ilhotas altamente purificadas de C57BL/6 e células NIT-1 foram lavadas duas vezes com PBS gelado e lisadas em tampão contendo SDS 2%, Tris-HCl 60 mmol/l (pH 6.8), incubadas a 95 °C, sonicadas em banho de água a 37 °C e centrifugadas a alta velocidade por 10 min. A avaliação do conteúdo total de proteínas foi realizado com kit (BCA, Pierce Biotechnology, Rockford, IL. USA). Alíquotas correspondendo a 50  $\mu$ g de proteínas foram submetidas à eletroforese com gel de poliacrilamida e SDS (SDS-PAGE) utilizando géis comerciais a 12% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e transferidos a membrana de polivinildifluoro. As membranas foram incubadas com leite em pó desnatado ao 5% em TBS (20mM Tris, 500mM NaCl, pH 7.5) por 12-18 h 4°C para bloquear ligações não específicas. Subseqüentemente, as membranas foram incubadas com 1:200 do anticorpo policlonal de coelho contra o CD40 murino (L-17, Santa Cruz Biotechnology) seguido da incubação com o anticorpo secundário contra coelho conjugado à peroxidase de raiz forte e detecção por quimiluminescência (Amersham Biosciences, San Francisco, CA, USA). As mesmas membranas foram novamente utilizadas e incubadas com anticorpo contra beta-actina 2066 (Sigma-Aldrich).

**Ensaio do gene repórter para NF- $\kappa$ B.** Alíquotas de  $3.0 \times 10^4$  células NIT-1 foram cultivadas em placas de 96 poças. Após 24 h, as células NIT-1 foram transitoriamente co-



transfectadas com dois plasmídeos repórteres: pNF $\kappa$ B-Luc (BD Biosciences/Clontech) que contem quatro cópias do elemento de união ao  $\kappa$ B acima da região do promotor que induz a expressão da luciferase de vaga-lume e o plasmídeo repórter pRLTK, que também codifica para a enzima luciferase de Renilla reniformis sob o controle do promotor constitutivo da timidina quinase (Promega, Madison, WI, USA). A transfecção foi realizada utilizando o reagente Fugene 6 (Roche, Indianapolis, IN) na relação de 3:1 microgramas de lipossomos para DNA. Após 24 h, as células foram não tratadas, incubadas na presença do mAb agonista contra CD40 de camundongo (HM40-3, 10  $\mu$ g/ml) ou o controle de isotipo (G235-1, 10  $\mu$ g/ml). Como controle positivo, as células foram também tratadas com o TNF- $\alpha$  (10<sup>6</sup> U/l, Roche Biochemicals). Após 2h de incubação a 37 °C, os lisados foram preparados de acordo com as instruções do fabricante (Dual-GLO-luciferase assay system, Promega). A atividade da luciferase foi medida em luminômetro (Wallac 1420 Victor<sup>2</sup>, Perkin Elmer, Fremont, CA, USA). As medidas de luminescência foram integradas por um período de 10 s/poça. A razão entre a atividade da luciferase de vaga-lume e de renilla foram expressas percentualmente tendo como referência a atividade de células controle transfectadas e não ativadas.

**Análise estatística.** Quando apropriado, os resultados foram analisados pelo teste t de Student. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando ANOVA e o método de Dunnett para contrastes posteriores com o programa estatístico Sigma-Stat 2. Os valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## Resultados

O mRNA do CD40 é expresso em ilhotas de camundongo e células NIT-1. Para investigar se o gene do CD40 é transcrito em ilhotas pancreáticas de camundongo e na linhagem celular NIT-1, isolamos RNA total de ilhotas purificadas de camundongos NOD e C57L/6 e de células NIT-1. Utilizamos camundongos NOD de 4 semanas, para evitar a possível contribuição da expressão do CD40 de células do sistema imune associadas à infiltração. A quantificação dos transcritos do CD40 utilizando a PCR em tempo real mostrou que o transcrito do CD40 está presente nas ilhotas, e seus níveis de expressão foram comparáveis entre NOD, C57BL/6 e células NIT-1 (Figura 1a, b). A identidade do produto da RT-PCR foi confirmada pela clivagem do amplicon com a enzima de restrição *NciI*, gerando os fragmentos do tamanhos esperados (145 e 210 pb, Figura 1a).

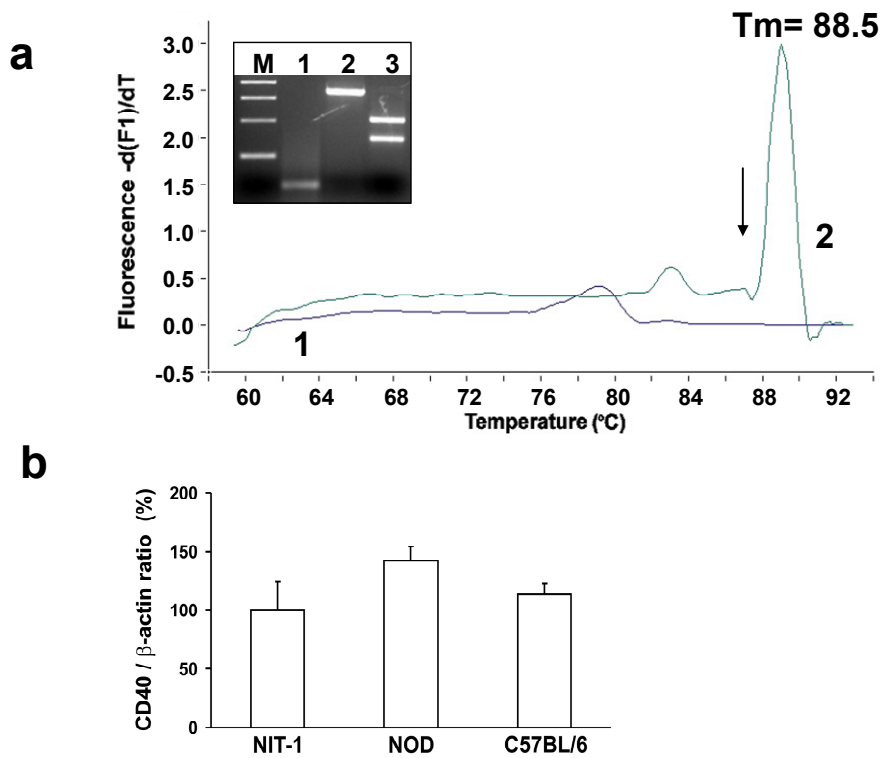


Figura 1. Detecção e quantificação de transcritos do CD40 em ilhotas de camundongo e células NIT-1 pela RT-PCR. a Perfil da curva de fusão dos transcritos de CD40 utilizando os iniciadores CD40F e CD40R, anelando às seqüências desde o éxon 7 e 9, respectivamente. Os iniciadores CD40F e CD40R geraram amplicons de 355 pb. A análise da curva de fusão foi realizada após a amplificação do cDNA de ilhotas B6. A primeira derivada negativa da fluorescência versus tempo ( $-dF/dT$ ) é graficada contra a temperatura. O produto do CD40 tem uma  $T_m$  de 88,5 °C. A *seta* marca a temperatura (87 °C) à qual os dados de fluorescência foram adquiridos. 1 e 2 representam o perfil de fusão das reações de amplificação das ilhotas B6 (reações controle sem RT e mais RT, respectivamente). *No requadro* está um gel de agarose com o amplicon do CD40. *Coluna M* mostra o marcador de 100 pb, *coluna 3* mostra o perfil de digestão do amplicon de CD40 com a enzima *NciI*. b Razão dos níveis de transcrito do CD40 estandardizados pelo conteúdo de transcritos de beta actina de células NIT-1, NOD de quatro semanas, e C57BL/6. Os resultados são uma média de dois experimentos.

**A proteína do CD40 é expressa por células beta de camundongo.** A figura 2a mostra que a expressão da proteína do CD40 é detectável por *western blot* tanto em ilhotas pancreáticas de camundongo como em células NIT-1. Também utilizamos imunohistoquímica para avaliar a expressão protéica do CD40 em cortes pancreáticos murinos e células NIT-1. Utilizando o anticorpo policlonal anti-CD40 L-17 observamos coloração específica em células NIT-1 (Figura 2b). Omitindo o anticorpo primário, a coloração não foi observada (Figura 2c). Ilhotas isoladas e ilhotas em cortes de tecidos pancreáticos tiveram coloração positiva para o CD40 (Figura 2d, e). A absorção prévia do anticorpo com seu peptídeo alvo inibiram completamente a marcação. Resultados similares foram obtidos com o mAb HM40-3 seguido por anticorpo secundário conjugado a FITC (dados não mostrados). Para definir que tipo de célula presente na ilhota expressa o CD40, utilizamos imunofluorescência dupla. Como mostrado na Figura 3, a microscopia *laser* confocal revelou que a expressão da proteína do CD40 co-localiza claramente com a insulina, mas

não com o glucagon. Não observamos diferenças apreciáveis nos padrões de coloração em cortes de tecidos de camundongos machos ou fêmeas C57BL/6, BALB/c ou NOD (dados não mostrados).

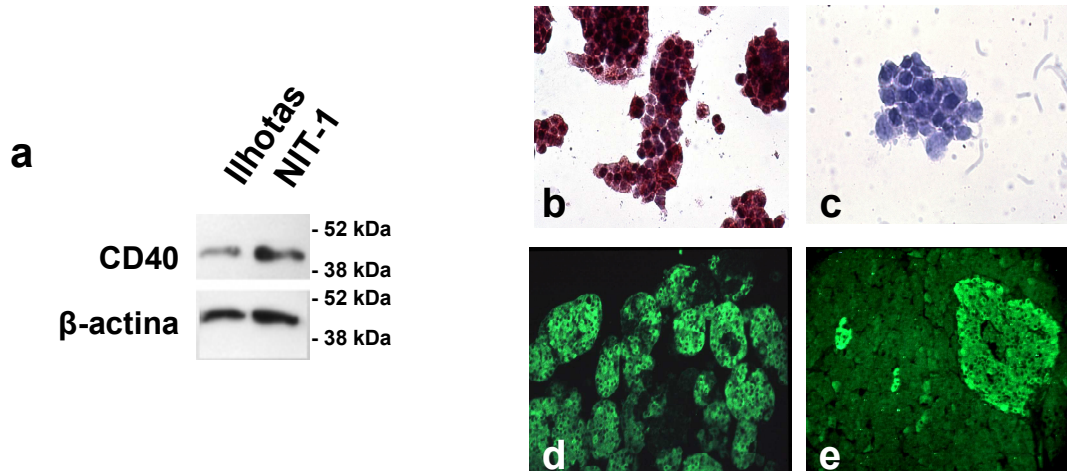


Figura 2. Análise da expressão do CD40 por *western blot* e imuno-histoquímica. a A expressão do CD40 foi analisada por *western blot* em amostras de ilhotas pancreáticas de C57BL/6 e células NIT-1. O mesmo gel foi utilizado para a incubação com um anticorpo contra a actina, para garantir que as mesmas quantidades de proteínas fossem transferidas e utilizadas na análise. A localização dos marcadores de proteínas de 52 e 38 kDa está assinalada. São mostrados dados representativos de 3 experimentos. b As células NIT-1 foram coloradas com um anticorpo policlonal feito em coelho contra o CD40 e um anticorpo secundário biotilado utilizando o método da imuno-peroxidase e um conjugado de estreptavidina peroxidase conjugado ao DAB como substrato. c Células NIT-1 coloradas na ausência do anticorpo primário. d Cortes de ilhotas isoladas embebidas em parafina de camundongos C57BL/6 e tecido pancreático (e) foram coloradas com o mesmo anticorpo seguidas por um anticorpo secundário conjugado com AlexaFluor488. Aumento original (b, c, d, e) x20. São mostrados dados representativos de cinco experimentos.

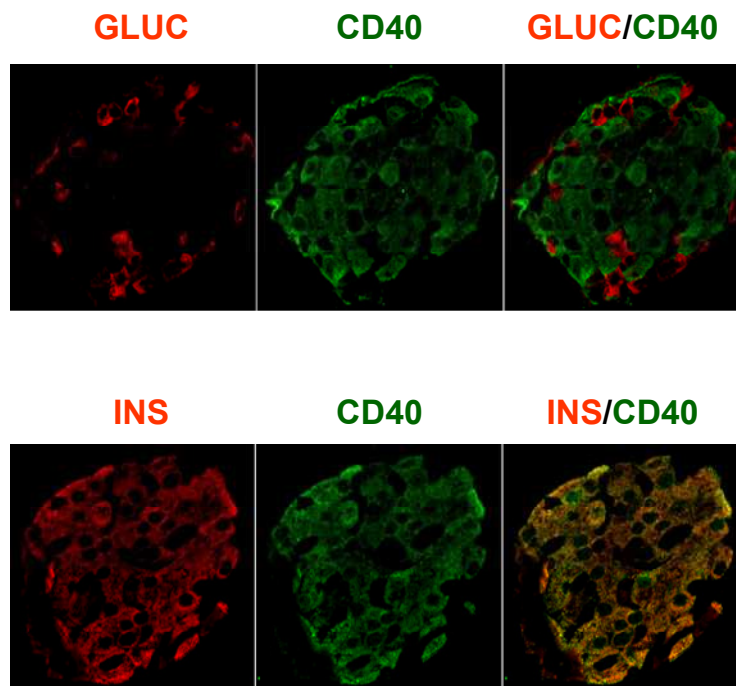


Figura 3. Co-localização da expressão do CD40 e insulina em ilhotas pancreáticas. A análise feita por microscopia fluorescente confocal dos cortes de parafina de pâncreas de um camundongo BALB/c de 8 semanas marcado para glucagon ou insulina (vermelho) ou CD40 (verde), utilizando imunofluorescência dupla. A coluna da direita mostra a sobreposição da coloração dos cortes óticos do CD40 e glucagon ou insulina. A *cor amarela* resultante indica a co-localização do CD40 e a insulina. Aumento original x40. São mostrados dados representativos de cinco experimentos.

**O receptor do CD40 é expresso na superfície das células das ilhotas pancreáticas de camundongos.** Tendo demonstrado a expressão da proteína, nos especulamos que esse receptor estivesse sendo expresso na superfície das células das ilhotas. Para testar essa hipótese analisamos células de ilhotas de camundongo dissociadas e células NIT-1 após a incubação com o mAb HM40-3, diretamente conjugado a FITC (Figura 4). A análise da citometria de fluxo revela a falta de marcação com o anticorpo

controle de isotipo, enquanto que 58-85% das células de ilhotas e a maioria das células NIT-1 exibem marcação na superfície para o CD40.

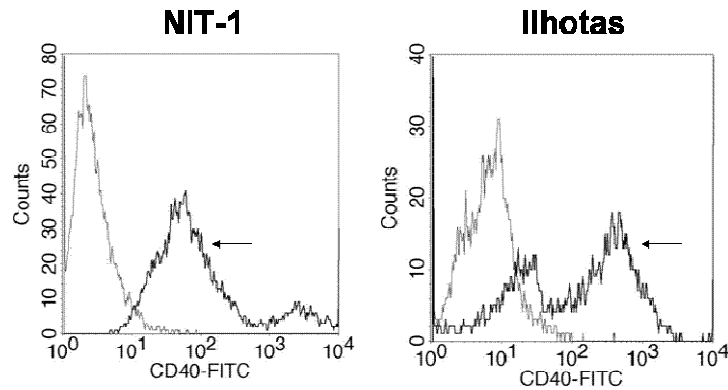


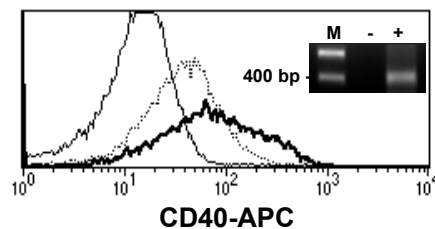
Figura 4. Expressão do CD40 em células NIT-1 e ilhotas pancreáticas isoladas. A expressão do CD40 foi analisada por citometria de fluxo em células de ilhotas pancreáticas dissociadas de camundongos C57BL/6 e células NIT-1. As curvas mostram o perfil das células marcadas com um anticorpo antiisotipo e com o anticorpo anti-CD40-FITC HM40-3 (seta). São mostrados dados representativos de cinco experimentos.

**O CD40 é expresso em células beta de humanos.** Também investigamos se o gene de CD40 é expresso em células humanas que foram purificadas por procedimentos padrões. Para assegurar que estávamos trabalhando com uma população pura de ilhotas, marcamos as células com NG e 7-AAD, de forma que as células beta vivas pudessem ser identificadas e separadas [36]. A separação das células com coloração positiva para o NG são na maioria (90%) células beta, como avaliadas por imuno-histoquímica pela coloração da insulina em células previamente separadas (H. Ichii, observações não publicadas). Avaliamos a expressão da proteína do CD40 em ilhotas humanas isoladas por imunofluorescência dupla. Como mostrado na figura 5b, a expressão do CD40 é detectado

pela marcação do anticorpo e co-localiza com a marcação para a insulina. A figura 5a demonstra que o CD40 é expresso na superfície de ilhotas humanas que são negativas para o 7-AAD e positivas para o NG. A coloração foi observada com o mAb contra CD40 humano HB14 conjugado com APC e com o mAb MAB89 (dados não mostrados). Portanto, a população celular de ilhotas, altamente enriquecida em células beta também expressa o transcrito do CD40 (Figura 5a) e a proteína, a qual, consistente com a sua função de receptor, também é expressa na superfície celular.

**A expressão do CD40 é aumentada por citocinas pro-inflamatórias.** Tratamos ilhotas humanas com uma combinação de citocinas pro-inflamatórias que estão associadas com dano nas células beta no diabetes auto-imune [37, 38]. A incubação durante toda a noite com a combinação de IL-1 $\beta$  ( $5 \times 10^4$  U/l), IFN- $\gamma$  ( $10^6$  U/l) e TNF- $\alpha$  ( $10^6$  U/l) aumentou a expressão do CD40 em células beta humana (7-AAD negativas, NG-brilhantes positivas) como mostrado pelo aumento da mediana da intensidade de fluorescência de  $37,5 \pm 2,9$  nas células controles a  $67,3 \pm 6,8$  nas células tratadas com as citocinas ( $p=0,02$ ) (Figura 5a).

**a**



7AAD neg  
Newport Green pos.

**b**

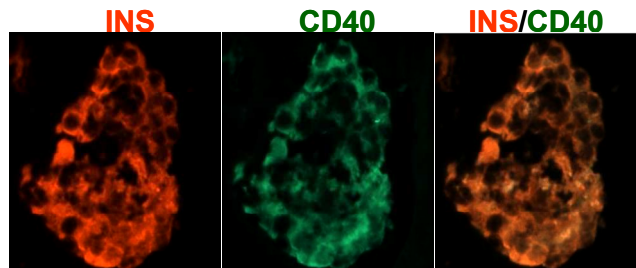


Figura 5. Análise da expressão do CD40 ilhotas pancreáticas humanas. a As ilhotas humanas foram mantidas em cultura durante toda a noite com ou sem uma combinação de citocinas (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ). Após a dissociação, as células foram coloradas com um anticorpo anti-CD40 humano conjugado a APC (HB14) e a fluorescência analisada na proporção de células 7-AAD negativas, NG brilhantes (células beta vivas). A *linha sólida* representa a fluorescência correspondendo às células controle utilizando o anticorpo antiisotipo. *Líneas pontilhada e sólida negrita* representam a fluorescência das células de ilhotas controle e tratadas com citocinas utilizando o anticorpo anti-CD40 HB14, respectivamente. No requadro está um gel de agarose com o transcrito do CD40 obtido pela RT-PCR do cDNA derivado de células humanas purificadas. b Cortes de ilhotas humanas foram congelados, fixados e lavados com PBS. Após bloqueio com bloqueador universal e bloqueador de proteínas, os cortes foram incubadas com o anticorpo primário contra humano anti-CD40 MAB89 (feito em camundongo) por 2 h e depois incubado com o anticorpo secundário de cabra contra camundongo conjugado a AlexaFluor488. A segunda coloração para insulina foi realizada nos mesmos cortes com anticorpo primário contra a insulina feito em coelho e anti-coelho Alexafluor568 feito em cabra como anticorpo secundário.

**O receptor CD40 é funcionalmente ativo.** A sinalização através do CD40 ativa o fator de transcrição NF-kB (14). Para investigar se o CD40 é funcionalmente ativo em células beta, avaliamos a ativação do NF-kB em células NIT-1 após estimulação do CD40. As células NIT-1 foram transitoriamente transfectadas com o gene repórter da luciferase que está fusionado ao promotor da timidina quinase que está precedido de quatro elementos consenso de união ao NF-kB organizados em tandem. Como mostrado na figura 6 a ativação do receptor CD40 pela incubação junto com o anticorpo agonista anti-CD40 HM40-3 resulta na ativação do NF-kB.



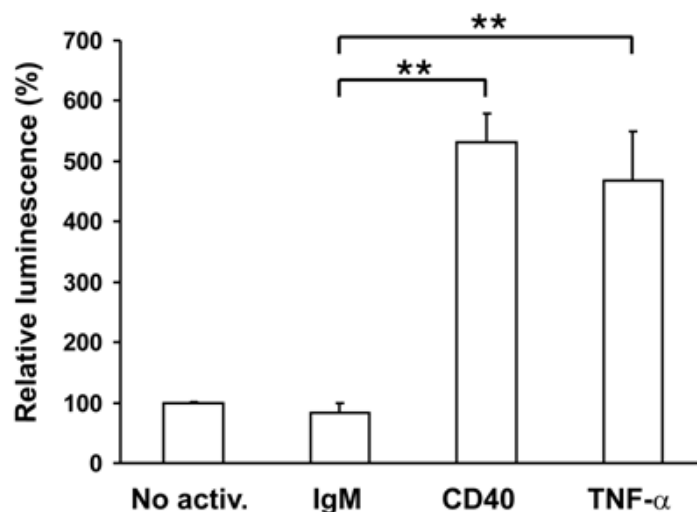


Figura 6. O receptor do CD40 é ativo funcionalmente, sinalizando através da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. As células NIT-1 foram transfectadas com 1.0  $\mu$ g do plasmídeo repórter pNF $\kappa$ B-luc e 0,5  $\mu$ g do plasmídeo controle expressando a luciferase da renilla. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram estimuladas com o anticorpo contra CD40 ou o anticorpo controle de isotipo (IgM) por 2 h. Como controle positivo, as células NIT-1 foram ativadas com o TNF- $\alpha$ . A atividade da luciferase foi determinada como descrita nos “Métodos” e expressa como a razão da atividade da luciferase do vaga-lume com respeito à da renilla. Os resultados são mostrados como uma percentagem relativa ao controle, onde a atividade da luciferase nos lisados de células transfectadas não ativadas foi escolhida como 100%. Os valores são expressos como média  $\pm$  D.P.; \* $P$  < 0.05 versus células estimuladas com IgM. São mostrados dados representativos de quatro experimentos.

## Discussão

No presente estudo demonstramos que o CD40 é expresso em ilhotas humanas e de camundongo e nas células de insulinoma NIT-1. Pela RT-PCR obtivemos amplicons de CD40 de células beta humanas, ilhotas purificadas de NOD e C57BL/6 e células NIT-1. O CD40 também foi expresso a nível protéico como demonstrado pela imuno-histoquímica e imunofluorescência.

A co-localização observada com insulina indica que o CD40 é expresso pelas células beta nas linhagens de camundongo estudadas e também em humanos. A falta de co-localização do CD40 com o glucagon em cortes de tecidos pancreáticos de camundongos sugerem que as células alfa não expressam o CD40.

Nós utilizamos a citometria de fluxo para demonstrar que, consistente com a sua função de receptor, o CD40 está presente na superfície celular. Isto foi mostrado tanto para ilhotas de camundongo como humanas. De acordo com os dados da imunofluorescência dupla, a coloração na superfície foi observada em preparações de células humanas altamente enriquecidas em células beta com o NG.

A expressão do CD40 foi aumentada pela incubação das ilhotas com um coquetel de citocinas que já foram associadas com o dano celular na auto-imunidade. A observação da expressão do CD40 nas células beta pancreáticas humanas é modulado pelas citocinas corrobora dados de um trabalho anterior publicado por Cardozo e col. (37) descrevendo o CD40 como um dos genes ativados por citocinas em células beta primárias de rato. Adicionalmente, nossos dados em células NIT-1 sugerem que as células pancreáticas expressam um receptor de CD40 que é funcional, cuja ativação resulta na ativação do NF- $\kappa$ B. Essa é uma consequência bem conhecida da sinalização do CD40. De fato, o CD40 e

outros membros da família do TNFR não possuem atividade intrínseca de quinase na cauda citoplasmática, mas propagam os sinais pela associação com fatores associados ao TNFR (uma família de proteínas adaptadoras) (14) que ativam os fatores de transcrição NF-kB e AP-1.

Foi recentemente relatado que o CD40 é expresso por células do ducto pancreático em humanos, mas não em ilhotas quando a expressão foi analisada por imuno-histoquímica em cortes pancreáticas (24). Nossos dados demonstrando a expressão do CD40 em células humanas beta após o isolamento (avaliadas por RT-PCR, imunofluorescência dupla de ilhotas isoladas e citometria de fluxo) sugerem que a expressão do CD40 em células beta humanas pode ser induzida pela manipulação associada ao processo de isolamento das ilhotas. Porém, o CD40 foi expresso de forma constitutiva em ilhotas murinas. Portanto, nossos dados enfatizam uma possível diferença na expressão do CD40 de ilhotas de camundongos e humanos, e sugerem que sua expressão é responsiva a um estímulo específico.

Os achados acima descritos implicam um papel potencialmente importante na expressão do CD40 nas ilhotas tanto em condições fisiológicas como patológicas. Em particular, a resposta das ilhotas humanas às citocinas sugere que o CD40 poderia ter um papel significativo durante condições inflamatórias como o desenvolvimento do diabetes auto-imune ou na área dos transplantes. Tal vez a expressão do CD40 possa ter um papel similar ao de moléculas co-estimuladoras. Por exemplo, a expressão transgênica da molécula co-estimuladora B7-1 na superfície das células beta resulta na aceleração do diabetes em camundongos NOD (38, 39). Camundongos transgênicos expressando B7-1 e a glicoproteína do vírus linfocítico coriomeningítico (LCMV) nas ilhotas e tendo células T

com um receptor com especificidade pela glicoproteína desenvolvem diabetes auto-imune após exposição ao LCMV (40). Camundongos expressando B7-1 e as moléculas do HLA-DQ associados a um risco aumentado para o desenvolvimento do diabetes, também desenvolvem diabetes auto-imune (41). É possível portanto que a expressão constitutiva e seletiva do CD40 na superfície das células beta possa contribuir à auto-imunidade suprindo sinais co-estimuladores aos linfócitos que se infiltram. De acordo com nossos achados, a inibição da diabetes espontânea relatada nos camundongos NOD tratados com o anticorpo anti-CD154 (anti-CD40L) (12) pode ser explicada tanto como resultado do bloqueio das APCs mas também pelo bloqueio das células beta. Do mesmo modo, o bloqueio da via do CD40 promove a sobrevivência do aloenxerto de ilhotas em modelos de transplante em roedores (42), e esse efeito poderia ser parcialmente dependente do bloqueio da sinalização do CD40 em células beta.

Estudos adicionais serão necessários para determinar o papel em potencial do CD40 como mediador de sinais inflamatórios. Camundongos nocaute para o CD40 têm sido gerados (43), e esses camundongos são deficientes na função do CD40 em todas as células que expressam o CD40. Portanto, esses camundongos não são apropriados para estudar seletivamente os efeitos da expressão do CD40 e sua inibição em células beta e imune. A geração de camundongos nocaute que seletivamente não expressem o CD40 em ilhotas ou células derivadas da medula óssea e acasalados com camundongos NOD será necessário para caracterizar melhor o papel funcional da expressão do CD40 em células beta pancreáticas, um fenômeno que ainda não havia sido descrito.

## **Agradecimentos**

Agradecemos ao Dr. S. Jayaraman pela leitura crítica do manuscrito. Este trabalho foi financiado pela Diabetes Research Institute Foundation. F.M.B.T. é financiada pela fundação brasileira CAPES. Nos agradecemos a Imaging Core Facility da University of Miami, parcialmente auxiliada pela Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF), por permitir o acesso ao microscópio confocal.

## Referências

1. Armitage, R.J., Fanslow, W.C., Strockbine, L., Sato, T.A., Clifford, K.N., Macduff, B.M., Anderson, D.M., Gimpel, S.D., Davis-Smith, T., Maliszewski, C.R., et al. 1992. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357:80-82.
2. Hollenbaugh, D., Grosmaire, L.S., Kullas, C.D., Chalupny, N.J., Braesch-Andersen, S., Noelle, R.J., Stamenkovic, I., Ledbetter, J.A., and Aruffo, A. 1992. The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *Embo J* 11:4313-4321.
3. Stamenkovic, I., Clark, E.A., and Seed, B. 1989. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *Embo J* 8:1403-1410.
4. Grewal, I.S., and Flavell, R.A. 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 16:111-135.
5. Klaus, S.J., Berberich, I., Shu, G., and Clark, E.A. 1994. CD40 and its ligand in the regulation of humoral immunity. *Semin Immunol* 6:279-286.
6. Yang, Y., and Wilson, J.M. 1996. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 273:1862-1864.
7. Lenschow, D.J., Walunas, T.L., and Bluestone, J.A. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233-258.
8. Kenyon, N.S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranuncoli, A., Oliveira, M., Wagner, J.L., Kirk, A.D., Harlan, D.M., Burkly, L.C., and Ricordi, C. 1999. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8132-8137.
9. Kirk, A.D., Harlan, D.M., Armstrong, N.N., Davis, T.A., Dong, Y., Gray, G.S., Hong, X., Thomas, D., Fechner, J.H., Jr., and Knechtle, S.J. 1997. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8789-8794.
10. Larsen, C.P., Alexander, D.Z., Hollenbaugh, D., Elwood, E.T., Ritchie, S.C., Aruffo, A., Hendrix, R., and Pearson, T.C. 1996. CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway. *Transplantation* 61:4-9.
11. Parker, D.C., Greiner, D.L., Phillips, N.E., Appel, M.C., Steele, A.W., Durie, F.H., Noelle, R.J., Mordes, J.P., and Rossini, A.A. 1995. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9560-9564.
12. Balasa, B., Krahl, T., Patstone, G., Lee, J., Tisch, R., McDevitt, H.O., and Sarvetnick, N. 1997. CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 159:4620-4627.
13. Mohan, C., Shi, Y., Laman, J.D., and Datta, S.K. 1995. Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *J Immunol* 154:1470-1480.
14. van Kooten, C., and Banchereau, J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67:2-17.
15. Calderhead, D.M., Kosaka, Y., Manning, E.M., and Noelle, R.J. 2000. CD40-CD154 interactions in B-cell signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 245:73-99.
16. Rathmell, J.C., Townsend, S.E., Xu, J.C., Flavell, R.A., and Goodnow, C.C. 1996. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 87:319-329.
17. Wagner, D.H., Jr., Vaitaitis, G., Sanderson, R., Poulin, M., Dobbs, C., and Haskins, K. 2002. Expression of CD40 identifies a unique pathogenic T cell population in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3782-3787.
18. Karmann, K., Hughes, C.C., Schechner, J., Fanslow, W.C., and Pober, J.S. 1995. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4342-4346.
19. Galy, A.H., and Spits, H. 1992. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol* 149:775-782.
20. Tan, J., Town, T., Mori, T., Obregon, D., Wu, Y., DelleDonne, A., Rojiani, A., Crawford, F., Flavell, R.A., and Mullan, M. 2002. CD40 is expressed and functional on neuronal cells. *Embo J* 21:643-652.
21. Smith, T.J., Sciaky, D., Phipps, R.P., and Jennings, T.A. 1999. CD40 expression in human thyroid tissue: evidence for involvement of multiple cell types in autoimmune and neoplastic diseases. *Thyroid* 9:749-755.

22. Sugimoto, K., Shiraki, K., Ito, T., Fujikawa, K., Takase, K., Tameda, Y., Moriyama, M., and Nakano, T. 1999. Expression of functional CD40 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 30:920-926.
23. Hess, S., and Engelmann, H. 1996. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J Exp Med* 183:159-167.
24. Vosters, O., Beuneu, C., Nagy, N., Movahedi, B., Aksoy, E., Salmon, I., Pipeleers, D., Goldman, M., and Verhasselt, V. 2004. CD40 expression on human pancreatic duct cells: role in nuclear factor-kappa B activation and production of pro-inflammatory cytokines. *Diabetologia* 47:660-668.
25. Ghia, P., Boussiotis, V.A., Schultze, J.L., Cardoso, A.A., Dorfman, D.M., Gribben, J.G., Freedman, A.S., and Nadler, L.M. 1998. Unbalanced expression of bcl-2 family proteins in follicular lymphoma: contribution of CD40 signaling in promoting survival. *Blood* 91:244-251.
26. Hess, S., Gottfried, E., Smola, H., Grunwald, U., Schuchmann, M., and Engelmann, H. 1998. CD40 induces resistance to TNF-mediated apoptosis in a fibroblast cell line. *Eur J Immunol* 28:3594-3604.
27. Gallagher, N.J., Eliopoulos, A.G., Agathangelo, A., Oates, J., Crocker, J., and Young, L.S. 2002. CD40 activation in epithelial ovarian carcinoma cells modulates growth, apoptosis, and cytokine secretion. *Mol Pathol* 55:110-120.
28. Wingett, D.G., Vestal, R.E., Forcier, K., Hadjokas, N., and Nielson, C.P. 1998. CD40 is functionally expressed on human breast carcinomas: variable inducibility by cytokines and enhancement of Fas-mediated apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 50:27-36.
29. Chao, M.V. 1994. The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 25:1373-1385.
30. Kanaka-Gantenbein, C., Dicou, E., Czernichow, P., and Scharfmann, R. 1995. Presence of nerve growth factor and its receptors in an in vitro model of islet cell development: implication in normal islet morphogenesis. *Endocrinology* 136:3154-3162.
31. Nadeau, S., and Rivest, S. 1999. Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. *Neuroscience* 93:1449-1464.
32. Scharfmann, R., Tazi, A., Polak, M., Kanaka, C., and Czernichow, P. 1993. Expression of functional nerve growth factor receptors in pancreatic beta-cell lines and fetal rat islets in primary culture. *Diabetes* 42:1829-1836.
33. Stephens, L.A., Thomas, H.E., Ming, L., Grell, M., Darwiche, R., Volodin, L., and Kay, T.W. 1999. Tumor necrosis factor-alpha-activated cell death pathways in NIT-1 insulinoma cells and primary pancreatic beta cells. *Endocrinology* 140:3219-3227.
34. Bottino, R., Fernandez, L.A., Ricordi, C., Lehmann, R., Tsan, M.F., Oliver, R., and Inverardi, L. 1998. Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes* 47:316-323.
35. Ricordi, C., and Strom, T.B. 2004. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. *Nat Rev Immunol* 4:259-268.
36. Ricordi, C., Lacy, P.E., Finke, E.H., Olack, B.J., and Scharp, D.W. 1988. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37:413-420.
37. Cardozo, A.K., Heimberg, H., Heremans, Y., Leeman, R., Kutlu, B., Kruhoffer, M., Orntoft, T., and Eizirik, D.L. 2001. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276:48879-48886.
38. Wong, F.S., Visintin, I., Wen, L., Granata, J., Flavell, R., and Janeway, C.A. 1998. The role of lymphocyte subsets in accelerated diabetes in nonobese diabetic-rat insulin promoter-B7-1 (NOD-RIP-B7-1) mice. *J Exp Med* 187:1985-1993.
39. Wong, S., Guerder, S., Visintin, I., Reich, E.P., Swenson, K.E., Flavell, R.A., and Janeway, C.A., Jr. 1995. Expression of the co-stimulator molecule B7-1 in pancreatic beta-cells accelerates diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 44:326-329.
40. Harlan, D.M., Hengartner, H., Huang, M.L., Kang, Y.H., Abe, R., Moreadith, R.W., Pircher, H., Gray, G.S., Ohashi, P.S., Freeman, G.J., et al. 1994. Mice expressing both B7-1 and viral glycoprotein on pancreatic beta cells along with glycoprotein-specific transgenic T cells develop diabetes due to a breakdown of T-lymphocyte unresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3137-3141.
41. Wen, L., Wong, F.S., Tang, J., Chen, N.Y., Altieri, M., David, C., Flavell, R., and Sherwin, R. 2000. In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes. *J Exp Med* 191:97-104.

42. Phillips, N.E., Markees, T.G., Mordes, J.P., Greiner, D.L., and Rossini, A.A. 2003. Blockade of CD40-mediated signaling is sufficient for inducing islet but not skin transplantation tolerance. *J Immunol* 170:3015-3023.
43. Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Kikutani, H. 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1:167-178.



## TRABALHO 2

### **Sinalização do CD40 na linhagem de células $\beta$ NIT-1 e conseqüências após a ativação.**

Florencia M. Barbé-Tuana, Dagmar Klein, Camillo Ricordi, Ricardo L. Pastori.

Diabetes Research Institute, University of Miami Leonard M. Miller School of Medicine.

Por favor, correspondência para:

R.L. Pastori, Ph.D.

Diabetes Research Institute

University of Miami School of Medicine

1450 NW 10th Avenue, Miami, FL 33136, USA

Tel: (305) 243-5349

Fax: (305) 243-4404

Endereço e-mail: [rpastori@med.miami.edu](mailto:rpastori@med.miami.edu)

**Abreviações não padronizadas:** equivalente de ilhotas (IEQ); proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK); quinase extracelular ativada por mitógeno (MEK); quinase regulada extracelularmente (ERK); fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B); proteína quinase ativada por stress (SAPK).

## Resumo

O CD40 é um membro da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), expresso em células hematopoiéticas e não hematopoiéticas. Recentemente demonstramos a expressão do CD40 em ilhotas de Langerhans isoladas de camundongos e humanos, mais especificamente nas células  $\beta$ , e também na linhagem de células  $\beta$  de insulinoma de camundongo NIT-1. O CD40 é uma proteína transmembrana. Porém, a cauda citoplasmática do CD40 não apresenta atividade quinase. A sinalização é realizada através da interação de diferentes proteínas adaptadoras no citoplasma celular que podem levar à sobrevivência celular ou à indução da apoptose. Utilizando a linhagem celular NIT-1, nós investigamos a via de transdução de sinais do CD40 em células  $\beta$ . Observamos que a sinalização no CD40 é realizada através das vias NF- $\kappa$ B e Raf/MEK/ERK1/2. A exposição das NIT-1 ao anticorpo agonista de CD40 induz a expressão do TNF- $\alpha$  no nível de mRNA. Adicionalmente, a exposição das células ao CD40 junto com uma citocina pró-inflamatória, o TNF- $\alpha$ , aumenta de forma sinérgica a expressão do TNF- $\alpha$ , assim como também a indução de apoptose. Em resumo, nossos resultados revelam as vias de sinalização através do CD40 em células NIT-1, e evidenciam o efeito sinérgico do CD40 com o TNF- $\alpha$  em um ambiente inflamatório.

**Palavras chave:** CD40, Diabetes Mellitus, ERK, MAPK, MEK, NF- $\kappa$ B, sinalização, TNF- $\alpha$ .

## Introdução

O CD40 é um membro da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). Inicialmente considerado expresso somente em células do sistema imune, como linfócitos B, macrófagos e células apresentadoras de antígeno profissionais (APC) (1), o CD40 também é expresso em células não imunes (2-8). Recentemente, demonstramos a expressão do CD40 em ilhotas de Langerhans de camundongos e humanos, mais especificamente nas células  $\beta$ , assim como também na linhagem de células  $\beta$  de insulinooma de camundongo NIT-1 (9).

A estimulação do CD40 pelo seu ligante, o ligante CD40 (CD40L) também chamado CD154, tem um papel importante na ativação do sistema imune induzindo a sobrevivência, proliferação e diferenciação dos linfócitos B (10, 11) e troca de isotipo (12). Adicionalmente, a ativação do CD40 em neurônios primários submetidos à privação de soro é capaz de resgatar as células da morte celular (7), e contrariamente, em linhagens celulares de carcinoma, está envolvido na morte celular por apoptose (13). Mais ainda, vias de ativação do CD40 antagonistas têm sido descritas em macrófagos infectados por *Leishmania* (14).

A ação dupla do CD40 em uma pletera de células imunes e não imunes implica uma plasticidade de interações desta molécula com diferentes moléculas adaptadoras de sinalização no citoplasma dessas células. O CD40 não apresenta atividade quinase intrínseca, e a sinalização é realizada pela interação do seu domínio citoplásmico com moléculas adaptadoras denominadas fatores associados ao TNFR (TRAFs) (15-21). Essas moléculas adaptadoras acoplam a ativação do CD40 com mediadores iniciais que ativam um sistema comum de segundos mensageiros a vários receptores que agem de forma

conjunta transduzindo sinais através das vias de sinalização das proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK) (13, 22, 23) e o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (19). As MAPK (ERK1/2, SAPK/JNK, p38) são proteínas quinases tirosina/treonina, mediadores chave em muitos eventos celulares fundamentais como desenvolvimento, crescimento, inflamação, estresse, e diferenciação entre outros. A cooperação entre as vias de transdução de sinais do CD40 tem sido demonstrada em linfócitos B (7) e monócitos (17). Porém, diferentes conclusões podem ser extraídas de acordo com o tipo celular e/ou o estado de ativação. Além disso, pouco, se sabe da sinalização do CD40 em células  $\beta$  pancreáticas e suas conseqüências após a ativação.

Especificamente demonstramos que na linhagem de células  $\beta$  pancreáticas NIT-1, a estimulação do CD40 ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B e a via de sinalização MEK1/2-ERK1/2. Adicionalmente, a ativação do CD40 induz o aumento da expressão do TNF- $\alpha$ , e agindo de forma conjunta com o TNF- $\alpha$ , aumenta o efeito de morte celular programada ou apoptose.

## Métodos

**Cultura de células e transfecção.** Células NIT-1 com poucos repiques (American Type Culture Collection CRL 2055, Manassas, VA) foram mantidas em meio F12/K (Gibco-BRL, Carlsbad, CA) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino dializado (Gibco-BRL). Quando necessário, as células foram dissociadas com uma solução não enzimática (Gibco-BRL) e repicadas.

Para as transfecções,  $5.0 \times 10^5$  células foram semeadas em uma placa de 6 poças com fundo plano. Após 24 h, as células foram transfectadas de forma transitória com o plasmídeo pRIEGFP que contém o promotor passível de indução pela insulina que dirige a expressão da proteína verde fluorescente aumentada (EGFP). A transfecção foi realizada utilizando o reagente Fugene 6 (Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN) na razão de 3:1 de lipossomos ao DNA. Após 24 h, as células foram incubadas por 1 ou 6 h a 37 °C, na presença do anticorpo monoclonal (mAb) agonista contra o CD40 murino (HM40-3, 10 µg/ml, B&D Biosciences, San Diego, CA). Após o tempo desejado, as células foram coletadas, lavadas com a solução tampão fosfato salina de Dulbecco (DPBS, Cellgro Mediatech, Inc. Herndon, VA) suplementada com 0.2 % albumina bovina sérica (BSA, Sigma-Aldrich) e imediatamente adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton-Dickinson Immunocytometry System, Braintree, MA).

**Análise de imunoblot e ensaio da atividade quinase.** As células NIT-1 ( $1 \times 10^6$ ) foram semeadas em placa de 6 poças. Vinte-e-quatro horas depois, foram tratadas com o mAb de camundongo anti-CD40 (HM40-3, 10 µg/ml, BD Biosciences) pelo tempo especificado a 37 °C. Seguidamente, a ativação foi suspensa pela lavagem das células com DPBS. Para os *western blots*, o lisado celular total foi preparado pela raspagem das

células em 40 µl de 1 x tampão de amostra com SDS (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% w/v SDS, 10 % glicerol, 50 mM DTT, 0.01 % azul de bromofenol). O extrato protéico foi separado em géis de SDS-PAGE 10-12%, e subseqüentemente transferidos a membranas de PVDF ou nitrocelulose. Todos os materiais utilizados para a SDS-PAGE e blot foram adquiridos da Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). As membranas foram incubadas com anticorpos específicos (1:1.000) para o IκBα total e fosforilado IκBα nas Ser32 e Ser36; MEK1/2 total e MEK1/2 fosforilado nas Ser217/221; ERK 1/2 total e ERK 1/2 fosforilado nas Thr202/Tyr204; p38 total e p38 fosforilado nas Thr180/Tyr182, AKT total e AKT fosforilado na Ser473; SAPK/JNK total e fosforilado na Thr183/Tyr185, sinapsina-1 fosforilada na Ser9 (Cell Signaling Technology, Inc. Beverly, MA), e β actina (1:5.000, Santa Cruz Biotechnology, CA). Como anticorpos secundários foram utilizados anticorpos IgG anti-camundongo ou anti-coelho conjugados à peroxidase da raiz forte (1:25.000, Amersham Pharmacia, San Francisco, CA). A detecção das bandas específicas foi realizada pela utilização do kit de quimiluminescência ECL (Amersham Pharmacia). Os inibidores da fosforilação do MEK1/2 e IκB, PD98059 (50 µM, Cell Signaling Technology) e Bay117082 (1-10 µM, Biomol Int. L.P., Plymouth Meeting, PA), respectivamente, foram adicionados às células 1 h antes e durante o tratamento.

Para a atividade da quinase ERK1/2, a enzima duplamente fosforilada ativa, foi imunoprecipitada a partir de extratos previamente ativados ou não com o anticorpo anti-CD40 (HM40-3) por 12 h, e o ensaio foi realizado de acordo às instruções do fabricante (Non radioactive ERK1/2 kinase activity, Cell Signaling Technology).

**Ensaio de secreção da insulina.** A secreção da insulina em as células NIT-1 foi medida em culturas estáticas utilizando o tampão de Krebs Ringer HEPES suplementado

com inibidores de protease (10 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% BSA, 130 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 1.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub> e 2.2 mM glicose).

As células foram pré-tratadas por 30 min a 37 °C com o anticorpo contra o CD40, e estimuladas por 45 min com 22mM de glicose com ou sem o mAb CD40. Os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 12.000 rpm e estocados a -20 °C até que o conteúdo de insulina foi determinado pela ELISA (Mouse insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). As amostras foram normalizadas para o conteúdo celular total de proteína (BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, IL).

**Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase.** As células NIT-1 foram tratadas com o mAb anti-CD40 por 2 h e subsequentemente incubadas com o TNF- $\alpha$  recombinante murino (10<sup>6</sup> U/l, Roche Diagnostics Corporation) por 6 h. Alternativamente, as células foram previamente tratadas por 1 h com PD98059 (50  $\mu$ M, Cell Signaling Technology) ou Bay117082 (5  $\mu$ M, Biomol). O RNA total foi isolado de 1.0 x 10<sup>6</sup> células com um kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen Inc, Valencia, CA), submetidas à digestão pela DNase I (Ambion, Austin, Texas) e usadas como molde para a síntese do cDNA (Superscript first-strand synthesis system for RT-PCR, Invitrogen). Iniciadores específicos foram desenhados para o TNF- $\alpha$  de camundongo. A amplificação da  $\beta$  actina (5'-GACTACCTCATGAAGATCC-3' e 5'-TCTCCTTCTGCATCCTGTC-3') foi utilizada como controle interno. Os produtos da PCR foram separados em um gel de agarose ao 3% (Invitrogen), corados com EtBr e analisados sob luz UV.

**Ensaio de viabilidade celular.** Para avaliar a viabilidade, as células NIT-1 foram semeadas a uma concentração de 3.0 x 10<sup>4</sup> células em cada poça de uma microplaca.

Após 24 h, o mAb anti-camundongo ou o anticorpo antiisotipo controle (IgM, clone G235-1, 10 µg/ml, BD Biosciences), junto com a proteína G (2 µg/ml) foram adicionados por 2 h. Para determinar o efeito da ativação do CD40, as células foram subsequentemente incubadas com o TNF- $\alpha$  (10<sup>6</sup> U/l, Roche Diagnostics Corporation) por 48 h. O ensaio de proliferação foi medido utilizando o kit MTS/PMS (Non-radioactive cell proliferation assay, Promega Corporation, Madison, WI) de acordo às instruções do fabricante. A proliferação foi quantificada utilizando um leitor de placas de ELISA e a absorbância a 490 nm foi registrada. As unidades de absorbância foram expressas relativas à absorbância das células tratadas com o antiisotipo não tratadas com o TNF- $\alpha$ .

**Determinação de nitritos.** Após 48 h, 50 µl do sobrenadante de células não tratadas ou tratadas com o CD40, TNF- $\alpha$ , ou CD40+TNF- $\alpha$  foi coletado para a determinação dos nitritos utilizando o reagente de Greiss (Promega Corporation). A absorbância foi medida a 550 nm.

**Ensaio de detecção da apoptose.** A apoptose foi avaliada utilizando o método descrito por S. Jayaraman (24) de detecção intracelular das caspases ativadas (IDAC). Basicamente, as células foram tratadas com o anticorpo agonista anti-CD40, TNF- $\alpha$  ou a combinação de ambos como mencionados anteriormente. Após 48 h de incubação, o sobrenadante contendo as células já liberadas foi coletado junto com as células dissociadas. Após a lavagem com DPBS-BSA, as células foram incubadas com 10 µM do pan-inibidor de caspases fluoro-metil-cetona benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoro-metil-cerone (FITC-VAD-FMK, Promega Corporation), por 45 min a 37 °C. As células foram lavadas, resuspendidas em DPBS-BSA com 10 µg/ml de iodeto de propídeo (PI, Roche Diagnostics Corporation) e adquiridas por citometria de fluxo (Becton-Dickinson).



Para bloquear a apoptose, as células tratadas com CD40+TNF- $\alpha$  foram pré-incubadas com 100  $\mu$ M de Z-VAD(O-Me)-FMK por 45 min antes da indução da apoptose. A apoptose das células adquiridas (10,000 eventos) foi analisada com o programa CellQuestPro.

**Análise estatística.** Os dados paramétricos estão apresentados como média aritmética  $\pm$  D.S. As comparações entre grupos foram realizadas utilizando ANOVA de uma via e o método de Dunnett's para contrastes posteriores com o programa estatístico Sigma-Stat 2. Os valores de  $P < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Quando apropriado, os resultados foram analisados pelo teste t de Student.

## Resultados

**Ação do fator nuclear  $\kappa$ B na ativação do CD40.** O NF- $\kappa$ B tem sido indicado como mediador de sinais que ocorrem após a ativação de membros da superfamília de TNF, como TNF- $\alpha$  e CD40, em diferentes sistemas celulares. Para examinar se o NF- $\kappa$ B está envolvido na transdução de sinais após a estimulação do CD40 na linhagem de células  $\beta$  de insulinoma NIT-1, a fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$  e a degradação do I $\kappa$ B $\alpha$  total foram examinadas por western blot. A estimulação das células NIT-1 com o anticorpo agonista contra o CD40 induziu um aumento da forma ativa do I $\kappa$ B $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilado) de forma tempo-dependente, atingindo o máximo de fosforilação após 10 minutos. Em paralelo com a fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$ , *hallmark* da ativação para o NF- $\kappa$ B, a degradação do I $\kappa$ B $\alpha$  total foi aparente após 5 minutos de estímulo (Figura 1, A e B). Mais ainda, a fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$  foi inibida de forma concentração-dependente quando as células NIT-1 foram pré-incubadas com o inibidor da fosforilação do I $\kappa$ B, Bay117082, antes da ativação do CD40 (Figura 1C). Esses resultados sugerem que a ativação do NF- $\kappa$ B é necessária para induzir a estimulação do CD40 nas células NIT-1, e está de acordo com nossos resultados prévios (9).

**O CD40 sinaliza pelas vias das MAPK MEK1/2 e ERK1/2, mas não p38 ou SAPK/JNK nas células NIT-1.** Para determinar o impacto da transdução de sinais do CD40 nas células  $\beta$ , nós tentamos identificar quais das MAPK estavam envolvidas após a ligação do CD40. Examinamos a ativação do MEK1/2 induzida pelo CD40 de forma tempo-dependente nas células NIT-1. A fosforilação do MEK1/2 foi detectada após 5 minutos de ativação, e persistiu após 30 minutos (Figura 2, A e B).

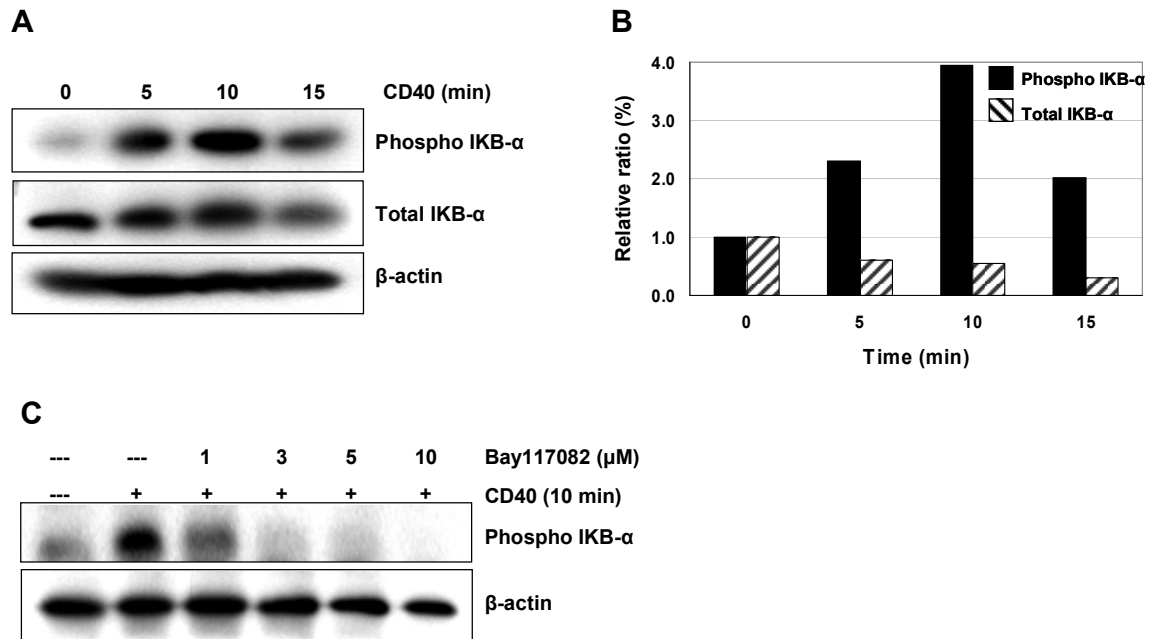


Figura 1. A estimulação do CD40 envolve a ativação do fator nuclear  $\kappa$ B. Extratos totais de células NIT-1 tratados com o anticorpo agonista (HM40-3, 10  $\mu$ g/ml) por 0, 5, 10 ou 15 min foram separados pela técnica de SDS-PAGE ao 10 % e subsequentemente transferidos a membrana de PVDF. As membranas foram incubadas com anticorpos contra: A) I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilado (superior), I $\kappa$ B $\alpha$  total (meio), ou  $\beta$  actina (inferior). B) O gráfico representa a razão da densitometria das bandas do I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilado relativo à  $\beta$  actina (barras pretas) ou I $\kappa$ B $\alpha$  total relativo à actina (barras listradas) utilizando o programa Fluorchem. C) As células NIT-1 foram incubadas com o inibidor da fosforilação do I $\kappa$ B $\alpha$  Bay117082 em diferentes concentrações 1 h antes e durante a ativação com o anticorpo contra CD40 por 10 min. O I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilado (superior), foi analisado por western blotting. Para garantir a mesma quantidade de proteína, as membranas foram lavadas, e incubadas novamente com anticorpos contra a  $\beta$  actina.

Como as MEK1 e MEK2 foram achadas com alta atividade ou na sua forma fosforilada e essas duas quinases fosforilam ERK1 e ERK2 (p44/42), nós quisemos determinar se os sinais transduzidos pelo CD40 que ativam ERK1/2 eram dependentes de MEK1/2. Por tanto, para avaliar os efeitos de MEK1/2 na fosforilação de ERK1/2, os extratos protéicos de células NIT-1 ativadas com o CD40, ou pré-tratadas com o inibidor de MEK PD98059, foram incubadas com anticorpos contra as proteínas fosforilada ou

fosforilada/não fosforilada (total) de ERK1/2. A análise da fosforilação de ERK1/2 mostra que a ligação do CD40 resultou no aumento da forma fosforilada de ERK1/2 após 5 min do tratamento e declinou ao longo do tempo (Figura 2C). Esse efeito foi eliminado quando as células foram pré-incubadas com o inibidor de MEK1/2 PD98059, sugerindo que a sinalização do CD40 contribui à ativação do ERK1/2 através do MEK1/2 (Figura 2D). Utilizando Elk-1 como substrato de fosforilação e a enzima ativa ERK1/2, duplamente fosforilada e imunoprecipitada, confirmamos a atividade quinase de ERK1/2 nas células NIT-1 após ativação do CD40 (Figura 2E).

Nós também investigamos se o CD40 induz a ativação das MAP quinases p38 ou SAPK/JNK MAP envolvidas no estresse celular. Em nossos experimentos, não observamos ativação dessas quinases (dados não mostrados).

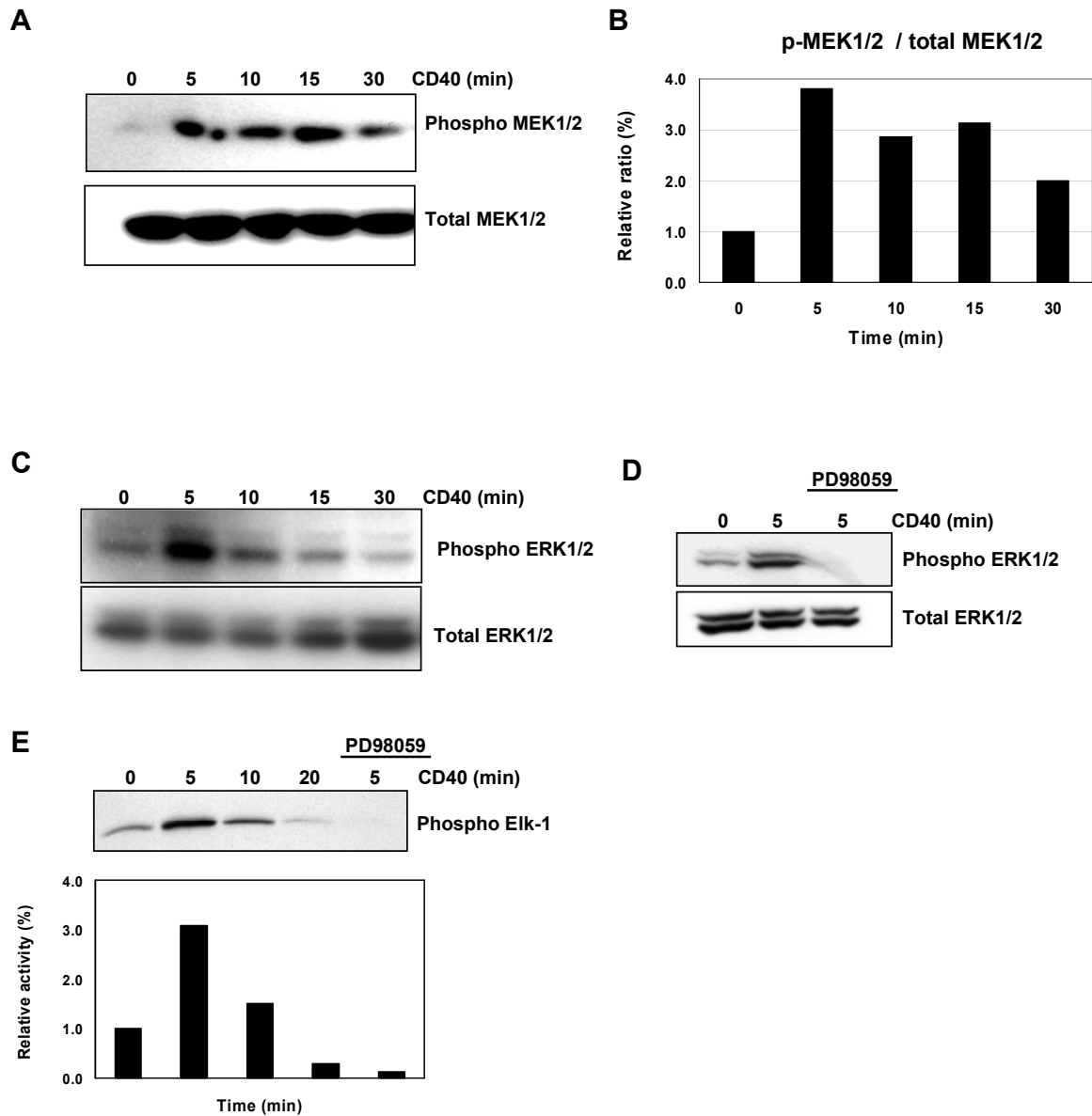


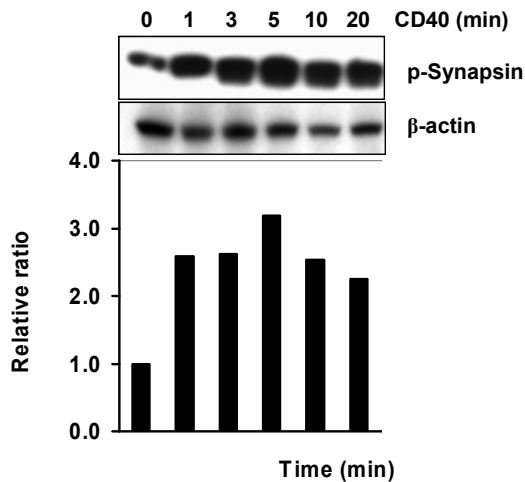
Figura 2. A ligação da molécula do CD40 envolve a ativação das quinases MEK e ERK1/2. Extratos totais de células NIT-1 tratados com o anticorpo agonista anti-CD40 (10 µg/ml) por 0, 5, 10, 15 ou 30 min foram separados pela técnica de SDS-PAGE ao 12 % e subsequentemente transferidos a membrana de PVDF. As membranas foram incubadas com anticorpos contra: A) MEK1/2 fosforilado (superior) ou MEK1/2 total (inferior). B) O gráfico representa a razão da densitometria das bandas do MEK1/2 fosforilado relativo ao MEK1/2 total utilizando o programa Fluorchem. C) Extratos totais de células NIT-1 tratados com o anticorpo agonista anti-CD40 por 0, 5, 10, 15 ou 30 min foram separados pela técnica de SDS-PAGE ao 10 % e subsequentemente transferidos a membrana de PVDF. As membranas foram incubadas com anticorpos contra: ERK1/2 fosforilado (superior) ou ERK1/2 total (inferior). D) Extratos totais de células NIT-1 tratados com o anticorpo agonista anti-CD40 por 0 ou 5 min ou pré-tratados com o

inibidor de MEK1/2 PD98059 (50  $\mu$ M) por 1 h e logo incubadas por 5 min com o anti-CD40 foram separadas pela SDS-PAGE ao 10 % e subsequentemente transferidos a membrana de PVDF. As membranas foram incubadas com anticorpos contra: ERK1/2 fosforilado (superior) ou ERK1/2 total (inferior). E) Para a realização do ensaio da quinase, as células NIT-1 foram estimuladas com o anti-CD40 por 0, 5, 10, 15 e 30 min antes da lise celular. A enzima ativa foi imunoprecipitada, separada em gel de poliacrilamida, transferida a membrana de nitrocelulose e incubada com o seu substrato, Elk-1. A atividade da quinase ERK1/2 foi quantificada utilizando o programa Fluorchem.

**A sinalização do CD40 não interage com a via da insulina.** Uma característica especializada das células  $\beta$  é a sua responsividade à glicose. Da mesma forma, como a via ERK está envolvida na secreção da insulina (25, 26), tentamos determinar se a ativação de ERK dependente do CD40 poderia também afetar a regulação da insulina. Realizamos análise por western blot para avaliar duas importantes proteínas ativas durante o metabolismo da insulina. A primeira, inositol fosfatidil 3-quinase (PI-3K), foi examinada utilizando um anticorpo específico para a proteína Akt/PKB fosforilada, uma quinase que se encontra ativada após o PI-3K. Porém, não foi detectada ativação após estimulação do CD40 nas células NIT-1 (dados não mostrados). A segunda, uma proteína associada a vesículas presente na maquinaria exocítica de neurônios e também identificada nas células  $\beta$  denominada sinapsina I (27). Células NIT-1 estimuladas com o CD40 mostraram um aumento da forma fosforilada da sinapsina I já aparente após 1 min de ativação e sustenta por pelo menos 20 min (Figura 3A). Adicionalmente, avaliamos a secreção de insulina induzida pela glicose em células NIT-1 incubadas no tampão de Krebs na presença do anticorpo anti-CD40. Como controle, as células NIT-1 foram incubadas somente no tampão de Krebs. A secreção de insulina foi analisada por ELISA. Porém, a incubação das células NIT-1 com o anti-CD40 não afetou a secreção de insulina (dados não mostrados).

Nós também transfectamos células NIT-1 com um plasmídeo expressando a EGFP sob controle do promotor de rato inducível (RIP). As células transfectadas com o plasmídeo pRIPEGFP foram incubadas na presença do anticorpo anti-CD40 por 1 ou 6 h, subsequentemente dissociadas e analisadas por citometria de fluxo. De acordo com os resultados de secreção de insulina, não houve diferença na expressão entre as células ativadas com o CD40 (Figura 3B). Esses resultados mostram que embora a estimulação do CD40 contribui com a ativação da sinapsina I, a sinalização do CD40 não afeta a secreção da insulina nas células NIT-1.

**A**



**B**

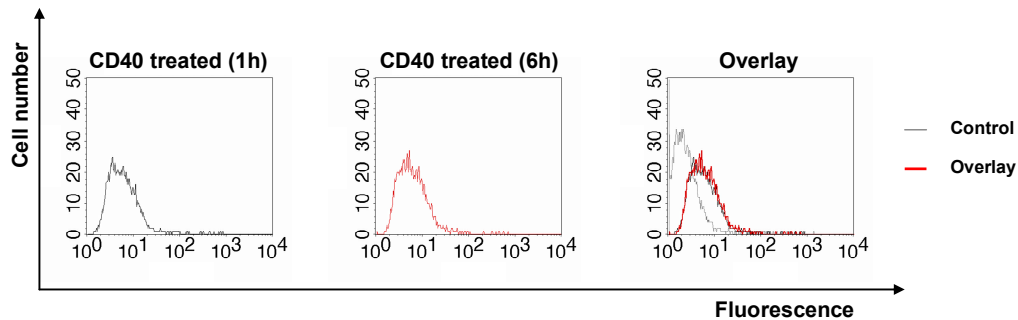


Figura 3. As vias de sinalização do CD40 e da insulina não interagem. Extratos totais de células NIT-1 tratados com o anticorpo agonista anti-CD40 (10  $\mu$ g/ml) por 0, 1, 3, 5, 10, e 20 min foram separados

pela SDS-PAGE ao 12 % e subsequentemente transferidos a membrana de PVDF. As membranas foram incubadas com anticorpos contra: sinapsina I fosforilada (superior) ou  $\beta$  actina (inferior). O gráfico representa a razão da densitometria das bandas da sinapsina I fosforilada relativo à  $\beta$  actina utilizando o programa Fluorchem. B) As células NIT-1 foram semeadas, e transfectadas com o plasmídeo pRIPEGFP. Após 24 h, as células foram ativadas com o anti-CD40 por 1 ou 6 h. As células foram dissociadas e adquiridas por citometria de fluxo.

**Efeito de indução de morte celular do CD40 + TNF- $\alpha$  é sinérgico e dependente de apoptose.** TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que tem sido reportada como mediadora do dano celular às ilhotas durante o curso da diabetes auto-imune (16). TNF- $\alpha$  é também capaz de promover morte celular em ilhotas primárias, células NIT-1 (28), e células  $\beta$  (29) in vitro. Nós incubamos células NIT-1 com o anticorpo anti-CD40, TNF- $\alpha$ , ou com a combinação de ambos (Figura 4A). Enquanto a estimulação do CD40 *per se* não afetou a sobrevivência das células NIT-1, a exposição das células ao TNF- $\alpha$  e ao anticorpo anti-CD40 resultou no aumento da morte celular, quando comparado ao tratamento somente com o TNF- $\alpha$ ,  $58.2 \pm 5.6$  e  $43.7 \pm 4.0$ , respectivamente ( $p < 0.001$ ). Para determinar se a morte celular era consequência de necrose ou morte celular programada (apoptose), nós realizamos ensaios adicionais. Para avaliar a possibilidade de que a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) estivesse sendo induzida pelo tratamento com CD40+TNF- $\alpha$ , a determinação dos nitritos foi acessada no sobrenadante das células em cultura. Não detectamos a presença de NO nas células NIT-1 tratadas após 48 h em cultura (dados não mostrados).

Finalmente, como a maioria das formas de apoptose envolvem caspases, nós avaliamos a detecção intracelular das caspases (IDAC) por citometria de fluxo. Como mostra a figura 4B e o quadro, o tratamento das células NIT-1 por 48 h com CD40+TNF- $\alpha$  ativa as caspases, as quais são responsáveis pelo aumento na percentagem



das células apoptóticas quando comparadas com as células tratadas somente com o CD40 de  $15.3 \pm 1.4\%$  para  $60.6 \pm 6.5\%$ , respectivamente ( $P < 0.001$ ). Para confirmar que esse tratamento induziu apoptose de uma forma caspase-dependente, as células tratadas com a combinação de CD40+TNF- $\alpha$ , foram previamente incubadas com 100  $\mu\text{M}$  do pan-inibidor de caspases zVAD-OMe-FMK. A figura 4B e o requadro mostram que a pré-incubação com esse inibidor elimina a apoptose dependente de CD40+TNF- $\alpha$ . A percentagem de células apoptóticas nas células tratadas com o zVAD-OMe-FMK foi similar às não tratadas, ou tratadas somente com o CD40,  $12.2 \pm 1.4\%$ ,  $15.8 \pm 2.2\%$  e  $15.3 \pm 1.4\%$ , respectivamente ( $P > 0.05$ ).

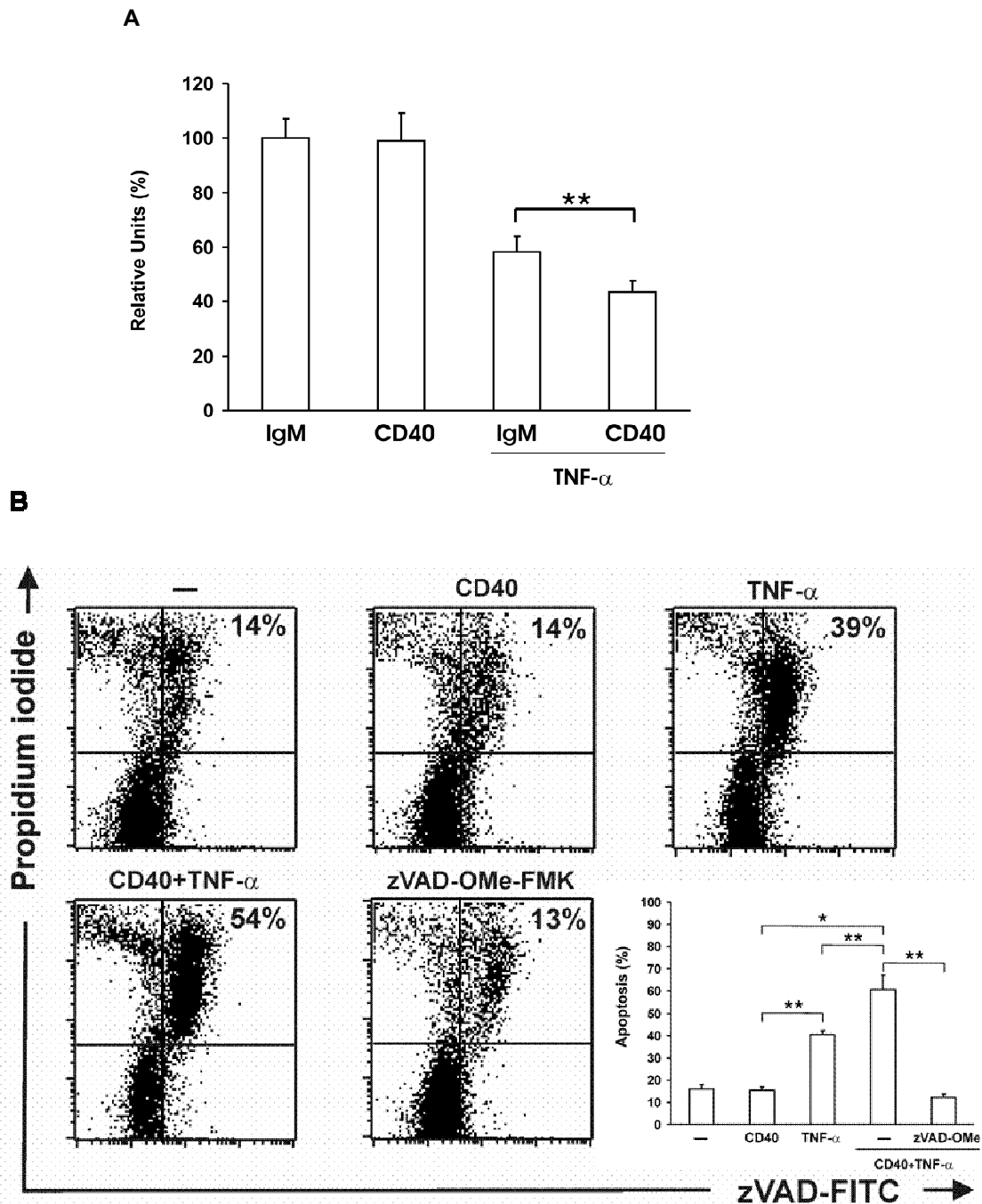


Figura 4. A ativação do CD40 aumenta a apoptose induzida pelo TNF- $\alpha$ . A) As células NIT-1 foram estimuladas com o anticorpo anti-CD40 ou o isotipo controle (IgM) por 2 h, e ainda incubadas por 48 h com o TNF- $\alpha$  ( $10^6$  U/l). A percentagem de células viáveis foi determinada utilizando um ensaio de proliferação não radioativo. As unidades de absorbância são expressas relativas ao controle de células tratadas de forma exclusiva com o isotipo controle IgM. Os valores são expressos como média  $\pm$  D.P. \*\*  $P < 0.001$ . B) As células NIT-1 foram analisadas por citometria de fluxo para a apoptose pela análise da coloração com zVAD-FITC e PI, como explicado nos métodos. Como controle, as células tratadas com

CD40 + TNF- $\alpha$  foram incubadas com o inibidor antes da indução. No requadro, o gráfico representa a porcentagem de células apoptóticas expressas como média  $\pm$  D.P., \*\* P< 0.001, \* P< 0.05.

**A indução de morte celular do CD40+TNF- $\alpha$  é dependente da superexpressão de TNF- $\alpha$  dependente das vias ERK1/2 e NF- $\kappa$ B.** Nós investigamos conseqüências na expressão gênica decorrentes da ativação por CD40+TNF- $\alpha$  nas células NIT-1 a nível de mRNA. A ativação das células NIT-1 com o CD40 ou TNF- $\alpha$  induziu a expressão do TNF- $\alpha$  (Figura 5). Porém, a expressão do TNF- $\alpha$  foi ainda mais pronunciada quando as células foram incubadas simultaneamente com CD40+TNF- $\alpha$ . Esse efeito demonstrou requer a atividade de MEK1/2 e ser dependente da fosforilação de ERK1/2, já que o PD98059 bloqueou completamente a expressão do TNF- $\alpha$  nas células tratadas com CD40+TNF- $\alpha$ . Adicionalmente, o inibidor do NF- $\kappa$ B Bay117082 também bloqueou a expressão do TNF- $\alpha$  nas células estimuladas com CD40+TNF- $\alpha$  (Figura 5).

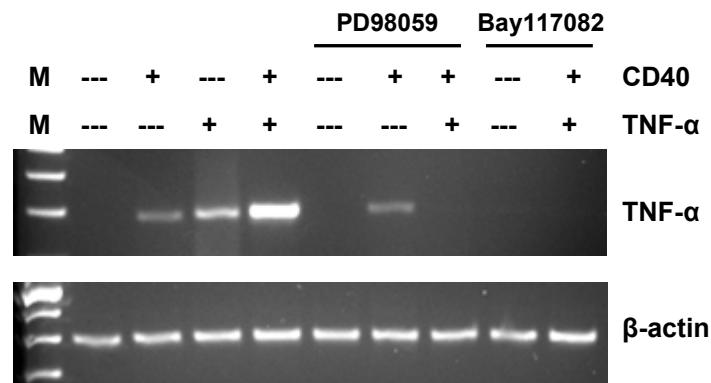


Figura 5. A ativação do CD40 induz a expressão do TNF- $\alpha$ . As células NIT-1 foram estimuladas com o anticorpo anti-CD40 (10  $\mu$ g/ml) por 2 h, e ainda incubadas por 6 h com o TNF- $\alpha$  ( $10^6$  U/l), ou pré-tratados com os inibidores de MEK1/2 PD98059 (50  $\mu$ M) ou NF- $\kappa$ B Bay117082 (5  $\mu$ M) por 1 h e durante o tempo de indução. Após a ativação as células foram coletadas, lavadas duas vezes com DPBS gelado e utilizadas para a RT-PCR. Gel de agarose ao 2 % corado com EtBr mostrando as bandas de TNF- $\alpha$  e  $\beta$  actina. M: marcador de 100 pb.

## Discussão

Diferentes estudos têm identificado vias de sinalização do receptor do CD40 em células hematopoiéticas, como macrófagos e linfócitos, onde tem sido implicado na administração de sinais envolvendo uma resposta imune celular (17). Uma grande quantidade de dados sustentam a hipótese de que a sinalização do CD40 pode contribuir em condições patológicas auto-imunes como em psoríase, aterosclerose ou fibrose cística (30-32). De fato, a importância do CD40 é bem reconhecida no campo do transplante onde, a disrupção da interação CD40-CD40L por anticorpos contra o CD40L inibem o desenvolvimento espontâneo do diabetes em camundongos NOD (33), e prolongam a sobrevivência de aloenxerto de ilhotas em primatas não humanos (34, 35), na ausência de drogas imunossupressoras convencionais.

O CD40 age como um transdutor de sinais transmembrana que, através da ativação de quinases intracelulares, induz sinais desde o citoplasma ao núcleo. Recentemente, observamos que o receptor do CD40 é expresso em células pancreáticas  $\beta$  de camundongos e humanos, assim como também na linhagem de células  $\beta$  de camundongo NIT-1 (9). Em concordância com esses resultados, nós agora demonstramos que a estimulação do CD40 induz uma rápida ativação da molécula NF- $\kappa$ B pela degradação de seu inibidor natural I $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição envolvido na ativação de muitas citocinas pro-inflamatórias e membros da superfamília de TNF. A ativação do NF- $\kappa$ B foi inibida quando as células NIT-1 foram pré-incubadas com o bloqueador Bay117082, o que sugere que a via do NF- $\kappa$ B estaria envolvida na sinalização do CD40. Em células primárias ou terminalmente diferenciadas como as células  $\beta$ , a ativação do NF- $\kappa$ B decorrente da incubação das células com citocinas tem sido

demonstrada como indutor de secreção de novas citocinas inflamatórias com conseqüências negativas para as células  $\beta$  (36-38).

Nossos resultados sugerem que a via MEK1/2/ERK1/2 poderia ser a via principal de ativação após a estimulação do CD40 na linhagem celular de camundongos NIT-1.

Nós evidenciamos que a secreção da citocina pro-inflamatória TNF- $\alpha$  dependente do CD40 está ligada à ativação do ERK1/2, já que o bloqueio da via MEK/ERK em um nível anterior com o PD98059, inibe completamente a transcrição do TNF- $\alpha$ . Outros estudos utilizando monócitos/macrófagos já têm associado a secreção das citocinas pro-inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  dependente do CD40 à via MEK/ERK (17, 39). Nesse sentido, nós temos dados adicionais (manuscrito em preparação) confirmando o papel central da via MEK/ERK na secreção de citocinas pro-inflamatórias (IL-6, IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$ ) de células pancreáticas  $\beta$  humanas. Porém, a expressão gênica induzida pelo CD40 tem variações entre as diversas células, e essas diferenças podem ser atribuídas ao diferente estado de ativação das células, ao grau de entrecruzamento utilizado para iniciar a sinalização celular ou à variação intrínseca no tipo celular. Nesse sentido, nós não obtivemos ativação da p38 ou SAPK dependentes do CD40, MAPKs que estão presentes nas células pancreáticas (40), confirmando a especificidade dos sinais administrados através do receptor do CD40 na células NIT-1.

Outro objetivo do trabalho foi determinar se nós poderíamos estabelecer uma interação entre a sinalização do CD40 e a liberação de insulina. Nesse sentido, várias aproximações foram realizadas. Nós utilizamos incubação estática para determinar secreção de insulina induzida pela glicose, células NIT-1 transfectadas com o plasmídeo pRIEGFP, ou análise pela técnica de western blot para proteínas envolvidas na

sinalização da glicose, Akt/PKB, para testar a dependência com o CD40. Porém, não conseguimos observar modificações atribuíveis à ativação pelo CD40. Finalmente, nós investigamos a proteína citoplasmática sinapsina I, proteína fisiologicamente relevante durante a translocação e liberação da insulina. Consistente com trabalhos feitos em outros tipos celulares como as linhagens de células  $\beta$  MIN6,  $\beta$ TC3 e INS-1 (25, 26) ou ilhotas de rato, onde a sinapsina I tem sido detectada na sua forma ativa, achamos que a fosforilação foi dependente da ativação mediada pelo CD40. Porém, a fosforilação da sinapsina I decorrente da sinalização do CD40 não parece modular o metabolismo da insulina nas células NIT-1.

A ativação de CD40 *per se* não induziu morte celular ou apoptose nas células NIT-1. Porém, quando as células foram incubadas com o TNF- $\alpha$ , esse tratamento foi capaz de aumentar a sensibilidade das células à apoptose. Assim como em outros sistemas (28, 41), a co-incubação do CD40 com outra citocina, nesse caso o TNF- $\alpha$ , aumentou a indução de apoptose dependente do TNF- $\alpha$ . De acordo a Stephens et al. (28) existe uma discrepância entre as células  $\beta$  primárias e as linhagens de células  $\beta$  nas sua suscetibilidade à indução de apoptose pelo TNF- $\alpha$ . Embora a linhagem de células  $\beta$  NIT-1 seja sensível à apoptose dependente do TNF- $\alpha$ , as células primárias  $\beta$  não o são, e precisam de IL-1 $\beta$  para a indução da morte celular por apoptose. Contudo, dados recentes da literatura sugerem que de fato células  $\beta$  primárias de humanos podem morrer por apoptose parcialmente dependente da secreção do TNF- $\alpha$  proveniente de meio condicionado por IL-1 $\beta$  de células do ducto pancreático (29). Tentando construir um modelo *in vitro* que imitasse o mecanismo de dano celular, baixas concentrações de TNF- $\alpha$  foram adicionadas de forma exógena às células NIT-1 que tinham sido previamente

tratadas com o anti-CD40. Os resultados de nossos ensaios de viabilidade celular (MTS), necrose (reação de Griess) e apoptose são comparáveis e confirmam que o efeito tóxico de indução de morte celular pela adição do CD40+TNF- $\alpha$  é majoritariamente dependente da apoptose. De acordo com isto, a incubação das células NIT-1 tratadas com CD40+TNF- $\alpha$  com o pan-inibidor de caspases zVAD-FMK reduziu a morte celular e sugerem que a apoptose é a via dominante envolvida na morte celular induzida pela ativação do CD40 nas células NIT-1. Esse efeito sinérgico foi correlacionado com o aumento da expressão do TNF- $\alpha$  em nível do mRNA. Nossos resultados mostram que a acumulação do TNF- $\alpha$  foi induzida tanto pelo CD40 como pelo TNF- $\alpha$ , e essa expressão foi ainda mais pronunciada quando as células NIT-1 foram ativadas com o CD40 e o TNF- $\alpha$  juntos, agindo através das vias NF- $\kappa$ B e MEK/ERK.

Em conclusão, nossos dados sugerem mecanismos de sinalização do CD40 nas células NIT-1. Demonstramos que o fator nuclear NF- $\kappa$ B está envolvido na sinalização através do CD40, que a via MEK/ERK é a cascata principal de sinalização ativada após a estimulação do CD40, e que a associação do CD40 com uma citocina pro-inflamatória, como o TNF- $\alpha$ , pode induzir morte celular por apoptose.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi financiado pela Diabetes Research Institute Foundation e a Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF). F.M.B.T. é financiada pela fundação brasileira CAPES.

## Referências

1. Grewal, I.S., and Flavell, R.A. 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 16:111-135.
2. Galy, A.H., and Spits, H. 1992. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol* 149:775-782.
3. Hess, S., and Engelmann, H. 1996. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J Exp Med* 183:159-167.
4. Karmann, K., Hughes, C.C., Schechner, J., Fanslow, W.C., and Pober, J.S. 1995. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4342-4346.
5. Smith, T.J., Sciaky, D., Phipps, R.P., and Jennings, T.A. 1999. CD40 expression in human thyroid tissue: evidence for involvement of multiple cell types in autoimmune and neoplastic diseases. *Thyroid* 9:749-755.
6. Sugimoto, K., Shiraki, K., Ito, T., Fujikawa, K., Takase, K., Tameda, Y., Moriyama, M., and Nakano, T. 1999. Expression of functional CD40 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 30:920-926.
7. Dadgostar, H., Zarnegar, B., Hoffmann, A., Qin, X.F., Truong, U., Rao, G., Baltimore, D., and Cheng, G. 2002. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1497-1502.
8. Vosters, O., Beuneu, C., Nagy, N., Movahedi, B., Aksoy, E., Salmon, I., Pipeleers, D., Goldman, M., and Verhasselt, V. 2004. CD40 expression on human pancreatic duct cells: role in nuclear factor-kappa B activation and production of pro-inflammatory cytokines. *Diabetologia* 47:660-668.
9. Klein, D., Barbe-Tuana, F., Pugliese, A., Ichii, H., Garza, D., Gonzalez, M., Molano, R.D., Ricordi, C., and Pastori, R.L. 2005. A functional CD40 receptor is expressed in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 48:268-276.
10. Calderhead, D.M., Kosaka, Y., Manning, E.M., and Noelle, R.J. 2000. CD40-CD154 interactions in B-cell signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 245:73-99.
11. van Kooten, C., and Banchereau, J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67:2-17.
12. Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Kikutani, H. 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1:167-178.
13. Davies, C.C., Mason, J., Wakelam, M.J., Young, L.S., and Eliopoulos, A.G. 2004. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and ERK MAPK-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of CD40 ligation in carcinoma cells. *J Biol Chem* 279:1010-1019.
14. Mathur, R.K., Awasthi, A., Wadhone, P., Ramanamurthy, B., and Saha, B. 2004. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nat Med* 10:540-544.
15. Eliopoulos, A.G., Davies, C., Knox, P.G., Gallagher, N.J., Afford, S.C., Adams, D.H., and Young, L.S. 2000. CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily. *Mol Cell Biol* 20:5503-5515.
16. Green, E.A., and Flavell, R.A. 1999. Tumor necrosis factor-alpha and the progression of diabetes in non-obese diabetic mice. *Immunol Rev* 169:11-22.



17. Pearson, L.L., Castle, B.E., and Kehry, M.R. 2001. CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Int Immunol* 13:273-283.
18. Rothe, M., Xiong, J., Shu, H.B., Williamson, K., Goddard, A., and Goeddel, D.V. 1996. I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8241-8246.
19. Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Azuma, S., Yamamoto, T., and Inoue, J. 1999. Two differently regulated nuclear factor kappaB activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1234-1239.
20. Urbich, C., Mallat, Z., Tedgui, A., Clauss, M., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. 2001. Upregulation of TRAF-3 by shear stress blocks CD40-mediated endothelial activation. *J Clin Invest* 108:1451-1458.
21. Pullen, S.S., Labadia, M.E., Ingraham, R.H., McWhirter, S.M., Everdeen, D.S., Alber, T., Crute, J.J., and Kehry, M.R. 1999. High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry* 38:10168-10177.
22. Davies, C.C., Bem, D., Young, L.S., and Eliopoulos, A.G. 2005. NF-kappaB overrides the apoptotic program of TNF receptor 1 but not CD40 in carcinoma cells. *Cell Signal* 17:729-738.
23. Tan, J., Town, T., Mori, T., Obregon, D., Wu, Y., DelleDonne, A., Rojiani, A., Crawford, F., Flavell, R.A., and Mullan, M. 2002. CD40 is expressed and functional on neuronal cells. *Embo J* 21:643-652.
24. Jayaraman, S. 2003. Intracellular determination of activated caspases (IDAC) by flow cytometry using a pancaspase inhibitor labeled with FITC. *Cytometry A* 56:104-112.
25. Khoo, S., Griffen, S.C., Xia, Y., Baer, R.J., German, M.S., and Cobb, M.H. 2003. Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 278:32969-32977.
26. Longuet, C., Broca, C., Costes, S., Hani el, H., Bataille, D., and Dalle, S. 2005. Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology* 146:643-654.
27. Jacobsson, G., Bean, A.J., Scheller, R.H., Juntti-Berggren, L., Deeney, J.T., Berggren, P.O., and Meister, B. 1994. Identification of synaptic proteins and their isoform mRNAs in compartments of pancreatic endocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12487-12491.
28. Stephens, L.A., Thomas, H.E., Ming, L., Grell, M., Darwiche, R., Volodin, L., and Kay, T.W. 1999. Tumor necrosis factor-alpha-activated cell death pathways in NIT-1 insulinoma cells and primary pancreatic beta cells. *Endocrinology* 140:3219-3227.
29. Movahedi, B., Van de Casteele, M., Caluwe, N., Stange, G., Breckpot, K., Thielemans, K., Vreugdenhil, G., Mathieu, C., and Pipeleers, D. 2004. Human pancreatic duct cells can produce tumour necrosis factor-alpha that damages neighbouring beta cells and activates dendritic cells. *Diabetologia* 47:998-1008.
30. Falco, A., Romano, M., Iapichino, L., Collura, M., and Davi, G. 2004. Increased soluble CD40 ligand levels in cystic fibrosis. *J Thromb Haemost* 2:557-560.
31. Ohta, Y., and Hamada, Y. 2004. In situ Expression of CD40 and CD40 ligand in psoriasis. *Dermatology* 209:21-28.
32. Urbich, C., and Dimmeler, S. 2004. CD40 and vascular inflammation. *Can J Cardiol* 20:681-683.
33. Berney, T., Pileggi, A., Molano, R.D., Poggioli, R., Zahr, E., Ricordi, C., and Inverardi, L. 2003. The effect of simultaneous CD154 and LFA-1 blockade on the survival of allogeneic islet grafts in nonobese diabetic mice. *Transplantation* 76:1669-1674.

34. Balasa, B., Krahl, T., Patstone, G., Lee, J., Tisch, R., McDevitt, H.O., and Sarvetnick, N. 1997. CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 159:4620-4627.
35. Kenyon, N.S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranuncoli, A., Oliveira, M., Wagner, J.L., Kirk, A.D., Harlan, D.M., Burkly, L.C., and Ricordi, C. 1999. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8132-8137.
36. Cardozo, A.K., Heimberg, H., Heremans, Y., Leeman, R., Kutlu, B., Kruhoffer, M., Orntoft, T., and Eizirik, D.L. 2001. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276:48879-48886.
37. Giannoukakis, N., Rudert, W.A., Trucco, M., and Robbins, P.D. 2000. Protection of human islets from the effects of interleukin-1beta by adenoviral gene transfer of an Ikappa B repressor. *J Biol Chem* 275:36509-36513.
38. Heimberg, H., Heremans, Y., Jobin, C., Leemans, R., Cardozo, A.K., Darville, M., and Eizirik, D.L. 2001. Inhibition of cytokine-induced NF-kappaB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kappaB super-repressor prevents beta-cell apoptosis. *Diabetes* 50:2219-2224.
39. Suttles, J., Milhorn, D.M., Miller, R.W., Poe, J.C., Wahl, L.M., and Stout, R.D. 1999. CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an ERK1/2-dependent pathway. A target of interleukin (il)-4 and il-10 anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274:5835-5842.
40. Matsuda, T., Omori, K., Vuong, T., Pascual, M., Valiente, L., Ferreri, K., Todorov, I., Kuroda, Y., Smith, C.V., Kandeel, F., et al. 2005. Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function. *Am J Transplant* 5:484-493.
41. Hess, S., Gottfried, E., Smola, H., Grunwald, U., Schuchmann, M., and Engelmann, H. 1998. CD40 induces resistance to TNF-mediated apoptosis in a fibroblast cell line. *Eur J Immunol* 28:3594-3604.

## TRABALHO 2

### **CD40 signaling in the mouse insulinoma $\beta$ cell line NIT-1 and consequences upon activation.**

Florencia M. Barbé-Tuana, Dagmar Klein, Camillo Ricordi, Ricardo L. Pastori.

Diabetes Research Institute, University of Miami Leonard M. Miller School of Medicine.

Please address correspondence to:

R. L. Pastori, Ph.D.

Diabetes Research Institute

University of Miami Leonard M. Miller School of Medicine

1450 NW 10th Avenue, Miami, FL 33136, USA

Tel: +1 (305) 243-5349

Fax: +1 (305) 243-4404

e-mail address: [rpastori@med.miami.edu](mailto:rpastori@med.miami.edu)

**Nonstandard abbreviations used:** islet equivalent (IEQ); mitogen-activated protein kinases (MAPK); mitogen extracellular kinase (MEK); extracellular regulated kinase (ERK); nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B); stress activated protein kinase (SAPK).

## **Abstract**

CD40 is a tumor necrosis factor receptor (TNFR) family member expressed in hematopoietic as well as non hematopoietic cells. We have recently demonstrated CD40 expression in normal isolated mouse and human pancreatic Langerhans islets, more specifically in the  $\beta$  cells, as well as in the  $\beta$  insulinoma mouse cell line NIT-1. CD40 is a transmembrane protein. However, its cytoplasmic tail does not harbor kinase activity. Signaling is accomplished through the interaction of different adaptor proteins in the cell cytoplasm that can lead to cell survival or induction of apoptosis. Using the NIT-1 cell line, we investigated the signal transduction pathway of CD40 in  $\beta$  cells. We observed that CD40 signaling was accomplished through the NF- $\kappa$ B and the MEK/ERK1/2 pathway. Exposure of NIT-1 cells to the agonist CD40 antibody induced TNF- $\alpha$  expression at the mRNA level. Furthermore, exposure of the cells to CD40 together with a pro-inflammatory cytokine, the TNF- $\alpha$ , were found to synergistically increase TNF- $\alpha$  expression together with the induction of apoptosis. In summary, our results reveal the signaling pathways through CD40 in NIT-1 cells, and evidence the synergistic effect of CD40 with TNF- $\alpha$  in an inflammatory cytokine milieu.

**Keywords:** CD40, diabetes mellitus, ERK, MAPK, MEK, NF- $\kappa$ B, signaling, TNF- $\alpha$ .

## Introduction

CD40 is a tumor necrosis factor receptor (TNFR) family member. Initially believed to be expressed only in immune system cells, like B lymphocytes, macrophages, and professional antigen presenting cells (1), CD40 is also expressed in non-immune cells (2-8). Recently, we have demonstrated CD40 expression in normal isolated mouse and human pancreatic Langerhans islets, more specifically in the  $\beta$  cells, as well as in the  $\beta$  insulinoma mouse cell line NIT-1 (9).

Activation of CD40 in B-lymphocytes by its counter part, the CD40 ligand (CD40L) also called CD154, has a principal role in the activation of the immune system inducing B cell survival and proliferation, differentiation (10, 11) and isotype class switching (12). In addition, activation of CD40 on serum starved primary neuron cells is also capable of rescuing cells from death (7), and contrary, in carcinoma cell lines is involved in cell death through apoptosis (13). Moreover, agonistic pathways of CD40 activation have been described in Leishmania infected macrophages (14)

The dual action of CD40 in a plethora of immune and non-immune cells implies a plastic interaction of this molecule with different signaling adaptor molecules in the cytoplasm of these cells. CD40 lacks intrinsic kinase activity, and signaling is accomplished by the interaction of its cytoplasmic domain with TNFR-associated factors (TRAFs) adaptor proteins (15-21) These adaptor molecules couple CD40 activation with early mediators that activate second messenger systems common to many receptors and act together transducing signals through mitogen-activated protein kinases (MAPK) (13, 22, 23) and the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathways (19). MAPK (ERK1/2, SAPK/JNK, p38) are a group of tyrosin/threonine protein kinases, key mediators of many

fundamental cellular events such as development, growth, inflammation, stress, differentiation among others. Cooperation between CD40-signaling pathways has been shown in B-lymphocytes (7) and in monocytes (17). However, different conclusions can be drawn regarding the cell type and/or status of activation. Moreover, nothing is known about CD40 signaling in pancreatic  $\beta$  cells and its consequence upon activation.

We specifically demonstrate that in the pancreatic  $\beta$  cell line NIT-1, CD40 stimulation activates the transcription factor NF- $\kappa$ B, and the MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway. Additionally, CD40 activation induces TNF- $\alpha$  up-regulation, and acting together with TNF- $\alpha$  enhances the killing effect of TNF- $\alpha$  through apoptosis.

## Methods

**Cell culture and transfection.** NIT-1 from early passages (American Type Culture Collection CRL 2055, Manassas, VA) was cultured in F12/K medium (Gibco-BRL, Carlsbad, CA) supplemented with 10 % (v/v) of dialyzed fetal bovine serum (Gibco-BRL). When necessary, cells were dissociated with a non-enzymatic solution (Gibco-BRL).

For transfections,  $5.0 \times 10^5$  cells were seeded in 6-well flat-bottomed plates. After 24 h, cells were transiently transfected with a reporter plasmid pRIPEGFP that contains an insulin inducible promoter region driving the firefly EGFP expression. Transfection was performed using the Fugene 6 reagent (Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN) with a 3:1 ratio of liposomes to DNA. After 24 hours, cells were incubated for 1 or 6 hours at 37 °C, in the presence of an agonistic anti-mouse CD40 monoclonal antibody (mAb) (HM40-3, 10 µg/ml, B&D Biosciences, San Diego, CA). After the desired time, cells were harvested, washed in cold Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, Cellgro Mediatech, Inc. Herndon, VA) substituted with 0.2 % bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) and immediately acquired in a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson Immunocytometry System, Brea, MA).

**Immunoblot analysis and kinase activity assay.** NIT-1 cells ( $1 \times 10^6$ ) were seeded in a 6 well plate. Twenty-four hours after, cells were treated with the anti-mouse CD40 mAb (HM40-3, 10 µg/ml, BD Biosciences) for the time specified at 37 °C. Activation was stopped by washing the cells with DPBS. For western blots, whole cells lysates were prepared by scraping the cells in 40 µl of 1 x SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% w/v SDS, 10 % glycerol, 50 mM DTT, 0.01 % bromophenol blue).

Protein extracts were separated in a 10 or 12 % SDS-PAGE gel and subsequently transferred to a PVDF or nitrocellulose membrane. All materials for SDS-PAGE and blotting were purchased from Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). Membranes were probed with antibodies (1:1000) specific for I $\kappa$ B $\alpha$  and phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  at Ser32 and Ser36; total MEK1/2 and phosphorylated MEK1/2 at Ser217/221; total ERK 1/2 and phosphorylated ERK1/2 at Thr202/Tyr204; total p38 and phosphorylated p38 at Thr180/Tyr182, total AKT and phosphorylated AKT at Ser473; total and phosphorylated SAPK/JNK at Thr183/Tyr185, phosphorylated synapsin-1 at Ser9 (Cell Signaling Technology, Inc. Beverly, MA), and  $\beta$  actin (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, CA). As secondary antibodies anti-mouse or anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase were purchased from Amersham Pharmacia (San Francisco, CA). Detection of the specific bands was done using the ECL enhanced chemiluminescence kit (Amersham Pharmacia). The MEK1/2 and I $\kappa$ B phosphorylation inhibitors, PD98059 (50  $\mu$ M, Cell Signaling Technology) and Bay117082 (1-10  $\mu$ M, Biomol Int. L.P., Plymouth Meeting, PA), were added to the cells 1 h before and for the duration of the treatment.

For ERK1/2 kinase activity, the dual phosphorylated active enzyme phospho-ERK1/2 was immunoprecipitated from cell extracts incubated or not with the anti-CD40 antibody (HM40-3) for 12 h, and assayed according to manufacturer's instructions (Non radioactive ERK1/2 kinase activity, Cell Signaling Technology).

**Insulin secretion assay.** Insulin secretion from NIT-1 cells was measured in static culture using Krebs Ringer HEPES buffer supplemented with protease inhibitors (10 mM HEPES, pH 7.4, 0.1% BSA, 130 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 1.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM NaHCO<sub>3</sub> and 2.2 mM glucose). Cells were pretreated



for 30 min at 37 °C with the CD40 antibody (HM40-3, 10 ug/ml), and stimulated for 45 min with 22 mM glucose with or without CD40. Supernatants were collected, centrifuged for 10 min at 12,000 rpm and stored at -20 °C until insulin content was determined by ELISA (Mouse insulin ELISA, Mercodia, Uppsala, Sweden). Samples were normalized to total cell protein content (BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, IL).

**Reverse transcriptase and polymerase chain reaction.** NIT-1 cells were treated with anti-mouse CD40 mAb for 2 h and subsequently incubated with recombinant murine TNF- $\alpha$  ( $10^6$  U/l, Roche Diagnostics Corporation) for 6 h. Alternatively, previously pretreated for 1h and during the treatment with PD98059 (50  $\mu$ M, Cell Signaling Technology) or Bay117082 (5  $\mu$ M, Biomol). Total RNA was isolated from  $1.0 \times 10^6$  with a commercial kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen Inc, Valencia, CA), subjected to DNase I digestion (Ambion, Austin, Texas) and used as a template for cDNA synthesis (Superscript first-strand synthesis system for RT-PCR, Invitrogen). Specific primers were designed for mouse TNF- $\alpha$ . Amplification of  $\beta$ -actin (5'-GACTACCTCATGAAGATCC-3' and 5'-TCTCCTTCTGCATCCTGTC-3') was used as an internal control. PCR products were separated in a 3% agarose gel (Invitrogen), stained with EtBr and analyzed under UV light.

**Cell viability assay.** To assess cell viability NIT-1 cells were seeded at an initial number of  $3.0 \times 10^4$  into the wells of a microtiter plate. After 24-hours the anti-mouse CD40 mAb or the isotype-matched antibody (G235-1, 10  $\mu$ g/ml), together with G protein (2  $\mu$ g/ml) were added for 2 h. To determine the effect of the CD40 activation, NIT-1 cells were subsequently incubated with recombinant murine TNF- $\alpha$  ( $10^6$  U/l, Roche Diagnostics Corporation) for 48 h. The proliferation assay was measured using a

MTS/PMS solution kit (Non-radioactive cell proliferation assay, Promega Corporation, Madison, WI) according to the manufacturer recommendations. Proliferation was quantified using an ELISA plate reader and absorbance at 490 nm was recorded. Absorbance units were expressed as relative to the absorbance of the isotype-matched cells not treated with TNF- $\alpha$ .

**Nitrite determination.** After 48 h, 50  $\mu$ l of the supernatant of untreated, CD40, TNF- $\alpha$ , or CD40+TNF- $\alpha$  treated NIT-1 cells was collected for nitrite determination using the Greiss reagent kit (Promega Corporation). Absorbance was measured at 550 nm.

**Apoptosis Detection Assay.** Apoptosis was assessed using the method described by S. Jayaraman (24) of intracellular detection of activated caspases (IDAC). Briefly, cells were treated with the CD40 agonist antibody, TNF- $\alpha$  or the combination of both as mentioned before. After 48 h of incubation, the supernatant of the cells containing the detached cells was collected and NIT-1 cells were dissociated, washed in DPBS-BSA, and incubated with the pan caspase inhibitor fluoro-methyl-ketone benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoro-methyl-kerone (FITC-VAD-FMK, Promega Corporation) 10  $\mu$ M, for 45 min at 37  $^{\circ}$ C. Cells were washed, resuspended in DPBS-BSA with 10  $\mu$ g/ml of propidium iodide (PI, Roche Diagnostics Corporation) and acquired by flow cytometry (Becton-Dickinson). In order to block apoptosis, CD40+TNF- $\alpha$  treated cells were pre-incubated with 100  $\mu$ M of the Z-VAD(O-Me)-FMK for 45 min before apoptosis induction. Apoptosis of acquired cells (10,000 events) was analyzed with the CellQuestPro software.

**Statistical analysis.** Parametric data are shown as the arithmetic mean  $\pm$  S.D. Group comparisons were performed using one-way ANOVA and the Dunnett's method

for posteriori contrasts done with the Sigma-stat 2 software. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant. When appropriate, results were analyzed by Student's t test.

## Results

**Involvement of the nuclear factor  $\kappa$ B in CD40 activation.** The NF- $\kappa$ B has been reported to mediate downstream signaling accomplished by members of the TNF superfamily as TNF- $\alpha$  and CD40 in different cell systems. In order to examine whether NF- $\kappa$ B is involved in the signal transduction pathway after CD40 engagement in the  $\beta$  insulinoma cell line NIT-1, phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  and degradation of total I $\kappa$ B $\alpha$  were examined by western blot. Stimulation of NIT-1 cells with the agonist CD40 antibody induced an increase of the activated form of the I $\kappa$ B $\alpha$  (phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$ ) in a time-dependent manner, reaching the maximum phosphorylation after 10 minutes. In parallel with I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, a hallmark for NF- $\kappa$ B activation, total I $\kappa$ B $\alpha$  degradation was already apparent after 5 minutes of stimulus (Figure 1, A and B). Moreover, I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation was inhibited in a concentration dependent manner when NIT-1 cells were pre-incubated with the phosphorylation inhibitor of I $\kappa$ B, Bay117082, before CD40 activation (Figure 1C). These results suggest that NF- $\kappa$ B activation is necessary to induce CD40 stimulation in NIT-1, and are in agree with our previous results (9).

**CD40 signals via MEK1/2 and ERK1/2 MAPK, but not p38 or SAPK/JNK in NIT-1.** To determine the impact of CD40 signal transduction pathways in  $\beta$  cells, we tried to identify which of the MAPK were involved after CD40 ligation. We examined the activation of MEK1/2 triggered by CD40 in a time dependent manner in NIT-1 cells. Phosphorylation of MEK1/2 was already detected after 5 min of activation, and persisted after 30 min (Figure 2, A and B).

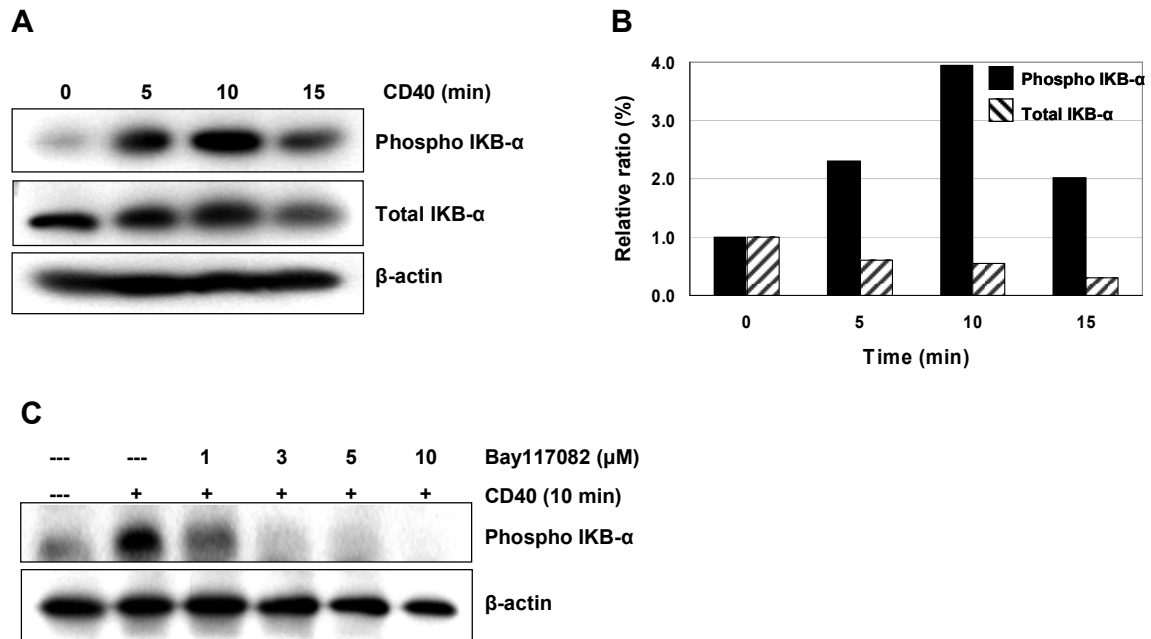


Figure 1. CD40 stimulation involves activation of the nuclear factor  $\kappa$ B. Total cellular extracts from NIT-1 cells treated with the CD40 agonist antibody (10  $\mu$ g/ml) for 0, 5, 10 or 15 min were separated in a 10% SDS-PAGE and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane. Blots were probed with antibodies against: A) phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  (top), total I $\kappa$ B $\alpha$  (middle), or  $\beta$ -actin (bottom). B) Graph represents immunoblots band density ratio of phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  relative to actin (black bars) or total I $\kappa$ B $\alpha$  relative to actin (hatched bars) using the Fluorchem software. C) NIT-1 cells were incubated with the inhibitor of I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation Bay117082 for different concentrations, 1 h before and during activation with the CD40 antibody for 10 min. Phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  (top) was analyzed by western blotting. To ensure equal loading, membranes were stripped and blotted against  $\beta$ -actin.

As MEK1 and MEK2 were found to be in a high activity or phosphorylated form and these two kinases phosphorylates ERK1 and ERK2 (p44/42), we wish to determine whether the signals transduced by CD40 that activates ERK1/2 were MEK1/2 dependent. Thus, to evaluate the effects of the MEK1/2 on ERK1/2 phosphorylation, protein extracts from CD40 activated NIT-1 cells, or pretreated with the MEK inhibitor PD98059, were blotted against phosphorylated or total ERK1/2 antibodies. Analysis of ERK1/2 phosphorylation shows that CD40 ligation resulted in an increased of the ERK1/2

phosphorylated form after 5 min post-treatment and declines over time (Figure 2C). This effect was abrogated when the cells were preincubated with the MEK1/2 inhibitor PD98059, suggesting that CD40 signaling contributes to ERK1/2 activation through MEK1/2 (Figure 2D). We confirmed ERK1/2 kinase activity in NIT-1 stimulated CD40 cells using Elk-1 as a phosphorylation substrate with the dually phosphorylated immunoprecipitated ERK1/2 active enzyme (Figure 2E).

We also assessed whether CD40 engages the p38 or SAPK/JNK MAP kinases involved in cellular stress. In our settings, we could not find any activation of these two kinases (data not shown).

**CD40 signaling does not crosstalk with the insulin pathway.** A specialized feature of  $\beta$  cells is its responsiveness to glucose. Also, as the ERK pathway is involved in insulin secretion (25, 26), we wish to determine whether ERK dependent CD40 activation could also affect insulin regulation. We performed western blot analysis to evaluate two important proteins involved during insulin metabolism. The first one, phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K), was examined using a specific antibody for the phosphorylated Akt/PKB protein, a kinase that is downstream of PI-3K. However, no detectable activation was observed after CD40 stimulation in NIT-1 cells (data not shown). Secondly, a vesicle-associated protein present in the exocytotic machinery of neurons and also identified in pancreatic  $\beta$  cells denominated synapsin I was evaluated

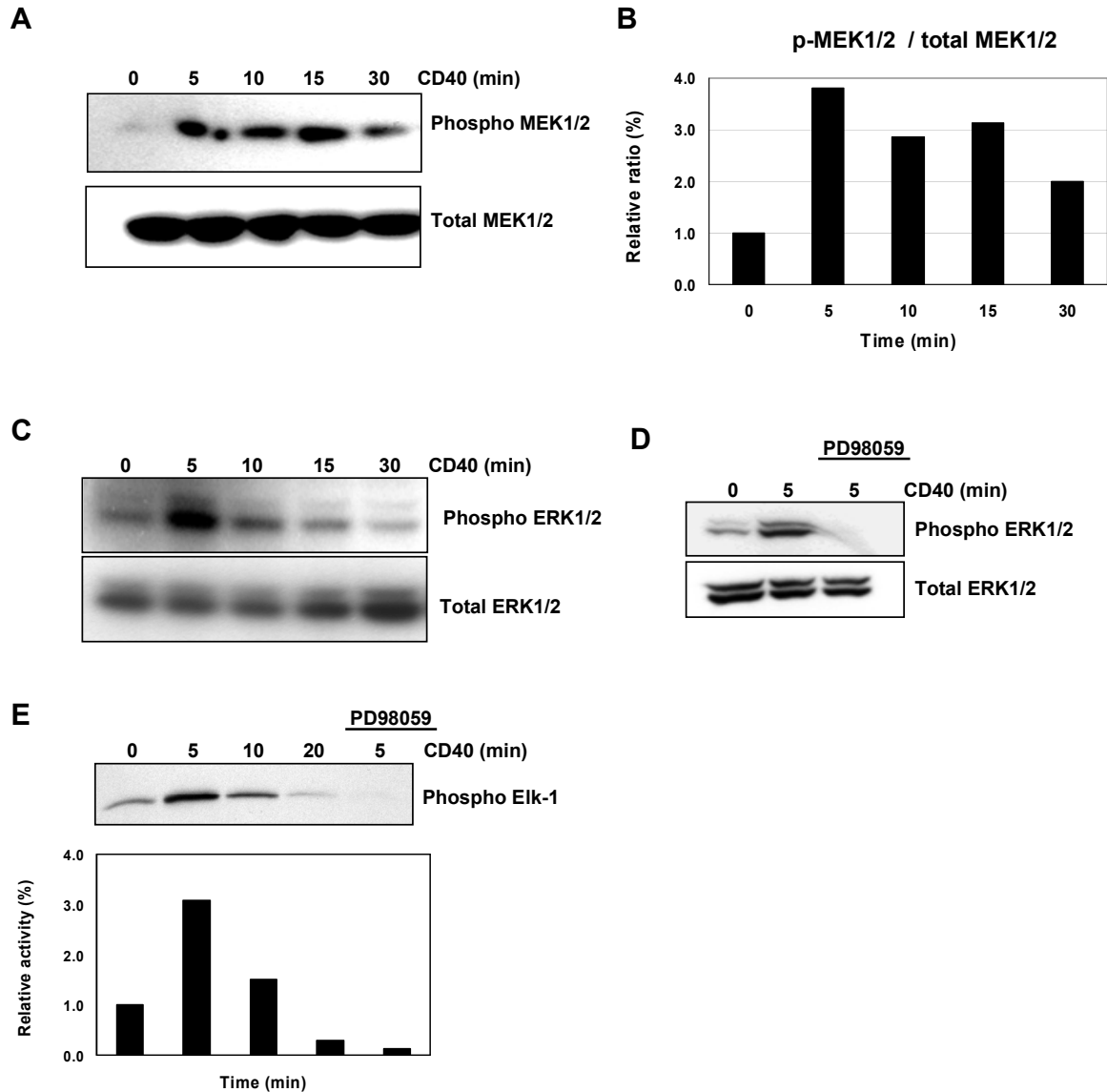


Figure 2. Ligation of the CD40 molecule involves activation of MEK/ERK1/2 kinases. Total cellular extracts from NIT-1 cells treated with the CD40 agonist antibody (10  $\mu$ g/ml) for 0, 5, 10, 15, 30 min were separated in a 12 % SDS-PAGE and subsequently transferred to a PVDF membrane. Blots were probed with antibodies against: A) phosphorylated MEK1/2 (top) or total MEK1/2 (bottom). B) Graph represents immunoblots band density ratio of phosphorylated MEK1/2 relative to total MEK1/2 using the Fluorchem software. C) Total cellular extracts from NIT-1 cells treated with the CD40 agonist antibody (10  $\mu$ g/ml) for 0, 5, 10, 15, or 30 min. were separated in a 10 % SDS-PAGE and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane. Blots were probed with antibodies against phosphorylated ERK1/2 (top) or total ERK1/2 (bottom). D) Total cellular extracts from NIT-1 cells treated with the CD40 agonist antibody (10  $\mu$ g/ml) for 0, 5, or pretreated with the MEK1/2 inhibitor PD98059 (50  $\mu$ M) for 1 h and then incubated for 5 min with the CD40 antibody were separated in a 10 % SDS-PAGE and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane. Blots were probed with antibodies against phosphorylated ERK1/2 (top) or total

ERK1/2 (bottom). E) NIT-1 cells were stimulated with CD40 antibody before lysis, immunoprecipitation, and kinase assay with phosphorylated Elk-1 as a substrate. Kinase activity was quantitated using the Fluorchem software.

(27). CD40 stimulated NIT-1 cells show an increase of the phosphorylated form of synapsin I already after 1 min of activation, and this activation is sustained at least by 20 min (Figure 3A).

Additionally, we assessed glucose induced insulin secretion in NIT-1 cells incubated in Krebs buffer in the presence of the CD40 antibody. As controls, NIT-1 cells were incubated in Krebs buffer alone. Insulin release was analyzed by ELISA. However, incubation of NIT-1 cells with the CD40 antibody did not affect insulin secretion (data not shown).

We also transfected NIT-1 cells with a plasmid expressing EGFP under the control of the rat inducible promoter (RIP). Transfected cells with pRIPEGFP plasmid were incubated in the presence of the CD40 antibody for 1 or 6h and subsequently dissociated and analyzed by flow cytometry. In accordance with insulin secretion results, there was no difference in expression from transfected or control cells activated with CD40 (Figure 3B). These results show that even CD40 stimulation contributes to synapsin I activation; CD40 signaling does not affect insulin secretion in NIT-1 cells.



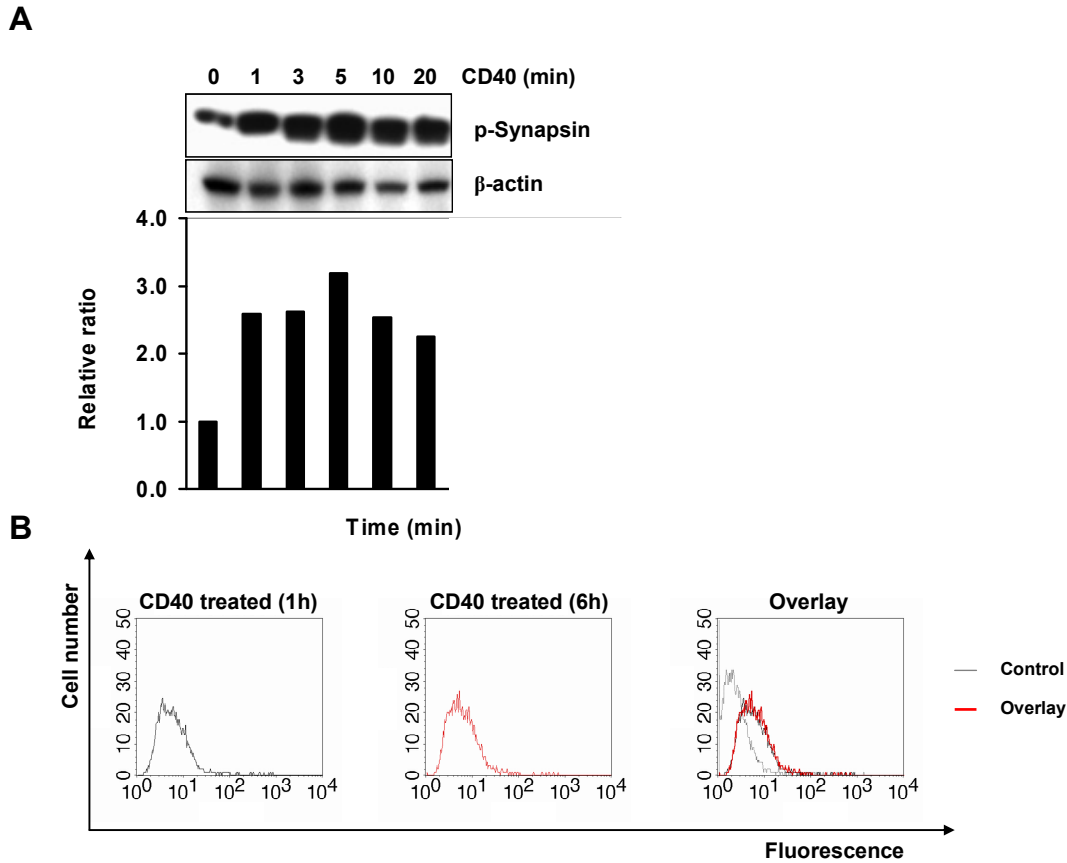


Figure 3. The CD40 and insulin pathway do not cross react. Total cellular extracts from NIT-1 cells treated with the CD40 agonist antibody (10  $\mu\text{g/ml}$ ) for 0, 1, 3, 5, 10, 20 min were separated in a 12 % SDS-PAGE and subsequently transferred to a PVDF membrane. Blots were probed with antibodies against: A) phosphorylated synapsin I (top) or  $\beta$ -actin (bottom). Graph represents immunoblots band density ratio of phosphorylated synapsin I relative to total  $\beta$ -actin using the Fluorchem software. B) NIT-1 cells were plated, and transfected or not with pRIPEGFP plasmid. Twenty-four h later, cells were activated with CD40 antibody (HM40-3, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) for 1 or 6 h. Dissociated cells were acquired by flow cytometry.

**Synergistic killing effect of CD40 + TNF- $\alpha$  is dependent of apoptosis.** TNF- $\alpha$  is a pro-inflammatory cytokine that has been reported to mediate damage to islet cells during the course of autoimmune diabetes (16). TNF- $\alpha$  is also known to promote cell death of primary islets, NIT-1 cells (28), and  $\beta$  cells (29) in vitro. We incubated NIT-1 cells with anti CD40 antibody, TNF- $\alpha$ , and with the combination of the two (Figure 4A). While

stimulation of CD40 alone did not affect NIT-1 cells survival, exposure of these cells to both TNF- $\alpha$  and the CD40 antibody resulted in greater cell death than TNF- $\alpha$  alone,  $58.2 \pm 5.6$  and  $43.7 \pm 4.0$ , respectively ( $P < 0.001$ ). In order to determine if cell death was a consequence of necrosis, or programmed cell death (apoptosis), we performed additional assays. To evaluate the possibility that inducible nitrite oxide synthase (iNOS) was being upregulated by the CD40+TNF- $\alpha$  treatment, nitrite determination was assessed on the supernatant of cultured cells. No NO production was found in NIT-1 treated cells after 48 h of culture (data not shown). Finally, as most forms of apoptosis involve caspases, we evaluated for intracellular detection of activated caspases (IDAC) by flow cytometry. As shown in Figure 4B and inset, CD40+TNF- $\alpha$  treatment activated caspases in NIT-1 cells after 48 h of incubation, which are responsible for increasing the percentage of apoptotic cells comparing to CD40 treated cells ( $60.6 \pm 6.5\%$  -vs-  $15.3 \pm 1.4\%$ ,  $P < 0.001$ ). To confirm that this treatment induced apoptosis in a caspase dependent manner, CD40+TNF- $\alpha$  NIT-1 treated cells, were pre-incubated with 100  $\mu$ M of the pan-caspase inhibitor zVAD-OMe-FMK. Figure 4B and inset shows that pre-incubation with this inhibitor eliminate CD40+TNF- $\alpha$  dependent apoptosis. The percentage of apoptosis in zVAD-OMe-FMK pre-treated cells was similar to untreated or CD40 treated cells,  $12.2 \pm 1.4\%$ ,  $15.8 \pm 2.2\%$  and  $15.3 \pm 1.4\%$ , respectively ( $P > 0.05$ ).

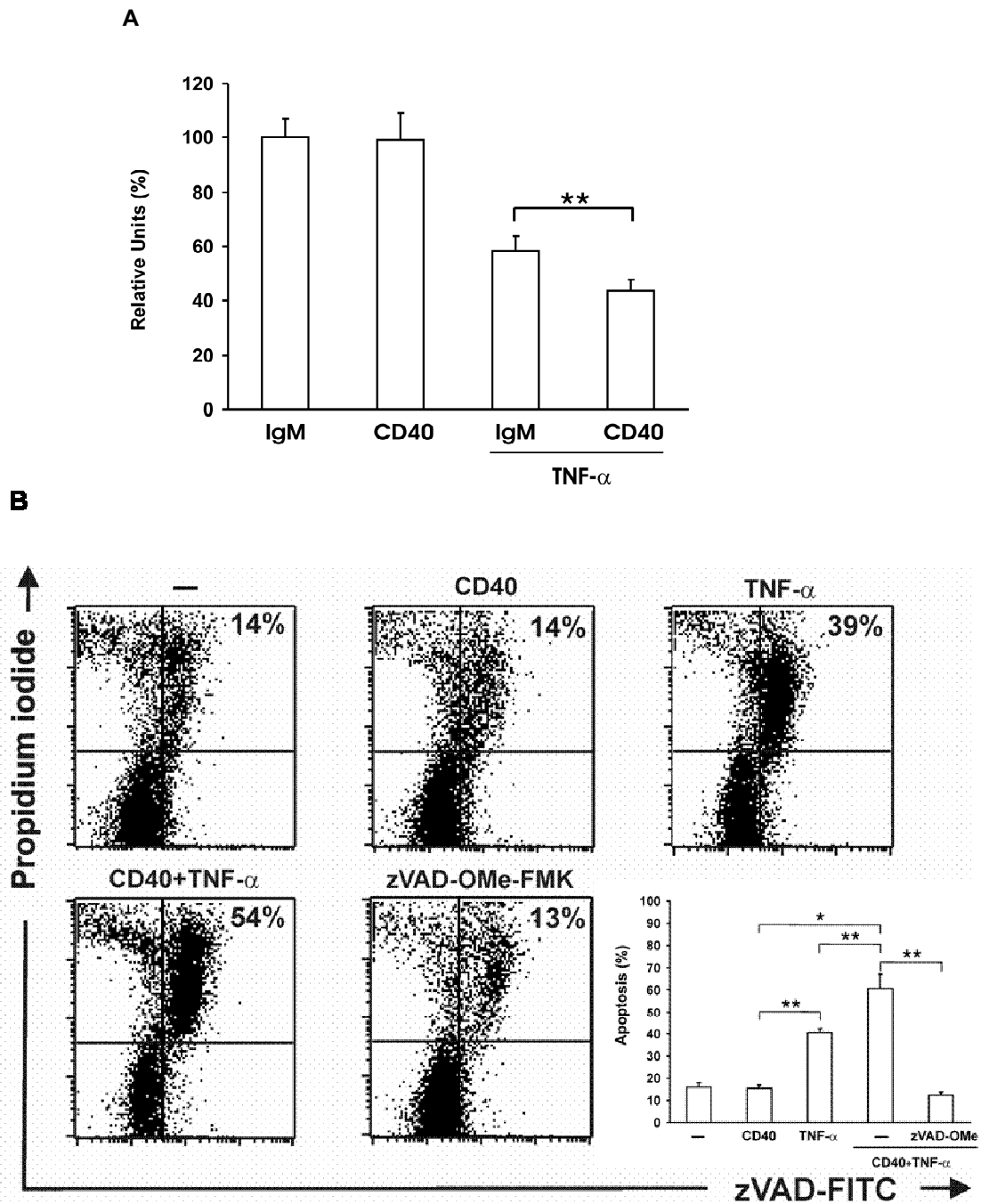


Figure 4. CD40 activation enhances apoptosis induced by TNF- $\alpha$ . A) NIT-1 cells were stimulated with CD40 antibody or the isotype control (IgM) for 2 hours, and further incubated for 48 hours with TNF- $\alpha$  ( $10^6$  U/l). The number of viable cells was determined using a non-radioactive proliferation assay. Absorbance units are expressed relative to the IgM control cells not treated with TNF- $\alpha$ . The values are

expressed as mean  $\pm$  S.D., \*\* P< 0.001. B) NIT-1 cells were analyzed for apoptosis by performing a flow cytometry analysis after staining with zVAD-FITC and PI as explained in materials and methods. As a control, CD40 + TNF- $\alpha$  treated cells were incubated with the zVAD-OMe-FMK inhibitor before the staining. In the inset, graph represents the percentage of apoptotic cells expressed as mean  $\pm$  S.D., \*\* P< 0.001, \* P< 0.05.

**CD40+TNF- $\alpha$  killing effect is dependent on up regulation of TNF- $\alpha$  in an ERK1/2 and NF- $\kappa$ B dependent way.** We then investigated gene expression consequences of CD40+TNF- $\alpha$  activation in NIT-1 cells at the messenger RNA level. Activation of NIT-1 cells with CD40 or TNF- $\alpha$  induced TNF- $\alpha$  expression (Figure 5). However, TNF- $\alpha$  expression was even more pronounced in cells that were simultaneously incubated with CD40+TNF- $\alpha$ . This effect was shown to require MEK1/2 activity and to be dependent on ERK1/2 phosphorylation, as PD98059 completely blocked TNF- $\alpha$  expression from CD40+TNF- $\alpha$  treated cells. Additionally, the NF- $\kappa$ B inhibitor Bay117082 also blocked TNF- $\alpha$  expression in CD40+TNF- $\alpha$  stimulated cells (Figure 5).

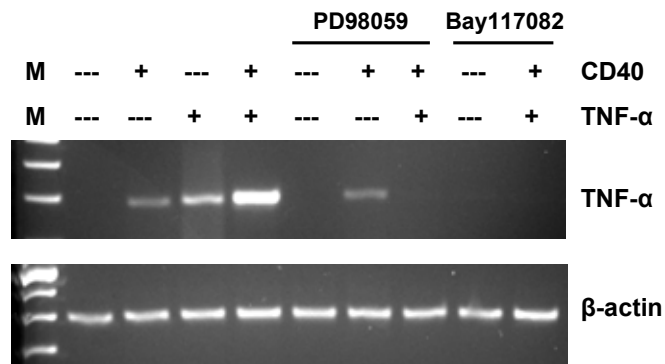


Figure 5. CD40 activation induces TNF- $\alpha$  expression. NIT-1 cells were stimulated with the CD40 antibody (10  $\mu$ g/ml) for 2 hours, and further incubated for 6 hours with TNF- $\alpha$  (106 U/l), or pretreated with the MEK1/2 PD98059 (50  $\mu$ M) or NF- $\kappa$ B Bay117082 (5  $\mu$ M) inhibitors for 1 h. After activation, cells were scraped, washed twice in cold DPBS and subject to RT-PCR. Pictures represent agarose gel electrophoresis of TNF- $\alpha$  and  $\beta$ -actin amplicons. M: marker.

## Discussion

Different studies have identified signaling pathways of the CD40 receptor in hematopoietic cells, as macrophages and lymphocytes, where it has been implicated in the delivery of signals involved in immune cellular responses (17). Large amount of data already support the idea that CD40 signaling can contribute in pathological autoimmune conditions as psoriasis, atherosclerosis and cystic fibrosis (30-32). Indeed, the importance of CD40 is well recognized in the field of transplantation whereas, disruption of the CD40-CD40L interaction by antibodies against CD40L inhibits the spontaneous development of diabetes in non obese diabetic (NOD) mice (33), and prolongs allogeneic islet graft survival in non human primates (34, 35), in the absence of conventional immunosuppressive drugs.

CD40 acts as a transmembrane signal transducer which, through the activation of intracellular kinases, delivers signals from the cytoplasm to the nucleus. Recently, we have observed that the CD40 receptor molecule is expressed in mouse and human pancreatic  $\beta$  cells, as well as the mouse insulinoma  $\beta$  cell line NIT-1 (9). In agree with these results, we now demonstrate by western blot that CD40 stimulation induced rapid activation of the NF- $\kappa$ B molecule by the degradation of its natural inhibitor I $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B is a transcription factor already known to be involved in the activation of many proinflammatory cytokines and TNF superfamily members. CD40 activation was blocked when NIT-1 cells were preincubated with the NF- $\kappa$ B blocker Bay117082, what strongly suggests that NF- $\kappa$ B pathway appear to be linked to regulation of CD40 signaling. In primary cells or terminally differentiated as  $\beta$  cells, NF- $\kappa$ B cytokine activation has also

been shown to induce the secretion of more inflammatory cytokines that can have negative consequences for  $\beta$  cells (36-38).

Our results also suggest that the MEK1/2/ERK1/2 pathway could be the primary MAPK activated upon CD40 stimuli in the mouse insulinoma cell line NIT-1. We provide evidence that CD40 dependent secretion of the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  is linked to ERK1/2 activation, as upstream blocking of the MEK/ERK pathway with PD98059, abolished TNF- $\alpha$  transcription. Other studies have also linked CD40 dependent secretion of the proinflammatory cytokines IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  through the MEK/ERK pathway (17, 39). In this regard, we also have additional data (manuscript in preparation) confirming a central role of the MEK/ERK pathway, in the secretion of proinflammatory cytokines (IL-6, IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\beta$ ) from human pancreatic  $\beta$  cells. However, CD40 regulated gene expression has been quite different among distinct cells, and this difference could be attributed to differently activation of the cells, degree of cross linking employed to initiate CD40 signaling, or variation in cell type. In this regard, we did not obtain CD40-dependent p38 or SAPK activation, MAPKs known to be present in pancreatic cells (40), confirming the specificity of signals delivered through the CD40 receptor in NIT-1 cells.

Another goal of this study was to determine whether we could establish an involvement between CD40 signaling and insulin release. In this regard, several approaches were taken. We use static incubation, pRIEGFP transfected NIT-1 cells, or western blot analysis for a protein involved in insulin signaling, AKT, to test CD40 dependency. However, we could not observe any modification attributable to CD40 activation. Finally, we investigated synapsin I, a cytoplasmic protein physiologically

relevant during insulin translocation and release. Consistent with work done in others cells as MIN6,  $\beta$ TC3 and INS-1  $\beta$  cell lines (25, 26) or rat islet cells, whereas synapsin I has been detected in its active form, we also found ERK1/2 dependent phosphorylation of the cytoplasmic protein synapsin I. However, phosphorylation of synapsin I as a consequence of CD40 signaling does not modulate insulin metabolism in NIT-1 cells.

CD40 activation by itself could not induce cell death or apoptosis in NIT-1. However, when cells were incubated also with TNF- $\alpha$ , this treatment seemed to augment sensitivity of the cells to apoptosis. As well as in other systems (28, 41), co-incubation of CD40 with a cytokine, in this case TNF- $\alpha$ , augments TNF- $\alpha$  induced apoptosis.

According to Stephens et al. (28) a discrepancy between primary  $\beta$  cells and  $\beta$  cell lines exist in their susceptibility to TNF- $\alpha$  induced apoptosis. Even if the  $\beta$  cell line NIT-1 is sensible to TNF- $\alpha$  dependent apoptosis, primary  $\beta$  cells are not, and need IL-1 $\beta$  in order to induce apoptosis dependent cell death. However, recently data from literature suggest that indeed primary human  $\beta$  cells can also die from apoptosis partially dependent on TNF- $\alpha$  secretion from IL-1 $\beta$  conditioned media from pancreatic ductal cells (29).

In order to construct an *in vitro* model that mimics natural mechanism of injury, low amounts of TNF- $\alpha$  were exogenously administered to previously CD40 stimulated NIT-1 cells. Our data from cell viability (MTS), necrosis (Griess reaction) and apoptosis assays are comparable and confirm that the killing effect of CD40+TNF- $\alpha$  is mostly apoptosis dependent. In agreement with this, incubation of CD40+TNF- $\alpha$  treated NIT-1 cells with the pan-caspase inhibitor VAD-FMK abrogated cell death and support the idea that apoptosis is the dominant pathway involved in cell death induced by CD40 activation



in NIT-1 cells. This synergistic effect was correlated with enhancement of TNF- $\alpha$  expression at the mRNA level. Our results show that TNF- $\alpha$  accumulation was induced by CD40 or TNF- $\alpha$  stimuli, and this expression was even more pronounced when NIT-1 cells were activated with CD40 and TNF- $\alpha$  together acting through the NF- $\kappa$ B and MEK/ERK pathway.

In conclusion, our data provide new insights in the signaling of CD40 in the insulinoma cell line NIT-1. We demonstrate that, NF- $\kappa$ B is involved in CD40 signaling, that the MEK/ERK pathway is the main signaling cascade activated after CD40 stimuli, and that the association of CD40 with a proinflammatory cytokine, as TNF- $\alpha$ , can induce cell death by apoptosis.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the Diabetes Research Institute Foundation and the Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF). F.M.B.T. is supported by the Brazilian Foundation CAPES.

## References

1. Grewal, I.S., and Flavell, R.A. 1998. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 16:111-135.
2. Galy, A.H., and Spits, H. 1992. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol* 149:775-782.
3. Hess, S., and Engelmann, H. 1996. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J Exp Med* 183:159-167.
4. Karmann, K., Hughes, C.C., Schechner, J., Fanslow, W.C., and Pober, J.S. 1995. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4342-4346.
5. Smith, T.J., Sciaky, D., Phipps, R.P., and Jennings, T.A. 1999. CD40 expression in human thyroid tissue: evidence for involvement of multiple cell types in autoimmune and neoplastic diseases. *Thyroid* 9:749-755.
6. Sugimoto, K., Shiraki, K., Ito, T., Fujikawa, K., Takase, K., Tameda, Y., Moriyama, M., and Nakano, T. 1999. Expression of functional CD40 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 30:920-926.
7. Dadgostar, H., Zarnegar, B., Hoffmann, A., Qin, X.F., Truong, U., Rao, G., Baltimore, D., and Cheng, G. 2002. Cooperation of multiple signaling pathways in CD40-regulated gene expression in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1497-1502.
8. Vosters, O., Beuneu, C., Nagy, N., Movahedi, B., Aksoy, E., Salmon, I., Pipeleers, D., Goldman, M., and Verhasselt, V. 2004. CD40 expression on human pancreatic duct cells: role in nuclear factor-kappa B activation and production of pro-inflammatory cytokines. *Diabetologia* 47:660-668.
9. Klein, D., Barbe-Tuana, F., Pugliese, A., Ichii, H., Garza, D., Gonzalez, M., Molano, R.D., Ricordi, C., and Pastori, R.L. 2005. A functional CD40 receptor is expressed in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 48:268-276.
10. Calderhead, D.M., Kosaka, Y., Manning, E.M., and Noelle, R.J. 2000. CD40-CD154 interactions in B-cell signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 245:73-99.
11. van Kooten, C., and Banchereau, J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67:2-17.
12. Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Kikutani, H. 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1:167-178.
13. Davies, C.C., Mason, J., Wakelam, M.J., Young, L.S., and Eliopoulos, A.G. 2004. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and ERK MAPK-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of CD40 ligation in carcinoma cells. *J Biol Chem* 279:1010-1019.
14. Mathur, R.K., Awasthi, A., Wadhone, P., Ramanamurthy, B., and Saha, B. 2004. Reciprocal CD40 signals through p38MAPK and ERK-1/2 induce counteracting immune responses. *Nat Med* 10:540-544.
15. Eliopoulos, A.G., Davies, C., Knox, P.G., Gallagher, N.J., Afford, S.C., Adams, D.H., and Young, L.S. 2000. CD40 induces apoptosis in carcinoma cells through activation of cytotoxic ligands of the tumor necrosis factor superfamily. *Mol Cell Biol* 20:5503-5515.
16. Green, E.A., and Flavell, R.A. 1999. Tumor necrosis factor-alpha and the progression of diabetes in non-obese diabetic mice. *Immunol Rev* 169:11-22.
17. Pearson, L.L., Castle, B.E., and Kehry, M.R. 2001. CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Int Immunol* 13:273-283.
18. Rothe, M., Xiong, J., Shu, H.B., Williamson, K., Goddard, A., and Goeddel, D.V. 1996. I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8241-8246.
19. Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Azuma, S., Yamamoto, T., and Inoue, J. 1999. Two differently regulated nuclear factor kappaB activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1234-1239.
20. Urbich, C., Mallat, Z., Tedgui, A., Clauss, M., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. 2001. Upregulation of TRAF-3 by shear stress blocks CD40-mediated endothelial activation. *J Clin Invest* 108:1451-1458.

21. Pullen, S.S., Labadia, M.E., Ingraham, R.H., McWhirter, S.M., Everdeen, D.S., Alber, T., Crute, J.J., and Kehry, M.R. 1999. High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry* 38:10168-10177.
22. Davies, C.C., Bem, D., Young, L.S., and Eliopoulos, A.G. 2005. NF-kappaB overrides the apoptotic program of TNF receptor 1 but not CD40 in carcinoma cells. *Cell Signal* 17:729-738.
23. Tan, J., Town, T., Mori, T., Obregon, D., Wu, Y., DelleDonne, A., Rojiani, A., Crawford, F., Flavell, R.A., and Mullan, M. 2002. CD40 is expressed and functional on neuronal cells. *Embo J* 21:643-652.
24. Jayaraman, S. 2003. Intracellular determination of activated caspases (IDAC) by flow cytometry using a pancaspase inhibitor labeled with FITC. *Cytometry A* 56:104-112.
25. Khoo, S., Griffen, S.C., Xia, Y., Baer, R.J., German, M.S., and Cobb, M.H. 2003. Regulation of insulin gene transcription by ERK1 and ERK2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 278:32969-32977.
26. Longuet, C., Broca, C., Costes, S., Hani el, H., Bataille, D., and Dalle, S. 2005. Extracellularly regulated kinases 1/2 (p44/42 mitogen-activated protein kinases) phosphorylate synapsin I and regulate insulin secretion in the MIN6 beta-cell line and islets of Langerhans. *Endocrinology* 146:643-654.
27. Jacobsson, G., Bean, A.J., Scheller, R.H., Juntti-Berggren, L., Deeney, J.T., Berggren, P.O., and Meister, B. 1994. Identification of synaptic proteins and their isoform mRNAs in compartments of pancreatic endocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12487-12491.
28. Stephens, L.A., Thomas, H.E., Ming, L., Grell, M., Darwiche, R., Volodin, L., and Kay, T.W. 1999. Tumor necrosis factor-alpha-activated cell death pathways in NIT-1 insulinoma cells and primary pancreatic beta cells. *Endocrinology* 140:3219-3227.
29. Movahedi, B., Van de Casteele, M., Caluwe, N., Stange, G., Breckpot, K., Thielemans, K., Vreugdenhil, G., Mathieu, C., and Pipeleers, D. 2004. Human pancreatic duct cells can produce tumour necrosis factor-alpha that damages neighbouring beta cells and activates dendritic cells. *Diabetologia* 47:998-1008.
30. Falco, A., Romano, M., Iapichino, L., Collura, M., and Davi, G. 2004. Increased soluble CD40 ligand levels in cystic fibrosis. *J Thromb Haemost* 2:557-560.
31. Ohta, Y., and Hamada, Y. 2004. In situ Expression of CD40 and CD40 ligand in psoriasis. *Dermatology* 209:21-28.
32. Urbich, C., and Dimmeler, S. 2004. CD40 and vascular inflammation. *Can J Cardiol* 20:681-683.
33. Berney, T., Pileggi, A., Molano, R.D., Poggioli, R., Zahr, E., Ricordi, C., and Inverardi, L. 2003. The effect of simultaneous CD154 and LFA-1 blockade on the survival of allogeneic islet grafts in nonobese diabetic mice. *Transplantation* 76:1669-1674.
34. Balasa, B., Krahl, T., Patstone, G., Lee, J., Tisch, R., McDevitt, H.O., and Sarvetnick, N. 1997. CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 159:4620-4627.
35. Kenyon, N.S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranuncoli, A., Oliveira, M., Wagner, J.L., Kirk, A.D., Harlan, D.M., Burkly, L.C., and Ricordi, C. 1999. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8132-8137.
36. Cardozo, A.K., Heimberg, H., Heremans, Y., Leeman, R., Kutlu, B., Kruhoffer, M., Ormtoft, T., and Eizirik, D.L. 2001. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276:48879-48886.
37. Giannoukakis, N., Rudert, W.A., Trucco, M., and Robbins, P.D. 2000. Protection of human islets from the effects of interleukin-1beta by adenoviral gene transfer of an Ikappa B repressor. *J Biol Chem* 275:36509-36513.
38. Heimberg, H., Heremans, Y., Jobin, C., Leemans, R., Cardozo, A.K., Darville, M., and Eizirik, D.L. 2001. Inhibition of cytokine-induced NF-kappaB activation by adenovirus-mediated expression of a NF-kappaB super-repressor prevents beta-cell apoptosis. *Diabetes* 50:2219-2224.
39. Suttles, J., Milhorn, D.M., Miller, R.W., Poe, J.C., Wahl, L.M., and Stout, R.D. 1999. CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an ERK1/2-dependent pathway. A target of interleukin (il)-4 and il-10 anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274:5835-5842.
40. Matsuda, T., Omori, K., Vuong, T., Pascual, M., Valiente, L., Ferreri, K., Todorov, I., Kuroda, Y., Smith, C.V., Kandeel, F., et al. 2005. Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function. *Am J Transplant* 5:484-493.

41. Hess, S., Gottfried, E., Smola, H., Grunwald, U., Schuchmann, M., and Engelmann, H. 1998. CD40 induces resistance to TNF-mediated apoptosis in a fibroblast cell line. *Eur J Immunol* 28:3594-3604.

## TRABALHO 3

### **A interação CD40-CD40 ligante em ilhotas pancreáticas ativa uma via pró-inflamatória que induz morte nas células $\beta$ .**

Florencia M. Barbé-Tuana, Dagmar Klein, Hirohito Ichii, Dora Berman-Weinberg,  
Norma S. Kenyon, Camillo Ricordi, Ricardo L. Pastori.

Diabetes Research Institute, University of Miami Leonard M. Miller School of  
Medicine.

Por favor, correspondência para:

R.L. Pastori, Ph.D.

Diabetes Research Institute

University of Miami School of Medicine

1450 NW 10th Avenue, Miami, FL 33136, USA

Tel: (305) 243-5349

Fax: (305) 243-4404

Endereço e-mail: [rpastori@med.miami.edu](mailto:rpastori@med.miami.edu)

**Abreviações não padronizadas:** molécula de adesão intracelular (ICAM);  
equivalente de ilhota (IEQ); quinase extracelular ativada por mitógeno (MEK);  
proteína inflamatória de macrófago-1 $\beta$  (MIP); proteína quimioatraente de monócitos-  
1 (MCP); newport green (NG); ligante CD40 recombinante humano solúvel  
(rhsCD40L); 7-amino actinomicina D (7-AAD); proteína quinase ativada por stress  
(SAPK).

## Resumo

O transplante de ilhotas pancreáticas está se tornando uma alternativa para pacientes com diabetes mellitus tipo 1 que utilizam insulina como terapia. Porém, a perda imediata das ilhotas, causada por eventos inflamatórios não-específicos no sítio do implante representa um grande obstáculo para o transplante das mesmas. Recentemente descobrimos que CD40, um membro da família do receptor de TNF, é expresso em células  $\beta$ . A expressão de CD40 em células não hematopoiéticas geralmente está associada à inflamação, portanto, nós investigamos o possível papel pró-inflamatório do CD40 em ilhotas. Ilhotas humanas, ou células  $\beta$  isoladas, incubadas com a proteína CD40L recombinante humana secretaram IL-6, IL-8, proteína quimioatraente 1 de monócito (MCP-1) assim como proteína quimioatraente  $1\beta$  de macrófago (MIP- $1\beta$ ), uma proteína que não foi previamente reportada em ilhotas. RT-PCR confirmou a indução das citocinas a nível da transcrição. A expressão de MIP- $1\beta$  nas células  $\beta$  produtoras de insulina foi corroborada por imunofluorescência dupla. A interação CD40-CD40L ativa as vias Raf/MEK/ERK1/2 e NF- $\kappa$ B, já que, inibidores destas vias bloquearam a indução de citocinas e quimiocinas nas ilhotas. Ainda mais, a incubação das ilhotas com meio condicionado de ilhotas previamente tratadas com o CD40L, induziu morte das células  $\beta$  e aumentou a expressão de ICAM-1.

Os resultados indicam que a expressão de CD40 em células  $\beta$  pode aumentar o micro ambiente inflamatório, contribuindo com a perda das ilhotas.

**Palavras chaves:** CD40, citocinas, diabetes mellitus, ERK, ICAM-1, inflamação, ilhotas, MAPK, NF- $\kappa$ B, quimiocinas.

## Introdução

O CD40 é membro da família do receptor de TNF (TNFR) expresso em diferentes tipos celulares. A ativação de CD40 em linfócitos B, macrófagos e células APC profissionais, pelo seu ligante, o CD40L, também chamado de CD154, tem um papel fundamental no sistema imune, induzindo sobrevivência e proliferação celular, diferenciação e também troca isotípica em linfócitos B (1).

Entretanto, a expressão de CD40 em células não hematopoiéticas, como células endoteliais, do timo, epiteliais, neoplásicas da tireóide, linhagens celulares transformadas e células do ducto pancreático (2-7), está principalmente associada a respostas inflamatórias não específicas. Esses eventos contribuem à indução e secreção de citocinas e quimiocinas, e também ao aumento de moléculas co-estimulatórias, resultando no recrutamento e ativação de células hematopoiéticas. Por exemplo, o estímulo de CD40 tem um papel principal em doenças como psoríase, aterosclerose e fibrose cística (8-10).

As ilhotas transplantadas são vulneráveis à perda imediata após o transplante, e isto é parcialmente atribuído à secreção local de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (11-14). As células  $\beta$  pancreáticas expressam uma variedade de moléculas inflamatórias como citocinas (15), receptor tipo Toll e receptor de LPS (16), proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) (17, 18) assim como proteína-10 induzível por interferon (IP-10) (19), que suportam um ambiente inflamatório danificando uma alta proporção de células  $\beta$ .

Mais ainda, as células do ducto pancreático, que estão em contato com as ilhotas e também expressam o receptor de CD40, secretam IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  após a ligação do CD40 (7), o que pode induzir a ativação das células dendríticas *in vitro* e apoptose das células  $\beta$  (20).

Recentemente demonstramos a expressão de CD40 em células  $\beta$  pancreáticas de camundongo e humano, a qual foi aumentada pela incubação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ). A sinalização através deste receptor também ativa o fator de transcrição pró-inflamatório NF- $\kappa$ B (21).

Neste estudo, demonstramos especificamente, em células  $\beta$  pancreáticas de primatas humanos e não humanos, que após o estímulo de CD40, há ativação e indução das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  através das vias Raf/MEK/ERK e NF- $\kappa$ B. As citocinas e quimiocinas secretadas como consequência da sinalização através de CD40 causaram morte das células  $\beta$ .

Mais ainda, a interação CD40-CD40L aumentou a expressão da molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1). Os resultados indicam que a expressão de CD40 em células  $\beta$  poderia contribuir à morte das mesmas e a persistência da inflamação.



## Métodos

**Ilhotas de primatas humanos e não humanos.** As ilhotas humanas foram fornecidas pelo cGMP do Diabetes Research Institute, *University of Miami*, e isoladas de acordo com o método automatizado desenvolvido por Ricordi e cols. (22). Dez mil IEQ de doador cadavérico foram incubadas a 37°C antes da manipulação. Após 24 h, as ilhotas humanas foram cuidadosamente dissociadas com um coquetel de enzimas digestivas (Accutase, Innovative Cell Technologies Inc., San Diego, CA) por 12 min a 37°C. A ação da enzima foi suspensa pela adição de FBS v/v. As células dissociadas foram utilizadas para os seguintes experimentos. As ilhotas de primatas não humanos foram cedidas pelo laboratório da Dr. Norma S. Kenyon, e isoladas como explicado acima.

**Separação com micropartículas magnéticas.** As ilhotas dissociadas foram depletadas das células com marcação positiva para o antígeno CA19-9 presente nas células do ducto, por um procedimento de marcação indireta utilizando a tecnologia de micropartículas MACS (Miltenyi Biotec Inc. Auburn, CA). Em resumo, as células foram marcadas utilizando um anticorpo monoclonal (mAb) contra o antígeno humano CA19-9 (1:100, NCL-CA19-9 IgG isotipo, Novocastra, Newcastle, UK) por 15 min a 4°C, lavadas duas vezes com DPBS pH 7.2, 2 mM EDTA suplementado com BSA 0.5%, e subsequentemente incubadas com 20 µl de micropartículas MACS covalentemente unidas a anti-IgG de cabra contra camundongo (Miltenyi Biotec Inc.) por 15 min a 4°C. Após duas lavagens com tampão DPBS-EDTA, as células foram separadas utilizando colunas LS MACS e um separador magnético manual (Miltenyi Biotec Inc.). A suspensão celular foi separada em duas populações, com marcação positiva e negativa para o antígeno de ducto CA19-9. Foi coletada a população não marcada e o procedimento foi repetido. A depleção das células CA19-9 do ducto na

fração negativa foi confirmada por citometria de fluxo, utilizando um anticorpo secundário contra camundongo (conjugado com FITC, 1:100, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO). A população negativa para CA19-9 também foi avaliada para a presença de células contaminantes como linfócitos B (CD19), macrófagos (CD14) e células dendríticas (CD11c) que também expressam o receptor CD40.

**Separação das células  $\beta$  por citometria de fluxo.** A suspensão celular de ilhotas de primatas humanos e não humanos foi corada com 1  $\mu$ M Newport Green PDX acetoximethyléter (NG, Molecular Probes, OR) por 1h30 min a 37°C em DPBS sem  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ . Após a lavagem final em DPBS, as células foram coradas com 7-amino actinomicina D (7-AAD, Molecular Probes) (23). As células que negativas para o 7-AAD foram separadas de acordo à intensidade da coração com o NG em NG<sup>brilhante</sup> (células  $\beta$ ) and NG<sup>fosca/neg</sup> (células não  $\beta$ ) utilizando um citômetro FACSVantage (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

**Indução e detecção de citocinas.** As células das ilhotas de primatas humanos e não humanos depletadas ou separadas foram incubadas em meio MM1 e estimuladas com a proteína humana recombinante solúvel (rhsCD40L) + adjuvante (1 $\mu$ g/ml, Alexis Biochemicals, San Diego, CA) a 37°C. Os inibidores da fosforilação MEK1/2 e I $\kappa$ B, PD98059 (50  $\mu$ M, Cell Signaling Technology, Inc. Beverly, MA) ou Bay117082 (5  $\mu$ M, Biomol Int. L.P., Plymouth Meeting, PA), foram adicionados às células 1h antes e permaneceram durante o tratamento.

Vinte e quatro horas mais tarde, o sobrenadante das células foi coletado. Cinquenta  $\mu$ l do sobrenadante da cultura de células tratadas ou não tratadas foram utilizados para detectar simultaneamente IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  através da tecnologia luminex (Bio-Plex System, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Todos os reagentes foram fornecidos pelo sistema

Bio-Plex e a manipulação foi realizada de acordo como o protocolo do fabricante (Bio-Rad Laboratories, Inc.). As amostras foram colocadas em duplicado e cada experimento foi repetido ao menos 3 vezes. As concentrações de citocinas foram calculadas a partir de uma curva padrão.

**Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase.** O RNA total foi isolado com um kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen Inc, Valencia, CA), submetidas à digestão pela DNase I (Ambion, Austin, Texas) e usadas como molde para a síntese do cDNA (Superscript first-strand synthesis system for RT-PCR, Invitrogen). Iniciadores específicos foram desenhados para as diferentes citocinas inflamatórias de humanos: IL-6 (5'-ACA TCC TCG ACG GCA TCT CAG3' e 5'TGG CTT GTT CCT CAC TAC TCT-3') (24), IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  (Biosource International, Camarillo, CA). A amplificação da  $\beta$  actina (5'-GAC TAC CTC ATG AAG ATC C-3' e 5'-TCT CCT TCT GCA TCC TGT C-3') foi utilizada como controle interno. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 3% (Invitrogen), corados com EtBr e analisados sob luz UV.

**Imunofluorescência de células pancreáticas.** As células previamente dissociadas foram desidratadas a temperatura ambiente em lâminas de vidro, fixadas com paraformaldeído a 2.5% (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA) por 15 min, lavadas 3 vezes com Optimax 1x (Bio-Genex, San Ramon, CA) e tratadas com um bloqueador de proteínas universal (Biogenex) para prevenir reações não específicas. As lâminas foram incubadas com anticorpo feito em cabra contra MIP-1 $\beta$  humana (5  $\mu$ g/ml, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), durante toda a noite a 4°C, lavadas e incubadas com anticorpo secundário contra cabra conjugado a Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes). A coloração para insulina ou glucagon foi realizada seguindo o mesmo protocolo, utilizando anticorpo de cabra contra coelho

conjugado com Alexa Fluor 568 (1:200, Molecular Probes) com anticorpo secundário. A omissão do anticorpo primário foi utilizada como controle negativo. As lâminas foram montadas com uma solução específica para minimizar a perda da fluorescência (Molecular Probes).

**Coloração com TMRE:** As ilhotas pancreáticas foram dissociadas como previamente explicado e coradas de acordo com o protocolo do fabricante (Roche).

**Análise estatística.** Quando apropriado, os resultados foram analisados pelo teste t de Student. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando ANOVA e o método de Tukey para contrastes posteriores com o programa estatístico Sigma-Stat 2. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (SD). Os valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## Resultados

**A estimulação de CD40 em células pancreáticas de primatas humanos e não humanos resulta em secreção de citocinas e quimiocinas.** Investigamos se a estimulação de CD40 presente em células pancreáticas estava associada à secreção de mediadores pró-inflamatórios. Primeiro as ilhotas pancreáticas foram depletadas de células contaminantes do ducto pancreático, as quais também expressam o CD40 (7), pela seleção com partículas magnéticas e um anticorpo específico que reconhece o carboidrato de membrana CA19-9, presente em todas as células do ducto. Este anticorpo cora o ducto principal, e as células dos ductos interlobular, intralobular, intercaladas e centroacinares, e já foi utilizado para purificar células pancreáticas ductais (25). A análise da citometria de fluxo revelou que as preparações de isolamentos de ilhotas humanas contêm uma alta proporção de células do ducto, de 30-65%. A depleção manual das células CA19-9 com colunas magnéticas foi atingida com sucesso, restando 1,5 a 2% após o procedimento (Figura 1). Como os linfócitos B, macrófagos assim como as células dendríticas também expressam o receptor de CD40, a população negativa para o CD19-9 também foi analisada com marcadores para essas populações. Em nossas preparações não achamos esses tipos celulares (dados não mostrados).

Para demonstrar a secreção de citocinas e quimiocinas, o sobrenadante da cultura de células pancreáticas humanas tratado por 24 h com o r<sub>h</sub>sCD40L ou o controle, foi avaliado pela tecnologia luminex. A tabela 1 resume os achados e mostra que a ativação do CD40 induziu ou aumentou a secreção de IL-6, IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  em ilhotas humanas. É interessante destacar que somente concentrações muito baixas de certas citocinas como IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram achadas.

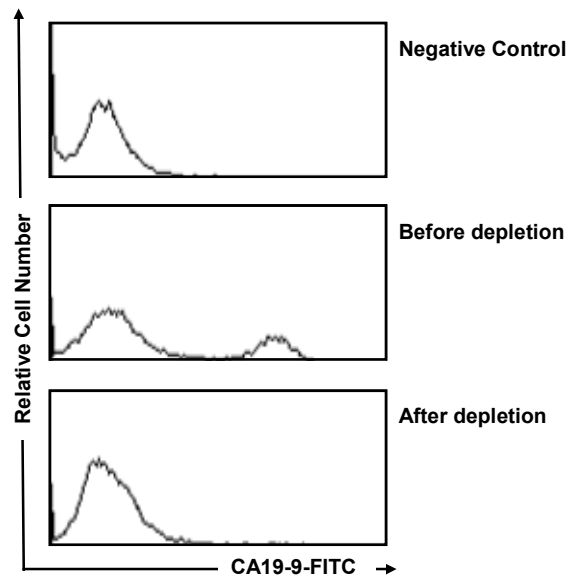


Figura 1. Depleção da preparação de ilhotas pancreáticas humanas de células do ducto pancreático positivas para o antígeno CA19-9. As ilhotas pancreáticas humanas foram dissociadas até formar uma suspensão celular e depletadas de células do ducto, utilizando um anticorpo contra o antígeno CA19-9 humano, seguido de anticorpo feito em cabra contra IgG de camundongo unido a micro partículas magnéticas. Após a separação, as células foram incubadas com anticorpo contra IgG de camundongo conjugado a isotiocianato de fluoresceína ou o controle de isotipo, e analisadas por citometria de fluxo.

Também utilizamos uma espécie diferente como fonte de ilhotas pancreáticas. As preparações de primata não humano, como o macaco cinomolgus (*Macaca fascicularis*), constituem uma fonte altamente pura de células  $\beta$  (80%) com uma percentagem muito baixa de células do ducto pancreático, como avaliado por citometria de fluxo (< 1%) (Norma S. Kenyon e Dora Berman-Weinberg, resultados não publicados).

Tabela 1. Secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em ilhotas pancreáticas isoladas de primatas humanos e não humanos ativadas com o CD40L.

<b>Protein concentration (pg/ml)</b>			
<b>Human Islet Preparation<sup>A</sup></b>			
	<b>Control</b>	<b>CD40L</b>	<b>P value</b>
<b>IL-6</b>	2.81 ± 0.71	67.04 ± 3.65	***
<b>IL-8</b>	484 ± 30	7751 ± 218	***
<b>MCP-1</b>	6.69 ± 0.01	121 ± 15	***
<b>MIP-1β</b>	10.59 ± 0.36	125 ± 6	***
<b>Non Human Islet Preparation</b>			
<b>IL-6</b>	2.76 ± 0.74	8.87 ± 2.02	**
<b>IL-8</b>	381 ± 56	804 ± 97	***
<b>MCP-1</b>	437 ± 133	937 ± 38	***
<b>MIP-1β</b>	20.70 ± 2.66	56.85 ± 4.86	***

Os dados são apresentados como média ± SD. As comparações foram realizadas utilizando o teste t de Student. Os valores \*\*P≤0.002; \*\*\*P≤0.0001 foram considerados estatisticamente significativos.

<sup>A</sup>Ilhotas depletadas de células CA19-9. Células de ilhotas de primatas humanos e não humanos foram incubadas a 37 °C na presença ou não de CD40L + adjuvante (1µg/ml). Após 24 h, os sobrenadantes das células pancreáticas em cultura foram avaliados pela tecnologia luminex para a secreção de IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ, MCP-1, MIP-1β, TNF-α.

Entretanto, como a expressão de CD40 em ilhotas de primatas não humanos nunca foi relatada, investigamos primeiramente sua expressão. A análise de western blot mostra que o receptor de CD40 também é expresso em ilhotas de primatas não humanos (Figura 2A). Com o intuito de identificar quais são as células que expressam a molécula de CD40, as células de ilhotas de primata não humano foram coradas com Newport Green (NG) e 7-amino actinomicina D (7-AAD). NG na forma de éster (NG-Ac), é um composto permeável à membrana celular, que une-se ao Zn, e que apresenta união seletiva às células β humanas (26, 27). A análise por citometria de fluxo mostrou que as células β de primata não humano coram-se com o NG

(confirmado por imunofluorescência, dados não mostrados), e que essas células expressam o receptor de CD40 (Figura 2B). Similar às células pancreáticas humanas, após a incubação com o rhsCD40L, observou-se também um aumento em IL-6, IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  das células de primata não humano (Tabela 1). Da mesma forma achamos um aumento das citocinas IL-6, IL-8 e MIP-1 $\beta$ , em células  $\beta$  isoladas de ambos primatas (pureza >90%) quando estimuladas com o rhsCD40L (dados não mostrados).

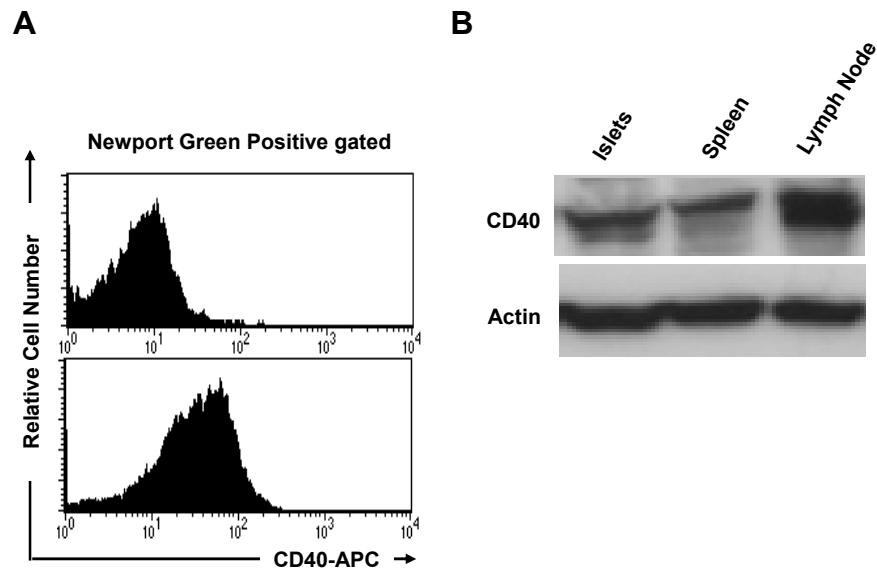


Figura 2. O receptor de CD40 é expresso em células  $\beta$  de primata não humano. A) A expressão de CD40 foi analisada por citometria de fluxo em células pancreáticas de primata não humano. As células foram coradas com NG e 7-AAD e um anticorpo fluorescente contra o CD40 humano ou o controle de isotipo. Os histogramas mostram a expressão do controle de isotipo ou a expressão de CD40 em células  $\beta$  pancreáticas. B) Expressão de CD40 por western blot em ilhotas pancreáticas, baço ou linfonodo.

Adicionalmente, a síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias foi confirmada ao nível de mRNA. Utilizamos células  $\beta$  de humano tratadas ou não com a molécula de rhsCD40L. Após 24 h de ativação, as células em cultura foram analisadas pela RT-PCR. Como mostrado na figura 3A, foi detectado um aumento na expressão de IL-6, IL-8 e MIP-1 $\beta$  nas células  $\beta$  isoladas de humanos após a ativação de CD40.



Como a expressão de MIP-1 $\beta$  nunca foi relatada em células  $\beta$ , utilizamos imunofluorescência dupla para confirmar sua expressão. Como mostrado na figura 3B, a análise por microscopia confocal confirmou que as células humanas que apresentam marcação positiva para a insulina também expressam a quimiocina MIP-1 $\beta$ . Os resultados decorrentes da tecnologia por luminex, RT-PCR e imunofluorescência confirmam a hipótese de que as células  $\beta$  podem exercer funções efetoras através de mediadores inflamatórios para induzir ou manter um estado inflamatório.

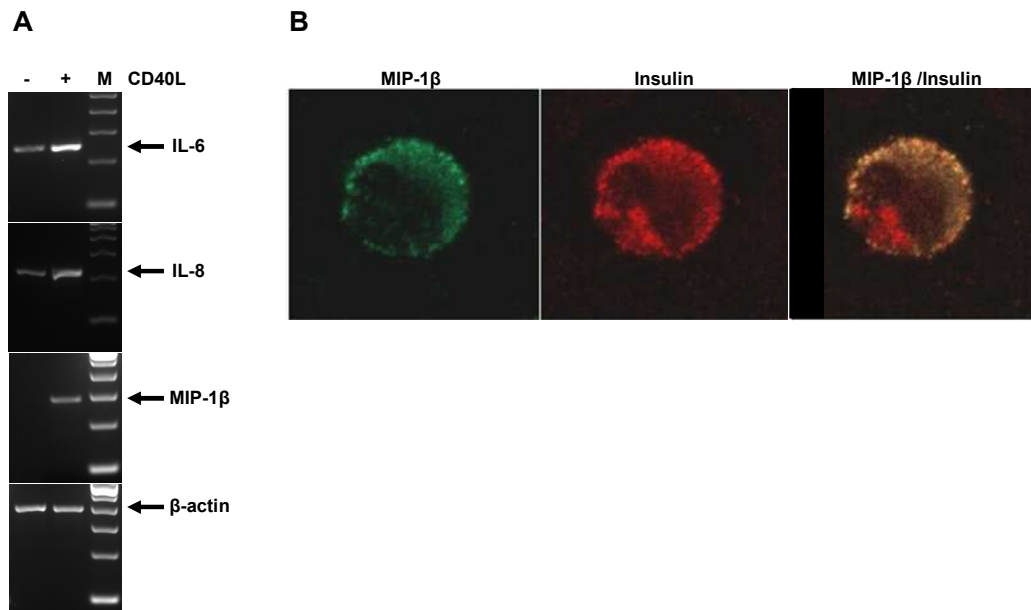


Figura 3. Detecção de citocinas e quimiocinas em células  $\beta$  isoladas de humanos após a estimulação do CD40 por RT-PCR e imunofluorescência. As ilhotas pancreáticas humanas foram dissociadas até formar uma suspensão celular, coradas com NG e 7-AAD, e separadas de acordo à intensidade de NG. As células separadas (7-AAD-, NG<sup>brilhantes</sup>) foram estimuladas com o CD40L (1  $\mu$ g/ml) por 24 h. A) Eletroforese em gel de agarose mostrando os amplicons de IL-6, IL-8, MIP-1 $\beta$  e  $\beta$ -actina. -: não estimulada com CD40L, +: estimulada com CD40L, M: marcador. B) Análise por microscopia confocal laser de células  $\beta$  separadas, coradas para MIP-1 $\beta$  e insulina, utilizando imunofluorescência dupla (aumento original 630x).

**A produção e secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias requer a ativação das vias MEK/ERK e NF- $\kappa$ B.** Já está bem estabelecida a importância da sinalização de CD40 em respostas inflamatórias em monócitos e macrófagos (28-30) através de membros da família da MAPK ERK. Estudamos o papel de ERK1/2 mediado pela ativação de CD40, e a indução da secreção de citocinas inflamatórias, pelo bloqueio das vias. A utilização de inibidor específico PD98059, que evita a ativação de MEK1 por parte de c-Raf (31), permitiu estudar o papel da via Raf/MEK/ERK na secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias induzidas por CD40. De forma similar, Bay117082 bloqueia fosforilação de I $\kappa$ B.

O envolvimento das vias das MAPK Raf/MEK/ERK e NF- $\kappa$ B foi demonstrado nas culturas com ilhotas pancreáticas. A secreção de IL-6, IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  foram avaliadas pela tecnologia luminex nos sobrenadantes de culturas tratadas por 24 h e previamente tratadas por 1 h e durante a fase de ativação com os inibidores de MEK ou I $\kappa$ B, PD98059 e Bay 117082, respectivamente. A adição de PD98059 (50  $\mu$ M) ou Bay 117082 (5  $\mu$ M) reduziu a secreção das citocinas/quimiocinas IL-6, IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  e bloqueou sinalização celular dependente de CD40 (Figura 4). Esses resultados indicam que a sinalização celular de CD40 nas ilhotas pancreáticas também é realizado através das vias Raf/MEK/ERK e NF- $\kappa$ B.

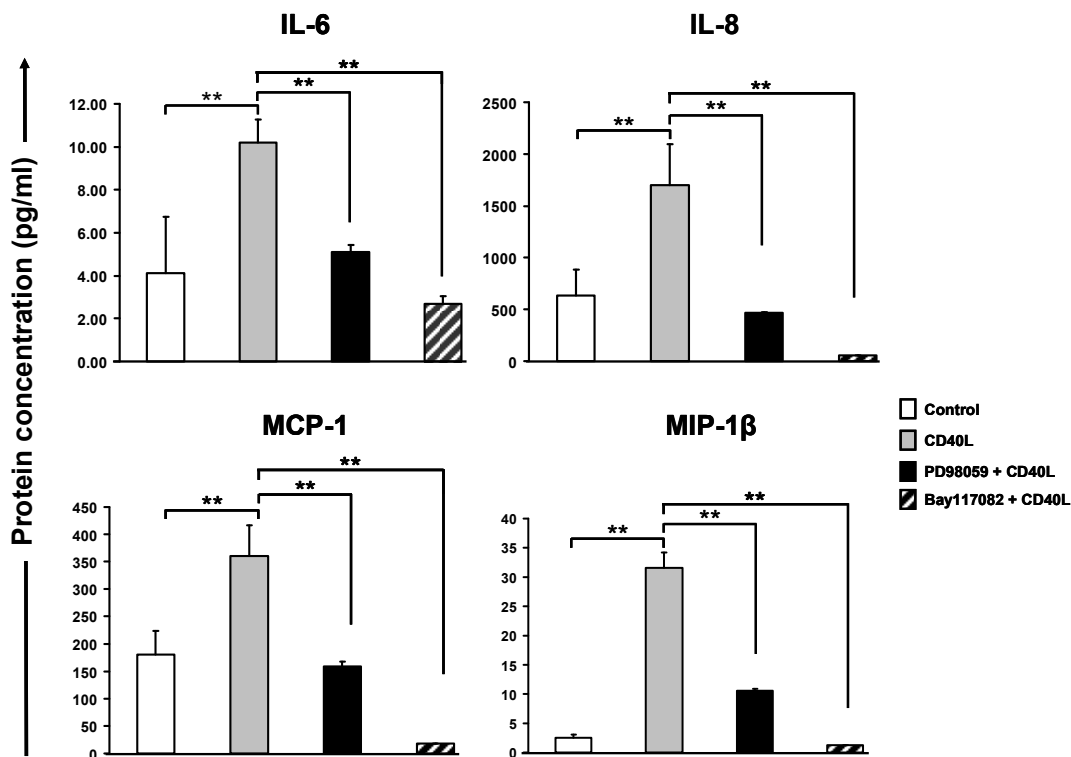


Figure 4. A secreção de citocinas pró-inflamatórias de ilhotas isoladas ativadas com o CD40L é dependente das vias Raf/MEK/ERK e NF- $\kappa$ B. As ilhotas pancreáticas humanas foram dissociadas até formar uma suspensão celular, e estimuladas com o CD40L (1  $\mu$ g/ml). Após 24 h, a secreção de IL-6, IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  foram avaliadas pela tecnologia luminex a partir do sobrenadante de culturas controle e ativadas com o CD40L, ou pré-tratadas por 1h e durante a fase de ativação com o inibidor de MEK ou de NF- $\kappa$ B, PD98059 (50 $\mu$ M) e Bay117082 (5 $\mu$ M), respectivamente. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando ANOVA e o método de Tukey para contrastes posteriores. \*\*: P < 0.05

**A secreção de citocinas e quimiocinas dependente de CD40 induz morte celular e a expressão da proteína ICAM-1 em ilhotas pancreáticas.** Investigamos se mediadores solúveis secretados após a ativação de CD40 poderiam induzir morte celular, em células pancreáticas. Avaliamos a despolarização do potencial elétrico da membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ) como um indicador de viabilidade/apoptose (27) com a molécula de tetrametilrodaminaetiléster (TMRE), um corante que marca somente mitocôndrias das células que apresentam um  $\Delta\psi$  intacto. As ilhotas humanas foram

incubadas por 36 h a 37°C com o sobrenadante de ilhotas previamente tratadas ou não com o rnsCD40L (Figura 5A). Os resultados mostram que o potencial elétrico mitocondrial nas células  $\beta$  incubadas com o médio condicionado, diminuiu de 85% nos controles para 68% nas ilhotas tratadas com o CD40L (Figura 5B), indicando que a sinalização dependente de CD40 pode comprometer também a viabilidade das células  $\beta$ . Mais ainda, o sobrenadante das ilhotas tratadas com o CD40L, aumentou a expressão da molécula de adesão intracelular (ICAM-1) (Figura 5C), outra molécula também regulada pela atividade de NF- $\kappa$ B (32).

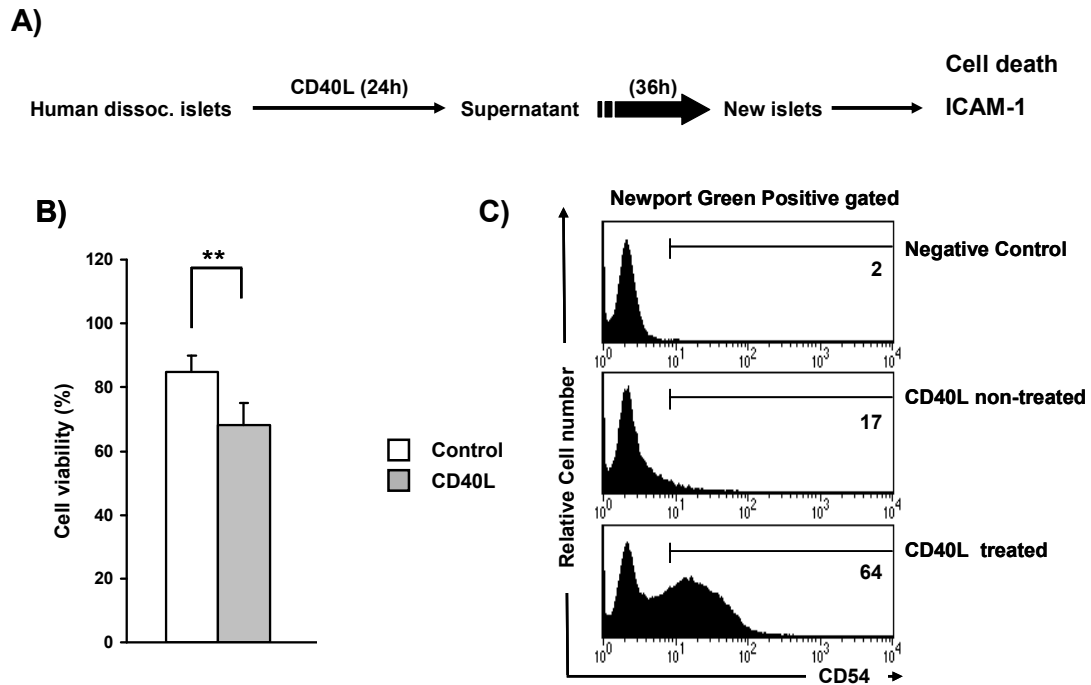


Figura 5. O médio condicionado de ilhotas tratadas com o CD40L induz morte celular dependente de CD40 e o aumento da expressão de ICAM-1 em células  $\beta$  pancreáticas. A) As ilhotas pancreáticas humanas foram desagregadas até formar uma suspensão celular, depletadas de células do ducto que expressam CA19-9 e estimuladas por 24 h com o CD40L (1  $\mu$ g/ml). O meio condicionado e meio controle foram utilizados para estimular novas ilhotas pancreáticas. Após 36 h de incubação: B) a viabilidade celular utilizando o TMRE, ou C) a expressão de ICAM-1, foram analisadas por citometria de fluxo em células  $\beta$ .

## Discussão

O transplante de ilhotas, utilizado como reposição biológica das células  $\beta$  secretoras de insulina em pacientes com formas graves de diabetes mellitus tipo 1, está se tornando uma prática clínica ao redor do mundo, na medida em que aumenta o progresso nas técnicas de isolamento e imunossupressão (33-35). Entretanto, o processo de isolamento de ilhotas, o qual consiste em uma digestão mecânica e enzimática do pâncreas, é potencialmente nocivo (36), e expõe as ilhotas a fatores que as prejudicam e que induzem um estado pró-inflamatório geral das ilhotas a serem transplantadas. Mais ainda, após o transplante, as ilhotas são submetidas a hipóxia e eventos imediatos não específicos, majoritariamente mediados por células do sistema imune do receptor, que podem comprometer a função biológica das células  $\beta$  e sua viabilidade. Nesse sentido, moléculas pró-inflamatórias localmente secretadas podem promover quimioatração, proliferação assim como diferenciação de células imunes específicas recrutadas ao sítio do implante, as quais podem comprometer o destino do enxerto de ilhotas.

O receptor de CD40 é uma molécula co-estimulatória, originariamente descrita na superfície de células hematopoiéticas especializadas como APC, linfócitos B e macrófagos. Quando essas células encontram um linfócito T, o receptor das células T (TCR) interage com o complexo de histocompatibilidade principal apresentando um peptídeo processado na superfície da APC. Esse encontro inicial induz a expressão do ligante para o CD40 nos linfócitos T e subseqüentemente, a interação com o receptor CD40 presente nas APC. Como consequência, em condições fisiológicas, a interação entre CD40-CD40L aumenta a expressão de outras moléculas co-estimulatórias, ativando as células T e iniciando a resposta imune adaptativa (1). Porém, vários trabalhos sugerem que a interação CD40-CD40L contribui não somente em respostas

imunes fisiológicas, assim como também em condições patológicas como doenças auto-imunes e vasculares, levando à inflamação crônica. De fato, o papel crítico do CD40 na ativação das células T é reconhecido no campo do transplante (37-40) e auto-imunidade (41, 42) e tem sido confirmado utilizando animais transgênicos e nocautes (1). A interferência da via do CD40 utilizando anticorpos contra o CD40L inibe o desenvolvimento espontâneo de diabetes em camundongos diabéticos não obesos (NOD) (43) e prolonga a sobrevivência do enxerto de ilhotas em primatas não humanos (37, 41), na ausência de drogas imunossupressoras. Observamos previamente que a molécula de CD40 é expressa em células  $\beta$  humanas. Mais ainda, a incubação das ilhotas humanas com um coquetel de citocinas pró-inflamatórias parece ter um papel significativo na sinalização de CD40, já que esse tratamento aumenta a sua expressão (21).

No presente estudo, demonstramos que a sinalização através de CD40 em células  $\beta$  induziu um aumento da citocina IL-6 e quimiocinas pró-inflamatórias IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  tanto a nível da transcrição como protéico (Figura 3A, B, Tabela 1). Embora nesse estudo tenhamos focado a atenção a essas 4 citocinas, é possível que o número de citocinas e quimiocinas ativadas via CD40 seja maior. A observação da expressão de mediadores inflamatórios intra-ilhota como, IL-6, IL-8 e MCP-1, após o isolamento e antes de qualquer tipo de estímulo, estão de acordo com resultados prévios e enfatiza a condição traumática das ilhotas isoladas (17, 18, 44, 45). É de especial interesse a secreção de MIP-1 $\beta$ . Nossos resultados mostram pela primeira vez, por três técnicas diferentes (tecnologia luminex, RT-PCR e imunofluorescência dupla) que após a ativação de CD40 há secreção de MIP-1 $\beta$  a partir das células que coram para a insulina. MIP-1 $\beta$  é uma quimiocina da subfamília da CC, previamente mostrada unicamente sendo secretada por monócitos ativados (46). Como outras

quimiocinas, MIP-1 $\beta$  pode coordenar respostas inflamatórias pelo recrutamento e ativação de células hematopoiéticas pró-inflamatórias. A expressão de seu receptor, a molécula CCR5, ativa seletivamente células dendríticas assim como também linfócitos Th1 (47), e induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias associadas com a insulite (48). Os resultados sustentam a idéia de que junto com IL-6, IL-8, e MCP-1, as células  $\beta$  também podem secretar a quimiocina MIP-1 $\beta$  após a interação CD40-CD40L.

Resultados prévios de células que não pertencem ao sistema imune têm mostrado uma quantidade significativa de genes induzidos por CD40, associados com a co-estimulação (49), secreção de citocinas (7, 30, 50), indução de apoptose (51, 52) ou sobrevivência (3, 53). Embora o mecanismo pelo qual o CD40 induz a secreção de IL-6, IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  nas células  $\beta$  não esteja totalmente compreendido, similar ao que é reportado para monócitos/macrófagos (28-30) e células sinoviais (50), investigamos as conseqüências da sinalização de CD40 utilizando os bloqueadores de MEK1/2 e NF- $\kappa$ B, PD98059 e Bay117082, respectivamente. Nesse sentido, a ativação de CD40 em células  $\beta$  pancreáticas induziu a produção de mediadores solúveis através das vias inflamatórias Raf/MEK/ERK e NF- $\kappa$ B, mostrando que, o pré-tratamento das células com esses inibidores antes e durante a ativação de CD40 reduziu a secreção de citocinas inflamatórias. Porém, enquanto o PD98059 reduziu a secreção de mediadores inflamatórios induzidos puramente pelo CD40, a ação de Bay117082 foi além do estímulo induzido pelo CD40. Consistente e de acordo a resultados prévios (32, 44, 54), as condições de stress associadas à procura do pâncreas, aumentadas pelo processo do isolamento das ilhotas *per se*, pode induzir a ativação do NF- $\kappa$ B e secreção de mediadores inflamatórios por uma via independente de CD40. Enquanto outros estudos utilizando células diferentes têm reportado que o estímulo de CD40

também parece ativar outros membros da família MAPK, como p38 e a proteína quinase ativada por stress (SAPK) (55), os resultados complementares a este trabalho mostram que essas duas vias não estão ativadas nas células  $\beta$  pancreáticas de insulinoma após a ativação de CD40 (Barbé-Tuana, F.M. and R.L. Pastori, resultados não publicados).

Mostramos dados convincentes que sugerem que, o processo inflamatório, consequência da secreção de citocinas e quimiocinas dependentes da ação de CD40, é nocivo para a viabilidade das células  $\beta$ . As citocinas pró-inflamatórias podem induzir ou acelerar o início do processo auto-imune em ilhotas pancreáticas, secretados por macrófagos e linfócitos T que levam à morte das células  $\beta$  (15, 56-60), enquanto que a inibição das vias inflamatórias que suprimem a secreção de citocinas melhoram a função do enxerto (61). Diferente dos modelos experimentais onde as citocinas são suplementadas, (20, 57), no presente estudo, utilizamos células endócrinas purificadas, investigando a morte das células  $\beta$  pela ação do meio de cultura condicionado pela ativação de CD40. Nesse sentido, os resultados apoiam a idéia de que as células  $\beta$ , também contribuem ao seu próprio dano citotóxico. Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de que o meio condicionado contenha outros mediadores pró-inflamatórios não conhecidos que atuem de forma sinérgica junto com IL-6, IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  para a indução de morte das células  $\beta$ , as quais poderiam ser responsáveis pela função fisiológica das células  $\beta$  e o resultado do transplante.

Previamente foi reportado que vários tipos celulares que expressam o receptor de CD40, incluindo as células  $\beta$  pancreáticas, são capazes de regular a expressão de CD40 em um ambiente inflamatório (2, 4-6, 18, 21, 62). Mais ainda, os novos resultados do presente estudo evidenciam que as citocinas e quimiocinas pró-



inflamatórias induzidas pela estimulação de CD40 podem aumentar a expressão de ICAM-1 em células  $\beta$ , molécula que também é regulada pela atividade de fator nuclear NF- $\kappa$ B (32), e portanto amplificar potencialmente, a resposta inflamatória. Como as citocinas e quimiocinas são reguladores do recrutamento de macrófagos e linfócitos, a indução de ICAM-1 poderia também estar envolvida na destruição das células  $\beta$ , orquestrando um processo inflamatório dependente de CD40 que contribua à perda do enxerto e rejeição.

É interessante ressaltar que tem sido relatada uma associação entre pacientes com diabetes mellitus tipo 1 e níveis plasmáticos elevados da molécula de CD40L expressa em plaquetas ativadas ou circulando na sua forma solúvel (63-66). Desta forma, a interação do receptor de CD40 presente nas células  $\beta$  de ilhotas recém transplantadas poderia comprometer o destino do transplante e, potencialmente, contribuir ao processo de recorrência de destruição auto-imune das células  $\beta$  pancreáticas, perpetuando assim o processo inflamatório.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi financiado pela Diabetes Research Institute Foundation e a Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF). F.M.B.T. é financiada pela fundação brasileira CAPES. Agradecemos ao Imaging Core Facility da University of Miami, parcialmente auxiliada pela Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF), por permitir o acesso ao microscópio confocal.

## Referências

1. van Kooten, C., and Banchereau, J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67:2-17.
2. Galy, A.H., and Spits, H. 1992. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol* 149:775-782.
3. Hess, S., Gottfried, E., Smola, H., Grunwald, U., Schuchmann, M., and Engelmann, H. 1998. CD40 induces resistance to TNF-mediated apoptosis in a fibroblast cell line. *Eur J Immunol* 28:3594-3604.
4. Karmann, K., Hughes, C.C., Schechner, J., Fanslow, W.C., and Pober, J.S. 1995. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4342-4346.
5. Smith, T.J., Sciaky, D., Phipps, R.P., and Jennings, T.A. 1999. CD40 expression in human thyroid tissue: evidence for involvement of multiple cell types in autoimmune and neoplastic diseases. *Thyroid* 9:749-755.
6. Sugimoto, K., Shiraki, K., Ito, T., Fujikawa, K., Takase, K., Tameda, Y., Moriyama, M., and Nakano, T. 1999. Expression of functional CD40 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 30:920-926.
7. Vosters, O., Beuneu, C., Nagy, N., Movahedi, B., Aksoy, E., Salmon, I., Pipeleers, D., Goldman, M., and Verhasselt, V. 2004. CD40 expression on human pancreatic duct cells: role in nuclear factor-kappa B activation and production of pro-inflammatory cytokines. *Diabetologia* 47:660-668.
8. Falco, A., Romano, M., Iapichino, L., Collura, M., and Davi, G. 2004. Increased soluble CD40 ligand levels in cystic fibrosis. *J Thromb Haemost* 2:557-560.
9. Ohta, Y., and Hamada, Y. 2004. In situ Expression of CD40 and CD40 ligand in psoriasis. *Dermatology* 209:21-28.
10. Urbich, C., and Dimmeler, S. 2004. CD40 and vascular inflammation. *Can J Cardiol* 20:681-683.
11. Baker, M.S., Chen, X., Rotramel, A., Nelson, J., and Kaufman, D.B. 2003. Proinflammatory cytokines induce NF-kappaB-dependent/NO-independent chemokine gene expression in MIN6 beta cells. *J Surg Res* 110:295-303.
12. Barshes, N.R., Wyllie, S., and Goss, J.A. 2005. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol* 77:587-597.
13. Corbett, J.A., Kwon, G., Turk, J., and McDaniel, M.L. 1993. IL-1 beta induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. *Biochemistry* 32:13767-13770.
14. Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Strynadka, K., Lakey, J.R., and Rajotte, R.V. 1996. Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3197-3202.
15. Eizirik, D.L., and Mandrup-Poulsen, T. 2001. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44:2115-2133.
16. Vives-Pi, M., Somoza, N., Fernandez-Alvarez, J., Vargas, F., Caro, P., Alba, A., Gomis, R., Labeta, M.O., and Pujol-Borrell, R. 2003. Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin Exp Immunol* 133:208-218.
17. Chen, M.C., Proost, P., Gysemans, C., Mathieu, C., and Eizirik, D.L. 2001. Monocyte chemoattractant protein-1 is expressed in pancreatic islets from prediabetic NOD mice and in interleukin-1 beta-exposed human and rat islet cells. *Diabetologia* 44:325-332.
18. Piemonti, L., Leone, B.E., Nano, R., Saccani, A., Monti, P., Maffi, P., Bianchi, G., Sica, A., Peri, G., Melzi, R., et al. 2002. Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation. *Diabetes* 51:55-65.
19. Christen, U., and Von Herrath, M.G. 2004. IP-10 and type 1 diabetes: a question of time and location. *Autoimmunity* 37:273-282.
20. Movahedi, B., Van de Castele, M., Caluwe, N., Stange, G., Breckpot, K., Thielemans, K., Vreugdenhil, G., Mathieu, C., and Pipeleers, D. 2004. Human pancreatic duct cells can produce tumour necrosis factor-alpha that damages neighbouring beta cells and activates dendritic cells. *Diabetologia* 47:998-1008.

21. Klein, D., Barbe-Tuana, F., Pugliese, A., Ichii, H., Garza, D., Gonzalez, M., Molano, R.D., Ricordi, C., and Pastori, R.L. 2005. A functional CD40 receptor is expressed in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 48:268-276.
22. Ricordi, C., Lacy, P.E., Finke, E.H., Olack, B.J., and Scharp, D.W. 1988. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37:413-420.
23. Ichii, H., Inverardi, L., Pileggi, A., Molano, R.D., Cabrera, O., Caicedo, A., Messinger, S., Kuroda, Y., Berggren, P.O., and Ricordi, C. 2005. A novel method for the assessment of cellular composition and beta-cell viability in human islet preparations. *Am J Transplant* 5:1635-1645.
24. Hughes, A.K., Stricklett, P.K., and Kohan, D.E. 2001. Shiga toxin-1 regulation of cytokine production by human glomerular epithelial cells. *Nephron* 88:14-23.
25. Gmyr, V., Belaich, S., Muharram, G., Lukowiak, B., Vandewalle, B., Pattou, F., and Kerr-Conte, J. 2004. Rapid purification of human ductal cells from human pancreatic fractions with surface antibody CA19-9. *Biochem Biophys Res Commun* 320:27-33.
26. Ichii, H., Inverardi, L., Pileggi, A., Molano, R.D., Cabrera, O., Caicedo, A., Messinger, S., Kuroda, Y., Berggren, P.O., and Ricordi, C. 2004. A novel method for the assessment of cellular composition and beta-cell viability in human islet preparations. *Am Soc Transplant:(Abstr)*.
27. Lukowiak, B., Vandewalle, B., Riachy, R., Kerr-Conte, J., Gmyr, V., Belaich, S., Lefebvre, J., and Pattou, F. 2001. Identification and purification of functional human beta-cells by a new specific zinc-fluorescent probe. *J Histochem Cytochem* 49:519-528.
28. Mukundan, L., Bishop, G.A., Head, K.Z., Zhang, L., Wahl, L.M., and Suttles, J. 2005. TNF receptor-associated factor 6 is an essential mediator of CD40-activated proinflammatory pathways in monocytes and macrophages. *J Immunol* 174:1081-1090.
29. Pearson, L.L., Castle, B.E., and Kehry, M.R. 2001. CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Int Immunol* 13:273-283.
30. Suttles, J., Milhorn, D.M., Miller, R.W., Poe, J.C., Wahl, L.M., and Stout, R.D. 1999. CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an ERK1/2-dependent pathway. A target of interleukin (il)-4 and il-10 anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274:5835-5842.
31. Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., and Saltiel, A.R. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270:27489-27494.
32. Cardozo, A.K., Heimberg, H., Heremans, Y., Leeman, R., Kutlu, B., Kruhoffer, M., Orntoft, T., and Eizirik, D.L. 2001. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276:48879-48886.
33. Ricordi, C., and Strom, T.B. 2004. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. *Nat Rev Immunol* 4:259-268.
34. Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., and Rajotte, R.V. 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343:230-238.
35. Shapiro, A.M., Ricordi, C., and Hering, B. 2003. Edmonton's islet success has indeed been replicated elsewhere. *Lancet* 362:1242.
36. Lakey, J.R., Burridge, P.W., and Shapiro, A.M. 2003. Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transpl Int* 16:613-632.
37. Kenyon, N.S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranuncoli, A., Oliveira, M., Wagner, J.L., Kirk, A.D., Harlan, D.M., Burkly, L.C., and Ricordi, C. 1999. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8132-8137.
38. Kirk, A.D., Harlan, D.M., Armstrong, N.N., Davis, T.A., Dong, Y., Gray, G.S., Hong, X., Thomas, D., Fechner, J.H., Jr., and Knechtle, S.J. 1997. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8789-8794.
39. Larsen, C.P., Alexander, D.Z., Hollenbaugh, D., Elwood, E.T., Ritchie, S.C., Aruffo, A., Hendrix, R., and Pearson, T.C. 1996. CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway. *Transplantation* 61:4-9.
40. Parker, D.C., Greiner, D.L., Phillips, N.E., Appel, M.C., Steele, A.W., Durie, F.H., Noelle, R.J., Mordes, J.P., and Rossini, A.A. 1995. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9560-9564.

41. Balasa, B., Krahl, T., Patstone, G., Lee, J., Tisch, R., McDevitt, H.O., and Sarvetnick, N. 1997. CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 159:4620-4627.
42. Mohan, C., Shi, Y., Laman, J.D., and Datta, S.K. 1995. Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *J Immunol* 154:1470-1480.
43. Berney, T., Pileggi, A., Molano, R.D., Poggioli, R., Zahr, E., Ricordi, C., and Inverardi, L. 2003. The effect of simultaneous CD154 and LFA-1 blockade on the survival of allogeneic islet grafts in nonobese diabetic mice. *Transplantation* 76:1669-1674.
44. Bottino, R., Balamurugan, A.N., Tse, H., Thirunavukkarasu, C., Ge, X., Profozich, J., Milton, M., Ziegenfuss, A., Trucco, M., and Piganelli, J.D. 2004. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes* 53:2559-2568.
45. Johansson, U., Olsson, A., Gabrielsson, S., Nilsson, B., and Korsgren, O. 2003. Inflammatory mediators expressed in human islets of Langerhans: implications for islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 308:474-479.
46. Maurer, M., and von Stebut, E. 2004. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1882-1886.
47. Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., et al. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187:129-134.
48. Fox, C.J., and Danska, J.S. 1998. Independent genetic regulation of T-cell and antigen-presenting cell participation in autoimmune islet inflammation. *Diabetes* 47:331-338.
49. Yang, Y., and Wilson, J.M. 1996. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 273:1862-1864.
50. Harigai, M., Hara, M., Kawamoto, M., Kawaguchi, Y., Sugiura, T., Tanaka, M., Nakagawa, M., Ichida, H., Takagi, K., Higami-Ohsako, S., et al. 2004. Amplification of the synovial inflammatory response through activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappaB using ligation of CD40 on CD14+ synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:2167-2177.
51. Gallagher, N.J., Eliopoulos, A.G., Agathangelo, A., Oates, J., Crocker, J., and Young, L.S. 2002. CD40 activation in epithelial ovarian carcinoma cells modulates growth, apoptosis, and cytokine secretion. *Mol Pathol* 55:110-120.
52. Wingett, D.G., Vestal, R.E., Forcier, K., Hadjokas, N., and Nielson, C.P. 1998. CD40 is functionally expressed on human breast carcinomas: variable inducibility by cytokines and enhancement of Fas-mediated apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 50:27-36.
53. Ghia, P., Boussiotis, V.A., Schultze, J.L., Cardoso, A.A., Dorfman, D.M., Gribben, J.G., Freedman, A.S., and Nadler, L.M. 1998. Unbalanced expression of bcl-2 family proteins in follicular lymphoma: contribution of CD40 signaling in promoting survival. *Blood* 91:244-251.
54. Kutlu, B., Darville, M.I., Cardozo, A.K., and Eizirik, D.L. 2003. Molecular regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 52:348-355.
55. Aicher, A., Shu, G.L., Magaletti, D., Mulvania, T., Pezzutto, A., Craxton, A., and Clark, E.A. 1999. Differential role for p38 mitogen-activated protein kinase in regulating CD40-induced gene expression in dendritic cells and B cells. *J Immunol* 163:5786-5795.
56. Arnush, M., Scarim, A.L., Heitmeier, M.R., Kelly, C.B., and Corbett, J.A. 1998. Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *J Immunol* 160:2684-2691.
57. Delaney, C.A., Pavlovic, D., Hoorens, A., Pipeleers, D.G., and Eizirik, D.L. 1997. Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology* 138:2610-2614.
58. Suarez-Pinzon, W., Sorensen, O., Bleackley, R.C., Elliott, J.F., Rajotte, R.V., and Rabinovitch, A. 1999. Beta-cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on beta-cells and proinflammatory cytokine expression in islets. *Diabetes* 48:21-28.
59. Toyoda, H., Formby, B., Magalong, D., Redford, A., Chan, E., Takei, S., and Charles, M.A. 1994. In situ islet cytokine gene expression during development of type I diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Immunol Lett* 39:283-288.
60. Widmer, U., Manogue, K.R., Cerami, A., and Sherry, B. 1993. Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines. *J Immunol* 150:4996-5012.

61. Matsuda, T., Omori, K., Vuong, T., Pascual, M., Valiente, L., Ferreri, K., Todorov, I., Kuroda, Y., Smith, C.V., Kandeel, F., et al. 2005. Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function. *Am J Transplant* 5:484-493.
62. Hess, S., and Engelmann, H. 1996. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J Exp Med* 183:159-167.
63. Harding, S.A., Sommerfield, A.J., Sarma, J., Twomey, P.J., Newby, D.E., Frier, B.M., and Fox, K.A. 2004. Increased CD40 ligand and platelet-monocyte aggregates in patients with type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 176:321-325.
64. Targher, G., and Zoppini, G. 2004. Soluble CD40L in young type 1 diabetic individuals without clinical microvascular and macrovascular complications. *Diabetes Care* 27:1236-1237.
65. Varo, N., Vicent, D., Libby, P., Nuzzo, R., Calle-Pascual, A.L., Bernal, M.R., Fernandez-Cruz, A., Veves, A., Jarolim, P., Varo, J.J., et al. 2003. Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones. *Circulation* 107:2664-2669.
66. Yngen, M., Ostenson, C.G., Hu, H., Li, N., Hjemdahl, P., and Wallen, N.H. 2004. Enhanced P-selectin expression and increased soluble CD40 Ligand in patients with Type 1 diabetes mellitus and microangiopathy: evidence for platelet hyperactivity and chronic inflammation. *Diabetologia* 47:537-540.

## TRABALHO 3

### **CD40-CD40 ligand interaction in pancreatic islets activates a pro-inflammatory pathway that induces $\beta$ -cell death.**

Florencia M. Barbé-Tuana, Dagmar Klein, Hirohito Ichii, Dora Berman-Weinberg, Norma S. Kenyon, Camillo Ricordi, Ricardo L. Pastori.

Diabetes Research Institute, University of Miami Leonard M. Miller School of Medicine.

Please address correspondence to:

R. L. Pastori, Ph.D.

Diabetes Research Institute

University of Miami Leonard M. Miller School of Medicine

1450 NW 10th Avenue, Miami, FL 33136, USA

Tel: +1 (305) 243-5349

Fax: +1 (305) 243-4404

e-mail address: [rpastori@med.miami.edu](mailto:rpastori@med.miami.edu)

**Nonstandard abbreviations used:** intracellular adhesion molecule (ICAM); islet equivalent (IEQ); mitogen extracellular kinase (MEK); macrophage inflammatory protein (MIP); monocyte chemoattractant protein (MCP); newport green (NG); recombinant human soluble CD40 ligand (rhsCD40L); 7-aminoactinomycin D (7-AAD); stress activated protein kinase (SAPK).

## **Abstract**

Pancreatic islet transplantation is becoming an alternative to insulin therapy in patients suffering from the most severe forms of Type 1 diabetes. However, early islet loss caused by non-specific inflammation at the site of implantation is a mayor obstacle in islet transplantation. We recently discovered that CD40, a member of TNF receptor family, is expressed in  $\beta$ -cells. CD40 expression in non-hematopoietic cells is generally associated with inflammation; therefore, we investigated the possible pro-inflammatory role of CD40 in islets. Human islets, or sorted  $\beta$  cells incubated with recombinant human CD40L secreted IL-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as well as macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), a chemokine never previously reported in islets. RT-PCR confirmed the induction of cytokines at transcriptional level. MIP-1 $\beta$  expression in insulin-producing  $\beta$  cells was verified by double-immunofluorescence staining. CD40-CD40L interaction activates ERK1/2 MAPK and NF- $\kappa$ B pathways, as blockers of these pathways inhibited cytokine/chemokines production in islets. Moreover, incubation of islets with conditioned media from CD40L-treated islet cells induced cell death in  $\beta$  cells and up-regulated the expression of ICAM-1. Our results indicate that the expression of CD40 in  $\beta$  cells may enhance the inflammatory microenvironment, thus contributing to islet loss.

**Keywords:** CD40, chemokines, cytokines, diabetes mellitus, ERK, ICAM-1, inflammation, islets, MAPK, NF- $\kappa$ B.

## Introduction

CD40 is a TNF receptor (TNFR) family member expressed in many different cell types. Engagement of CD40 in B lymphocytes, macrophages, and professional APC by its counter part, the CD40 ligand (CD40L) also called CD154, has a principal role in the immune system, inducing cell survival and proliferation, differentiation and also isotype class switching in B lymphocytes (1).

However CD40 expression in cells others than hematopoietic such as, endothelial, thymic epithelial, normal and neoplastic thyroid, carcinomas, transformed cell lines and pancreatic duct cells (2-7), is mainly associated with non-specific inflammatory responses. These events contribute to the induction of cytokine and chemokine synthesis and secretion, and also enhancement of co-stimulatory molecules, resulting in the recruitment and activation of hematopoietic cells. For example, CD40 stimulation plays a pivotal role in diseases such as psoriasis, atherosclerosis and cystic fibrosis (8-10).

Transplanted islets are vulnerable to rapid graft loss, partially attributed to early local pro-inflammatory cytokine secretion of IL-1, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (11-14). Pancreatic  $\beta$  cells express a wide array of pro-inflammatory molecules as cytokine (15), Toll-like and LPS receptors (16), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (17, 18) and interferon gamma inducible protein-10 (IP-10) (19), which support an inflammatory milieu damaging a high proportion of endocrine  $\beta$  cells. Moreover, ductal cells, that are in close contact to islets cells and also bear a CD40 receptor, secrete IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  upon CD40 ligation (7), that can induce dendritic cell activation in vitro and  $\beta$ -cell apoptosis (20).



We have recently demonstrated CD40 expression in mouse and human pancreatic  $\beta$  cells, which was upregulated by incubation with a cocktail of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ). Signaling through this receptor activates the pro-inflammatory transcription factor NF- $\kappa$ B (21).

In this study, we specifically demonstrate that upon CD40 stimulation in human and non-human primate pancreatic  $\beta$  cells, there is activation and induction of the pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  through Raf/MEK/ERK and the NF- $\kappa$ B pathways. Cytokines and chemokines secreted by CD40 signaling caused cell death in  $\beta$  cells. Furthermore, CD40-CD40L interaction up-regulates the expression intracellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) that could contribute to  $\beta$  cell death and persistence of inflammation after islet transplantation.

## Methods

**Human and non human primate islets.** Human islets were provided by the cGMP facility at the Diabetes Research Institute, University of Miami, and isolated following the automated method developed by Ricordi et al. (22). 10,000 IEQ from human cadaveric donor were incubated at 37 °C before manipulation. Twenty-four h later, human islets were gently dissociated into disaggregated islets cells with a cocktail of digestive enzymes (Accutase, Innovative Cell Technologies Inc., San Diego, CA) for 12 min at 37 °C. The action of the enzymes was stopped by adding v/v of FBS. Dissociated islets cells were used in further experiments. Non human primate islets were provided by Dr. Norma S. Kenyon lab, at the same institution, and isolated as explained above.

**Magnetic bead sorting.** Dissociated islet cells were depleted from CA19-9 ductal positive cells in an indirect labeling protocol using MACS microbeads technology (Miltenyi Biotec Inc. Auburn, CA). Briefly, single cells were labeled with mouse mAb anti-human CA19-9 (1:100, NCL-CA19-9 IgG isotype, Novocastra, Newcastle, UK) for 15 min at 4 °C, washed twice with DPBS pH 7.2, 2 mM EDTA supplemented with BSA 0.5%, and subsequently incubated with 20 µl of MACS goat anti-mouse IgG microbeads (Miltenyi Biotec Inc.) for 15 min at 4 °C. After two washes in DPBS-EDTA buffer, cells were manually separated by magnetic sorting using LS MACS columns (Miltenyi Biotec Inc.). The cell suspension was positive selected for CA19-9 ductal cells, and the unbound population was collected. The procedure was repeated. Depletion of CA19-9 ductal cells in the negative fraction was confirmed by flow cytometry using as secondary antibody anti-mouse IgG antibody (FITC conjugated 1:100, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO).

The CA19-9 negative population was assed by flow cytometry for the presence of contaminating cells as, B lymphocytes (CD19), macrophages (CD14) and dendritic cells (CD11c), which also express the CD40 receptor.

**Flow cytometry sorting of  $\beta$  cells.** Dispersed human and non human primate islets were stained with 1  $\mu$ M Newport Green PDX acetoxymethylether (NG, Molecular Probes, OR) for 1h30 min at 37°C in DPBS without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . After final wash in DPBS, cells were stained with 7-aminoactinomycin D (7-AAD, Molecular Probes) (23). Negative 7-AAD cells were sorted according to their NG staining in NG<sup>bright</sup> ( $\beta$  cells) and NG<sup>dim/neg</sup> (non  $\beta$  cells) using a FACSVantage cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

**Cytokine induction and detection.** Depleted or sorted human and non human primate islet cells were incubated in MM1 media and stimulated with the recombinant human soluble CD40L (rhsCD40L) + enhancer (1 $\mu$ g/ml, Alexis Biochemicals, San Diego, CA) at 37 °C. The MEK1/2 and I $\kappa$ B phosphorylation inhibitors, PD98059 (50  $\mu$ M, Cell Signaling Technology, Inc. Beverly, MA) or Bay117082 (5  $\mu$ M, Biomol Int. L.P., Plymouth Meeting, PA), were added to the cells 1 h before and for the duration of the treatment.

Twenty-four h later, the supernatant of the cells was collected. Fifty  $\mu$ l of untreated or treated pancreatic cell culture supernatant was used to simultaneously detect IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  by luminex technology (Bio-Plex System, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). All reagents were provided by the Bio-Plex system and manipulation was done following manufacturer protocol (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Samples were run in duplicates and each experiment

repeated at least three times. Cytokines concentrations were calculated from a standard curve.

**Reverse transcriptase and polymerase chain reaction.** Total RNA was isolated with a commercial kit (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA), subjected to DNase I digestion (Ambion, Austin, TX) and used as a template for cDNA synthesis (Superscript first-strand synthesis system for RT-PCR, Invitrogen, CA). Specific primers for different human inflammatory cytokines IL-6 (5'ACATCCTCGACGGCATCTCAG<sup>3'</sup> and 5'TGGCTTGTTCCCTCACTACTCT<sup>3'</sup> (24), IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  (Biosource International, Camarillo, CA) were used. Amplification of  $\beta$ -actin was used as an internal control. PCR products were separated in a 3% agarose gel (Invitrogen), stained with EtBr and analyzed under UV light.

**Immunofluorescence of islet cells.** Dissociated sorted  $\beta$  cells were air dried at RT on glass slides, fixed in 2.5% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA) for 15 min, washed three times with Optimax 1x (Bio-Genex, San Ramon, CA) and treated with universal protein blocker (Biogenex) to prevent nonspecific reactions. Slides were incubated with a goat anti-human MIP-1 $\beta$  (5  $\mu$ g/ml, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) O/N at 4 °C, washed and incubated with a secondary chicken anti-goat Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes) conjugate. The staining for either insulin or glucagon was performed following the same protocol, using goat anti rabbit Alexa Fluor 568 (1:200, Molecular Probes) conjugate as secondary antibody. Omission of the primary antibody served as negative control. Slides were mounted using prolong antifade mounting solution (Molecular Probes).

**TMRE staining:** Islets were dissociated as explained before and stained according to manufacturer instructions (Roche).

**Statistical analysis.** When appropriate, results were analyzed by Student's *t* test. Group comparisons were performed using one-way ANOVA and the Tukey's method for posteriori contrasts using the Sigma-stat 2 software. Data is presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

**CD40 stimulation results in secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by human and non human primate pancreatic cells.** We investigated whether CD40 stimulation in pancreatic cells was associated with secretion of pro-inflammatory mediators. First, we depleted human pancreatic islets cells from contaminating duct cells, also expressing the CD40 receptor (7) by selection with magnetic bead technology using a pan-ductal membrane antibody carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9). This antibody specifically stained main duct, interlobular, intralobular, intercalated, and centroacinar ductal cells and has been used to purify pancreatic duct cells (25). Fluorescence activated cell sorting analysis revealed that initial human islet preparations contained a high proportion of ductal cells, within a range of 30-65%. Manually depletion of CA19-9 cells with magnetic columns was successfully achieved and shown to be less than 1.5-2% (Figure 1). As B lymphocytes, macrophages or dendritic cells also express the CD40 receptor, the CA19-9 negative population was also screened by flow cytometry with markers for these populations. In our preparations, none of these cells types were found (data not shown).

In order to demonstrate cytokine and chemokine secretion, supernatant from 24 h of cultured untreated or rhCD40L stimulated, depleted, human pancreatic cells was assessed using luminex technology. Table 1 summarizes the findings and shows that CD40 engagement induced or increased IL-6, IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  secretion in human islet cells. Interestingly no detectable or very low levels of others pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  were found.

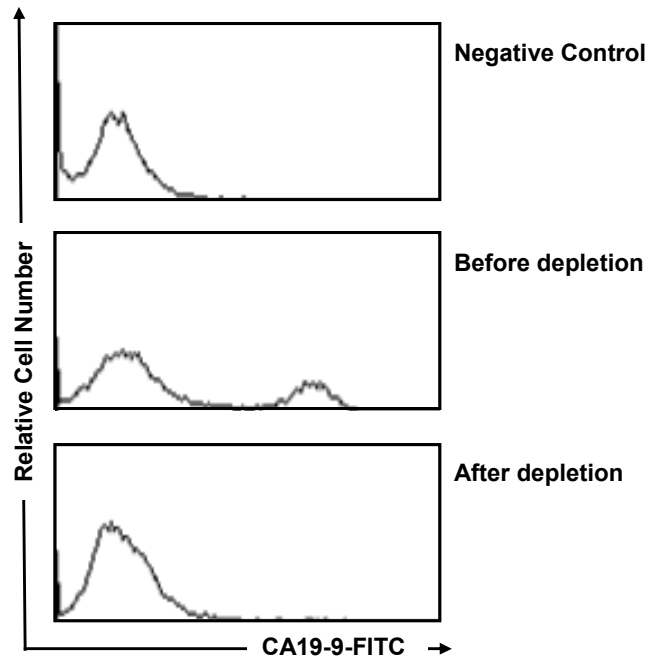


Figure 1. Depletion of CA19-9 positive ductal cells from pancreatic human islet cells. Human islet cells were dispersed into single cells and magnetically depleted from ductal cells using anti-human CA19-9 mAb followed by goat anti-mouse IgG microbeads. After separation, cells were fluorescently labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugate anti-mouse IgG, or isotype matched antibody and analyzed by flow cytometry.

We also used a different specie as a source of pancreatic islets. The non-human primate cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) islet preparations constitute a highly pure source of  $\beta$  cells (up to 80%) with a very low percentage of ductal cell contamination as assessed by flow cytometry ( $< 1\%$ ) (Norma S. Kenyon and Dora Berman-Weinberg, unpublished results).

Table 1. Pro-inflammatory cytokine secretion from isolated human and non human primate islet cells activated with CD40L.

<b>Protein concentration (pg/ml)</b>			
<b>Human Islet Preparation<sup>A</sup></b>			
	<b>Control</b>	<b>CD40L</b>	<b>P value</b>
<b>IL-6</b>	2.81 ± 0.71	67.04 ± 3.65	***
<b>IL-8</b>	484 ± 30	7751 ± 218	***
<b>MCP-1</b>	6.69 ± 0.01	121 ± 15	***
<b>MIP-1β</b>	10.59 ± 0.36	125 ± 6	***
<b>Non Human Islet Preparation</b>			
<b>IL-6</b>	2.76 ± 0.74	8.87 ± 2.02	**
<b>IL-8</b>	381 ± 56	804 ± 97	***
<b>MCP-1</b>	437 ± 133	937 ± 38	***
<b>MIP-1β</b>	20.70 ± 2.66	56.85 ± 4.86	***

Data are means ± SD. Comparisons were performed using Student's *t* test. Values of \*\* $P \leq 0.002$ ; \*\*\* $P \leq 0.0001$  were considered statistically significant. <sup>A</sup>CA19-9 depleted islet cells. Human or non human primate islet cells were incubated at 37 °C in the presence or not of the CD40L + enhancer (1ug/ml). After 24 h, supernatants from cultured pancreatic cells were evaluated by luminex technology for IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ, MCP-1, MIP-1β, and TNF-α secretion.

However, as CD40 expression has never been reported before in non-human primate islets, we first investigated its expression. Western blot analysis shows that the CD40 receptor is also expressed in non human primate islets cells (Figure 2A). In order to identify which cells express the CD40 molecule, non human primate islets cells were stained with Newport green (NG) and 7-aminoactinomycin D (7-AAD). NG in its ester form (NG-Ac), is a cell permeable, Zn-binding dye, which shows selective binding to human β cells (26, 27). Flow cytometry analysis showed that non-human primate β cells stain for NG (confirmed by immunofluorescence, data not shown), and these cells



express the CD40 receptor (Figure 2B). Similarly as in human pancreatic cells, after 24 h of incubation with the rhsCD40L, an increase in IL-6, IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  was also observed in non human primate cells (Table 1). We also found increased secretion of IL-6, IL-8 and MIP-1 $\beta$  cytokines, in human and non-human primate sorted  $\beta$  cells (purity > 90%) when stimulated with rhsCD40L (data not shown).

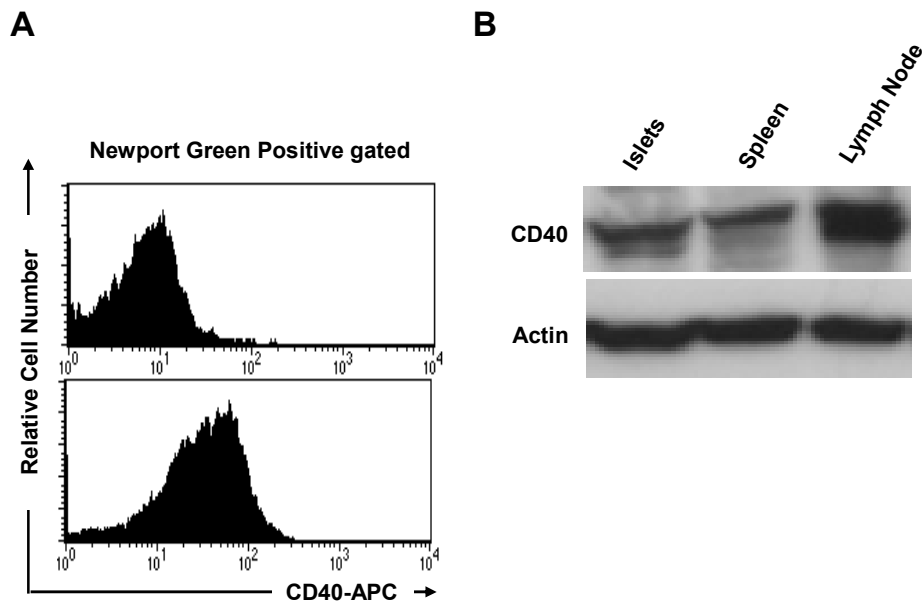


Figure 2. The CD40 receptor is expressed in non human primate  $\beta$  cells. A) CD40 expression was analyzed by flow cytometry in dispersed non human primate pancreatic islets. Cells were stained with NG and 7-AAD and a fluorescent antibody against CD40 or an isotype-matched antibody. Histograms shows the expression of isotype control, or CD40 expression in non human primate live  $\beta$  cells. B) CD40 expression by western blot in pancreatic islets, spleen or lymph node.

In addition, pro-inflammatory IL-6, IL-8 and MIP-1 $\beta$  cytokine and chemokines synthesis were confirmed at the mRNA expression level. We used sorted human  $\beta$  cells treated or not with the rhsCD40L molecule. After 24 h of activation, cultured cells were analyzed by RT-PCR. As shown in Figure 3A, a dramatic enhancement of IL-6, IL-8 and MIP-1 $\beta$  was detected in sorted human  $\beta$  islet cells after CD40 activation.

As expression of MIP-1 $\beta$  in  $\beta$  cells has never been reported before, we used double-immunofluorescence staining to confirm its expression. As depicted in Figure 3B, confocal microscopy analysis confirms that human insulin positive cells also express the MIP-1 $\beta$  chemokine. The results supported by luminex technology, RT-PCR and immunofluorescence further confirm the idea that islet  $\beta$  cells can exhibit effectors functions through inflammatory mediators to induce or maintain a local inflammatory state.

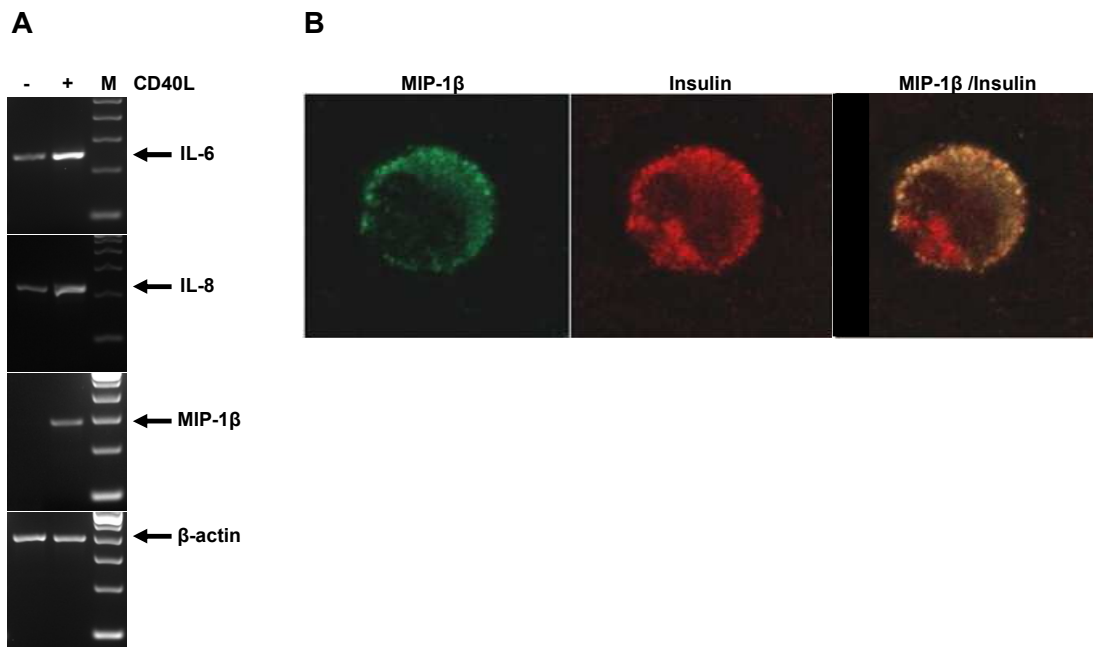


Figure 3. Detection of cytokines and chemokines in human sorted  $\beta$  cells after CD40 stimulation by RT PCR and immunofluorescence. Human pancreatic islet cells were dispersed into single cells, stained with NG and 7-AAD, and sorted according to NG intensity. Sorted alive  $\beta$  cells (7-AAD $^{-}$ , NG $^{bright}$ ) were stimulated with the CD40L (1  $\mu$ g/ml) for 24 h. A) Agarose gel electrophoresis of IL-6, IL-8, MIP-1 $\beta$  and  $\beta$ -actin amplicons. -: no stimulated with CD40L, +: stimulated with CD40L, M: marker. B) Laser scanning confocal microscopy analysis of sorted  $\beta$  cells stained for MIP-1 $\beta$  and insulin, using double immunofluorescence (original magnification 630x).

**Pro-inflammatory cytokine and chemokine production and secretion require the activation of MEK/ERK and NF- $\kappa$ B pathways.** It is well established the importance of CD40 signaling in inflammatory responses for monocytes and macrophages (28-30) through the ERK MAPK family members. We studied the role of CD40-mediated activation of ERK1/2, and the induction of inflammatory cytokines secretion via upstream blockade. The use of the highly specific inhibitor PD98059, which prevents c-Raf mediated activation of MEK1 (31), allowed us to study the role of the Raf/MEK/ERK pathway in CD40-mediated pro-inflammatory cytokine and chemokine secretion. Similarly, Bay117082 blocks I $\kappa$ B phosphorylation.

The involvement of the Raf/MEK/ERK MAPK and NF- $\kappa$ B pathway was demonstrated on islet cell cultures. IL-6, IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  secretion was evaluated by the luminex technology in supernatants from 24h culture pretreated for 1h and during the activation phase with the MEK or I $\kappa$ B inhibitors, PD98059 and Bay 117082, respectively. Addition of PD98059 (50  $\mu$ M) or Bay 117082 (5  $\mu$ M) reduced IL-6, IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\beta$ , and blocked the CD40 signaling dependent production of these cytokines/chemokines (Figure 4). These results indicate that CD40 signaling in islet cells is also accomplished through both Raf/MEK/ERK and NF- $\kappa$ B pathways.

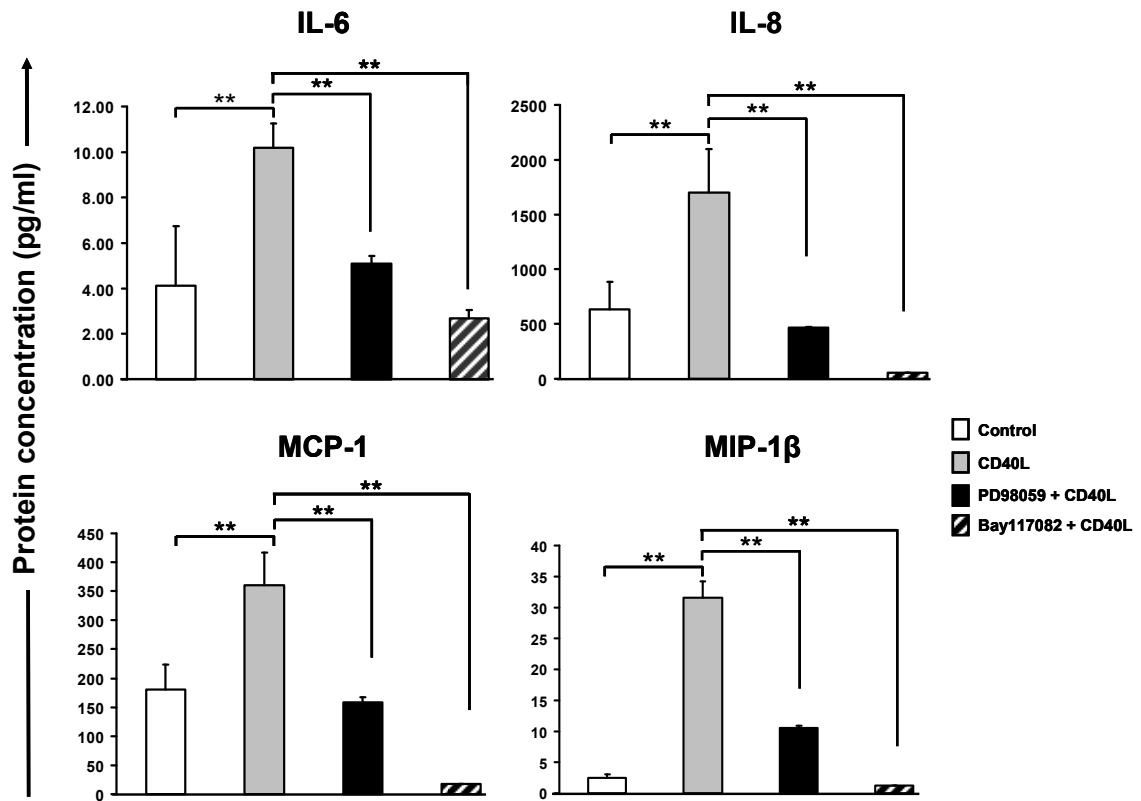


Figure 4. Pro-inflammatory cytokine secretion from isolated islet cells activated with CD40L is Raf/MEK/ERK and NF- $\kappa$ B dependent. Non human pancreatic islets cells were dispersed into single cells, and stimulated with the CD40L (1  $\mu$ g/ml) + enhancer. After 24 h, IL-6, IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  secretion was evaluated by luminex technology in supernatants from cultured control, activated with CD40L or pretreated for 1h and during the activation phase with the MEK inhibitor PD98059 (50 $\mu$ M) or the NF- $\kappa$ B inhibitor Bay117082 (5 $\mu$ M). Data are means  $\pm$  SD. Group comparisons were performed using one-way ANOVA and the Tukey's method for posteriori contrasts. \*\*:  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**CD40 dependent secretion of cytokines and chemokines induces cell death in islets and ICAM-1 protein expression.** We investigated whether soluble mediators secreted after CD40 activation could induce cell death, in newly pancreatic islet cells. We

assessed the depolarization of electrical mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi$ ) as an indicator of  $\beta$  cell viability/apoptosis (27) with tetramethylrhodamineethylester (TMRE), a dye that is only taken up into mitochondria with an intact  $\Delta\psi$ . Human islets were incubated for 36 h at 37 °C with the supernatant from previously untreated control or CD40L treated islet cells (Figure 5A). Our results shows that conditioned media from CD40L treated islet cells, decreased the mitochondrial potential of  $\beta$  cells, demonstrated by the diminution in TMRE staining, from 85% in controls to 68% in CD40L treated cells (Figure 5B), indicating that CD40 dependent signaling can also compromise  $\beta$  cell viability. Moreover, supernatant from CD40L treated islets; further enhances the expression of the intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (Figure 5C), a molecule regulated by NF- $\kappa$ B activity (32).

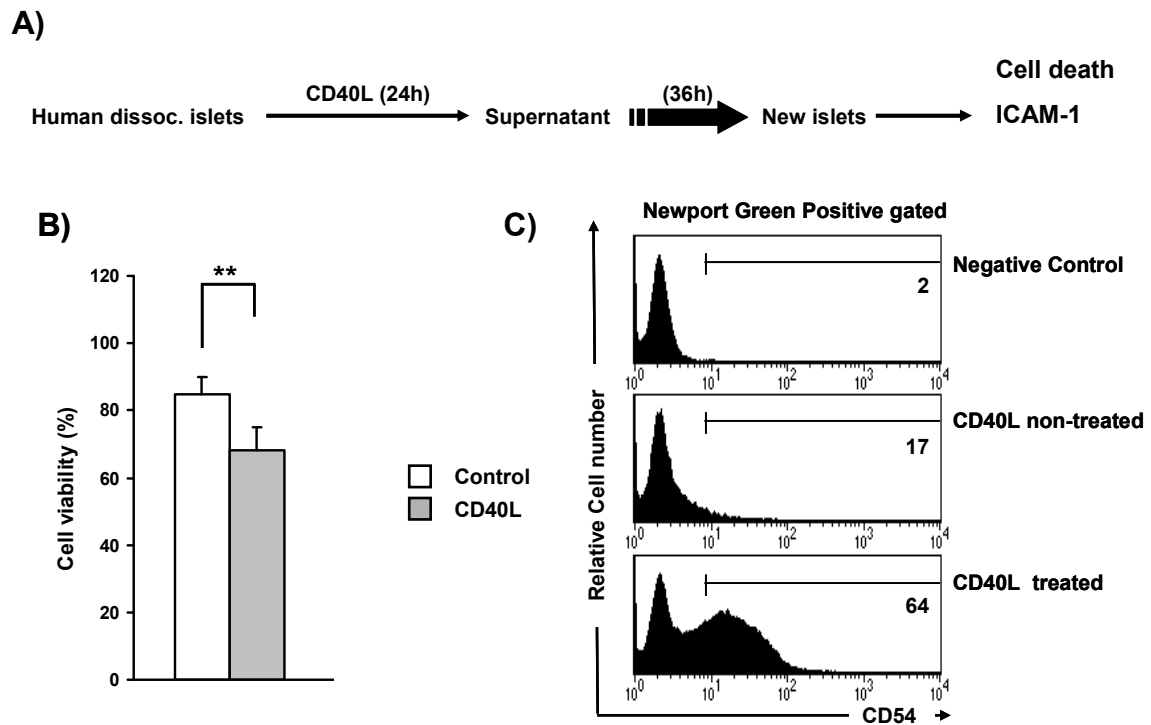


Figure 5. Conditioned media from CD40L treated cells induces up-regulation of ICAM-1 in islets cells and CD40-dependent cell death in pancreatic  $\beta$  cells. A) Human pancreatic islets cells were dispersed into single cells, depleted from CA19-9 positive ductal cells and stimulated with the CD40L (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24 h. This conditioned medium or control medium was used to stimulate newly pancreatic depleted human islets cells. After 36 h of incubation: B) TMRE staining or C) ICAM-1 expression, were analyzed by flow cytometry, on gated  $\beta$  cells (NG positive cells).

## Discussion

Human islet transplantation, used as biological replacement for insulin-secreting  $\beta$  cells in patients with severe forms of type 1 diabetes mellitus, is becoming a worldwide clinical practice, as increasing progress in islet isolation and immunosuppression techniques are becoming available (33-35). However, the islet isolation process itself, consisting in a mechanic and enzymatic digestion of the pancreas, is potentially harmful (36), and exposes islets to damaging factors that induce a general pro-inflammatory state of the transplantable islets. Additionally, after transplantation, islets are subject to hypoxia and during isolation to early non-specific inflammatory events, mainly mediated by immune cells from the recipient, which can also compromise  $\beta$  cell biological function and viability. In this regard, locally secreted pro-inflammatory molecules can direct chemoattraction, proliferation, and differentiation of specific immune cells recruited to the site of implantation that can compromise the fate of the islet graft.

The CD40 receptor is a co-stimulatory molecule, originally described on the surface of specialized hematopoietic cells as APC, B-lymphocytes, and macrophages. When these cells encounters a T-lymphocyte, the T cell receptor (TCR) from T-cells interact with the major histocompatibility complex harboring a processed peptide on the surface of the APCs. This initial encounter induces the expression of the ligand for CD40 on T-lymphocytes and subsequently, interaction with the CD40 receptor present in the APCs. As a consequence of this, in physiological conditions, the CD40-CD40L engagement up-regulates the expression of other co-stimulatory molecules, activating T cells and initiating the adaptative immune response (1). However, extensive data suggest that the CD40-CD40L interaction not only contribute in physiological cell mediated

responses, but also in immune pathological conditions as autoimmune and vascular diseases, leading to chronic inflammatory events. Indeed, the critical role of CD40 in T-cell activation is well recognized also in the fields of transplantation (37-40) and autoimmunity (41, 42) and has been confirmed using transgenic and knockout mice (1). Interference with the CD40 pathway using blocking antibodies against CD40L inhibits the spontaneous development of diabetes in non obese diabetic (NOD) mice (43) and prolongs allogeneic islet graft survival in non human primates (37, 41), in the absence of conventional immunosuppressive drugs. We have previously observed that the CD40 receptor molecule is expressed in human pancreatic  $\beta$  cells. Moreover, incubation of human islets with a cocktail of pro-inflammatory cytokines seems to play an important role in CD40 signaling, as this treatment up-regulates its expression (21).

In the present study we demonstrate that CD40 signaling in  $\beta$  cells induced upregulation of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and chemokines IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  at the transcriptional and protein level (Figure 3A, B, Table 1). Although in this study, we have focused in these 4 cytokines/chemokines, it is highly possible that the number of cytokines and chemokines activated via CD40 is much higher. Our observation of intra-islet inflammatory mediators' expression as, IL-6, IL-8 and MCP-1, upon isolation and before any kind of stimulation, agrees with previous reports and emphasizes the traumatic injury condition of the isolated islets (17, 18, 44, 45). Of special interest is the MIP-1 $\beta$  secretion. Our results show for the first time by three different techniques (luminex technology, RT-PCR and double immunofluorescence) that, after CD40 activation there is secretion of MIP-1 $\beta$  from insulin positive  $\beta$  cells. MIP-1 $\beta$  is a chemokine of the CC subfamily, previously shown to be secreted only by activated



monocytes (46). As others chemokines, MIP-1 $\beta$  can coordinate inflammatory responses by recruiting and activating pro-inflammatory hematopoietic cells. The expression of its receptor, the CCR5 molecule, selectively activates dendritic cells as well as Th1 lymphocytes (47), and induces the secretion of Th1 type pro-inflammatory cytokines associated with insulinitis (48). Our results support the idea that together with IL-6, IL-8, and MCP-1,  $\beta$  cells can also secrete the MIP-1 $\beta$  chemokine after CD40-CD40L interaction.

Previous reports from non immune cells have shown a significant amount of CD40 inducible genes, generally associated with co-stimulation signals (49), cytokine secretion (7, 30, 50), apoptosis induction (51, 52) or cell survival (3, 53). Although the mechanism by which CD40 induces IL-6, IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  secretion in  $\beta$  cells is not fully understood, similar to what is reported for monocyte/macrophage (28-30) and synovial cells (50), we investigated the consequences of CD40 signaling using the MEK1/2 and NF- $\kappa$ B blocking agents PD98059 and Bay 117082, respectively. In this regard, CD40 activation in pancreatic  $\beta$  cells induced the production of soluble mediators through the Raf/MEK/ERK and NF- $\kappa$ B inflammatory pathways, showing that, pre-treatment of islets cells with these inhibitors before and during CD40 activation reduced pro-inflammatory secretion. However, while PD98059 reduced pro-inflammatory mediators induced purely by CD40 stimulation, Bay117082 action was beyond CD40 stimuli. Consistent with this and in agree with previous results (32, 44, 54), stressing conditions associated with pancreas harvesting enhanced by the islet isolation process itself, can induce NF- $\kappa$ B activation in a CD40 independent pathway secretion of inflammatory mediators. While other studies using different cells have reported that

CD40 stimulation also appears to activate other members of the MAPK family, as p38 and the stress activated protein kinase (SAPK) (55), complementary results show that this two pathways are not activated in pancreatic insulinoma  $\beta$  cells after CD40 activation (Barbé-Tuana, F.M. and R.L. Pastori, manuscript in preparation).

We show convincing data suggesting that, the inflammatory process consequence of CD40 dependent secretion of cytokines and chemokines action is, detrimental for  $\beta$  cell viability. Pro-inflammatory cytokines can induce or accelerate the onset of the autoimmune process in pancreatic islets secreted by activated T lymphocytes, macrophages leading to  $\beta$  cell death (15, 56-60), whereas the inhibition of inflammatory pathways suppresses cytokine secretion and improved islet graft function (61). Different from other experimental models where cytokines were added (20, 57), in the present study, we used purified endocrine islet cells, investigating  $\beta$  cell death by conditioned media action of the CD40 receptor. In this regard, our results support the idea that  $\beta$  cells, also contribute to their own cytotoxic damage. However, we cannot exclude that conditioned media contains others unknown pro-inflammatory mediators that act in synergy with IL-6, IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  for the induction of  $\beta$  cell death, that could be responsible for  $\beta$  cell physiological function and transplant outcome.

It was previously showed that several cell types that express the CD40 receptor, including pancreatic  $\beta$  cells, are able to up-regulate CD40 expression in an inflammatory milieu (2, 4-6, 18, 21, 62). Furthermore, our new data shows evidence that pro-inflammatory cytokines and chemokines induced by CD40 stimulation can enhance the expression of ICAM-1 in  $\beta$  cells, regulated by NF- $\kappa$ B activity (32), thus potentially amplifying the inflammatory response. As cytokines and chemokines are regulators of

macrophages and lymphocytes homing, ICAM-1 induction could also be involved in  $\beta$  cell destruction, orchestrating an inflammatory CD40 dependent process that contributes to graft loss and rejection.

Interestingly, it has been reported an association between patients with type 1 diabetes mellitus and higher plasma levels of the CD40L molecule present in activated platelets or circulating in its soluble form (63-66). In this way, the engagement of the CD40 receptor in  $\beta$  cells from newly transplanted islets could compromise the fate of the transplant, and potentially contribute to the process of recurrence of autoimmune destruction of pancreatic  $\beta$  cells by perpetuation of the inflammatory process.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the Diabetes Research Institute Foundation and the Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF). F.M.B.T. is supported by the Brazilian Foundation CAPES. We thank the Imaging Core at the University of Miami, partly supported by a center grant from the JDRF, for providing access to confocal microscopy.

## References

1. van Kooten, C., and Banchereau, J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67:2-17.
2. Galy, A.H., and Spits, H. 1992. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol* 149:775-782.
3. Hess, S., Gottfried, E., Smola, H., Grunwald, U., Schuchmann, M., and Engelmann, H. 1998. CD40 induces resistance to TNF-mediated apoptosis in a fibroblast cell line. *Eur J Immunol* 28:3594-3604.
4. Karmann, K., Hughes, C.C., Schechner, J., Fanslow, W.C., and Pober, J.S. 1995. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4342-4346.
5. Smith, T.J., Sciaky, D., Phipps, R.P., and Jennings, T.A. 1999. CD40 expression in human thyroid tissue: evidence for involvement of multiple cell types in autoimmune and neoplastic diseases. *Thyroid* 9:749-755.
6. Sugimoto, K., Shiraki, K., Ito, T., Fujikawa, K., Takase, K., Tameda, Y., Moriyama, M., and Nakano, T. 1999. Expression of functional CD40 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 30:920-926.
7. Vosters, O., Beuneu, C., Nagy, N., Movahedi, B., Aksoy, E., Salmon, I., Pipeleers, D., Goldman, M., and Verhasselt, V. 2004. CD40 expression on human pancreatic duct cells: role in nuclear factor-kappa B activation and production of pro-inflammatory cytokines. *Diabetologia* 47:660-668.
8. Falco, A., Romano, M., Iapichino, L., Collura, M., and Davi, G. 2004. Increased soluble CD40 ligand levels in cystic fibrosis. *J Thromb Haemost* 2:557-560.
9. Ohta, Y., and Hamada, Y. 2004. In situ Expression of CD40 and CD40 ligand in psoriasis. *Dermatology* 209:21-28.
10. Urbich, C., and Dimmeler, S. 2004. CD40 and vascular inflammation. *Can J Cardiol* 20:681-683.
11. Baker, M.S., Chen, X., Rotramel, A., Nelson, J., and Kaufman, D.B. 2003. Proinflammatory cytokines induce NF-kappaB-dependent/NO-independent chemokine gene expression in MIN6 beta cells. *J Surg Res* 110:295-303.
12. Barshes, N.R., Wyllie, S., and Goss, J.A. 2005. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol* 77:587-597.
13. Corbett, J.A., Kwon, G., Turk, J., and McDaniel, M.L. 1993. IL-1 beta induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. *Biochemistry* 32:13767-13770.
14. Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Strynadka, K., Lakey, J.R., and Rajotte, R.V. 1996. Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3197-3202.
15. Eizirik, D.L., and Mandrup-Poulsen, T. 2001. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44:2115-2133.
16. Vives-Pi, M., Somoza, N., Fernandez-Alvarez, J., Vargas, F., Caro, P., Alba, A., Gomis, R., Labeta, M.O., and Pujol-Borrell, R. 2003. Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin Exp Immunol* 133:208-218.
17. Chen, M.C., Proost, P., Gysemans, C., Mathieu, C., and Eizirik, D.L. 2001. Monocyte chemoattractant protein-1 is expressed in pancreatic islets from prediabetic NOD mice and in interleukin-1 beta-exposed human and rat islet cells. *Diabetologia* 44:325-332.
18. Piemonti, L., Leone, B.E., Nano, R., Saccani, A., Monti, P., Maffi, P., Bianchi, G., Sica, A., Peri, G., Melzi, R., et al. 2002. Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation. *Diabetes* 51:55-65.
19. Christen, U., and Von Herrath, M.G. 2004. IP-10 and type 1 diabetes: a question of time and location. *Autoimmunity* 37:273-282.
20. Movahedi, B., Van de Casteele, M., Caluwe, N., Stange, G., Breckpot, K., Thielemans, K., Vreugdenhil, G., Mathieu, C., and Pipeleers, D. 2004. Human pancreatic duct cells can produce tumour necrosis factor-alpha that damages neighbouring beta cells and activates dendritic cells. *Diabetologia* 47:998-1008.

21. Klein, D., Barbe-Tuana, F., Pugliese, A., Ichii, H., Garza, D., Gonzalez, M., Molano, R.D., Ricordi, C., and Pastori, R.L. 2005. A functional CD40 receptor is expressed in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 48:268-276.
22. Ricordi, C., Lacy, P.E., Finke, E.H., Olack, B.J., and Scharp, D.W. 1988. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37:413-420.
23. Ichii, H., Inverardi, L., Pileggi, A., Molano, R.D., Cabrera, O., Caicedo, A., Messinger, S., Kuroda, Y., Berggren, P.O., and Ricordi, C. 2005. A novel method for the assessment of cellular composition and beta-cell viability in human islet preparations. *Am J Transplant* 5:1635-1645.
24. Hughes, A.K., Stricklett, P.K., and Kohan, D.E. 2001. Shiga toxin-1 regulation of cytokine production by human glomerular epithelial cells. *Nephron* 88:14-23.
25. Gmyr, V., Belaich, S., Muharram, G., Lukowiak, B., Vandewalle, B., Pattou, F., and Kerr-Conte, J. 2004. Rapid purification of human ductal cells from human pancreatic fractions with surface antibody CA19-9. *Biochem Biophys Res Commun* 320:27-33.
26. Ichii, H., Inverardi, L., Pileggi, A., Molano, R.D., Cabrera, O., Caicedo, A., Messinger, S., Kuroda, Y., Berggren, P.O., and Ricordi, C. 2004. A novel method for the assessment of cellular composition and beta-cell viability in human islet preparations. *Am Soc Transplant:(Abstr)*.
27. Lukowiak, B., Vandewalle, B., Riachy, R., Kerr-Conte, J., Gmyr, V., Belaich, S., Lefebvre, J., and Pattou, F. 2001. Identification and purification of functional human beta-cells by a new specific zinc-fluorescent probe. *J Histochem Cytochem* 49:519-528.
28. Mukundan, L., Bishop, G.A., Head, K.Z., Zhang, L., Wahl, L.M., and Suttles, J. 2005. TNF receptor-associated factor 6 is an essential mediator of CD40-activated proinflammatory pathways in monocytes and macrophages. *J Immunol* 174:1081-1090.
29. Pearson, L.L., Castle, B.E., and Kehry, M.R. 2001. CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Int Immunol* 13:273-283.
30. Suttles, J., Milhorn, D.M., Miller, R.W., Poe, J.C., Wahl, L.M., and Stout, R.D. 1999. CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an ERK1/2-dependent pathway. A target of interleukin (il)-4 and il-10 anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274:5835-5842.
31. Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., and Saltiel, A.R. 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270:27489-27494.
32. Cardozo, A.K., Heimberg, H., Heremans, Y., Leeman, R., Kutlu, B., Kruhoffer, M., Orntoft, T., and Eizirik, D.L. 2001. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276:48879-48886.
33. Ricordi, C., and Strom, T.B. 2004. Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. *Nat Rev Immunol* 4:259-268.
34. Shapiro, A.M., Lakey, J.R., Ryan, E.A., Korbitt, G.S., Toth, E., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., and Rajotte, R.V. 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343:230-238.
35. Shapiro, A.M., Ricordi, C., and Hering, B. 2003. Edmonton's islet success has indeed been replicated elsewhere. *Lancet* 362:1242.
36. Lakey, J.R., Burridge, P.W., and Shapiro, A.M. 2003. Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transpl Int* 16:613-632.
37. Kenyon, N.S., Chatzipetrou, M., Masetti, M., Ranuncoli, A., Oliveira, M., Wagner, J.L., Kirk, A.D., Harlan, D.M., Burkly, L.C., and Ricordi, C. 1999. Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8132-8137.
38. Kirk, A.D., Harlan, D.M., Armstrong, N.N., Davis, T.A., Dong, Y., Gray, G.S., Hong, X., Thomas, D., Fechner, J.H., Jr., and Knechtle, S.J. 1997. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8789-8794.
39. Larsen, C.P., Alexander, D.Z., Hollenbaugh, D., Elwood, E.T., Ritchie, S.C., Aruffo, A., Hendrix, R., and Pearson, T.C. 1996. CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway. *Transplantation* 61:4-9.
40. Parker, D.C., Greiner, D.L., Phillips, N.E., Appel, M.C., Steele, A.W., Durie, F.H., Noelle, R.J., Mordes, J.P., and Rossini, A.A. 1995. Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9560-9564.

41. Balasa, B., Krahl, T., Patstone, G., Lee, J., Tisch, R., McDevitt, H.O., and Sarvetnick, N. 1997. CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 159:4620-4627.
42. Mohan, C., Shi, Y., Laman, J.D., and Datta, S.K. 1995. Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *J Immunol* 154:1470-1480.
43. Berney, T., Pileggi, A., Molano, R.D., Poggioli, R., Zahr, E., Ricordi, C., and Inverardi, L. 2003. The effect of simultaneous CD154 and LFA-1 blockade on the survival of allogeneic islet grafts in nonobese diabetic mice. *Transplantation* 76:1669-1674.
44. Bottino, R., Balamurugan, A.N., Tse, H., Thirunavukkarasu, C., Ge, X., Profozich, J., Milton, M., Ziegenfuss, A., Trucco, M., and Piganelli, J.D. 2004. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes* 53:2559-2568.
45. Johansson, U., Olsson, A., Gabrielsson, S., Nilsson, B., and Korsgren, O. 2003. Inflammatory mediators expressed in human islets of Langerhans: implications for islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 308:474-479.
46. Maurer, M., and von Stebut, E. 2004. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1882-1886.
47. Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., et al. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187:129-134.
48. Fox, C.J., and Danska, J.S. 1998. Independent genetic regulation of T-cell and antigen-presenting cell participation in autoimmune islet inflammation. *Diabetes* 47:331-338.
49. Yang, Y., and Wilson, J.M. 1996. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 273:1862-1864.
50. Harigai, M., Hara, M., Kawamoto, M., Kawaguchi, Y., Sugiura, T., Tanaka, M., Nakagawa, M., Ichida, H., Takagi, K., Higami-Ohsako, S., et al. 2004. Amplification of the synovial inflammatory response through activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappaB using ligation of CD40 on CD14+ synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:2167-2177.
51. Gallagher, N.J., Eliopoulos, A.G., Agathangelo, A., Oates, J., Crocker, J., and Young, L.S. 2002. CD40 activation in epithelial ovarian carcinoma cells modulates growth, apoptosis, and cytokine secretion. *Mol Pathol* 55:110-120.
52. Wingett, D.G., Vestal, R.E., Forcier, K., Hadjokas, N., and Nielson, C.P. 1998. CD40 is functionally expressed on human breast carcinomas: variable inducibility by cytokines and enhancement of Fas-mediated apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 50:27-36.
53. Ghia, P., Boussiotis, V.A., Schultze, J.L., Cardoso, A.A., Dorfman, D.M., Gribben, J.G., Freedman, A.S., and Nadler, L.M. 1998. Unbalanced expression of bcl-2 family proteins in follicular lymphoma: contribution of CD40 signaling in promoting survival. *Blood* 91:244-251.
54. Kutlu, B., Darville, M.I., Cardozo, A.K., and Eizirik, D.L. 2003. Molecular regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 52:348-355.
55. Aicher, A., Shu, G.L., Magaletti, D., Mulvanian, T., Pezzutto, A., Craxton, A., and Clark, E.A. 1999. Differential role for p38 mitogen-activated protein kinase in regulating CD40-induced gene expression in dendritic cells and B cells. *J Immunol* 163:5786-5795.
56. Arnush, M., Scarim, A.L., Heitmeier, M.R., Kelly, C.B., and Corbett, J.A. 1998. Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *J Immunol* 160:2684-2691.
57. Delaney, C.A., Pavlovic, D., Hoorens, A., Pipeleers, D.G., and Eizirik, D.L. 1997. Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology* 138:2610-2614.
58. Suarez-Pinzon, W., Sorensen, O., Bleackley, R.C., Elliott, J.F., Rajotte, R.V., and Rabinovitch, A. 1999. Beta-cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on beta-cells and proinflammatory cytokine expression in islets. *Diabetes* 48:21-28.
59. Toyoda, H., Formby, B., Magalong, D., Redford, A., Chan, E., Takei, S., and Charles, M.A. 1994. In situ islet cytokine gene expression during development of type I diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Immunol Lett* 39:283-288.
60. Widmer, U., Manogue, K.R., Cerami, A., and Sherry, B. 1993. Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines. *J Immunol* 150:4996-5012.

61. Matsuda, T., Omori, K., Vuong, T., Pascual, M., Valiente, L., Ferreri, K., Todorov, I., Kuroda, Y., Smith, C.V., Kandeel, F., et al. 2005. Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function. *Am J Transplant* 5:484-493.
62. Hess, S., and Engelmann, H. 1996. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J Exp Med* 183:159-167.
63. Harding, S.A., Sommerfield, A.J., Sarma, J., Twomey, P.J., Newby, D.E., Frier, B.M., and Fox, K.A. 2004. Increased CD40 ligand and platelet-monocyte aggregates in patients with type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 176:321-325.
64. Targher, G., and Zoppini, G. 2004. Soluble CD40L in young type 1 diabetic individuals without clinical microvascular and macrovascular complications. *Diabetes Care* 27:1236-1237.
65. Varo, N., Vicent, D., Libby, P., Nuzzo, R., Calle-Pascual, A.L., Bernal, M.R., Fernandez-Cruz, A., Veves, A., Jarolim, P., Varo, J.J., et al. 2003. Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones. *Circulation* 107:2664-2669.
66. Yngen, M., Ostenson, C.G., Hu, H., Li, N., Hjerdahl, P., and Wallen, N.H. 2004. Enhanced P-selectin expression and increased soluble CD40 Ligand in patients with Type 1 diabetes mellitus and microangiopathy: evidence for platelet hyperactivity and chronic inflammation. *Diabetologia* 47:537-540.

## DISCUSSÃO DO CONJUNTO DOS TRABALHOS

Vários trabalhos têm relatado a expressão da molécula de CD40 em células de origem não hematopoiética como células endoteliais, epiteliais, e neoplásicas, em linhagens celulares, assim como presente nas células do ducto pancreático (1-6). Nessas células a expressão de CD40 parece estar associada a eventos pro-inflamatórios.

O papel central de CD40 em processos inflamatórios aliado à importância de mecanismos auto-imunes na patogênese do DM1, levou-nos a avaliar em primeiro lugar a expressão de CD40 em células pancreáticas. Seguiu-se o interesse pelos aspectos funcionais dos mecanismos moleculares. Além disso, a recente demonstração da expressão de forma constitutiva da molécula de CD40 em neurônios (7), células que expressam várias moléculas semelhantes às das células pancreáticas, reforçou o interesse pela nossa pesquisa.

Utilizaram-se técnicas laboratoriais como transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), *western blot*, imuno-histoquímica e citometria de fluxo em três espécies diferentes de mamíferos, a saber, roedor (*Mus musculus*), macaco (*Macaca fascicularis*) e homem (*Homo sapiens*), para determinar a expressão de CD40. Também se empregou imunofluorescência dupla com o intuito de determinar qual é o tipo celular responsável pela expressão do receptor de CD40.

Os achados deste estudo evidenciam, de forma inédita, a expressão de CD40 na superfície de células  $\beta$  pancreáticas de camundongos NOD e C57BL/6, macacos e de humanos. Também se observou a expressão de CD40 na linhagem celular NIT-1. Um achado interessante foi a demonstração da expressão constitutiva de CD40 apenas em roedores. Tal dado sugere uma expressão diferencial da molécula entre espécies distantes



na escala filogenética. Alternativamente, uma possível explicação poderia ser a diferente sensibilidade de detecção dos anticorpos empregados para a realização da técnica de imuno-histoquímica.

Na maioria dos casos e como já mencionado, a expressão do CD40 em células que não pertencem ao sistema imune, está associada a eventos inflamatórios não específicos como ocorre em psoríase, aterosclerose ou na fibrose cística (8-10). Nesse sentido, e tentando criar um modelo que simulasse um ambiente inflamatório *in vitro*, ilhotas humanas foram expostas a uma mistura de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ l). Após exposição por 12-18 h observou-se um aumento na expressão do receptor do CD40 em células  $\beta$  humanas (7AAD-negativas/NG-positivas). Esse achado está de acordo com dados prévios da literatura observados em células  $\beta$  de ratos (11), e sugerem que a expressão do CD40 pode ser induzida em um ambiente pró-inflamatório.

Uma vez identificada a expressão da molécula de CD40 em roedores e primatas, tentou-se explorar a funcionalidade de CD40 como receptor. Como resposta ao seu estímulo, escolheu-se estudar o fator nuclear  $\kappa$ B, cuja ativação já está bem documentada em diferentes sistemas biológicos após a ativação de CD40 (11-14). Porém, a transdução de sinais em CD40 que inclui a ativação de moléculas adaptadoras citoplasmáticas que ativam o fator nuclear NF- $\kappa$ B, pode ser realizada por duas vias diferentes, dependendo da fosforilação ou não do inibidor  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) (15).

Para tal estudo, utilizou-se a linhagem celular de camundongo NIT-1, estratégia que permitiu o emprego de quantidades ilimitadas de células  $\beta$  puras. Deste modo, as medidas de luminescência nas células NIT-1 transfectadas com o plasmídeo repórter

demonstraram que a estimulação de CD40 induziu a ativação de genes decorrentes do NF- $\kappa$ B.

Com o intuito de determinar qual era a via de ativação do CD40, células NIT-1 foram novamente ativadas com o anticorpo agonista de CD40, HM40-3, por diferentes períodos, e extratos celulares foram realizados. A presença do inibidor ativo (fosforilado, pI $\kappa$ B), visualizado por *western blot* demonstrou que ao igual a outros sistemas biológicos (11-14), o CD40 presente em células  $\beta$  pancreáticas é funcional, e que procede pela via de ativação clássica ou canônica do NF- $\kappa$ B. Essa via também foi observada em células  $\beta$  humanas, já que a incubação das mesmas com Bay117082, que bloqueia a fosforilação do I $\kappa$ B, inibiu a resposta de CD40 mediada por NF- $\kappa$ B.

Como já comentado anteriormente, o receptor de CD40 não possui atividade catalítica, e a transdução de sinais após o estímulo na membrana citoplasmática é realizada através de reações bioquímicas de sinalização e comunicação intracelular mediante enzimas treonina/serina quinases (16). Dentre dessas, as MAPK como as ERK1/2, p38 e SAPK/JNK são preferencialmente encontradas após estímulo do CD40 em diferentes tipos celulares em situações de stress celular. Sob condições de ativação das células  $\beta$ , nossos achados somente demonstraram a ativação específica da via Raf/MEK/ERK, a qual também já foi demonstrada em macrófagos/monócitos (17), neurônios (7) e células sinoviais (18), demonstrando uma via específica pela qual o CD40 em células  $\beta$  pancreáticas novamente, é funcional.

A importância do conhecimento dos mecanismos de sinalização intracelular foi evidenciada *in vivo* por Matsuda e cols. Neste trabalho, a cultura prévia de ilhotas pancreáticas na presença de bloqueadores de uma via de secreção de citocinas pro-

inflamatórias dependentes de LPS, melhorou a função do enxerto em camundongos diabéticos (19).

Vários trabalhos utilizando células que não pertencem ao sistema imune têm demonstrado uma quantidade significativa de genes induzidos em resposta ao estímulo mediado pelo CD40 (6, 17, 18, 20). Os achados deste estudo demonstram que a ativação de CD40 em ilhotas pancreáticas humanas induziu a expressão e secreção de um perfil de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias (IL-6, IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$ ) tanto no nível de mRNA como protéico, dependentes das vias de transdução de sinais Raf/MEK/ERK e NF- $\kappa$ B. Porém, a expressão de mediadores pro-inflamatórios como IL-6, IL-8, e MCP-1, mas não MIP-1 $\beta$ , após isolamento já foi amplamente documentado na literatura. Nossos achados corroboram dados anteriores (21-24), e enfatizam as condições traumáticas das ilhotas isoladas exacerbadas agora, pela ação do CD40.

Diferente de outros modelos experimentais onde as citocinas foram adicionadas (25, 26), no presente estudo, utilizaram-se ilhotas pancreáticas humanas purificadas, livres de células contaminantes que também pudessem expressar o receptor do CD40. Desta forma investigaram-se as conseqüências da ativação do CD40 na morte das células  $\beta$  humanas induzida por meio condicionado. Os achados sustentam a idéia de que o receptor do CD40 presente nas células  $\beta$  pancreáticas humanas contribui de forma autócrina e parácrina para o dano celular.

Embora existam limitações, a utilização de linhagens celulares como substituição às células primárias em modelos laboratoriais é aceita para a realização de aproximações. Assim, achou-se uma diferença entre células  $\beta$  primárias, com respeito ao modelo de indução de morte celular no qual empregamos a linhagem celular. No caso das células

NIT-1, a ação isolada do CD40 não induziu morte celular ou apoptose, e foi necessário a cultura conjunta com baixas doses de uma citocina pro-inflamatória, o TNF- $\alpha$ , para a indução da morte celular por apoptose em comparação com as ilhotas. Várias explicações poderiam ser plausíveis. Primeiramente, trabalhou-se com uma linhagem celular e com uma cultura de células primárias, cujo processo de obtenção induz uma série de respostas inflamatórias a nível celular previamente relatadas.

Em segundo lugar a ativação das células foi diferente. No caso das NIT-1, as células foram ativadas com um anticorpo monoclonal, e quando utilizadas as ilhotas pancreáticas humanas, estas foram dissociadas e estimuladas com uma proteína recombinante, o CD40L. Possivelmente, diferenças no grau de conformação tridimensional, a nível espacial, poderiam ser as responsáveis pelos achados diferentes. Por outro lado, não podemos excluir o fato de que o meio condicionado possa conter outras proteínas pro-inflamatórias que agem em forma conjunta com IL-6, IL-8, MCP-1 e MIP-1 $\beta$  para a indução de morte celular das células  $\beta$ , e ser desse modo, responsáveis pela resposta biológica.

Os resultados recentemente publicados (27), juntos com dados da literatura, mostram que vários tipos celulares que expressam o receptor do CD40, incluindo as células  $\beta$  pancreáticas, são capazes de aumentar ainda mais a expressão do CD40 em um ambiente inflamatório (1-5, 24, 27). Mais ainda, os achados demonstram que citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias induzidas como resultado da exposição das ilhotas ao CD40L, podem aumentar sua própria expressão do CD40, amplificando potencialmente a resposta inflamatória.

Nesse sentido, é interessante ressaltar a associação relatada entre pacientes com DM e altos níveis plasmáticos do ligante de CD40, o CD40L, presente em plaquetas ativadas ou circulando na sua forma solúvel (28-30). Desta forma, a ativação do receptor de CD40 em células  $\beta$  presente em ilhotas recentemente transplantadas poderia comprometer o destino do transplante e contribuir potencialmente ao processo de destruição de células pancreáticas, recorrência de auto-imunidade e perpetuação do processo inflamatório.

O meio condicionado de ilhotas humanas previamente tratadas com o CD40L também induziu a expressão de ICAM-1, molécula regulada pela atividade do NF- $\kappa$ B (11). Como as citocinas e quimiocinas são reguladores potenciais do recrutamento de macrófagos e linfócitos, a indução de ICAM-1 poderia estar envolvida na destruição das células  $\beta$ , orquestrando um processo inflamatório dependente de CD40 que contribuísse à perda do enxerto e rejeição.

As evidências aqui apresentadas: 1) expressão de CD40 em células  $\beta$  pancreáticas; 2) mecanismo de sinalização intracelular dependente das vias Raf/MEK/ERK e NF- $\kappa$ B; 3) indução de morte celular e 4) superexpressão das moléculas CD40 e ICAM-1 sob estímulo pró-inflamatório, evidenciam o processo inflamatório consequência da ativação da molécula de CD40 em células  $\beta$  pancreáticas. Assim como no caso de linfócitos T ativados ou macrófagos (25, 26, 31-34), as citocinas pró-inflamatórias secretadas agora por células  $\beta$ , podem induzir ou acelerar o início do processo auto-imune em ilhotas pancreáticas, levando à morte celular das células produtoras de insulina.

Os dados sugerem que a estimulação do receptor de CD40 é nociva para a viabilidade das células  $\beta$ . A disparidade entre a disponibilidade de ilhotas para transplante e a crescente demanda pelo procedimento, evidencia a necessidade de busca de mais medidas visando maximizar o controle dos eventos inespecíficos de inflamação que ocorrem no micro ambiente das ilhotas, para que desta forma a via de ativação de CD40 não seja outro fator que possa contribuir à perda do enxerto.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, e de acordo aos objetivos específicos delineados, conclui-se que:

É possível detectar-se a expressão do receptor CD40 na linhagem celular de insulinoma NIT-1, em células  $\beta$  pancreáticas de camundongos, primatas não humanos e humanos.

É possível determinar-se a via de transdução de sinais após a estimulação do receptor de CD40, e detectar as MAPKs MEK1/2-ERK1/2 e o fator nuclear NF- $\kappa$ B como as principais vias de sinalização em células  $\beta$  pancreáticas.

É possível demonstrar-se *in vitro* o efeito citotóxico de morte celular e a superexpressão de ICAM-1, como resultante da ativação do receptor CD40 presente nas células  $\beta$  pancreáticas humanas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Galy, A.H., and Spits, H. 1992. CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol* 149:775-782.
2. Hess, S., and Engelmann, H. 1996. A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J Exp Med* 183:159-167.
3. Karmann, K., Hughes, C.C., Schechner, J., Fanslow, W.C., and Pober, J.S. 1995. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4342-4346.
4. Smith, T.J., Sciaky, D., Phipps, R.P., and Jennings, T.A. 1999. CD40 expression in human thyroid tissue: evidence for involvement of multiple cell types in autoimmune and neoplastic diseases. *Thyroid* 9:749-755.
5. Sugimoto, K., Shiraki, K., Ito, T., Fujikawa, K., Takase, K., Tameda, Y., Moriyama, M., and Nakano, T. 1999. Expression of functional CD40 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 30:920-926.
6. Vosters, O., Beuneu, C., Nagy, N., Movahedi, B., Aksoy, E., Salmon, I., Pipeleers, D., Goldman, M., and Verhasselt, V. 2004. CD40 expression on human pancreatic duct cells: role in nuclear factor-kappa B activation and production of pro-inflammatory cytokines. *Diabetologia* 47:660-668.
7. Tan, J., Town, T., Mori, T., Obregon, D., Wu, Y., DelleDonne, A., Rojiani, A., Crawford, F., Flavell, R.A., and Mullan, M. 2002. CD40 is expressed and functional on neuronal cells. *Embo J* 21:643-652.
8. Falco, A., Romano, M., Iapichino, L., Collura, M., and Davi, G. 2004. Increased soluble CD40 ligand levels in cystic fibrosis. *J Thromb Haemost* 2:557-560.
9. Ohta, Y., and Hamada, Y. 2004. In situ Expression of CD40 and CD40 ligand in psoriasis. *Dermatology* 209:21-28.
10. Urbich, C., and Dimmeler, S. 2004. CD40 and vascular inflammation. *Can J Cardiol* 20:681-683.
11. Cardozo, A.K., Heimberg, H., Heremans, Y., Leeman, R., Kutlu, B., Kruhoffer, M., Orntoft, T., and Eizirik, D.L. 2001. A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276:48879-48886.
12. Lee, H.H., Dempsey, P.W., Parks, T.P., Zhu, X., Baltimore, D., and Cheng, G. 1999. Specificities of CD40 signaling: involvement of TRAF2 in CD40-induced NF-kappaB activation and intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1421-1426.
13. Propst, S.M., Estell, K., and Schwiebert, L.M. 2002. CD40-mediated activation of NF-kappa B in airway epithelial cells. *J Biol Chem* 277:37054-37063.
14. Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Azuma, S., Yamamoto, T., and Inoue, J. 1999. Two differently regulated nuclear factor kappaB activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1234-1239.
15. van Kooten, C., and Banchereau, J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67:2-17.
16. Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M.H. 2001. MAP kinases. *Chem Rev* 101:2449-2476.
17. Suttles, J., Milhorn, D.M., Miller, R.W., Poe, J.C., Wahl, L.M., and Stout, R.D. 1999. CD40 signaling of monocyte inflammatory cytokine synthesis through an ERK1/2-dependent pathway. A target of interleukin (il)-4 and il-10 anti-inflammatory action. *J Biol Chem* 274:5835-5842.
18. Harigai, M., Hara, M., Kawamoto, M., Kawaguchi, Y., Sugiura, T., Tanaka, M., Nakagawa, M., Ichida, H., Takagi, K., Higami-Ohsako, S., et al. 2004. Amplification of the synovial inflammatory response through activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappaB using ligation of CD40 on CD14+ synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50:2167-2177.
19. Matsuda, T., Omori, K., Vuong, T., Pascual, M., Valiente, L., Ferreri, K., Todorov, I., Kuroda, Y., Smith, C.V., Kandeel, F., et al. 2005. Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function. *Am J Transplant* 5:484-493.
20. Yang, Y., and Wilson, J.M. 1996. CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 273:1862-1864.
21. Bottino, R., Balamurugan, A.N., Tse, H., Thirunavukkarasu, C., Ge, X., Profozich, J., Milton, M., Ziegenfuss, A., Trucco, M., and Piganelli, J.D. 2004. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes* 53:2559-2568.



22. Chen, M.C., Proost, P., Gysemans, C., Mathieu, C., and Eizirik, D.L. 2001. Monocyte chemoattractant protein-1 is expressed in pancreatic islets from prediabetic NOD mice and in interleukin-1 beta-exposed human and rat islet cells. *Diabetologia* 44:325-332.
23. Johansson, U., Olsson, A., Gabrielsson, S., Nilsson, B., and Korsgren, O. 2003. Inflammatory mediators expressed in human islets of Langerhans: implications for islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 308:474-479.
24. Piemonti, L., Leone, B.E., Nano, R., Sacconi, A., Monti, P., Maffi, P., Bianchi, G., Sica, A., Peri, G., Melzi, R., et al. 2002. Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation. *Diabetes* 51:55-65.
25. Delaney, C.A., Pavlovic, D., Hoorens, A., Pipeleers, D.G., and Eizirik, D.L. 1997. Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology* 138:2610-2614.
26. Eizirik, D.L., and Mandrup-Poulsen, T. 2001. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44:2115-2133.
27. Klein, D., Barbe-Tuana, F., Pugliese, A., Ichii, H., Garza, D., Gonzalez, M., Molano, R.D., Ricordi, C., and Pastori, R.L. 2005. A functional CD40 receptor is expressed in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 48:268-276.
28. Stassi, G., De Maria, R., Trucco, G., Rudert, W., Testi, R., Galluzzo, A., Giordano, C., and Trucco, M. 1997. Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 186:1193-1200.
29. Varo, N., Vicent, D., Libby, P., Nuzzo, R., Calle-Pascual, A.L., Bernal, M.R., Fernandez-Cruz, A., Veves, A., Jarolim, P., Varo, J.J., et al. 2003. Elevated plasma levels of the atherogenic mediator soluble CD40 ligand in diabetic patients: a novel target of thiazolidinediones. *Circulation* 107:2664-2669.
30. Yngen, M., Ostenson, C.G., Hu, H., Li, N., Hjerdahl, P., and Wallen, N.H. 2004. Enhanced P-selectin expression and increased soluble CD40 Ligand in patients with Type 1 diabetes mellitus and microangiopathy: evidence for platelet hyperactivity and chronic inflammation. *Diabetologia* 47:537-540.
31. Arnush, M., Scarim, A.L., Heitmeier, M.R., Kelly, C.B., and Corbett, J.A. 1998. Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *J Immunol* 160:2684-2691.
32. Suarez-Pinzon, W., Sorensen, O., Bleackley, R.C., Elliott, J.F., Rajotte, R.V., and Rabinovitch, A. 1999. Beta-cell destruction in NOD mice correlates with Fas (CD95) expression on beta-cells and proinflammatory cytokine expression in islets. *Diabetes* 48:21-28.
33. Toyoda, H., Formby, B., Magalong, D., Redford, A., Chan, E., Takei, S., and Charles, M.A. 1994. In situ islet cytokine gene expression during development of type I diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Immunol Lett* 39:283-288.
34. Widmer, U., Manogue, K.R., Cerami, A., and Sherry, B. 1993. Genomic cloning and promoter analysis of macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, members of the chemokine superfamily of proinflammatory cytokines. *J Immunol* 150:4996-5012.

## **ANEXO A: Trabajos científicos publicados**

1. KLEIN, Dagmar; **BARBÉ-TUANA, Florencia María**; PUGLIESE, Alberto; ICHII, Hiroito; GARZA, David; GONZALEZ, Marco; MOLANO, R Damaris; RICORDI, Camillo; PASTORI, Ricardo L. A functional CD40 receptor is expressed in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, Inglaterra, v. 48, n. 2, p. 268-276, 2005.

2. KLEIN, Dagmar; MENDOZA, Valeska; PILLEGGI, Antonello; MOLANO, R Damaris; **BARBÉ-TUANA, Florencia María**; INVERARDI, Luca; RICORDI, Camillo; PASTORI, Ricardo L. Delivery of TAT/PTD-fused proteins/peptides to islets via pancreatic duct. *Cell Transplantation*, Estados Unidos, V. 15, N. 5, p. 241-248, 2005.

## **ANEXO B: Resumos publicados em congressos**

1. **BARBÉ-TUANA, Florencia María**; KLEIN, Dagmar; PUGLIESE, Alberto; ICHII, Hiroito; GONZALEZ, Marco; MOLANO, R Damaris; RICORDI, Camillo; PASTORI, Ricardo L. Expression of CD40 in pancreatic beta cells. In: THE 7<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONGRESS OF THE CELL TRANSPLANT SOCIETY, 2004, Boston, USA.

2. **BARBÉ-TUANA, Florencia María**; KLEIN, Dagmar; ICHII, Hiroito; ESCALONA, Maria; BERMAN-WEINBERG, Dora; RICORDI, Camillo; KENYON, Norma Sue; PASTORI, Ricardo L. Proinflammatory Pathway Activation through CD40 in Human and Non Human Primate Islet Cells. In: THE 65<sup>th</sup> ANNUAL SCIENTIFIC CONGRESS OF THE AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005, San Diego, USA.

D. Klein · F. Barbé-Tuana · A. Pugliese · H. Ichii ·  
D. Garza · M. Gonzalez · R. D. Molano · C. Ricordi ·  
R. L. Pastori

## A functional CD40 receptor is expressed in pancreatic beta cells

Received: 17 August 2004 / Accepted: 31 August 2004 / Published online: 3 February 2005  
© Springer-Verlag 2005

**Abstract** *Aims/hypothesis:* Despite differences in function and embryonic origin, pancreatic islet cells and neurons express proteins belonging to the tumour necrosis factor receptor superfamily. While neurons express the CD40 receptor, it is unknown whether islet cells also express it. We investigated CD40 expression in human and mouse pancreatic islets as well as in NIT-1 insulinoma cells. *Methods:* CD40 expression was studied by reverse transcriptase polymerase chain reaction, flow cytometry, immunohistochemistry and western blot. Responses mediated by CD40 were assessed by a luciferase gene reporter assay following stimulation with a CD40 agonist antibody. *Results:* We found that CD40 is expressed in mouse and human pancreatic islet cells. CD40 is expressed by beta cells, and its expression is upregulated by proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ). CD40 signalling in NIT-1 insulinoma cells activates nuclear factor kappa-B, demonstrating that CD40 is functional. *Conclusions/interpretation:* We present evidence that, in addition to immune cell types, mouse and human pancreatic beta cells express CD40. Its expression is upregulated by proinflammatory stimuli, and signalling through this receptor activates NF- $\kappa$ B. We suggest that the effects of inflammatory stimuli that affect beta cell function and survival may be also mediated by signalling through the CD40 receptor. Thus, CD40 may have a role in processes associated with islet autoimmunity and transplantation.

**Keywords** Beta cells · CD40 · Diabetes mellitus · Islets · NIT-1 · Nuclear factor kappa-B

**Abbreviations** 7-AAD: 7-Aminoactinomycin D · APC: Allophycocyanin · APC: Antigen-presenting cell · CD40L: CD40 ligand · FITC: Fluorescein isothiocyanate · IEQ: Islet equivalent · LCMV: Lymphocytic choriomeningitis virus · mAb: Monoclonal antibody · NF- $\kappa$ B: Nuclear factor kappa B · NG: Newport green · NOD: Nonobese diabetic ·  $T_m$ : Melting temperature · TNFR: Tumour necrosis factor receptor

### Introduction

The CD40 receptor is a membrane glycoprotein that belongs to the tumour necrosis factor receptor (TNFR) family. Its natural ligand, CD40 ligand (CD40L or CD154), is a type II transmembrane protein and a member of the TNF- $\alpha$  protein family [1–3]. CD40 is expressed on the surface of B lymphocytes and antigen-presenting cells (APCs) and mediates costimulatory signals for T-lymphocyte activation [4]. During the course of an immune response, the T-cell receptor recognises the MHC/antigen on the surface of APCs. Antigen recognition is followed by the expression of CD40L on T lymphocytes. The interaction of CD40L with CD40 upregulates the expression of other costimulatory molecules on the surface of APCs. These include CD80 and CD86 [5, 6], which interact with CD28 expressed by T cells [4, 7]. This cascade of events results in IL-2 production and T-cell activation. The critical role of CD40 in T-cell activation is well recognised also in the fields of transplantation [8–11] and autoimmunity [12, 13], and it has been confirmed using transgenic and knockout mice [14]. Interference with the CD40 pathway using blocking antibodies against CD40L inhibits the spontaneous development of diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice and prolongs allogeneic islet graft survival in non-human primates in the absence of conventional immunosuppressive drugs [11, 13]. Similar findings have been obtained in other transplantation settings [8–10]. Moreover, the engagement of CD40 with its ligand CD40L can dramatically affect B lymphocyte survival, leading to either cell proliferation or death depending on whether stim-

D. Klein · F. Barbé-Tuana · A. Pugliese · H. Ichii · D. Garza ·  
M. Gonzalez · R. D. Molano · C. Ricordi · R. L. Pastori (✉)  
Diabetes Research Institute,  
University of Miami School of Medicine,  
1450 NW 10th Avenue,  
Miami, FL, 33136, USA  
e-mail: rpastori@med.miami.edu  
Tel.: +1-305-2435349  
Fax: +1-305-2434404

ulation is caused by foreign or self-antigens [15, 16]. CD40/CD40L have a role in isotype switching and somatic hypermutation as well [14]. CD40 expression has been reported in diabetogenic T cells and T-cell clones in the NOD mouse [17].

Non-immune cell types such as endothelial cells [18], thymic epithelial cells [19], neurons [20], normal and neoplastic thyroid cells [21], carcinomas [22], transformed cell lines [23] and pancreatic duct cells also express CD40 [24]. The effects of CD40 signalling in non-immune cell types are not fully understood. However, several reports indicate that signalling through the CD40 receptor can induce survival [25, 26] or growth inhibition and enhances apoptosis of various non-immune cell types [27, 28].

Despite differences in function and embryonic origin, both pancreatic islet cells and neurons express proteins belonging to the TNFR superfamily, such as TNF-R1 and neuron growth factor receptor [29–33]. Since neurons express CD40, we hypothesised that islet cells can also express this member of the TNFR superfamily. In this study we investigated CD40 expression in mouse and human pancreatic islets and the NIT-1 insulinoma cell line.

## Methods

**Tissues and cells** We studied pancreata and islets from C57BL/6, BALB/c and NOD mice. Human islets were obtained from a pancreatic cadaver donor. NIT-1 insulinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (CRL 2055; ATCC, Manassas, VA, USA) and cultured according to ATCC instructions.

**Islet isolation** Methods for islet isolation from human and mouse pancreata have been previously described [34, 35]. Human islets were provided by the cGMP facility at the Diabetes Research Institute, University of Miami, and isolated following the automated method developed by Ricordi et al. [34]. Mouse islets were isolated as follows. Animals were sacrificed under general anaesthesia, the abdomen was opened, and the pancreas was exposed and injected with 0.8 mg/ml collagenase solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) through the main bile duct until full distension was achieved. The University of Miami Animal Care and Use Committee approved this procedure. The distended pancreatic tissue was then surgically removed and immersed in collagenase solution. Digestion was performed at 37°C for 17 min with gentle shaking. The enzyme kinetics were sharply slowed by adding cold Hanks' balanced salt solution supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA). Mechanical disruption of the digested pancreatic tissue was achieved by repeated passages through a 14-gauge needle until complete release of free islets was observed under the microscope. The tissue was then filtered through a 450- $\mu$ m screen. Islets were purified by centrifugation at 900 *g* for 11 min on discontinuous Euro-Ficoll gradients. This method routinely provided islets of >90% purity as assessed by dithizone staining (Sigma-Aldrich). Islets

were counted and scored for size. An algorithm was used for the calculation of 150- $\mu$ m-diameter islet equivalent number (IEQ). Experiments were performed using hand-picked islets.

**RNA extraction and cDNA synthesis** Total RNA was isolated using the RNeasy kit (Qiagen, Los Angeles, CA, USA). Samples were treated with DNase I (Ambion, Austin, TX, USA) to remove traces of contaminating genomic DNA. The cDNA synthesis was carried out with oligo(dT) and SuperScript II reverse transcriptase enzyme (Invitrogen, Chicago, IL, USA).

**Quantitative real-time polymerase chain reaction** Mouse islet cDNA was amplified using a set of forward (CD40F) and reverse (CD40R) primers specific for exons 7 and 9, respectively (CD40F: TGGTCATTCCTGTCGTGATG; and CD40R: GGCTCTGTCTTGGCTCATCT). Reactions in which the reverse transcriptase enzyme was omitted were included as negative control. To determine the proper parameters for the acquisition of the fluorescence data, we performed a preliminary melting curve analysis. The melting curve analysis was carried out by heating to 95°C, cooling to 55°C at 20°C/s, followed by heating to 94°C at a much slower rate of 0.2°C/s and acquiring fluorescence continuously. This analysis allows us to determine the melting temperatures specific for the PCR product of interest. Fluorescence data were collected at 1.5°C below the melting temperature ( $T_m$ ) of the specific product to avoid the contribution of the fluorescence generated by non-specific products. The identity of the PCR products was verified by electrophoresis on 1% agarose gels. PCR amplifications were performed in a fluorescence temperature cyclor (LightCycler; Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) in a final volume of 20  $\mu$ l containing 3 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ mol/l of each primer, 2  $\mu$ l of ready-to-use reaction mix 10 $\times$ DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals) and the template. The reaction was preincubated for 5 min at room temperature with 0.55  $\mu$ g of TaqStart antibody (Clontech, Palo Alto, CA, USA). The amplification programme was as follows: transition rate of 20°C/s for all steps involved; 1 cycle of denaturation at 94°C for 1 min; 45 cycles of denaturation at 94°C for 5 s, annealing at 55°C for 5 s, and extension at 72°C for 10 s; acquisition of fluorescence by heating to 87°C for 1 s. The melting curve analysis was carried out by heating to 95°C, cooling to 55°C at 20°C/s, followed by heating to 94°C at a much slower rate of 0.2°C/s, and acquiring fluorescence continuously.

**PCR of cDNA from human sorted beta cells** PCR amplification of human CD40 transcripts was performed with forward primer ACAATACTGCGACCCCAAC (spanning exons 3 and 4) and reverse primer AAAGACCAGC ACCAAGAGGA (exon 7). The PCR conditions were 1 cycle for 1 min at 95°C, 40 cycles of 30 s at 95°C, 45 s at 55°C, and 45 s at 72°C. A final elongation of 3 min was performed at 72°C.

The amplicon of 404 bp was cleaved by *Stu*I, generating fragments of 104 and 300 bp. Reactions in which the reverse transcriptase enzyme was omitted were included as negative controls.

**Immunohistochemistry** NIT-1 cells were grown to confluence in chamber slides, washed with PBS, and fixed in formalin. Cells were stained using the ABC staining kit according to the manufacturer's instructions (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) with 5 µg/ml rabbit antimouse CD40 polyclonal antibody (L-17; Santa Cruz Biotechnology) as primary antibody. Negative controls included sections that were stained with an isotype control antibody and sections that were incubated with the secondary but not the primary antibody.

**Immunofluorescence of mouse tissue** The pancreata from NOD, C57BL/6 and BALB/c mice were fixed in Bouin's solution (Sigma-Aldrich) and embedded in paraffin. Tissue sections were incubated with 5 µg/ml of CD40 polyclonal antibody (rabbit antimouse) followed by an Alexa-Fluor488-conjugated goat antirabbit secondary antibody (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). In double-staining experiments, sections were also stained with a guinea pig antiporcine insulin antibody (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA) or with a mouse antiporcine glucagon monoclonal antibody (mAb; K79bB10; Sigma-Aldrich) that cross-react with mouse insulin and glucagon, respectively. Insulin or glucagon staining was revealed by incubation with secondary antibody AlexaFluor568-conjugated goat anti-guinea pig and goat antimouse, respectively. Control reactions included staining with isotype controls and omission of the primary antibody, as well as mismatched combinations of primary and secondary antibodies. Immunofluorescence was analysed by confocal microscopy using a Zeiss LSM-510 laser scanning microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA).

**Immunostaining of human pancreatic tissue and isolated islets** Pelleted human islets or human pancreas was snap-frozen in OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) and sectioned. Sections were dried and washed in PBS prior to fixation in Histochoice Tissue Fixative (Amresco, Solon, OH, USA). After washing in PBS the samples were treated with Universal blocker (Biogenex, San Ramon, CA, USA) to prevent non-specific reactions. Sections were incubated with a mouse antihuman CD40 mAb (MAB89; Beckmann-Coulter, Hialeah, FL, USA), washed and incubated with a secondary goat antimouse Alexa Fluor488 conjugate. The staining for either insulin was performed following the same protocol, using goat antirabbit Alexa Fluor568 conjugate as secondary antibody.

**Flow cytometry** One million NIT-1 cells or mouse-dissociated islet cells were incubated with 1 µg/100 µl fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated hamster antimouse CD40 mAb (HM40-3; BD/Pharmingen, San Diego, CA, USA) for 30 min on ice, washed, and evaluated by flow cytometry. Mouse and human islets were dissoci-

ated into single-cell suspensions by incubating aliquots of approximately 500–1,000 IEQ in 1 ml of an Accutase solution (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, USA) at 37°C for 5–15 min and subsequently dispersed by gentle pipetting. Human islet cells were incubated with 1 µmol/l Newport green (NG) (Molecular Probes) for 30–60 min at 37°C in PBS without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. After washing, cells were incubated on ice for 20 min with anti-CD40 conjugated to allophycocyanin (APC) or anti-CD40-phycoerythrin (HB14; Caltech, CA, USA; and clone MAB89, Beckmann-Coulter), respectively. Finally, cells were stained with 7-aminoactinomycin D (7-AAD; Invitrogen, La Jolla, CA, USA) at a concentration of 10 µg/ml. The DNA-binding dye 7-AAD is capable of staining dead cells, thus allowing for their selective exclusion. Flow cytometry analysis was performed using the CellQuest software on a FACScan instrument (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA).

**Incubation of human islets with proinflammatory cytokines** Handpicked human islets were treated overnight with a combination of IL-1β (5×10<sup>4</sup> U/l), IFN-γ (10<sup>6</sup> U/l) and TNF-α (10<sup>6</sup> U/l). Islets were washed, dissociated and analysed by flow cytometry as described above.

**Cell sorting** After dissociation into single-cell suspensions, islet cells were stained with NG and 7-AAD. Cell sorting was performed by using a FACSvantage (Becton Dickinson). NG-bright and NG-dim/negative subsets were obtained.

**Western blot** Highly purified C57BL/6 islets and NIT-1 cells were washed with cold PBS and lysed in 2% SDS, Tris-HCl 60 mmol/l (pH 6.8) buffer, incubated at 95°C, sonicated in a water bath at 37°C and centrifuged at high speed for 10 min. Assessment of the total protein content was carried out with the BCA detection kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). Aliquots corresponding to 50 µg of protein were subjected to electrophoresis on a 12% SDS-PAGE pre-cast gel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and transferred electrophoretically to an Immobilon polyvinylidene difluoride membrane. The membranes were incubated with 5% non-fat dry milk in TBS (20 mmol/l Tris, 500 mmol/l NaCl, pH 7.5) overnight at 4°C to block non-specific binding. Subsequently, the membranes were immunoblotted with 1:200 rabbit antimouse CD40 polyclonal antibody (L-17; Santa Cruz Biotechnology) followed by incubation with a secondary antirabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody and chemiluminescent detection (Amersham Biosciences, San Francisco, CA, USA). The same membranes were stripped and re-probed with an antimouse beta-actin antibody 2066 (Sigma-Aldrich).

**NF-κB reporter gene assay** NIT-1 aliquots of 3.0×10<sup>4</sup> cells were seeded in 96-well flat-bottomed plates. After 24 h, NIT-1 cells were transiently cotransfected with two different luciferase reporter plasmids: pNFκB-Luc (BD Biosciences/Clontech) that contains four copies of the κB binding element upstream of the promoter region driving

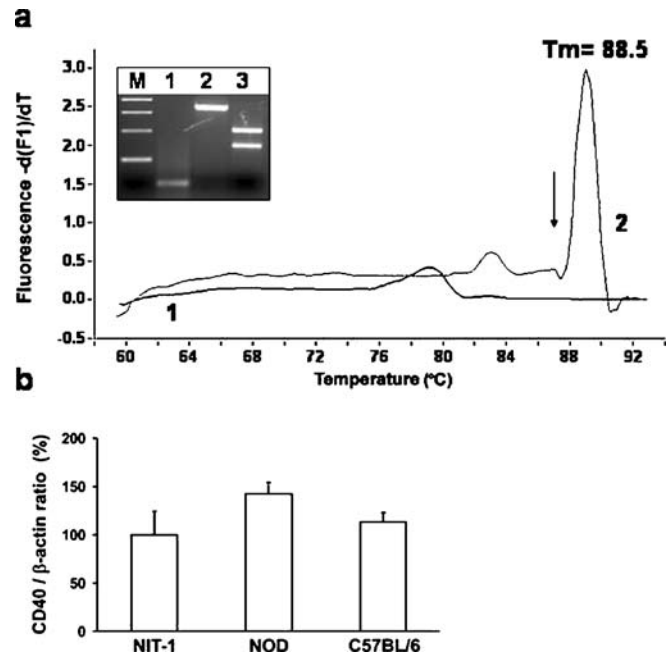
the firefly luciferase expression, and the reporter plasmid phRL-TK, that also encodes for the luciferase enzyme from *Renilla reniformis* under the control of the constitutive promoter from thymidine kinase (Promega, Madison, WI, USA). Transfection was performed using the Fugene 6 reagent (Roche Biochemicals) with a 3:1 ratio of liposomes to DNA. After 24 h, control cells were left untreated, and the rest were incubated in the presence of an agonistic antimouse CD40 mAb (HM40-3, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) or an isotype-matched antibody (G235-1, 10  $\mu\text{g/ml}$ ). As a positive control, cells were also treated with TNF- $\alpha$  ( $10^6$  U/l; Roche Biochemicals). After 2 h of incubation at 37°C, lysates were prepared with the Dual-GLO-luciferase assay system according to the manufacturer's instructions (Promega). Luciferase activities were measured in a luminometer (Wallac 1420 Victor<sup>2</sup>; Perkin-Elmer, Fremont, CA, USA). Luminescence measurements were integrated over a period of 10 s/well. Ratios of firefly to renilla luciferase activities are expressed as relative to the activity of the transfected, non-activated control cells.

**Statistical analysis** When appropriate, results were analysed by Student's *t*-test. Group comparisons were performed using one-way ANOVA and Dunnett's method for a posteriori contrasts using Sigma-Stat 2 software. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## Results

**CD40 mRNA is expressed in mouse islets and NIT-1 cells** To investigate whether the CD40 gene is transcribed in mouse pancreatic islets and in the NIT-1 insulinoma cell line, we isolated total RNA from handpicked NOD and C57BL/6 islets and NIT-1 cells. For NOD mice, we used 4-week-old animals to avoid the potential contribution to CD40 expression associated with the presence of infiltrating immune cells. Quantification of CD40 transcripts using real-time PCR revealed that the CD40 transcript is present in islets, and its levels of expression were comparable among NOD, C57BL/6 islets and NIT-1 cells (Fig. 1a, b). The identity of the RT-PCR product was confirmed by cleaving the amplicon with restriction enzyme *NciI*, generating fragments of the expected sizes (145 and 210 bp, Fig. 1a, inset).

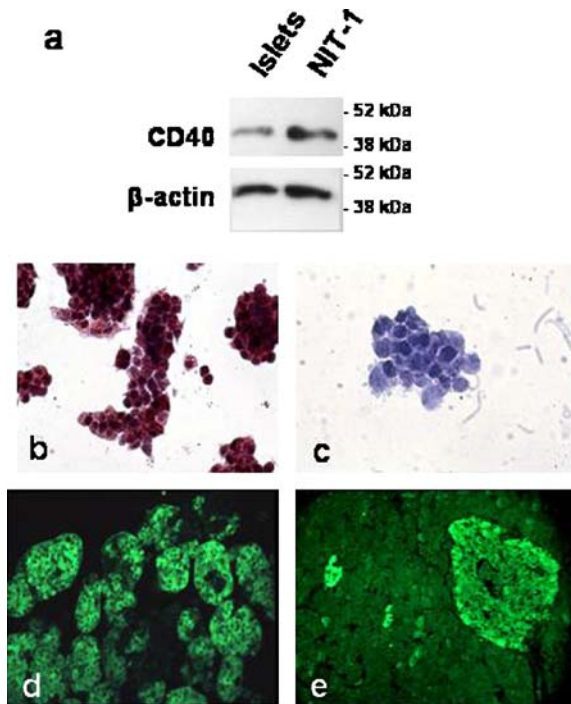
**CD40 protein is expressed by mouse beta cells** Figure 2a shows that CD40 protein expression is detectable in both mouse pancreatic islets and NIT-1 cells by western blot. We also used immunohistochemistry to assess CD40 protein expression in mouse pancreatic sections and NIT-1 cells. Using the anti-CD40 polyclonal antibody L17 we observed specific staining in NIT-1 cells (Fig. 2b). Omitting primary antibody, staining was not observed (Fig. 2c). Isolated islets and islets in pancreatic tissue sections stained positive for CD40 (Fig. 2d, e). Preabsorption of the antibody with its target peptide completely prevented staining. Similar results were obtained with the antimouse CD40 mAb HM40-3 followed by an FITC-conjugated



**Fig. 1** Detection and quantification of CD40 transcripts in mouse islets and NIT-1 cells by RT-PCR. **a** Melting curve profile of CD40 transcripts using primers CD40F and CD40R, annealing to sequences from exon 7 and 9, respectively. Primers CD40F and CD40R generated CD40 amplicons of 355 bp. Melting curve analysis was carried out after CD40 amplification of cDNA from B6 islets. The first negative derivative of fluorescence vs time ( $-dF/dT$ ) is plotted against temperature. The CD40 product has a  $T_m$  of 88.5°C. The arrow marks the temperature (87°C) at which fluorescent data is acquired. 1 and 2 are the melting profile of amplification reactions from B6 islets (control no RT and plus RT reactions, respectively). *Inset* is an agarose gel electrophoresis of the CD40 amplicon. *Lane M* shows the 100-bp ladder DNA marker, *lane 3* shows the restriction enzyme *NciI* of CD40 amplicon. **b** Ratio of levels of CD40 transcripts standardised by content of beta-actin transcripts from NIT-1 cells, 4-week-old NOD and C57BL/6. The results are the average of two experiments.

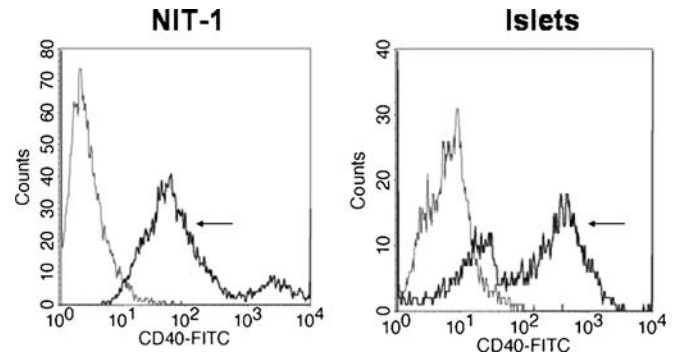
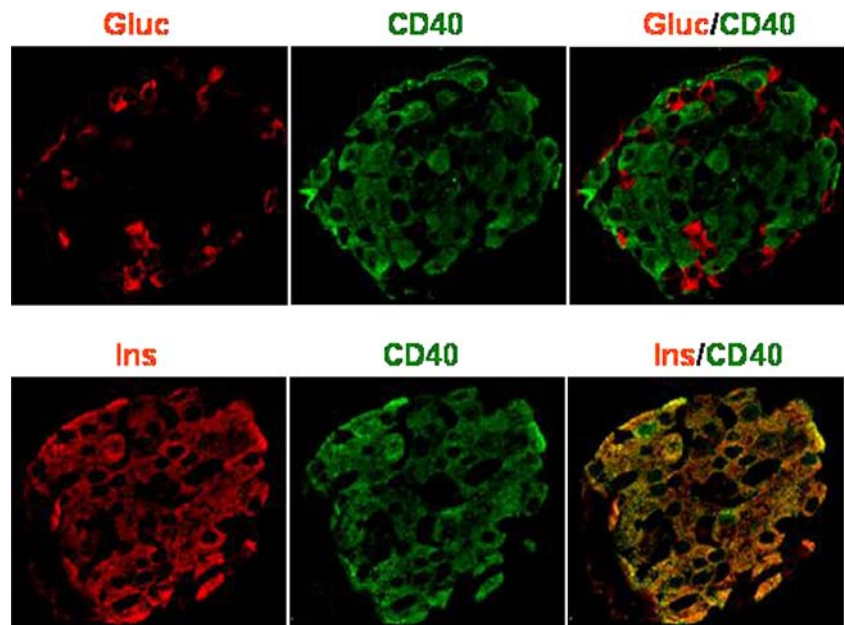
secondary antibody (data not shown). To define which mouse islet cell types express CD40, we used double-immunofluorescence staining. As shown in Fig. 3, laser confocal microscopy revealed that CD40 protein expression clearly colocalised with insulin but not with glucagon. We did not observe any appreciable differences in the staining patterns in pancreatic tissue sections from male or female C57BL/6, BALB/c or NOD mice (data not shown).

**CD40 receptor is expressed on the surface of mouse islet cells** Having demonstrated CD40 protein expression, we hypothesised that this receptor molecule may be present on the surface of islet cells. To test this hypothesis we analysed dissociated mouse islet cells and NIT-1 cells after incubation with the antimouse CD40 mAb HM40-3, directly conjugated with FITC (Fig. 4). Flow cytometry analysis revealed no staining with an isotype control antibody, while 58–85% of the dissociated islet cells and most of the NIT-1 cells exhibited surface staining for CD40.



**Fig. 2** Analysis of mouse CD40 expression by western blot and immunohistochemistry. **a** CD40 expression was analysed by Western blot on samples of C57BL/6 pancreatic islets and NIT-1 cells. The same gel was stripped and used for staining with a mouse antibody against actin, to ensure similar amounts of proteins were transferred and used for analysis. The locations of 52- and 38-kDa protein markers are noted. Representative data from three experiments are shown. **b** NIT-1 cells were stained with a rabbit polyclonal antibody against CD40 and a biotinylated secondary antibody using the immunoperoxidase method and a streptavidin peroxidase conjugate DAB as a substrate. **c** NIT-1 cells stained in the absence of the primary antibody. **d** Paraffin sections of C57BL/6 isolated islets and pancreatic tissue (**e**) were stained with the same antibody followed by a secondary antibody conjugate with AlexaFluor488. Original magnification (**b**, **c**, **d**, **e**)  $\times 20$ . Representative data from five experiments are shown.

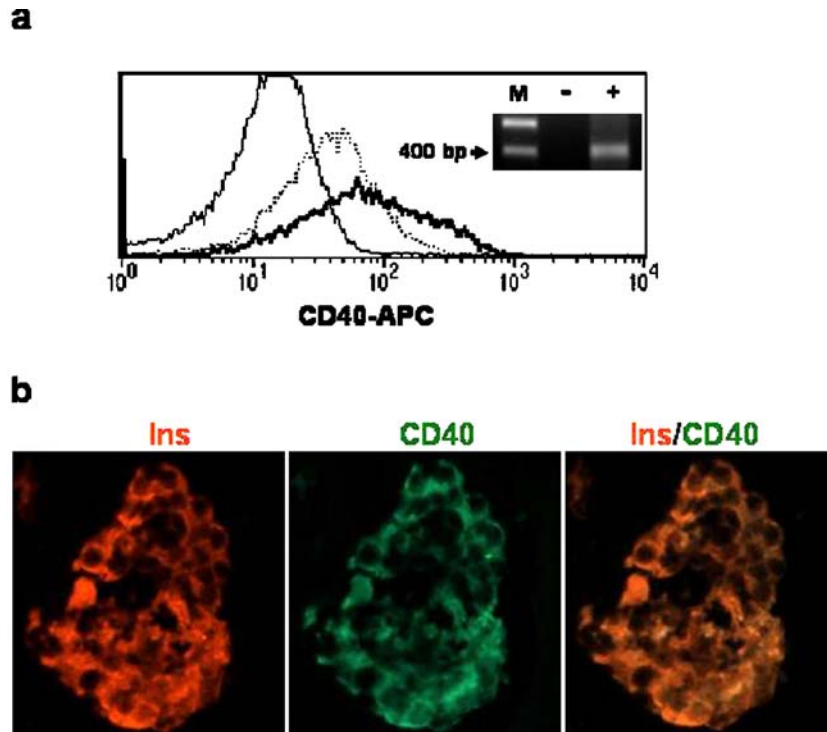
**Fig. 3** Colocalisation of CD40 expression and insulin in pancreatic islets. Laser scanning confocal microscopy analysis of paraffin sections of pancreas from an 8-week-old BALB/c mouse stained for glucagon or insulin (red) or CD40 (green), or for CD40 and glucagon or CD40 and insulin, using double immunofluorescence. The far right column shows the superimposed stack optical sections of CD40 and glucagon or insulin staining. The resultant yellow colour indicates colocalisation of CD40 and insulin. Original magnification  $\times 40$ . Representative data from five experiments are shown.



**Fig. 4** CD40 expression in NIT-1 cells and isolated pancreatic islets. CD40 expression was analysed by flow cytometry in dispersed pancreatic islets isolated from C57BL/6 mice and NIT-1 cells. Curves show the profile of cells stained with an isotype-matched antibody and with anti-CD40-FITC HM40-3 antibody (arrow). Representative data from five experiments are shown.

*CD40 is expressed by human beta cells* We investigated whether the CD40 gene is also expressed in purified human islets following isolation with standard procedures. To ensure that we had pure preparations of islet cells, we stained islets with NG and 7-AAD, so that live beta cells could be identified and sorted [36]. NG-positive sorted cells are mostly (90%) beta cells as assessed by insulin staining of sorted cells using immunohistochemistry (H. Ichii, unpublished observations). Similar to our findings in mouse islets, we detected CD40 transcripts in sorted human beta cells (Fig. 5a, inset). The identity of CD40 amplicon was confirmed by cleaving the 404-bp product with the restriction enzyme *StuI*, generating the expected fragments of 104 and 300 bp (data not shown). We then assessed CD40 protein expression in isolated human islets by double-immunofluorescence staining. As shown in Fig. 5b, CD40 expression is detected by antibody staining and colocalises with insulin staining. Figure 5a demonstrates that CD40 is expressed on the





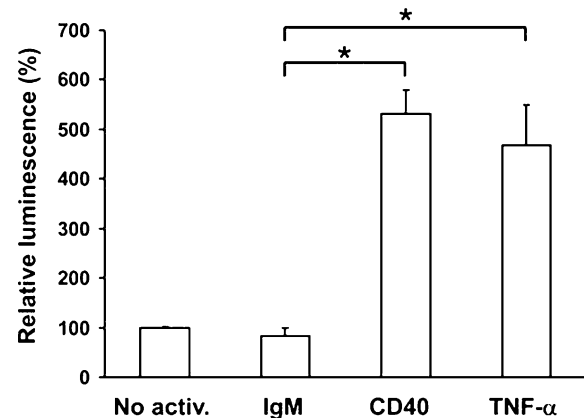
**Fig. 5** Analysis of CD40 expression in human pancreatic islets. **a** Human islets were cultured overnight alone or with a combination of cytokines (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ). Following dissociation, cells were stained with an APC-conjugated antihuman CD40 antibody (HB14) and fluorescence was analysed in the 7-AAD-negative, Newport green-bright cell subset (live beta cells). *Solid line* represents fluorescence corresponding to control cells using isotype control antibody. *Dotted* and *bold solid lines* represent cell fluorescence from control or cytokine-treated islets using anti-CD40 HB14 antibody, respectively. Shown in the *inset*

is an agarose gel with the RT-PCR CD40 transcript analysis from cDNA derived from sorted beta cells. **b** Frozen sections of isolated human islets were fixed and washed in PBS. After blocking with universal blocker and protein blocker, the sections were incubated with primary antihuman CD40 antibody MAB89 (host mouse) for 2 h and then incubated with AlexaFluor488 goat antimouse secondary antibody. The second staining for insulin was performed on the same sections with rabbit anti-insulin primary antibody and goat antirabbit AlexaFluor568 secondary antibody.

surface of human islet cells that are 7-AAD-negative and NG-bright. Staining was observed with the antihuman CD40 mAb HB14 conjugated with APC and with the anti-CD40 mAb MAB89 (data not shown). Thus, sorted islet cell populations highly enriched in beta cells expressed the CD40 transcript (Fig. 5a, inset) and protein, which, consistent with its receptor function, is expressed on the cell surface.

*CD40 expression is upregulated by proinflammatory cytokines* We treated human islets with a combination of proinflammatory cytokines that are reportedly associated with beta cell damage in autoimmune diabetes [37, 38]. Overnight incubation with a combination of IL-1 $\beta$  ( $5 \times 10^4$  U/l), IFN- $\gamma$  ( $10^6$  U/l) and TNF- $\alpha$  ( $10^6$  U/l) up-regulated CD40 expression in human beta cells (7-AAD-negative/NG-bright positive) as shown by an increase in the median fluorescence intensity from  $37.5 \pm 2.9$  in control cells to  $67.3 \pm 6.8$  in the cytokine-treated cells ( $p=0.02$ ) (Fig. 5a).

*CD40 receptor is functionally active* CD40 signalling is known to activate the NF- $\kappa$ B transcription factor [14]. To investigate whether CD40 is functionally active in beta cells, we assessed NF- $\kappa$ B activation upon CD40 stimula-



**Fig. 6** CD40 receptor is functionally active, signalling through the activation of NF- $\kappa$ B transcription factor. NIT-1 cells were transfected with 1.0  $\mu$ g of the pNF- $\kappa$ B-luc reporter plasmid and 0.5  $\mu$ g of the control plasmid-expressing renilla luciferase. Twenty-four hours after transfection, cells were stimulated with CD40 antibody or the control isotype (IgM) for 2 h. As a positive control, NIT-1 cells were activated with TNF- $\alpha$ . Luciferase activity was determined as described in “Methods” and expressed as a ratio of the activity of firefly to renilla luciferase. Results are shown as a percentage relative to the control, where luciferase activity in the lysates of transfected, non-activated cells was taken to be 100%. The values are expressed as means  $\pm$  SD; \* $p < 0.05$  versus IgM-stimulated cells. Representative data from four experiments are shown.

tion. NIT-1 cells were transiently transfected with a luciferase reporter gene fused to a minimal thymidine kinase promoter that was preceded by four NF- $\kappa$ B consensus binding sites arrayed in tandem. As shown in Fig. 6, activation of the CD40 receptor by incubation with the agonistic mouse anti-CD40 mAb HM40-3 resulted in NF- $\kappa$ B activation.

## Discussion

In the present study we demonstrate that CD40 is expressed in human and mouse pancreatic islets and in NIT-1 insulinoma cells. RT-PCR rendered CD40 amplicons from sorted human beta cells, purified NOD and C57BL/6 islets and NIT-1 cells. CD40 was also expressed at the protein level as demonstrated by immunohistochemistry and immunofluorescence. The observed colocalisation with insulin indicates that CD40 is expressed by beta cells in all mouse strains studied and in humans. The lack of colocalisation of CD40 and glucagon in mouse pancreatic tissue sections suggests that alpha cells do not express CD40.

We used flow cytometry to demonstrate that, consistent with its receptor function, CD40 was present at the cell surface. This was shown for both mouse and human islets. Agreeing with the double-immunofluorescence data, surface staining was observed in human islet cell preparations highly enriched in beta cells by staining with Newport green.

CD40 expression was upregulated by incubation of islets with a cocktail of cytokines which are known to be associated with autoimmune beta cell damage. Our finding that CD40 expression in human pancreatic beta cells is modulated by cytokines corroborates a previous report from Cardozo et al. [39] describing CD40 as one of the genes being activated by cytokines in primary rat beta cells. Furthermore, our data in NIT-1 cells suggest that islet cells express a functional CD40 receptor, the triggering of which results in activation of NF- $\kappa$ B. This is a well-known consequence of CD40 signalling. Indeed, CD40 and other members of the TNFR family lack intrinsic kinase activity in the cytoplasmic tail, but propagate signals by associating with TNFR-associated factors (a family of adaptor proteins) [14] which in turn activate NF- $\kappa$ B and the AP-1 transcription factor complex.

It was recently reported that CD40 is expressed in human pancreatic duct cells but not in islets when expression was analysed by immunohistochemistry on pancreatic sections [24]. Our data demonstrating CD40 expression in human beta cells after isolation (as assessed by RT-PCR, double-immunofluorescence staining of isolated human islets and flow cytometry) suggest that CD40 expression in human beta cells may be induced by the manipulation associated with the islet isolation process. In addition, we show that incubation with cytokines increases CD40 expression by human beta cells. However, CD40 was constitutively expressed in mouse islets. Thus, our data highlight a possible difference in CD40 expression between mouse

and human islets, and suggest that its expression is responsive to selected stimuli.

The above findings imply a potentially important role for islet cell CD40 expression in both physiological and pathophysiological conditions. In particular, human islet cell responsiveness to cytokines suggests that CD40 expression may play a significant role during inflammatory conditions such as the development of autoimmune diabetes or in the transplantation setting. Perhaps CD40 expression by islets can play a role similar to that of other costimulatory molecules. For example, the transgenic expression of the costimulatory molecule B7-1 on the surface of beta cells results in accelerated diabetes in NOD mice [40, 41]. Transgenic mice expressing B7-1 and the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) glycoprotein in islets and having T cells with a glycoprotein-specific T-cell receptor develop autoimmune diabetes following exposure to LCMV [42]. Mice expressing B7-1 and human HLA-DQ molecules associated with increased diabetes risk also develop autoimmune diabetes [43]. It is therefore plausible that the constitutive and selective expression of CD40 on the surface of beta cells may contribute to autoimmunity by providing costimulatory signals to infiltrating lymphocytes. In light of our findings, the inhibition of spontaneous diabetes reported in NOD mice treated with anti-CD154 antibody (anti-CD40L) [13] might be explained not only as a result of costimulatory blockade in APCs but also in beta cells. Likewise, blockade of the CD40 pathway promotes islet allograft survival in rodent transplantation models [44], and this effect could be partially dependent on the blockade of CD40 signalling in beta cells.

Further studies will be necessary to fully assess the potential role of CD40 in the mediation of proinflammatory signals. CD40 knockout mice have been generated [45], and these mice are functionally deficient in CD40 function in all the cells that express CD40. Therefore, these mice are not suitable to selectively study the effects of CD40 expression and its inhibition in beta cells and immune cells. The generation of knockout mice selectively lacking CD40 expression in either islets or bone marrow-derived cells and backcrossing into NOD mice will be required to better characterise the functional role of CD40 expression in pancreatic beta cells, a phenomenon that was previously unrecognised.

**Acknowledgements** This work was supported by the Diabetes Research Institute Foundation. F. Barbé-Tuana is supported by the Brazilian Foundation CAPES. We thank the Imaging Core at the University of Miami, partly supported by a centre grant from the Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF), for providing access to confocal microscopy.

## References

1. Stamenkovic I, Clark EA, Seed B (1989) A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J* 8:1403–1410

2. Hollenbaugh D, Grosmaire LS, Kullas CD et al (1992) The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *EMBO J* 11:4313–4321
3. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L et al (1992) Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357:80–82
4. Grewal IS, Flavell RA (1998) CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 16:111–135
5. Klaus SJ, Berberich I, Shu G, Clark EA (1994) CD40 and its ligand in the regulation of humoral immunity. *Semin Immunol* 6:279–286
6. Yang Y, Wilson JM (1996) CD40 ligand-dependent T cell activation: requirement of B7-CD28 signaling through CD40. *Science* 273:1862–1864
7. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233–258
8. Larsen CP, Alexander DZ, Hollenbaugh D et al (1996) CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection: suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway. *Transplantation* 61:4–9
9. Parker DC, Greiner DL, Phillips NE et al (1995) Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9560–9564
10. Kirk AD, Harlan DM, Armstrong NN et al (1997) CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8789–8794
11. Kenyon NS, Chatzipetrou M, Masetti M et al (1999) Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8132–8137
12. Mohan C, Shi Y, Laman JD, Datta SK (1995) Interaction between CD40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *J Immunol* 154:1470–1480
13. Balasa B, Krahl T, Patstone G et al (1997) CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 159:4620–4627
14. van Kooten C, Banchereau J (2000) CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 67:2–17
15. Calderhead DM, Kosaka Y, Manning EM, Noelle RJ (2000) CD40-CD154 interactions in B-cell signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 245:73–99
16. Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC (1996) Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 87:319–329
17. Wagner DH Jr, Vaitaitis G, Sanderson R, Poulin M, Dobbs C, Haskins K (2002) Expression of CD40 identifies a unique pathogenic T cell population in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3782–3787
18. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS (1995) CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4342–4346
19. Galy AH, Spits H (1992) CD40 is functionally expressed on human thymic epithelial cells. *J Immunol* 149:775–782
20. Tan J, Town T, Mori T et al (2002) CD40 is expressed and functional on neuronal cells. *EMBO J* 21:643–652
21. Smith TJ, Sciaky D, Phipps RP, Jennings TA (1999) CD40 expression in human thyroid tissue: evidence for involvement of multiple cell types in autoimmune and neoplastic diseases. *Thyroid* 9:749–755
22. Sugimoto K, Shiraki K, Ito T et al (1999) Expression of functional CD40 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 30:920–926
23. Hess S, Engelmann H (1996) A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J Exp Med* 183:159–167
24. Vosters O, Beuneu C, Nagy N et al (2004) CD40 expression on human pancreatic duct cells: role in nuclear factor-kappa B activation and production of pro-inflammatory cytokines. *Diabetologia* 47:660–668
25. Ghia P, Boussiotis VA, Schultze JL et al (1998) Unbalanced expression of bcl-2 family proteins in follicular lymphoma: contribution of CD40 signaling in promoting survival. *Blood* 91:244–251
26. Hess S, Gottfried E, Smola H, Grunwald U, Schuchmann M, Engelmann H (1998) CD40 induces resistance to TNF-mediated apoptosis in a fibroblast cell line. *Eur J Immunol* 28:3594–3604
27. Wingett DG, Vestal RE, Forcier K, Hadjokas N, Nielson CP (1998) CD40 is functionally expressed on human breast carcinomas: variable inducibility by cytokines and enhancement of Fas-mediated apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 50:27–36
28. Gallagher NJ, Eliopoulos AG, Agathangelo A, Oates J, Crocker J, Young LS (2002) CD40 activation in epithelial ovarian carcinoma cells modulates growth, apoptosis, and cytokine secretion. *Mol Pathol* 55:110–120
29. Nadeau S, Rivest S (1999) Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. *Neuroscience* 93:1449–1464
30. Chao MV (1994) The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol* 25:1373–1385
31. Stephens LA, Thomas HE, Ming L et al (1999) Tumor necrosis factor-alpha-activated cell death pathways in NIT-1 insulinoma cells and primary pancreatic beta cells. *Endocrinology* 140:3219–3227
32. Kanaka-Gantenbein C, Dicou E, Czernichow P, Scharfmann R (1995) Presence of nerve growth factor and its receptors in an in vitro model of islet cell development: implication in normal islet morphogenesis. *Endocrinology* 136:3154–3162
33. Scharfmann R, Tazi A, Polak M, Kanaka C, Czernichow P (1993) Expression of functional nerve growth factor receptors in pancreatic beta-cell lines and fetal rat islets in primary culture. *Diabetes* 42:1829–1836
34. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW (1988) Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37:413–420
35. Bottino R, Fernandez LA, Ricordi C et al (1998) Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes* 47:316–323
36. Lukowiak B, Vandewalle B, Riachy R et al (2001) Identification and purification of functional human beta-cells by a new specific zinc-fluorescent probe. *J Histochem Cytochem* 49:519–528
37. Toyoda H, Formby B, Magalong D et al (1994) In situ islet cytokine gene expression during development of type I diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Immunol Lett* 39:283–288
38. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T (2001) A choice of death—the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44:2115–2133
39. Cardozo AK, Heimberg H, Heremans Y et al (2001) A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kappa B-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276:48879–48886
40. Wong S, Guerder S, Visintin I et al (1995) Expression of the costimulator molecule B7-1 in pancreatic beta-cells accelerates diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 44:326–329
41. Wong FS, Visintin I, Wen L, Granata J, Flavell R, Janeway CA (1998) The role of lymphocyte subsets in accelerated diabetes in nonobese diabetic-rat insulin promoter-B7-1 (NOD-RIP-B7-1) mice. *J Exp Med* 187:1985–1993

42. Harlan DM, Hengartner H, Huang ML et al (1994) Mice expressing both B7-1 and viral glycoprotein on pancreatic beta cells along with glycoprotein-specific transgenic T cells develop diabetes due to a breakdown of T-lymphocyte unresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3137–3141
43. Wen L, Wong FS, Tang J et al (2000) In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes. *J Exp Med* 191:97–104
44. Phillips NE, Markees TG, Mordes JP, Greiner DL, Rossini AA (2003) Blockade of CD40-mediated signaling is sufficient for inducing islet but not skin transplantation tolerance. *J Immunol* 170:3015–3023
45. Kawabe T, Naka T, Yoshida K et al (1994) The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1:167–178