

**Ο ρόλος της απόπτωσης
και της οδού Fas-Fas ligand
στην παθογένεια
του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1**

Λέξεις ευρετηρίου

Απόπτωση
Αυτοανοσία
Διαβήτης τύπου 1
Fas-Fas ligand
Ινσουλίτιδα

Τα τελευταία χρόνια πιστεύεται ότι στην παθογένεια των αυτοάνοσων νόσων του ενδοκρινικού συστήματος, όπως στη θυρεοειδίτιδα Hashimoto, στη νόσο του Addison και στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, εκτός από το ανοσιακό σύστημα, σημαντικό ρόλο παίζει και η απόπτωση. Πρόσφατα, οι παθήσεις αυτές, όπως και άλλα αυτοάνοσα νοσήματα, συσχετίστηκαν με διαταραχές της απόπτωσης που επάγεται μέσω της οδού Fas-Fas ligand. Στην παρούσα ανασκόπηση παρουσιάζονται τα μέχρι σήμερα δεδομένα από μελέτες που συσχετίζουν την απόπτωση μέσω της οδού Fas με τον αυτοάνοσο διαβήτη σε πειραματόζωα και τον άνθρωπο. Η περαιτέρω κατανόηση των τρόπων ρύθμισης της συγκεκριμένης αποπτωτικής οδού θα μπορούσε να έχει κλινικές εφαρμογές στην αντιμετώπιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1.

**Το φαινόμενο της απόπτωσης
και η οδός Fas-Fas ligand**

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι φυσιολογική μορφή κυτταρικού θανάτου, κάρη στην οποία γίνεται συνεχής ανανέωση των ιστών με ταυτόχρονη διατήρηση της σταθερότητας των ιστολογικών διαμερισμάτων.^{1,2}

Δύο είναι οι κύριες οδοί που οδηγούν σε απόπτωση: (α) η *θετική επαγωγή* μέσω της σύνδεσης ενός προσδέτη σε υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης και (β) η *αρνητική επαγωγή* με την απώλεια ενός κατασταλτικού σήματος. Στην πρώτη περίπτωση, κεντρικό ρόλο παίζουν

**Μ. Ανδρικούλα,
Α. Τσατσούλης**

*Ενδοκρινολογική Μονάδα,
Τομέας Παθολογίας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα*

**The role of apoptosis
and the Fas-Fas ligand pathway
in the pathogenesis of type 1 diabetes**

Abstract at the end of the article

υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, οι λεγόμενοι «υποδοχείς θανάτου». Οι υποδοχείς αυτοί μεταδίδουν σήματα από ειδικούς προσδέτες και ενεργοποιούν τις κασπάσες, πρωτεολυτικά ένζυμα του κυττάρου που οδηγούν στην κατάτμηση του DNA.

Η πρωτεΐνη Fas είναι μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I, που ανήκει στην οικογένεια υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) και εκφράζεται σε διάφορους ιστούς και σε ποικιλία κυτταρικών τύπων, όπως είναι τα ενεργοποιημένα T- και B-λεμφοκύτταρα. Ο προσδέτης του Fas, Fas ligand (FasL), είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II και ανήκει και αυτός στην οικογένεια TNF. Για την πρόκληση απόπτωσης είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση του Fas είτε μέσω αντισώματος anti-Fas, είτε μέσω του FasL.³

Στην περίπτωση της αρνητικής επαγωγής της απόπτωσης, τα κύτταρα προγραμματίζονται να πεθάνουν όταν σταματούν να λαμβάνουν σήματα επιβίωσης από το περιβάλλον τους.⁴ Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται στους νευρώνες, οι οποίοι οδηγούνται σε απόπτωση όταν στερηθούν νευροτροφικούς παράγοντες, και στους ενδοκρινείς αδένες, όταν στερηθούν τροφικές ορμόνες.

Η σχέση της οδού Fas-FasL με το ανοσιακό σύστημα

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, μέσω της οδού Fas-FasL, εμπλέκεται σε πολλά στάδια της επιλογής και διαφοροποίησης των T- και B-κυττάρων, καθώς και στη ρύθμιση πολλών ανοσιακών αντιδράσεων.

Είναι γνωστό ότι οι δύο πρωτεΐνες (Fas και FasL) εκφράζονται σε ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα, με αποτέλεσμα, όταν ένα Fas-θετικό Τ-κύτταρο έρθει σε επαφή με ένα άλλο κύτταρο οποιουδήποτε τύπου που εκφράζει FasL, το πρώτο να υφίσταται απόπτωση. Οι έρευνες έδειξαν ότι οι υποδοχείς Fas και FasL παίζουν σημαντικό ρόλο: (α) στην εξάλειψη ενεργοποιημένων ώριμων Τ-κυττάρων στην περιφέρεια κατά τη λήξη μιας ανοσιακής αντίδρασης, (β) στην καταστροφή κυττάρων-στόχων (όπως κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς ή καρκινικά κύτταρα) μέσω των Τ-κυτταροτοξικών κυττάρων και των κυττάρων-φυσικών φονέων και (γ) με την εξάλειψη κυττάρων φλεγμονής σε ανοσολογικά προνομιακούς ιστούς (immune-privileged), όπως είναι οι ιστοί των οφθαλμών και των όρχεων.⁵

Σε επίμυες με μεταλλάξεις των γονιδίων *Fas* και *FasL* (lpr και gld mice, αντίστοιχα) παρατηρήθηκε συσσωρευση περιφερικών λεμφοκυττάρων και ένα θανατηφόρο αυτοάνοσο σύνδρομο με μαζική διόγκωση λεμφαδένων.^{6,7} Στον άνθρωπο, μεταλλάξεις του γονιδίου *Fas* έχουν περιγραφεί στο σύνδρομο της αυτοάνοσης λεμφοϋπερπλαστικής νόσου.⁸ Περιφερικά λεμφοκύτταρα από ασθενείς με το σύνδρομο αυτό παρουσιάζουν μειωμένη απόπτωση *in vitro* μετά από διέγερση με anti-Fas αντισώματα.

Οι Cheng et al⁹ περιέγραψαν ένα Fas mRNA, που προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα (splicing) και εξάλειψη των εξονίων 3, 4, 6 και 7. Αυτό το mRNA κωδικοποιεί τη διαλυτή μορφή του Fas (sFas), στην οποία λείπει η διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα αυτού. Το sFas παρεμποδίζει τις αλληλεπιδράσεις Fas-FasL και μπορεί να προστατέψει τα κύτταρα-στόχους από τη Fas-επαγόμενη απόπτωση.

Η πρωτεΐνη FasL έχει κι αυτή διαλυτή μορφή (sFasL), η οποία προκύπτει από αποκοπή της πρωτεΐνης FasL από την κυτταρική μεμβράνη μέσω μιας μεταλλοπρωτεϊνάσης.¹⁰ Το μόριο sFasL έχει την ικανότητα επαγωγής απόπτωσης σε Fas-θετικά κύτταρα-στόχους.

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η οδός Fas είναι σημαντική στη ρύθμιση ανοσιακών αντιδράσεων και πρωταρχικής σημασίας στην επαγωγή απόπτωσης με κυτταροτοξικά κύτταρα του ανοσιακού συστήματος.

Συσχέτιση του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1 με τη Fas-επαγόμενη απόπτωση

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 θεωρείται ως αυτοάνοση νόσος διαμεσολαβούμενη από κυτταροτοξικά κύτταρα (cell-mediated), η οποία χαρακτηρίζεται από την επιλεκτική καταστροφή των παγκρεατικών β-κυττάρων.¹¹

Για την εκδήλωση του αυτοάνοσου διαβήτη είναι παραδεκτή η ύπαρξη γενετικής προδιάθεσης, πιστεύεται όμως ότι κάποιο περιβαλλοντικό γεγονός προκαλεί την έναρξη της διεργασίας σε γενετικά προδιατεθειμένα άτομα. Κατά καιρούς, διάφοροι ιοί έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεια της νόσου, χωρίς όμως να έχει αναγνωριστεί κάποιος διαβητογόνος ιός. Ιογενείς ή άλλοι παράγοντες είναι πιθανό να οδηγούν σε φλεγμονή των νησιδίων, ενεργοποίηση αυτοανοσίας, διήθηση των νησιδίων από ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα (ινσουλίτιδα) και καταστροφή των β-νησιδιοκυττάρων του παγκρέατος. Η τελευταία πράξη φαίνεται να συμβαίνει μέσω απόπτωσης των β-κυττάρων (εικ. 1). Πράγματι, τα παθολογοανατομικά ευρήματα στο πάγκρεας ασθενών με νεοδιαγνωσθέντα διαβήτη τύπου 1 χαρακτηρίζονται από διήθηση των νησιδίων από μονοκύτταρα (ινσουλίτιδα) και μείωση του αριθμού των ινσουλινοπαραγωγών β-κυττάρων.¹²

Στα μη παχύσαρκα διαβητικά ποντίκια (NOD mice), τα οποία χρησιμεύουν ως μοντέλο μελέτης του ανθρώπινου τύπου 1 διαβήτη, η αυτοάνοση διεργασία περιλαμβάνει δύο στάδια: (α) ένα στάδιο 5 εβδομάδων περίπου, το οποίο χαρακτηρίζεται από διήθηση των νησιδίων του Langerhans από μονοκύτταρα, και (β) ένα στάδιο 12 εβδομάδων, κατά το οποίο συμβαίνει μαζική καταστροφή των β-κυττάρων, που οδηγεί στο διαβήτη.¹³

Οι διάφορες μελέτες έδειξαν ότι τα Τ-κύτταρα παίζουν κίριο ρόλο στην παθογένεια της νόσου. Ένας από τους κύριους μηχανισμούς κυτταροτοξικότητας μέσω Τ-κυττάρων φαίνεται ότι είναι η ενεργοποίηση της αποπτωτικής οδού Fas, κατά την οποία προσδετικά μόρια FasL στην επιφάνεια των Τ-κυττάρων ή σε διαλυτή μορφή (sFasL) συνδέονται στον υποδοχέα Fas σε κύτταρα-στό-



Εικόνα 1. Πιθανός ρόλος της απόπτωσης μέσω Fas-FasL στην παθογένεια του σακχαρώδους διαβήτη τύπου 1.

χους. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν το ρόλο της αλληλεπίδρασης Fas-FasL στην αυτοάνοση καταστροφή των β-κυττάρων στο διαβήτη τύπου 1. Ιδιαίτερα, έκφραση Fas ανιχνεύθηκε μόνο στα β-κύτταρα σε παγκρεατικό ιστό από δύο παιδιά με πρόσφατη έναρξη τύπου 1 διαβήτη και, συγχρόνως, απόπτωση παρατηρήθηκε σε Fas-θετικά β-κύτταρα σε περιοχές όπου υπήρχαν FasL-θετικά διηθητικά Τ-κύτταρα.¹⁴ Περαιτέρω μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η πρωτεΐνη Fas εκφράζεται σε νησιδιοκύτταρα νεοδιαγνωσθέντων ασθενών αλλά όχι φυσιολογικών ατόμων και ότι FasL εκφράζεται αποκλειστικά στα διηθητικά λεμφοκύτταρα στην περιοχή της ινσουλίτιδας.¹⁵ Τα FasL-θετικά κύτταρα είναι κυρίως CD8 και σε λιγότερο βαθμό μακροφάγα και CD4. Στην τελευταία μελέτη, διαπιστώθηκε επίσης συσχέτιση μεταξύ έκφρασης Fas και ινσουλίτιδας, υποδηλώνοντας ότι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, που απελευθερώνονται τοπικά από τα διηθητικά μονοκύτταρα, πιθανώς να επάγουν την έκφραση Fas στα ενδοκρινικά κύτταρα. Πράγματι, mRNAs για κυτταροκίνες, όπως IL-1β, INF-α, INF-γ, TNF-α και IL-β, έχουν ανιχνευθεί στο πάγκρεας τύπου 1 διαβητικών ασθενών.¹⁶ Μεταξύ αυτών, IL-1β, INF-γ και TNF-α επάγουν την έκφραση Fas σε β-κύτταρα των νησιδίων.¹⁷ Επιπλέον, μελέτες σε ανθρώπινα νησίδια αποκάλυψαν ότι η IL-1β, μέσω της δημιουργίας μονοξειδίου του αζώτου, επάγει την έκφραση Fas επιλεκτικά στα β-κύτταρα, καθιστώντας τα ευαίσθητα στη Fas-επαγόμενη καταστροφή.¹⁴

Έτσι, οι ενδείξεις από τις ανθρώπινες μελέτες συγκλίνουν στο ότι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, που παράγονται στον τόπο της ινσουλίτιδας, επάγουν την έκφραση Fas στα β-νησιδιοκύτταρα. Η αλληλεπίδραση μεταξύ Fas στα β-κύτταρα και FasL στα διηθητικά Τ-κυτταροτοξικά κύτταρα μπορεί να πυροδοτήσει τον αποπτωτικό θάνατο των β-κυττάρων και να οδηγήσει στην κλινική έκφραση του διαβήτη τύπου 1.

Μελέτες σε πειραματόζωα υποστηρίζουν το ρόλο της Fas-επαγόμενης απόπτωσης στην παθογένεια του αυτοάνοσου διαβήτη. Έτσι, έχει δείχθει ότι η απόπτωση αποτελεί τον κύριο τρόπο θανάτου των β-κυττάρων σε NOD ποντίκια που αναπτύσσουν διαβήτη.¹⁸ NOD ποντίκια με μεταλλαγμένο γονίδιο Fas (NOD-lpr/lpr) ή ποντίκια ετερόζυγα για τη μετάλλαξη *gld* του FasL δεν αναπτύσσουν διαβήτη, υποδηλώνοντας τη σημασία της αλληλεπίδρασης Fas-FasL στην εξέλιξη της ινσουλίτιδας προς καταστροφή των β-κυττάρων.^{19,20}

Υπάρχουν όμως και άλλες μελέτες που υποδεικνύουν ότι το σύστημα Fas-FasL παίζει ελάχιστο ρόλο στην καταστροφή των β-κυττάρων. Οι μελέτες αυτές υποστηρίζουν ότι η μη ανάπτυξη του διαβήτη σε NOD-

lpr/lpr ποντίκια²⁷ θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα ανοσιακής ανεπάρκειας άλλης από εκείνη της έλλειψης Fas.^{21,22} Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, μοσχεύματα νησιδίων με έλλειμμα του υποδοχέα Fas δεν προστατεύονται από την κυτταροτοξική επίθεση διαβητογόνων Τ-κυττάρων. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι, σε προδιαβητικά NOD ποντίκια, Fas εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα διηθητικά λεμφοκύτταρα, αλλά σε μικρό βαθμό στα β-νησιδιοκύτταρα.²³

Τα διαφορετικά αποτελέσματα των παραπάνω μελετών, αν και μπορεί να οφείλονται σε διαφορετική μεθοδολογική προσέγγιση, υποδηλώνουν ότι πιθανώς και άλλοι μηχανισμοί, εκτός της οδού Fas, είναι δυνατό να εμπλέκονται στη ανοσο-διαμεσολαβούμενη καταστροφή των β-κυττάρων. Πράγματι, εκτός από το σύστημα Fas-FasL, ένας επιπρόσθετος μηχανισμός θανάτωσης από τα κυτταροτοξικά Τ-κύτταρα είναι μέσω περφορίνης.²⁴ Έτσι, ποντίκια με ελλειμματικό μηχανισμό περφορίνης εμφανίζουν καθυστερημένη έναρξη και ελαττωμένη επίπτωση διαβήτη.²⁵ Η έκταση της συμμετοχής και το στάδιο κατά τη διαδικασία της ινσουλίτιδας, στο οποίο ενεργοποιούνται οι δύο αυτοί μηχανισμοί, αναμένεται να διευκρινιστούν.

Τέλος, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι χορήγηση αντισώματος έναντι FasL μείωσε σημαντικά το βαθμό της λευκοκυτταρικής διήθησης και τον αποπτωτικό θάνατο των β-κυττάρων σε συμβατά μοσχεύματα νησιδίων που είχαν μεταμοσχευθεί σε διαβητικά NOD ποντίκια.²⁶ Η μελέτη αυτή δείχνει την πιθανή κλινική εφαρμογή εξουδετέρωσης των μορίων FasL με ειδικά αντισώματα στην πρόληψη ανάπτυξης του διαβήτη τύπου 1 ή της υποτροπής της νόσου μετά από μεταμόσχευση νησιδίων του παγκρέατος.

Συμπεράσματα

Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η παθογένεια του αυτοάνοσου διαβήτη είναι πολυπαραγοντική και σε πολλά σημεία αδιευκρίνιστη. Πιστεύεται, πάντως, ότι η τελευταία πράξη στη διαδικασία αυτή είναι η «αυτοκτονία» των β-νησιδιοκυττάρων του παγκρέατος μέσω απόπτωσης. Γιατί και πώς συμβαίνει ο αποπτωτικός θάνατος των ινσουλινοπαραγωγών κυττάρων, δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, που παράγονται τοπικά κατά το στάδιο της ινσουλίτιδας από τα διηθητικά κύτταρα του ανοσιακού συστήματος, επάγουν την έκφραση του αποπτωτικού υποδοχέα Fas στην επιφάνεια των β-παγκρεατικών κυττάρων. Η παρουσία, επίσης, FasL-θετικών διηθητικών Τ-κυττάρων οδηγεί σε απόπτωση τα Fas-θετικά νησιδιο-

κύτταρα, με αποτέλεσμα την κλινική έκφραση του διαβήτη. Έτσι, η επαγόμενη από αυτοανοσία οδός Fas-FasL φαίνεται ότι αποτελεί την κύρια αποπτωτική οδό θανάτου των β-κυττάρων του παγκρέατος, αν και αυτό δεν υποστηρίζεται από όλες τις μελέτες. Πιθανώς να εμπλέκονται και άλλοι αποπτωτικοί και φλεγμονώδεις μηχανισμοί.

Είναι λοιπόν φανερό ότι απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση του ρόλου της απόπτωσης και της οδού Fas στην παθογένεια του διαβήτη τύπου 1. Η απόκτηση γνώσεων από τη διερεύνηση αυτή θα οδηγήσει στην ανακάλυψη τρόπων παρέμβασης και ρύθμισης της οδού Fas για την πρόληψη ή και τη βελτίωση της κλινικής έκφρασης της νόσου.

ABSTRACT

The role of apoptosis and the Fas-Fas ligand pathway in the pathogenesis of type 1 diabetes

M. ANDRIKOULA, A. TSATSOULIS

Endocrine Unit, Department of Medicine, University of Ioannina, Ioannina, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2001, 18(4):349-353

The central pathogenic event in the development of autoimmune endocrine diseases is the immune-mediated destruction of the specific endocrine cell. In the case of autoimmune type 1 diabetes the cytotoxic destruction of the pancreatic islet β-cells occurs through apoptosis leading to inadequate insulin secretion and hyperglycemia. Immune-mediated apoptosis specifically triggered through Fas, is believed to be central to the pathogenesis of autoimmune diabetes because this apoptotic mechanism destroys islet β-cells in both animal models of diabetes and the human type 1 disease. On the other hand, animals engineered to prevent Fas mediated cytotoxicity of islet cells do not develop the disease. Thus, apoptosis signaled through the Fas pathway appears to play an important role in the pathogenesis of autoimmune diabetes. The regulation of this pathway in the islet cells may alter the clinical expression of the disease.

Key words: Apoptosis, Autoimmunity, Fas, Fas ligand, Insulinitis, Type 1 diabetes

Βιβλιογραφία

- KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972, 26:239-257
- AMEISEN JC. The origin of programmed cell death. *Science* 1995, 272:1278-1279
- SMITH CA, FARRAH T, GOODWIN RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* 1994, 76:959-962
- JACOBSON MD, WELL M, RAFF MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997, 88:347-354
- GRIFFITH TS, BRUNNER T, FLETCHER SM, GREEN DR, FERGUSON TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995, 270:1189-1192
- NAGATA S. Mutations in the Fas antigen gene in lpr mice. *Semin Immunol* 1994, 6:3-8
- LYNCH DH, WATSON ML, ALDERSON MR, BAUM PR, MILLER RE, TOUGHT ET AL. The mouse Fas-ligand gene is mutated in gld mice and is part of a TNF family gene cluster. *Immunity* 1994, 1:131-136
- FISHER GH, ROSENBERG FJ, SRAUS SE, DALE JK, MIDLETON LA, LIN AY ET AL. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 1995, 81:935-946
- CHENG J, ZHOU T, LIU C, SHAPIRO JP, BRAUER MJ, KIEFER MC ET AL. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994, 263:1759-1762
- TANAKA M, SUDA T, TAKAHASHI T, NAGATA S. Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 1995, 14:1129-1135
- BACH JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 1994, 15:516-542
- ITOH N, HANAFUSA T, MIYAZAKI J, YAMAGATA K, YAMAMOTO K, WAGURI M ET AL. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Invest* 1993, 92:2313-2322
- ANDRÉ I, GONZALEZ A, WANG B, KATZ J, BENOIST C, MATHIS D. Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:2260-2263

14. STASSI G, DEMARIA R, TRUCCO G, RUDERT W, TESTI R, GALLUZZO A ET AL. Nitric oxide primes pancreatic β cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1997, 186:1193
15. MORIWAKI M, ITOH N, MIYAGAWA J, YAMAMOTO K, IMAGAWA A, YAMAGATA K ET AL. Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999, 42:1332–1340
16. SOMOZA N, VARGAS F, ROURA-MIR C, VIVES PI M, FERNANDEZ-FIGUERAS MT, ARIZA A ET AL. Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V β usage and cytokine profile. *J Immunol* 1994, 152:1360–1377
17. STASSI G, TODARO M, RICHIUSA P, GIORDANO M, MATTINA A, SBRIGLIA MS ET AL. Expression of apoptosis-inducing CD95 (Fas/Apo1) of human β -cells sorted by flow cytometry and cultured *in vitro*. *Transplant Proc* 1995, 27:3271–3275
18. O BRIEN BA, HARMON BV, CAMENON DP, ALLAN DJ. Apoptosis is the mode of β -cell death responsible for the development of IDDM in the nonobese diabetes (NOD) mouse. *Diabetes* 1997, 40:750–757
19. CHERVONSKY AV, WANG Y, WONG F, VISINTIN I, FLAVELL RA, JANEWAY CAJR ET AL. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 1997, 89: 17–24
20. SU Y, HU Q, KRISTAN JM, COSTA C, SHEN Y, GERO D ET AL. Significant role for Fas in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *J Immunol* 2000, 164:2523–2532
21. KIM YH, KIM S, KIM KA, YAGITA H, KAYAGAKI N, KIM KW ET AL. Apoptosis of pancreatic β cells detected in accelerated diabetes of NOD mice: no role of Fas-Fas ligand interaction in autoimmune diabetes. *Eur J Immunol* 1999, 29:455–465
22. ALLISON J, STRASSER A. Mechanisms of β cell death in diabetes: a minor role for CD95. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:13818–13822
23. THOMAS HE, DARWICHE R, CORBETT JA, KAY TW. Evidence that β cell death in the nonobese diabetic mouse is Fas independent. *J Immunol* 1999, 163:1562–1569
24. KAEGI D, VIGNAUX F, LEDERMANN B, BUERKI K, DEPRAETERE V, NAGATA S ET AL. Fas and perforin pathways as major mechanism of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994, 265:528–530
25. KAEGI D, ODERMATT B, SEILER P, ZINKERNAGEL RM, MAK TW, HENGARTNER H. Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1997, 186: 989–993
26. SUAREZ-PINZON WL, POWER RF, RABINOVITCH A. Fas ligand-mediated mechanisms are involved in autoimmune destruction of islet beta cells in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 2000, 43:1149–1156

Corresponding author:

A. Tsatsoulis, Endocrine Unit, Department of Medicine, University of Ioannina, GR-451 10 Ioannina, Greece