

Az immunreguláció és az inkretin tengely változásainak vizsgálata 1-es típusú diabetes mellitusban

Doktori értekezés

dr. Zóka András

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Firneisz Gábor, Ph.D.,
egyetemi adjunktus/tudományos munkatárs

Konzulens: Dr. Barna Gábor, Ph.D., tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Körner Anna, D.Sc., habil., egyetemi docens
Dr. Farkas Klára, Ph.D., részlegvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Pánczél Pál, C.Sc., habil., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ferencz Viktória, Ph.D., egyetemi tanársegéd
Dr. Ruzicska Éva, Ph.D.

Budapest
2017

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyéke	3
1. Bevezetés, irodalmi háttér	7
1.1 A szénhidrát-anyagcsere zavarainak etiológia szerinti áttekintése.....	7
1.2 Az 1-es típusú diabetes mellitus epidemiológiája.....	10
1.3 Insulitis és β -sejt károsodás: a patogenezis klasszikus modelljének átértékelése.....	14
1.4 Genetikai tényezők szerepe T1DM kialakulásában.....	18
1.5 Kandidáns gének jelentősége az immunregulációban.....	22
1.6 Az insulitis kialakulását befolyásoló endogén és exogén tényezők.....	25
1.7 T _{reg} sejtek: meghatározásuk, működése és főbb alcsoportjaik.....	32
1.8 Az entero-inzuláris rendszer metabolikus és immunológiai jelentősége.....	37
2. Célkitűzések	43
3. Módszerek	45
3.1 Vizsgálatba bevont személyek.....	45
3.2 DPP4 enzimaktivitás meghatározása.....	47
3.3 GLP-1 koncentrációk meghatározása.....	47
3.4 Áramlási citometriás mérések.....	47
3.4.1 Kapuzási stratégia.....	49
3.5 További laborparaméterek meghatározása.....	50
3.6 Genetikai vizsgálatok.....	50
3.7 Statisztikai módszerek.....	51
4. Eredmények	52
4.1 Szérum DPP4 aktivitás és GLP-1 plazmaszintek.....	52
4.2 Az inkretin-tengely paramétereinek összefüggései hematológiai paraméterekkel.....	53
4.3 CD25 és CTLA-4 expresszió a helper és regulátoros T-sejt populációkon.....	54
4.4 Az egyes T-sejt alcsoportok CTLA-4 és Foxp3 expressziója.....	57

4.5 A T_{reg} sejtek CD26 expressziója.....	58
4.6 A T_{reg} alcsoportok CXCR3 expressziója.....	59
4.7 A vizsgált T_{reg} paraméterek összefüggései metabolikus tényezőkkel.....	59
4.8 Az expressziós, metabolikus és endokrin paraméterek összefüggései genetikai (<i>DPP4</i> rs6741949, <i>CTLA4</i> rs3087243, <i>CD25</i> rs61839660, <i>PTPN2</i> rs2476601) polimorfizmusokkal.....	60
4.8.1 A <i>CTLA4</i> rs3087243 SNP összefüggése a $CD25^+$ T_{reg} sejtek <i>CTLA-4</i> expressziójával.....	60
4.8.2 A <i>CTLA4</i> rs3087243 genotípus összefüggése a postprandialis <i>GLP-1</i> plazmaszintekkel.....	62
4.8.3 További összefüggések az inkretin-válasszal és a szérum <i>DPP4</i> enzimaktivitással.....	63
5. Megbeszélés.....	65
5.1 Perifériás T_{helper} és T_{reg} sejtek és egyes markereinek változásai T1DM-ben.....	65
5.2 Az immunregulációt befolyásoló genetikai tényezők kapcsolata az inkretinválasszal.....	68
5.3 A <i>DPP4</i> -inkretin tengely változásai T1DM-ben, és ezek összefüggése hematológiai paraméterekkel.....	70
6. Következtetések.....	71
7. Összefoglalás.....	74
8. Summary.....	75
9. Irodalomjegyzék.....	76
10. Saját publikációk jegyzéke.....	111
11. Köszönetnyilvánítás.....	113

Rövidítések jegyéke

ADA: American Diabetes Association

AF700: alexa fluor 700

AIRE: autoimmune regulator

ANOVA: varianciaanalízis (analysis of variance)

APC: antigénbemutató sejt (antigen presenting cell)

APC (áramlási citometria): allophycoyanin

ATG: thyreoglobulin-elleni antitest

ATPO: thyreoperoxidáz elleni antitest

BAK: BCL2-antagonist/killer

BAX : BCL2-associated X protein

BCL2: B-cell CLL/lymphoma 2

BCL-XL: BCL2-like protein 1

BH3: BCL2 homologous 3

BMI: testtömegindex (body mass index)

CCL: chemokine (C-C motif) ligand

CI: konfidencia intervallum

CRP: C-reaktív protein

CTLA-4: cytotoxikus T-lymphocytá-asszociált protein 4

CXCL: chemokine (C-X-C motif) ligand

CXCR: CXC chemokine receptor

DAMP: danger-associated molecular pattern

DC: dendritikus sejt (dendritic cell)

DIPP: Diabetes Prediction and Prevention

DP5: death protein 5

DPP4: dipeptidyl peptidase 4

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ER: endoplazmatikus reticulum
FITC: fluorescein isothiocyanate
Foxp3: forkhead box P3
GAD: glutaminsav dekarboxiláz
GCK: glukokináz
GDM: gestációs diabetes mellitus
GIP: glukózdependens inzulinotróp peptid
GKO: génkiütött (gene-knockout)
GLP-1: glucagon-like peptid-1
GLUT: glukóztranszporter
GWAS: genome-wide association study
HbA1c: hemoglobin A1c (glikohemoglobin)
HHV: humán herpes vírus
HLA: humán leukocita antigén
HNF-1 α : hepatic nuclear factor-1 α
hsCRP: high-sensitivity CRP
HSP: heat shock protein
IADPSG: International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups
IAPP: szigetsejt amiloid polipeptid (islet amyloid polipetide)
ICA: szigetsejt elleni autoantitest (islet cell autoantibody)
IDF: International Diabetes Federation
IFG: emelkedett éhomi glukózsztint (impaired fasting glucose)
IL2RA: IL-2 receptor α lánc
iNKT: invariáns természetes ölösejt (invariant natural killer T-cell)
IFIH1: interferon induced with helicase C domain 1
IFN: interferon
IGT: csökkent glukóztolerancia (impaired glucose tolerance)
IPEX: immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked

iT_{reg}: indukált regulátoros T-sejt
JNK: c-Jun N-terminal kinase
LADA: felnőttkori látens autoimmun diabetes (latent autoimmune diabetes of adults)
LCMV: lymphocytás choriomeningitis vírus
LPS: lipopolysaccharide
MHC: major histocompatibility complex
MWU: Mann-Whitney U-teszt
MODY: maturity onset diabetes of the young
NAFLD: nem alkoholos zsírmájbetegség (non-alcoholic fatty liver disease)
NF-κB: nuclear factor-κB
NGS: újgenerációs szekvenálás (next-generation sequencing)
NOD: non-obese diabetic
nT_{reg}: természetes regulátoros T-sejt (natural T_{reg})
OVA: ovalbumin
PAMP: patogén-asszociált molekuláris mintázat (pathogen-associated molecular pattern)
PBS: phosphate-buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PE: phycoerythrin
PerCP: peridinin chlorophyll
PRR: patogén-felismerő receptor (pathogen-recognition receptor)
PTPN2: protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2
PUMA: p53 up-regulated modulator of apoptosis
RANTES: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
SGLT: nátrium-glukóz kotranszporter (sodium-glucose transport protein)
siRNS: kis interferáló RNS (small interfering RNA)
SLE: szisztémás lupus erythematosus
SNP: single nucleotid polymorphism
SRO: Spearman rank order (Spearman-féle korrelációvizsgálat)

STAT: signal transducer and activator of transcription

T1DM: 1-es típusú diabetes mellitus

T1DGC: Type 1 Diabetes Genetics Consortium

T2DM: 2-es típusú diabetes mellitus

TEDDY: The Environmental Determinants of Diabetes in the Young

Th: helper T-sejt

TLR: toll-like receptor

TNF: tumor necrosis factor

TSDR: T_{reg} cell-specific demethylated region

TRAK: TSH-receptor elleni antitest

TSDR: T_{reg} cell-specific demethylated region

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

Th2: helper T-sejt, 2-es alcsoport

VEGF: vascular endothelial growth factor

VNTR: variable number tandem repeat

WHO DiaMond: World Health Organization Diabetes Mondiale

1. Bevezetés, irodalmi háttér

1.1 A szénhidrát-anyagcsere zavarainak etiológia szerinti áttekintése

Míg a korábbi évezredek során az akut megbetegedések, elsősorban fertőzések voltak felelősek a halálozás legnagyobb hányadáért, az életszínvonal javulásával és a születéskor várható élettartam növekedésével előtérbe kerültek olyan krónikus megbetegedések, amelyek kialakulásában a várható élettartam növekedése és egyes civilizációs ártalmak szerepe a meghatározó. Ezen betegségek között kiemelt szereppel bír a cukorbetegség (diabetes mellitus). Hátterében az inzulin relatív vagy abszolút hiánya áll, amely közvetlenül érinti a szénhidrát-, közvetve a lipid- és fehérje anyagcserét, és számos jelentős mortalitású szív-érrendszeri és idegrendszeri szövődmény kialakulásával áll összefüggésben. Az IDF (International Diabetes Federation) adatai szerint jelenleg világszerte több, mint 400 millió ember él diabetes mellitusszal [1]. Az esetek több mint 90%-át a perifériás inzulin-rezisztencián és relatív inzulinhoányon alapuló 2-es típusú diabetes mellitus (T2DM) teszi ki. Kialakulása számos, részben ismert genetikai faktor mellett a nagymértékben életmódbeli tényezőkön alapuló metabolikus szindróma kialakulásához köthető [2]. Relatív inzulinhoányhoz vezethetnek további ritkább kórállapot is. Az inzulinszekréción zavarát eredményező monogénes, autoszómális dominánsan öröklődő kórállapotokat MODY (maturity onset diabetes of the young) néven foglalja össze az irodalom. Leggyakoribb altípusai az inzulin transzkripcióját is szabályozó HNF-1 α (hepatic nuclear factor-1 α) transzkripció faktor funkcióvesztéses mutációja által okozott MODY3 és a β -sejtek glukózszenzoraként működő glukokináz (GCK) enzim funkcióvesztéses mutációjával összefüggő MODY2. A mitochondriumok örökletes funkciózavarai további szervrendszerek eltérései mellett a β -sejtek funkciózavarát is eredményezik, amelyet az irodalom mitochondriális-, illetve az öröklődés sajátossága alapján anyai ágon öröklődő diabetesként foglal össze [3]. A pontos prevalencia adatok megadását nehezíti, hogy az inzulinhoány súlyosságától, életkortól és a klinikai képtől függően MODY vagy mitochondrialis diabetes esetén számos esetben 1-es, gyakrabban 2-es típusú diabestet diagnosztizálnak és a későbbiek során sem minden esetben születik meg a pontos kórisme. MODY a diagnosztizált – nagyobb részben fiatalkori- diabeteses esetek 0,14-1,8 %-ában kerül megállapításra, [4] a mitochondrialis diabetes prevalenciája 1 %

körülre tehető az összes eset között [5]. A felsoroltakon kívül változó mértékű inzulinhiányhoz és következményes diabetes mellitushoz vezethetnek a pancreas állományát kiterjedten roncsoló folyamatok (pancreatogén diabetes, „3c típusú diabetes” – T3cDM), elsősorban az akut és krónikus pancreatitis, illetve a pancreas térfoglaló folyamatai. Etiológiától függetlenül gestatiós diabetes mellitus (GDM), illetve gestatiós hyperglükemia kerül megállapításra a szénhidrát-anyagcsere várandósság során felismert zavarai esetében. A gestatiós diabetes meghatározása jelentős részben lefedi a szénhidrát-anyagcsere nem várandós alanyok között emelkedett éhomi vércukorként (IFG: impaired fasting glucose) és csökkent glukóztoleranciaként (IGT: impaired glucose tolerance) meghatározott, diabetes kialakulására fokozott kockázatot jelentő állapotokat is, bár az egyes szervezetek ajánlásai a határértékek vonatkozásában eltérhetnek [6]. Újabban a WHO is szigorúbb ajánlást tett a diagnosztikus éhomi plazma glukózsint tekintetében. Bár a szénhidrát-anyagcsere bármely zavara leírásra kerülhet várandósság ideje alatt is, a GDM esetek nagy többsége a T2DM kialakulására is hajlamosító rizikótényezőkkel hozható összefüggésbe. A diabetes eddig felsorolt alcsoportjainak részletekbe menő ismertetése túlmutatna a jelen munka keretein. A diagnosztikus határértékeket az I. táblázat foglalja össze.

I. táblázat A diabetes mellitus diagnosztikájában használt határértékek [7–12]

	Egészséges	Fokozott kockázatú állapotok (prediabetes)		T1DM és T2DM	Gestatiós diabetes*	
		IFG	IGT		2013 WHO, ADA jelenlegi, IADPSG*	Módosított 1999 WHO (SE centrumban használt)
Éhomi plazma glukóz	<6 mmol/l	6,1-6,9 mmol/l (ADA: 5,5-6,9)	NA	≥7 mmol/l	5,1-6,9* mmol/l	≥6,1 mmol/l (2017 MDT: ≥5,6 mmol/l)
Random érték	<11,1 mmol/l	<11,1 mmol/l	<11,1 mmol/l	≥11,1 mmol/l	<11,1 mmol/l	<11,1 mmol/l
OGT 60'					≥10 mmol/l	
OGTT 120'	<7,8 mmol/l	NA	7,8-11 mmol/l	≥11,1 mmol/l	8,5-11,1* mmol/l	≥7,8 mmol/l
HBA1c	ADA: <5,7 %	ADA: 5,7-6,4 %		≥6,5%		

Az I. táblázatban jelölt nemzetközi irányelvek és legújabb hazai ajánlás alapján a * jelöléssel kiemelt felső érték fölött a kórisme terhesség alatt manifesztálódott diabetes (diabetes in pregnancy). GDM esetében a feltüntetett értékek a 24-28. gestatiós héten egy lépésben, 75 g glukózzal végzett terhelésre vonatkoznak (ADA 2016, WHO 2013).

Az összes eset mintegy 10 %-áért felelős 1-es típusú diabetes mellitus számos vonatkozásban eltér az említett altípusoktól. A T2DM-től eltérően többnyire, de nem kizárólag fiatalabb életkorban (jellemzően 30 év alatt) alakul ki. Az inzulin elválasztásáért felelős β -sejtek szelektív pusztulásából következő abszolút inzulinhiány jellemzi. Hátterében a betegség korai szakaszában az esetek nagy többségében szerológiai módszerekkel is igazolható az autoimmun folyamat fennállása. Terminológiailag különbséget teszünk gyorsan progrediáló („klasszikus fiatalkori cukorbetegség”) és lassabban progrediáló, típusosan felnőttkorban jelentkező variáns között. Ez utóbbit LADA (latent autoimmune diabetes of adults) néven említi az irodalom. A β -sejtek károsodásához vezető folyamat, az insulitis szövettani szinten azonosítható folyamat (a jelenleg leginkább elfogadott definíció szerint kimutatható legalább három érintett sziget és ezek mindegyikében 15 infiltráló immunsejt metszetenként [13]). A Langerhans-szigeteket infiltráló makrofágok citokintermelésük [14] által, a citotoxikus $CD8^+$ T-sejtek emellett pórusképzéssel járulnak hozzá a β -sejtek pusztulásához [15]. A folyamat igen specifikus, ugyanakkor az inzulinhiány a glucagont elválasztó α -sejtek gátlásvesztéséhez is vezet [16]. A pusztuló β -sejtekből felszabaduló autoantigének ellen teremelődő autoantitestek a szérumban kimutathatóak, és a diagnózis fontos elemei. Ugyanakkor a folyamatot elindító, és fennállását, előrehaladását lehetővé tevő tényezőkről jelenleg is csak töredékes ismeretekkel rendelkezünk. A T1DM népegészségügyi jelentősége is ebből adódik: a jellemzően fiatalkori kezdetet követően a betegek több évtizeden keresztül élnek együtt betegségükkel és annak szövődményeivel, amelyek jellemzően aktív korokban alakulnak ki, és befolyásolják munkaképességüket; ugyanakkor a körülhatárolható támadáspont hiányában nem rendelkezünk olyan terápiás lehetőséggel, amely által a folyamat megelőzhető, feltartóztatható, esetleg visszafordítható lenne. Az egyetlen hatékony – tüneti – kezelési lehetőség ma is az inzulin külső forrásból történő pótlása, amely a T2DM-től, illetve ritkább altípusoktól eltérően T1DM esetében –jelen tudásunk és terápiás lehetőségeink mellett- definíció szerint elkerülhetetlen.

1.2 Az 1-es típusú diabetes mellitus epidemiológiája

A világban jelenleg mintegy 422 millió ember szenved diabetesben (WHO 2015) [1], az esetek mintegy tizedének háttérében feltételezhető T1DM. Tekintettel arra, hogy a klinikum önmagában nem elégséges a pontos diagnózishoz, az immunológiai vizsgálatok, illetve a ritkább alcsoportok meghatározásához szükséges genetikai vizsgálatok azonban csak a világ népességének kisebb része számára hozzáférhetőek, a WHO globálisan nem tett közzé etiológia szerinti pontos adatokat [17]. Az incidencia és prevalenciaértékek területenként eltérőek, a legkevesebb új esetet jellemzően Ázsia (Kína: 0,6/100 000 új eset évente [18]) egyes területein, míg a legtöbbet Európában regisztrálják, igen jelentős helyi eltérésekkel. A világelső Észak-Európa, ezen belül Finnország, ahol 100 000 vizsgált személy között átlagosan 57,4 új megbetegedést regisztrálnak évente, míg Macedóniában az éves incidencia 3,9/100000 lakos. Az incidencia északról dél felé haladva jellemzően csökken, amely alól kivételt jelent Szardínia (38,8/100 000) [19]. Mind az 1-es [20], mind a 2-es típusú diabetes incidenciája és prevalenciája világszerte emelkedik. Az incidencia növekedése az elmúlt évtizedekben Európában évente 3-4% közötti volt (jelentős területi eltérésekkel), és jellemzően a legfiatalabbak (0-4 évesek) között volt a legnagyobb mértékű, bár a legtöbb új eset továbbra is a serdülőkorúak közül kerül ki [21]. Az elmúlt években az EURODIAB study keretében született legátfogóbb hazai felmérés alapján a magyar incidencia-adatok az európai középmezőnybe tartoznak, ugyanakkor 1989 és 2009 között 7,7/100 000-ről 18,2/100 000-re emelkedett a gyermekkorban (<15 év) felismert új esetek száma évente. Az incidencia átlagos növekedése a vizsgált 20 éves időszakban 4,4% volt. Az autoimmun betegségek többségétől eltérően a szerzők nemek szerint nem számoltak be számottevő eltérésekről. Figyelemreméltó ugyanakkor, hogy az átlagos évenkénti incidencia-növekedés üteme az 5 év alattiak között a legmagasabb (0-4 év: 6,2%; 5-9 év: 4,9%; 9-15 év: 3,3%) [22].

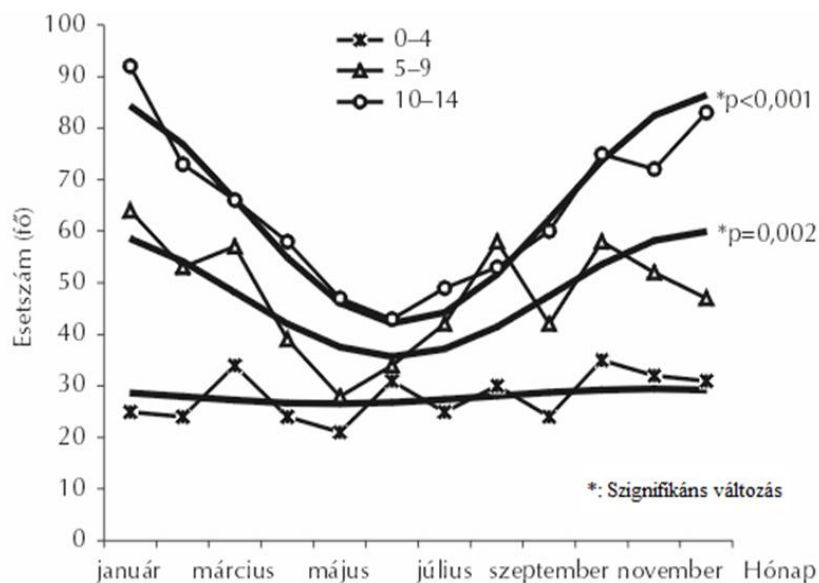
Míg a 2-es típusú diabetes kialakulásához vezető kórélettani eltérések szorosan kapcsolódnak a metabolikus szindrómához, és az annak kialakulásáért felelős tényezők terjedéséhez, 1-es típus esetében a növekvő incidencia okairól, a patogenezis korai lépéseihez hasonlóan csak keveset tudunk. A népesség genetikai kockázatra vonatkozó összetétele jelenlegi ismereteink szerint nem változhat jelentősen rövidebb időtartamon belül, így a tendenciák háttérében a környezeti tényezők elsődleges szerepét

feltételezhetjük. Ezt támasztja alá, hogy a Type 1 Diabetes Genetics Consortium (T1DGC) adatai alapján az 1965 és 2006 között diagnosztizált esetek között a rizikóért meghatározó részben felelős HLA-DR3/4-DQB1*0302 allélok csökkenő penetranciáját írták le [23]. A változás az öt év alatt diagnosztizáltak között a legjelentősebb, és az incidencia növekedése ebben a csoportban a legkifejezettebb. Ugyanakkor a populáció fokozatos genetikai átrendeződésének szerepe sem kizárható hosszabb távon, azonban ez valószínűleg nem elégséges az epidemiológiai trendek magyarázatára.

Bár a metabolikus tényezők szerepe T1DM kialakulásában csekélyebb, mint T2DM esetében, egyes megfigyelések szerint a kategorikus diagnózis számos esetben nem lehetséges. Ahogy a gyermekek és fiatalok körében is egyre több a túlsúlyos, az inzulinrezisztencia is megjelent az egészen fiatalok között. Emellett egyre növekszik azoknak a száma, akik egyértelműen obesek és inzulinrezisztenciát mutatnak (így általában 2-es típusúnak diagnosztizálják őket), de emellett autoantitesteket is hordoznak („double diabetes”). A SEARCH for Diabetes in Youth Study (USA) eredményei szerint a 20 évnél fiatalabb, frissen diagnosztizált diabetesesek 19,5 %-a a bizonyítható autoimmunitás mellett inzulinrezisztenciát is mutat (15,9 % tisztán inzulinrezisztens, autoimmunitás nélkül!) [24]. Felmerül a kérdéses, hogy csak az 1-es típusú diabeteshez járulékosan társuló klasszikus inzulinrezisztenciáról van-e szó, vagy mélyebb összefonódásokat is kell keresnünk, továbblépve egy új klasszifikáció felé.

Több, régóta ismert megfigyelés is alátámasztja, hogy az újonnan felismert T1DM esetek száma évszakonként ingadozik, a legtöbb új diagnózis a téli hónapokban születik. Ez a megfigyelés vezetett először a szezonális vírusfertőzések etiológiai szerepének felvetéséhez már 1926-ban [25]. 1969-ben főleg enterovírusok, leginkább a Coxsackie B vírus etiológiai szerepe merült fel, amelyet szerológiai vizsgálatok eredményei is alátámasztani látszottak: magasabb Coxsackie B vírus (főképp B4) elleni antitesttitert mutattak ki három hónapon belül felismert T1DM betegek szérumból mind egészséges kontrollszemélyekkel, mind hosszabb ideje fennálló T1DM betegekkel összehasonlítva [26]. Későbbi PCR módszerrel is szignifikánsan gyakrabban sikerült enterovírus RNS-t kimutatni T1DM-mel diagnosztizált gyerekek szérumból a diagnóziskor, mint egészséges kontrollokból [27].

A meggyőző adatok ellenére továbbra sem egyértelmű, hogy a vírusfertőzések milyen módon vesznek részt a patogenezisben. Egyes epidemiológiai megfigyelések finomítják, és részben új megközelítésbe helyezhetik eddigi ismereteinket a szezonális ingadozásról. A World Health Organization Diabetes Mondiale (WHO DiaMond) vizsgálatban gyerekkori T1DM incidenciájában kimutatható volt szezonális ingadozás, amely az életkor előrehaladtával kifejezettebbé vált [28]. Az EURODIAB (Epidemiology and Prevention of Diabetes study) hazai adatai is hasonló tendenciákat mutatnak: négy éves kor előtt felállított diagnózis esetén nem figyelhető meg szezonális ingadozás, 5-10 éves korban mérsékelt, de szignifikáns, míg 10-14 évesen diagnosztizáltak között kifejezett szezonális ingadozás mutatható ki (1. ábra) [29]. A szezonális ingadozás változása az életkorral felveti a lehetőséget, hogy egy környezeti trigger hatékonyságát az életkorral változó endogén folyamatok dinamikája határozhatja meg.



1. ábra A T1DM incidenciájában mutatkozó szezonális ingadozás (az inzulinkezelés megkezdése alapján) korcsoportonként: a közlemény szerzői beszámoltak róla, hogy a klinikai manifesztáció időpontja az életkor előrehaladtával egyre kifejezettebb szezonális ingadozást mutat [29]

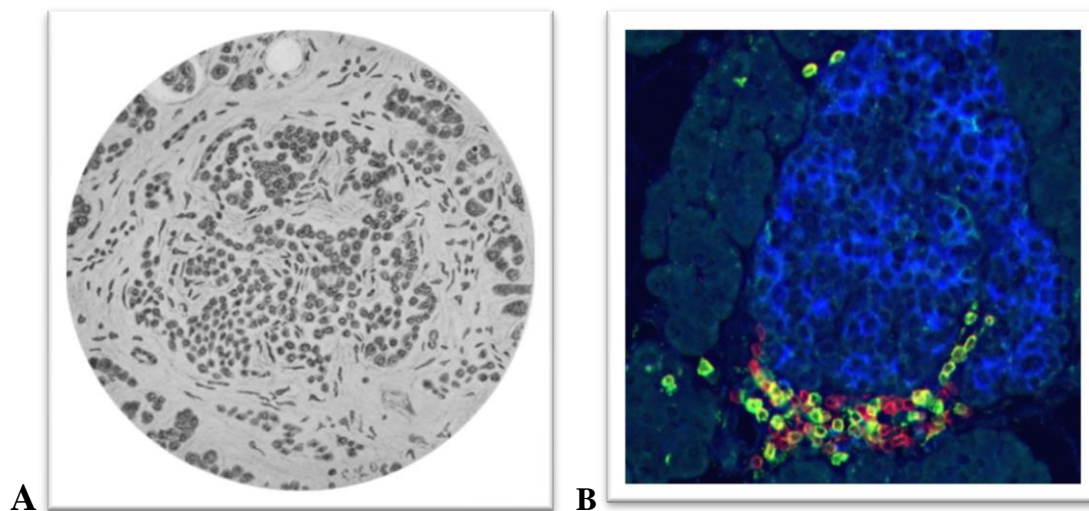
T1DM betegekben több –elsősorban T-sejt-mediált- szövet-specifikus és szisztémás autoimmun betegség előfordulása jelentősen gyakoribb, mint a teljes népesség körében, amelynek hátterében meghatározó lehet a közös hajlamosító genetikai polimorfizmusok szerepe, amelyek közül számos az immunválasz szabályozásához, limitálásához, az autotolerancia kialakításához alapvető fontosságú fehérjéket kódoló géneket érint (ld. 1.4 alfejezet). A T1DM betegek közel negyede hordozhat pajzsmirigy elleni autoantitesteket, és ezen betegek közel felében idővel klinikailag manifeszt autoimmun thyreoiditis is kialakul (jellemzően Hashimoto-thyreoiditis és hypothyreosis). Autoimmun gastritis és coeliakia jellemzően a betegek 5-10 %-ában alakul ki [30]. A T1DM mellett autoimmun társbetegségként ismert előforduló kórképeket, gyakoriságukat és a diagnózis alapjául szolgáló immunológiai vizsgálatokat a II. táblázat foglalja össze.

II. táblázat A T1DM gyakoribb autoimmun társbetegségei [30–40]

	Prevalencia T1DM betegekben	Esélyhányados (vs. teljes népesség)	Szerológiai és szövettani diagnózis
Autoimmun thyreoiditis	10-12%	2-3,5	pajzsmirigy funkció, ATPO, TRAK , ATG
Coeliakia	4-10%	5-10	transzgluamináz és deaminált gliadin elleni antitestek, szövettan
Autoimmun gastritis (<i>anaemia perniciosa</i>)	5-10% (2,6-4%)	3-5	se. B12, parietalis sejt elleni antitest, gastroscopia, chromogranin?
Vitiligo	2-10%	4-30	-
Addison-kór	0,5%	5	21-hidroxiáz elleni antitest
Rheumatoid arthritis- juvenilis idiopathiás arthritis	<0,5%	4	radiológiai eltérések, rheumafaktor, anti-CCP
SLE	0,5-1,15%	6-13	ANA, anti-Smith, anti-dsDNS, lupus band-test
Sclerosis multiplex	0,2-2%	3-5	klinikai tünetek, képalkotó vizsgálatok (MRI)

1.3 Insulitis és β -sejt károsodás: a patogenezis klasszikus modelljének átértékelése

Sobolew 1900-ban a Langerhans-szigetek hiányát írta le egyes diabetes mellitussal összefüggésben elhunyt betegek boncolásakor [41]. Opie egy évvel később megjelent munkájában „interstitialis pancreatitis” esetek vizsgálata során összefüggést figyelt meg a Langerhans-szigetek léziói és a diabetes mellitus megjelenése között [41]. A korai megfigyelések ellenére az insulitis valós kórélettani jelentősége még évtizedekig ismeretlen maradt, amely a diabetes kórélettani alapú klasszifikációjának kiforrotlansága mellett leginkább talán azzal magyarázható, hogy a folyamat nem egyszerre és egyforma mértékben érinti a szigeteket, így az insulitis különösen a korai módszerekkel akcidentális leletként volt értékelhető. Erre utalhat Weichselbaum 1910-ben publikált munkája, amelyben 189, korábban diabetes mellitusban szenvedő beteg boncolásakor mindössze hat esetében tudott insulitist azonosítani [42]. Bár az insulitis szövettani leírására már több mint 100 éve sor került, körülbelül 50 éve merült fel T1DM és további autoimmun betegségek (Grawes-Basedov thyreoiditis [43] anaemia perniciosa [44]) társulása alapján a T1DM autoimmun eredete, és az insulitis valós kórélettani szerepe 1958-ban került leírásra [45].

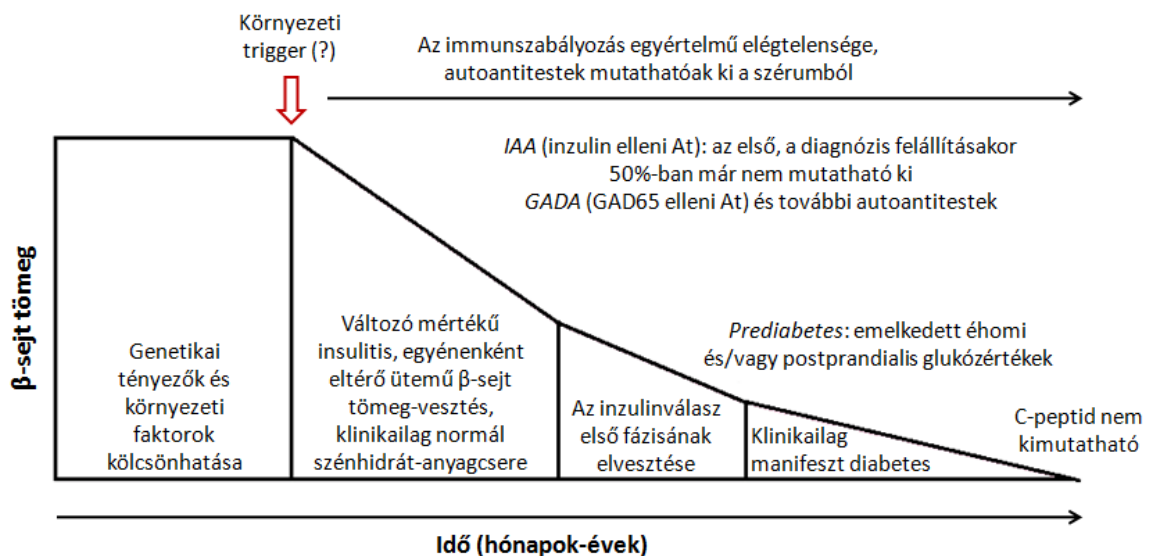


2. ábra. **A:** Az insulitis egyik első fennmaradt fénymikroszkópos képe Opie [41] közleményéből (1901) ; **B:** az insulitis immunfluoreszcens képe (zöld szín jelöli a $CD4^+$, piros a $CD8^+$ T-lymphocytákat) [46]

A T1DM kialakulásának klasszikus elméletét Eisenbarth 1986-ban publikált közleményében foglalta össze [47]. A kórélettani történéseket egymásból következő események láncolataként értelmező elmélet, bár számos új adattal egészült ki, máig a patogenezis legelfogadottabb modellje maradt. Alapja, hogy a genetikai hajlammal rendelkező egyénben valamely környezeti trigger hatására T-sejt mediált autoimmun folyamat alakul ki. A β -sejtek destrukciójáért a Langerhans-szigetek lymphocytás és macrophag infiltrációja (insulitis) során a β -sejtek ellen megvalósuló sejt-közvetített immunválasz a felelős. A macrophagok által elválasztott citokinek (TNF- α , IFN- γ) toxikus hatásúak a β -sejtekre [14], a CD8⁺ effektor T-sejtek pórusképzés által képesek őket károsítani [15]. A folyamat előrehaladtát a β -sejtek kompenzáló proliferációja, illetve a regulátoros T-sejtek (T_{reg}) működése (ld. később) nem képesek ellensúlyozni. A pusztuló β -sejtekből felszabaduló autoantigének ellen a diagnosztika alapjául szolgáló autoantitestek termelődnek. Az autoantitestek célfehérjei jelentős részben megfelelnek a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek által felismert antigéneknek. A β -sejtekkel szembeni autoimmun folyamat standard módszerekkel legkorábban kimutatható markerei az inzulin és proinzulin elleni autoantitestek [48].

Az ismert autoantigének (III. táblázat) nagy többségének jellemző közös vonása, hogy a szekréciós útvonalhoz (granulumok, szinaptikus mikrovezikulák, endoplazmatikus retikulum, Golgi-apparátus) köthetők. Ugyanakkor az autoantigének nem kizárólag konstans fehérjék lehetnek, több esetben igazolható volt, hogy poszttranszlációs módosulásokat követően korábban nem immunogén peptidekkel szemben is aktív immunválasz alakulhat ki. Ez érthető, hiszen a thymusban a T-sejtek szelekciója csak intakt saját antigénekkel szemben történik meg, így adott a lehetőség, hogy „majdnem autoreaktív” T-sejtek jussanak a perifériára. Hasonló mechanizmusok szerepe egyes autoimmun betegségekben már tankönyvi adatként ismert (pl. coeliakia-transzglutamináció, rheumatoid arthritis-citrullináció). Újabb, murin adatok szerint hibrid-peptidek (C-peptid és WE14 vagy IAPP –szigetsejt-amiloid polipeptid-) szerepelhet T1DM-ben autoantigénként [49]. Emellett a szöveti transzglutamináz aktivitás β -sejtekben is igazolható, aktivációja összefügg a hyperglycaemia-indukálta Ca²⁺-árammal, és a transzglutaminált (és citrullinált) GAD65 epitópok nagyobb affinitással kötődnek a HLA DRB1*04:01 rizikóallélhoz [50].

Az egyre csökkenő β -sejt tömeg által elválasztott inzulinmennyiség kezdetben még elegendő az normoglycaemia fenntartásához (prediabetes), majd elkerülhetlenül kialakul a hyperglycaemia és a klinikailag manifeszt diabetes mellitus. Az inzulinkezelés megkezdésekor a tehermentesített β -sejtek átmeneti proliferációs shubja még létrehozhat egy “honeymoon” periódust, amikor az inzulinszükséglet és inzulinpótlás átmenetileg csökkenthető, esetleg elhagyható [51]. Bár a szérumból kimutatható autoantitestek képezik a diagnosztika alapját, a T-sejt mediált autoimmunitás kezdete időben korábbra tehető, illetve ez a kimenetelt meghatározó folyamat. Ugyanakkor a B-lymphocyták szerepe sem tekinthető teljesen passzívnak. A B-lymphocyták professzionális antigénbemutató sejtek, így az általuk felismert antigénekkal reagáló T-sejtek aktiválására és támogatására közvetlenül is képesek, illetve az általuk termelt antitestek az antigéneket opsonizálják, így azokat a macrophagok Fc-receptorai segítségével hatékonyabban képesek felvenni [52]. Ennek jelentőségére utalhat, hogy rituximab (CD20 elleni monoklonális antitest) alkalmazásával NOD egerekben (non-obese diabetic, a humán T1DM legelterjedtebben alkalmazott állatmodelljében) a betegség remisszióját lehetett elérni [53], és a kezelés frissen felfedezett T1DM betegekben is az hozzájárult az endogén inzulintermelés fenntartásához, bár más immunológiai alapú terápiás próbálkozásokhoz hasonlóan gyógyulás, illetve tartós remisszió elérésére nem bizonyult elégségesnek [54].



3. ábra A patogenezis klasszikus, eredetileg Eisenbarth által leírt modellje [47, 51]

Bár az említett tényezők a patogenezis meghatározó elemei, az incidencia szezonálításának életkorral történő fokozódása felveti a lehetőséget, hogy a fogékonyság nem statikus paraméter és egy környezeti trigger hatékonysága endogén folyamatok dinamikájától függhet [28]. A humán T1DM széleskörűen elfogadott és használt állatmodelljében, a NOD egerekben minden egyedben megfigyelhető insulitis, ez azonban nem vezet szükségszerűen manifeszt diabetes kialakulásához [55]. A humán T1DM-ben sem tekinthető a β -sejt-tömeg csökkenése lineáris folyamatnak [51], illetve újabb adatok arra utalnak, hogy a folyamat nem teljesen szelektív, T1DM betegekben az exokrin pancreasállomány kisebb tömegét [56] és immunsejtes beszűrtségét [57] is leírták. Bár a humán T1DM diagnosztikájában használt autoantitestek a β -sejtekkel szemben fennálló autoimmun folyamatra utalnak, már az ICA antitestcsoport 1974-ben történt leírásakor [58] is megfigyelték normális szénhidrátanyagcseréjű személyekben, és későbbi vizsgálatok is igazolták, hogy az antitest-pozitív egyéneknél a későbbiekben sem feltétlenül alakul ki T1DM [59]. Danke és mtsai. egészséges egyének perifériás vérében is ki tudtak mutatni autoreaktív nem regulátoros $CD4^+$ T-sejteket, azonban in vitro az azonos egyénből származó $CD4^+CD25^+$ („ T_{reg} ”) sejtek jelenlétében ezen klónok expansiója elmaradt [60]. A szigetsejt elleni autoantitestek leírásának évében publikálta Jerne elméletét az anti-idiotípus (anti-Id) antitestek (immunglobulinok antigénfelismerő régiójához kötődő antitestek) hálózatáról [61]. Oak és mtsai. egészséges egyének jelentős részében is ki tudtak mutatni glutaminsav-dekarboxiláz elleni autoantitesteket az anti-Id antitestek eltávolítása után, azonban ezek standard módszerekkel történő kimutatását a jelen lévő anti-Id antitestek megakadályozták. T1DM miatt kezelt és stiff man szindrómában szenvedő betegekben a GAD65-autoantitest elleni anti-Id antitest hiányát írták le [62]. Ezek a megfigyelések a folyamatot elindító tényezők helyett a fennálló folyamat szabályozásának fontossága felé tolják a hangsúlyt.

III. táblázat. Ismert autoantigének és jellemzőik 1-es típusú diabetesben [60, 63, 64]

autoantigén	expresszió	Intracelluláris elhelyezkedés	antigén felismerése		
			CD4+ T-sejtek	CD8+ T-sejtek	auto-antitestek
Inzulin	β -sejt, thymus	szekrécións granulumok	+	+	+
GAD65	neuroendokrin	szinaptikus mikrovezikulák	+	+	+
GAD67	neuroendokrin	citoszol	+	+	+
IA-2 (ICA512)	neuroendokrin	szekrécións granulumok	+	+	+
Phogrin (IA2-beta)	neuroendokrin	szekrécións granulumok	+	+	+
IGRP	β -sejt	endoplazmatikus retikulum	+	+	?
Chromogranin	neuroendokrin	szekrécións granulumok	+	?	?
ZnT8	β -sejt	szekrécións granulumok	?	?	+
HSP-60	általános	mitochondrium	+	?	+
HSP-70					
Glima-38		szekrécións granulumok	?	?	+
Amylin/IAPP		szekrécións granulumok	?	+	?
CD38	általános	?	?	?	\pm

1.4 Genetikai tényezők szerepe T1DM kialakulásában

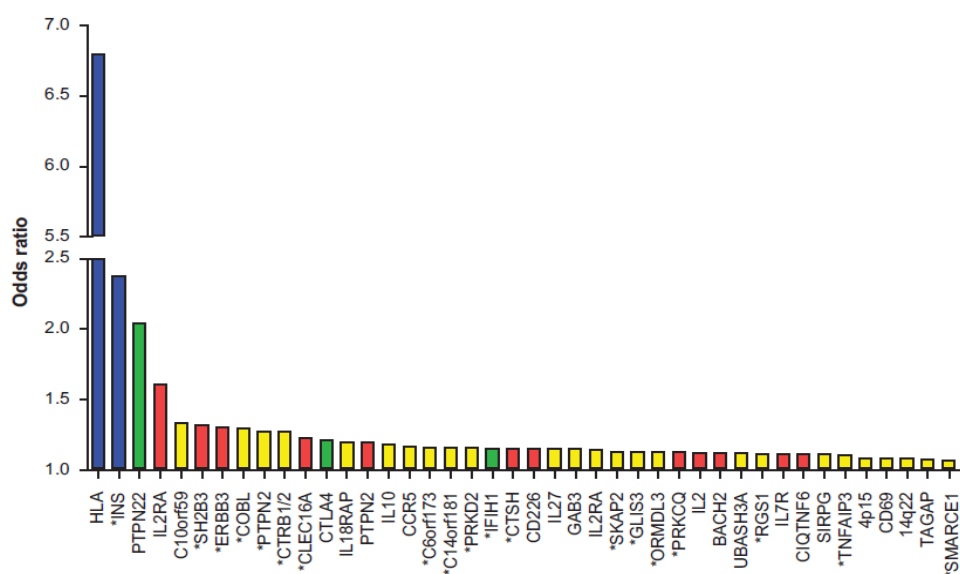
Jelenlegi ismereteink szerint a genetikai tényezők a T1DM kialakulásában nem kizárólagos, de meghatározó szereppel bírnak. Tünetmentes egyének kockázatát T1DM kialakulására nagy fokban befolyásolja a családban előforduló érintettség, amely szerint egyetértő ikreknél a kockázat a tünetmentes egyénben 30-70%, több elsőfokú rokon érintettsége esetén 20-25%, egy elsőfokú rokon érintettsége esetén átlagosan 5% (apa: 3%, anya: 5%, testvér: 8%, ld. IV. táblázat) [65–67]. A T1DM miatt kezelték körülbelül 70%-a hordozza a legmagasabb rizikóval járó HLA allélok valamelyikét, ugyanakkor az ezen allélokat hordozók között csak 3-7%-ban alakul ki T1DM [68]. A Morrann és mtsai. által szerkesztett összefoglaló közleményben a kockázatokat HLA protektív és kockázati allélok, illetve családi anamnézis szerint a IV. táblázatban összefoglaltak szerint adták meg.

IV. táblázat T1DM kialakulására vonatkozó hajlam családi anamnézis és hordozott HLA allél függvényében [65]

	Rizikó (%)
Alacsony rizikó	
Elsőfokú rokon nem érintett, protektív HLA allél	0,01
Elsőfokú rokon nem érintett	0,4
Elsőfokú rokon érintett, protektív HLA allél	0,3
Közepes rizikó	
Elsőfokú rokon nem érintett, HLA rizikóallél	4
Egy elsőfokú rokon érintett	5
Apai T1DM	3
Anyai T1DM	5
Testvérnél T1DM	8
Magas Rizikó	
Egy elsőfokú rokon érintett, HLA rizikóallél	10-20
Több elsőfokú rokon érintett	20-25
Igen magas rizikó	
Több elsőfokú rokon érintett, HLA rizikóallél	50
Testvér érintett, HLA rizikóallél	30-70
Egypetűjű ikertestvér érintett	30-70

Todd és mtsai. számos gén polimorfizmusára kiterjedő vizsgálatukban általános elvként megállapítják hogy a betegség manifesztációjának rizikóját gének kis csoportja nagymértékben, egy nagyobb csoportja kismértékben növeli [69], amely alól kivételt képeznek egyes ritkább monogénes formák. Az elmúlt tíz évben tíz nagy preconcepciómentes GWAS (Genome-wide association study) vizsgálat több, mint hetven hajlamosító SNP-t (single nucleotid polymorphism) azonosított. Közülük számoshoz a T1DM mellett más autoimmun betegségek kialakulására is magasabb kockázat társul. Ez részben magyarázatot adhat egyes autoimmun betegségek epidemiológiailag már megfigyelt gyakoribb társulására, illetve ezen betegségek hátterében közös jelátviteli utakra és szabályozó mechanizmusokra hívja fel a figyelmet. Az autoimmun betegségek többségéhez hasonlóan az 1-es típusú diabetes is összefügg bizonyos HLA-haplotípusok jelenlétével. Az általuk kódolt MHC komplexek az (auto)antigének bemutatásának fő mediátorai, a hozzájuk köthető többletkockázat (közel hétszeres) messze a legmagasabb az eddig azonosított hajlamosító genetikai tényezők közül [69]. A legismertebb hajlamosító allélok a HLA-DR3 és HLA-DR4,

valamint a DQ2 és DQ8, amelyek többnyire kapcsoltan öröklődnek. T1DM miatt kezelt gyerekek 90%-ában kimutatható a DR4-DQ8 vagy a DR3-DQ2 allélkombináció. E két kombináció megléte az adott személyben tovább fokozza a hajlamot, és nagyon gyakori azokban a gyermekekben, akiknél a betegség különösen korán jelentkezik [70]. Az említett HLA II. osztályú allélok mellett az I-es osztály bizonyos locusait érintő polimorfizmusok is összefüggésbe hozhatóak a betegség kialakulásával [71]. Történeti szempontból említést érdemel, hogy a T1DM kialakulásával először gyanúba hozott haplotípusok a HLA-A8 és W15 voltak, amelyek szintén az MHC-I komplex részei [72]. Az egyre nagyobb mintákon elvégzett GWAS vizsgálatok alapján egyre növekszik azon HLA és non-HLA allélok száma, amelyekhez jóval kisebb (jellemzően 1-2-szeres esélyhányados), de mérhető kockázatnövekedés köthető. A módszertani fejlődéssel egyidejűleg további finomhangolásra lehet számítani, ennek példaként említhető, hogy NGS (next generation sequencing) módszerrel a közelmúltban igazolták, hogy a HLA-DRB3, -DRB4 és -DRB5 allélok adott szigetsejt-ellenes autoantitest mintázattal függhetnek össze és növelik a gyerekkori T1DM kockázatát [73]. A kandidáns gének által kódolt géntermékek pontos szerepe a T1DM kialakulásában nem minden esetben ismert, de közülük számos a patogenezis ismert jelátviteli útvonalainak résztvevője [74–95].



4. ábra. A T1DM kialakulására fokozott rizikóval összefüggő kandidáns gének az ismert polimorfizmusaihoz köthető esélyhányados szerinti sorrendben [74]

V. táblázat GWAS vizsgálatok során kandidáns géneként azonosított, az immunregulációban ismerten kiemelkedő jelentőségű terméket kódoló gének és a *DDP4* kóreléleti jelentősége és az ismert dolimorfizmusaihoz köthető kórállapotok. paraméterek [74-94]

Gén	Kromoszomális pozíció	ritkó SNP	Elhelyezkedés	Odds Ratio T1DM-re	A géntermék kóreléleti funkciója	A gén ismert polimorfizmusával összefüggésbe hozott állapotok	A gén ismert polimorfizmusával összefüggésbe hozott paraméterek
<i>IL2</i>	4q27	rs4505848	intron	NA	Lymphokin, meghatározó szereppel bír az effektor és regulátoros T-sejt válasz szabályozásában, elsősorban para- és autokrin mediátor	atopiás dermatitis, coeliakia, rheumatoid arthritis, pollenallergia, alopecia areata, colitis ulcerosa	IL2 plazmaszintek, Treg funkció, T-helper sejtek IL-2 elválasztása, LAK-sejtek tumorölő képessége
<i>IL2RA (CD25)</i>	10p15.1	rs61839660	intron	1,6	Az IL-2 receptor α -láncra, az aktív regulátoros és effektor T-sejtek markere	alopecia areata, sclerosis multiplex, vitiligo, rheumatoid arthritis	szérum szolibilis CD25 szintek, CD25 expresszió naív és memória T-sejteken
<i>IL2RB (CD122)</i>	22q13.1	rs743777	intron	1,1	Az IL-2 receptor β -láncra, a α -láncsal heterodimereket alkotva az IL-2 közepes affinitású receptorát hozza létre	Graves-betegség, rheumatoid arthritis, veseerát-rejékcó, asthma bronchiale	hematológiai paraméterek (Htk, MCV, MCH)
<i>CTLA4</i>	2q33.2	rs3087243	near gene	NA	A T-sejt kostimulátor CD28 analógja, gátolja a T-sejt aktivációt, downregulálja az antigénbemutató sejtek felszínén a CD80/86 komplexeket	alopecia areata, rheumatoid arthritis, Graves-Baseow-kór, hypothyreosis, autoantitestek T1DM-ben	CTLA-4 expresszió T-sejtekben, T _{reg} sejtek aránya periférás vérben
<i>PTPN2</i>	18p11.21	rs2542151	intergénikus	NA	Protein tirozin foszfatáz, gátolja a β -sejtek apoptózist, gátolja a STAT5 mediálta jelátvitelt, amely a meghatározó a T _{reg} sejtek indukciójában	Crohn-betegség, rheumatoid arthritis, coeliakia, oesophagus-carcinoma	IL2RA mediálta jelátvitel (STAT5 foszforiláció alapján), FOXP3 expresszió T-sejtekben
<i>IL10</i>	1q32.1	rs3024505	downstream	1,19	Monoocyta, Th2 lymphocyta és regulátoros T-sejtek által elválasztott antinflamatorikus citokin, az immunválaszt Th2 túlsúly irányába mozdítja	Colitis ulcerosa, Crohn-betegség, Behçet-kór, tüdőlés Alzheimer-kórban	T _{reg} markerek (Foxp3, GITR)csökkent expressziója újszülötkorban, vakcinációt követő T-sejt proliferáció
<i>PTPN22</i>	1p13.2	rs2476601	misszenz	1,98	Protein tirozin foszfatáz, a TCR-mediált T-sejt aktivációt src-kinázok defoszforilációja által gátolja	rheumatoid arthritis, myasthenia gravis, hypothyreosis, ATPO antitestszintek, vitiligo, Crohn-betegség, emlődaganoma	T- és B-lymphocytaszám, Treg sejtek túlélése és funkciója
		rs6679677	upstream	1,82			
<i>IFIH1</i>	2q24.2	rs1990760	misszenz	1,2	A virális kettősszalú RNS-t kötő mintázatfelismerő receptor (pattern recognition receptor - PRR)	IgA hiány, vitiligo, psoriasis, colitis ulcerosa	IFIH1 (MIDAS) expresszió, antivirális interferonválasz
<i>DDP4</i>	2q24.2	rs6741949*	intron	NA*	Bár nem kandidáns gén T1DM-ben, a GLP-1 és számos citokin bontásán keresztül befolyásolhatja az autoimmun folyamatot	rheumatoid arthritis, schizophrénia, Alzheimer-kór	érzékenység hatóanyagokra, plazma DDP4 szintek coronariabetegekben, hippocampus-volumen

*vizsgálataink során ez a génavariáns került meghatározásra, ugyanakkor T1DM kialakulására vonatkozóan nem köthető hozzá magasabb kockázatot

1.5 Kandidáns gének jelentősége az immunregulációban

A saját antigénekkal reagáló B- és T-lymphocyták elsődleges szelekciójára a primer immunszervekben kerül sor. A centrális tolerancia kialakítása során az autoreaktív sejtek deléció áldozatául eshetnek, valamint receptoruk editing által korrekcióra kerülhet (elsősorban a B-lymphocyták esetében) [96, 97]. A saját antigénekkal elárasztott autoreaktív T sejtek, ha kijutnak a perifériára, anerg állapotba kerülnek. A T- és B-lymphocyták szelekciója kölcsönösen védelmet nyújthatnak egymás autoreaktív tendenciáival szemben. Ennek magyarázata részben, hogy az autoreaktív T-sejt számára a B-lymphocyta lehet az első professzionális antigénprezentáló sejt (APC: antigen presenting cell), másrészt az autoreaktív B-lymphocyta neki megfelelő Th2 (helper T-sejt, 2-es alcsoport) támogatást igényel. Ez nem zárja ki ugyanakkor, hogy egyes fertőzések esetében a patogénre specifikus T-sejtek képesek legyenek az autoreaktív B-lymphocyták számára Th2 szignálokat közvetíteni [98]. Ezen felül gyulladásozó környezetben új antigének válhatnak az immunrendszer számára hozzáférhetővé, amely folyamat “antigen spreading”-ként ismert [99]. Míg a centrális toleranciát túlnyomórészt genetikai tényezők határozzák meg, a perifériás tolerancia multifaktoriális.

Az autoreaktív T-sejtek szelekciójához nélkülözhetetlen nagy számú antigen bemutatása a thymusban. Az insulin thymusban történő bemutatását csökkentő, vagy akadályozó genetikai variációk a centrális tolerancia kialakulását befolyásolják. Az *INS* géntől upstream elhelyezkedő IDDM2 locusban rövidebb VNTR- (variable number tandem repeat) szakaszokat hordozók nagyobb eséllyel betegszenek meg 1-es típusú diabetes mellitusban, mint akik hosszabb szakaszokat hordoznak. Hosszabb VNTR szakaszok jelenlétekor az mRNS szintű inzulin-expressziót magasabbnak találták a thymusban, amely az antigénprezentáció jobb hatásfokára, utalhat [100, 101]. Ezzel összefüggésben az inzulin génhez kapcsolt rövidebb VNTR szakasz hordozói közel 2,5-szeres kockázatot hordoznak T1DM kialakulására. Kísérletes körülmények között az *Ins2* gén expressziójának célzott felfüggesztése egerek AIRE (autoimmun regulator) expresszáló thymusepithel-sejtjeiben nemtől függetlenül spontán insulitis és diabetes kialakulásához vezetett az érintett egyedekben háromhetes korukban [102]. Számos, az *INS* gént érintő, T1DM kialakulására hajlamosító SNP ismert, amelyekhez a jelenleg igazolt legmagasabb non-HLA esélyhányados (több mint kétszeres) köthető [69, 78]. A diagnosztikus markerként felhasznált autoantitestek közül jellemzően az insulin-elleni

autoantitest jelenik meg elsőként [103], diagnosztikus jelentőségét azonban az inzulinkezelés bevezetése után elveszti.

A központi immunszervekben nincs lehetőség a szervezet összes antigénjének bemutatására. Bár az autoreaktív B- és T-sejt klónok szelekciója igen hatékony, kijutásuk a perifériára nem kizárt. Autoreaktív B-lymphocyták a perifériás nyiroktüszők csíracentrumában is keletkezhetnek a szomatikus hipermutáció során [98]. Az immunrendszer az élet során számtalan antigénnel kerül kapcsolatba, ezért az immunválasz megfelelő szabályozásának is a periférián kell megvalósulnia. A szabályozásban kiemelt szerep jut a T_{reg} sejteknek, amely csoporton belül megkülönböztetünk a thymusban keletkező természetes (natural- nT_{reg}) és a periférián kialakuló indukált T_{reg} (iT_{reg}) sejteket. Kialakulásukat és működésüket részleteiben az 1.5.1 fejezet taglalja. Az iT_{reg} indukció minimális feltételei jelenlegi ismereteink szerint a TCR-függő jelátvitelen kívül az IL-2 és a TGF- β jelenléte. Emellett az IL-2 mediált jelátvitel szerepe a thymusban is kiemelkedő az nT_{reg} sejtek keletkezésében [104]. Az IL-2-t, illetve receptorának α (CD25) és β (CD122) láncait kódoló géneket érintő polimorfizmusokhoz különböző GWAS vizsgálatok eredményei alapján egyenként alacsony, de kimutatható rizikónövekedés társul (OR: 1,1-1,6) [76, 77, 105, 106].

Az immunválasz jellegét alapvetően meghatározzák az antigénbemutatás körülményei. Amennyiben az APC MHC-II expressziója és a kostimulusok mennyisége alacsony marad, kedvező környezet alakul ki T_{reg} -indukcióhoz. Ez abban az esetben jellemző, ha a dendritikus sejtek (DC- dendritic cell) érését támogató stimulusok (ld. később) mennyisége alacsony. Egyes DC-k retinsav termeléssel is ellensúlyozni képesek a T_{reg} indukciót gátló citokinek hatását, illetve IL-10 és retinsav termelésükkel hozzájárulhatnak az iT_{reg} sejtek indukciójához [104, 107, 108]. Az intestinalis mucosában található macrophagok csökkent TLR érzékenységgel rendelkeznek, és IL-10 termelés által is hozzájárulnak a T_{reg} -indukcióhoz, így az oralis tolerancia kialakulásához [109]. A T_{reg} sejtek maguk is további TGF- β és IL-10 termeléssel gátlólag képesek hatni az immunválaszra és serkentőleg további T_{reg} sejtek indukciójára. Ezzel összefüggésben az IL-10 gén funkcionális variánsa is kockázatot jelent T1DM kialakulására [76].

A T-sejtek aktivációjához az antigénprezentáció melletti járulékos szignálok szükségesek, ezek blokkolása a tolerancia irányába mozdítja az immunválaszt, illetve

MHC komplexhez kötött antigén kostimuláció nélküli észlelése a T-sejtet anerg állapotba képes juttatni. A T-sejt felszíni CD28 komplexének kötődése az APC CD80/86 komplexéhez a T-sejt aktiváció egyik meghatározó aktiváló kostimulusa. A CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) a CD28 analógja, ahhoz hasonlóan az APC CD80/86 komplexéhez képes kötődni. A T_{reg} sejtek konstitutívan expresszálják, a többi T-sejt alcsoport csak aktivációhoz kapcsoltn, amely az immunválaszt limitáló feedback szereppel bír [110]. A *CTLA4* kandidáns génként került azonosításra a T1DM mellett további autoimmun betegségekben, így például coeliakiában is [77, 106]. CTLA-4 gátlással kísérletesen autoimmun folyamatok, gyulladásoos bélbetegség, és hatékonyabb antitumor-immunitás idézhető elő, míg a CTLA-4 hiányos egerek néhány hetes korukban elpusztulnak kontrollálatlan lymphoproliferáció következtében [110, 111]. A csökkent sejtfelszíni CD28 és domináns CTLA-4 mediálta jelátvitel az iT_{reg} sejtek indukciójának kedvez [112]. A naív T-sejt regulátoros fenotípusának kialakítása mellett a CTLA-4 hozzájárul a CD80/86 downregulációjához az APC-n [110]. CTLA-4-et magasabb mennyiségben expresszáló NOD-egerek védettnek bizonyultak T1DM kialakulásával szemben [113]. Egy közelmúltban lezárult vizsgálat során Orban és mtsai. a CTLA-4 analóg abatacept két éven át történő alkalmazása mellett placebóval összehasonlítva jelentősen magasabb C-peptid szinteket és alacsonyabb HbA1c koncentrációkat mértek T1DM betegekben változatlan inzulin használat mellett. A szerzők szerint a β -sejtek funkcióvesztésének lassulása a T-sejt aktiváció csökkenésével magyarázható, amely valószínűleg a klinikai diagnózis után is folytatódik [114]. Az IL-2 mediálta jelátvitel szerepe kiemelkedő a CTLA-4 expresszió fenntartásában (ld. később) [83, 115].

Egy, a közelmúltban megjelent közlemény új megvilágításba helyezheti több, a T_{reg} sejtek éréséhez és funkciójához lényeges génterméket kódoló kandidáns gén szerepét T1DM kialakulásában. Achenbach és mtsai. autoantitest pozitivitás mellett három éven belül T1DM-be progrediáló és autoantitest pozitivitás mellett tíz év elteltével is normoglikémiás gyerekek genotípusát hasonlították össze (gyors és lassú progresszorok). Míg a két csoport HLA-DR és HLA-DQ genotípusában nem mutatkozott különbség, a gyors progresszorok között gyakrabban fordultak elő egyes, a T_{reg} sejtek keletkezését, érését és aktivációját érintő non-HLA gének (*IL2*, *CD25*, *IL10*, *INS VNTR*, *IL18RAP*, *PTPN22*) polimorfizmusai [59].

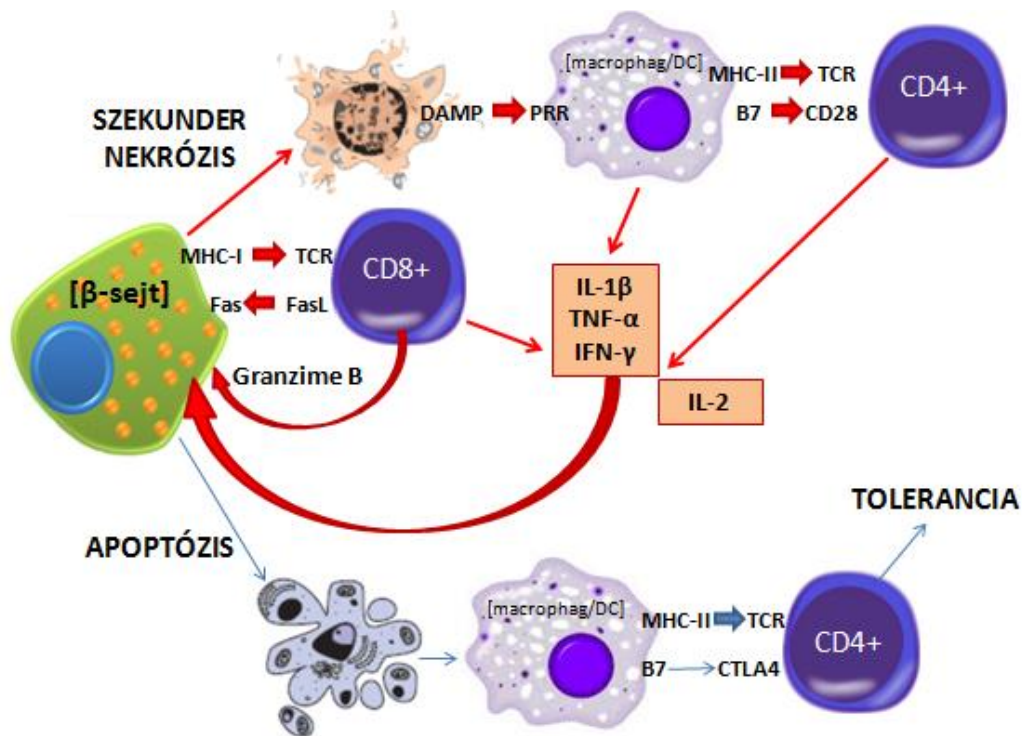
1.6 Az insulitis kialakulását befolyásoló endogén és exogén tényezők

Dresser 1962-ben írta le, hogy nagy tisztaságú antigénnel történő immunizáció jellemzően toleranciát indukál és csak valamilyen adjuvánssal együtt eredményez megfelelő immunválaszt [116]. Ez a kezdeti megfigyelés vezetett a későbbiekben ahhoz a klasszikus elmélethez (először a B-, majd a T-lymphocyták esetében is), hogy legalább két egyidejű trigger szükséges az immunválasz kiváltásához [117–119]. Később igazolták, hogy az APC az antigén MHC-II komplexhez kötött bemutatása mellett számos kostimulust biztosít a T-sejtek számára. Janeway 1989-ben publikált elmélete szerint az immunrendszer evolúciójának hajtóereje a fertőzések elleni védekezés (infectious non-self, “stranger-hypothesis”) és az antigénbemutatás az immunválasz irányát meghatározó lépés, amelyet alapvetően meghatároz, hogy az APC mintázatfelismerő receptoraival (PRR: pathogen recognition receptor) észlelt-e valamilyen sajáttól eltérő mintázatot (PAMP: pathogen-associated molecular pattern) [120, 121]. Az elméletet alátámasztotta a toll-like receptorok (TLR), illetve számos további mintázatfelismerő receptor (köztük az IFIH1 - Interferon Induced with Helicase C Domain 1, amely duplaszálú vírus RNS-t észlel) leírása, azonban kiegészítésre szorult ahhoz, hogy a tumorokkal, graftokkal szembeni immunválaszra, illetve az autoimmunitás kialakulására magyarázatot adhasson. Matzinger alternatív hipotézise szerint az APC-k olyan jeleket észlelnek, amelyek károsodott sejtekből szabadulnak fel (DAMP: danger associated molecular pattern) [121, 122]. DAMP-ként számos sejtalkotó szerepelhet, köztük több heat shock protein (pl. HSP60 és 70) és kristályosodási küszöbét elérve a húgysav is [123], amelyek in vitro is képesek voltak dendritikus sejtek érését serkenteni [124–126]). Ismert, hogy a HSP-k, mint peptid hordozói specifikusan felvételre kerülnek APC-k által, és az általuk szállított peptid MHC-I-hez kötött formában bemutatásra kerül [127]. A HSP60 és 70 a lipopoliszacharid-receptoron (LPS-receptor: TLR4-CD14 komplex) keresztül közvetítenek jelet [128–130] és egyes megfigyelések szerint az LPS-mentes HSP-k nem fejtettek ki aktiváló hatást [131, 132]. A HSP60 és 70 szerepe is felmerült autoantigénként [133]. A TEDDY (The Environmental Determinants of Diabetes in the Young) vizsgálatban szigetsejt elleni autoimmunitás alacsonyabb incidenciáját írták le három hónapos koruk előtt probiotikus kezelésben részesült gyerekekben [134]. NOD egerekben a bakteriális komponensek (elsősorban LPS) peritoneális ürbe szivárgását

összefüggésbe hozták az autoreaktív T-sejtek aktiválódásával a pancreaticus nyirokcsomókban [135].

Matzinger és Janeway elméletei nem mondanak egymásnak ellent abban, hogy az antigénbemutató és ezzel az immunválasz természetét az antigénfelvétel körülményei határozzák meg. Ismert, hogy az apoptotikus sejtmadványok kevésbé immunogének, illetve felvételüket követően az APC-k TGF- β elválasztását is leírták, amely kedvező környezetet teremt az iT_{reg} sejtek keletkezéséhez [136]. Rágcsálókban [137, 138] és emberben [139] is leírták, hogy a perinatális adaptáció során jelentős számú β -sejt apoptózisa következik be. Trudeau és mtsai. megfigyelték, hogy NOD egerekben az insulitis körülbelül az ötödik hét környékén jelenik meg, de soha nem a 15. nap előtt. A β -sejtek apoptotikus hullámának csúcsa a 13. napra tehető [138]. Az insulitis kialakulásának ezt a késleltetését elméletileg magyarázhatná az immunrendszer éretlensége, de ez ellen szól, hogy Höglund és mtsai. vizsgálataiban a murin T-sejtek és APC-k funkcionálisnak bizonyultak a 10. napon [140]. Emellett a diabetesre hajlamos hordozó vagy kimondottan védett állatok apoptotikus rátájában nem tudtak eltérést kimutatni. Ennek ellenére NOD egerekben TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) módszerrel nagyobb mennyiségű apoptotikus remnant mutatkozott [138]. Az apoptotikus sejtmadványok eltakarításáért élettani körülmények között a macrophagok felelősek. NOD egerekben az élet első heteiben a pancreasban elsősorban macrophagok mutathatóak ki [141], funkciózavaruk magyarázatot adhat a nagyobb mennyiségű apoptotikus remnant jelenlétére [142, 143]. Késői eltakarításukkor a sejtmadványok másodlagos necrosis következhet be, amely endogén adjuvánsok felszabadulásán keresztül nem specifikus támogatást nyújthat egy lokális immunválasznak (bystander aktiváció). A macrophag-funkció gátlása NOD egerekben protektívnek bizonyult, ami az antigénprezentáció gátolásával és a Th1 immunválasz csökkent indukciójával magyarázható (a csökkent IL-12 szekréció eredményeként) [144]. Ezzel szemben a β -sejtek apoptotikus rátájának változtatásával nem lehetett számottevően befolyásolni a betegség iniciációját [145]. Szisztémás lupus erythematosusban (SLE) leírták az apoptotikus remnantok csökkent eltakarítását a macrophagok által [146] és rendelkezésre álló kísérletes adatok [147] alapján T1DM kialakulásában is szerepe lehet a macrophag funkció zavarának.

A DIPP (Diabetes Prediction and Prevention) vizsgálat eredményei szerint a 10 éves korukig T1DM-ben megbetegedők többsége már két éves korban is autoantitest-pozitív [148], ami az autoimmun folyamat igen korai iniciációja mellett szól. Ismert ugyanakkor, hogy az autoantitest-pozitivitást nem minden esetben követi T1DM kialakulása [59], illetve az történhet a szerológiai diagnózis után évekkel, évtizedekkel. Magnuson és mtsai. Kaede transzgenikus NOD egerekben az insulinitist dinamikusan változó lézióként írták le. Kialakulását a negyedik hétre tették, amelyet követően a Langerhans-szigetekben a lymphocyták jelentős turnoverét írták le, amely során az új belépők többsége naív fenotípust ($CD44^{-low}CD62^{+hi}$) mutatott és ezen sejteknek csak kis része aktiválódott. Ugyanakkor a jelentős számban történő belépésükhöz feltételezhetően szükséges a fennálló folyamat által biztosított citokingradiens, amelyet alátámaszt az érintett és intakt szigetek párhuzamos jelenléte [141].



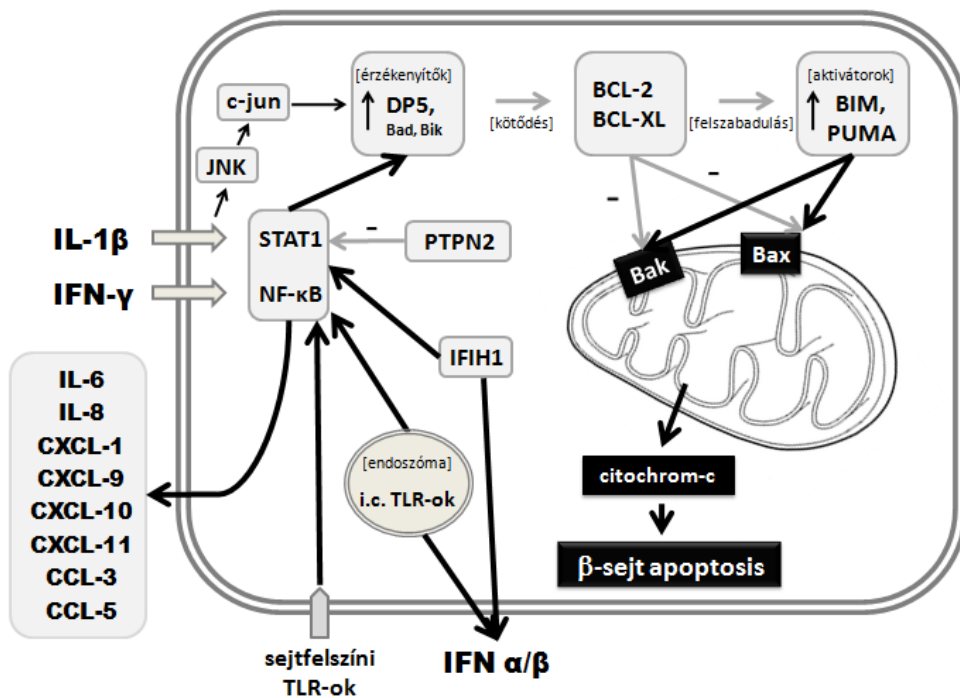
5. ábra Az apoptotikus β -sejt maradványok késői eltakarítása esetén azok másodlagos nekrozisa következhet be. A nekrotikus sejtmaradványokból felszabaduló intracelluláris sejtalkotók DAMP-ként funkcionálva az APC-k érését, a jelenlévő –potenciálisan autoreaktív- T-sejtek aktivációját és proinflammatorikus citokinek elválasztását indukálhatják, ezzel elősegítve további β -sejtek károsodását.

Annak ellenére, hogy egyes környezeti tényezők szerepét meggyőző epidemiológiai adatok alapján évtizedek óta feltételezik T1DM kialakulásában, ezek pontos helye a betegség kórleletében máig sem egyértelmű. Egyre bővülő ismereteink alapján a környezeti faktorokat, köztük egyes vírusfertőzéseket triggernek tekintő elmélet csak egy komplexebb rendszer elemeként látszik fenntarthatónak [149, 150]. Rubeola, mumpsz és coxsackie vírusok képesek a β -sejteket fertőzni, és lízisüket előidézni [99], és vírusfertőzéshez (köztük coxsackie-B, HHV6 és herpes simplex) kapcsolódó fulmináns diabeteses esetekről is beszámol az irodalom [151], ugyanakkor ez nem tartható a patogenezis elsődleges mechanizmusának. A vírusfertőzések képesek befolyásolni az apoptózis folyamatát, továbbá a GWAS vizsgálatokban azonosított egyes gének termékei aktívan részt vesznek a vírusfertőzésre adott válaszban, amely támogatja az autoimmun folyamatot. A β -sejtek is kifejeznek mintázatfelismerő receptorokat (köztük a kandidáns gén *IFIH1* termékét, -a kettszálú virális RNS receptora- [69] és toll-like receptorokat), amelyek NF- κ B és STAT1 aktiváció által proapoptotikus szignált közvetítenek a sejt számára [152]. Az insulitis során meghatározó proapoptotikus citokinek (IFN- γ és IL-1 β) is az NF- κ B és STAT1 mediálta jelátvitel aktiválásán keresztül fejtik ki a hatásukat [152]. A PTPN2 antiapoptotikus hatást fejt ki részben a JNK1 (c-Jun N-terminal Protein Kinase 1) gátlásával. Ennek megfelelően a PTPN2 expresszió gátlása a transzláció szintjén (siRNS) mind in vitro humán β -sejteken, mind in vivo a BCL2L11 (BCL2-like 11, BIM; ld. később) expressziójának upregulációját eredményezte és elősegítette a β -sejtek IFN-indukálta (mind α -, β -, és γ -interferon) apoptózisát [153]. Az NF- κ B és STAT1 jelátvitel ezen felül hozzájárul az MHC-I komplexek fokozott expressziójához a sejtfelszínen, amely a β -sejtet láthatóbbá téve a citotoxikus T-lymphocyták számára hozzájárulhat egy *circulus viciosus* kialakulásához [99, 152]. In vitro humán szigetsejtek MHC-II (HLA-DRA és HLA-DQA1) expressziója is emelkedett IFN- γ hatására, míg IFN- α kezelés mellett inkább csökkenés volt megfigyelhető. Ugyanakkor szerzők a B-lymphoblastoid sejtek és dendritikus sejtek magasabb HLA-DRA és HLA-DQA1 expressziójáról számoltak be IFN- α kezelést követően, amely az MHC-II expresszió eltérő szabályozására utalhat professzionális és nem professzionális antigénbemutató sejteken [154]. A közelmúltban jelentősen bővültek az ismereteink a proapoptotikus szignálokat az apoptózis végső közös útját jelentő mitochondrialis BAX

(BCL2-associated X protein) és BAK (BCL2-antagonist/killer) transzlokációval összekötő jelátvitelről. Ezekben a folyamatokban igen jelentős szereppel bírnak a BH3 (BCL2 homologous 3) proteinek. Aktivitásukat tekintve két csoportjuk különíthető el: az érzékenyítők (pl. DP5 –death protein 5-) kötődnek a BCL2 (B-cell CLL/lymphoma 2) és BCL-XL (BCL2-like protein 1) proteinekhez, amelyek gátolják a BAX és BAK aktivációt, és egyben felszabadítják az aktivátorokat (pl. BIM és PUMA –p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis-) ebből a kötésből, amelyek aktiválják a BAX és BAK fehérjéket [155]. Gurzov és mtsai. leírták, hogy az endoplazmatikus retikulum (ER) stressz meghatározó szerepet játszik ebben a folyamatban, és in vitro ER stressz hatására β -sejtekben magasabb DP5 expressziót írtak le [155] és a DP5 mRNS szinten történő gátlásával az apoptotikus ráta csökkenthető volt [152]. DP5 GKO egerekben nagyobb β -sejt tömeget írtak le és rezisztensnek bizonyultak a magas zsírtartalmú diéta indukálta glukóz-intoleranciával szemben, igazolva a kapcsolatot az immunológiai, apoptotikus és metabolikus folyamatok között [156]. Az aktivátorok között a BIM szerepe tűnik a meghatározónak. A PTPN2 gátlást követő magasabb apoptotikus ráta csökkenthető volt BIM gátlással [153]. TNF- α és IFN- γ kombinációja hatására humán szigetsejtekben a DP5, PUMA, és BIM indukciója volt megfigyelhető [157]. A apoptotikus jelátvitel folyamatait a 6. ábra foglalja össze.

A β -sejteket érintő vírusfertőzés által létrehozott proinflammatorikus citokinkörnyezet kedvező lehet egy fennálló, de klinikai tünetekkel még nem járó autoimmun folyamat fellángolásához (bystander aktiváció), illetve a széteső sejtekből felszabaduló új antigének is hozzáférhetővé válhatnak az immunválasz számára (antigen spreading), így nem megfelelő perifériás tolerancia mellett akár új autoimmun folyamat iniciációjához is vezethet [99]. A β -sejtek sem passzív résztvevői a lokális gyulladásnak (6. és 7. ábra). Eizirik és mtsai. a humán β -sejt transcriptom vizsgálata során a CXCL-9, -10, -11 és CCL-2, -3, -5 többszörös emelkedését figyelték meg in vitro IFN- γ és IL-1 β kezelés hatására [158]. T1DM betegekben magasabb CXCL10 szérumkoncentrációt lehetett kimutatni egészséges kontroll és T2DM betegekkel összehasonlítva [159]. A CXCR3 (CXCL-9, -10, -11 citokinek receptora) expressziója jellemző a Th1 sejtekre, és a CXCR3 mediálta jelátvitel gátlásával egyes szerzők diabetogenesis gátlásáról számoltak be egérmódelben [160, 161]. Ugyanakkor ők a korábban említett RIP-gp (rat insulin promoter glikoprotein, ld. később) egereket használták, amelyek tökéletesen modellezik

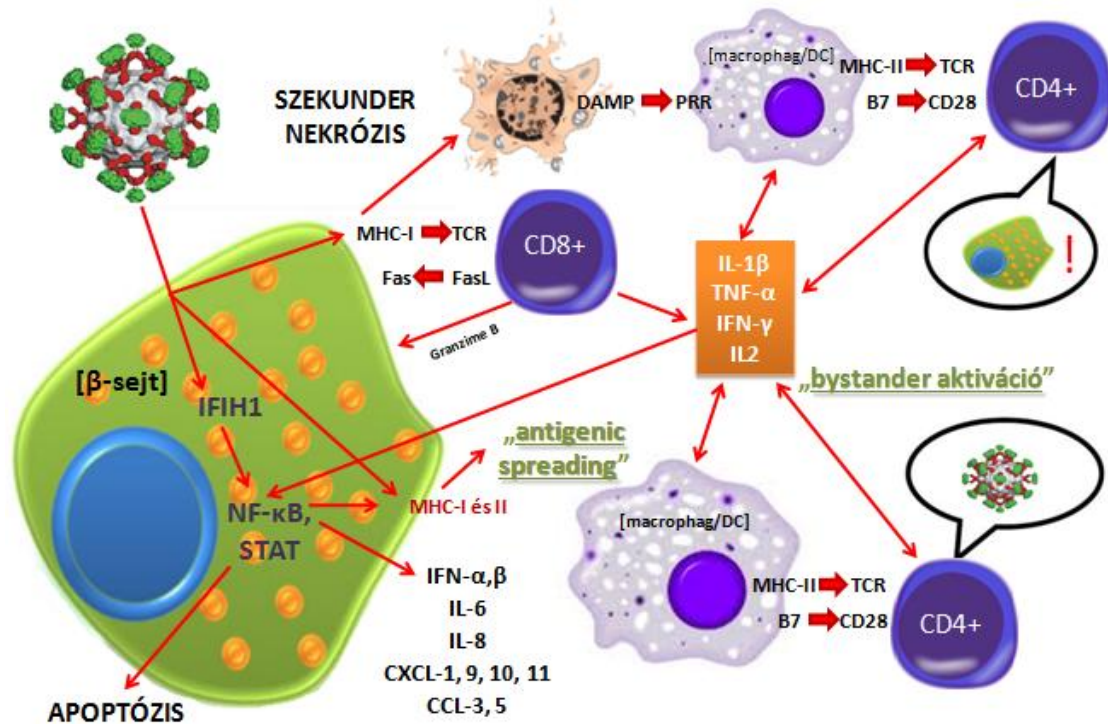
az antigénmimikrit, de nem a multifaktoriális T1DM kialakulását. Yamada és mtsai. vizsgálatai során a CXCR3 GKO NOD egerek nem bizonyultak védettnek diabetes mellitus kialakulásával szemben, illetve a betegség korábban alakult ki bennük, amely a T_{reg} sejtek elégtelen kemotaxisával volt magyarázható [159].



6. ábra A proinflammatorikus citokinekhez (IL-1 β és IFN- γ) hasonlóan több mintázatfelismerő receptor közvetítésével megvalósuló jelátvitel is hozzájárul a β -sejtek apoptotikus folyamataihoz és számos citokin elválasztásához. Az apoptózisban kiemelt szereppel bírnak a BH3 proteinek: ezen család egyes tagjai (“érzékenyítők”, köztük a DP5) kötődnek az antiapoptotikus BCL2 és BCL-XL fehérjékhez, ezzel felszabadítva az aktivátorokat (BIM, PUMA). A PTPN2 a β -sejtek apoptózisát gátolja a BH3 proteinek mediálta kaszkád gátlásán keresztül (STAT1 gátlás szintjén) [150].

Egyes virális és humán fehérjék hasonlósága vezetett az antigénmimikri útján történő indukció feltételezéséhez. A legtöbbször gyanúba hozott coxsackie-B vírus valóban hordoz a humán GAD65-el jelentős hasonlóságot mutató fehérjét [99]. Ugyanakkor kísérletesen igazolható volt, hogy molekuláris mimikri útján autoimmunitást triggerelni

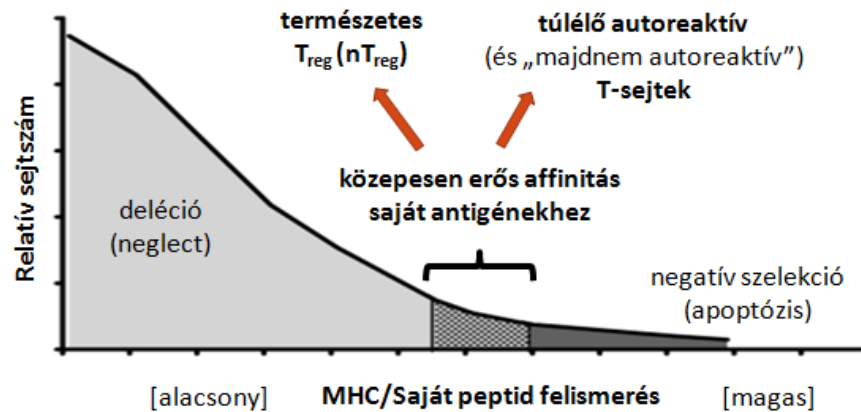
csak teljes aminosav-szekvencia azonosság esetén lehet, erre példa RIP-gp egér, amely a lymphocytás choriomeningitis vírus (LCMV) glikoproteinjét expresszálja a β -sejtjeiben, és rapidan diabetesessé válik LCMV vírusfertőzést követően [99, 162, 163]. Ismert ugyanakkor, hogy egy hasonló, de nem azonos vírusprotein serkenteni képes egy már fennálló autoimmun folyamatot [164], illetve annak intenzitása határozza meg a vírusfertőzés hatását [99]. Idősebb, insulitist hordozó NOD egerek fertőzése coxsackie-B vírusokkal a diabetes gyorsabb kialakulásához vezetett [165] (hasonló hatást írtak le rotavírus esetében is [166]). Fiatal, insulitistól még mentes NOD egerek fertőzése ugyanakkor csökkentette a diabetes előfordulását, és a leginkább pancreatovirulens törzsek mellett figyelték meg a legnagyobb fokú védelmet, amelynek magyarázata nem egyértelmű, a szerzők felvetették a felszínre kerülő autoantigének toleranciát kiváltó hatását [165]. Ezt alátámaszthatja Hugues és mtsai. vizsgálata, amely során NOD egereket védetté lehetett tenni diabetes kialakulásával szemben, amennyiben fiatal korukban egyszeri, alacsony dózisu streptozotocin-kezelésben részesültek. A protektív hatás csak akkor volt megfigyelhető, ha apoptózis valóban bekövetkezett, a RIP-Crma transzgenikus (β -sejtjeikben CrmA kaszpáz-inhibitor expresszáló) NOD egerekben nem [167]. Ezek a megfigyelések egybevágóak azokkal az epidemiológiai megfigyelésekkel, amelyek szerint az antigénszegény környezet kedvezhet az autoimmun folyamat kialakulásának azáltal, hogy a korai fertőzések immunmoduláns hatása nem érvényesül („higiénia hipotézis”) [168]. A képet árnyalhatja az a megfigyelés, hogy Beyerlein és mtsai. T1DM gyakoribb előfordulását írták le az élet első hat hónapjában átélt légúti vírusfertőzések esetén közel 300 000 gyermek 8,5 éves utánkötése során (OR: 1,19) [169]. Ugyancsak progressziót indukáló hatása feltételezhető a humán inzulinból csak három aminosavban különböző bovin inzulin is, amely ellen T1DM-specifikus antitesteket nem hordozó csecsemőkben is leírtak antitesttermelődést, azonban ezek titere 12-18 hónapos korban spontán lecsökkent, a T1DM-re hajlamosító HLA DQB1*0302 haplotípust hordozókban is. Velük szemben a legalább már két autoantitestet (IAA, ICA, GADA, és/vagy IA-2A) hordozókban a bovin inzulin elleni antitestek titere tovább emelkedett [170].



7. ábra A β -sejtet érintő vírusfertőzések proinflammatorikus citokinkörnyezet létrehozása által hozzájárulhatnak az esetlegesen jelen lévő autoreaktív T-sejt klónok aktivációjához (bystander aktiváció). A károsodott β -sejtekből további, korábban az immunrendszer számára nem hozzáférhető antigének szabadulhatnak fel, illetve a gyulladáshoz vezető citokinkörnyezet is hozzájárul a β -sejtek fokozott MHC-I expressziójához (antigenic spreading). A citokinkörnyezet és az endogén adjuvánsok hatására aktiválódó APC-k által biztosított kostimulusok a naív autoreaktív T-sejtek számára effektor fenotípus kialakítását támogató környezetet biztosítanak.

1.7 T_{reg} sejtek: meghatározásuk, működésük és főbb alcsoportjaik

Az autoreaktivitás nem bináris tulajdonság, a thymusban egy T-sejt affinitása egy antigénhez széles skálán mozoghat. A saját antigént erősen kötő $CD4^+$ T-sejtek egy része nem lesz deléció áldozata, nT_{reg} (natural T_{reg}) sejtévé hasznosul [171]. Emellett a periférián is lehetőség van –megfelelő mikrokozonyezetben– naív $CD4^+$ T-sejtek indukált T_{reg} (iT_{reg}) irányú differenciálódására.

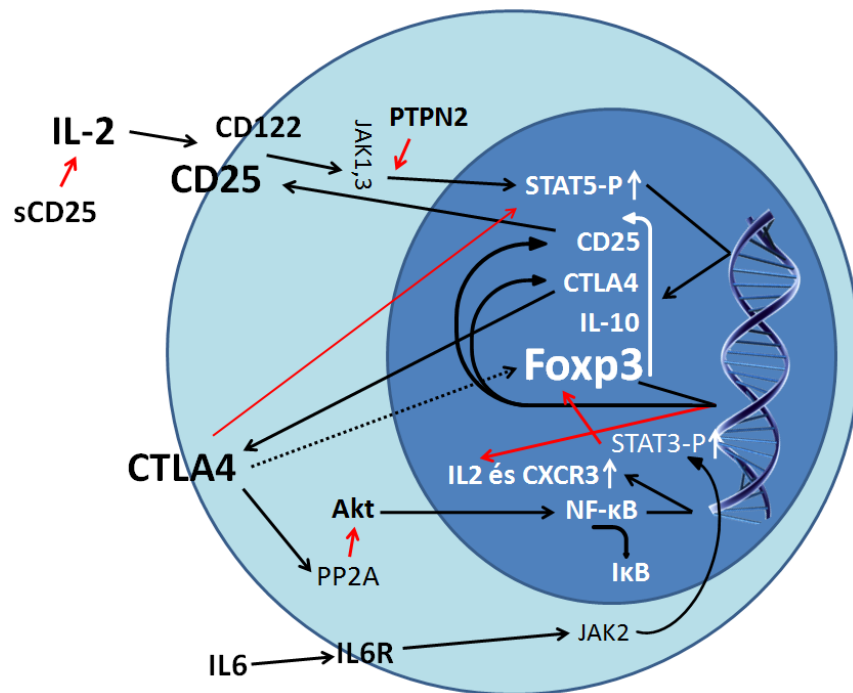


8. ábra A thymusban a saját MHC-komplexhez kötődni nem képes T-sejt klónok deléciója következik be (pozitív szelekció). A saját antigénekhez erősen kötődő klónok apoptózis áldozatául esnek (negatív szelekció). Átmenetet képeznek azok a klónok, amelyek gyenge-közepes affinitással képesek saját antigénekhez kötődni, illetve azoknak minimális módosítása (pl. transzglutamináció, citrullináció) szükséges csak a felismerésükhöz. Ezen sejtek természetes regulátoros T-sejtekké (nT_{reg}) differenciálódva, illetve a túlélő autoreaktív klónokként juthatnak a perifériára.

Bár egyes $CD8^+$ [172] és $\gamma\delta$ -T-sejtek [173] sejtek is betölthetnek regulátoros funkciót, jelen tudásunk szerint a domináns T_{reg} populációt az X-hez kapcsoltan öröklődő forkhead box P3 (Foxp3) transzkripciós faktort expresszáló $CD4^+$ lymphocyták teszik ki [104]. A Foxp3 a T_{reg} differenciáció fő irányítója [174], a diszfunkciója következtében kialakuló IPEX (Immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked) szindrómában megfelelő T_{reg} funkció nem alakul ki és ezekben a betegekben gyakran és igen korán alakul ki diabetes mellitus [175]. In vitro humán T_{reg} sejtek szupresszor kapacitása jelentősen károsodott a Foxp3 expresszió siRNS (kis interferáló RNS) mediálta gátlásának hatására [176]. Vice versa, a Foxp3 lentivírus transzfekció útján történő bejuttatását és expresszióját követően humán naív és memória $CD4^+$ T-sejtekben T_{reg} sejtekre jellemző fenotípus és funkció kialakulását írták le. [177]. Említést érdemel ugyanakkor, hogy effektor T-sejtek tranzienst, alacsony szintű Foxp3 expresszióját is leírták aktiválódáskor [178]. Az IL-2 receptor α láncát is széles körben használták T_{reg} sejtek azonosítására ($CD4^+CD25^{+high}$) [104] CD127 negativitással együtt [179], vagy önmagában. A módszer előnye, hogy nem igényli a sejtek permeabilizálását, így

életképes, és funkcionálisan tovább vizsgálható sejtek nyerhetők. Ugyanakkor a CD127 expressziója nem kapcsolható annyira alapvetően és egyértelműen a regulátoros tulajdonsághoz, mint a Foxp3. Liu és mtsai. vizsgálatában a CD4⁺CD127^{low} sejtek 41,5%-a bizonyult Foxp3 pozitívnak, míg a jelentősen nagyobb CD4⁺CD127⁺ populáció 2,5%-a is expresszált Foxp3-at [179]. Felmerült továbbá, hogy aktivációjukkor a T_{reg} sejtek felszínén is a CD127 upregulációja következik be [180]. Bár a CD25 specificitását T_{reg} sejtekre csökkentti, hogy az effektor T-sejtek aktivációs markere is [181], funkcionális *IL2RA* allél hiánya emberben IPEX-hez hasonló tünetegyüttes kialakulásához vezet megtartott CD4⁺Foxp3⁺ sejtsszámmal, de ezen sejtek csökkent funkciójával, amelyben meghatározó az elégtelen IL-10 termelés [182]. Long és mtsai. in vitro T1DM betegek CD4⁺CD25^{high} T-sejtjeiben a Foxp3 fokozott expresszióvesztéséről számoltak be IL-2 jelenlétében, amely összefüggött az IL-2 mediálta jelátvitelben meghatározó STAT5 csökkent foszforilációjával és magasabb PTPN2 expresszióval. Ez utóbbi nem volt összefüggésbe hozható a *PTPN2* gén két ismert, T1DM kialakulására hajlamosító polimorfizmusának hordozásával [83]. In vitro a CTLA-4 mediálta jel elősegítette CD4⁺CD45RB^{high} (naív) murin T-sejtek Foxp3 expresszióját, de ahhoz nem bizonyult feltétlenül szükségesnek. In vivo a CTLA-4 szerepe meghatározónak bizonyult a bél mucosa Foxp3⁺ T-sejt pooljának kialakításában, míg a thymusban és a lépben nem. A szerzők továbbá leírták, hogy a B7 komplex 2-es altípusának (CD86) szerepe meghatározó a T_{reg} indukcióban [183]. A T_{reg} sejtek kialakulását és működését alapvetően befolyásoló jelátviteli utakat a 9. ábra foglalja össze.

Zelenay és mtsai. a murin CD4⁺Foxp3⁺CD25⁻ sejteket az aktív T_{reg} sejtek rezervoárjaként írták le, amelyek csak aktiválódást (részben IL-2 által) és a CD25 upregulációját követően képesek aktív regulátoros funkció kifejtésére [184]. Komatsu és mtsai. szintén murin T-sejtek vizsgálata során a CD4⁺Foxp3⁺CD25⁻ T_{reg} sejtek Foxp3 expresszióját kevésbé találták stabilnak, és ezen sejtek T effektor irányú transzdifferentiációját is leírták megfelelő citokinkörnyezetben [185]. A humán vizsgálatok eredményei sokkal kevésbé kategorikusak, többségükben azonban a CD25⁻ T_{reg} sejtek meglévő, de csökkent szuppresszív kapacitását írják le [179, 186, 187]. A CD4⁺Foxp3⁺CD25⁻ T-sejtek magasabb arányát írták le sclerosis multiplexben [188], rheumatoid arthritisben [189] és SLE-ben [190].



9. ábra A T_{reg} sejtek kialakulását és működését meghatározó jelátviteli utak összefoglalása [183, 191–200]. Az IL-2 elsősorban STAT5 mediálta jelátvitelen keresztül alapvető jelentőséggel bír a Foxp3 és a CTLA-4 expresszió fenntartásában. A szolubilis CD25 az IL-2 celluláris hatásait kompetitíven gátolni képes. A CTLA-4 mediálta jelátvitel emellett a Foxp3 indukcióján keresztül a T_{reg} irányú differenciálódásnak kedvez. A fekete nyilak aktivációt, a piros színűek gátlást jelölnek.

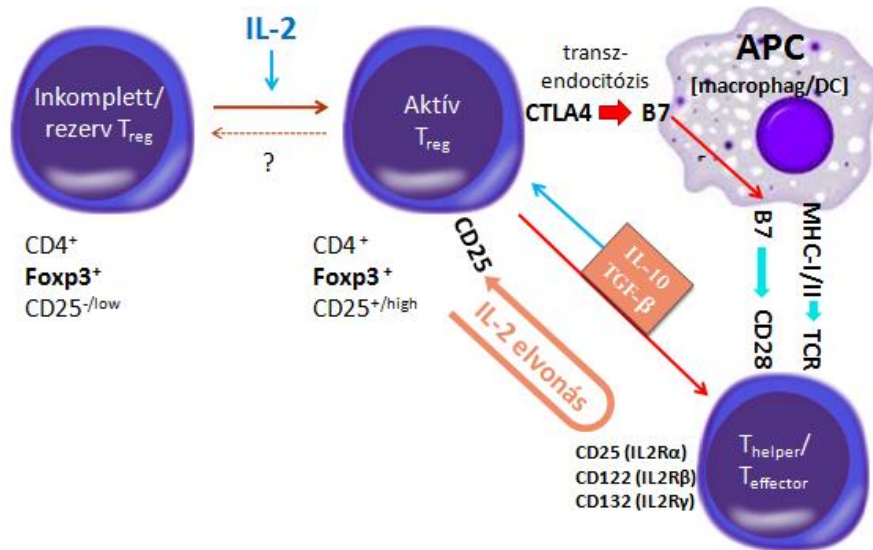
Az iT_{reg} és nT_{reg} sejtek elkülönítésére több lehetséges markert és eljárást is említ az irodalom. A Foxp3 lókuszt TSDR (T_{reg} cell-specific demethylated region) régiójában bekövetkező demetiláció szükséges a Foxp3 stabil expressziójához. Míg nT_{reg} sejtek esetében a régió jellemzően demetilált, *in vitro* indukált iT_{reg} sejtekben inkomplett demetilációt és kevésbé stabil fenotípust írtak le [104]. Az *in vitro* indukálható iT_{reg} sejtek azonban nem feleltethetők meg tökéletesen az *in vivo* indukált iT_{reg} sejteknek. Az utóbbiak esetében egyes vizsgálatok stabil TSDR-demetilációt és stabil fenotípust írtak le [104, 201]. Thornton és mtsai. vizsgálatában az egerek thymusából izolált összes $CD4^+CD8^-Foxp3^+$ T-sejtben ki tudták mutatni a helios (az Ikaros transzkripciós faktor családba tartozó protein) expresszióját, míg az *in vitro* létrehozott iT_{reg} sejtek egyáltalán nem mutattak helios expressziót. A perifériás egér és humán $Foxp3^+$ T_{reg} sejtek 70%-a

expresszáta ezt a markert, ami az nT_{reg} sejtek 70%-os arányára utal a perifériás vér T_{reg} sejtjei között. [202]. Akimova és mtsai. ugyanakkor megfigyelték, hogy a helios indukálható T-sejt aktiváció során, és az expresszió csökken a sejtek nyugvó állapotában mind effektor, mind regulátoros T-sejtek esetében, így inkább aktivációs markernek tekinthető [203, 204]. Az nT_{reg} és iT_{reg} sejtek elkülönítésére alkalmasnak látszó markerként merült fel egy számos ligandot, köztük a VEGF (vascular endothelial growth factor) család tagjait kötő receptor, a neuropilin-1, amelyre vonatkozóan elsősorban murin adatok állnak rendelkezésre [204].

Viszonylag kevés adat ismert az iT_{reg} és nT_{reg} sejtek eltérő élettani és kóreltani jelentőségéről. Ez talán az elkülönítésükre irányuló próbálkozások újszerűségével és bizonytalanságával is magyarázható. Kísérletes adatok alapján az iT_{reg} sejteknek jelentős szerepük lehet az autoimmun folyamatok iniciációjában, progressziójában jelentős mucosalis tolerancia fenntartásában. Az asthma bronchiale ovalbumin (OVA) indukálta egérmodelljében az iT_{reg} sejtek meghatározó szerepe volt kimutatható: OVA-TCR–transzgenikus egerekből származó nT_{reg} sejtek képesek voltak az astmatikus állatokban az IL-4 és IL-5 termelést csökkenteni, ugyanakkor az antigénspecifikus IgE szintjét és a tüneteket nem. Ugyanakkor azonos TCR specificitású iT_{reg} sejtek átvitelekor az utóbbiakban is szignifikáns javulás mutatkozott [205]. $Rag^{-/-}$ egerek kísérletes colitise is kezelhetőnek bizonyult iT_{reg} és nT_{reg} sejtek szimultán átvitelével, illetve IL-10 GKO nT_{reg} sejtek átvitelekor az iT_{reg} sejtek megfelelő mennyiségű IL-10 termelésre voltak képesek [127]. Smythies és mtsai. az intestinalis macrophagok csökkent gyulladáscitokintermelését írták le megtartott phagocitafunkció mellett, amely hozzájárulhat a naív T-sejtek iT_{reg} irányú differenciációjához [206].

A T_{reg} sejtek szuppresszív kapacitása részben humorális, részben kontakt celluláris mechanizmusokon alapul. A kontakt gátló funkció jelentős részben a CTLA-4 felszíni expressziójához köthető. A T_{reg} felszíni CTLA-4 által képes az APC felszíni CD80/86 expresszióját csökkenteni [110], amelyben szereppel bírhat a CD80/86 (B7) komplex transzendocitózisa [207]. A T_{reg} sejtek számottevő CD25 expressziója által az effektor T-sejtek IL-2 deprivációját, és apoptosist képesek kiváltani, amely in vitro kivédhető volt a közös γ -receptorláncon keresztül jelet közvetítő citokinek (IL-2, 4, 7, 15) hozzáadásával [208]. Emellett a T_{reg} sejtek számottevő humorális gátló kapacitással

rendelkeznek elsősorban IL-10, TGF- β és IL-35 elválasztáson keresztül, illetve további iT_{reg} sejtek keletkezéséhez is hozzájárulnak [209]. Az IL-10 mediálta gátló funkció zavarát írták le CD25 hiányban (ld. korábban) [182].

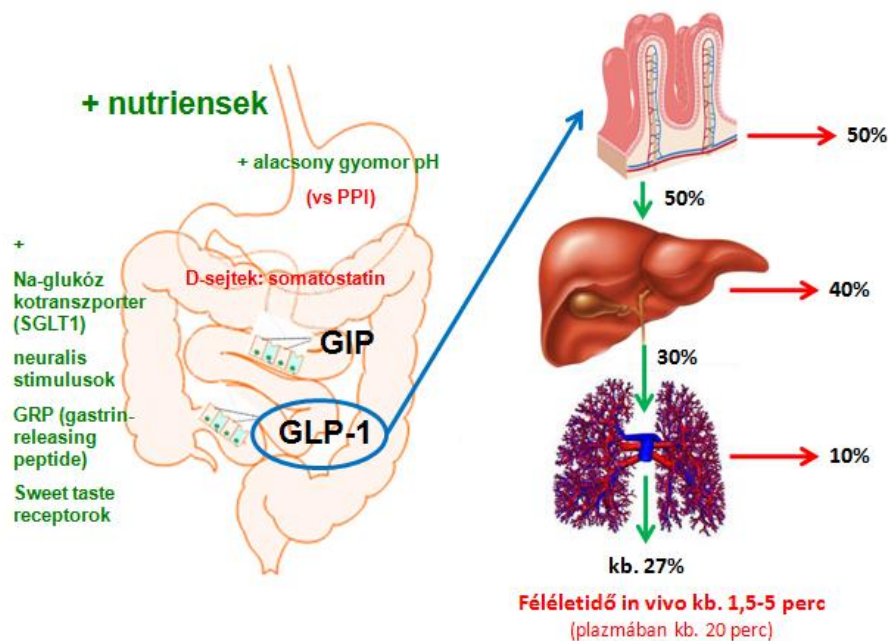


10. ábra A T_{reg} sejtek –jelentős részben IL-2 mediálta- aktivációját a CD25 expressziójuk upregulációja kíséri. Az aktív T_{reg} sejtek jelentős affinitása az IL-2-höz az effektor T-sejtek IL-2 deprivációjához, és ezzel gátlásához vezet, amelyhez az IL-10 és TGF- β elválasztással is hozzájárulnak. Emellett a T_{reg} sejtek felszíni CTLA-4 expressziójuk által az APC-k felszínén a CD80/86 (B7) downregulációját idézik elő, csökkentve az APC effektor T-sejt indukáló kapacitását.

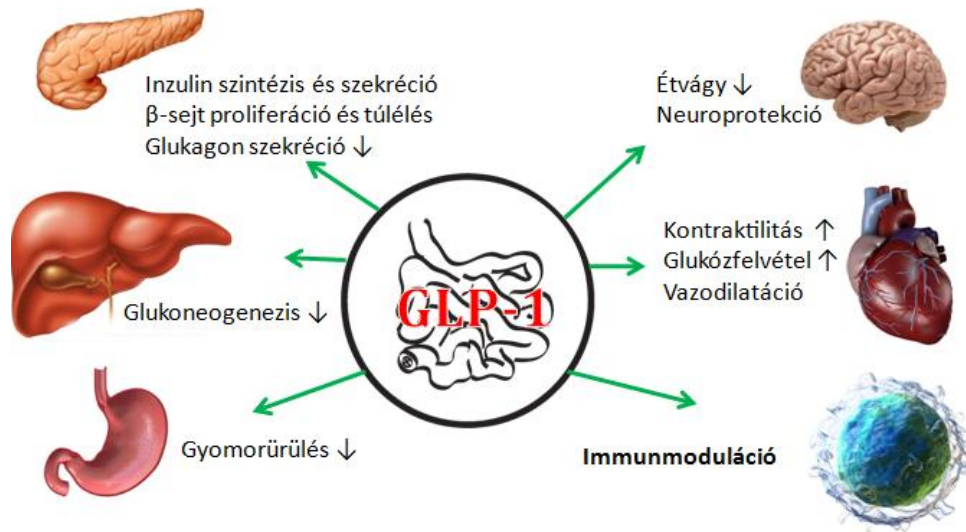
1.8 Az entero-inzuláris rendszer metabolikus és immunológiai jelentősége

Nauck és mtsai. közel húsz éve írták le az enterális és vénás glukózterhelésre adott eltérő inulinválaszt [210]. A bélrendszer L- és K-sejtjei által elválasztott glukagonszerű peptid-1 (GLP-1) és glukózdependens inzulinotrop peptid (GIP) stimulálják β -sejtek inzulinelválasztását, és az étkezést követő inzulinválasz 50-70%-a a hatásukra következik be [211]. Direkt endokrin hatásuk mellett az inkretin hormonok túlélési és proliferációs szignált is jelentenek a β -sejtek számára [211]. In vitro humán β -sejteken GLP-1 stimulus képes volt ellensúlyozni a glukolipotoxicitás jelentette proapoptotikus stimulust [212], illetve a proinflammatorikus citokinek (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ)

antiproliferatív hatását [14]. Ezen túlmenően *in vitro* hasnyálmirigy ductalis sejteinek transz-differenciációját is leírták GLP-1 hatására [213]. Az L-sejtek GLP-1 elválasztását elsősorban a béllumen felől észlelésre kerülő glukóz serkenti, amely nátrium-glukóz kotranszporterén (SGLT), illetve GLUT csatornákon keresztül kerül felvételre és a sejt ATP-termelésén és az ATP-érzékeny káliumcsatornák záródásán keresztül járul hozzá a sejt depolarizációjához és a szekréciós granulumok exocitózisához [214]. Sweet taste receptorok és egyéb transzmitterek is aktiválhatják az L-sejteket (neuropeptidek, GIP, acetilkolin), míg a glukagon gátlólag hat [215]. A GLP-1 és GIP féléletideje néhány percre tehető [216], inaktiválásukért (N-terminális hasítás) elsősorban a dipeptidyl peptidase 4 (DPP4, felszínhez kötött formában CD26) felelős (ld. 11. ábra), kisebb részben további enzimek (pl. neutrális endopeptidáz) is szerepet játszhatnak [217].



11. ábra A GLP-1 elválasztását a béllumenbe kerülő monoszacharidok, zsírok és aminosavak mellett neuronális stimulusok és az alacsony gyomor-pH is stimulálják. A véráramba szekretált GLP-1 mintegy fele már a mesenterialis kapillárisok endothel-felszínéhez kötött CD26 (DPP4) aktivitás következtében inaktiválódik. A portális keringést elérő mennyiség 60 %-a hagyja csak el a májat, és további 10 % a veszteség a tüdő érrendszerében. A teljes elválasztott GLP-1 mennyiség kevesebb, mint harmada éri el a szisztémás keringést, a féléletidő 5 percnél kevesebb. A GLP-1 inaktiváció mintegy 10-15%-áért a szérumban DPP4 aktivitás felelős [218–220].



12. ábra A GLP-1 ismert pancreaticus és extrapancreaticus hatásainak áttekintése [221–223]

A GLP-1 számos szövet és szerv működését befolyásolja (12. ábra), immunmoduláns hatásairól is egyre többet tudunk. GLP-1-et kódoló rekombináns adenovírusal kezelt obes (ob/ob) egerek peritoneális macrophagjaiban alacsonyabb IL-6, TNF- α és TLR4 expressziót írtak le mRNS szinten kezeletlen egerekkel összehasonlítva [224]. In vitro GLP-1 kezelés hatására humán macrophagok STAT3 mediálta M2 irányú (a Th1 válaszokat IL-10, TGF- β és IL-1 receptor antagonisták termelésén keresztül gátló fenotípus) differenciációját írták le. (Az M1 fenotípusú macrophagok jellemzően gyulladásgátló citokineket - TNF- α , IL-6, IL-12- termelnek) [225]. Humán umbilicis véna endothelsejtek liraglutid-kezelése is a proinflammatorikus NF- κ B jelátvitel downregulációját eredményezte [226]. A GLP-1 receptort kimutatták többek közt T- [227] és iNKT sejteken is [228]. Hadjiyanni és mtsai. megfigyelései szerint a *Glp1r*^{-/-} murin thymocyták hypoproliferatívnak bizonyultak és a hím GLP-1 receptor GKO egerekben csökkent perifériás T_{reg} számokat írtak le [229]. Marx és mtsai. exendin-4 kezelés hatására a humán T-sejtek csökkent CXCL12 indukálta migrációjáról is beszámoltak [227]. A munkacsoport később a GLP-1⁹⁻³⁶ GLP-1 receptortól független, a CD4⁺ T-lymphocyták kemotaxisát gátló tulajdonságáról is beszámolt [230]. Részben a GLP-1 antiinflammatorikus hatása, részben a DPP4 gátlása nyomán megváltozó citokinkörnyezet állhat a háttérben annak a megfigyelésnek is, hogy a koronáriabetegségben is szenvedő T2DM betegek kezelésének kiegészítése

sitagliptinnel alacsonyabb hsCRP-szinteket, systolés vérnyomásértékeket és kedvezőbb reaktív hyperaemia indexet eredményezett a kontrollcsoporthoz képest [231]. A GLP-1 analóg exenatidot akut myocardialis infarktusban alkalmazva alacsonyabb nekroenzim-értékeket és kisebb infarktusméretet figyelték meg, a háttérben a GLP-1 direkt miokardiális hatása állhat [232].

A megfigyelések gyakorlati jelentőségét támasztja alá az inkretin tengely befolyásolásának megfigyelt terápiás haszna több immunológiai betegségben. Generalizált pustularis és erythrodermával járó psoriasisban eosinophiliát írtak le [233], amely cyclosporin kezelés hatására csökkent [234], ezzel együtt a szérum DPP4 aktivitás emelkedését figyelték meg [235]. Az eosinophiliával járó Churg-Starusszindrómában alacsonyabb szérum DPP4 koncentrációkat írtak le, amelyek remisszióban emelkedtek [236]. A megfigyelésekben szerepet játszhat az eosinophilek mobilizációjában jelentős eotaxin (CCL11) DPP4 mediált hasítása. T2DM-ben és psoriasisban szenvedő betegeken a bőrtünetek javulását írták le exenatide kezelés során, emellett az iNKT sejt szám emelkedett a keringésben, de csökkent a plakkokban, illetve dózisfüggő csökkenés volt megfigyelhető a citokintermelésükben [228]. A sitagliptin kedvező hatását is leírták súlyos psoriasisban [237], illetve antiinflammatorikus hatását figyelték meg T2DM betegeken: a kezelt csoport perifériás mononukleáris sejtjeiben csökkent NF- κ B, TNF- α , TLR4 és CD26 expressziót írtak le placebóval kezeltikkel összehasonlítva [238]. Asthma bronchialeban szenvedő betegek légúti epithelájában a DPP4 upregulációját írták le. In vitro a Th2 citokin IL-13 hatására légúti epithelsejtekben a a DPP4 upregulációját figyelték meg mRNS szinten [239]. CD26 GKO patkányok ovalbumin indukálta asthmájában a bronchoalveolaris lavage folyadék csökkent eosinophil granulocytá és aktivált T-sejt tartalmáról, a T_{reg} sejtek fokozott tüdőbe áramlásáról, in vitro a drenáló nyirokcsomóból származó sejtek IL-10 termeléséről számoltak be [240]. Sitagliptin kezelés mellett légúti allergiás reakció OVA-indukálta murin modelljében csökkent a BAL leukocytá és IL-13 tartalma, illetve az állatok szérumában az antigénspecifikus IgE koncentrációja [241]. Patkányokban DPP4 hiány mellett súlyosabb Th1 mediálta kontakt dermatitist, míg a Th2 medálta allergiás bőrtünetek kedvezőbb lefolyását írták le [242].

A DPP4 expressziója gyakorlatilag minden szervben és számos sejten kimutatható, köztük a T és B-lymphocytákon, NK (natural killer) sejteken, epithelialis és endothelsejteken, acinaris hámon, zsírsejteken, és szolublis formában is megtalálható a szérumban [243]. A transzmembrán szakaszt nem tartalmazó szolubilis forma rendelkezésre álló ismereteink szerint jelentős részben zsírszöveti és hepaticus eredetű lehet [244, 245]. A szérumba jutásának mechanizmusa pontosan nem ismert. Munkacsoportunk korábban a szérumban magasabb aktivitásáról számolt be nem alkoholos zsírmájbetegségben (NAFLD) [244] és T1DM-ben [246], illetve számos közlemény írta le a szérumban DPP4 aktivitás változását autoimmun betegségekben. Lamers és mtsai. in vitro a DPP4 inzulinrezisztenciát közvetítő, adipokinszerű hatását írták le zsír- és vázizomsejteken, amely meghatározó szerepét valószínűsíti az NAFLD-hez kapcsolódó perifériás inzulinrezisztencia kialakulásában [245], és egybevégez Firneisz és mtsai. korábbi megfigyeléseivel [244]. A számottevő felszíni CD26 expresszió egyes szerzők szerint a Th1 [247] és Th17 [248] szubpopulációkra, illetve CD8⁺ korai effektor memória T-sejtekre [249] különösen, de nem kizárólagosan jellemző. Salgado és mtsai. az alacsony felszíni CD26 expressziót a T_{reg} sejtek jellemző tulajdonságaként írták le [250]. Lymphocyták esetében aktivációs markerként került leírásra, illetve membránhoz kötött formája maga is részt vesz kostimulusok közvetítésében [249, 251]. Emellett számos, a lymphocyták kemotaxisában és homingjában jelentős citokin a DPP4 ligandja, köztük a CXCL9-11, CXCL12 (SDF-1), CCL5 (RANTES - regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) [252]. A DPP4 vizsgálatunk szempontjából jelentős citokin ligandjait a VI. táblázat foglalja össze. In vitro a humán lymphocyták kemotaxisa gátolható volt a CXCL9 és 10 citokinek CD26 mediálta hasításával [253]. Yamada és mtsai. vizsgálatukban CXCR3 (a CXCL9-11 receptora) GKO NOD egerekben a diabetes rapidabb kialakulását írták le, amelyet mérsékelni lehetett vad fenotípusú NOD egerek CD4⁺CD25⁺ T-sejtjeinek transzfúziójával. Megfigyelésük hátterében a CXCR3 GKO modellben a T_{reg} sejtek Langerhans-szigetekbe történő elégtelen homingját írták le [159].

VI. táblázat A DPP4 néhány kiemelkedő jelentőségű interleukin/kemokin-ligandja [252]

Peptid	N-terminus	Receptor	Fő biológiai jellemzők
CXCL9	TPVVR...	CXCR3	Kemokinek, szerepük meghatározó az effektor és regulátoros T-sejtek navigálásában.
CXCL10	VPLSR...	CXCR3	
CXCL11	IPLAR...	CXCR3	
CXCL12 (SDF-1)	KPVSL...	CXCR4	
CCL11 (eotaxin)	GPASV...	CCR3	Kemokin, az eosinophilek homingjának fő szabályozója.
IL1 α	SAPFS...	IL-1R	Alapvető proinflammatorikus citokinek, pirogének. Elsősorban monocyták és macrophagok választják el.
IL1 β	APVRS...	IL-1R	
IL2	APTSS...	IL-2R (részei: CD25, CD122 és CD132)	T-sejt aktivátor, szerepe elsődleges a T _{reg} aktivációban, így a gyulladási folyamatok limitálásában.
IL6	VPPGE...	IL-6R (részei: CD126 és CD130)	Az akutfázis-reakció fő mediátora, elsősorban proinflammatorikus citokin, pirogén.
IL10	SPGQG...	IL-10R	Antiinflammatorikus citokin, a T _{reg} sejtek jelentős mennyiségben választják el, CD25 mediálta jelátviteltől függően

2. Célkitűzések

- 2.1 Munkacsoportunk korábbi vizsgálatainak során T1DM betegek szérumában magasabb DPP4 aktivitás igazolódott. A szolubilis forma a szervezetben előforduló DPP4 kisebbik hányadát képezi. Míg a metabolikus szindrómához kapcsolódó T2DM esetében eredetéről és a patogenezisben betöltött jelentőségéről a közelmúltban ismereteink jelentősen bővültek, T1DM esetében mind a többlet eredetéről, illetve annak befolyásáról az inkretin-tengelyre és immunológiai paraméterekre nem áll rendelkezésre információ. Vizsgálatunk célja volt az 1-es típusú diabetes mellitus miatt kezelt betegek szérumában kimutatható szolubilis DPP4 aktivitás-többlet GLP-1 plazmaszintekre és az immunreguláció egyes, általunk vizsgálható paraméterei gyakorolt hatásának megismerése.
- 2.2 Több autoimmun betegség esetében igazolni lehetett a T_{reg} sejtek, illetve alcsoportjaik arányában eltéréseket, amelyek szerepet játszhatnak az autoimmunitás térnyerésében. Bár a T_{reg} sejtek vizsgálata jelentős múltra tekint vissza, ismereteink továbbra is töredékesek. Célunk volt a $CD4^+Foxp3^+$ T_{reg} sejtek, illetve $CD25^+$ (aktív) és $CD25^{-/low}$ (rezerv) alcsoportjaik arányának mérése mellett ezen alcsoportok gátló (CTLA4) és kemotaktikus (CXCR3) kapacitását jellemző markerek expressziójának vizsgálata is T1DM betegek és egészséges kontrollszemélyek perifériás vérmintáiban.
- 2.3 Az inkretin-hormonok mellett a DPP4 ligandjai közé tartozik számos, mind a T_{reg} , mind az effektor T-sejtek és további fehérvérsejt-alcsoportok kemotaxisában meghatározó jelentőségű citokin. Kiterjedt citokinvizsgálatok kivitelezése meghaladta volna lehetőségeinket, ugyanakkor vizsgálatunk célja volt a magasabb szérum DPP4 aktivitás lehetséges összefüggéseinek megismerése a T-lymphocytá populációk megoszlásával. A natív GLP-1⁷⁻³⁶ és a DPP4 által hasított GLP-1⁹⁻³⁶ is ismerten rendelkezik immunmoduláns hatással, amelynek jelentősége egyelőre kevésbé ismert T1DM-ben. Célunk volt annak pontosabb megértése, hogy a GLP-1 aktív és hasított formájának in vivo milyen immunológiai hatások tulajdoníthatóak T1DM-ben, illetve egészséges kontrollszemélyekben.

2.4 A GWAS vizsgálatok során azonosított, T1DM kialakulására hajlamosító polimorfizmusok közül számos érinti a T_{reg} sejtek kialakulását és funkcióját. Emellett a DPP4-inkretin tengely eltéréseire is számos adat utal T1DM-ben, ugyanakkor ezek lehetséges összefüggései az immunregulációval kevésbé ismertek. Vizsgálatunk célja volt néhány, a T_{reg} sejtek működését alapvetően meghatározó génterméket kódoló gén polimorfizmusainak (SNP-k: *DPP4* rs6741949, *CTLA4* rs3087243, *CD25* rs61839660, *PTPN2* rs2476601) meghatározása az általunk vizsgált populációban, és ezek befolyásának felmérése a DPP4-inkretin tengely általunk mért paramétereire.

3. Módszerek

3.1 Vizsgálatba bevont személyek

Vizsgálatainkat az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság engedélyével végeztük (294/PI/10, 4514-0/2010-1018EKU). A vizsgált alanyok bevonása önkéntes alapon történt, tájékoztatást követően írásos beleegyező nyilatkozatot írtak alá. Vizsgálatunk során 1-es típusú cukorbeteg (T1DM) és korban és nemi összetételben illesztett egészséges kontrollszemélyek mintáit vizsgáltuk. A T1DM megállapítására a nemzetközi standardoknak megfelelően került sor [9]. Szisztémás immunmoduláns kezelésben részesülő, illetve ismert, számottevő szisztémás immunmoduláns hatással rendelkező gyógyszert vagy DPP4 inhibitor készítményt használó betegek egyik csoportban sem szerepelhettek. A kontrollcsoportban nem szerepelhettek ismert autoimmun betegségben, illetve egyéb, jelentős akut, vagy krónikus megbetegedésben szenvedők. Nem kerültek bevonásra gravidák, illetve azon személyek, akikben valamely vizsgált laborparaméter alapján a fentiekkel nem összeegyeztethető állapot igazolható vagy feltételezhető volt. A T1DM csoportból az autoimmun társbetegségek nem kerültek kizárára a klinikai napi gyakorlatnak megfelelően. Előfordulásukat, illetve a célszervkárosodásokra és gyógyszerhasználatra vonatkozó adatokat a VII. táblázat tartalmazza.

A kontrollcsoportból kizárára került két személy: egy alany esetébenben pozitív gyulladáshoz laborparaméterek mutatkoztak, egy esetben Hashimoto-thyreoiditis igazolódott a klinikai anamnézis és ATPO (thyreoperoxidáz elleni antitest) vizsgálat pozitivitása alapján. A T1DM csoportból is két alany került kizárára, akik esetében a diagnózis nem volt kétséget kizáróan igazolható. Ezen alanyok a feltüntetett esetszámokban nem szerepelnek. Arra tekintettel, hogy a szénhidrát-anyagsere jelentős eltérései (bár ezt közvetlenül kimutatni nem tudtuk) befolyásolhatják a DPP4-inkretin tengely laboratóriumi módszerekkel vizsgálható paramétereit, a szénhidrát-anyagsere igen jelentős eltéréseit mutató betegeket (HbA1C $\geq 12\%$ és/vagy éhomi plazma glukóz ≥ 20 mmol/l, 5 T1DM beteg) ezen paraméterek összefüggéseinek vizsgálatokor kizártuk az elemzésből. Az egyes mérések esetében a minták elemszáma technikai okok miatt is módosulhatott, amely a későbbiekben feltüntetésre kerül.

VII. táblázat Autoimmun betegségek és célszervkárosodás előfordulása, illetve gyógyszerhasználat a vizsgált T1DM betegek között

Autoimmun társbetegségek	
Hashimoto-thyreoiditis	6/39 (15,38%)
Autoimmun gastritis	3/39 (7,69%)
Coeliakia	2/39 (5,13%)
Vitiligo	1/39 (2,56%)
Crohn-betegség	1/39 (2,56%)
Célszervkárosodás	
Retinopathia	13/39 (33,33%)
Neuropathia	6/39 (15,38%)
Nephropathia	3/39 (7,7%)
Major cardiovascularis esemény	0/39
Gyógyszerhasználat	
Analog inzulint használók	25/39 (64,1%)
ACEI/ARB	7/39 (17,95%)
Statin	2/39 (5,13%)
Aspirin	0/39

VIII. táblázat A vizsgálati csoportok néhány fontosabb klinikai paramétere

	T1DM (n=39)	CNTRL (n=36)	p
Kor (év, 95% CI)	32,52 (29,65-35,37)	31,06 (27,87-34,24)	NS
BMI (kg/m²)	23,32 (22,02-24,63)	23,7 (22,21-25,19)	NS
Nem (N/F)	20/19	19/17	NS
Életkor diagnóziskor (év)	17,97 (15,22-20,73)	-	-
Betegségtartam (év)	14,88 (12,32-17,44)	-	-
C-peptid pozitivitás	8/39	-	-
HbA1c (%)	7,91 (7,23-8,59)	-	-
(mmol/mol)	63,4 (55,69-71,1)		-
Éhomi plazma glukóz (mmol/L)	9,64 (8,07-11,22)	4,96 (4,82-5,09)	<10 ⁻⁵
45 perces plazma glukóz (mmol/L)	11,17 (9,5-12,83)	5,29 (4,82-5,77)	<10 ⁻⁵
Fehérvérsejt-szám (G/L)	6,52 (5,96-7,08)	6,25 (5,76-6,75)	NS
Lymphocyta szám (G/L)	1,74 (1,56-1,93)	1,95 (1,8-2,11)	NS
Neutrophil szám (G/L)	4,06 (3,64-4,48)	3,55 (3,2-3,9)	NS
Monocyta-szám (G/L)	0,43 (0,38-0,47)	0,42 (0,39-0,46)	NS
Eosinophil-szám (G/L)	0,16 (0,13-0,2)	0,16 (0,13-0,18)	NS
Basophil-szám (G/L)	0,06 (0,03-0,09)	0,034 (0,03-0,04)	NS
CD4/CD8 arány	1,72 (1,5-1,94)	1,84 (1,53-2,14)	NS

3.2 DPP4 enzimaktivitás meghatározása

A szérumban DPP4 enzimaktivitás meghatározása natív éhomi szérumban mintákból történt microplate alapú kinetikus módszerrel 96 wellben. A szérumban minták tárolása a centrifugálással (20 perc, 2000 rpm) az alakos elemektől történő különválasztást követően -20, majd -80 C°-on kerültek tárolásra. Wellenként 9,4 µl minta hozzáadására került sor. Szubsztrátként Gly-Pro-pNA-t (Glicin-Prolin-Paranitroanilin) használtunk. A teljes reakcióvolumen 125 µl, a Gly-Pro-pNA koncentrációja 2 mmol/l volt, pufferként 100 mM Tris-HCL-t használtunk. A mérés 37 C°-on, Thermo Scientific Varioskan Flash berendezéssel (Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet) történt 7'30" időközökkel, összesen 30 perc időtartammal, 405 nm-en. Az enzimaktivitás U/L-ben adtuk meg, amelyet a pNA hidrolízisből számoltunk.

3.3 GLP-1 koncentrációk meghatározása

EDTA-val, sitagliptinnel és proteáz-inhibitor cocktaillal (Sigma Aldrich, P8340; összetétel: 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, aprotinin, bestatin hydrochloride, N-trans-Epoxy succinyl-L-leucine 4-guanidinobutylamide, leupeptin hemisulfate, pepstatin A) kezelt csövekbe standard tesztétkezt (50 g szénhidrát, 22 g fehérje, 9 g zsír) követően 45 perccel vett vérmintákból nyert plazmát használtunk. A vérmintákat hűtve tároltuk és 30 percen belül centrifugálással (20 perc, 2000 rpm) különválasztottuk a plazmát, amely -20, majd -80 C°-on került tárolásra. A GLP-1⁷⁻³⁶ („aktív”) és a total GLP-1 (GLP-1⁷⁻³⁶ és GLP-1⁹⁻³⁶) koncentrációk meghatározására standard ELISA kitekkel került sor (Merck Millipore, GLP-1⁷⁻³⁶: EGLP-35K, total GLP-1: EZGLP-1T-36K) a gyártó ajánlásainak megfelelően. A hasított GLP-1⁹⁻³⁶ plazmakoncentrációkat a kettő különbségeként számítással határoztuk meg.

3.4 Áramlási citometriás mérések

Az áramlási citometriás mérések a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben Dr. Barna Gábor által vezetett Áramlási Citometriás Laboratóriumban történtek. EDTA-val antikoagulált éhomi vérmintákat vizsgáltunk a

mintavétel napján. A fixáció és a vörösvértestek lízise BD Pharmingen Transcription Factor Buffer Set segítségével történt. Minden vérmintából három csövet állítottunk összesen: az elsőben teljes fixálást és permeabilizálást végeztünk antitestek hozzáadása nélkül. A 2. és 3. csövek összetételét és a felhasznált antitestek főbb paramétereit a IX. és X. táblázatok tartalmazzák. A 3. csőben CD4 antitest használatára nem került sor, mivel a beállítás során az APC-Cy7 (CD4) transzfluoreszcenciát okozott az APC (CTLA-4) csatornában. Ebben a csőben CD8^{neg} nem citotoxikus T-sejtek (T_{nc}) kerültek meghatározásra, a T_{reg} sejteket is ezen csoporton belül különítettük el Foxp3 expressziójuk alapján.

IX. táblázat A vizsgált markerek csövenkénti és a jelöléshez tartozó festéket gerjesztő lézertípus hullámhossza szerinti bontásban

2. cső			3. cső		
Kék lézer (488 nm)					
CD44	5 µl	FITC	CXCR3	5 µl	Fluoreszcein
CD26	5 µl	PE	CD26	5 µl	PE
FoxP3	5 µl	PE-CF594	FoxP3	5 µl	PE-CF594
CD8	1,5 µl	PerCP	CD8	1,5 µl	PerCP
CD3	1 µl	PE-Cy7	CD3	1 µl	PE-Cy7
Piros lézer (633 nm)					
CD25	2 µl	AF700	CTLA-4	15 µl	APC
CD4	5 µl	APC-Cy7	CD25	2 µl	AF700

X. táblázat Az egyes markerek jelölésére használt antitestek az áramlási citometria során

Jelölt antigén	Jelölés	Izotípus	Klón	Gyártó
CD3	PE-Cy7	IgG1, κ	UCHT1	Biologend (San Diego, CA, USA)
CD4	APC-Cy7	IgG1, κ	SK3	Biologend (San Diego, CA, USA)
CD8	PerCP	IgG1, κ	SK1	Biologend (San Diego, CA, USA)
CD25	AF700	IgG1, κ	BC96	Biologend (San Diego, CA, USA)
CD26	PE	IgG2a, κ	BA5b	Biologend (San Diego, CA, USA)
CD44	FITC	IgG1, κ	BJ18	Biologend (San Diego, CA, USA)
CXCR3 (CD183)	Fluoreszcein	IgG2b	49801	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
CTLA-4 (CD152)	APC	IgG2a, κ	BNI3	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Foxp3	PE-CF594	IgG1	259D/C7	BD Biosciences (San Jose, CA, USA)

A felszíni antigéneket jelölő antitestek és 50 µl EDTA-val antikoagulált vér bemérését követően a mintákat 30 percig inkubáltuk 2-8 °C hőmérsékleten, fénytől védve. Mosást (2 ml PBS) és centrifugálást (5 min, 1600 rpm), a felülúszó leöntését és az üledék vortexelését követően fixáló-permeabilizáló oldatot adtunk a mintákhoz (Fix/Perm, Transcription Factor Buffer Set, BD Biosciences), és 45 percig inkubáltuk őket 2-8 °C hőmérsékleten. 1 ml Perm/Wash oldat (Transcription Factor Buffer Set, BD Biosciences) hozzáadását követően centrifugáltuk, majd a felülúszó leöntését és vortexelést követően ismét mostuk a mintákat 2 ml Perm/Wash oldattal. Ezt követően mértük be az intracelluláris antitesteket, és ismét 45 percig inkubáltuk hűtőszekrényben a mintákat. Az inkubációs idő leteltével további két mosási lépés (2-2 ml Perm/Wash) után a 300 µl PBS-ben diszpergált sejtszuszpenziót Beckman Coulter Navios áramlási citométer segítségével vizsgáltuk. Az eredmények kiértékelése Beckman Coulter Kaluza szoftverrel (Ver. 1.2) történt.

3.4.1 Kapuzási stratégia

A mérések értékelése során a lymphocytákat a jellemző oldalsó és előre irányuló fényszórásuk alapján különítettük el. Amennyiben egy markerre nézve (CD25, Foxp3) nem volt egyértelmű a pozitív és negatív populáció határa, a cutoff érték meghatározása a jelöletlen csőben azonos csatornában észlelt autofluoreszcencia alapján történt. A CD4⁺ T-lymphocyták csoportján belül Foxp3 expressziójuk alapján különítettük el a T_{reg} sejteket. Mind a CD4⁺, mind a T_{reg} populáción belül meghatároztuk a CD25⁺ sejtek arányát, illetve meghatároztuk az egyes alcsoportokon belül a CD26⁺ sejtek arányát. Igen magas, és jellegzetes eloszlású CD26 expressziójuk alapján különítettük el a CD8⁺ T-sejt csoporton belül a korai effektor memória sejtek alcsoportját [249]. A 3. csőben a CD4 (APC-Cy7) és CTLA4 (APC) jelölések között észlelt interferencia miatt a CD8^{neg} T-sejtek kerültek további értékelésre. Meghatároztuk ezen csoport intracelluláris CTLA4 expresszióját, illetve a CD8^{neg}Foxp3⁺CD25⁺, valamint CD8^{neg}Foxp3⁺CD25^{-/low} sejtek felszíni CXCR3 expresszióját. A kiértékelés során alkalmazott kapuzási stratégiát a 17. és 20. ábrák részletesen tartalmazzák.

3.5 További laborparaméterek meghatározása

A rutin laboratóriumi, illetve további immunológiai és endokrin paraméterek meghatározása a Semmelweis Egyetem Központi Laboratóriumában történt. A hematológiai paraméterek meghatározása Siemens ADVIA 2120 Hematology System (Erlangen, Germany), az éhomi és postprandiális plazma glukózértékek meghatározása Beckman Coulter AU5800 Clinical Chemistry System (Brea, CA, USA) berendezéssel, a szérum C-peptid koncentrációk meghatározása Liaison XL Chemiluminescence Analyzer (Dia Sorin, Saluggia, Italy), a HbA1C mérések Bio-Rad Variant II Turbo Hemoglobin Testing System (Hercules, California, USA) berendezésen, az IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) módszertani előírásának megfelelően történtek. A glutaminsav-dekarboxiláz elleni autoantitestek (GADA) meghatározása Euroimmun Anti-Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) ELISA (IgG) Kittel (Euroimmun AG, Luebeck, Germany), a szigetsejt elleni autoantitestek (ICA) detektálása indirekt immunfluoreszcens technikával majom pancreas-szöveten történt (Inova Diagnostics, San Diego, CA, USA).

3.6 Genetikai vizsgálatok

Három, a T_{reg} sejtek indukcióját és működését meghatározó gén GWAS vizsgálatok során már vizsgált, immunpatológiai kórállapotokkal összefüggésbe hozott polimorfizmusát (*CTLA4* rs3087243, *CD25* rs61839660 és *PTPN2* rs2476601), illetve a *DPP4* gén egy gyakori variánsát (rs6741949) vizsgáltuk. Az ezen génekről és polimorfizmusairól rendelkezésre álló, a kiválasztásukat indokló adatokat az V. táblázat foglalta össze. A humán genomiális DNS izolálása magnetic bead alapú módszerrel (Mag Maxi Kit, LGC Genomic Solutions, Berlin, Germany), Hamilton MagNA STAR (Hamilton Robotics, Bonaduz, Switzerland) automatizált berendezésen történt a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikáján (laborvezető: Dr. Komlósi Zsolt egyetemi adjunktus). Vizsgált személyenként 500 ng genomiális DNS került izolálásra (5 µl volumenben, 100 ng/ µl). A hordozott genotípus (SNP: single nucleotide polymorphism) meghatározását kereskedelmi forgalomban kapható allélspecifikus TaqMan assayk (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) és master-mix (FastStart Essential DNA Probes Master, Roche, Basel, Switzerland) segítségével

végeztük, ROX hozzáadásával 7500 Fast Real-Time PCR rendszeren (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), a gyártó által megadott ciklusparaméterekkel a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrin Laboratóriumában (laborvezető: Dr. Patócs Attila egyetemi docens, munkatársak: Dr. Nyíró Gábor és dr. Molnár Ágnes).

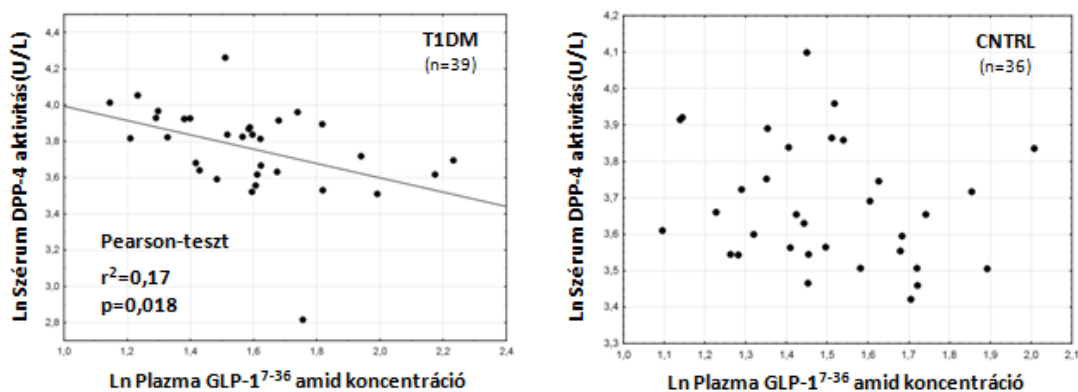
3.7 Statisztikai módszerek

Az adatok értékeléséhez Statistica (version 11 és 12, StatSoft, Tulsa, OK, USA) szoftvert használtunk. A csoportösszetételek összehasonlítását Khi-négyzet próba (KST) segítségével végeztük. Az adatsorok normális eloszlásának megítélésére Shapiro-Wilks és Kolmogorov-Smirnov tesztekkel használtunk. Adatsorok páronkénti összehasonlítását független változók és normál eloszlás esetén kétmintás párosítatlan T-teszttel (T-teszt), nem normál eloszlás esetén Mann-Whitney U-teszttel (MWU) végeztük. Normál eloszlás, de az adatsorok eltérő szórásnégyzete esetén a Welch által módosított kétmintás T-próbát használtuk. Több függő változó összehasonlítására Friedman-ANOVA-t és Wilcoxon post-hoc tesztet használtunk. Több független változó összehasonlítása normál eloszlás esetén ANOVA-, a normáltól eltérő eloszlás esetén Kruskal-Wallis ANOVA által történt, post-hoc tesztként mindkét esetben a rank-alapú Scheffe-tesztet használtuk. A korrelációkat a minta normál, vagy attól eltérő eloszlásától függően Pearson, illetve Spearman korrelációs próbákkal vizsgáltuk. A felhasznált statisztikai próbák az eredmények mellett feltüntetésre kerültek. A genetikai vizsgálatokban a Hardy-Weinberg egyensúlytól való deviáció vizsgálatát követően a genotípus-fenotípus összefüggések analízisét (bináris és folyamatos változók) egy erre a célra megírt R-projekt statisztikai programcsomaggal is elvégeztük (Németh László, Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar, Valószínűségelméleti és Statisztika Tanszék) logisztikus regresszió módszerével domináns és additív matematikai modelleket alkalmazva. A genetikai összefüggések függetlenségét metabolikus paraméterektől a BMI kovariánshoz történő matematikai hozzáigazítási eljárással is biztosítottuk. Több SNP egyidejű vizsgálata miatt a Benjamini-Hochberg szerinti p-korrektív eljárást alkalmaztuk az FDR (false discovery rate) minimalizálása céljából.

4. Eredmények

4.1 Szérum DPP4 aktivitás és GLP-1 plazmaszintek

A T1DM betegek szérumban jelen vizsgálatunkban is magasabb szolubilis DPP4 aktivitást mértünk (T1DM: 44,13 U/l [95% CI: 40,86-47,41] vs. CNTRL: 40,29 U/l [95% CI: 37,84-42,75], MWU $p=0,025$ statisztikai erő =0,59). A plazma GLP-1⁷⁻³⁶, -számított- GLP-1⁹⁻³⁶ és hasítatlan GLP-1 koncentrációkban nem figyeltünk meg szignifikáns eltérést a vizsgált csoportok között (GLP-1⁷⁻³⁶: T1DM: 5,07 pmol/l [95% CI: 4,54-5,58], CNTRL: 4,57 pmol/l [95% CI: 4,2-4,93]; össz. GLP-1: T1DM: 14,06 pmol/l [95% CI: 12,84-15,29], CNTRL: 14,47 pmol/l [95% CI: 13,07-15,86]; iGLP-1: T1DM: 8,99 pmol/l [95% CI: 7,89-10,1], CNTRL: 9,9 pmol/l [95% CI: 8,52-11,28], MWU=n.s. mindhárom esetben), valamint további alcsoportok létrehozása esetén sem (humán és analóg inzulint használó cukorbeteg, allergiás betegségben szenvedő és ettől mentes vizsgálati alanyok, reziduális β -sejt funkcióval rendelkező és C-peptid-negatív betegek). A szérum DPP4 enzimaktivitás és a plazma aktív (GLP-1⁷⁻³⁶) koncentrációja között szignifikáns negatív összefüggést mutattunk ki a T1DM csoportban (SRO: $r=-0,53$, $p=0,002$). Az adatsorok logaritmizálással történő normalizálását követően az összefüggés Pearson korrelációs próbával gyengült, de fennmaradt ($r=-0,41$, $p=0,018$, statisztikai erő=0,69; 13. ábra).

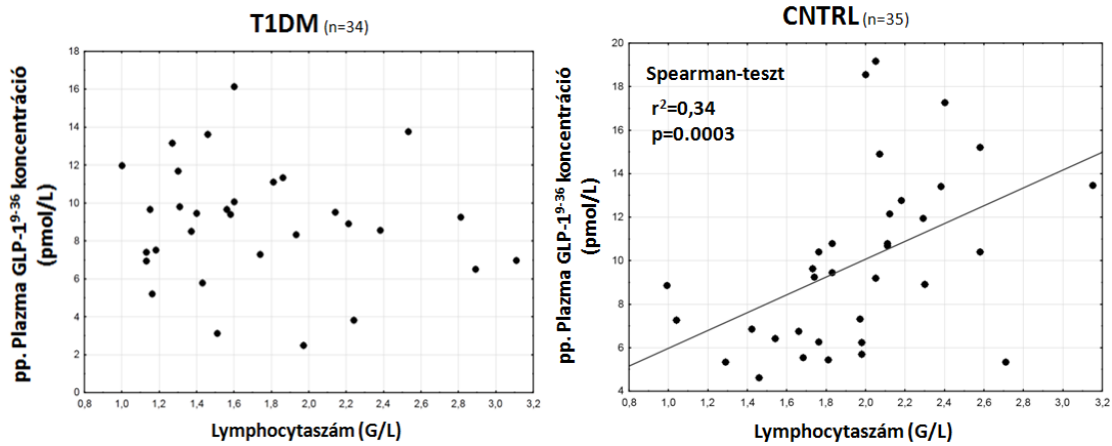


13. ábra. A szérum DPP4 aktivitás összefüggése a plazma aktív GLP-1⁷⁻³⁶ koncentrációkkal

Említést érdemel, hogy T1DM betegekben a posztprandiális totál GLP-1 koncentrációk és a betegség fennállásának tartama között is megfigyelhető volt egy gyenge fordított összefüggés határérték statisztikai szignifikanciával (Spearman $r=-0,35$, $p=0,042$). Sem a szérum DPP4 aktivitás, sem a plazma GLP-1 koncentrációk nem mutattak összefüggést az életkorral, BMI-vel, HbA1c koncentrációkkal és plazma glukóz értékekkel. Ennek ellenére a szénhidrát-anyagcsere jelentős eltéréseinek közvetlen befolyásoló hatása a DPP4-inkretin tengely laboratóriumi módszerekkel vizsgálható paramétereire a bevezető részben már vázolt kórélettani összefüggések ismeretében nem zárható ki. Emiatt a szénhidrát-anyagcsere igen jelentős eltéréseit mutató betegeket ($HbA1C \geq 12\%$ és/vagy éhomi plazma glukóz ≥ 20 mmol/l) ezen összefüggések további vizsgálatakor kizártuk a mintánkból.

4.2 Az inkretin-tengely vizsgált paraméterek összefüggései hematológiai paraméterekkel

Egészséges kontrollszemélyekben a $GLP-1^{9-36}$ plazmakoncentrációja direkt összefüggést mutatott a lymphocytaszámmal (G/l) (SRO: $r=0,58$; $p=0,0003$; 14. ábra). A $GLP-1^{9-36}$ koncentrációk logaritmizálással történő normalizálását követően is fennmaradt az összefüggés (Pearson-teszt, $r=0,48$; $p=0,004$, statisztikai erő=0,84). Az összefüggés T1DM betegekben még tendencia szintjén sem volt megfigyelhető. Gyenge direkt összefüggést figyeltünk meg a szérum DPP4 enzimaktivitás és az eosinophil granulocitaszám (G/l) között (SRO: $r=0,42$, $p=0,016$), valamint fordított összefüggést az aktív $GLP-1^{7-36}$ plazmakoncentrációja és az eosinophil granulocitaszám (G/l) között (SRO: $r=-0,4$; $p=0,028$) T1DM betegekben. A DPP4 enzimaktivitás és $GLP-1^{7-36}$ plazmakoncentrációk normalizálását követően az összefüggéseket Pearson tesztrel vizsgálva csak tendencia szinten voltak megfigyelhetőek ($r=0,3$, $p=0,089$ illetve $r=-0,27$, $p=0,149$).

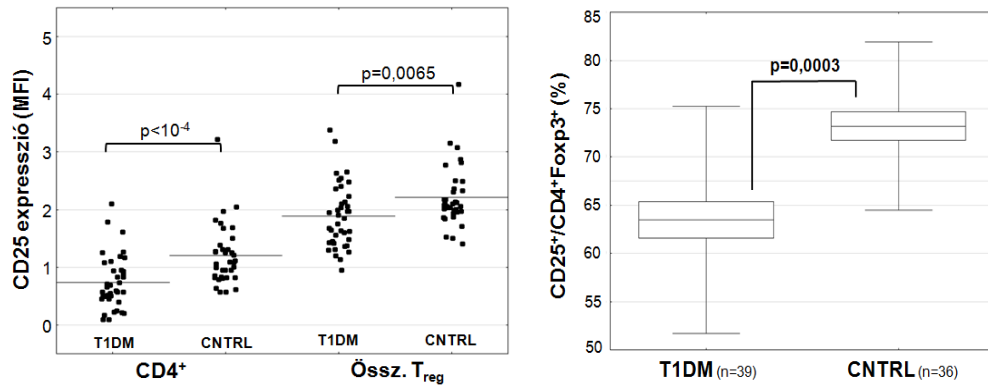


14. ábra A posztprandialis GLP-1⁹⁻³⁶ koncentrációk összefüggése a lymphocytaszámmal T1DM és egészséges kontroll vizsgálati alanyokban

4.3 CD25 és CTLA-4 expresszió a helper és regulátoros T-sejt populációkon

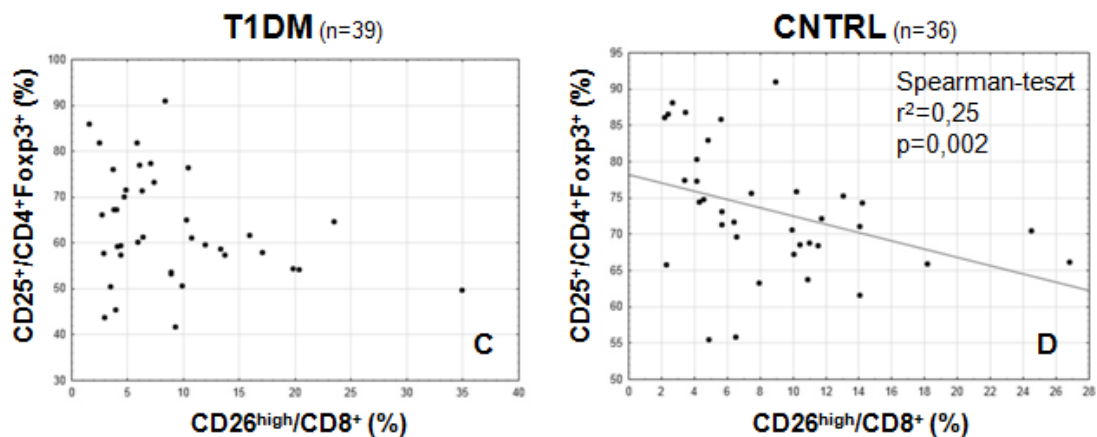
A CD25 expressziót a vizsgált T-sejt populációk medián fluoreszcens intenzitásában (MFI) adtuk meg. A CD4⁺ T-sejtek CD25 expressziója alacsonyabbnak bizonyult a T1DM csoportban (T1DM: 0,74 [95% CI: 0,59-0,89] vs. CNTRL: 1,21 [95% CI: 1,03-1,38], $p < 10^{-4}$, MWU, stat. erő=0,97). A jelöletlen csőben mért autofluoreszcenciánál magasabb expressziót mutató sejteket tekintettük CD25-re nézve pozitívnak. A CD25⁺ sejtek aránya alacsonyabb volt a T1DM csoportban (CD25⁺/CD4⁺: T1DM: 34,68% [95% CI: 29,96-39,41] vs. CNTRL: 48,3% [95% CI: 43,89-52,71], $p < 10^{-4}$, MWU, stat. erő=0,97; 15. és 17. ábrák).

A regulátoros T-sejteket mint a Foxp3 transzkripció faktort az autofluoreszcencia szintje felett expresszáló CD4⁺ T-sejt populációt definiáltuk. Az arányukban nem mutatkozott eltérés a T1DM és a kontroll csoport között. Ugyanakkor a CD4⁺Foxp3⁺ T_{reg} sejtek CD25 expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a T1DM csoportban (MFI: T1DM: 1,89 [95% CI: 1,71-2,07] vs. CNTRL 2,22 [95% CI: 2,04-2,39], $p = 0,007$, MWU, stat. erő=0,7). Ennek háttérében a CD25⁺ sejtek alacsonyabb arányát azonosítottuk a T1DM csoportban (CD25⁺/CD4⁺Foxp3⁺; T1DM: 63,48% [95% CI: 59,67-67,3] vs. CNTRL 73,2% [95% CI: 70,25-76,15], $p < 0,001$, T-teszt, stat. erő=0,96; 15. és 17. ábrák).

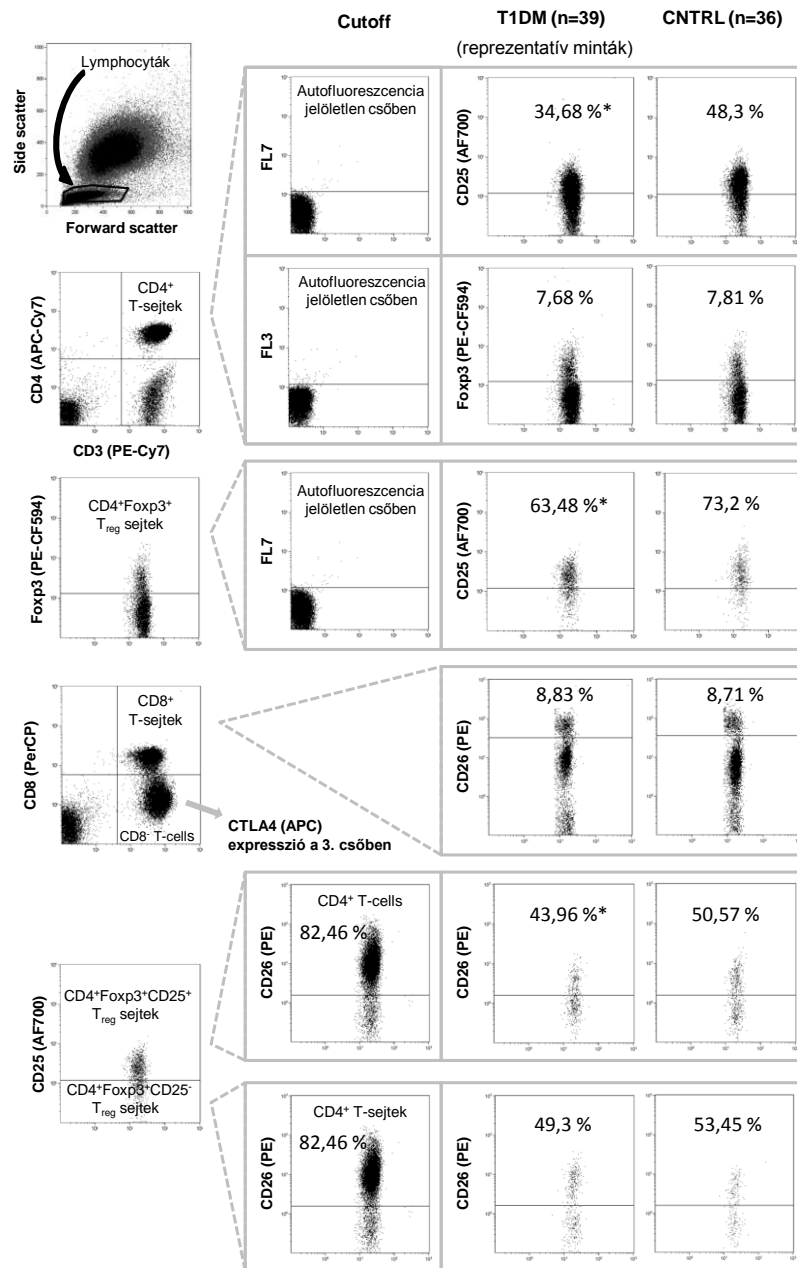


15. ábra A T-helper és T_{reg} sejtek CD25 expressziója, illetve CD25⁺ sejtek aránya a CD4⁺Foxp3⁺ T_{reg} sejtek között a T1DM betegekben és egészséges kontrollszemélyekben

Statisztikailag szignifikáns fordított összefüggést figyeltünk meg a CD8⁺CD26^{high} korai effektor memória T-sejtek aránya (CD26^{high}/CD8⁺) [249] és a CD25⁺ T_{reg} sejtek teljes T_{reg} poolban számított aránya (CD25⁺/CD4⁺Foxp3⁺) között (r^2 : 0,25, $p=0,002$, SRO; 16. ábra) a kontrollszemélyek között, míg a T1DM csoportban nem.

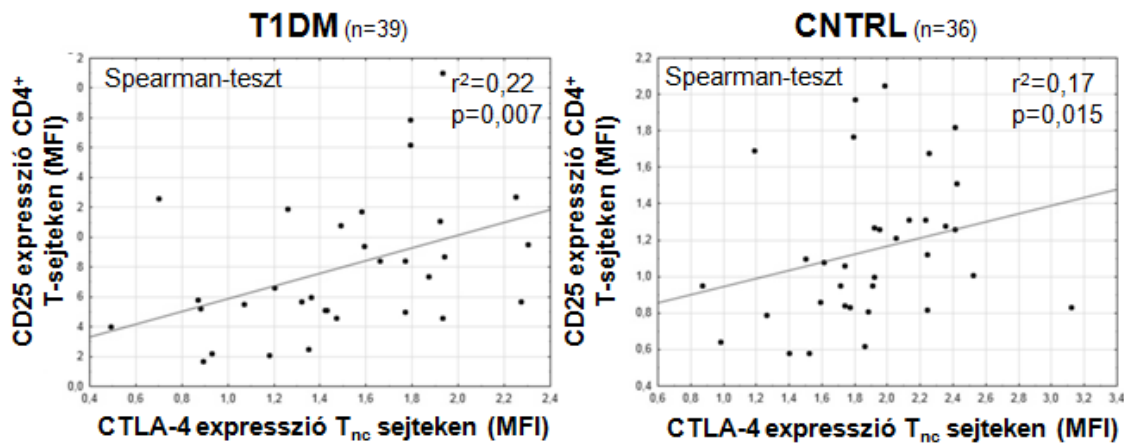


16. ábra A CD25⁺ sejtek T_{reg} (CD4⁺Foxp3⁺) csoporton belüli arányának és a CD26^{high} („korai effektor memória”) CD8 cytotoxikus T-sejtek közötti arányának összefüggése T1DM és egészséges kontroll személyekben



17. ábra Kapuzási stratégiánk és főbb áramlási citometriás eredményeink összefoglalása. A lymphocyták kapuzása az oldalsó és elülső fényszórásuk alapján történt. A CD26 kivételével a cutoff értékek meghatározására és a marker pozitív sejtek elkülönítésére egy jelöletlen csőben az adott csatornában mért autofluoreszcenciát használtuk. A T_{reg} sejteket a $CD4^+$ illetve $CD8^{neg}$ csoporton belül Fopx3 sejtekként határoztuk meg. Minden vizsgált csoport és alcsoport kapuzását egy-egy reprezentatív minta szemlélteti, csillaggal jelöltük, ahol a vizsgált csoportok között statisztikailag szignifikáns különbség mutatkozott.

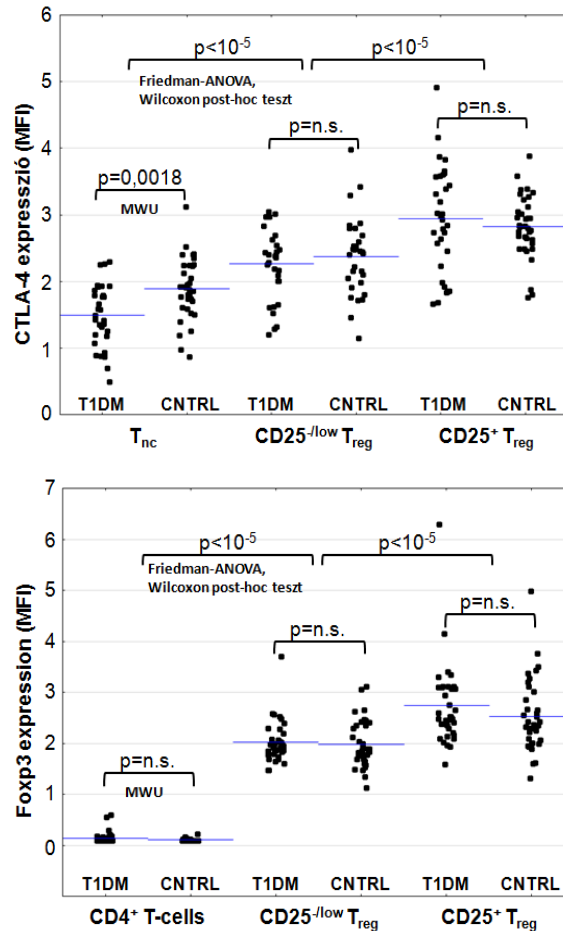
A T1DM csoport nem cytotoxikus T-sejtjeiben ($CD3^+CD8^{neg} T_{nc}$) alacsonyabb CTLA-4 expressziót figyeltünk meg (MFI, T1DM: 1,49 [95% CI: 1,32-1,66] vs. CNTRL 1,89 [95% CI: 1,73-2,05], $p=0,002$, MWU, stat. erő=0,89; 19. ábra). Szignifikáns összefüggést figyeltünk meg a $CD4^+$ T-sejtek CD25 és a $CD8^{neg} T_{nc}$ sejtek CTLA-4 expressziója között mind a T1DM ($r^2=0,22$, $p=0,007$, SRO), mind a kontroll csoportban ($r^2=0,17$, $p=0,015$, SRO; 18. ábra).



18. ábra A $CD4^+$ T-helper sejtek CD25 és a $CD8^{neg}$ nem cytotoxikus T-sejtek CTLA-4 expressziójának összefüggése

4.4 Az egyes T-sejt alcsoportok CTLA-4 és Foxp3 expressziója

Bár a $CD25^+$ és $CD25^{-/low} T_{reg}$ sejtek CTLA-4 expressziója nem mutatott eltérést a vizsgált csoportok között, egy lépcsőzetes emelkedés volt megfigyelhető az egyes T-sejt alpopulációk CTLA-4 expressziójában (MFI; T_{nc} : T1DM: 1,49 [95% CI: 1,32-1,66], CNTRL: 1,89 [95% CI: 1,73-2,05]; $CD25^{-/low} T_{reg}$: T1DM: 2,26 [95% CI: 2,06-2,46], CNTRL: 2,38 [95% CI: 2,16-2,6]; $CD25^+ T_{reg}$: T1DM: 2,94 [95% CI: 2,65-3,23], CNTRL: 2,83 [95% CI: 2,67-2,98]), és ehhez hasonlóan a Foxp3 expresszióban (MFI; $CD4^+$ T-sejtek: T1DM: 0,14 [95% CI: 0,11-0,18], CNTRL: 0,11 [95% CI: 0,1-0,12]; $CD25^{-/low} T_{reg}$: T1DM: 2,02 [95% CI: 1,89-2,16], CNTRL: 1,96 [95% CI: 1,81-2,12]; $CD25^+ T_{reg}$: T1DM: 2,73 [95% CI: 2,47-3], CNTRL: 2,54 [95% CI: 2,29-2,8]) is. Az egyes sejtcsoportok párhuzamos összehasonlítása Friedman-ANOVA segítségével, Wilcoxon post-hoc teszttel történt (minden esetben $p<10^{-5}$). A T1DM és kontroll csoportokat Mann-Whitney U-teszttel hasonlítottuk össze (ld. 17. és 19. ábrák).



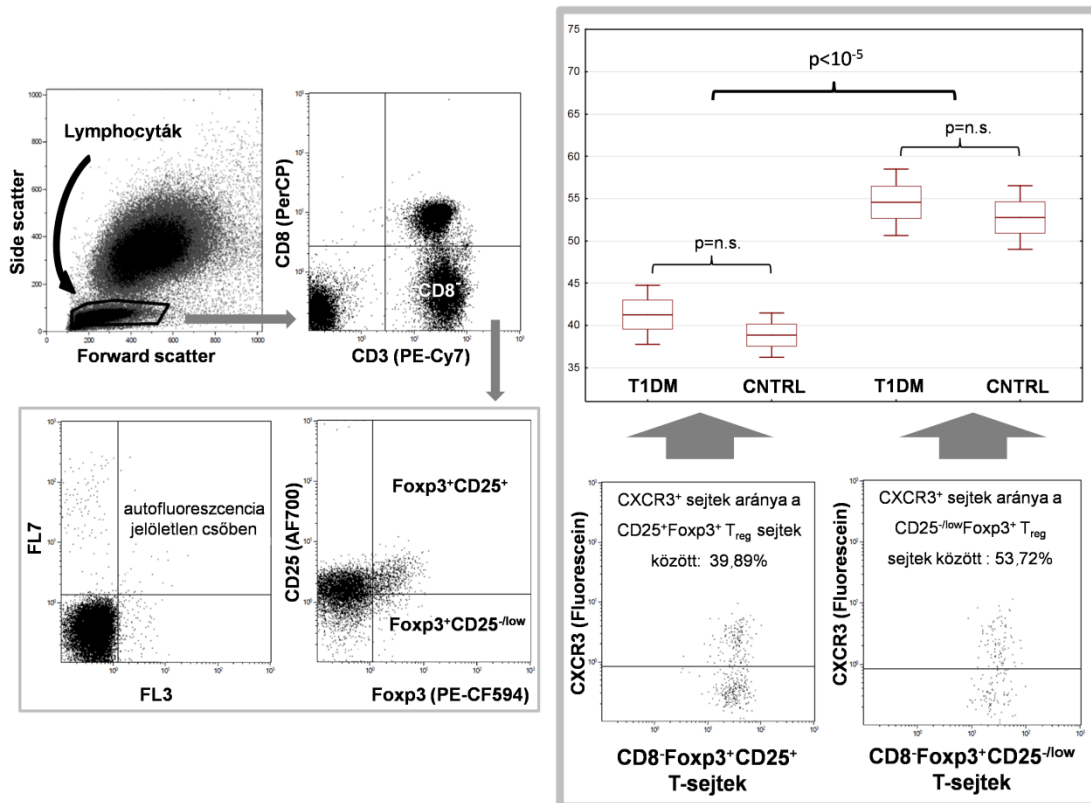
19. ábra Az egyes T-sejt csoportok CTLA-4 és Foxp3 expresszióinak összehasonlítása

4.5 A T_{reg} sejtek CD26 expressziója

A CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺ és CD4⁺Foxp3⁺CD25^{-/low} T_{reg} sejteken mindkét vizsgálati csoportban alacsonyabb CD26 expressziót mutattak, mint a teljes CD4⁺ poolon. A teljes vizsgálati csoport esetében a CD26⁺ sejtek arányai a következők voltak: CD4⁺ T-sejtek: 82,46% [95% CI: 80,72-84,2] vs. CD25^{-/low} T_{reg} sejtek: 51,29% [95% CI: 48,74-53,83] vs. on CD25⁺ T_{reg} sejtek: 47,14% [95% CI: 44,7-49,58] (Friedman-ANOVA, p<10⁻⁵; Wilcoxon post-hoc teszt: CD4⁺ vs. CD25^{-/low} T_{reg} vagy CD25⁺ T_{reg}: p<10⁻⁵ stat. erő=0,99, CD25^{-/low} T_{reg} vs. CD25⁺ T_{reg}: p=0,0002, stat. erő=0,7). A CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺CD26⁺ sejtek aránya alacsonyabbnak bizonyult a T1DM betegekben (CD26⁺/CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺: T1DM: 43,96% [95% CI:40,33-47,6] vs. CNTRL: 50,57% [95% CI: 47,58-53,57], p=0,006, T-teszt, stat. erő=0,78).

4.6 A T_{reg} alcsoportok CXCR3 expressziója

A CXCR3⁺ sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb volt a CD8^{neg}Foxp3⁺CD25^{-/low} T_{reg} sejtek, mint a CD8^{neg}Foxp3⁺CD25⁺ T_{reg} között (53,72% [95% CI: 51,06-56,38] vs. 39,89 [95% CI: 37,62-42,17, Wilcoxon-teszt p<10⁻⁵, statisztikai erő =0,99; 20. ábra). Ugyanakkor a T1DM és kontroll csoport között nem volt kimutatható különbség.



20. ábra A CD8^{neg}Foxp3⁺CD25⁺ és CD8^{neg}Foxp3⁺CD25^{-/low} T_{reg} csoportok és ezek CXCR3⁺ és CXCR3^{neg} alcsoportjainak elkülönítése és arányaik összehasonlítása áramlási citometria segítségével

4.7 A vizsgált T_{reg} paraméterek összefüggései metabolikus tényezőkkel

Statisztikailag szignifikáns, gyenge összefüggés mutatkozott a CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺CD26⁺ sejtek aránya (CD26⁺/CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺) és a HbA1c értéke között a T1DM csoportban (r=0,39, p=0,0144, SRO). Bár statisztikailag szignifikáns, az összefüggés erősségét tekintve szintén marginális összefüggés mutatkozott az éhomi plazma glukóz és a CD25⁺ T_{reg} sejtek Foxp3 expressziója között

($r=0,26$, $p=0,026$) a teljes vizsgálati csoportban. Az igen alacsony r^2 (0,15, illetve 0,07) érték miatt a fentieket nem írhatjuk le valós összefüggésként. A T_{reg} sejtek $CD4^+$ populáción belüli aránya és az éhomi plazma glukóz értéke között egy hasonló, bár statisztikailag szignifikáns, de igen gyenge összefüggést ($r=0,36$, $p=0,034$) figyeltünk meg, azonban csak az egészséges kontrollszemélyek között. Ezen felül nem figyeltünk meg összefüggést a metabolikus és klinikai paraméterek (HbA1C, FPG, PPG, napi inzulin dózis) és azon paraméterek között, amelyekben különbséget írtunk le a vizsgált csoportok között.

4.8 Az expressziós, metabolikus és endokrin paraméterek összefüggései genetikai (DPP4 rs6741949, CTLA4 rs3087243, CD25 rs61839660, PTPN2 rs2476601) polimorfizmusokkal

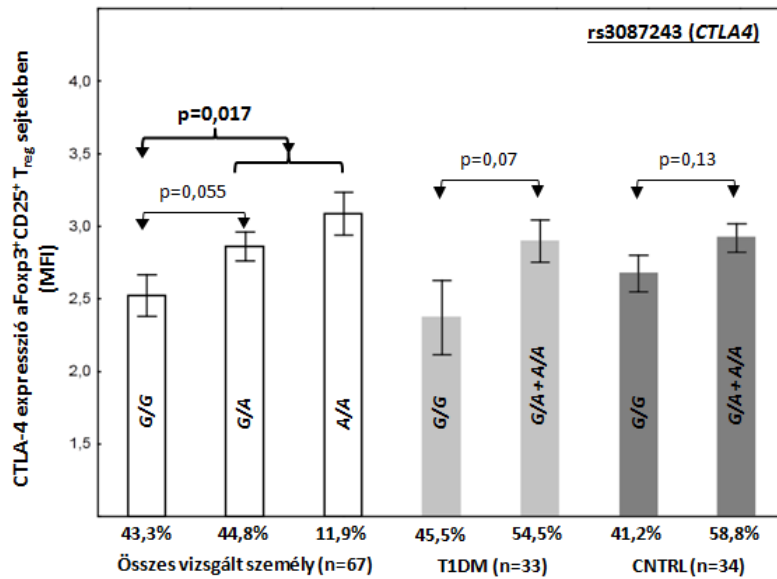
A vizsgált allélok megoszlását a vizsgálati alanyainkban és a 1000 Genomes adatbázis európai alcsoportjában, továbbá a Hardy-Weinberg equilibrium teljesülését a vizsgálati csoportjainkra a XI. táblázatban foglaltuk össze.

4.8.1 A CTLA4 rs3087243 SNP összefüggése a $CD25^+$ T^{reg} sejtek CTLA-4 expressziójával

A $CD8^{neg}Foxp3^+CD25^+$ T_{reg} sejtek CTLA-4 expressziója magasabbnak mutatkozott a legalább egy minor („A”) allélt hordozó személyekben, mint a G allélt homozigóta formában hordozókban (MFI; rs3087243-A allélt hordozók: 2,91 [95% CI: 2,74-3,08] vs. G/G homozigóta alanyok: 2,52 [95% CI: 2,23-2,82], $p=0,017$, T-teszt, stat. erő=0,66; 21. ábra).

XI. táblázat A genotípusok megoszlása a kiválasztott génvariánsokra (SNP) vonatkozóan a vizsgálati csoportban

Gén	vizsgált SNP	A vizsgált személyek megoszlása genotípusok szerint (% a vizsgáltak között, T1DM n=33, CNTRL n=34)												Minor Allel Frekvencia			Hardy-Weinberg equilibrium teljesülése
		AA		AG		GG		GG		GG		GG		Allelok: G/A			
CTLA4	rs3087243	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	1000 Genomes (EUR)	mindkét vizsgálati csoportban		
			9,1	14,7	45,5	44,1	45,5	41,2	0,32 (A)	0,36 (A)	0,47 (A)						
		9,1	CC		CG		GG		Allelok: C/G								
			T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	1000 Genomes (EUR)						
DPP4	rs6741949	9,1	20,6	42,4	58,8	48,5	20,6	0,30 (C)	0,50 (C)	0,41 (C)	mindkét vizsgálati csoportban						
			GG		GT		TT										
		T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	1000 Genomes (EUR)							
			6,1	2,9	30,3	17,6	63,6	79,4	0,21 (G)	0,12 (G)		0,14 (G)					
PTPN2	rs2542151	TT		TC		CC			Allelok: T/C			mindkét vizsgálati csoportban					
		T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	1000 Genomes (EUR)							
			0	2,9	12,1	11,8	87,9	85,3	0,11 (T)	0,15 (T)	0,07 (T)						
		TT		TC		CC			Allelok: T/C								
CD25	rs61839660	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	1000 Genomes (EUR)	T1DM csoportban						
			0	2,9	12,1	11,8	87,9	85,3	0,11 (T)	0,15 (T)		0,07 (T)					
		TT		TC		CC			Allelok: T/C								
		T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	T1DM	CNTRL	1000 Genomes (EUR)							

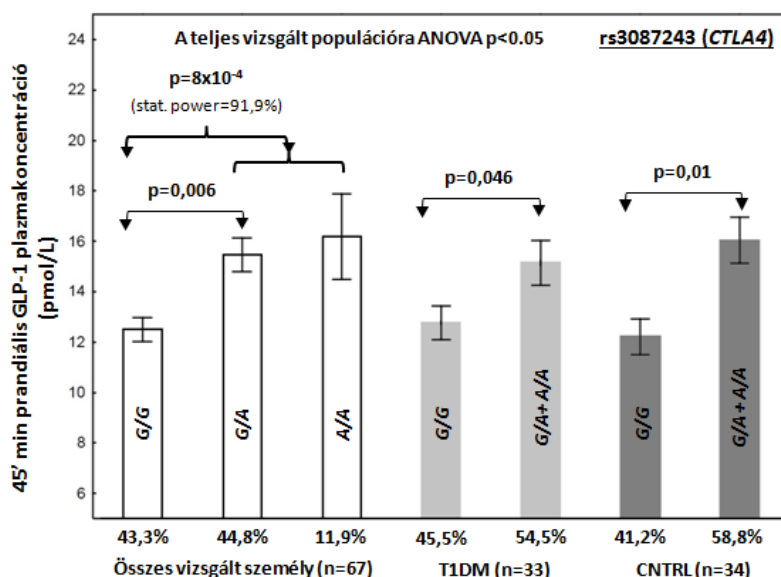


21. ábra A Foxp3⁺CD25⁺ T_{reg} CTLA-4 expressziója a *CTLA4* rs3087243 genotípusok szerint (átlagokat és 95% CI)

4.8.2 A *CTLA4* rs3087243 genotípus összefüggése a postprandialis GLP-1 plazmaszintekkel

A tesztétkezést követően 45 perccel vett plazmamintákból meghatározott total GLP-1 koncentrációk szignifikánsan alacsonyabbak voltak a teljes vizsgálati csoportban a *CTLA4* rs3087243-G/G genotípusú alanyokban, mint a minor (A) allélt hordozókban (rs3087243-G/G genotípusúak: 12,5 pmol/l [95% CI:11,52-13,48] vs. A allélt hordozók: 15,62 pmol/L [95% CI: 14,33-16,9], p=0,0008, Welch T-teszt, statisztikai erő =0,92). Ezt a különbséget megfigyeltük továbbá a T1DM csoportban (rs3087243-G/G genotípus: 12,77 pmol/L [95% CI: 11,34-14,2] vs. A allélt hordozók: 15,15 pmol/L [95% CI: 13,28-17,02], p=0,0464, stat. power=48,16%, T-teszt) és az egészséges kontrollszemélyek között (rs3087243-G/G genotípusúak: 12,21 [95% CI: 10,7-13,73] vs. A allélt hordozók: 16,04 [95% CI: 14,13-17,95], p=0,01, T-teszt) is. Az rs3087243-A allélt homozigóta és heterozigóta formában hordozók között nem mutatkozott statisztikailag szignifikáns különbség (egy rs3087243-A allélt hordozók: 15,47 pmol/L [95% CI: 14,08-16,86] vs. homozigóta rs3087243-A allél-hordozók: 16,19 [95% CI: 12,19-20,19], ANOVA p<0,05, Scheffé poszt-hoc teszt p=n.s.). Ugyanakkor az ANOVA és Scheffé poszt-hoc teszt egyértelműen szignifikáns (p=0,006) különbséget

mutatott a rs3087243-G/G genotípusú személyek és a heterozigóta A allélhordozók között. Az rs3087243-A allél hordozásához mintegy 3,11 pmol/L-el magasabb posztprandiális plazma GLP-1 szinttel járt a teljes vizsgálati csoportban ($p=0,002$). A teljes GLP-1 koncentrációkhoz hasonló eltérés volt megfigyelhető a hasított GLP-1 (GLP-1⁹⁻³⁶) számított koncentrációjában is a *CTLA4* rs3087243 genotípustól függően (teljes vizsgálati csoport, rs3087243-G/G genotípus: 7,96 pmol/L [95% CI: 6,97-8,94] vs. A allélt hordozók: 10,57 pmol/L [95% CI: 9,31-11,82], $p=0,0026$, T-teszt, statisztikai erő =0,82). Az aktív GLP-1⁷⁻³⁶ koncentrációjában és a szérumban DPP4 enzimaktivitásában nem figyeltünk meg a *CTLA4* rs3087243 genotípussal összefüggésben függő eltérést.



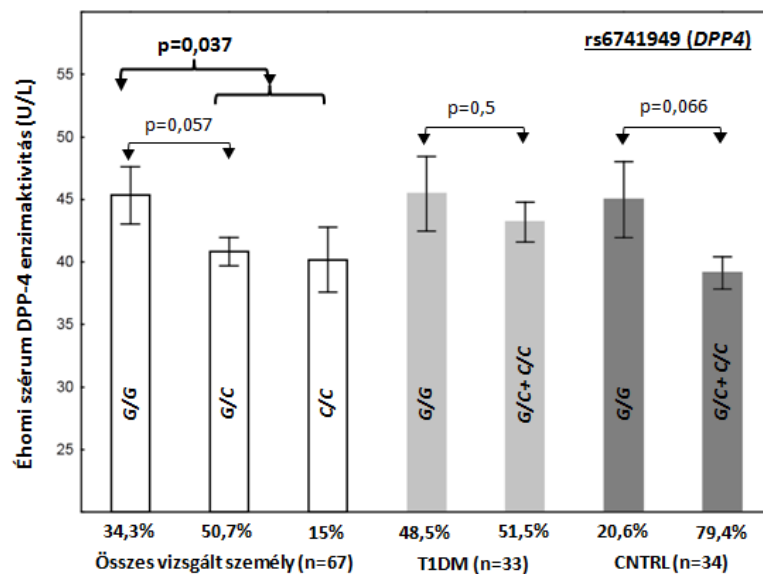
22. ábra A tesztétkezés után 45 perccel mért plazma GLP-1 értékek a hordozott *CTLA4* rs3087243 allélok szerint (átlagok és 95% CI)

4.8.3 További összefüggések az inkretin-válasszal és a szérumban DPP4 enzimaktivitással

A T1DM korábbi manifesztációja volt megfigyelhető az rs3087243-A allélt nem hordozó betegek között határérték szignifikanciával (rs3087243-G/G genotípusú személyek: 15,8 év [95% CI: 11,98-19,62] vs. A-allélt hordozók: 21 év [95% CI: 16,65-25,35]; $p=0,0713$, T-teszt). A C-peptid negatív, és a reziduális endogén

inzulintermeléssel még rendelkezők között ugyanakkor nem mutatkozott különbség a plazma GLP-1 szintekben, bár összesen 8 beteg rendelkezett detektálható C-peptid szinttel és a két csoportban a betegség tartama jelentősen eltért (7,96 év vs. 16,33 év). A posztprandiális total plazma GLP-1 szintek tendencia szintű csökkenése volt megfigyelhető a T1DM betegekben a betegség előrehaladtával ($r=-0,27$), amely valamivel kifejezettebb volt az rs3087243-G/G genotípust hordozókban ($r=-0,41$), azonban a p-érték nem volt szignifikáns (Pearson-teszt $p=0,13$).

Az éhomi szérumban DPP4 aktivitás magasabb volt a *DPP4* rs6741949 G/G genotípust hordozókban, mint a legalább egy C allélt hordozókban (45,34 U/l [95% CI: 40,57-50,11] vs. 40,7 [95% CI: 38,6-42,79], $p=0,0372$, Welch T-teszt, statisztikai erő =0,54). A C allél hordozása mintegy 4,6 U/l csökkenéssel volt összefüggésbe hozható a szérumban DPP4 aktivitásban ($p=0,037$).



23. ábra Az éhomi szérumban DPP4 aktivitásnak a *DPP4* rs6741949-G/C allélok hordozásával összefüggő eltérései (átlagok és 95% CI)

5. Megbeszélés

Annak ellenére, hogy az insulitis, mint a T1DM kialakulásának háttérében álló jellegzetes kórszövettani eltérés évtizedek óta ismert, és az autoimmun folyamat egyre több részletét értjük, a β -sejt vesztés számos vonatkozása máig sem tisztázott. Az inkretin hormonok, elsősorban a GLP-1 (inaktiválása által pedig a DPP4) a posztprandiális inzulinválasz szabályozásán és a β -sejtek túlélésének támogatásán túl immunológiai folyamatok szabályozásában is részt vesznek. A DPP4-inkretin tengelyben bekövetkező változások jelentőségét egyre több adat (pl. a DPP4 széles, immunológiai vonatkozású szubsztrátköre) támasztja alá T1DM-ben és igazolni látszanak a DPP4 gátlókkal [254–256] és GLP-1 alapú kezelésekkel [256–258] elért biztató terápiai részeredmények is. A T1DM betegek szérumában korábban mért magasabb DPP4 enzimaktivitás [246] jelen vizsgálatunkban, illetve egy japán munkacsoport által [259] vizsgálatainktól függetlenül is megerősítésre került. Továbbá a szérum DPP4 aktivitás fordított összefüggését figyeltük meg T1DM betegekben az aktív GLP-1⁷⁻³⁶ plazmakoncentrációjával [260]. Ugyanakkor az irodalmi adatok fényében a szolubilis DPP4 aktivitás csak az inkretin hormonok inaktiválásának mintegy 15%-áért [218–220] lehet felelős.

5.1 Perifériás T_{helper} és T_{reg} sejtek és egyes markereinek változásai T1DM-ben

Több, a bevezető részben már idézett vizsgálat [58, 59, 61, 62] eredménye is arra utal, hogy az autoimmunitás nem tekinthető minden formájában definíció szerint kórosnak, és a periférián megvalósuló szabályozó folyamatoknak meghatározó szerepük van az élettani állapotok fenntartásában. Ezen szabályozó folyamatok zavara számottevően hozzájárul az autoimmun eredetű kórállapotok kialakulásához. A T1DM kialakulásában mai ismereteink szerint elsődleges a celluláris immunválasz perifériás szabályozásáért felelős T_{reg} sejtek szerepe. A GWAS vizsgálatok során azonosított kandidáns gének jelentős része kódol a T_{reg} sejtek indukciójához és funkciójához szükséges fehérjéket, működésüket számtalan in vitro, humán és állatmodellekre épülő vizsgálat (nagyobb részben NOD egerek) során tanulmányozták. Míg a teljes T_{reg} populáció arányában a szerzők többsége nem tudott egyértelmű eltérést kimutatni, egy, a közelmúltban közölt

vizsgálat során *in vitro* is igazolható volt a T1DM betegekből származó T_{reg} sejtek csökkent szuppresszor funkciója [261]. A T_{reg} -vizsgálatok egyelőre nem áthidalható technikai nehézsége, hogy a funkcióhoz legszorosabban kapcsolódó marker, a Foxp3 jelölése mindenképpen a sejtek pusztulásával jár, funkcionális sejtek így csak indirekt markerek felhasználásával nyerhetők. A vizsgálati lehetőségeink ismeretében a regulátoros karakterre specifikusabb, de a sejtek szükségszerű fixálásával és permeabilizálásával vizsgálható Foxp3 meghatározása mellett döntöttünk. Ezt egészítettük ki a gátló funkcióhoz nélkülözhetetlen CTLA-4 intracelluláris fehérjeexpressziójának vizsgálatával, valamint a sejtfelszíni aktivációs marker CD25 (IL2-RA) vizsgálatával, ami lehetőséget biztosított, hogy elkülönítsük a feltehetően aktív ($CD4^+Foxp3^+CD25^+$) és a rezerv ($CD4^+Foxp3^+CD25^{-/low}$) populációt [184, 185] alkotó T_{reg} sejteket. A teljes T_{reg} populáció $CD4^+$ T-lymphocyták közötti arányában nem találtunk különbséget a T1DM betegek és az egészséges kontrollszemélyek között. Ugyanakkor a „rezerv” T_{reg} $CD4^+Foxp3^+CD25^{-/low}$ alcsoport szignifikánsan magasabb relatív arányát figyeltük meg a betegekből a teljes T_{reg} populáción belül. Ezen sejteket jelentős Foxp3 expressziójuk egyértelműen elkülöníti a teljes $CD4^+$ T-lymphocytá pooltól, ugyanakkor CTLA-4 expressziójuk, így feltételezhetően a gátló kapacitásuk is elmarad a $CD25^+$ T_{reg} sejtektől [262]. A T_{reg} sejt alpopulációk arányában talált különbség azt a lehetőséget támasztja alá, hogy a T1DM kialakulásában jelentős szerepe lehet a T_{reg} sejtek egyfajta perifériás érési zavarának is. Eredményeink közzlése után egy évvel egy cseh munkacsoport hasonló megfigyelést tett: a $CD25^+FoxP3^+$ (de nem a $CD25^+Helios^+$) T_{reg} sejtek csökkent arányát, illetve mindkét csoport csökkent $CD25$ expresszióját írták le hosszabb ideje fennálló T1DM miatt kezelt gyerekek perifériás vérében, amely összefüggést mutatott az IL-2 mediálta STAT5 foszforilációs válasz zavarával [263].

A flow citometriás vizsgálatokat genetikai vizsgálatokkal kiegészítve azt találtuk, hogy a *CTLA4* rs3087243-G allélt homozigóta formában hordozók esetében a $CD25^+$ „aktív” T_{reg} sejtek CTLA-4 expressziója szignifikánsan elmaradt a legalább egy A allélt hordozóktól [264]. Eredményeink összhangban vannak egy korábbi vizsgálat eredményével, amely során a szerzők a $CD4^+$ T-sejtek magasabb CTLA-4 expresszióját írták le az A allélt hordozó sclerosis multiplexben szenvedő betegekből a G allélt homozigóta formában hordozókkal összehasonlítva [82]. A CTLA-4 T-sejt mediált

immunválasz gátlásában betöltött meghatározó szerepe alapján feltételezhető, hogy a csökkent expressziója csökkent gátló kapacitásnak felelhet meg, bár ennek kísérletes körülmények között történő bizonyítására lehetőségeink egyelőre nem voltak elégségesek.

A $CD4^+$ és T_{reg} populáció esetében egyaránt megfigyelt alacsonyabb CD25 expresszió T1DM betegekben [262] az IL-2 mediálta jelátvitel zavarára utal, amelynek CTLA-4 is része és szabályozója is egyben. A CD25 expresszióban megfigyelt eltérések jelentősebbek, mintsem hogy kizárólag a vizsgált betegpopulációnkban 11%-os minor allélfrekvenciával megjelenő *CD25* rs61839660 génvariáns hatásával legyen magyarázható. Ezért az IL-2 mediálta jelátvitel zavara feltételezhetően még több tényezőre vezethető vissza. Az IL-2 mediálta jelátvitel zavarát támasztják alá T1DM-ben további adatok, így Todd és mtsai. megfigyelései is, akik T1DM betegek perifériás vérplazmájában magasabb szolubilis CD25 (sCD25) szinteket írtak le [197]. Ez a megfigyelés összhangban lehet az általunk közölt, előbbieken részletezett eredményekkel, amelyek szerint a rezerv ($CD4^+Foxp3^+CD25^{-/low}$) T_{reg} sejtpopuláció aránya magasabb T1DM-ben, ugyanis az IL-2 képes a saját receptorát up-regulálni, de a magasabb szolubilis CD25 szintek ezt a folyamatot gátolhatják. Habár a mi vizsgálatunkban nem történt sCD25 mérés a betegek plazmájában, Todd és mtsai. vizsgálatában pedig nem határozták meg a T_{reg} -ek sejtfelszíni CD25 expresszióját, a két vizsgálatot a fentiek értelmében lehet két egymást kiegészítő vizsgálatként értelmezni, amelyek egyöntetűen az IL-2 szignál változásaira utalnak. A rekombináns IL-2 aldesleukinnal végzett vizsgálatok [265–267] egyértelműen alátámasztják az IL-2 jelátviteli útvonal jelentőségét a kórkép kialakulásában, jelenlegi formájukban azonban inkább a patogenezis megértését segítik. Az IL-2 tengelyen ható kezelési lehetőségek terápiás felhasználása csak a biztonságosság igazolása után, valószínűleg kombinált kezelések részeként jöhet szóba a jövőben.

Ebben az összetett rendszerben jelenlegi ismereteink szerint további meghatározó, de nem kizárólagos szereppel bírhat a CXCR3 receptoron (CXCL9-11 kemokinek receptora) keresztül megvalósuló jelátvitel a T_{reg} sejtek orientálásában [159], ugyanakkor az ezt alátámasztó adatok jelentős része murin modellekből származik és tudomásunk szerint az aktív és rezerv T_{reg} alcsoportok kemotaktikus kapacitására

vonatkozóan nem álltak rendelkezésre adatok. Bár funkcionális vizsgálatok elvégzésére nem volt lehetőségünk, tudomásunk szerint elsőként írtuk le alcsoportokra bontva (CD25⁺ és CD25^{-low}) a T_{reg} sejtek CXCR3 expresszióját és méréssel is igazolni tudtuk a „rezerv” T_{reg} sejtek jelentősen magasabb CXCR3 expresszióját az „aktív” T_{reg} sejtekkel összehasonlítva [260]. A CD25^{-low} T_{reg} sejtek alacsonyabb CTLA-4 expressziója (így feltételezhetően alacsonyabb gátló kapacitása) és magasabb CXCR3 expressziója is ezen sejtek rezerv jellegére utalhat, ami azt jelenti, hogy ezek a sejtek egyfajta „készenléti” állapotban várakoznak orientáló és aktiváló stimulusokra. Az irodalmi áttekintésben részletezett jelátviteli utak ismeretében feltételezhető, hogy a CD25^{-low} T_{reg} sejtek aktivációja a CTLA-4 upregulációjához és a kemotaktikus „vevőkészség” visszafogásához vezethet, azonban ez csak további, in vitro vizsgálatokkal lenne igazolható. Ki kell emelnünk, hogy a vizsgált T_{reg} alcsoportok között megfigyelt különbség a CXCR3 expresszióban egyaránt megfigyelhető volt a T1DM és a kontroll személyek csoportjában, így ez a megfigyelésünk önmagában nem specifikus T1DM-re. Ugyanakkor a „rezerv” és „aktív” T_{reg} alpopulációkban észlelt arányeltolódást a T1DM-re jellemző eltérésként írtuk le [262]. A szabályozás komplexitását tovább árnyalja, hogy a CXCR3 ligandjai mind szubsztrátjai a DPP4-nek. Tekintettel arra, hogy a lymphocyták homingja alapvetően a citokinek gradiensétől függ, a szérumban megfigyelt magasabb DPP4 aktivitás, amely nem jár a lymphocytá-felszíni CD26 expresszió paralell emelkedésével, elméletileg eltérően befolyásolhatja a különböző válaszkészségű T_{reg} alcsoportok homingját.

5.2 Az immunregulációt befolyásoló genetikai tényezők kapcsolata az inkretinválasszal

Jelen ismereteink szerint a *CTLA4* rs3087243-G polimorfizmushoz 1,2-szeres kockázatnövekedés társul T1DM kialakulására, emellett a *CTLA4* ugyanezen egy pontos génvariánsát mint a T1DM és a coeliakia közös genetikai kockázati tényezőjét („shared locus”) is leírták [76, 268]. A *CTLA4* rs3087243-G allélja globálisan, európaiakban, illetve az általunk vizsgált populációban is major allélnak tekinthető, és ezzel összefüggésben tartjuk fontosnak, hogy az rs3087243-G/G homozigóta genotípus megjelenési gyakorisága is magas (saját vizsgálatunkban 43%), ezért az általunk

bemutatott prandiális GLP-1 válasz csökkenésére vonatkozó eredményeknek szélesebbkörű jelentősége is lehet [264]. A csökkent GLP-1 válasszal összefüggésben tudomásunk szerint eddig egyetlen alacsony frekvenciájú génvariáns homozigóta formáját tudták azonosítani, ami összességében tízezerből négy európai embert érinthez [269]. Ezen túlmenően tudomásunk szerint a gyakori génvariáns definíciójának megfelelő asszociációt csökkent inkretinválasszal a jelen munkát megelőzően eddig nem tudtak összefüggésbe hozni. Tekintettel arra, hogy a Foxp3⁺CD25⁺ T_{reg} sejtek CTLA-4 expresszióján kívül további funkcionális immunológiai vizsgálatot nem végeztünk, ami a *CTLA4* rs3087243-G allélt homozigóta formában hordozók alacsonyabb prandiális GLP-1 plazmaszintjeinek [264] hátterében álló folyamatot feltárhatná, így jelen munkában elsődlegesen az új asszociáció leírására szorítkozunk. Mindazonáltal a *CTLA4* géntermékének funkciójáról eddig felgyülemlett ismeretanyag alapján felvetődik egy olyan lehetőség is, hogy a fiziológiás autoimmunitás limitálásában alapvető jelentőségű *CTLA4* gén ezen variánsa hozzájárulhat egy esetleges, az L-sejtek funkciózavarához vezető folyamat kialakulásához is.

Emellett a T1DM egyik leggyakoribb és az intestinalis mucosát közvetlenül érintő autoimmun társbetegségként mindenképpen említést érdemel a coeliakia, amelynek kialakulására magasabb rizikót jelent az általunk vizsgált *CTLA4* rs3087243-G allél homozigóta formában történő hordozása [268]. Az, hogy a vizsgálatunkban nem találtunk közvetlen összefüggést a csökkent GLP-1 válasz és coeliakia között nem jelenti a végső szót a kérdés vizsgálatában, hiszen a coeliakiára pozitív mintaelemszámunk igen alacsony volt. Ezzel összefüggésben a bélmucosa barrier funkciójának és immunhomeosztázisának károsodására vonatkozóan több korábbi lényeges megfigyelés is rendelkezésre áll T1DM-ben [270–272], azonban ezek vizsgálata nem képezte vizsgálatunk, így a disszertáció tárgyát.

Blaslov és mtsai. alacsonyabb plazma totál GLP-1 szinteket mértek T1DM betegekben egészséges kontrollszemélyekhez képest, és a különbség még jelentősebb volt a metabolikus szindrómában is szenvedő T1DM betegek esetében [273]. Az utóbbi megfigyelés a jelenlegi eredmények (illetve a GLP-1 hepatikus hatásai [2]) alapján egy fordított logika/szekvencia szerint is létrejöhet: az arra hajlamos személyek (köztük a

CTLA4 rs3087243-G/G homozigóták, A allélt nem hordozók) alacsonyabb prandiális GLP-1 szintekkel rendelkezhetnek [260, 274].

A DPP4 gátlókkal [254–256] és GLP-1 mimetikumokkal [256–258] végzett vizsgálatokban kezdetben biztató előzetes eredmények születtek. A liraglutiddal végzett legutóbbi ADJUNCT ONE vizsgálat azonban nem hozott átütő eredményeket a T1DM betegekben, habár inzulininterápia mellett alkalmazva dózisfüggően kisfokban csökkentette a HbA1c értéket, a teljes napi inzulinszükségletet, valamint a testsúlyt a placebohoz képest [275]. A magasabb szimptomatikus hypoglycaemia arány a teljes T1DM populációban a kezelés klinikai alkalmazását korlátozta.

5.3 A DPP4-inkretin tengely változásai T1DM-ben, és ezek összefüggése hematológiai paraméterekkel

A jelen alfejezetben taglalt eltérések csak érintőlegesen képezik a doktori értekezés részét, a vizsgálat során mellékleletként lettünk figyelmesek néhány összefüggésre a DPP4-inkretin tengely változásai és egyes hematológiai paraméterek között.

A kontrollszemélyekben megfigyelt direkt összefüggés a lymphocytaszám és a hasított GLP1⁹⁻³⁶ között [260] egybevág a más munkacsoportok által leírt, a GLP-1⁹⁻³⁶-nak a CD4⁺ T-lymphocyták migrációját gátló hatásával [230], és azzal a megfigyeléssel is, hogy egyes DPP4 gátlók mellékhatásaként lymphopaeniát figyeltek meg [276, 277]. Jelen ismereteink szerint feltételezhető, hogy a GLP-1⁹⁻³⁶ a GLP-1 receptortól független jelátvitelen keresztül megvalósuló hatásokkal is rendelkezik (kettős receptor hipotézis) [278]. Említést érdemel emellett, hogy a lymphocyták kemotaxisát alapvetően befolyásoló CXCL-12 plazmaszintjét a DPP4 gátló kezelés befolyásolhatja [279], így a szérumban DPP4 aktivitás változása akár két szinergista úton is befolyásolhatja a lymphocytamobilizációt. A fenti negatív korreláció (GLP-1⁹⁻³⁶ vs. abszolút lymphocytaszám) további vizsgálat tárgyát képezheti. Amennyiben erre, illetve T1DM betegekben ennek hiányára vonatkozó megfigyelésünk megerősítést nyer, az immunreguláció zavarának új tényezőjére is utalhat.

6. Következtetések

Vizsgálatunk célja a DPP4-GLP-1 tengely és az autoimmun folyamat kapcsolatának pontosabb megértése volt 1-es típusú cukorbetegekben. Eredményeinkből a következő következtetéseket vontuk le:

- A T1DM betegekben megfigyelt szérumban DPP4 aktivitás-emelkedés stabil eltérés, amely az inkretin tengelyre gyakorolt hatásán túlmutató szereppel bírhat immunológiai folyamatok szabályozásában:
 - A T1DM betegek szérumban korábbi vizsgálataink során már kimutatott magasabb DPP4 aktivitás vizsgálataink során reprodukálhatónak bizonyult, emellett a statisztikailag szignifikáns összefüggését figyeltük meg a prandiális aktív GLP-1⁷⁻³⁶ plazmaszintekkel. Ez megerősíti azt a feltételezésünket, hogy a megfigyeléseink valós kórtani jelentőséggel bírnak, ugyanakkor a megelőző közleményekkel egybevágóan arra is következtethetünk, hogy a szérumban szolubilis DPP4 enzimaktivitásnak a GLP-1 inaktiválásában hozzávetőleg 15% szerepe lehet és a GLP-1 inaktiválása döntő többsége membránhoz kötött DPP4 aktivitás következménye.
 - A hasított („inaktív”) GLP-1⁹⁻³⁶ forma plazmaszintjének direkt összefüggése a lymphocytaszámmal kontrollszemélyekben (de nem T1DM betegekben) a kettős receptor hipotézis (GLP-1⁹⁻³⁶ GLP-1 receptortól független hatásait magyarázó elmélet) ismeretében utalhat a GLP-1⁹⁻³⁶ mediálta jelátvitel zavarára T1DM-ben.
- A T_{reg} (CD4⁺Foxp3⁺) sejtek arányában nem figyeltünk meg különbséget a T1DM betegek és kontrollszemélyek között. Ugyanakkor tudomásunk szerint elsőként vizsgáltuk a „rezerv” (CD4⁺Foxp3⁺CD25^{-/low}) T_{reg} sejtek markermintázatait T1DM-ben, és elsőként írtuk le magasabb arányukat a teljes T_{reg} populáción belül. Ezekből az új eredményekből arra következtetünk, hogy a T1DM immunreguláció zavarának része lehet a T_{reg} sejtek finomabb perifériás érési zavara.

- Továbbá a $\text{Foxp3}^+\text{CD25}^{-/\text{low}}$ T_{reg} sejtek két meghatározó jellemzőjét írtuk le, amelyek önmagukban nem specifikusak T1DM-re, az alcsoportok arányának változásán keresztül azonban mégis lehet jelentőségük a patogenezisben:
 - A $\text{CD25}^{-/\text{low}}$ T_{reg} sejteket az alacsonyabb CTLA-4 expressziójuk megkülönbözteti az aktív T_{reg} sejtektől, amely feltételezhetően összefügg a csökkent gátló kapacitással.
 - Tudomásunk szerint ugyancsak elsőként írtuk le, hogy a $\text{CD25}^{-/\text{low}}$ T_{reg} sejtek CXCR3 expressziója ugyanakkor jelentősen meghaladja a CD25^+ T_{reg} sejtekét, amely fokozott kemotaktikus válaszkésztséget valószínűsít. Az ismert jelátviteli utak ismeretében feltételezhető, hogy ezek a sejtek egyfajta készenléti állapotban várakoznak orientáló stimulusokra, ami a sejteknek az immunválasz helyére való odatalálását segítheti. Ezt követően amennyiben aktivációjukat támogató (elsősorban IL-2 alapú) citokinkörnyezetbe jutnak, kemotaktikus válaszkésztségük csökkenhet, CTLA-4 mediálta gátló kapacitásuk megnőhet.
- Eredményeink arra utalnak, hogy a *CTLA4* rs3087243-G polimorfizmus homozigóta formában történő hordozása az aktív (CD25^+) T_{reg} sejtek alacsonyabb CTLA-4 expressziójával, így feltehetően alacsonyabb szuppresszív kapacitásával jár, amely részben magyarázat lehet a GWAS vizsgálatok során észlelt T1DM kockázatnövekedésre, illetve tágabb értelemben szerepére több autoimmun betegségben. Ugyanakkor –bár ezt a kis mintaelemszám miatt kétséget kizáróan igazolni nem tudtuk- felmerül, hogy a *CTLA4* rs3087243-G polimorfizmus a betegség kialakulására vonatkozó 1,2-szeres rizikónövekedést meghaladó mértékben befolyásolhatja a klinikai manifesztáció időpontját és esetleg a kórlefolyás további klinikai jellemzőit.
- Tudomásunk szerint elsőként írunk le egy gyakori génvariáns összefüggését a csökkent GLP-1 válasszal, azáltal, hogy a *CTLA4* rs3087243-G/G genotípus és a csökkent 45 perces prandiális totál GLP-1 koncentrációk között szignifikáns és megfelelő statisztikai erővel jellemezhető asszociációt tudunk kimutatni a T1DM jelenlététől függetlenül. Tekintettel a *CTLA4* rs3087243 kockázati

genotípus prevalenciájára álláspontunk szerint ez a génvariáns kandidánsként jön szóba az inkretinválasz/terápia személyreszabását célzó jövőbeni vizsgálatokban. Tekintettel arra, hogy ez a génvariáns nem kódoló szakaszon helyezkedik el („near gene”), ezért mind a csökkent CTLA-4 expresszióhoz vezető pontos genetikai szabályozás megértése, mind a gén ismert funkciója következtében felvethető immunológiai hátterű L-sejt funkciózavar vizsgálata a jövő feladata.

- Tudomásunk szerint elsőként írjuk le a *DPP4* rs6741949 intronvariánsának *G/G* genotípusát a magasabb szérum *DPP4* enzimaktivitással összefüggésben. Ugyanakkor az aktivitástöbblet hátterét és esetleges kórtani jelentőségét tovább vizsgálni egyelőre nem volt lehetőségünk, így nem tudjuk, hogy az enzim aktivitása, vagy mennyisége által változik a szérumban mérhető aktivitás, illetve, hogy az egyes szövetekre jellemző *DPP4* aktivitás, valamint az asszociáció létrejöttének pontos genetikai mechanizmusa hogyan alakul.

7. Összefoglalás

Eset-kontroll vizsgálatunk során az immunreguláció változásait és azok összefüggéseit tanulmányoztuk a DPP4-inkretin tengellyel 1-es típusú diabetes mellitusban (T1DM). Áramlási citometriával meghatároztuk a regulátoros T-sejtek ($CD4^+Foxp3^+$ T-lymphocyták, T_{reg}) és szubpopulációik arányát, valamint a funkciójukat és homingjukat meghatározó CD25, CTLA-4 és CXCR3 markereik expresszióját. ELISA módszerrel meghatároztuk a plazma posztprandiális (45 perccel standard étkezés után) teljes és aktív (7-36) valamint számítással a hasított (9-36) GLP-1 koncentrációját, enzimkinetikus assay által a szérum éhomi DPP4 aktivitását. Meghatároztuk a vizsgált alanyok genotípusát négy, irodalmi adatok alapján kiválasztott génvariánsra nézve (SNP-k: *DPP4* rs6741949, *CTLA4* rs3087243, *CD25* rs61839660, *PTPN2* rs2476601).

Korábbi eredményeinket megerősítve magasabb szérum DPP4 aktivitást találtunk T1DM betegekben, amelynek értéke a T1DM csoportban fordított összefüggést mutatott a plazma aktív GLP-1⁷⁻³⁶ koncentrációjával. A szérum DPP4 aktivitás magasabbnak bizonyult *DPP4* rs6741949-G/G homozigótákban. A plazma hasított GLP-1⁹⁻³⁶ koncentrációja direkt összefüggést mutatott a lymphocytaszámmal kontrollszemélyekben, míg T1DM betegekben nem. A teljes T_{reg} populáció arányában nem észleltünk eltérést, azonban ezen belül magasabb volt a $CD25^{-/low}$ („rezerv”) T_{reg} sejtek aránya. Ezen sejtek az aktív ($CD25^+$) T_{reg} sejtekkel összehasonlítva magasabb CXCR3, és alacsonyabb CTLA-4 expressziót mutattak. A $CD25^+$ T_{reg} sejtek CTLA-4 expressziója és a plazma posztprandiális totál GLP-1 koncentrációja is magasabbnak bizonyult a legalább egy *CTLA4* rs3087243-A allélt hordozókban a G allélt homozigóta formában hordozókkal összehasonlítva mindkét vizsgálati csoportban.

A T1DM-ben bekövetkező immunregulációs zavar része lehet a T_{reg} sejtek perifériás aktivációjának, érésének zavara a $CD4^+Foxp3^+CD25^+/CD4^+Foxp3^+CD25^{-/low}$ arányeltolódás alapján. Eredményeink a DPP4-inkretin rendszer eltéréseinek kórélettani jelentőségére utalhatnak T1DM-ben. Elsőként írtuk le egy gyakori genetikai variáns (*CTLA4* rs3087243 G/G genotípus) összefüggését csökkent prandiális GLP-1 plazmakoncentrációkkal T1DM fennállásától függetlenül. Az összefüggés hátterében felmerülhet az L-sejtek immunológiai eredetű károsodásának lehetősége. Gyakoriságából adódóan a *CTLA4* rs3087243 kandidáns genetikai variánsként felmerülhet a jövőben az inkretinválasz, illetve inkretin-alapú terápia vizsgálatában.

8. Summary

The aim of our case-control study was to investigate the alterations of immune regulation in type 1 diabetes (T1DM) and their relations with the DPP4-incretine axis. We assessed the proportion of regulatory T-cells (T_{reg} , $CD4^+Foxp3^+$ T-lymphocytes) and their subpopulations as well as the expression of certain markers (CD25, CTLA-4, CXCR3) related to their function and homing by flow cytometry. Total and active (7-36) GLP-1 concentrations were measured from prandial plasma samples taken 45 minutes after a standardized meal. Concentrations of cleaved (9-36) GLP-1 were calculated. Fasting serum DPP4 activity was determined in a continuous monitoring assay. The genotypes of the participants were assessed for four selected polymorphisms (SNPs: *DPP4* rs6741949, *CTLA4* rs3087243, *CD25* rs61839660, *PTPN2* rs2476601).

We confirmed our previous results regarding the higher serum DPP4 enzymatic activity and found its values to be inversely correlated with the plasma concentrations of active GLP-1⁷⁻³⁶ in the T1DM study group. Furthermore the serum DPP4 activity was higher in the *DPP4* rs6741949-G/G homozygous individuals. The plasma concentrations of cleaved GLP-1⁹⁻³⁶ was directly correlated with lymphocyte count in controls, but not in T1DM individuals. The proportions of the total T_{reg} population was similar in the two study groups, however, the proportion of $CD25^{-/low}$ („reserve”) T_{reg} s was higher in T1DM subjects. These cells showed higher CXCR3 and lower CTLA-4 expression when compared to active ($CD25^+$) T_{reg} cells. The CTLA-4 expression of $CD25^+$ T_{reg} cells and surprisingly the plasma concentrations of total GLP-1 were also higher in individuals carrying at least one *CTLA4* rs3087243-A allele compared to those homozygous for the G allele.

According to the altered proportion of $CD4^+Foxp3^+CD25^+$ and $CD4^+Foxp3^+CD25^{-/low}$ T_{reg} s an impaired peripheral maturation and activation of T_{reg} cells might be part of the immune dysregulation in T1DM. Our results suggest the pathophysiologic significance of the DPP4-incretin axis in T1DM. We first report the association between a common gene variant (*CTLA4* rs3087243 G/G genotype) and reduced total prandial plasma GLP-1 concentrations independent of T1DM in our cohort. One may speculate that an immune response-related L-cell damage might explain this novel association. Based on its prevalence in the population the *CTLA4* rs3087243 might potentially be considered as a candidate gene variant for future trials tailoring the incretin response/therapy.

9. Irodalomjegyzék

1. WHO | *Global report on diabetes*. In: WHO. <http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>. Accessed 7 Jun 2016
2. Firneisz G. (2014) Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus: The liver disease of our age? *World J Gastroenterol WJG*, 20: 9072–9089.
3. Supale S, Li N, Brun T, Maechler P. (2012) Mitochondrial dysfunction in pancreatic β cells. *Trends Endocrinol Metab*, 23: 477–487.
4. Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S. (2010) Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia*, 53: 2504–2508.
5. Mazzaccara C, Iafusco D, Liguori R, Ferrigno M, Galderisi A, Vitale D, Simonelli F, Landolfo P, Prisco F, Masullo M, Sacchetti L. (2012) Mitochondrial Diabetes in Children: Seek and You Will Find It. *PLoS ONE*, 7: e34956.
6. (2015) Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 38: S1–S94.
7. (2013) Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy. World Health Organization, Geneva
8. Association AD. (2017) 13. Management of Diabetes in Pregnancy. *Diabetes Care*, 40: S114–S119.
9. American Diabetes Association. (2014) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37: S81–S90.
10. (2010) International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care*, 33: 676–682.
11. Jermendy G, Gaál Z, Hidvégi T, Kempler P, Winkler G, Wittmann I. (2017) Egészségügyi szakmai irányelv – A diabetes mellitus kórismézéséről, a

cukorbetegék antihyperglykaemiás kezeléséről és gondozásáról felnőttkorban. *Diabetologia Hungarica*, 25: 3–77.

12. Al-Aissa Z, Rosta K, Hadarits O, Harreiter J, Zóka A, Bancher-Todesca D, Patócs A, Kiss K, Sárman B, Pusztai P, Sziller I, Rigó J, Rác K, Somogyi A, Kautzky-Willer A, Firneisz G. (2015) Cord Serum Dipeptidyl-Peptidase 4 Activity in Gestational Diabetes. *Eur J Clin Invest*. doi: 10.1111/eci.12397
13. Campbell-Thompson M, Fu A, Kaddis JS, Wasserfall C, Schatz DA, Pugliese A, Atkinson MA. (2016) Insulinitis and β -Cell Mass in the Natural History of Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 65: 719–731.
14. Blandino-Rosano M, Perez-Arana G, Mellado-Gil JM, Segundo C, Aguilar-Diosdado M. (2008) Anti-proliferative effect of pro-inflammatory cytokines in cultured beta cells is associated with extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibition: protective role of glucagon-like peptide -1. *J Mol Endocrinol*, 41: 35–44.
15. Hamilton-Williams EE, Palmer SE, Charlton B, Slattery RM. (2003) Beta cell MHC class I is a late requirement for diabetes. *Proc Natl Acad Sci*, 100: 6688–6693.
16. Taborsky GJ Jr, Ahrén B, Havel PJ. (1998) Autonomic mediation of glucagon secretion during hypoglycemia: implications for impaired alpha-cell responses in type 1 diabetes. *Diabetes*, 47: 995–1005.
17. WHO | *Global report on diabetes*. In: WHO. <http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>. Accessed 16 May 2016
18. Diabetes Atlas. In: Int. Diabetes Fed. <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Accessed 2 Dec 2014
19. Fortunato F, Cappelli MG, Vece MM, Caputi G, Delvecchio M, Prato R, Martinelli D, Workgroup AC-ODR, Fortunato F, Cappelli MG, Vece MM, Caputi G, Delvecchio M, Prato R, Martinelli D, Workgroup AC-ODR. (2016) Incidence of Type 1 Diabetes among Children and Adolescents in Italy between

- 2009 and 2013: The Role of a Regional Childhood Diabetes Registry, Incidence of Type 1 Diabetes among Children and Adolescents in Italy between 2009 and 2013: The Role of a Regional Childhood Diabetes Registry. *J Diabetes Res J Diabetes Res*, 2016, 2016: e7239692.
20. Li L, Jick S, Breitenstein S, Michel A. (2015) Prevalence of Diabetes and Diabetic Nephropathy in a Large U.S. Commercially Insured Pediatric Population, 2002–2013. *Diabetes Care*, dc151710.
 21. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G. (2009) Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study. *The Lancet*, 373: 2027–2033.
 22. Gyurus EK, Patterson C, Soltesz G. (2012) Twenty-one years of prospective incidence of childhood type 1 diabetes in Hungary--the rising trend continues (or peaks and highlands?). *Pediatr Diabetes*, 13: 21–25.
 23. Steck AK, Armstrong TK, Babu SR, Eisenbarth GS. (2011) Stepwise or linear decrease in penetrance of type 1 diabetes with lower-risk HLA genotypes over the past 40 years. *Diabetes*, 60: 1045–1049.
 24. Dabelea D, Pihoker C, Talton JW, D'Agostino RB, Fujimoto W, Klingensmith GJ, Lawrence JM, Linder B, Marcovina SM, Mayer-Davis EJ, Imperatore G, Dolan LM; SEARCH for Diabetes in Youth Study. (2011) Etiological approach to characterization of diabetes type: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Diabetes Care*, 34: 1628-33.
 25. Adams SF. (1926) The seasonal variation in the onset of acute diabetes: the age and sex factors in 1,000 diabetic patients. 37: 861–864.
 26. Gamble DR, Kinsley ML, FitzGerald MG, Bolton R, Taylor KW. (1969) Viral Antibodies in Diabetes Mellitus. *Br Med J*, 3: 627–630.
 27. Clements GB, Galbraith DN, Taylor KW. (1995) Cocksackie B virus infection and onset of childhood diabetes. *Lancet*, 346: 221–223.

28. Moltchanova EV, Schreier N, Lammi N, Karvonen M. (2009) Seasonal variation of diagnosis of Type 1 diabetes mellitus in children worldwide. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*, 26: 673–678.
29. Gyürüs É, Soltész G. (2004) Az 1-es típusú diabetes mellitus incidenciája Európában, az EURODIAB adatai alapján. *Lege Artis Med*, 14: 399–404.
30. Kahaly GJ, Hansen MP. (2016) Type 1 diabetes associated autoimmunity. *Autoimmun Rev*. doi: 10.1016/j.autrev.2016.02.017
31. Nielsen NM, Westergaard T, Frisch M, Rostgaard K, Wohlfart J, Koch-Henriksen N, Melbye M, Hjalgrim H. (2006) Type 1 diabetes and multiple sclerosis: A danish population-based cohort study. *Arch Neurol*, 63: 1001–1004.
32. Tettey P, Simpson S, Taylor BV, van der Mei IAF. (2015) The co-occurrence of multiple sclerosis and type 1 diabetes: shared aetiologic features and clinical implication for MS aetiology. *J Neurol Sci*, 348: 126–131.
33. Van den Driessche A, Eenkhoorn V, Van Gaal L, De Block C. (2009) Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review. *Neth J Med*, 67: 376–387.
34. Kota SK, Meher LK, Jammula S, Kota SK, Modi KD. (2012) Clinical profile of coexisting conditions in type 1 diabetes mellitus patients. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*, 6: 70–76.
35. Hage M, Zantout MS, Azar ST. (2011) Thyroid Disorders and Diabetes Mellitus. *J Thyroid Res*. doi: 10.4061/2011/439463
36. Ludvigsson JF, Ludvigsson J, Ekbom A, Montgomery SM. (2006) Celiac Disease and Risk of Subsequent Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*, 29: 2483–2488.
37. De Block CEM, De Leeuw IH, Van Gaal LF. (2008) Autoimmune Gastritis in Type 1 Diabetes: A Clinically Oriented Review. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 363–371.

38. Krüger C, Schallreuter KU. (2012) A review of the worldwide prevalence of vitiligo in children/adolescents and adults. *Int J Dermatol*, 51: 1206–1212.
39. McAulay V, Frier BM. (2000) Addison's disease in type 1 diabetes presenting with recurrent hypoglycaemia. *Postgrad Med J*, 76: 230–232.
40. Hermann G, Thon A, Mönkemöller K, Lilienthal E, Klinkert C, Holder M, Hörtenhuber T, Vogel-Gerlicher P, Haberland H, Schebek M, Holl RW, Diabetes Patienten Verlaufsdokumentation-initiative, Federal Ministry of Education and Research Competence Network Diabetes Mellitus. (2015) Comorbidity of type 1 diabetes and juvenile idiopathic arthritis. *J Pediatr*, 166: 930-935.e1–3.
41. Opie EL. (1901) On the relation of chronic interstitial pancreatitis to the islands of Langerhans and to diabetes mellitus. *J Exp Med*, 5: 397–428.
42. Tattersall RB. History of Diabetes Mellitus. In: Holt RIG, Cockram C, Flyvbjerg A, Goldstein BJ (szerk.), *Textbook of Diabetes*. John Wiley & Sons, Chichester, 2010: 3-23.
43. Hayles AB, Kennedy RLJ, Beahrs OH, Woolner LB. (1959) Exophthalmic goiter in children. *J Clin Endocrinol Metab*, 19: 138–151.
44. Ungar B, Stocks AE, Martin FI, Whittingham S, Mackay IR. (1968) Intrinsic-factor antibody, parietal-cell antibody, and latent pernicious anaemia in diabetes mellitus. *Lancet*, 2: 415–417.
45. Lecpmppte PM. (1958) Insulitis in early juvenile diabetes. *AMA Arch Pathol*, 66: 450–457.
46. Type 1 diabetes mellitus - Diapedia, The Living Textbook of Diabetes. <http://www.diapedia.org/type-1-diabetes-mellitus>. Accessed 3 Jun 2015
47. Eisenbarth GS. (1986) Type I Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*, 314: 1360–1368.
48. Yu L, Dong F, Miao D, Fouts AR, Wenzlau JM, Steck AK. (2013) Proinsulin/Insulin autoantibodies measured with electrochemiluminescent assay

- are the earliest indicator of prediabetic islet autoimmunity. *Diabetes Care*, 36: 2266–2270.
49. Delong T, Wiles TA, Baker RL, Bradley B, Barbour G, Reisdorph R, Armstrong M, Powell RL, Reisdorph N, Kumar N, Elso CM, DeNicola M, Bottino R, Powers AC, Harlan DM, Kent SC, Mannering SI, Haskins K. (2016) Pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes recognize epitopes formed by peptide fusion. *Science*, 351: 711–714.
 50. McGinty JW, Chow I-T, Greenbaum C, Odegard J, Kwok WW, James EA. (2014) Recognition of Posttranslationally Modified GAD65 Epitopes in Subjects With Type 1. *Diabetes*, 63: 3033–3040.
 51. Belle TLV, Coppieters KT, Herrath MG. (2011) Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiol Rev*, 91: 79–118.
 52. Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark Å. (2005) Autoantibodies in. *Diabetes*, 54: S52–S61.
 53. Hu C, Rodriguez-Pinto D, Du W, Ahuja A, Henegariu O, Wong FS, Shlomchik MJ, Wen L. (2007) Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *J Clin Invest*, 117: 3857–3867.
 54. Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H, Becker DJ, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA, Marks JB, McGee PF, Moran AM, Raskin P, Rodriguez H, Schatz DA, Wherrett D, Wilson DM, Lachin JM, Skyler JS. (2009) Rituximab, B-Lymphocyte Depletion, and Preservation of Beta-Cell Function. *N Engl J Med*, 361: 2143–2152.
 55. André I, Gonzalez A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D. (1996) Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 2260–2263.
 56. Williams AJK, Thrower SL, Sequeiros IM, Ward A, Bickerton AS, Triay JM, Callaway MP, Dayan CM. (2012) Pancreatic volume is reduced in adult patients

- with recently diagnosed type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 97: E2109-2113.
57. Rodriguez-Calvo T, Ekwall O, Amirian N, Zapardiel-Gonzalo J, von Herrath MG. (2014) Increased immune cell infiltration of the exocrine pancreas: a possible contribution to the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes*, 63: 3880–3890.
 58. Bottazzo AF-C. (1974) Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, 2: 1279–83.
 59. Achenbach P, Hummel M, Thümer L, Boerschmann H, Höfelmann D, Ziegler AG. (2013) Characteristics of rapid vs slow progression to type 1 diabetes in multiple islet autoantibody-positive children. *Diabetologia*, 56: 1615–1622.
 60. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW. (2004) Autoreactive T cells in healthy individuals. *J Immunol Baltim Md 1950*, 172: 5967–5972.
 61. Jerne NK. (1974) Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol*, 125C: 373–389.
 62. Oak S, Gilliam LK, Landin-Olsson M, Törn C, Kockum I, Pennington CR, Rowley MJ, Christie MR, Banga JP, Hampe CS. (2008) The lack of anti-idiotypic antibodies, not the presence of the corresponding autoantibodies to glutamate decarboxylase, defines type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 5471–5476.
 63. Mallone R, Brezar V, Boitard C. (2011) T Cell Recognition of Autoantigens in Human Type 1 Diabetes: Clinical Perspectives. *J Immunol Res*, 2011: e513210.
 64. Gottlieb PA, DeLong T, Baker RL, Fitzgerald-Miller L, Wagner R, Cook G, Rewers MR, Michels A, Haskins K. (2014) Chromogranin A is a T Cell Antigen in Human Type 1 Diabetes. *J Autoimmun*, 50: 38–41.
 65. Morran MP, Vonberg A, Khadra A, Pietropaolo M. Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus. *Mol Aspects Med*. doi: 10.1016/j.mam.2014.12.004

66. Nielsen DS, Krych Ł, Buschard K, Hansen CHF, Hansen AK. (2014) Beyond genetics. Influence of dietary factors and gut microbiota on type 1 diabetes. *FEBS Lett*, 588: 4234–4243.
67. Ziegler A-G, Nepom GT. (2010) Prediction and Pathogenesis in Type 1 Diabetes. *Immunity*, 32: 468–478.
68. Orešič M, Simell S, Sysi-Aho M, Näntö-Salonen K, Seppänen-Laakso T, Parikka V, Katajamaa M, Hekkala A, Mattila I, Keskinen P, Yetukuri L, Reinikainen A, Lähde J, Suortti T, Hakalax J, Simell T, Hyöty H, Veijola R, Ilonen J, Lahesmaa R, Knip M, Simell O. (2008) Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. *J Exp Med*, 205: 2975–2984.
69. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszeko JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JHM, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AAC, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung H-T, Wallace C, Howson JMM, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SCL, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG. (2007) Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*, 39: 857–864.
70. Gillespie KM. (2006) Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can*, 175: 165–170.
71. Howson JMM, Walker NM, Clayton D, Todd JA. (2009) Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A. *Diabetes Obes Metab*, 11 Suppl 1: 31–45.
72. J Nerup PP. (1974) HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet*, 2: 864–6.
73. Zhao LP, Alshiekh S, Zhao M, Carlsson A, Larsson HE, Forsander G, Ivarsson SA, Ludvigsson J, Kockum I, Marcus C, Persson M, Samuelsson U, Örtqvist E,

- Pyo C-W, Nelson WC, Geraghty DE, Lernmark Å, Better Diabetes Diagnosis (BDD) Study Group. (2016) Next-Generation Sequencing Reveals That HLA-DRB3, -DRB4, and -DRB5 May Be Associated With Islet Autoantibodies and Risk for Childhood Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 65: 710–718.
74. Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nierras CR, Todd JA, Rich SS, Nerup J. (2010) Genetics of type 1 diabetes: what's next? *Diabetes*, 59: 1561–1571.
75. GWAS Catalog. <http://www.ebi.ac.uk/gwas/>. Accessed 8 Mar 2016
76. Plagnol V, Howson JMM, Smyth DJ, Walker N, Hafler JP, Wallace C, Stevens H, Jackson L, Simmonds MJ, Bingley PJ, Gough SC, Todd JA. (2011) Genome-Wide Association Analysis of Autoantibody Positivity in Type 1 Diabetes Cases. *PLoS Genet*, 7: e1002216.
77. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Plagnol V, Pociot F, Schuilenburg H, Smyth DJ, Stevens H, Todd JA, Walker NM, Rich SS. (2009) Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet*, 41: 703–707.
78. Hakonarson H, Grant SFA, Bradfield JP, Marchand L, Kim CE, Glessner JT, Grabs R, Casalunovo T, Taback SP, Frackelton EC, Lawson ML, Robinson LJ, Skraban R, Lu Y, Chiavacci RM, Stanley CA, Kirsch SE, Rappaport EF, Orange JS, Monos DS, Devoto M, Qu H-Q, Polychronakos C. (2007) A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature*, 448: 591–594.
79. Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, Walker NM, Smyth DJ, Bailey R, Bourget K, Plagnol V, Field S, Atkinson M, Clayton DG, Wicker LS, Todd JA. (2007) Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet*, 39: 1074–1082.

80. Dendrou CA, Plagnol V, Fung E, Yang JHM, Downes K, Cooper JD, Nutland S, Coleman G, Himsworth M, Hardy M, Burren O, Healy B, Walker NM, Koch K, Ouwehand WH, Bradley JR, Wareham NJ, Todd JA, Wicker LS. (2009) Cell-specific protein phenotypes for the autoimmune locus IL2RA using a genotype-selectable human bioresource. *Nat Genet*, 41: 1011–1015.
81. Atabani SF, Thio CL, Divanovic S, Trompette A, Belkaid Y, Thomas DL, Karp CL. (2005) Association of CTLA4 polymorphism with regulatory T cell frequency. *Eur J Immunol*, 35: 2157–2162.
82. Karabon L, Kosmaczewska A, Bilinska M, Pawlak E, Ciszak L, Jedynak A, Jonkisz A, Noga L, Pokryszko-Dragan A, Koszewicz M, Frydecka I. (2009) The CTLA-4 gene polymorphisms are associated with CTLA-4 protein expression levels in multiple sclerosis patients and with susceptibility to disease. *Immunology*, 128: e787–e796.
83. Long SA, Cerosaletti K, Bollyky PL, Tatum M, Shilling H, Zhang S, Zhang Z-Y, Pihoker C, Sanda S, Greenbaum C, Buckner JH. (2010) Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes*, 59: 407–415.
84. Aghili N, Devaney JM, Alderman LO, Zukowska Z, Epstein SE, Burnett MS. (2012) Polymorphisms in dipeptidyl peptidase IV gene are associated with the risk of myocardial infarction in patients with atherosclerosis. *Neuropeptides*, 46: 367–371.
85. Sayad A, Movafagh A. (2014) The Association of IL2330 Interleukin-2 Gene Polymorphism with Its Plasma Concentration in Iranian Multiple Sclerosis Patients. *Scientifica*, 2014: e724653.
86. Yamanouchi J, Rainbow D, Serra P, Howlett S, Hunter K, Garner VES, Gonzalez-Munoz A, Clark J, Vejjola R, Cubbon R, Chen S-L, Rosa R, Cumiskey AM, Serreze DV, Gregory S, Rogers J, Lyons PA, Healy B, Smink LJ, Todd JA, Peterson LB, Wicker LS, Santamaria P. (2007) Interleukin-2 gene variation

- impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nat Genet*, 39: 329–337.
87. Raedler D, Illi S, Pinto LA, von Mutius E, Illig T, Kabesch M, Schaub B. (2013) IL10 polymorphisms influence neonatal immune responses, atopic dermatitis, and wheeze at age 3 years. *J Allergy Clin Immunol*, 131: 789–796.
 88. del Rio R, Noubade R, Subramanian M, Saligrama N, Diehl S, Rincon M, Teuscher C. (2008) SNPs upstream of the minimal promoter control IL-2 expression and are candidates for the autoimmune disease-susceptibility locus *Aod2/Idd3/Eae3*. *Genes Immun*, 9: 115–121.
 89. Li Y, Meng F-D, Tian X, Sui C-G, Liu Y-P, Jiang Y-H. (2014) Impact of IL-2 and IL-2R SNPs on proliferation and tumor-killing activity of lymphokine-activated killer cells from healthy Chinese blood donors. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*, 15: 7965–7970.
 90. Park SJ, Yoon YC, Kang SW, Kim TH, Kim YW, Joo H, Kim HJ, Jeong KH, Lee DY, Lee SS, Chung JH, Kim YH. (2011) Impact of IL2 and IL2RB genetic polymorphisms in kidney transplantation. *Transplant Proc*, 43: 2383–2387.
 91. Ganesh SK, Zakai NA, van Rooij FJA, Soranzo N, Smith AV, Nalls MA, Chen M-H, Kottgen A, Glazer NL, Dehghan A, Kuhnel B, Aspelund T, Yang Q, Tanaka T, Jaffe A, Bis JCM, Verwoert GC, Teumer A, Fox CS, Guralnik JM, Ehret GB, Rice K, Felix JF, Rendon A, Eiriksdottir G, Levy D, Patel KV, Boerwinkle E, Rotter JI, Hofman A, Sambrook JG, Hernandez D, Zheng G, Bandinelli S, Singleton AB, Coresh J, Lumley T, Uitterlinden AG, vanGils JM, Launer LJ, Cupples LA, Oostra BA, Zwagenga J-J, Ouwehand WH, Thein S-L, Meisinger C, Deloukas P, Nauck M, Spector T, Gieger C, Gudnason V, van Duijn CM, Psaty BM, Ferrucci L, Chakravarti A, Greinacher A, O'Donnell CJ, Witteman JCM, Furth S, Cushman M, Harris TB, Lin J-P. (2009) Multiple loci influence erythrocyte phenotypes in the CHARGE Consortium. *Nat Genet*, 41: 1191–1198.

92. Minton K. (2013) Regulatory T cells: The role of PTPN22 in T cell homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 13: 6–6.
93. Nowakowska DJ, Kissler S. (2016) Ptpn22 Modifies Regulatory T Cell Homeostasis via GITR Upregulation. *J Immunol Baltim Md 1950*, 196: 2145–2152.
94. Shigemoto T, Kageyama M, Hirai R, Zheng J, Yoneyama M, Fujita T. (2009) Identification of loss of function mutations in human genes encoding RIG-I and MDA5: implications for resistance to type I diabetes. *J Biol Chem*, 284: 13348–13354.
95. Looney BM, Xia C-Q, Concannon P, Ostrov DA, Clare-Salzler MJ. (2015) Effects of Type 1 Diabetes-Associated IFIH1 Polymorphisms on MDA5 Function and Expression. *Curr Diab Rep*, 15: 96.
96. Luning Prak ET, Monestier M, Eisenberg RA. (2011) B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*, 1217: 96–121.
97. McGargill MA, Derbinski JM, Hogquist KA. (2000) Receptor editing in developing T cells. *Nat Immunol*, 1: 336–341.
98. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. (2005) Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*, 435: 590–597.
99. Boettler T, von Herrath M. (2011) Protection against or triggering of Type 1 diabetes? Different roles for viral infections. *Expert Rev Clin Immunol*, 7: 45–53.
100. Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG, Wickramasinghe S, Colle E, Polychronakos C. (1997) Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet*, 15: 289–292.
101. Culina S, Brezar V, Mallone R. (2013) Insulin and type 1 diabetes: immune connections. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc*, 168: R19-31.

102. Fan Y, Rudert WA, Grupillo M, He J, Sisino G, Trucco M. (2009) Thymus-specific deletion of insulin induces autoimmune diabetes. *EMBO J*, 28: 2812–2824.
103. Kis J, Engelmann P, Heyam J, Orbán T. (2006) Az immunológiai prevenció lehetősége 1-es típusú diabetes mellitusban. 2006, 16: 771–773.
104. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. (2009) Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*, 30: 626–635.
105. Huang J, Ellinghaus D, Franke A, Howie B, Li Y. (2012) 1000 Genomes-based imputation identifies novel and refined associations for the Wellcome Trust Case Control Consortium phase 1 Data. *Eur J Hum Genet EJHG*, 20: 801–805.
106. Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM, Plagnol V, Walker NM, Allen JE, Downes K, Barrett JC, Healy BC, Mychaleckyj JC, Warram JH, Todd JA. (2008) Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat Genet*, 40: 1399–1401.
107. Nolting J, Daniel C, Reuter S, Stuelten C, Li P, Sucov H, Kim B-G, Letterio JJ, Kretschmer K, Kim H-J, von Boehmer H. (2009) Retinoic acid can enhance conversion of naive into regulatory T cells independently of secreted cytokines. *J Exp Med*, 206: 2131–2139.
108. Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. (2007) All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med*, 204: 1765–1774.
109. Manicassamy S, Pulendran B. (2011) Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunol Rev*, 241: 206–227.
110. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. (2008) CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science*, 322: 271–275.

111. Khattri R, Auger JA, Griffin MD, Sharpe AH, Bluestone JA. (1999) Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses. *J Immunol Baltim Md 1950*, 162: 5784–5791.
112. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. (2012) Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*, 30: 531–564.
113. Araki M, Chung D, Liu S, Rainbow DB, Chamberlain G, Garner V, Hunter KMD, Vijayakrishnan L, Peterson LB, Oukka M, Sharpe AH, Sobel R, Kuchroo VK, Wicker LS. (2009) Genetic evidence that the differential expression of the ligand-independent isoform of CTLA-4 is the molecular basis of the Idd5.1 type 1 diabetes region in nonobese diabetic mice. *J Immunol Baltim Md 1950*, 183: 5146–5157.
114. Orban T, Bundy B, Becker DJ, DiMeglio LA, Gitelman SE, Goland R, Gottlieb PA, Greenbaum CJ, Marks JB, Monzavi R, Moran A, Raskin P, Rodriguez H, Russell WE, Schatz D, Wherrett D, Wilson DM, Krischer JP, Skyler JS, Type 1 Diabetes TrialNet Abatacept Study Group. (2011) Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 378: 412–419.
115. Hwang KW, Sweatt WB, Mashayekhi M, Palucki DA, Sattar H, Chuang E, Alegre M-L. (2004) Transgenic expression of CTLA-4 controls lymphoproliferation in IL-2-deficient mice. *J Immunol Baltim Md 1950*, 173: 5415–5424.
116. Dresser DW. (1962) Specific Inhibition of Antibody Production. *Immunology*, 5: 378–388.
117. Bretscher P, Cohn M. (1970) A theory of self-nonsel self discrimination. *Science*, 169: 1042–1049.

118. Rosenstreich DL, Mizel SB. (1979) Signal requirements for T lymphocyte activation. I. Replacement of macrophage function with phorbol myristic acetate. *J Immunol Baltim Md 1950*, 123: 1749–1754.
119. Quill H, Schwartz RH. (1987) Stimulation of normal inducer T cell clones with antigen presented by purified Ia molecules in planar lipid membranes: specific induction of a long-lived state of proliferative nonresponsiveness. *J Immunol Baltim Md 1950*, 138: 3704–3712.
120. Janeway CA. (1989) Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54: 1–13.
121. Rock KL, Hearn A, Chen C-J, Shi Y. (2005) Natural endogenous adjuvants. *Springer Semin Immunopathol*, 26: 231–246.
122. Matzinger P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, 12: 991–1045.
123. Shi Y. (2010) Caught red-handed: uric acid is an agent of inflammation. *J Clin Invest*, 120: 1809–1811.
124. Kuppner MC, Gastpar R, Gelwer S, Nössner E, Ochmann O, Scharner A, Issels RD. (2001) The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur J Immunol*, 31: 1602–1609.
125. Flohé SB, Brüggemann J, Lendemans S, Nikulina M, Meierhoff G, Flohé S, Kolb H. (2003) Human heat shock protein 60 induces maturation of dendritic cells versus a Th1-promoting phenotype. *J Immunol Baltim Md 1950*, 170: 2340–2348.
126. Land WG. (2012) Role of Heat Shock Protein 70 in Innate Alloimmunity. *Front Immunol*. doi: 10.3389/fimmu.2011.00089

127. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. (2007) Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol*, 81: 15–27.
128. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*, 6: 435–442.
129. Kol A, Lichtman AH, Finberg RW, Libby P, Kurt-Jones EA. (2000) Cutting Edge: Heat Shock Protein (HSP) 60 Activates the Innate Immune Response: CD14 Is an Essential Receptor for HSP60 Activation of Mononuclear Cells. *J Immunol*, 164: 13–17.
130. Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H. (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol Baltim Md 1950*, 164: 558–561.
131. Bausinger H, Lipsker D, Ziylan U, Manié S, Briand J-P, Cazenave J-P, Muller S, Haeuw J-F, Ravanat C, Salle H de la, Hanau D. (2002) Endotoxin-free heat-shock protein 70 fails to induce APC activation. *Eur J Immunol*, 32: 3708–3713.
132. Gao B, Tsan M-F. (2003) Recombinant human heat shock protein 60 does not induce the release of tumor necrosis factor alpha from murine macrophages. *J Biol Chem*, 278: 22523–22529.
133. Lieberman SM, DiLorenzo TP. (2003) A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *Tissue Antigens*, 62: 359–377.
134. Uusilato U, William H, Jimin Y, Marian R, Jill N, Xiang L, Carin Andren A, Anette Z, Jin-Xiang S, Jeffrey K, Sandra H, Olli S, Suvi V. (2014) Probiotic use in infancy and islet autoimmunity in the environmental determinants of diabetes in the young (TEDDY) study. *Diabetologia*, 57: S78.

135. Emani R, Alam C, Pekkala S, Zafar S, Emani MR, Hänninen A. (2015) Peritoneal Cavity is a Route for Gut-Derived Microbial Signals to Promote Autoimmunity in Non-Obese Diabetic Mice. *Scand J Immunol*, 81: 102–109.
136. Kasagi S, Zhang P, Che L, Abbatiello B, Maruyama T, Nakatsukasa H, Zanvit P, Jin W, Konkell JE, Chen W. (2014) In vivo-generated antigen-specific regulatory T cells treat autoimmunity without compromising antibacterial immune response. *Sci Transl Med*, 6: 241ra78.
137. Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S. (1997) Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology*, 138: 1736–1741.
138. Trudeau JD, Dutz JP, Arany E, Hill DJ, Fieldus WE, Finegood DT. (2000) Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes*, 49: 1–7.
139. Kassem SA, Ariel I, Thornton PS, Scheimberg I, Glaser B. (2000) Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes*, 49: 1325–1333.
140. Höglund P, Mintern J, Waltzinger C, Heath W, Benoist C, Mathis D. (1999) Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. *J Exp Med*, 189: 331–339.
141. Magnuson AM, Thurber GM, Kohler RH, Weissleder R, Mathis D, Benoist C. (2015) Population dynamics of islet-infiltrating cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 1511–1516.
142. O'Brien BA, Huang Y, Geng X, Dutz JP, Finegood DT. (2002) Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages from NOD mice is reduced. *Diabetes*, 51: 2481–2488.
143. Kim HS, Han MS, Chung KW, Kim S, Kim E, Kim MJ, Jang E, Lee HA, Youn J, Akira S, Lee M-S. (2007) Toll-like receptor 2 senses beta-cell death and contributes to the initiation of autoimmune diabetes. *Immunity*, 27: 321–333.

144. Jun HS, Yoon CS, Zbytnuik L, van Rooijen N, Yoon JW. (1999) The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med*, 189: 347–358.
145. Carrington EM, Kos C, Zhan Y, Krishnamurthy B, Allison J. (2011) Reducing or increasing β -cell apoptosis without inflammation does not affect diabetes initiation in neonatal NOD mice. *Eur J Immunol*, 41: 2238–2247.
146. Byrne JC, Ní Gabhann J, Lazzari E, Mahony R, Smith S, Stacey K, Wynne C, Jefferies CA. (2012) Genetics of SLE: functional relevance for monocytes/macrophages in disease. *Clin Dev Immunol*, 2012: 582352.
147. Marée AFM, Kublik R, Finegood DT, Edelstein-Keshet L. (2006) Modelling the onset of Type 1 diabetes: can impaired macrophage phagocytosis make the difference between health and disease? *Philos Trans R Soc Lond Math Phys Eng Sci*, 364: 1267–1282.
148. Knip M, Virtanen SM, Akerblom HK. (2010) Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. *Am J Clin Nutr*, 91: 1506S–1513S.
149. Zóka A, Somogyi A, Firneisz G. (2012) [Type 1 diabetes mellitus: most recent advances in its pathogenesis and treatment]. *Orv Hetil*, 153: 1047–1056.
150. Zóka A, Múzes G, Somogyi A, Varga T, Szémán B, Al-Aissa Z, Hadarits O, Firneisz G. (2013) Altered Immune Regulation in Type 1 Diabetes. *Clin Dev Immunol*, 2013: 254874.
151. Imagawa A, Hanafusa T. (2006) Pathogenesis of Fulminant Type 1 Diabetes. *Rev Diabet Stud*, 3: 169–177.
152. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. (2009) The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*, 5: 219–226.
153. Santin I, Moore F, Colli ML, Gurzov EN, Marselli L, Marchetti P, Eizirik DL. (2011) PTPN2, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates pancreatic β -cell apoptosis via regulation of the BH3-only protein Bim. *Diabetes*, 60: 3279–3288.

154. Harris PE, Malanga D, Liu Z, Hardy MA, Souza F, Del Pozzo G, Winchester RJ, Maffei A. (2006) Effect of interferon alpha on MHC class II gene expression in ex vivo human islet tissue. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*, 1762: 627–635.
155. Gurzov EN, Eizirik DL. (2011) Bcl-2 proteins in diabetes: mitochondrial pathways of β -cell death and dysfunction. *Trends Cell Biol*, 21: 424–431.
156. Cunha DA, Igoillo-Esteve M, Gurzov EN, Germano CM, Naamane N, Marhfour I, Fukaya M, Vanderwinden J-M, Gysemans C, Mathieu C, Marselli L, Marchetti P, Harding HP, Ron D, Eizirik DL, Cnop M. (2012) Death protein 5 and p53-upregulated modulator of apoptosis mediate the endoplasmic reticulum stress-mitochondrial dialog triggering lipotoxic rodent and human β -cell apoptosis. *Diabetes*, 61: 2763–2775.
157. Barthson J, Germano CM, Moore F, Maida A, Drucker DJ, Marchetti P, Gysemans C, Mathieu C, Nunez G, Jurisicova A, Eizirik DL, Gurzov EN. (2011) Cytokines Tumor Necrosis Factor- α and Interferon- γ Induce Pancreatic β -Cell Apoptosis through STAT1-mediated Bim Protein Activation. *J Biol Chem*, 286: 39632–39643.
158. Eizirik DL, Sammeth M, Bouckenoghe T, Bottu G, Sisino G, Igoillo-Esteve M, Ortis F, Santin I, Colli ML, Barthson J, Bouwens L, Hughes L, Gregory L, Lunter G, Marselli L, Marchetti P, McCarthy MI, Cnop M. (2012) The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. *PLoS Genet*, 8: e1002552.
159. Yamada Y, Okubo Y, Shimada A, Oikawa Y, Yamada S, Narumi S, Matsushima K, Itoh H. (2012) Acceleration of diabetes development in CXCR3 chemokine receptor 3 (CXCR3)-deficient NOD mice. *Diabetologia*, 55: 2238–2245.
160. Frigerio S, Junt T, Lu B, Gerard C, Zumsteg U, Holländer GA, Piali L. (2002) Beta cells are responsible for CXCR3-mediated T-cell infiltration in insulinitis. *Nat Med*, 8: 1414–1420.

161. Christen U, McGavern DB, Luster AD, von Herrath MG, Oldstone MBA. (2003) Among CXCR3 chemokines, IFN-gamma-inducible protein of 10 kDa (CXC chemokine ligand (CXCL) 10) but not monokine induced by IFN-gamma (CXCL9) imprints a pattern for the subsequent development of autoimmune disease. *J Immunol Baltim Md 1950*, 171: 6838–6845.
162. Schloot NC, Willemsen SJ, Duinkerken G, Drijfhout JW, de Vries RR, Roep BO. (2001) Molecular mimicry in type 1 diabetes mellitus revisited: T-cell clones to GAD65 peptides with sequence homology to Coxsackie or proinsulin peptides do not crossreact with homologous counterpart. *Hum Immunol*, 62: 299–309.
163. Sevilla N, Homann D, von Herrath M, Rodriguez F, Harkins S, Whitton JL, Oldstone MB. (2000) Virus-induced diabetes in a transgenic model: role of cross-reacting viruses and quantitation of effector T cells needed to cause disease. *J Virol*, 74: 3284–3292.
164. Christen U, Edelmann KH, McGavern DB, Wolfe T, Coon B, Teague MK, Miller SD, Oldstone MBA, von Herrath MG. (2004) A viral epitope that mimics a self antigen can accelerate but not initiate autoimmune diabetes. *J Clin Invest*, 114: 1290–1298.
165. Tracy S, Drescher KM, Chapman NM, Kim K-S, Carson SD, Pirruccello S, Lane PH, Romero JR, Leser JS. (2002) Toward testing the hypothesis that group B coxsackieviruses (CVB) trigger insulin-dependent diabetes: inoculating nonobese diabetic mice with CVB markedly lowers diabetes incidence. *J Virol*, 76: 12097–12111.
166. Pane JA, Webster NL, Graham KL, Holloway G, Zufferey C, Coulson BS. (2013) Rotavirus acceleration of murine type 1 diabetes is associated with a T helper 1-dependent specific serum antibody response and virus effects in regional lymph nodes. *Diabetologia*, 56: 573–582.
167. Hugues S, Mougneau E, Ferlin W, Jeske D, Hofman P, Homann D, Beaudoin L, Schrike C, Von Herrath M, Lehuen A, Glaichenhaus N. (2002) Tolerance to islet

- antigens and prevention from diabetes induced by limited apoptosis of pancreatic beta cells. *Immunity*, 16: 169–181.
168. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach J-F. (2010) The ‘hygiene hypothesis’ for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*, 160: 1–9.
 169. Beyerlein A, Donnachie E, Jergens S, Ziegler A. (2016) INfections in early life and development of type 1 diabetes. *JAMA*, 315: 1899–1901.
 170. Vaarala O, Knip M, Paronen J, Hämäläinen AM, Muona P, Väätäinen M, Ilonen J, Simell O, Akerblom HK. (1999) Cow’s milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infants at genetic risk for type 1 diabetes. *Diabetes*, 48: 1389–1394.
 171. Klein L, Jovanovic K. (2012) Regulatory T cell differentiation: turning harmful into useful. *Immunity*, 37: 441–443.
 172. Suzuki M, Jagger AL, Konya C, Shimojima Y, Pryshchep S, Goronzy JJ, Weyand CM. (2012) CD8+CD45RA+CCR7+FOXP3+ T cells with immunosuppressive properties: a novel subset of inducible human regulatory T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*, 189: 2118–2130.
 173. Kühl AA, Pawlowski NN, Grollich K, Blessenohl M, Westermann J, Zeitz M, Loddenkemper C, Hoffmann JC. (2009) Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. *Immunology*, 128: 580–588.
 174. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. (2007) Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*, 445: 771–775.
 175. Otsubo K, Kanegane H, Kamachi Y, Kobayashi I, Tsuge I, Imaizumi M, Sasahara Y, Hayakawa A, Nozu K, Iijima K, Ito S, Horikawa R, Nagai Y, Takatsu K, Mori H, Ochs HD, Miyawaki T. (2011) Identification of FOXP3-negative regulatory T-like (CD4+CD25+CD127low) cells in patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Clin Immunol*, 141: 111–120.

176. Sun L, Wu J, Yi S. (2012) Foxp3 is critical for human natural CD4+CD25+ regulatory T cells to suppress alloimmune response. *Transpl Immunol*, 26: 71–80.
177. McMurchy AN, Levings MK. (2013) In vitro generation of human T regulatory cells: generation, culture, and analysis of FOXP3-transduced T cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ*, 946: 115–132.
178. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK. (2007) Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol*, 19: 345–354.
179. Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Groth BF de S, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*, 203: 1701–1711.
180. Simonetta F, Chiali A, Cordier C, Urrutia A, Girault I, Bloquet S, Tanchot C, Bourgeois C. (2010) Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 40: 2528–2538.
181. Couper KN, Lanthier PA, Perona-Wright G, Kummer LW, Chen W, Smiley ST, Mohrs M, Johnson LL. (2009) Anti-CD25 antibody-mediated depletion of effector T cell populations enhances susceptibility of mice to acute but not chronic *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol Baltim Md 1950*, 182: 3985–3994.
182. Caudy AA, Reddy ST, Chatila T, Atkinson JP, Verbsky JW. (2007) CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*, 119: 482–487.
183. Barnes MJ, Griseri T, Johnson AMF, Young W, Powrie F, Izcue A. (2013) CTLA-4 promotes Foxp3 induction and regulatory T cell accumulation in the intestinal lamina propria. *Mucosal Immunol*, 6: 324–334.

184. Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, Moraes-Fontes MF, Rebelo M, Demengeot J. (2005) Foxp3⁺ CD25⁻ CD4⁺ T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 4091–4096.
185. Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S. (2009) Heterogeneity of natural Foxp3⁺ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 1903–1908.
186. Bonelli M, Savitskaya A, Steiner C-W, Rath E, Smolen JS, Scheinecker C. (2009) Phenotypic and functional analysis of CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁺ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Baltim Md 1950*, 182: 1689–1695.
187. Prado C, de Paz B, López P, Gómez J, Rodríguez-Carrio J, Suárez A. (2013) Relationship between FOXP3 positive populations and cytokine production in systemic lupus erythematosus. *Cytokine*, 61: 90–96.
188. Fransson M, Burman J, Lindqvist C, Atterby C, Fagius J, Loskog A. (2010) T regulatory cells lacking CD25 are increased in MS during relapse. *Autoimmunity*, 43: 590–597.
189. de Paz B, Prado C, Alperi-López M, Ballina-García FJ, Rodriguez-Carrio J, López P, Suárez A. (2012) Effects of glucocorticoid treatment on CD25⁻FOXP3⁺ population and cytokine-producing cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*, 51: 1198–1207.
190. Suen J-L, Li H-T, Jong Y-J, Chiang B-L, Yen J-H. (2009) Altered homeostasis of CD4⁺ FoxP3⁺ regulatory T-cell subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Immunology*, 127: 196–205.
191. Laurence A, Amarnath S, Mariotti J, Kim YC, Foley J, Eckhaus M, O’Shea JJ, Fowler DH. (2012) STAT3 transcription factor promotes instability of nTreg

- cells and limits generation of iTreg cells during acute murine graft-versus-host disease. *Immunity*, 37: 209–222.
192. Pallandre J-R, Brillard E, Créhange G, Radlovic A, Remy-Martin J-P, Saas P, Rohrlich P-S, Pivot X, Ling X, Tiberghien P, Borg C. (2007) Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*, 179: 7593–7604.
 193. Hulme MA, Wasserfall CH, Atkinson MA, Brusko TM. (2012) Central role for interleukin-2 in type 1 diabetes. *Diabetes*, 61: 14–22.
 194. Osorio LMG, Ibañez JM, Cabrera A. (2005) Autoimmunity co-signaling system: Regulatory T cells, CTLA-4 and FOXP3. *Inmunología*, 24: 283–297.
 195. Carreno BM, Bennett F, Chau TA, Ling V, Luxenberg D, Jussif J, Baroja ML, Madrenas J. (2000) CTLA-4 (CD152) Can Inhibit T Cell Activation by Two Different Mechanisms Depending on Its Level of Cell Surface Expression. *J Immunol*, 165: 1352–1356.
 196. Tsuji-Takayama K, Suzuki M, Yamamoto M, Harashima A, Okochi A, Otani T, Inoue T, Sugimoto A, Toraya T, Takeuchi M, Yamasaki F, Nakamura S, Kibata M. (2008) The production of IL-10 by human regulatory T cells is enhanced by IL-2 through a STAT5-responsive intronic enhancer in the IL-10 locus. *J Immunol Baltim Md 1950*, 181: 3897–3905.
 197. Downes K, Marcovecchio ML, Clarke P, Cooper JD, Ferreira RC, Howson JMM, Jolley J, Nutland S, Stevens HE, Walker NM, Wallace C, Dunger DB, Todd JA. (2014) Plasma concentrations of soluble IL-2 receptor α (CD25) are increased in type 1 diabetes and associated with reduced C-peptide levels in young patients. *Diabetologia*, 57: 366–372.
 198. Srahna M, Van Grunsven LA, Remacle JE, Vandenberghe P. (2006) CTLA-4 interacts with STAT5 and inhibits STAT5-mediated transcription. *Immunology*, 117: 396–401.

199. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, Linsley PS, Thompson CB, Riley JL. (2005) CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol Cell Biol*, 25: 9543–9553.
200. Search ChIP-qPCR Assay. <http://www.sabiosciences.com/chipqpcrsearch.php>
Accessed 5 Jun 2015
201. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, Olek S, Hamann A, von Boehmer H, Huehn J. (2008) DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol*, 38: 1654–1663.
202. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM. (2010) Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3+ T Regulatory Cells. *J Immunol Baltim Md 1950*, 184: 3433–3441.
203. Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW. (2011) Helios Expression Is a Marker of T Cell Activation and Proliferation. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0024226
204. Lin X, Chen M, Liu Y, Guo Z, He X, Brand D, Zheng SG. (2013) Advances in distinguishing natural from induced Foxp3+ regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 6: 116–123.
205. Huang H, Ma Y, Dawicki W, Zhang X, Gordon JR. (2013) Comparison of induced versus natural regulatory T cells of the same TCR specificity for induction of tolerance to an environmental antigen. *J Immunol Baltim Md 1950*, 191: 1136–1143.
206. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. (2005) Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest*, 115: 66–75.
207. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, Baker J, Jeffery LE, Kaur S, Briggs Z, Hou TZ, Futter CE, Anderson G, Walker LSK,

- Sansom DM. (2011) Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*, 332: 600–603.
208. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. (2007) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 8: 1353–1362.
209. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. (2008) How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8: 523–532.
210. Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, Creutzfeldt W. (1986) Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab*, 63: 492–498.
211. Nauck MA. (2011) Incretin-Based Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus: Properties, Functions, and Clinical Implications. *Am J Med*, 124: S3–S18.
212. Buteau J, El-Assaad W, Rhodes CJ, Rosenberg L, Joly E, Prentki M. (2004) Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipototoxicity. *Diabetologia*, 47: 806–815.
213. Bulotta A, Hui H, Anastasi E, Bertolotto C, Boros LG, Di Mario U, Perfetti R. (2002) Cultured pancreatic ductal cells undergo cell cycle re-distribution and beta-cell-like differentiation in response to glucagon-like peptide-1. *J Mol Endocrinol*, 29: 347–360.
214. Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM. (2008) Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab*, 8: 532–539.
215. Cummings DE, Overduin J. (2007) Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest*, 117: 13–23.
216. Meier JJ, Nauck MA, Kranz D, Holst JJ, Deacon CF, Gaeckler D, Schmidt WE, Gallwitz B. (2004) Secretion, Degradation, and Elimination of Glucagon-Like Peptide 1 and Gastric Inhibitory Polypeptide in Patients with Chronic Renal Insufficiency and Healthy Control Subjects. *Diabetes*, 53: 654–662.

217. Holst JJ. (2007) The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiol Rev*, 87: 1409–1439.
218. Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen M, Pridal L, Willms B, Holst JJ. (1995) Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH₂-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes*, 44: 1126–1131.
219. Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. (1995) Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 80: 952–957.
220. Hansen L, Deacon CF, Orskov C, Holst JJ. (1999) Glucagon-like peptide-1-(7-36)amide is transformed to glucagon-like peptide-1-(9-36)amide by dipeptidyl peptidase IV in the capillaries supplying the L cells of the porcine intestine. *Endocrinology*, 140: 5356–5363.
221. Drucker DJ, Rosen CF. (2011) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists, obesity and psoriasis: diabetes meets dermatology. *Diabetologia*, 54: 2741–2744.
222. Ravassa S, Zudaire A, Díez J. (2012) GLP-1 and cardioprotection: from bench to bedside. *Cardiovasc Res*, 94: 316–323.
223. McIntyre RS, Powell AM, Kaidanovich-Beilin O, Soczynska JK, Alsuwaidan M, Woldeyohannes HO, Kim AS, Gallagher LA. (2013) The neuroprotective effects of GLP-1: possible treatments for cognitive deficits in individuals with mood disorders. *Behav Brain Res*, 237: 164–171.
224. Lee Y-S, Park M-S, Choung J-S, Kim S-S, Oh H-H, Choi C-S, Ha S-Y, Kang Y, Kim Y, Jun H-S. (2012) Glucagon-like peptide-1 inhibits adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in an obese mouse model of diabetes. *Diabetologia*, 55: 2456–2468.

225. Shiraishi D, Fujiwara Y, Komohara Y, Mizuta H, Takeya M. (2012) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) induces M2 polarization of human macrophages via STAT3 activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 425: 304–308.
226. Shiraki A, Oyama J, Komoda H, Asaka M, Komatsu A, Sakuma M, Kodama K, Sakamoto Y, Kotooka N, Hirase T, Node K. (2012) The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- α -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis*, 221: 375–382.
227. Marx N, Burgmaier M, Heinz P, Ostertag M, Hausauer A, Bach H, Durst R, Hombach V, Walcher D. (2010) Glucagon-like peptide-1(1-37) inhibits chemokine-induced migration of human CD4-positive lymphocytes. *Cell Mol Life Sci*, 67: 3549–3555.
228. Hogan AE, Tobin AM, Ahern T, Corrigan MA, Gaoatswe G, Jackson R, O'Reilly V, Lynch L, Doherty DG, Moynagh PN, Kirby B, O'Connell J, O'Shea D. (2011) Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the regulation of human invariant natural killer T cells: lessons from obesity, diabetes and psoriasis. *Diabetologia*, 54: 2745–2754.
229. Hadjiyanni I, Siminovitch KA, Danska JS, Drucker DJ. (2010) Glucagon-like peptide-1 receptor signalling selectively regulates murine lymphocyte proliferation and maintenance of peripheral regulatory T cells. *Diabetologia*, 53: 730–740.
230. Liberman A, Esser M, Marx N, Burgmaier M. (2013) Glucagon-Like Peptide-1(9-36) Inhibits Chemokine-Induced Migration of Human CD4-Positive Lymphocytes. *PLoS ONE*, 8: e58445.
231. Matsubara J, Sugiyama S, Akiyama E, Iwashita S, Kurokawa H, Ohba K, Maeda H, Fujisue K, Yamamoto E, Kaikita K, Hokimoto S, Jinnouchi H, Ogawa H. (2013) Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, improves endothelial dysfunction in association with its anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease and uncontrolled diabetes. *Circ J Off J Jpn Circ Soc*, 77: 1337–1344.

232. Woo JS, Kim W, Ha SJ, Kim JB, Kim S-J, Kim W-S, Seon HJ, Kim KS. (2013) Cardioprotective effects of exenatide in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of exenatide myocardial protection in revascularization study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33: 2252–2260.
233. Mansur AT, Göktay F, Yaşar SP. (2008) Peripheral blood eosinophilia in association with generalized pustular and erythrodermic psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*, 22: 451–455.
234. Schopf RE, Hultsch T, Lotz J, Bräutigam M. (1998) Eosinophils, pruritus and psoriasis: effects of treatment with etretinate or cyclosporin-A. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*, 11: 234–239.
235. Yıldırım FE, Karaduman A, Pinar A, Aksoy Y. (2011) CD26/dipeptidyl-peptidase IV and adenosine deaminase serum levels in psoriatic patients treated with cyclosporine, etanercept, and psoralen plus ultraviolet A phototherapy. *Int J Dermatol*, 50: 948–955.
236. Schönermarck U, Csernok E, Trabandt A, Hansen H, Gross WL. (2000) Circulating cytokines and soluble CD23, CD26 and CD30 in ANCA-associated vasculitides. *Clin Exp Rheumatol*, 18: 457–463.
237. Lynch M, Tobin A-M, Ahern T, O’Shea D, Kirby B. (2014) Sitagliptin for severe psoriasis. *Clin Exp Dermatol*, 39: 841–842.
238. Makdissi A, Ghanim H, Vora M, Green K, Abuaysheh S, Chaudhuri A, Dhindsa S, Dandona P. (2012) Sitagliptin exerts an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab*, 97: 3333–3341.
239. Yong Zhang, Cydney Urbanek, Esteban G. Burchard, Hong Wei Chu, Max A. Seibold. (2014) The Asthma Biomarker Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP4) Is IL-13 Inducible In Airway Epithelial Cells And Inhibits Rhinovirus Infection. In: C57 TOGETHER FOREVER Airw. Epithel. SMOOTH MUSCLE CELLS. American Thoracic Society, pp A4875–A4875

240. Schmiedl A, Krainski J, Schwichtenhövel F, Schade J, Klemann C, Raber KA, Zscheppang K, Beekmann T, Acevedo C, Glaab T, Wedekind D, Pabst R, von Hörsten S, Stephan M. (2010) Reduced airway inflammation in CD26/DPP4-deficient F344 rats is associated with altered recruitment patterns of regulatory T cells and expression of pulmonary surfactant proteins. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*, 40: 1794–1808.
241. Nader MA, El-Awady MS, Shalaby AA, El-Agamy DS. (2012) Sitagliptin exerts anti-inflammatory and anti-allergic effects in ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 385: 909–919.
242. Tasic T, Bäumer W, Schmiedl A, Schwichtenhövel F, Pabst R, Raap U, von Hörsten S, Stephan M. (2011) Dipeptidyl peptidase IV (DPP4) deficiency increases Th1-driven allergic contact dermatitis. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*, 41: 1098–1107.
243. Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. (2001) CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol*, 54: 249–264.
244. Firneisz G, Varga T, Lengyel G, Fehér J, Ghyczy D, Wichmann B, Selmeçi L, Tulassay Z, Rácz K, Somogyi A. (2010) Serum Dipeptidyl Peptidase-4 Activity in Insulin Resistant Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Novel Liver Disease Biomarker. *PLoS ONE*, 5: e12226.
245. Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, Hartwig S, Lehr S, Ouwens DM, Eckardt K, Kaufman JM, Ryden M, Müller S, Hanisch F-G, Ruige J, Arner P, Sell H, Eckel J. (2011) Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes*, 60: 1917–1925.
246. Varga T, Somogyi A, Barna G, Wichmann B, Nagy G, Rácz K, Selmeçi L, Firneisz G. (2011) Higher serum DPP-4 enzyme activity and decreased lymphocyte CD26 expression in type 1 diabetes. *Pathol Oncol Res POR*, 17: 925–930.

247. Seitzer U, Scheel-Toellner D, Hahn M, Heinemann G, Mattern T, Flad HD, Gerdes J. (1997) Comparative study of CD26 as a Th1-like and CD30 as a potential Th2-like operational marker in leprosy. *Adv Exp Med Biol*, 421: 217–221.
248. Bengsch B, Seigel B, Flecken T, Wolanski J, Blum HE, Thimme R. (2012) Human Th17 cells express high levels of enzymatically active dipeptidylpeptidase IV (CD26). *J Immunol Baltim Md 1950*, 188: 5438–5447.
249. Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Morimoto C. (2013) CD26-mediated co-stimulation in human CD8(+) T cells provokes effector function via pro-inflammatory cytokine production. *Immunology*, 138: 165–172.
250. Salgado FJ, Pérez-Díaz A, Villanueva NM, Lamas O, Arias P, Nogueira M. (2012) CD26: a negative selection marker for human Treg cells. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*, 81: 843–855.
251. Ohnuma K, Takahashi N, Yamochi T, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. (2008) Role of CD26/dipeptidyl peptidase IV in human T cell activation and function. *Front Biosci J Virtual Libr*, 13: 2299–2310.
252. Ou X, O’Leary HA, Broxmeyer HE. (2013) Implications of DPP4 modification of proteins that regulate stem/progenitor and more mature cell types. *Blood*, 122: 161–169.
253. Proost P, Schutyser E, Menten P, Struyf S, Wuyts A, Opdenakker G, Detheux M, Parmentier M, Durinx C, Lambere AM, Neyts J, Liekens S, Maudgal PC, Billiau A, Van Damme J. (2001) Amino-terminal truncation of CXCR3 agonists impairs receptor signaling and lymphocyte chemotaxis, while preserving antiangiogenic properties. *Blood*, 98: 3554–3561.
254. Ellis SL, Moser EG, Snell-Bergeon JK, Rodionova AS, Hazenfield RM, Garg SK. (2011) Effect of sitagliptin on glucose control in adult patients with Type 1 diabetes: a pilot, double-blind, randomized, crossover trial. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*, 28: 1176–1181.

255. Zhao Y, Yang L, Xiang Y, Liu L, Huang G, Long Z, Li X, Leslie RD, Wang X, Zhou Z. (2014) Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin maintains β -cell function in patients with recent-onset latent autoimmune diabetes in adults: one year prospective study. *J Clin Endocrinol Metab*, 99: E876-880.
256. Hari Kumar KVS, Shaikh A, Prusty P. (2013) Addition of exenatide or sitagliptin to insulin in new onset type 1 diabetes: a randomized, open label study. *Diabetes Res Clin Pract*, 100: e55-58.
257. Kielgast U, Holst JJ, Madsbad S. (2011) Antidiabetic actions of endogenous and exogenous GLP-1 in type 1 diabetic patients with and without residual β -cell function. *Diabetes*, 60: 1599–1607.
258. Kielgast U, Krarup T, Holst JJ, Madsbad S. (2011) Four weeks of treatment with liraglutide reduces insulin dose without loss of glycemic control in type 1 diabetic patients with and without residual beta-cell function. *Diabetes Care*, 34: 1463–1468.
259. Osawa S, Kawamori D, Katakami N, Takahara M, Sakamoto F, Katsura T, Yasuda T, Kaneto H, Matsuhisa M, Matsuoka T-A, Shimomura I. (2016) Significant elevation of serum dipeptidyl peptidase-4 activity in young-adult type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 113: 135–142.
260. Zóka A, Barna G, Hadarits O, Al-Aissa Z, Wichmann B, Múzes G, Somogyi A, Firneisz G. (2015) Altered crosstalk in the dipeptidyl peptidase-4-incretin-immune system in type 1 diabetes: A hypothesis generating pilot study. *Hum Immunol*, 76: 667–672.
261. Aghili B, Amirzargar AA, Rajab A, Rabbani A, Sotoudeh A, Assadiasl S, Larijani B, Massoud A. (2015) Altered Suppressor Function of Regulatory T Cells in Type 1 Diabetes. *Iran J Immunol IJI*, 12: 240–251.
262. Zóka A, Barna G, Somogyi A, Múzes G, Oláh Á, Al-Aissa Z, Hadarits O, Kiss K, Firneisz G. (2015) Extension of the CD4(+)Foxp3(+)CD25(-/low) regulatory T-cell subpopulation in type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity*, 48: 289–97.

263. Parackova Z, Kayserova J, Danova K, Sismova K, Dudkova E, Sumnik Z, Kolouskova S, Lebl J, Stechova K, Sediva A. (2016) T regulatory lymphocytes in type 1 diabetes: Impaired CD25 expression and IL-2 induced STAT5 phosphorylation in pediatric patients. *Autoimmunity*, 49: 523–531.
264. Zóka A, Barna G, Nyíró G, Molnár Á, Németh L, Múzes G, Somogyi A, Firneisz G. Reduced GLP-1 response to meal is associated with the CTLA4 rs3087243 G/G genotype. *Cent Eur J Immunol*, accepted for publication: 22nd May 2017.
265. Hartemann A, Bensimon G, Payan CA, Jacqueminet S, Bourron O, Nicolas N, Fonfrede M, Rosenzweig M, Bernard C, Klatzmann D. (2013) Low-dose interleukin 2 in patients with type 1 diabetes: a phase 1/2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 1: 295–305.
266. Baeyens A, Pérol L, Fourcade G, Cagnard N, Carpentier W, Woytschak J, Boyman O, Hartemann A, Piaggio E. (2013) Limitations of IL-2 and rapamycin in immunotherapy of type 1 diabetes. *Diabetes*, 62: 3120–3131.
267. Todd JA, Evangelou M, Cutler AJ, Pekalski ML, Walker NM, Stevens HE, Porter L, Smyth DJ, Rainbow DB, Ferreira RC, Esposito L, Hunter KMD, Loudon K, Irons K, Yang JH, Bell CJM, Schuilenburg H, Heywood J, Challis B, Neupane S, Clarke P, Coleman G, Dawson S, Goymer D, Anselmiova K, Kennet J, Brown J, Caddy SL, Lu J, Greatorex J, Goodfellow I, Wallace C, Tree TI, Evans M, Mander AP, Bond S, Wicker LS, Waldron-Lynch F. (2016) Regulatory T Cell Responses in Participants with Type 1 Diabetes after a Single Dose of Interleukin-2: A Non-Randomised, Open Label, Adaptive Dose-Finding Trial. *PLoS Med*, 13: e1002139.
268. Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, Cooper JD, Downes K, Yang JH, Howson JM, Stevens H, McManus R, Wijmenga C, Heap GA, Dubois PC, Clayton DG, Hunt KA, van Heel DA, Todd JA. (2008) Shared and Distinct Genetic Variants in Type 1 Diabetes and Celiac Disease. *N Engl J Med*, 359: 2767–2777.
269. Torekov SS, Ma L, Grarup N, Hartmann B, Hainerová IA, Kielgast U, Kissow H, Rosenkilde M, GIANT Consortium, Lebl J, Witte DR, Jørgensen T, Sandbaek A,

- Lauritzen T, Madsen OD, Wang J, Linneberg A, Madsbad S, Holst JJ, Hansen T, Pedersen O. (2011) Homozygous carriers of the G allele of rs4664447 of the glucagon gene (GCG) are characterised by decreased fasting and stimulated levels of insulin, glucagon and glucagon-like peptide (GLP)-1. *Diabetologia*, 54: 2820–2831.
270. Vaarala O. (2012) Is the origin of type 1 diabetes in the gut? *Immunol Cell Biol*, 90: 271–276.
271. Okorokov PL, Anikhovskaia IA, Volkov IE, Iakovlev MI. (2011) [Intestinal endotoxin in induction of type 1 diabetes]. *Fiziol Cheloveka*, 37: 138–141.
272. Pellegrini S, Sordi V, Bolla AM, Saita D, Ferrarese R, Canducci F, Clementi M, Invernizzi F, Mariani A, Bonfanti R, Barera G, Testoni PA, Doglioni C, Bosi E, Piemonti L. (2017) Duodenal Mucosa of Patients With Type 1 Diabetes Shows Distinctive Inflammatory Profile and Microbiota. *J Clin Endocrinol Metab*, 102: 1468–1477.
273. Blaslov K, Bulum T, Zibar K, Duvnjak L. (2014) Relationship between metabolic syndrome and meal-induced glucagon like peptide-1 response in type 1 diabetic patients. *J Diabetes*, n/a-n/a.
274. Firneisz G, Zóka A. (2017) Elevation of serum dipeptidyl peptidase-4 activity in type 1 diabetes: Potential explanations and implications. *Diabetes Res Clin Pract*, 127: 291–292.
275. Mathieu C, Zinman B, Hemmingsson JU, Woo V, Colman P, Christiansen E, Linder M, Bode B, ADJUNCT ONE Investigators. (2016) Efficacy and Safety of Liraglutide Added to Insulin Treatment in Type 1 Diabetes: The ADJUNCT ONE Treat-To-Target Randomized Trial. *Diabetes Care*, 39: 1702–1710.
276. Bagchi D, Sreejayan N. (2012) *Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome*. Academic Press
277. Whalen K, Onge E. (2010) Saxagliptin (Onglyza) for Type 2 Diabetes Mellitus. *Am Fam Physician*, 81: 1483–1484.

278. Tomas-Falco E, Habener JF. (2010) Insulin-like Actions of Glucagon-like Peptide-1: A Dual Receptor Hypothesis. *Trends Endocrinol Metab TEM*, 21: 59–67.
279. Fujita H, Taniai H, Murayama H, Ohshiro H, Hayashi H, Sato S, Kikuchi N, Komatsu T, Komatsu K, Komatsu K, Narita T, Yamada Y. (2014) DPP-4 inhibition with alogliptin on top of angiotensin II type 1 receptor blockade ameliorates albuminuria via up-regulation of SDF-1 α in type 2 diabetic patients with incipient nephropathy. *Endocr J*, 61: 159–166.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent teljes terjedelmű eredeti közlemények

Zóka A, Barna G, Hadarits O, Al-Aissa Z, Wichmann B, Múzes G, Somogyi A, Firneisz G. (2015) Altered crosstalk in the dipeptidyl peptidase-4-incretin-immune system in type 1 diabetes: A hypothesis generating pilot study. *Hum Immunol*, 76: 667-72. doi: 10.1016/j.humimm. 2015.09.018. IF: 2,127

Zóka A, Barna G, Somogyi A, Múzes G, Oláh Á, Al-Aissa Z, Hadarits O, Kiss K, Firneisz G. (2015) Extension of the CD4⁺Foxp3⁺CD25^{-/low} regulatory T-cell subpopulation in type 1 diabetes mellitus. *Autoimmunity*, 48: 289-97. doi: 10.3109/08916934.2014.992518. IF: 2,917

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

Hadarits O*, Zóka A*, Barna G, Al-Aissa Z, Rosta K, Rigó J Jr, Kautzky-Willer A, Somogyi A, Firneisz G. (2016) Increased Proportion of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Population in Cord Blood of Neonates Born to Mothers with Gestational Diabetes Mellitus. *Stem Cells Dev*, 25: 13-7. doi: 10.1089/scd.2015.0203. IF: 3,727 (*megosztott elsőszereplőség)

Al-Aissa Z, Rosta K, Hadarits O, Harreiter J, Zóka A, Bancher-Todesca D, Patócs A, Kiss K, Sárman B, Pusztai P, Sziller I, Rigó J, Rácz K, Somogyi A, Kautzky-Willer A, Firneisz G. (2015) Cord Serum Dipeptidyl-Peptidase 4 Activity in Gestational Diabetes. *Eur J Clin Invest*, 45: 196-203. doi: 10.1111/eci.12397. IF: 2,834

Közlésre elfogadott teljes terjedelmű eredeti közlemény az értekezés témájában

Zóka A, Barna G, Nyíró G, Molnár Á, Németh L, Múzes G, Somogyi A, Firneisz G. Reduced GLP-1 response to meal is associated with the CTLA4 rs3087243 G/G genotype. *Cent Eur J Immunol*. Közlésre elfogadva: 2017.05.22. IF: 0,776

Az értekezés témájához kapcsolódó további közlemények

Firneisz G, Zóka A. (2017) Elevation of serum dipeptidyl peptidase-4 activity in type 1 diabetes: Potential explanations and implications. *Diabetes Res Clin Pract*, 127: 291-2. doi: 10.1016/j.diabres.2016.08.005.

Zóka A, Múzes G, Somogyi A, Varga T, Szémán B, Al-Aissa Z, Hadarits O, Firneisz G. (2013) Altered immune regulation in type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol*, 2013: 254874. doi: 10.1155/2013/254874. IF: 2,934

Zóka A, Somogyi A, Firneisz G. (2012) 1-es típusú diabetes mellitus: a patogenezis és terápia aktuális kérdései. *Orv Hetil.* 153: 1047-56. doi: 10.1556/OH.2012.29413.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönömettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Firneisz Gábornak szakmai iránymutatásáért, építő kritikájáért és orvosként személyes példájáért.

Köszönöm Dr. Somogyi Anikó Professzor Asszonynak, hogy már TDK hallgatóként a Diabetológia és Anyagcsere Munkacsoport tagjává válhattam, majd az általa vezetett, „A diabetes mellitus és szövődményeinek valamint a májbetegségek etiológiai és genetikai tényezőinek vizsgálata” doktori program keretében folytathattam a kutatómunkát, amelyet mindvégig figyelemmel kísért és támogatótt.

Köszönöm Dr. Varga Tímeának, hogy Ph.D. munkájában lefektette azokat az alapokat, amelyekre vizsgálataink megtervezésekor támaszkodtunk.

Hálával tartozom I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Áramlási Citometriás Laboratóriumából Dr. Barna Gábor laborvezetőnek és Szabó Orsolyának, akik iránymutatása, a méréseink beállításában nyújtott segítsége nélkül a vizsgálataink nem valósulhattak volna meg.

Köszönöm Dr. Patócs Attila egyetemi docensnek, hogy a genetikai vizsgálatainkat Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika Endokrin Laboratóriumában végezhetjük. Az allélspecifikus PCR vizsgálatok elvégzésében köszönöm Dr. Nyíró Gábor és dr. Molnár Ágnes segítségét és iránymutatásait.

Köszönöm Németh László (ELTE, Természettudományi Kar, Valószínűségelméleti és Statisztika Tanszék) segítségét a statisztikai elemzésben.

Köszönöm Prof. Dr. Vér Ágota, Dr. Kukor Zoltán és Dr. Bartha Csaba segítségét abban, hogy lehetővé tették méréseink végzését a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetében.

Köszönöm Dr. Komlósi Zsolt egyetemi adjunktus segítségét a magnetic bead alapú DNS izolálásban.

Köszönöm dr. Oláh Ágnes egykori TDK hallgató konstruktív segítségét a vizsgálatok elvégzésében és kiértékelésében.

Köszönöm Dr. Múzes Györgyi Docens Asszony közleményeinkhez adott építő kritikáját.

Köszönöm Dr. Rácz Károly Professzor Úrnak, hogy lehetővé tette a részvételt a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinikán folyó kutatómunkában.