

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: BBI



Karel, Paukner

Význam a úloha monocytů v patogenezi diabetu - imunogenetická studie

The role of monocytes in pathogenesis of diabetes - immunogenetic study

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Pavlína Čejková, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 17. srpna 2012

.....

(Karel Paukner)

Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval své školitelce, paní RNDr. Pavlíně Čejkové, Ph.D. za cenné rady, připomínky a trpělivost při psaní mé bakalářské práce.

ABSTRAKT

Diabetes 1. typu je autoimunitní onemocnění způsobené destrukcí β buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu syntetizujících inzulín. V důsledku zničení β buněk je hlavním příznakem onemocnění hyperglykémie. Monocyty hrají klíčovou roli v aktivaci T lymfocytů, jejichž působení může být protektivní (T_{reg}) nebo destruktivní. Prostřednictvím svých derivátů má monocyty podíl jak na ničení β buněk (makrofágy), tak na utváření self-tolerance (dendritické buňky). V posledních desetiletích meziročně vzrůstá počet diabetiků. V této práci si za cíl kladu shrnout roli monocytů v patogenezi T1D a pokusím se navrhnout možný směr dalšího bádání.

Klíčová slova:

diabetes, monocyty, přirozená imunita, etiologie, gen, asociace

ABSTRACT

Type one diabetes is an autoimmune disease. It is caused by the destruction of β cells of Langerhans' pancreatic islets. Hyperglycemia is a major symptom of β cell destruction. Monocytes play a key role during T cell activation. T cell effect can be protective (T_{reg}) or destructive. Monocyte destroys β cells as a macrophage and generates self-tolerance as a dendritic cell. The number of patients with T1D is increasing. In the presented work I aim to summarize current information about pathogenesis of T1D and I try to propose future way of research.

Key words:

diabetes, monocyte, innate immunity, etiology, gene, association

OBSAH

Seznam zkratek	5
1. Úvod	6
1.1. Diabetes melitus	6
1.1.1. T1D	7
1.2. Místo děje: Langerhansovy ostrůvky	7
1.3. Dědičnost T1D	9
1.4. Imunitní faktory	10
1.4.1. Imunitní faktory buněčné	10
1.4.1.1. Monocyty	10
1.4.1.2. Dendritické buňky	11
1.4.1.3. Makrofágy	12
1.4.1.4. T lymfocyty	12
1.4.2. Mediátory	13
1.4.3. Receptory	14
1.5. Asociované exogenní faktory	15
1.6. Zvířecí modely	16
2. Genetika T1D	17
2.1. Genový komplex MHC	18
2.1.1. Polymorfismus HLA	18
2.1.2. Funkce HLA	19
2.1.3. Klasifikace a exprese HLA	19
2.1.4. Struktura HLA II. Třídy	19
2.1.5. HLA asociace s T1D	20
2.2. Non-HLA geny	21
3. Monocyty – klíčoví hráči mnoha tváří	22
3.1. Vývoj monocytů a jejich prekurzory	22
3.2. Prozánětlivý fenotyp	23
3.3. Makrofágy	23
3.3.1. Patogenní role	24
3.4. Dendritické buňky	26
3.4.1. Autoimunitní reakce	26
3.4.2. Osídlení ostrůvků, nezralé DC	27
3.4.3. Místo děje: lymfatická soustava	28
3.4.4. Maturační stadia dendritických buněk, cross-talk s T lymfocyty	28
4. Toll-like receptory	29
5. Závěr	30
6. Seznam citované literatury	32

SEZNAM ZKRATEK

AG	antigen	antigen
APC	antigen-presenting cell	buňky předkládající antigen
CD	cluster of differentiation	diferenční skupina
DC	dendritic cells	dendritické buňky
GM-CSF	granulocyte macrophage- colony stimulating factor	granulocytární makrofágový- kolonie stimulující faktor
HLA	human leukocyte antigen	lidský leukocytární antigen
IS	immune systém	imunitní systém
MF	macrophages	makrofágy
MHC	major histocompatibility complex	hlavní histokompatibilní komplex
NO	nitric oxide	oxid dusnatý
ROS	reactive oxygen species	volné kyslíkové radikály
T1D	type one diabetes mellitus	diabetes 1. typu
TLR	toll-like receptore	toll-like receptor

1. ÚVOD

V úvodní kapitole si kladu za cíl představit z různých pohledů (dědičnost, asociované faktory, modelové organismy) problematiku diabetu a zejména nastínit obrovskou složitost imunitního systému. Pod pojmem monocyt si tak lze představit široký interval znaků na molekulární i buněčné úrovni ovlivňujících tkáňové děje. V souvislosti s defektem β buněk se z úrovně tkání přesuneme na úroveň celého organismu.

1.1. Diabetes mellitus (DM)

DM tvoří nehomogenní skupinu onemocnění různé etiologie, jejichž společným jmenovatelem je hyperglykémie (zvýšená koncentrace glukosy v krvi) a v jejím důsledku glykosurie (přítomnost glukosy v moči). Onemocnění je podmíněno absolutním nedostatkem inzulínu, nebo jeho relativním nedostatkem při jeho snížené účinnosti. Je provázeno komplexní poruchou metabolismu cukrů, tuků a bílkovin. Novodobě se DM klasifikuje do 4 základních skupin (viz Tabulka 1) (WHO, 1999).

Tabulka 1: Základní klasifikace diabetes mellitus

DIABETES MELLITUS
1. typu (A. imunitně podmíněný B. idiopatický)
2. typu
Ostatní specifické typy
Gestační DM

V důsledku zvýšené koncentrace glukosy v krvi (nad $3,3 - 5,6 \text{ mmol dm}^{-3}$) dochází k poškozování proteinů v téměř celém těle. Mechanismem je neenzymatická glykace proteinů, prováděná jako posttranslační modifikace. Glykace začíná jako spontánní reakce redukujícího sacharidu s volnými aminoskupinami proteinových řetězců. Výsledkem je propojení sousedních proteinových segmentů a ztížení pohyblivosti celé 3D struktury. Zpravidla během ničivého procesu spolupůsobí další oxidační reakce a volné kyslíkové radikály (ROS). Takto poškozené proteiny nazýváme koncovými produkty pokročilé glykooxidace. U diabetiků se pak objevují různá, často kombinovaná onemocnění. Obecně je

nazýváme diabetopatiemi a patří mezi ně: neuropatie, kardiopatie, angiopatie, nefropatie a další. Sem patří i gangrény končetin, poničená sítnice, zmatnění oční čočky, poruchy filtrace ledvin, degenerace mozkových jader a mnoho dalších onemocnění i patologických procesů (McCarthy et al., 2001) (Vlassara et al., 1981).

1.1.1. T1D

Označení **T1D** je z anglického Type One of Diabetes Mellitus. Jde o chronické autoimunitní onemocnění. Mechanismem je selektivní destrukce pankreatických β buněk Langerhansových ostrůvků, které produkují inzulín. Ztráta β buněk vede k absolutnímu nedostatku inzulínu a celoživotní závislosti na jeho exogenním podávání. Nejčastější příčinou je autoimunitní reakce u geneticky predisponovaných jedinců, kdy jako spouštěč slouží exogenní nebo endogenní agens. Incidence T1D má celosvětově vzestupný trend (Patterson et al., 2009). Meziroční přírůstek v USA je 5 %. Vrchol výskytu je ve věku mezi 10 a 14 lety (Maahs et al., 2010) a pohybuje se kolem 20 diabetiků na 100 000 obyvatel. Přesto po 35. roce života vzniká více než polovina ze všech případů (Harjutsalo et al., 2005). T1D býval dříve označován jako juvenilní DM. Důvodem byla vysoká incidence u dětí.

T1D se může objevit v kterémkoliv věku a jeho klinický obraz závisí na agresivitě autoimunitního procesu. Velmi rychlý zánik β buněk v řádech měsíců bývá v dětství a dospívání. Naproti tomu pomalý průběh je typický pro manifestaci T1D v dospělosti. Onemocnění je pak někdy označováno termínem LADA (Latent Autoimmune Diabetes of Adults). Pomalu probíhající destrukce teprve po čase vyústí v úplnou závislost na inzulínu. T1D je často sdružen s jinými autoimunitami, mezi které patří Hashimotova tyreoiditida (Perros et al., 1995), perniciozní anemie (Perros et al., 2000), celiakie (Barera et al., 2002), Addisonova choroba (Barker et al., 2005).

1.2. Místo děje: Langerhansovy ostrůvky

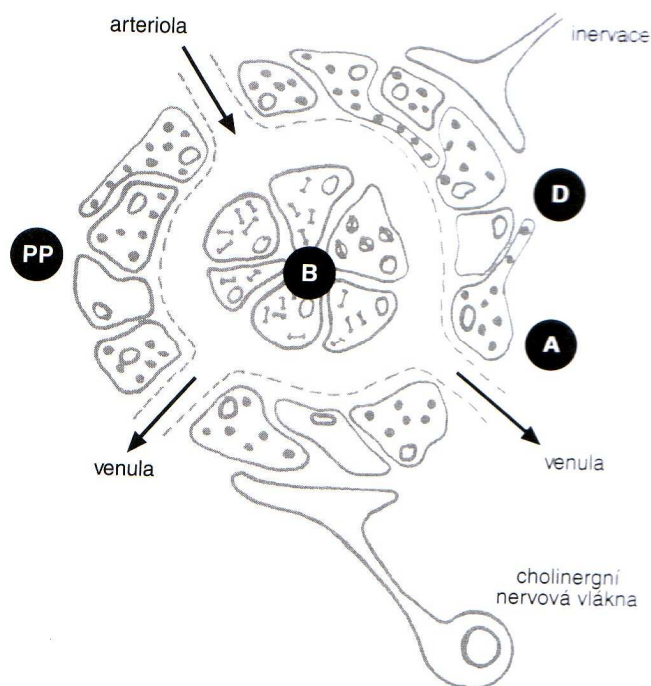
Pankreatické ostrůvky byly objeveny v roce 1869 Paulem Langerhansem. Tvoří endokrinní složku pankreatu zaujímající 2 – 3% hmoty žlázy, ve které jsou ostrůvky roztroušeny. Pankreas zdravého dospělého člověka obsahuje asi 1 milion ostrůvků. Každý z ostrůvků se skládá z masy asi 3000 endokrinních buněk. Od exokrinní tkáně pankreatu jsou odděleny tenkým pouzdrem z fibroblastů a kolagenních vláken.

Buňky ostrůvků jsou během embryonálního vývoje derivovány z buněk endodermu chordy. Geneze ostrůvků probíhá nejprve formou samostatných buněk mezi exokrinními buňkami při terminálních kanálcích. Potom formou chomáče buněk bez oddělení od exokrinní tkáně a nakonec se od ní oddělují jako samostatné ostrůvky.

Na základě rozdílné funkce a struktury (Obrázek 1) se v ostrůvku až dosud rozeznávají 4 typy buněk: A(α) glukagon, B (β) inzulín, D (δ) somatostatin, PP pankreatický polypeptid. Společně s názvem je uveden i produkt a to hormon. Různé buňky ostrůvků se nevyvíjejí současně. Buňky α vznikají dříve než β a PP, δ se vyvíjejí nakonec. Organizace buněk v ostrůvku s centrálním uložením β buněk je ukončena kolem 20. fetálního dne. Buňky β tvoří jádro (dřeň) ostrůvku, ostatní buňky jsou umístěny převážně při jeho povrchu. Všechny endokrinní buňky obsahují sekreční granula. Největší a nejčetnější mají β buňky. Buňky β produkují dále amylin, polypeptid, který zpomaluje vyprazdňování žaludku a navozuje pocit sytosti. Je hlavní složkou pankreatického amyloidu (glykoregulace). Mezi další produkty patří enzym dekarboxyláza kyseliny glutamové (GAD) a kyselina γ -aminomáslená (GABA), která vzniká díky enzymu GAD (Sorenson et al., 1991).

Ostrůvky jsou přímo zásobovány arteriální krví z jedné nebo několika arteriol, které ústí do husté sítě kapilár prostupujících celý ostrůvek. Kapiláry se slévají ve venuly s odtokem žilní krve přes exokrinní tkáň pankreatu do vena portae. Ostrůvky jsou velmi rozsáhle inervované adrenergními, cholinergními a peptidergními vlákny, která obsahují cholecystokinin, substanci P a neuropetidy.

U dlouhotrvajícího T1D jsou zcela zničeny β buňky, ostatní buňky ostrůvků jsou však zachovány. U čerstvě vzniklého diabetu je ve zbytcích ostrůvků možno nalézt β buňky, některé z ostrůvků jsou zachyceny inzulitidou, tedy infiltrovány buňkami typickými pro zánět (T helper (T_{H1}), makrofág (MF)). Na povrchu β buněk se exprimují MHC glykoproteiny I. (zvýšená exprese) a II. (u zdravých neexprimovány) třídy. Přítomnost MHC II. třídy může spustit autoimunitní zánět a následnou inzulitidu (Gaglia et al., 2011). Okolo postižených ostrůvků hypertrofují kapiláry, představující tak cestu, kterou ve zvýšeném počtu invadují imunitní buňky, a nakonec vedou k zničení ostrůvků (De Paepe et al., 1992).



Obrázek 1: Struktura Langerhansova ostrůvku. Převzato z: (Anděl et. al. 2001)

1.3. Dědičnost

T1D se nedědí přímo, dědičné jsou pouze predispozice. Zda se onemocnění projeví, závisí také na exogenních vlivech. Škála genetického rizika a exogenních vlivů, které mohou být protektivní nebo rizikové, má Gaussovo rozložení. Vzájemnou kombinací vlivů genetických a vlivů prostředí (navíc v čase) je určeno, zda bude překročen práh, za nímž se započne T1D.

Riziko výskytu v běžné populaci je 0,1 - 0,4 %. Mezi sourozenci vzrůstá 12 až 100 krát, tj. na 5 až 10 % (Redondo et al., 2001). Konkordance mezi monozygotními dvojčaty se pohybuje v rozmezí 23 - 53 %, zatímco u dizygotních dvojčat je od 2,5 do 11 % (Kyvik et al., 1995). Genetické riziko u příbuzných diabetického probanda souvisí s počtem alel sdílených s tímto probandem: nejvyšší riziko mají monozygotní dvojčata (sdílející vždy 100 % alel), nižší je pozorováno u dětí probanda nebo u sourozenců probanda (50 % alel). S rostoucí vzdáleností v rodokmenu probanda strmě klesá i riziko T1D. Na základě pozorování je vytvořen model jednoho hlavního lokusu s několika lokusy menšího významu, které působí epistaticky (Onengut-Gumuscu and Concannon, 2002).

1.4. Imunitní faktory

Autoimunitní onemocnění je výsledkem selhání regulace imunitního systému. Imunitní systém představuje bezpečnostní systém organismu. Jeho úkolem je rozpoznání a efektivní odstraňování cizorodých látek, mikroorganismů a abnormálních buněk. Tvoří je buňky, které můžeme rozdělit na několik základních typů: lymfocyty (T, B, NK); myeloidní buňky (monocyty, makrofágy, granulocyty) a další druhy, příkladem uvedu dendritické buňky. Buňky imunitního systému (IS) spolu komunikují prostřednictvím relativně malých signálních molekul – cytokinů nebo vlastním kontaktem skrz povrchové receptory (CD, TLR). Každý buněčný typ lze charakterizovat podle spektra exprimovaných cytokinů nebo receptorů. Imunitní regulace je spleť komunikační sítě.

1.4.1. Imunitní faktory buněčné

Mezi buněčné typy zapojené do vzniku T1D patří monocyty a jejich deriváty makrofágy a dendritické buňky. Dalším z klíčových typů jsou T lymfocyty.

1.4.1.1. Monocyty

Monocyty cirkulují v krvi, kostní dřeni, slezině. Představují buňky IS vybavené chemokinovými receptory a receptory rozpoznávajícími patogeny. Tyto receptory zprostředkovávají migraci z krve do tkání během infekce. Mezi efektorové funkce monocytů patří produkce prozánětlivých cytokinů a fagocytóza buněčných a toxických molekul. Asi nejzajímavější na monocytech je jejich **schopnost rozlišovat se** do zánětlivých dendritických buněk nebo makrofágů. Diferencují se s vysokou účinností během zánětlivých stavů. Migrace monocytů do tkání a jejich diferenciace na dendritické buňky nebo makrofágy je určena zánětlivým prostředím a přítomností patogenů. Monocyty a buňky všeobecně tyto signály rozeznávají pomocí svých povrchových receptorů. V závislosti na nebezpečí, které organismu hrozí, se monocyty dokážou diferencovat do širokého spektra efektorových buněk s antipatogenními účinky. Podílejí se proto jak na obraně proti virům, tak proti mikrobům (Taylor and Gordon, 2003).

Cirkulující monocyty jsou různé, mají nestejnou expresi receptorů a rozdílnou fagocytární schopnost. V současnosti rozlišujeme tři subpopulace monocytů: klasickou, neklasickou a přechodnou (intermediate) na základě míry exprese receptorů CD14 a CD16

(Ziegler-Heitbrock et al., 2010). CD14 je koreceptorem TLR4 a MD2 (lymfocyte antigen 96, asociován s TLR, umožňuje reakci na LPS). CD14 se podílí na detekci bakteriálního LPS (Hailman et al., 1994). CD16 je Fc γ receptorem vázajícím IgG protilátky (Hazenbos et al., 1996). Klasické monocyty vykazují vysokou expresi receptoru CD14 $^{++}$, CD16 neexprimují (CD16 $^{-}$). Koexpresi CD14 a CD16 v rozdílném poměru (CD14 $^{+}$ CD16 $^{++}$) nalezneme u monocytů neklasických a u přechodných (CD14 $^{++}$ CD16 $^{+}$) je poměr CD14/CD16 převrácený (Passlick et al., 1989). Monocyty jsou profesionálními fagocyty. Exprimují MHC II. třídy, receptory pro oblast Fc imunoglobulinu (CD64, CD32), receptor pro IFN- γ a další cytokiny. Komunikují s lymfocyty jako APC (MHC I. a II. třídy).

Aktivované lymfocyty pak vylučují faktory, které ovlivňují funkce a diferenciaci monocytů a jejich derivátů. Cytokiny tvořené monocyty a jejich deriváty zase ovlivňují odpovědi lymfocytů. Mají tedy ústřední význam pro zahájení a regulaci imunitní odpovědi a jsou významným zdrojem sekretovaných cytokinů.

1.4.1.2. Dendritické buňky

Dendritické buňky (DC) jsou považovány za neúčinnější buňky předkládající antigen. V organismu se vyskytují ve dvou formách: zralé a nezralé. V nezralém stavu jsou vysoce fagocyticky účinné, jako maturované disponují velkou kapacitou produkovaných cytokinů.

Nezralé DC průběžně pohlcují odumřelé buňky zdravých tkání a molekuly rozpuštěné v mezibuněčné tekutině. Pohlcené molekuly zpracují a následně je prezentují na svých povrchových MHC molekulách. T lymfocyty, které prezentované autoantigeny rozeznávají, jsou zcela utlumeny nebo se z nich tvoří regulační lymfocyty (T $_{reg}$). T $_{reg}$ imunitní reakce vůči danému autoantigenu aktivně potlačují (Dieckmann et al., 2001). Význam nezralých dendritických buněk spočívá také v zachovávání tolerance vůči vlastním tkáním. Zralými se DC stávají po rozeznání nebezpečného podnětu pro organismus (patogen, buňka zahynulá nekrózou).

Zrající DC ztrácejí schopnost pohlcovat částice, zvyšují expresi MHC proteinů, kostimulačních molekul (CD80, CD86), adhezivních molekul a cytokinů (IL-1, IL-6, IL-12, TNF) (Mihret et al., 2011, López-Albaitero et al., 2009). Stávají se tak vysoce účinnými APC. Pouze zralé DC dokážou aktivovat naivní lymfocyty (tedy ty, jež se doposud neseťkaly s antigenem). Zralosti dendritické buňky dosahují během 48 hodin a to ireverzibilně. Ve

zralém stadiu vydrží 2 až 3 dny a pak hynou apoptózou (Chen et al., 2007). Hlavními růstovými a diferenciacními růstovými faktory jsou IL-4 a GM-CSF (granulocyte macrophage- colony stimulating factor (Martinez et al., 2012, Hettihewa, 2011). DC exprimují většinu toll-like receptorů (TLR). Takto charakterizovaná subpopulace DC buněk je označována jako myeloidní (mDC).

Další známou subpopulací jsou plazmacytoidní DC (pDC) s růstovými faktory CD40L a IL-3. Na svých površích exprimují hlavně receptory nukleových kyselin TLR-7, TLR-9. Po setkání s viry produkují velké množství interferonu α (Kawai and Akira, 2006). Také u nich dochází po stimulaci k maturaci a přeměně v účinné APC pro antigenně specifické T lymfocyty.

1.4.1.3. Makrofágy

Jsou to rezidentní tkáňové buňky, zapojené do tkáňové homeostázy prostřednictvím fagocytózy apoptotických buněk a produkce růstových faktorů. Makrofágy jsou vybaveny širokou škálou receptorů rozpoznávajících patogeny, díky čemuž s vysokou účinností fagocytují a indukují produkci zánětlivých cytokinů (Allewa et al., 2000). Makrofág bývá první buňkou imunitního systému, která se dostává v těle do místa zánětu. Provádí tam rychlou a nespecifickou reakci (Hutchings et al., 1990). Jeho základní funkcí je fagocytóza, od které se odvíjí jeho další funkce. Sem patří prezentace antigenu T lymfocytům, regulace zánětu, destrukce mikroorganismů, odstraňování mrtvých buněk a cytotoxická reakce. Stimulací T lymfocytů se podílí na iniciaci adaptivní imunity (Stosic-Grujicic et al., 2008).

1.4.1.4. T lymfocyty

T lymfocyty jsou klíčovým hráčem ve vývoji T1D. Interagují s makrofágy, dendritickými buňkami a β buňkami pankreatu a společně vytvářejí spleť vzájemných regulací. T lymfocyty mohou ničit β buňky, stejně tak i vytvářet klony zabraňující vzniku T1D. T lymfocyt je složka adaptivní imunity. Dozrívá v brzlíku. Ničit β buňky může přímo kontaktem buňka-buňka nebo prostřednictvím cytokinů. Podílí se na regulačních mechanismech, migraci a maturaci buněk nespecifické imunity (Tsai et al., 2008). Kromě jiných na svém povrchu exprimuje T buněčný receptor (TCR). Pomocí TCR rozpoznává antigeny navázané na MHC (Stone et al., 2009). T lymfocyty se na základě povrchových CD markerů rozlišují do několika typů. T_H (helper, pomocné) lymfocyty stimulují prostřednictvím

cytokinů imunitní reakci. Rozdělují se na T_{H1} – prozánětlivé, stimulující buněčný typ odpovědi, a T_{H2} – humorální, jež spolupracují s B lymfocyty a tato spolupráce vede až k B lymfocytární tvorbě protilátek. Takové rozdělení je značně zjednodušené, protože existuje celá plejáda přechodných T_H typů (Szczycka et al., 2012). Dalším typem je T_C (cytotoxický T lymfocyt) schopný ničit buňky napadené virem nebo parazity (Milstein et al., 2010). Na závěr je třeba uvést T_{reg} (regulační) T_H lymfocyty.

1.4.2. Mediátory

Regulátorem buněčné komunikace jsou **cytokiny**. Obecně lze charakterizovat následovně. Z biochemického hlediska jde o glykoproteiny. Na cílové buňky působí reakcí s příslušným povrchovým receptorem. Účinné jsou již při extrémně nízkých koncentracích (10^{-9} až 10^{-12} M). Účinky cytokinů jsou pleiotropní (mnoho různých účinků) a redundantní (více cytokinů se stejným účinkem) (Vlahopoulos et al., 1999). Pro řadu účelů je zřejmě nutné koordinované spolupůsobení několika různých cytokinů. Tyto složité a dosud málo prozkoumané synergistické a antagonistické interakce v cytokinovém systému označujeme jako cytokinovou síť. Produkovány jsou množstvím buněk různého typu (Yeung et al., 2012). Z evolučního hlediska jsou značně konzervované, nepodléhají výrazným změnám během fylogeneze (Zdanov et al., 1995).

Klasifikace cytokinů je složitá vzhledem k pleiotropnosti účinků a diverzitě produkujících buněk. V praxi se cytokiny dělí do několika skupin, které se částečně překrývají. Patří sem hematopoetické růstové faktory, interferony, interleukiny a chemokiny. Napříč touto klasifikací lze vytvořit skupinu prozánětlivých cytokinů, podporující zánětlivou reakci IS, a skupinu cytokinů podporujících buněčně zprostředkovanou (T_{H1}) odpověď. Mezi prozánětlivé cytokiny patří: TNF, IL-6, IL-1 α a β , IL-8, IL-12, IL-18, IL-19, IL-22, IL-33, MIF (Yeung et al., 2012). Ve druhé skupině se uplatňují: IL-1, IL-2, IL-15, IL-16, IL-23, IL-27, IL-31, CD70, IFN- γ , GM-CSF, TNF, IL-1 β (Johnsen-Soriano et al., 2010).

Cytokiny působí skrze své receptory, které se skládají ze dvou, někdy i tří podjednotek. Jedna z podjednotek specificky váže cytokin, zatímco zbylé podjednotky zajišťují spojení se signalizačními intracelulárními molekulami. Signalizační podjednotka bývá sdílena několika různými cytokinovými receptory. Na základě těchto sdružení určujeme cytokinové receptorové rodiny. Jedna z rodin například sdružuje receptory pro IL-3, GM-CSF a IL-5 (Eizirik et al., 2012).

Mezi další mediátory IS a klíčové hráče T1D patří **ROS** (reactive oxygen species, volné kyslíkové radikály) a **NO** (oxid dusnatý) (Lee et al., 2009). ROS působí na buňku a její nitrobuněčné struktury, kdy toto působení mívá destruktivní a patologické následky. ROS jsou nestabilní molekuly s velmi krátkou dobou existence a vysokou chemickou reaktivitou vůči okolním strukturám. Jejich nestabilita a vysoká chemická reaktivita je dána přítomností volného elektronu ve valenční vrstvě elektronového obalu. Stabilita normálních molekul je dána existencí elektronů, které se vyskytují v elektronových vrstvách v párech. ROS mají afinitu především k nenasyceným mastným kyselinám, které jsou hlavní součástí buněčných membrán. V případě navázání kyslíkového radikálu na nenasycenou mastnou kyselinu buněčné membrány dojde k předání elektronu mezi radikálem a mastnou kyselinou, ta se stává radikálem a celý děj předávání elektronů pokračuje řetězově mezi jednotlivými chemickými strukturami membrány až do doby, kdy dojde k jejímu úplnému rozrušení a tím k zániku buňky nebo organely. ROS působí také na protein - způsobují agregaci řetězců, která vyústí ve změny v reaktivitě a působení proteinů. Destruktivní účinky mají i na nukleové kyseliny. NO patří mezi ROS, od ostatních mediátorů se odlišuje schopností volně a rychle difundovat přes membrány (Maechler et al., 1999).

1.4.3. Receptory

Receptory jsou transmembránové proteiny (membránou prochází úsek zhruba dvaceti hydrofobních aminokyselin) schopné zachytit na extracelulární straně ligand, ke kterému mají afinitu, a přenést o tom informaci do cytoplasmy. Na receptory navazují mechanismy interpretující změnu jeho stavu. Takovým pochodům říkáme signalizační kaskády. Nakonec musí být signál odstraněn. Klasifikovat receptory lze na základě struktury nebo funkce. Funkční skupiny spojené s T1D jsou antigenně specifické receptory (TCR) (Serreze et al., 2004), adhezivní molekuly (integriny), receptory cytokinů a chemokinů, regulační signalizační receptory (CD4, CD8) (Tsai et al., 2008), receptory mikrobiálních složek CD14 (Cipolletta et al., 2005), TLR (Karumuthil-Meethil et al., 2008) a receptory prezentující antigen (MHC) (Serreze et al., 2004). V dalších kapitolách bude detailně rozvedena strukturu MHC a TLR.

1.5. Exogenní faktory T1D

Zásadní úlohu negenetických faktorů podporuje několik faktů. Mezi ně patří neúplná konkordance výskytu T1D u monozygotních dvojčat a existence lokálních epidemií T1D. Případy výskytu onemocnění se hromadí v místě i čase. Je dlouhodobě známo, že se T1D manifestuje více na podzim a v zimě než na jaře a v létě (Waldhoer et al., 1997) (Karvonen et al., 1996). Sezonalita je pravděpodobně způsobena sezonními infekcemi a její vliv spočívá v urychlení dlouhodobě trvající destrukce β buněk.

Mezi rizikové faktory patří infekce enteroviry (Coxsackievirus typ B) a virem zarděnek. Viry mohou zničit β buňky buď přímo svým cytolytickým účinkem, nebo spuštěním autoimunitního zánětu. Mohou patrně také dlouhodobě perzistovat v β buňkách a interferovat s jejich metabolickými a sekrečními funkcemi (Hyöty and Taylor, 2002).

Další hlavní předpokládané faktory jsou nutriční faktory. Mezi ně řadíme kravské mléko ve stravě kojenců. Krysy krmené proteiny kravského mléka měly asi třikrát častější incidenci T1D než krysy krmené semisyntetickou dietou bez mléčných proteinů (Elliott and Martin, 1984). Mezi kravské proteiny patří bovinní sérový albumin (BSA) (Miyazaki et al., 1995) a hovězí inzulin (Vaarala et al., 1998). Jako další rizikový faktor může působit vyšší věk matky spolu s nižším pořadím narození (Sumnik et al., 2004).

Mechanismy, kterými se exogenní faktory podílejí na prolomení autotolerance, jsou různé. Může se uplatnit molekulární homologie (Vreugdenhil et al., 1998) nebo poškození tkání s uvolněním sekvestrovaných či skrytých autoantigenů. Možná je také indukce interferonů s následnou zvýšenou expresí HLA molekul a tedy intenzivnější prezentací vlastních skrytých autoepitopů. Dále porucha produkce a regulace cytokinů a i vyčerpání přirozené imunity s následnou nepřiměřenou aktivací T lymfocytů (Hyöty and Taylor, 2002). Negenetické rizikové faktory jsou jednotlivě slabé a je jich velké množství. Riziko je tedy rozdrobeno mezi špatně definované faktory, jejichž jednotlivý příspěvek je nízký. Negenetické faktory je třeba studovat s přihlédnutím k faktorům genetickým. Na základě nálezů slabých asociací negenetických faktorů nemohou být navrženy žádné preventivní strategie.

1.6. Zvířecí modely

Modelové organismy výrazně přispěly k pochopení procesů vedoucích k rozvoji T1D. Experimentálně se T1D vyvolává buďto chemickými látkami (streptozotocin a cyclophosphamid u geneticky vnímavých myších kmenů) nebo genetickými manipulacemi (transgenní myši). Dva hlodavčí modely (**BioBreeding** potkan, **Non-Obese Diabetes** myši) našly širokého využití jako modelové organismy pro pochopení patofyziologie T1D. Oba modely se podobají lidem. Jsou u nich přítomny ostrůvkové AG-specifické CD4 a CD8 T lymfocyty a genetická vazba k T1D. Stejně jako u lidí jsou specifické genové produkty MHC zapojeny do rozvoje T1D. Vedle MHC lokusu přispívají k rozvoji onemocnění i ostatní lokusy. Pro BB potkany jich není méně jak 12 a u NOD myši bylo nalezeno více jak 20 lokusů, které obsahují například polymorfismy v genech pro antigen cytotoxické T lymfocyty, IL-2, PTPN 22. Pro oba modely platí společné přispění enviromentálních a genetických faktorů v patogenezi T1D (Van Belle et al., 2009). Jednotlivé modely shrnuje Tabulka 2.

Tabulka 2: Souhrn myších modelů T1D (Van Belle et al., 2009)

Modely indukované patogeny	Spontánní modely	Transfer (přenos) modely	Farmakologické modely
RIP-LCMV-GP (C57Bl/6, Balb/c)	NOD myši	NOD lymphocyty přenesené do imunodeficientních NOD myši	Alloxan
RIP-LCMV-NP (C57Bl/6, Balb/c)	BDC2.5/B6g7	CD4+ BDC2.5 TCR Tg přenesené do novorozeneých mláďat	Streptozotocin
HIP-LCMV-NP (NOD)	Dvojité Tg-modely: DO11.10 × RIP-mOVA P14 × RIP-LCMV-GP TCR-HA × Ins-HA	Smarta CD4+ přenesené do RIP-LCMV-GP myši P14 CD8+ into RIP-LCMV-GP	PANIC-ATTAC myši

Tg: transgenní; RIP: krysí insulinový promotor; HIP: lidský insulinový promotor; OVA: Ovalbumin; BDC: Barbara Davis Center; HA: Hemaglutinin; LCMV: virus lymphochoriomeningity; GP: Glykoprotein; NP: nukleoprotein; PANIC-ATTAC: apoptóza β buněk pankreatické ostrůvků zprostředkovaná cílenou aktivací kaspázy-8

2. Genetika T1D

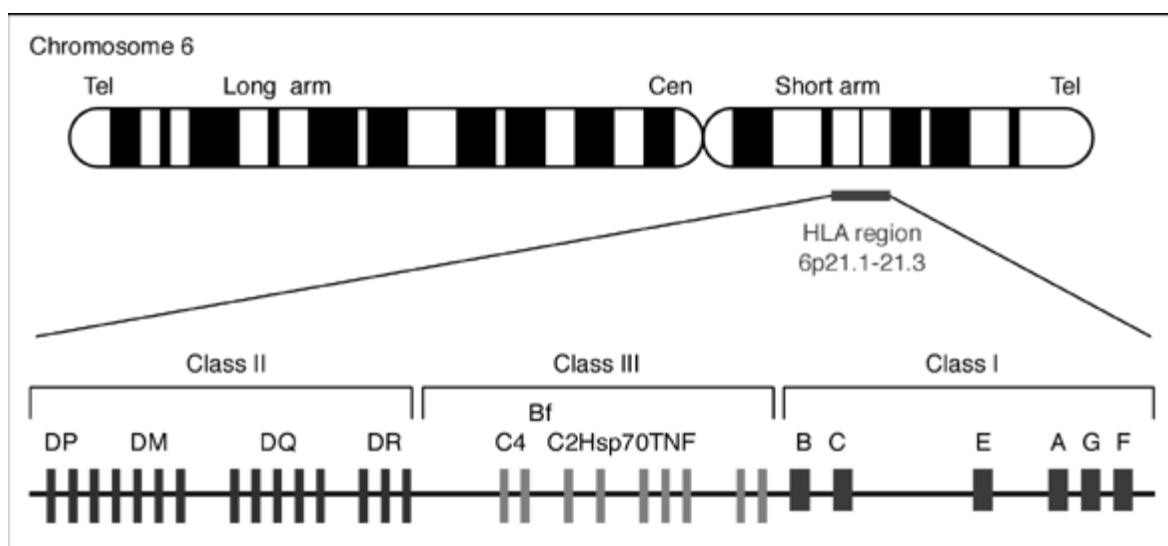
T1D je typická multifaktoriální (souběžné působení genetických a negenetických vlivů), polygenní (podíl více genů na vnímavosti) choroba. Jeho vznik je výsledkem interakce genetických a negenetických faktorů. Genetické faktory jsou zodpovědné za přibližně jednu polovinu rizika (Kyvik et al., 1995). K tomuto poměru se dospělo pomocí familiálních studií. Poznaných genů či genových komplexů asociovaných s T1D na základě celogenomových studií je okolo čtyřiceti (Barrett et al., 2009). Nejsilněji je T1D asociován s geny pro MHC II. třídy. Tento podíl dosahuje jedné poloviny (Undlien et al., 2001). Ze všech možných vlivů má čtvrtinový podíl na vzniku T1D. Mezi další geny asociované s T1D patří gen pro inzulin *INS*, protein tyrozinofosfatázu *PTPN22*, cytotoxický T lymfocytární antigen *CTLA4*, receptor pro IL-2 *IL2R* a geny pro transkripční faktory Foxp3 a AIRE (viz dále). Lze se také setkat s označením genů *IDDMx* (x je celé číslo). Potom gen pro MHC II označujeme *IDDM1* (Todd et al., 1987), pro inzulin *IDDM2*. Pro názornost přikládám tabulku s osmnácti T1D asociovanými lokusy známými v roce 2008.

Tabulka 3: Geny asociované s T1D (Cejkova, 2008)

Lokus	Chromosom	Gen/marker
IDDM 1	6p21	HLA
IDDM 2	11p15.5	INS
IDDM 3	15q26	D15S107
IDDM 4	11q13	ZFM1 (Zinc finger protein 162)
IDDM 5	6q25	SOD2 (superoxid dismutase)
IDDM 6	18q12-q21	DCC associated gene, ZNF236, bcl-2
IDDM 7	2q31	NEUROD1 IGPR (islet specific glucose 6 – phosphatase) IL-1 gene cluster, HOXD8, GAD1, GALNT3
IDDM 8	6q27	
IDDM 9	3q21-q25	
IDDM 10	10p11.2-q11.2	GAD2
IDDM 11	14q24.3-q31	ENSA (alpha-endosulphine)
IDDM 12	2q33	<i>CTLA-4</i> , CD28, ICOS
IDDM 13	2q34	NRAMP1
IDDM 14		
IDDM 15	6q21	Transient neonatal diabetes
IDDM 16	14	Ig heavy chain
IDDM 17	10q25	D10S1750-D10S1773
IDDM 18	5q31.1-33.1	ILB12

2.1. Genový komplex MHC

MHC byl nejprve popsán jako soubor genů, jejichž produkty jsou klíčové pro histokompatibilitu – schopnost transplantátu přilnout se v organismu jiného jedince. Rozsáhlý genový komplex MHC kóduje kromě genů pro MHC i geny pro některé složky komplementu, cytokiny (TNF), podjednotky proteazomů, podjednotky proteinových pump a stresové proteiny (HSP, proteiny tepelného šoku) (Obrázek 2). Celkem obsahuje více jak 220 genů. Nachází se u člověka na krátkém raménku chromosomu č. 6 (6p21.3) (název HLA ~ human leukocyte antigen) a u myši na chromosomu č. 17 (H-2) (<http://hla.alleles.org/>).



Obrázek 2: Genová mapa HLA. Převzato z: (URL 1)

2.2. Polymorfismus HLA

HLA systém je nejpolymorfnější známou oblastí lidského genomu. Existují desítky, stovky až tisíce různých alelických forem jednotlivých izotypů. Například v dubnu roku 2012 bylo známo 165 alel DQB1 a 1094 alel pro gen DRB1 (<http://hla.alleles.org/>). Tyto alelické formy se dědí kodominantně, takže jedinec má na povrchu svých buněk po dvou alelických formách HLA-DR, -DQ atd. Jednotlivé alelické formy se mezi sebou odlišují v záměně několika aminokyselin nejčastěji ve vazebném místě pro antigen (AG) nebo jeho nejbližším okolí. Alely se zřídka liší jen v jednom nukleotidu, naopak nejčastější počet substitucí mezi dvěma náhodně vybranými alelami je 10-20. Tak se nositelé různých alel liší v repertoáru antigenů, které umějí s dostatečnou afinitou vázat a prezentovat (Salamon et al., 1999).

2.3. Funkce HLA

Z hlediska funkce jsou MHC glykoproteiny specializované receptory na buněčných membránách, které vážou části peptidových AG a prezentují je T lymfocytům. Ty je rozpoznávají pomocí svých TCR (Serreze et al., 2004).

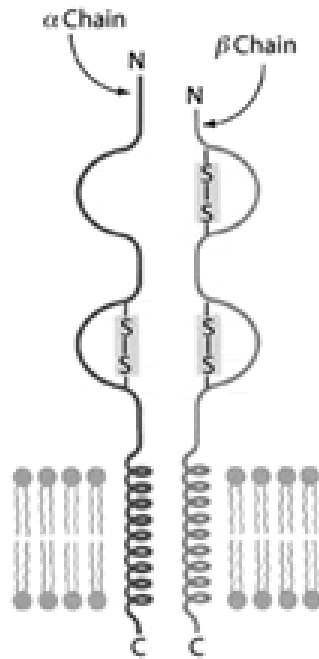
2.4. Klasifikace a exprese HLA

Podle funkce, výskytu a syntézy se molekuly HLA dělí na dvě třídy, první a druhou. Molekuly HLA I. třídy prezentují peptidy zejména intracelulárního původu, a to CD8 (cytotoxickým) T lymfocytům. Exprimovány jsou všemi jadernými buňkami organismu (Panter et al., 2012). Molekuly HLA II. třídy prezentují peptidy CD4 (pomocným) T lymfocytům a to peptidy původu extracelulárního a membránového. Za fyziologických podmínek se exprimují jen na buňkách prezentujících AG (DC, monocyty, MF). HLA II. třídy tvoří pět izotypů: DR, DQ, DP, DM a DO (van Ham et al., 1997). Pro dispozice k T1D je důležitá alela DQ a její riziko je modifikováno alelou pro DR (Sanjeevi et al., 1996). Exprese HLA-DR molekuly je obecně asi o řád vyšší než HLA-DQ, která má zase o řád vyšší expresi než HLA-DP (Teyton et al., 1987).

2.5. Struktura HLA II. třídy

HLA II. třídy se skládají ze dvou nekovalentně asociovaných transmembránových podjednotek, α a β . N-terminální domény obou řetězců (α_1 a β_1) společně vytvářejí vazebné místo pro peptidy (Brown et al., 1993).

Geny kódující řetězce α se označují písmenem „A“ (DQA1), zatímco pro řetězce β písmenem „B“ (DRB1), viz Obrázek 3. Geny pro řetězce β jsou polymorfnější, řetězce β jsou tedy strukturně různorodější než α řetězce (Jonsson et al., 1987).



Obrázek 3: Struktura molekuly MHC II. Třídy Převzato z: (URL 2)

2.6. HLA asociace s T1D

Riziko diabetu je primárně určeno genotypem **HLA-DQB1**, **DQA1** s přispěním subtypů **DRB1*04**, pokud je alela DRB1*04 přítomna (Aly et al., 2006, Erlich et al., 2008). V oblasti DQB1 jsou významnými rizikovými faktory především alely DQB1 ***0302** (pro severské populace) a DQB1***02** (v jižních populacích) (Erlich et al., 2008). Mechanismus rizika přinášeného HLA-DQ spočívá v přítomnosti některého z kódovaných heterodimerů HLA-DQ, přičemž jejich efekt nelze jednoduše vysvětlit přítomností či absencí jednotlivé aminokyseliny v daném řetězci (Rønningen et al., 1991a). Rizikovost nebo protektivita je přinášena celým heterodimerem DQ (Wegener et al., 1992).

Silným protektivním faktorem v oblasti DQB1 je alela DQB1***0602** (Pugliese et al., 1995). Alela DQB1*0602 je jediná z alel běžných DR2 haplotypů, která je přítomna na silně protektivních haplotypech konzistentně v populacích kavkazských, asijských, afrických i mexických, což dokazuje její primární roli. Protektivita DQB1*0602 se jeví dominantní nad vlivem ostatních molekul a chrání před destruktivním průběhem inzulitidy: osoby s DQB1*0602 mohou mít autoprotilátky proti GAD65, ale tyto protiátky u nich mohou přetrvávat mnoho let, aniž by značily destrukci buněk (12th International HLA workshop, 1997).

DQA1 je stejně jako **DQB1** primární faktor, ačkoli to není z analýz europoidní populace ihned zřejmé. Jeden z důkazů může být mezipopulační srovnání, kdy v afro-karibské populaci **DRB1*07-DQB1*02** haplotyp přináší riziko T1D, zatímco tento haplotyp není rizikový u europoidní populace. Rozdíl mezi těmito dvěma haplotypy je právě v **DQA1** alele: v afrokaribské populaci je to **DQA1*0301**, kdežto v europoidní je to **DQA1*02** (Rønningen et al., 1991b).

Efekt molekuly **DQ** je modifikován subtypem alely **DRB1*04** nesené na **DQB1*0302-DQA1*03-DRB1*04** haplotypu. Různé subtypy **DRB1*04** jsou asociovány s rizikem, které se navzájem zásadně liší. **DRB1*0403** a **DRB1*0406** jsou známy jako silně protektivní faktory (např. proto **DQB1*0302** není v Japonsku rizikové: většina Japonců nesoucích **DQB1*0302** nese též **DRB1*0403** nebo ***0406**), **DRB1*0404** je neutrální a riziko stoupá v řadě **DRB1*0402 - DRB1*0401 - DRB1*0405**. Rizikovost či protektivita některých z těchto alel není univerzální (Ge et al., 2011).

Míra genetického rizika se odráží nejen v tom, zda jedinec diabetem onemocní, ale i v době manifestace diabetu. T1D je v tomto ohledu klinicky heterogenní onemocnění. Je známo, že mezi pacienty manifestujícími se v raném dětství je více některých rizikových alel, haplotypů či genotypů než u pacientů manifestujících se později nebo v dospělosti. Ani protektivní efekt alely **DQB1*0602** není u pacientů manifestujících se v dospělosti tolik patrný (Graham et al., 1999).

2.7. Non HLA geny

Nejvýznamnější jsou z non-HLA genů asociovány s T1D geny bezprostředně spřažené s T lymfocyty. Výjimku představuje gen pro inzulin a *AIRE*. Kupříkladu gen kódující transkripční faktor **FoxP3** (forkhead box protein) má supresivní účinky na vývoj T_{reg} a tedy i svůj podíl na tvorbě self-tolerance. Defektní alely *FoxP3* jsou asociovány s rozličnými autoimunitami (Bandukwala et al., 2011). Další gen v souvislosti s T lymfocyty kóduje receptor IL-2 (**IL2RA**), protože tento cytokin ovlivňuje růst a přežití T_{reg} (Qu et al., 2007). Asociaci s T1D vykazují také gen pro T lymfocytární antigen (**CTLA4**, Cytotoxic T Lymphocyte Antigen) (Nisticò et al., 1996) a gen pro jeden z inhibitorů aktivace T lymfocytů (**PTPN22**, Protein Tyrosine Phosphatase, non-receptor type 22) (Bottini et al., 2006).

Gen pro transkripční faktor **AIRE** (Autoimmune Regulator) exprimovaný v thymu medulárními epiteliárními buňkami má vliv na vznik autotolerance tím, že umožňuje transkripci genů, které vytvářejí bílkoviny obvykle exprimované jen v periferních tkáních. Transkripční faktor AIRE je tvořen také v dendritických buňkách. Inzulín exprimovaný AIRE+ dendritickými buňkami a předkládaný T lymfocytům v thymu umožňuje negativní selekci jejich inzulín-reaktivních klonů (Grupillo et al., 2012).

Asociace T1D a genu pro inzulín je založena na jeho variabilním počtu tandemových repetitivních (VNTR) v promotorové oblasti genu. Délka VNTR v promotoru ovlivňuje míru transkripce genu. Formy s delšími VNTR jsou pak i ve větší míře k dispozici při utváření autotolerance v thymu (Barratt et al., 2004). Tím ovlivňují úspěšné ustavení centrální tolerance vůči inzulínu a zvyšují tak nebo snižují riziko vzniku diabetu. Protektivní varianta inzulínového genu s dlouhými VNTR se chová dominantně nad alternativní variantou rizikovou (Anderson et al., 2002).

3. Monocyty - klíčoví hráči mnoha tváří

V této kapitole představím zejména molekulární mechanismy migrace, diferenciací monocyty, cytotoxického působení makrofágů, rozvoj autotolerance prostřednictvím dendritických buněk. Odpověď monocyty na signály z prostředí je značně plastická (rozdíly v expresi molekul, diferenciací). Molekulární mechanismy stále zůstávají do jisté míry zahaleny tajemstvím, ale mnohé je známo. Vybral jsem několik studií, kterými se pokusím mechanismy přiblížit.

3.1. Vývoj monocyty a jeho prekurzory

Progenitory a diferencované buněčné populace lze pozorovat pomocí vícebarevné (multi-color) fluorescence. Barevné odlišení je založeno na rozdílné expresi povrchových proteinů. Touto metodou lze nastínit vývoj monocyty *in vivo* (Varol et al., 2009). Získaná data naznačují, že monocyty, makrofágy a dendritické buňky pocházejí *in vivo* z hematopoetických kmenových buněk (hematopoetic stem cell-derived progenitor) nacházejících se v kostní dřeni. Tyto multipotentní kmenové buňky se postupně diferencují na společné myeloidní prekurzory (CMPs, common myeloid progenitors), prekurzory granulocyty – makrofágů (GMPs, granulocyte – macrophage precursors) a nakonec na makrofágové – dendritické progenitorové buňky (MDPs, macrophage – dendritic cell progenitors). MDPs sdílejí s myeloidními prekurzory společné znaky a dále z nich mohou vzniknout monocyty a prekurzory dendritických buněk (common dendritic cells precursors – CDPs) (Liu et al., 2009). Zvláštní otázník tedy visí nad vývojem dendritických buněk. Ty mohou vzniknout nezávisle na monocyttech, ale stejně tak se mohou z monocyty diferencovat (Randolph et al., 1998).

V kostní dřeni vyvinuvší se monocyty vstupují do krevního oběhu, ze kterého při zánětlivých stavech vstupují do tkání. Zde dávají vzniknout subpopulacím makrofágů i zánětlivých dendritických buněk (Geissmann et al., 2003). Z kostní dřeni jsou monocyty rekrutovány pomocí chemokinu MCP-1, který rozeznávají svým povrchovým receptorem CCR2 (Serbina et al., 2008).

3.2. Prozánětlivý fenotyp

Vyšetřením monocytů získaných z krve diabetiků a porovnáním s kontrolní skupinou zdravých jedinců se pomocí protilátek blokujičích činnost některých vytipovaných cytokinů a pomocí detekce mRNA dospělo k tomu, že některé cytokiny jsou diabetickými probandy produkovány spontánně. Patří mezi ně IL-6 a IL-1 β . Tyto fungují jako induktory prodiabetogenních T_{H17} lymfocytů a podporují jejich expanzivitou. Blokování IL-6 a IL-1 β vyústilo ve snížení počtu T_{H17} lymfocytů a také se snížilo množství IL-17, který je těmito lymfocyty produkován (Bradshaw et al., 2009). *In vitro* měl IL-17 prozánětlivé a proapoptické účinky na buňky ostrůvků (Honkanen et al., 2010).

3.3. Makrofágy

Makrofágy (MF) mají heterogenní fenotyp, jehož různorodost se odvíjí od mikroprostředí, v němž se nacházejí. Fenotypem je myšlena rozdílná exprese proteinů, potažmo povrchových receptorů. Díky nim může MF interagovat s okolím, kterým je také zpětně utvářen. Fenotyp charakterizuje rovněž exprese cytokinů, chemoreceptorů a rozdílné efektorové funkce. Například v *in vitro* kultuře lidských monocytů se podáváním GM-CSF docílí diferenciaci v prozánětlivé makrofágy, podáváním M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) získáme makrofágy imunomodulační (Fleetwood et al., 2009).

3.3.1. Patogenní role makrofágů

Ačkoliv řada studií zdůrazňuje převažující roli T lymfocytů v patogenezi T1D, také existují práce, které podporují zapojení makrofágů. Histologické studie popsaly přítomnost makrofágů v ostrůvkových infiltrátech NOD myší. Inhibice influxu makrofágů do pankreatu zablokováním adhezivních receptorů na pankreatických buňkách zastavila vývoj T1D (Hutchings et al., 1990). Nezbyvá než si položit otázku, v čem spočívá důležitost přítomnosti makrofágů pro vznik T1D. Jednou z možností je poskytování antigenu autoreaktivním klonům T lymfocytů. Makrofágy by tak mohly předkládat například fagocytované zbytky z β buněk napadených a zničených viry nebo třeba i podléhajících běžnému tkáňovému obratu (Trudeau et al., 2000). Kromě zprostředkování antigenu však makrofágy mohou být i efektorovými buňkami a přímo β buňky ničit, či mohou fungovat jako rovnocenný spoluhráč T lymfocytům a na základě jejich vzájemných interakcí se podílet na řízení autoimunitních dějů probíhajících v pankreatu. Zmíněné interakce si zaslouží více rozvést.

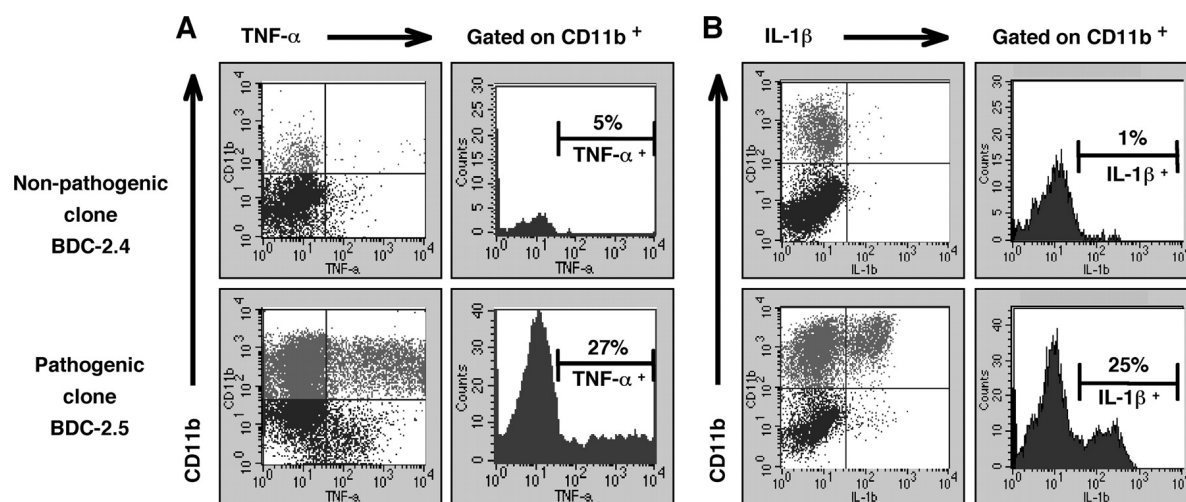
Nejdříve je však nutné definovat **inzulitidu**. Jde o zánětlivou infiltraci Langerhansových ostrůvků, kdy dochází ke zvýšenému lokálnímu průtoku krve a k nábore a hromadění aktivovaných leukocytů. Zánětlivé buňky se rekrutují koordinovaně, migrací z krevního oběhu do tkání. Migrace je řízena chemokiny (Willcox et al., 2009). Receptory pro chemokiny bývají sedmkrát membránou procházející G-spřážené receptory (vážou GTP).

Inzulitida je tedy charakterizována nahromaděním makrofágů a T lymfocytů v ostrůvcích. Tyto buňky za fyziologického stavu v těchto počtech pankreas neokupují, musí proto existovat mechanismy, které stojí za jejich náborem. Zda jsou prvními infiltrujícími buňkami T lymfocyty nebo MF není zcela jasné a možná ani podstatné. Oba buněčné typy dokážou produkovat chemokiny rekrutující zánětlivé buňky do ostrůvků. Podle Cantora a Haskinse diabetogenní CD4⁺ T lymfocyty jsou schopné produkovat chemokin CCL1, jehož receptorem je CCR8 exprimovaný na monocytech/makrofázích (Cantor and Haskins, 2007). Tento ligand/receptorový pár je mezi savci jedinečný ve své specifitě dané vysokou vzájemnou afinitou, která nebývá vždy obvyklá (Roos et al., 1997). Charakteristickým znakem chemokinových receptorů totiž je smíšená vazba s několika chemokiny. Interakce CCR8/CCL1 se zdá být klíčovou i v jiných autoimunitách než jen v T1D (Gonzalo et al., 2007, Fife et al., 2001).

Makrofágy rekrutované do pankreatu jsou aktivovány k produkci prozánětlivých cytokinů. Aktivovány jsou prostřednictvím IFN- γ a TNF- α , které jsou exprimovány T lymfocyty. Pod vlivem těchto cytokinů se tak z makrofágů stávají cytotoxické efektory. Aktivované makrofágy syntetizují TNF- α a IL-1 β , které jsou cytotoxické pro β buňky *in vitro*. IL-1 β spolu s TNF- α nebo s IFN- γ stimuluje β buňky k produkci oxidu dusnatého *in vitro* vyúsťující v jejich smrt. TNF- α má také schopnost up-regulace exprese adhezivních molekul a indukuje syntézu chemokinů (Cantor and Haskins, 2007).

Dále lze charakterizovat aktivované makrofágy cytokinovým profilem IL-12. Ten je exprimován ve zvýšené míře u NOD myší oproti NOR kmenům (Non-Obese diabetes Resistant). Exprese mRNA pro IL-12 v Langerhansových ostrůvcích se zvyšuje úměrně s destrukcí β buněk, zatímco *in vivo* neutralizace IL-12 blokuje rozvoj T1D. Účinek IL-12 pravděpodobně spočívá ve stimulaci T_{H1} odpovědi mechanismem zvýšení hladiny IFN- γ produkovaného infiltrujícími diabetogenními T lymfocyty (Alleva et al., 2000).

Aktivované MF v pankreatu také produkují chemokiny CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL6 (C 10) a chemokinové receptory. Takovéto receptory vážou ligandy exprimované diabetogenními T lymfocyty, které tak odpovídají na stimulaci svých TCR. Mezi MF exprimované chemokiny patří CCR5 schopný vázat MIP-1 α,β,γ a RANTES. Nejvyšší úroveň syntézy dosahuje receptor pro CCR8 a to až 5 krát více než v kontrolní skupině makrofágů izolovaných ze sleziny (Cantor and Haskins, 2007).



Obrázek 4: Obrázek znázorňuje produkci prozánětlivých cytokinů (TNF- α (A) nebo IL-1 β (B)) produkovaných makrofágy. Produkce byla analyzována průtokovou cytometrií. Analyzovány byly dva klony: nepatogenní BDC-2.4 a patogenní klon BDC-2.5. Procenta u histogramů uvádí podíl makrofágů pozitivních pro výrobu uvedeného cytokinu. Převzato z: (Cantor and Haskins, 2007)

Na patogenní roli makrofágů má významný vliv i MIF (macrophage migration inhibitory factor) patřící mezi prozánětlivé cytokiny. Během experimentů byly do NOD myši (akcelerované formy T1D) aplikovány anti-MIF protilátky. Blokáce vedla ke snížené náchylnosti vzniku T1D včetně inzulitidy a snížilo se i množství apoptotických β buněk. MIF je tedy nezbytný pro vývoj T1D. Exprimován je různými druhy buněk: aktivovanými MF, T lymfocyty, ale také různými neimunitními buňkami. Ve svých účincích je pleiotropní. Jeho nedostatek vede k snížené proliferaci a adhezivnosti T lymfocytů. U aktivovaných makrofágů snižuje produkci cytokinů asociovaných s T1D (IL-12, TNF- α , IL-1 β) a stejně působí i na buňky Langerhansových ostrůvků, kde snižuje produkci IL-18, TNF- α , IL-1 β a NO. Funguje také jako stimulant těchto buněk a to pro expresi IL-4 a TGF- β cytokinů s inhibičním účinkem na makrofágy a T_{H1} lymfocyty (Stosic-Grujicic et al., 2008).

3.4. Dendritické buňky

Jak je patrné z předchozí kapitoly, k účinné destrukci β buněk je nutná účast T lymfocytů. Tyto T lymfocyty musí být patologické, schopné reagovat proti vlastním tkáním. U zdravých jedinců jsou autoreaktivní klony eliminovány negativní selekcí v thymu, ve které hrají dendritické buňky klíčovou roli: předkládají AG. Určují, které T lymfocyty přežijí a vstoupí do oběhu, a které budou utlumeny (anergie) nebo zničeny (apoptóza, fagocytóza). Díky této důležité roli v organismu mohou DC způsobovat vznik T1D. Existuje množství odchylek v souvislosti s dendritickými buňkami, které jsou spojeny s T1D. Podobně jako u makrofágů, studium dendritických buněk a jejich interakcí s ostatními buňkami na molekulární úrovni přináší důležité informace, jež mají potenciál být využity k preventivním zásahům proti T1D.

3.4.1. Autoimunitní reakce

Protože jsou DC důležitým článkem pro zachování autotolerance, která je protektivním faktorem v souvislosti s autoimunitními chorobami, rozvedu blíže tyto dva pojmy. Imunitní systém má schopnost rozpoznat AG vlastních tkání a reagovat na ně. Vede-li taková odpověď k poškození tkáně, mluvíme pak o autoimunitním onemocnění. Autoimunitní reakce (AR) může být jak humorálního, tak buněčného typu. V prvním případě dochází k tvorbě protilátek. Buněčně zprostředkované AR jsou charakterizovány poškozujícím zánětem způsobeným T_c a T_{H1} lymfocyty, jejich cytokinovými produkty a aktivací makrofágů. Vznik autoimunitního onemocnění je podmíněn prolomením autotolerance, tedy mechanismů udržujících imunitní odpověď vůči vlastním tkáním ve fyziologických mezích. Tolerance je udržována na centrální a periferní úrovni. Nebezpečí vzniku AR je zvláště velké u AG specifických mechanismů právě proto, že vzniká obrovský repertoár receptorů s různou vazebnou specifitou na genové úrovni. Některé produkty vzniklé náhodnými rekombinačními a mutačními procesy pak mohou být snadno autoreaktivní.

3.4.2. Osídlení ostrůvků, nezralé DC

Izolací a zkoumáním ostrůvků izolovaných z myších kmenů byly získány následující informace. DC se většinou v pankreatu nacházejí v blízkosti cév a pobývají zde několik dní. Prostřednictvím svých výběžků aktivně zkoumají cévy a jejich okolí. Buňky cév ostrůvků tvoří na svém povrchu adhezivní molekuly CD54 (ICAM-1) a CD31 (PECAM-1), jež interagují s receptorem CD11, který je exprimován na povrchu infiltrovaných dendritických buněk. Analýze byly podrobeny diabetické i nediabetické myší kmeny. Průměrně se v jednom

ostrůvku objevuje 10 dendritických buněk. Pomocí protilátek lze zjistit, že exprimují CD11 b a c, F4/80 (lidský homolog je EMR1), MHC II a CD80 (B7-1). Na povrchu ostrůvkových dendritických buněk se exprimují v hojně míře chemokinové receptory: CCR5, CCR6, CXCR3 a CXCR4. Při analýzách se zjišťovala přítomnost i jiných povrchových molekul (CD4, ICOS-L, PD-L1 a 2, CD 40, CD 40L, B7-H2 a 3, CCR7 a 9, CXCR2). Tyto molekuly exprimovány nebyly nebo jen v minimálním množství. Získaná data naznačují, že DC izolované z ostrůvků jsou **nezralé** (iDC, immature dendritic cells) (Calderon et al., 2008).

Podával-li se streptozotocin (STZ) myším, jehož aplikací se navozují slabé zánětlivé stavy, došlo pak během několika dní k nárůstu počtu dendritických buněk v ostrůvcích. Osmý den se počet dendritických buněk zdvojnásobil. Druhé skupině myší byl podáván nejen STZ, ale byly také ozářeny radioaktivním zářením. Tato skupina vykazovala snížené počty dendritických buněk v ostrůvcích. Závěrem je, že při zánětu se množství dendritických buněk v ostrůvcích zvyšuje. Nově přichozí DC se diferencovaly z progenitorů v kostní dřeni a oproti běžnému stavu exprimovaly na svém povrchu zvýšené množství B7-2. Protein B7-2 (CD86) je jedním z členů tandemu CD80/CD86 exprimovaného na povrchu antigen prezentujících buněk a poskytující signál pro aktivaci a přežití T lymfocytů. Ty exprimují na svém povrchu receptory CTLA-4 a CD28, na které se jako ligandy váží CD80 a CD86 (Calderon et al., 2008).

3.4.3. Místo děje: lymfatická soustava

Lymfatická neboli mízní soustava člověka je jednosměrný systém vedoucí z mezibuněčných prostor do krve mízními cévami. Větší mízní cévy se označují jako mízovody. Mezi lymfatické orgány patří brzlík (thymus), imunokompetentní orgán pro T lymfocyty. Mízní (lymfatická) uzlina je součástí mízního oběhu a funkčně navazuje na mízní cévy. V uzlinách dochází k vychytávání cizorodých látek a antigenů. Dosahují velikosti 1 mm až 2,5 cm. Uzlina je složena z vazivového pouzdra, kůry a dřene. V kůře a dřeni se nacházejí zejména lymfocyty a DC. Korová vrstva je od dřene (medulla) oddělena tzv. parakortikální zónou, kde se zdržují T lymfocyty. Zde nejčastěji dochází k interakcím dendritická buňka – T lymfocyt.

3.4.4. Maturační stadia dendritických buněk, cross-talk s T lymfocyty

Interakce mezi dendritickými buňkami a T lymfocyty hraje klíčovou roli mezi imunitní odpovědí a tolerancí. Komunikace mezi těmito buňkami je komplexní, obousměrná a zprostředkovaná cytokiny nebo buněčnými povrchovými molekulami. Znalost regulačních mechanismů imunitní odpovědi vyvolané nebo inhibované prostřednictvím dendritických buněk a jejich interakce s T_{reg} lymfocyty by mohla být důležitá pro vývoj nových imunoterapeutických přístupů. Plně maturované DC stimulují T_{H1} odpověď (efektorové T lymfocyty), která je silně proliferativní. Maturované DC exprimují ve velké míře MHC II. třídy, CD80 a CD86, a produkují také velké množství IL-12. DC mohou umožnit vznik i supresorovým (CD8+) a T_{reg} (CD4+ CD25+) lymfocytům. Supresorové T lymfocyty vznikají po kontaktu s maturovanými plazmatickými i maturovanými dendritickými buňkami. AG je navázán na MHC II a není podpořen signálem nebezpečí. Supresorové T lymfocyty exprimují IL-10, jehož prostřednictvím utlumují efektorové T lymfocyty. V závislosti na vlastnostech mikroprostředí DC vyžívají v různé míře. Popsány byly nezralé, modulované i semi-maturované DC. Mezi faktory mikroprostředí patří přítomnost prozánětlivých cytokinů nebo signálů nebezpečí, vitamínu D3, cyklosporinu (imunosupresivní lék) a IL-10. Různě vyžralé DC se mezi sebou bohatě fenotypově odlišují, funkčně je lze rozdělit jednoduše na dvě skupiny: tolerogenní a efektorové. Jednotlivé typy DC jsou představeny v Tabulce 4.

Během navození tolerogenního stavu se uplatňuje IL-10. Působí inhibičně na APC tak, že down-reguluje MHC II a kostimulační molekuly. Inhibuje syntézu prozánětlivých cytokinů. V důsledku toho DC plně nematurují – působí tolerogenně. DC mají možnost inhibice efektorových T lymfocytů deplecí tryptofanu (nutrient). Deplece zvyšuje produkci kynurenových metabolitů (od kyseliny kynurenové). Tyto metabolity inhibují proliferaci T lymfocytů a indukují supresi aktivací GCN2 kinázy (Munn et al., 2005). Zajímavostí je, že u mladých NOD myši byl popsán defekt IDO (indolamine-2,3-dioxygenase) exprese (Grohmann et al., 2003) a dále, že přežití ostrůvkových štěpů prodlužovala zvýšená exprese IDO (Alexander et al., 2002). Možný podíl připadá také na inhibiční receptory dendritických buněk ILT3 (immunoglobulin-like transcript 3) a ILT4 (Suciu-Foca et al., 2005).

Tabulka 4: Přehled typů dendritických buněk

TOLEROGENNÍ	podporovaný T	výskyt MHC II	IL-12	výskyt CD80, CD86	jiný receptor
zralé pDC	CD8+	vysoký	+/-	-	
nezralé pDC	CD4+ CD25+	nízký	-	nízký	
nezralé mDC	CD4+ CD25+	nízký	-	nízký	
TSLP-zralé mDC	CD4+ CD25+	vysoký	-	vysoký	
modulované mDC	CD4+ CD25+	nízký	-	nízký	IL-10 +
Semi-mature mDC	CD4+ CD25+	vysoký	+/-	vysoký	IL-10 +/-
EFEKTOROVÉ					
plně maturované DC		vysoký	++	vysoký	

+ exprimovaný, - neexprimovaný, mature = zralý, pDC = plazmacytoidní, mDC = myeloidní

4. TLR

V poslední kapitole se budu věnovat Toll like receptorům. Rodina TLR receptorů se skládá z více než deseti členů (Palladino et al., 2007) a sdílí podobnost s receptorem pro IL-1 (Rock et al., 1998). Hlavní efektorovou funkcí TLR receptorů v organismu je indukce zánětlivé odpovědi (Zhang et al., 2010). Buňkám přirozeného imunitního systému umožňuje rozlišit cizorodé a nebezpečné molekuly, tzv. PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Mezi ně patří proteiny, sacharidy, lipidy a nukleové kyseliny. Jsou odvozeny z patogenů – virů, bakterií, hub a parazitů. TLR receptory jsou schopné vázat nejen takovéto exogenní molekuly, ale také endogenní. Ty vznikají jako reakce na zánět a poškození tkání. Tato poškození vznikají obvykle v malé míře během ochranného působení imunitního systému. Je-li reakce imunitního systému nepřiměřeně silná, výrazně poškozuje i vlastní tkáň. Mezi endogenní signály patří heat-shock proteiny (HSP) (Ohashi et al., 2000), HMGB1 (Park et al., 2004), β defensin (Vora et al., 2004). Nejčastěji se vážou na toll-like receptory 2 a 4.

Pro patogenezi T1D se zdají být důležité TLR 2, 4, 7, 8 a 9. TLR 9 je exprimovaný na endosomech plazmacytoidních dendritických buněk. Detekuje DNA (deoxyribonucleic acid) s hypometylovanými CpG ostrůvky (Zhang et al., 2010). Stimulace TLR 7/8 na plazmacytoidních dendritických buňkách vedla k odlišné signalizaci – zvýšené expresi INF-1 (Meyers et al., 2010), který může up-regulovat expresi INF- γ a podporovat tak T_{H1} buněčnou odpověď. Tato podpora se projeví zvýšeným počtem proti-ostrůvkových T lymfocytů a z ní vyplývající destrukce β buněk (Montoya et al., 2002). Up-regulované množství toll-like receptorů 4 na monocytech a myeloidních dendritických buňkách vedlo k zvýšené produkci IL-1 β , INF- γ a CXCL 10, které společně patří mezi prozánětlivé cytokiny (Meyers et al., 2010). Aktivované toll-like receptory 4 také indukují NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) signalizaci. NF- κ B patří do skupiny transkripčních faktorů, které se vážou na promotory RNA polymerázy II a ovlivňují tak expresi genů zapojených do regulace prozánětlivé odpovědi. Mezi indukované geny patří mimo jiné geny pro cytokiny TNF- α , IL-1 a IL-6 (Haas et al., 1990, Shakhov et al., 1990). TLR 2 rozeznává komponenty bakteriální stěny (lipoproteiny, peptidoglykany) a míra jeho exprese byla zvýšena u diabetiků podobně jako exprese toll-like receptorů 4 (Devaraj et al. 2008).

Klíčový význam TLR pro buňky přirozené imunity přiblížil Zhang (Zhang et al., 2010). Podle něj nepřítomnost TLR může zamezit vzniku zánětlivé odpovědi. V jeho pokusech s NOD myšimi kmeny deficientními pro TLR 9 -/- nedocházelo k výskytu T1D a

nebo byl výskyt v čase oddálen v porovnání s TLR 9 +/- sourozenci (Zhang et al., 2010). Stejně tak myši náchylné k lupus erythematoses byly chráněny před rozvojem onemocnění, pokud byly TLR 7 deficientní (Christensen et al., 2006).

Význam TLR receptorů pravděpodobně nespočívá jen ve schopnosti rozpoznat nebezpečí a zahájit odpověď, ale také ve schopnosti řídit vývoj dendritických buněk. Jak naznačila experimentální data, dendritické buňky tvořily rozdílné cytokiny v závislosti na signálech zprostředkovaných TLR receptory (Edwards et al., 2002). V reakci na *mycobacterium tuberculosis* produkovaly IL-12. Naopak, pokud se nacházely v prostředí s usmrcenými kvasinkami, exprimovaly IL-10 (Edwards et al., 2002).

5. Závěr

Snad každý v životě slyšel slovo diabetes nebo imunita. Ve své práci jsem se pokusil shrnout důležité poznatky o vlivu monocytů v patogenezi T1D. Vliv monocytů lze studovat na mnoha úrovních. Za vznikem T1D stojí genetické pozadí, které je s monocyty silně asociováno. Riziko s téměř až čtvrtinovým podílem představují MHC glykoproteiny II. třídy, které jsou exprimovány na monocytech. Funkčně jsou s MHC spojeny i TLR. O genetickém riziku je známo, že vytváří pozadí, které určuje míru rizika každého jednotlivého probanda. Konečně až iniciační podnět z vnějšího prostředí nebo z vlastního těla nastartuje autoimunitní onemocnění. Výzkum na molekulární úrovni v oblasti MHC, TLR, diferenciaci monocytů a působení dendritických buněk na vznik tolerance považuji za přínosný. Ve své diplomové práci bych se rád věnoval analýze genové exprese monocytů zaměřené na cytokiny, receptory, ale také transkripční regulátory a geny s podílem na diferenciaci. Tyto analýzy lze provádět s humánními vzorky krve. Za velkou výzvu považuji výzkum dendritických buněk během jejich působení na vznik T_{reg} lymfocytů. Zajímavým cílem by mohlo být vytvoření self-kultur T_{reg} lymfocytů *in vitro*, které by po zpětné aplikaci do probanda mohly působit preventivně proti vzniku T1D.

Monocyt má veliký potenciál pro patogenezi T1D. U pacientů s T1D jako tzv. akcesorní buňka rozvíjí zánět v buňkách pankreatu. Produkci cytokinů vytváří zánětlivé mikroprostředí, rekrutuje T lymfocyty ničící β buňky anebo je ničí sám. U zdravých jedinců není porušen proces tvorby autotolerance. Monocyty se podílejí na běžném tkáňovém obratu, fagocytují buněčné zbytky a určují, který z T lymfocytárních klonů přežije. Eliminovány jsou autoreaktivní klony.

Imunitní odpověď vzniká souhrou složek specifické i nespecifické imunity a stejně taková souhra stojí za vznikem T1D. Monocyt a jeho deriváty fungují jako efektorové buňky nespecifických složek, ale zrovna tak zajišťují komunikaci s imunitou adaptivní. Monocyt je důležitým komunikátorem a jeho aberantní fenotyp může vést k patologiím.

6. Seznam citované literatury

Alexander, A.M., Crawford, M., Bertera, S., Rudert, W.A., Takikawa, O., Robbins, P.D., and Trucco, M. (2002). Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expression in Transplanted NOD Islets Prolongs Graft Survival After Adoptive Transfer of Diabetogenic Splenocytes. *Diabetes* 51, 356–365.

Alleva, D.G., Pavlovich, R.P., Grant, C., Kaser, S.B., and Beller, D.I. (2000). Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains: elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor-alpha and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice. *Diabetes* 49, 1106–1115.

Aly, T.A., Ide, A., Jahromi, M.M., Barker, J.M., Fernando, M.S., Babu, S.R., Yu, L., Miao, D., Erlich, H.A., Fain, P.R., et al. (2006). Extreme Genetic Risk for Type 1A Diabetes. *PNAS* 103, 14074–14079.

Anděl, M., et al. *Diabetes mellitus a další poruchy metabolismu*. Praha: Galén, 2001

Anderson, M.S., Venanzi, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S.P., Turley, S.J., Boehmer, H.V., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., et al. (2002). Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein. *Science* 298, 1395–1401.

Bandukwala, H.S., Wu, Y., Feurer, M., Chen, Y., Barbosa, B., Ghosh, S., Stroud, J.C., Benoist, C., Mathis, D., Rao, A., et al. (2011). Structure of a domain-swapped FOXP3 dimer on DNA and its function in regulatory T cells. *Immunity* 34, 479–491.

Barera, G., Bonfanti, R., Viscardi, M., Bazzigaluppi, E., Calori, G., Meschi, F., Bianchi, C., and Chiumello, G. (2002). Occurrence of Celiac Disease After Onset of Type 1 Diabetes: A 6-Year Prospective Longitudinal Study. *Pediatrics* 109, 833–838.

Barker, J.M., Yu, J., Yu, L., Wang, J., Miao, D., Bao, F., Hoffenberg, E., Nelson, J.C., Gottlieb, P.A., Rewers, M., et al. (2005). Autoantibody “Subspecificity” in Type 1 Diabetes Risk for organ-specific autoimmunity clusters in distinct groups. *Dia Care* 28, 850–855.

Barratt, B.J., Payne, F., Lowe, C.E., Hermann, R., Healy, B.C., Harold, D., Concannon, P., Gharani, N., McCarthy, M.I., Olavesen, M.G., et al. (2004). Remapping the Insulin Gene/IDDM2 Locus in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 53, 1884–1889.

Barrett, J.C., Clayton, D., Concannon, P., Akolkar, B., Cooper, J.D., Erlich, H.A., Julier, C., Morahan, G., Nerup, J., Nierras, C., et al. (2009). Genome-wide association study and meta-analysis finds over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 41, 703–707.

Van Belle, T.L., Taylor, P., and von Herrath, M.G. (2009). Mouse Models for Type 1 Diabetes. *Drug Discov Today Dis Models* 6, 41–45.

Bottini, N., Vang, T., Cucca, F., and Mustelin, T. (2006). Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Seminars in Immunology* 18, 207–213.

Bradshaw, E.M., Raddassi, K., Elyaman, W., Orban, T., Gottlieb, P.A., Kent, S.C., and Hafler, D.A. (2009). Monocytes from Patients with Type 1 Diabetes Spontaneously Secrete Proinflammatory Cytokines Inducing Th17 Cells. *J Immunol* 183, 4432–4439.

Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Stern, L.J., Urban, R.G., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1993). Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. , Published Online: 01 July 1993; | Doi:10.1038/364033a0 364, 33–39.

Calderon, B., Suri, A., Miller, M.J., and Unanue, E.R. (2008). Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present β cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules. *PNAS* 105, 6121–6126.

Cantor, J., and Haskins, K. (2007). Recruitment and Activation of Macrophages by Pathogenic CD4 T Cells in Type 1 Diabetes: Evidence for Involvement of CCR8 and CCL1. *J Immunol* 179, 5760–5767.

- Cejkova, P., Molecular-genetic study of polygenic diseases with a special focus on diabetes mellitus. Ph.D. thesis, 2008
- Cipolletta, C., Ryan, K.E., Hanna, E.V., and Trimble, E.R. (2005). Activation of Peripheral Blood CD14+ Monocytes Occurs in Diabetes. *Diabetes* 54, 2779–2786.
- Christensen, S.R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R.A., and Shlomchik, M.J. (2006). Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* 25, 417–428.
- Davies, J.L., Kawaguchi, Y., Bennett, S.T., Copeman, J.B., Cordell, H.J., Pritchard, L.E., Reed, P.W., Gough, S.C.L., Jenkins, S.C., Palmer, S.M., et al. (1994). A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. , Published Online: 08 September 1994; Doi:10.1038/371130a0 371, 130–136.
- Devaraj, S., Dasu, M.R., Rockwood, J., Winter, W., Griffen, S.C., and Jialal, I. (2008). Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 578–583.
- Edwards, A.D., Manickasingham, S.P., Spörri, R., Diebold, S.S., Schulz, O., Sher, A., Kaisho, T., Akira, S., and Sousa, C.R. e (2002). Microbial Recognition Via Toll-Like Receptor-Dependent and -Independent Pathways Determines the Cytokine Response of Murine Dendritic Cell Subsets to CD40 Triggering. *J Immunol* 169, 3652–3660.
- Eizirik, D.L., Sammeth, M., Bouckennooghe, T., Bottu, G., Sisino, G., Igoillo-Esteve, M., Ortis, F., Santin, I., Colli, M.L., Barthson, J., et al. (2012). The Human Pancreatic Islet Transcriptome: Expression of Candidate Genes for Type 1 Diabetes and the Impact of Pro-Inflammatory Cytokines. *PLoS Genet* 8,.
- Elliott, R.B., and Martin, J.M. (1984). Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? *Diabetologia* 26, 297–299.
- Erlich, H., Valdes, A.M., Noble, J., Carlson, J.A., Varney, M., Concannon, P., Mychaleckyj, J.C., Todd, J.A., Bonella, P., Fear, A.L., et al. (2008). HLA DR-DQ Haplotypes and Genotypes and Type 1 Diabetes Risk Analysis of the Type 1 Diabetes Genetics Consortium Families. *Diabetes* 57, 1084–1092.
- Fife, B.T., Paniagua, M.C., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L., and Karpus, W.J. (2001). Selective CC chemokine receptor expression by central nervous system-infiltrating encephalitogenic T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience Research* 66, 705–714.
- Fleetwood, A.J., Dinh, H., Cook, A.D., Hertzog, P.J., and Hamilton, J.A. (2009). GM-CSF- and M-CSF-Dependent Macrophage Phenotypes Display Differential Dependence on Type I Interferon Signaling. *J Leukoc Biol* 86, 411–421.
- Gaglia, J.L., Guimaraes, A.R., Harisinghani, M., Turvey, S.E., Jackson, R., Benoist, C., Mathis, D., and Weissleder, R. (2011). Noninvasive imaging of pancreatic islet inflammation in type 1A diabetes patients. *Journal of Clinical Investigation* 121, 442–445.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19, 71–82.
- Ge, X., James, E.A., Reijonen, H., and Kwok, W.W. (2011). Differences in Self-peptide Binding between T1D-related Susceptible and Protective DR4 Subtypes. *J Autoimmun* 36, 155–160.
- Gonzalo, J.-A., Qiu, Y., Lora, J.M., Al-Garawi, A., Villeval, J.-L., Boyce, J.A., Martinez-A, C., Marquez, G., Goya, I., Hamid, Q., et al. (2007). Coordinated Involvement of Mast Cells and T Cells in Allergic Mucosal Inflammation: Critical Role of the CC Chemokine Ligand 1:CCR8 Axis. *J Immunol* 179, 1740–1750.
- Graham, J., Kockum, I., Sanjeevi, C.B., Landin-Olsson, M., Nyström, L., Sundkvist, G., Arnqvist, H., Blohmé, G., Lithner, F., Littorin, B., et al. (1999). Negative association between type 1 diabetes and HLA DQB1*0602-DQA1*0102 is attenuated with age at onset. *European Journal of Immunogenetics* 26, 117–127.

- Grohmann, U., Fallarino, F., Bianchi, R., Orabona, C., Vacca, C., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2003). A Defect in Tryptophan Catabolism Impairs Tolerance in Nonobese Diabetic Mice. *J Exp Med* 198, 153–160.
- Grupillo, M., Gualtierotti, G., He, J., Sisino, G., Bottino, R., Rudert, W.A., Trucco, M., and Fan, Y. (2012). Essential roles of insulin expression in Aire⁺ tolerogenic dendritic cells in maintaining peripheral self-tolerance of islet β -cells. *Cell. Immunol.* 273, 115–123.
- Haas, J.G., Baeuerle, P.A., Riethmüller, G., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1990). Molecular mechanisms in down-regulation of tumor necrosis factor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9563–9567.
- Hailman, E., Lichenstein, H.S., Wurfel, M.M., Miller, D.S., Johnson, D.A., Kelley, M., Busse, L.A., Zukowski, M.M., and Wright, S.D. (1994). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 179, 269–277.
- van Ham, S.M., Tjin, E.P., Lillemeier, B.F., Grüneberg, U., van Meijgaarden, K.E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D., et al. (1997). HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr. Biol.* 7, 950–957.
- Harjutsalo, V., Podar, T., and Tuomilehto, J. (2005). Cumulative Incidence of Type 1 Diabetes in 10,168 Siblings of Finnish Young-Onset Type 1 Diabetic Patients. *Diabetes* 54, 563–569.
- Hazenbos WL, Gessner JE, Hofhuis FM, Kuipers H, Meyer D, Heijnen IA, Schmidt RE, Sandor M, Capel PJ, Daëron M, van de Winkel JG, Verbeek JS. (1996). Impaired IgG-Dependent Anaphylaxis and Arthus Reaction in Fc γ RIII (CD16) Deficient Mice. *Immunity* 5, 181–188.
- Hettihewa, L.M. (2011). Prolonged expression of MHC class I - peptide expression in bone marrow derived retrovirus transfected matured dendritic cells by continuous centrifugation in the presence of IL-4. *Indian J Med Res* 134, 672–678.
- Honkanen, J., Nieminen, J.K., Gao, R., Luopajarvi, K., Salo, H.M., Ilonen, J., Knip, M., Otonkoski, T., and Vaarala, O. (2010). IL-17 Immunity in Human Type 1 Diabetes. *J Immunol* 185, 1959–1967.
- Hutchings, P., Rosen, H., O'Reilly, L., Simpson, E., Gordon, S., and Cooke, A. (1990). Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages. , Published Online: 13 December 1990; | Doi:10.1038/348639a0 348, 639–642.
- Hyöty, and Taylor (2002). The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 45, 1353–1361.
- Chen, M., Huang, L., Shabier, Z., and Wang, J. (2007). Regulation of the Lifespan in Dendritic Cell Subsets. *Mol Immunol* 44, 2558–2565.
- Johnsen-Soriano, S., Sancho-Tello, M., Arnal, E., Navea, A., Cervera, E., Bosch-Morell, F., Miranda, M., and Javier Romero, F. (2010). IL-2 and IFN-gamma in the retina of diabetic rats. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 248, 985–990.
- Jonsson, A.K., Hyldig-Nielsen, J.J., Serenius, B., Larhammar, D., Andersson, G., Jörgensen, F., Peterson, P.A., and Rask, L. (1987). Class II genes of the human major histocompatibility complex. Comparisons of the DQ and DX alpha and beta genes. *J. Biol. Chem.* 262, 8767–8777.
- Karumuthil-Melethil, S., Perez, N., Li, R., and Vasu, C. (2008). Induction of Innate Immune Response through Toll-like Receptor 2 and Dectin 1 prevents type 1 diabetes. *J Immunol* 181, 8323–8334.
- Karvonen, M., Tuomilehto, J., Virtala, E., Pitkäniemi, J., Reunanen, A., Tuomilehto-Wolf, E., and Åkerblom, H.K. (1996). Seasonality in the Clinical Onset of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus in Finnish Children. *Am. J. Epidemiol.* 143, 167–176.
- Kawai, T., and Akira, S. (2006). Innate immune recognition of viral infection. *Nature Immunology* 7, 131–137.
- Kyvik, K.O., Green, A., and Beck-Nielsen, H. (1995). Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. *BMJ* 311, 913–917.

- Lee, Y.-S., Li, N., Shin, S., and Jun, H.-S. (2009). Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Encephalomyocarditis Virus-Induced Diabetes in Mice. *J. Virol.* 83, 8004–8011.
- Liu, K., Victora, G.D., Schwickert, T.A., Guernonprez, P., Meredith, M.M., Yao, K., Chu, F.-F., Randolph, G.J., Rudensky, A.Y., and Nussenzweig, M. (2009). In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324, 392–397.
- López-Albaitero, A., Mailliard, R., Hackman, T., Filho, P.A.A., Wang, X., Gooding, W., Ferrone, S., Kalinski, P., and Ferris, R.L. (2009). Maturation Pathways of Dendritic Cells Determine TAP1 and TAP2 Levels and Cross-presenting Function. *J Immunother* 32, 465–473.
- Maahs, D.M., West, N.A., Lawrence, J.M., and Mayer-Davis, E.J. (2010). Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America* 39, 481–497.
- Maechler, P., Jornot, L., and Wollheim, C.B. (1999). Hydrogen Peroxide Alters Mitochondrial Activation and Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 27905–27913.
- Martinez, M., Ono, N., Planutiene, M., Planutis, K., Nelson, E.L., and Holcombe, R.F. (2012). Granulocyte-macrophage stimulating factor (GM-CSF) increases circulating dendritic cells but does not abrogate suppression of adaptive cellular immunity in patients with metastatic colorectal cancer receiving chemotherapy. *Cancer Cell Int* 12, 2.
- Meyers, A., Shah, R., Gottlieb, P., and Zipris, D. (2010). Altered toll-like receptor signaling pathways in human type 1 diabetes. *Journal of Molecular Medicine* 88, 1221–1231.
- McCarthy, A.D., Etcheverry, S.B., Bruzzone, L., Lettieri, G., Barrio, D.A., and Cortizo, A.M. (2001). Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC Cell Biology* 2, 16.
- Mihret, A., Mamo, G., Tafesse, M., Hailu, A., and Parida, S. (2011). Dendritic Cells Activate and Mature after Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Res Notes* 4, 247.
- Milstein, O., Hagin, D., Lask, A., Reich-Zeliger, S., Shezan, E., Ophir, E., Eidelstein, Y., Afik, R., Antebi, Y.E., Dustin, M.L., et al. (2010). CTLs respond with activation and granule secretion when serving target for T cell recognition. *Blood*.
- Miyazaki, I., Cheung, R.K., Gaedigk, R., Hui, M.F., Van der Meulen, J., Rajotte, R.V., and Dosch, H.M. (1995). T cell activation and anergy to islet cell antigen in type I diabetes. *J. Immunol.* 154, 1461–1469.
- Montoya, M., Schiavoni, G., Mattei, F., Gresser, I., Belardelli, F., Borrow, P., and Tough, D.F. (2002). Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* 99, 3263–3271.
- Munn, D.H., Sharma, M.D., Baban, B., Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., and Mellor, A.L. (2005). GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity* 22, 633–642.
- Nisticò, L., Buzzetti, R., Pritchard, L.E., Auwera, B.V.D., Giovannini, C., Bosi, E., Larrad, M.T.M., Rios, M.S., Chow, C.C., Cockram, C.S., et al. (1996). The CTLA-4 Gene Region of Chromosome 2q33 Is Linked to, and Associated with, Type 1 Diabetes. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1075–1080.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S., and Kolb, H. (2000). Cutting Edge: Heat Shock Protein 60 Is a Putative Endogenous Ligand of the Toll-Like Receptor-4 Complex. *J Immunol* 164, 558–561.
- Onengut-Gumuscu, S., and Concannon, P. (2002). Mapping genes for autoimmunity in humans: type 1 diabetes as a model. *Immunological Reviews* 190, 182–194.
- De Paepe, M.E., Corriveau, M., Tannous, W.N., Seemayer, T.A., and Colle, E. (1992). Increased vascular permeability in pancreas of diabetic rats: detection with high resolution protein A-gold cytochemistry. *Diabetologia* 35, 1118–1124.

- Palladino, M. a., Johnson, T. a., Gupta, R., Chapman, J. l., and Ojha, P. (2007). Members of the Toll-Like Receptor Family of Innate Immunity Pattern-Recognition Receptors Are Abundant in the Male Rat Reproductive Tract. *Biol Reprod* 76, 958–964.
- Panter, M.S., Jain, A., Leonhardt, R.M., Ha, T., and Cresswell, P. (2012). Dynamics of major histocompatibility complex class I association with the human peptide-loading complex. *J. Biol. Chem.*
- Park, J.S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J.-Y., Strassheim, D., Ishizaka, A., and Abraham, E. (2004). Involvement of Toll-like Receptors 2 and 4 in Cellular Activation by High Mobility Group Box 1 Protein. *J. Biol. Chem.* 279, 7370–7377.
- Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527–2534.
- Patterson, C.C., Dahlquist, G.G., Gyürüs, E., Green, A., and 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.
- Perros, P., McCrimmon, R.J., Shaw, G., and Frier, B.M. (1995). Frequency of thyroid dysfunction in diabetic patients: value of annual screening. *Diabet. Med.* 12, 622–627.
- Perros, P., Singh, R.K., Ludlam, C.A., and Frier, B.M. (2000). Prevalence of pernicious anaemia in patients with Type 1 diabetes mellitus and autoimmune thyroid disease. *Diabet. Med.* 17, 749–751.
- Pugliese, A., Gianani, R., Moromisato, R., Awdeh, Z.L., Alper, C.A., Erlich, H.A., Jackson, R.A., and Eisenbarth, G.S. (1995). HLA-DQB1*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes* 44, 608–613.
- Qu, H.-Q., Montpetit, A., Ge, B., Hudson, T.J., and Polychronakos, C. (2007). Toward Further Mapping of the Association Between the IL2RA Locus and Type 1 Diabetes. *Diabetes* 56, 1174–1176.
- Randolph, G.J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282, 480–483.
- Redondo, M.J., Fain, P.R., and Eisenbarth, G.S. (2001). Genetics of Type 1A Diabetes. *Recent Progress in Hormone Research* 56, 69.
- Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A., and Bazan, J.F. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *PNAS* 95, 588–593.
- Rønningen, K.S., Gjertsen, H.A., Iwe, T., Spurkland, A., Hansen, T., and Thorsby, E. (1991a). Particular HLA-DQ Aβ Heterodimer Associated With IDDM Susceptibility in Both DR4-DQw4 Japanese and DR4-DQw8/DRw8-DQw4 Whites. *Diabetes* 40, 759–763.
- Rønningen, K.S., Spurkland, A., Iwe, T., Vartdal, F., and Thorsby, E. (1991b). Distribution of HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 alleles and DQA1-DQB1 genotypes among Norwegian patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Tissue Antigens* 37, 105–111.
- Roos, R.S., Loetscher, M., Legler, D.F., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Moser, B. (1997). Identification of CCR8, the Receptor for the Human CC Chemokine I-309. *J. Biol. Chem.* 272, 17251–17254.
- Salamon, H., Klitz, W., Easteal, S., Gao, X., Erlich, H.A., Fernandez-Viña, M., Trachtenberg, E.A., McWeeney, S.K., Nelson, M.P., and Thomson, G. (1999). Evolution of HLA class II molecules: Allelic and amino acid site variability across populations. *Genetics* 152, 393–400.
- Sanjeevi, C.B., Falorni, A., Kockum, I., Hagopian, W.A., and Lernmark, A. (1996). HLA and glutamic acid decarboxylase in human insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 13, 209–217.
- Serbina, N.V., Jia, T., Hohl, T.M., and Pamer, E.G. (2008). Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annu Rev Immunol* 26, 421–452.

- Serreze, D.V., Holl, T.M., Marron, M.P., Graser, R.T., Johnson, E.A., Choisy-Rossi, C., Slattery, R.M., Lieberman, S.M., and DiLorenzo, T.P. (2004). MHC Class II Molecules Play a Role in the Selection of Autoreactive Class I-Restricted CD8 T Cells That Are Essential Contributors to Type 1 Diabetes Development in Nonobese Diabetic Mice. *J Immunol* *172*, 871–879.
- Shakhov, A.N., Collart, M.A., Vassalli, P., Nedospasov, S.A., and Jongeneel, C.V. (1990). Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J. Exp. Med.* *171*, 35–47.
- Sorenson, R.L., Garry, D.G., and Brelje, T.C. (1991). Structural and Functional Considerations of GABA in Islets of Langerhans: β -Cells and Nerves. *Diabetes* *40*, 1365–1374.
- Stone, J.D., Chervin, A.S., and Kranz, D.M. (2009). T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology* *126*, 165–176.
- Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Maksimovic-Ivanic, D., Momcilovic, M., Popadic, D., Harhaji, L., Miljkovic, D., Metz, C., Mangano, K., Papaccio, G., et al. (2008). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is necessary for progression of autoimmune diabetes mellitus. *Journal of Cellular Physiology* *215*, 665–675.
- Suciu-Foca, N., Manavalan, J.S., Scotto, L., Kim-Schulze, S., Galluzzo, S., Naiyer, A.J., Fan, J., Vlad, G., and Cortesini, R. (2005). Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review. *International Immunopharmacology* *5*, 7–11.
- Sumnik, Z., Drevinek, P., Lanska, V., Malcova, H., Vavrinec, J., and Cinek, O. (2004). Higher maternal age at delivery, and lower birth orders are associated with increased risk of childhood type 1 diabetes mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* *112*, 294–297.
- Szczycka, M., Ploch, S., and Obmińska-Mrukowicz, B. (2012). Modulation of Th1/Th2 cytokine production by selective and nonselective phosphodiesterase inhibitors administered to mice. *Pharmacol Rep* *64*, 179–184.
- Taylor, P.R., and Gordon, S. (2003). Monocyte heterogeneity and innate immunity. *Immunity* *19*, 2–4.
- Teyton, L., Lotteau, V., Turmel, P., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L., Pujol, J.P., Loyau, G., Piatier-Tonneau, D., Auffray, C., and Charron, D.J. (1987). HLA DR, DQ, and DP antigen expression in rheumatoid synovial cells: a biochemical and quantitative study. *J Immunol* *138*, 1730–1738.
- Todd, J.A., Bell, J.I., and McDevitt, H.O. (1987). HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* *329*, 599–604.
- Trudeau, J.D., Dutz, J.P., Arany, E., Hill, D.J., Fieldus, W.E., and Finegood, D.T. (2000). Neonatal Beta-Cell Apoptosis: A Trigger for Autoimmune Diabetes? *Diabetes* *49*, 1–7.
- Tsai, S., Shameli, A., and Santamaria, P. (2008). CD8+ T cells in type 1 diabetes. *Adv. Immunol.* *100*, 79–124.
- Undlien, D.E., Lie, B.A., and Thorsby, E. (2001). HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? *Trends in Genetics* *17*, 93–100.
- Vaarala, Paronen, Otonkoski, and Åkerblom (1998). Cow Milk Feeding Induces Antibodies to Insulin in Children – A Link Between Cow Milk and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus? *Scandinavian Journal of Immunology* *47*, 131–135.
- Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.-D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* *31*, 502–512.
- Vlahopoulos, S., Boldogh, I., Casola, A., and Brasier, A.R. (1999). Nuclear Factor- κ B-Dependent Induction of Interleukin-8 Gene Expression by Tumor Necrosis Factor α : Evidence for an Antioxidant Sensitive Activating Pathway Distinct From Nuclear Translocation. *Blood* *94*, 1878–1889.

- Vlassara, H., Brownlee, M., and Cerami, A. (1981). Nonenzymatic glycosylation of peripheral nerve protein in diabetes mellitus. *PNAS* 78, 5190–5192.
- Vora, P., Youdim, A., Thomas, L.S., Fukata, M., Tesfay, S.Y., Lukasek, K., Michelsen, K.S., Wada, A., Hirayama, T., Arditi, M., et al. (2004). β -Defensin-2 Expression Is Regulated by TLR Signaling in Intestinal Epithelial Cells. *J Immunol* 173, 5398–5405.
- Vreugdenhil, G.R., Geluk, A., Ottenhoff, T.H., Melchers, W.J., Roep, B.O., and Galama, J.M. (1998). Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule. *Diabetologia* 41, 40–46.
- Waldhoer, T., Schober, E., and Tuomilehto, J. (1997). Long-term patterns in seasonality of insulin-dependent diabetes mellitus diagnosis in Austrian children. *Journal of Clinical Epidemiology* 50, 159–165.
- Wegener, S., Falk, U., Lakner, K., Meyer-Riennecker, H.J., Hauptmann, G., and Uring-Lambert, B. (1992). [11th International Histocompatibility Workshop 1991: Personal data for the Multiple Sclerosis Study]. *Beitr Infusionsther* 30, 324–331.
- Willcox, A., Richardson, S.J., Bone, A.J., Foulis, A.K., and Morgan, N.G. (2009). Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clinical & Experimental Immunology* 155, 173–181.
- Yeung, T.Y., Seeberger, K.L., Kin, T., Adesida, A., Jomha, N., Shapiro, A.M.J., and Korbitt, G.S. (2012). Human Mesenchymal Stem Cells Protect Human Islets from Pro-Inflammatory Cytokines. *PLoS One* 7,.
- Zdanov, A., Schalk-Hihi, C., Gustchina, A., Tsang, M., Weatherbee, J., and Wlodawer, A. (1995). Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure* 3, 591–601.
- Zhang, J., Huang, Z., Sun, R., Tian, Z., and Wei, H. (2012). IFN- γ induced by IL-12 administration prevents diabetes by inhibiting pathogenic IL-17 production in NOD mice. *Journal of Autoimmunity* 38, 20–28.
- Zhang, Y., Lee, A.S., Shameli, A., Geng, X., Finegood, D., Santamaria, P., and Dutz, J.P. (2010). TLR9 Blockade Inhibits Activation of Diabetogenic CD8⁺ T Cells and Delays Autoimmune Diabetes. *J Immunol* 184, 5645–5653.
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74–e80.

(URL 1)

http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_07/S1462399403005957sup002.htm

(URL 2)

<http://www.hopkins-arthritis.org/arthritis-news/2008/european-admixture-associated-with-genetic-risk-for-rheumatoid-arthritis-in-african-americans.html>