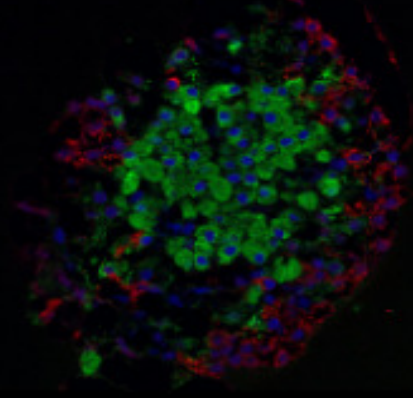


Auto-immuniteit bij Type 1 Diabetes Mellitus en immunomodulerende behandelmethoden



Auteur:
Matthijs Vogels

Begeleider:
Dr. M. M. Faas
Afdeling Pathologie en Medische Biologie
Rijksuniversiteit Groningen

Rijksuniversiteit Groningen
Faculteit Wiskunde en Natuurwetenschappen
Life Science and Technology
Maart, 2010

Abstract

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) kenmerkt zich door de vernietiging van de β -cellen van de pancreas. Dit gebeurt door β -cel autoantigenen, macrofagen, B-cellen en T-cellen. Deze cellen zijn betrokken bij of het begin van de ontwikkeling van T1DM, dan wel bij de uitvoering van de destructie van de β -cellen.

De achterliggende mechanismen die deze processen op gang kunnen zetten zijn zowel genetisch als infectieus. Bepaalde genen zijn hierbij van bijzondere interesse. De genen waarvan men denkt dat ze T1DM kunnen induceren zijn onder andere HLA, IDDM2, PTPN22. Het bewijs hiervoor is nog onomstreden en verder onderzoek is nodig om alle genen te identificeren. Factoren uit het milieu kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van T1DM, bijvoorbeeld infecties. Van bepaalde virale infecties is bekend dat ze tot auto-immuun diabetes kunnen leiden, andere worden van hiervan verdacht. Het meest bekende voorbeeld bij mensen zijn enterovirussen en bij ratten is het Kilham rat virus (KRV) veel onderzocht. Er worden echter nog meer virussen verdacht, maar definitief bewijs hiervoor is nog niet gevonden.

De huidige behandelingen van T1DM zijn voornamelijk symptomatisch. Er worden immunomodulerende therapieën onderzocht die de balans terugbrengen in het immuunsysteem door middel van Tregs. De T cel respons kan ook onderdrukt worden door bijvoorbeeld antilichamen. Daarnaast zijn er andere eiwitten, zoals DiaPep277 en GAD, die via cytokineproductie het immuunsysteem moduleren. Virale infecties kunnen door middel van de behandeling van IFNs tegen worden gegaan. Een combinatie van deze behandelmethoden zou kunnen leiden tot de volledige genezing van T1DM.

De genezing van T1DM is nog niet bekend, dus misschien moet er meer aandacht aan het daadwerkelijke probleem worden besteed dan aan het bestrijden van de symptomen en remming van de progressie. Onderzoek naar de mechanismen achter auto-immuniteit zou een beter resultaat kunnen laten zien. De genetische achtergrond moet verder onderzocht worden om zo mensen met risico op de ontwikkeling van T1DM beter te kunnen helpen. En infecties zouden artsen extra alert moeten maken bij genetisch vatbare patiënten, zodat de behandeling misschien aangepast moet worden. Al deze factoren moeten verder onderzocht worden om de mechanismen van de ontwikkeling van T1DM te achterhalen, een betere diagnose te kunnen stellen en de ziekte uiteindelijk volledig te kunnen genezen.

Inhoudsopgave

1. Voorblad	1
2. Abstract	2
3. Inhoudsopgave	3
4. Inleiding	4
5. Auto-immuniteit bij T1DM	5
5.1. Mechanismen achter auto-immuniteit	5
5.1.1. De rol van macrofagen	5
5.1.2. De rol van β -cel autoantigenen en T cellen	5
5.1.3. Vicious apoptose cyclus	8
5.2. Genetisch immunologische factoren	9
5.2.1. HLA	9
5.2.2. IDDM2	10
5.2.3. Andere verdachte loci	11
5.2.4. SNPs: PTPN22	11
5.3. Virale infecties	13
5.3.1. Bewijs uit dierexperimenten	14
5.3.2. Enterovirus	14
5.3.3. Cytomegalovirus	16
5.3.4. Hepatitis C	16
5.3.5. Overige virussen	16
5.4. Bacteriële infecties	17
6. Behandelmethoden gericht tegen auto-immuniteit	18
6.1. Immunomodulatie	18
6.1.1. Antilichaam therapie	18
6.1.2. DiaPep277	18
6.1.3. GAD therapie	19
6.1.4. Tregs	19
6.2. Anti-virale behandelmethoden	20
6.2. Combineren van therapieën	20
7. Discussie	22
8. Nawoord	23
9. Referenties	23

Inleiding

In 2008 stierven er in Nederland 3202 mensen met als primaire doodsoorzaak Diabetes Mellitus. (bron: CBS) Geschat wordt dat van dit aantal ongeveer 10% het Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) heeft. (bron: RIVM) Voor beide typen diabetes is er nog geen genezing mogelijk maar zijn er wel behandelmethoden die de ziekte kunnen reguleren. Er wordt nog steeds veel onderzoek verricht naar het proces achter de vernietiging van de β -cellen in de Eilandjes van Langerhans van de pancreas en eventuele, definitieve behandelingen.

De pancreas ligt in de buikholte onder de maag en heeft verschillende functies. De eerste functie is het afgeven van verteringssappen die via de ductus pancreaticus naar het duodenum worden vervoerd. Daar helpen ze bij het afbreken van eiwitten, koolhydraten en vetten en neutraliseert het afgegeven natriumbicarbonaat de pH van de bolus. Dit wordt ook wel de exocriene functie van de pancreas genoemd. Het merendeel van de cellen van de pancreas vervult deze functie.

De tweede functie heeft te maken met de secretie van hormonen. De gespecialiseerde cellen die deze hormonen produceren liggen in clusters in de pancreas en worden de Eilandjes van Langerhans genoemd. Er zijn drie verschillende type cellen; α -cellen, β -cellen en δ -cellen, die respectievelijk glucagon, insuline en somatostatine produceren. De hormonen worden direct aan het bloed afgegeven. Dit wordt ook wel de endocriene functie van de pancreas genoemd.

Insuline is betrokken bij de glucoseopname door cellen. Zonder de β -cellen wordt er geen insuline meer geproduceerd en ontstaat er hyperglycemie, omdat de glucose in het bloed niet wordt opgenomen. Consequenties hiervan zijn schade aan bloedvaten en neuronen met de daarbij behorende ziektebeelden tot gevolg. Andere symptomen zijn dehydratie en polyurie.

T1DM wordt veroorzaakt door een auto-immunreactie op de insuline producerende β -cellen van de pancreas. Een auto-immunreactie is een aanval van cellen van het immuunsysteem die gericht is op lichaamseigen cellen, die als lichaamsvreemde cellen worden herkend. Macrofagen zijn de eerste cellen die de Eilandjes van Langerhans infiltreren en daar de immunrespons op gang brengen, mede door de productie van cytokinen. Hierdoor worden de T lymfocyten (T cellen) geactiveerd en vervolgens zullen ook deze cellen naar de pancreas migreren. Door de binding van T cellen aan receptoren in het celmembraan van de β -cellen wordt er celdood, ofwel apoptose, geïnduceerd. Een voorbeeld van deze apoptose receptor is de Fc receptor.

Macrofagen activeren ook B lymfocyten (B cellen) die betrokken zijn bij de productie van cytokinen en antilichamen, waardoor andere cellen van het immuunsysteem geactiveerd worden. Cytokinen zijn signaalmoleculen die vooral immunologische celprocessen reguleren en antilichamen zijn eiwitten die binden aan lichaamsvreemde stoffen of cellen, waardoor ze beter herkenbaar zijn voor andere cellen van het immuunsysteem.

De oorzaak van de auto-immunreactie op de β -cellen kan het gevolg zijn van genetische factoren. Deze genen hebben voornamelijk te maken met de receptor eiwitten die op T cellen tot expressie wordt gebracht en met lichaamseigen moleculen die door een kruisreactie met deze receptor eiwitten een doelwit kunnen worden. Infecties kunnen een andere oorzaak zijn bij de ontwikkeling van T1DM. Hierbij brengen virussen schade toe aan β -cellen, waardoor er een infectie plaatsvindt die de auto-immunreactie op gang brengt.

In deze scriptie zal er eerst gekeken worden naar de mechanismen achter deze auto-immunreactie en wat de immunologische oorzaken hierachter kunnen zijn. Als aanvulling hierop worden immunomodulerende behandelmethoden bekeken die in de toekomst deze ziekte eventueel kunnen genezen.

Auto-immuniteit bij T1DM

Mechanismen achter auto-immuniteit

De rol van macrofagen

Yoon et al (1999) denken dat macrofagen een belangrijke rol spelen bij de inductie van T1DM in NOD muizen. Bij insulitis, wat vaak leidt tot diabetes, bestaat het grootste gedeelte van cellen die de Eilandjes van Langerhans infiltreren uit macrofagen en dendritische cellen (DCs). Dit wordt onderbouwd door een studie van Oschilewski et al (1985) die silica injecteerde in NOD muizen, wat zeer toxisch is voor macrofagen, waardoor de ontwikkeling van T1DM werd voorkomen. Ook bleek dat macrofagen nodig zijn om T cellen te laten differentiëren in β -cel specifieke cytotoxische T cellen (CTLs), ook wel CD8+ T cellen genoemd, en CD4+ T cellen, die beide de uiteindelijke destructie van β -cellen teweeg kunnen brengen. Bij CTLs wordt dit bereikt door het induceren van apoptose en bij CD4+ T cellen door het activeren van macrofagen die lichaamsvreemde partikels fagocyteren.

Macrofagen produceren IL-12, waardoor de Th1 immuunrespons wordt gestimuleerd en de CTLs in staat worden gesteld de β -cellen aan te vallen. De stimulatie van Th1 zorgt voor een cellulaire immuunrespons, ofwel de activering van CTLs en CD4+ T cellen. Als de IL-12 productie wordt verhinderd, bijvoorbeeld door het weghalen van macrofagen, kan dit resulteren in het voorkomen van de β -cel destructie door de Th1 cellen. Een andere mogelijkheid is het up-reguleren van de Th2 immuunrespons die ook de Th1 immuunrespons onderdrukt. De Th2 immuunrespons wordt ook wel de humorale immuunrespons genoemd, doordat het de B cellen activeert en de antilichaam productie stimuleert. Bewijs hiervoor komt uit experimenten met NOD muizen. Ook is er een daling in de expressie van Fas ligand (FasL) en perforin in T cellen, waaruit blijkt dat macrofagen nodig zijn voor de activatie van CTLs. Via FasL kan apoptose geïnduceerd worden als dit bindt aan de Fas receptor op het celmembraan. Er ontstaat dan een cascade aan reacties, waardoor effector caspases geactiveerd worden die DNA fragmenteren. Ook wordt er cytochrome c geproduceerd door de mitochondria die andere effector caspases activeert wat tot apoptose leidt. Perforin is een humaan eiwit dat poriën maakt in het membraan van de β -cellen, waardoor afbraak mogelijk is door de Th1 cellen. Zoals gezegd produceren macrofagen ook IL-12, die CD4+ T cellen activeren. Op hun beurt activeren CD4+ T cellen de CTLs via de productie van IL-2 en IFN- γ . Zonder macrofagen zal er een down-regulatie van CD4+ T helper cellen plaats vinden, waardoor deze geen cytokinen produceren, zodat CTLs niet geactiveerd kunnen worden. Macrofagen produceren ook vrije radicalen en andere cytokinen, zoals IL-1 β , TNF- α en IFN- γ . Deze worden beschouwd als toxisch tegen de β -cellen van de pancreas (Pankewycz et al, 1995). De cellen zijn erg gevoelig voor vrije radicalen, omdat er een lage enzymatische activiteit is die de schade herstelt. De cytokinen die net genoemd zijn dragen mogelijk bij aan de productie van vrije radicalen.

De rol van β -cel autoantigenen en T cellen

De precieze mechanismen die zijn betrokken bij de aanzet tot β -cel specifieke auto-immuniteit en de progressie hiervan bij T1DM zijn nog niet duidelijk. Volgens Yoon et al (1999) zijn β -cel autoantigenen, B- en T lymfocyten duidelijk betrokken. β -cel autoantigenen zijn doelwit van het immuun systeem en zijn veel onderzocht. Auto-immuniteit tegen deze autoantigenen kan T1DM veroorzaken.

Glutamic acid decarboxylase (GAD) is de precursor van de neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA) en is gevonden in de β -cellen bij T1DM patiënten. GAD65 is een bepaalde isovorm die bij mensen voorkomt en staat bekend als autoantigeen die de ontwikkeling van T1DM stimuleert. Uit onderzoek van Geng et al (1998) zijn verrassende resultaten naar voren gekomen. Zo bleek dat NOD muizen met een hyperexpressie van GAD in de β -cellen een verminderde kans hadden om T1DM te ontwikkelen, maar dat normale expressie van GAD de ziekte accelereerde. Waarom dit precies gebeurt, is nog steeds onduidelijk. Uit ander onderzoek van Lim et al (1999) bleek dat de onderdrukking van GAD expressie auto-immuun diabetes kan voorkomen. Al deze onderzoeken geven dus aan dat

GAD als autoantigeen kan dienen bij het ontstaan van T1DM in NOD muizen. Een theorie volgens Ludvigsson et al (2009) is dat het te maken heeft met specifieke chemische conformaties. De conformatie van GAD zou lijken op bepaalde receptor eiwitten van T cellen, waardoor er kruisreacties voor kunnen komen. CTLs of CD4+ T cellen met deze receptor eiwitten zullen dan binden met GAD en geactiveerd worden, waarna clonale expansie plaats vindt en er een grote immuunrespons gerealiseerd wordt.

Insuline is een β -cel specifiek antigeen dat gerelateerd is aan T1DM. Dit kwam naar voren in een onderzoek van Wilkin et al (1984) waarbij in meer dan 59% van patiënten met deze ziekte anti-insuline antilichamen gevonden zijn. Verder onderzoek is nodig om de precieze rol te achterhalen.

Een ander antigeen, het 38kD antigeen, is gevonden bij Bio Breeding (BB) ratten. Het is het enige autoantigeen dat een vertraagde expressie laat zien bij ratten met acute diabetes. De reden hiervoor is onbekend en moet verder onderzocht worden. Een hypothese volgens Yoon et al (1999) stelt dat dit autoantigeen als lichaamsvreemd herkend wordt, waardoor auto-immuniteit ontstaat. Maar dit is nog niet volledig bewezen.

Het volgende autoantigeen is IA-2, dat afstamt van de proteïne tyrosine fosfatase (verder behandeld in *Genetische factoren*) en wordt gezien als een belangrijke trigger voor het ontwikkelen van T1DM. In een onderzoek van Lan et al (1996) werd bij 70% van de patiënten met auto-immuun diabetes antilichamen gevonden die gericht waren tegen IA-2 en kunnen dienen als serologische markers voor T1DM. Ook van dit autoantigeen blijft de rol bij auto-immuniteit onbekend.

Het laatste autoantigeen is ICA69 (islet cell autoantigen 69 kDa). Dit autoantigeen is aanwezig in de β -cellen en Pilon et al (2000) hebben aangetoond dat dit eiwit een bijdrage levert aan de functie van endocriene cellen. Het resultaat is gebaseerd op een experiment met *C. elegans*, waar bij ze een homoloog van ICA69, genaamd ric-19, hebben gevonden dat signaalmoleculen produceert, waarschijnlijk voor communicatie tussen endocriene cellen. ICA69 lijkt chemisch gezien op bovine serum albumin (BSA), dat in koemelk voorkomt. Er kan dus een kruisreactie ontstaan met ICA69 als T cellen het BSA als lichaamsvreemd beschouwen. Sommige epidemiologische studies hebben daarom T1DM in verband gebracht met koemelk, omdat patiënten hier een verhoogd niveau aan antilichamen voor hebben (Martin et al, 1991). Deze resultaten worden echter door andere experimenten bevestigd, waardoor het nog moet worden bepaald welke rol ICA69 hierbij speelt.

Het is bekend dat patiënten antilichamen tegen pancreas antigenen produceren, voordat er klinische klachten ontstaan. Er bestaat dus een tijdelijke tolerantie voor autoreactieve T cellen, waarvan de rol door onder andere regulatoire T cellen wordt vervuld. De functie van deze cellen wordt later behandeld.

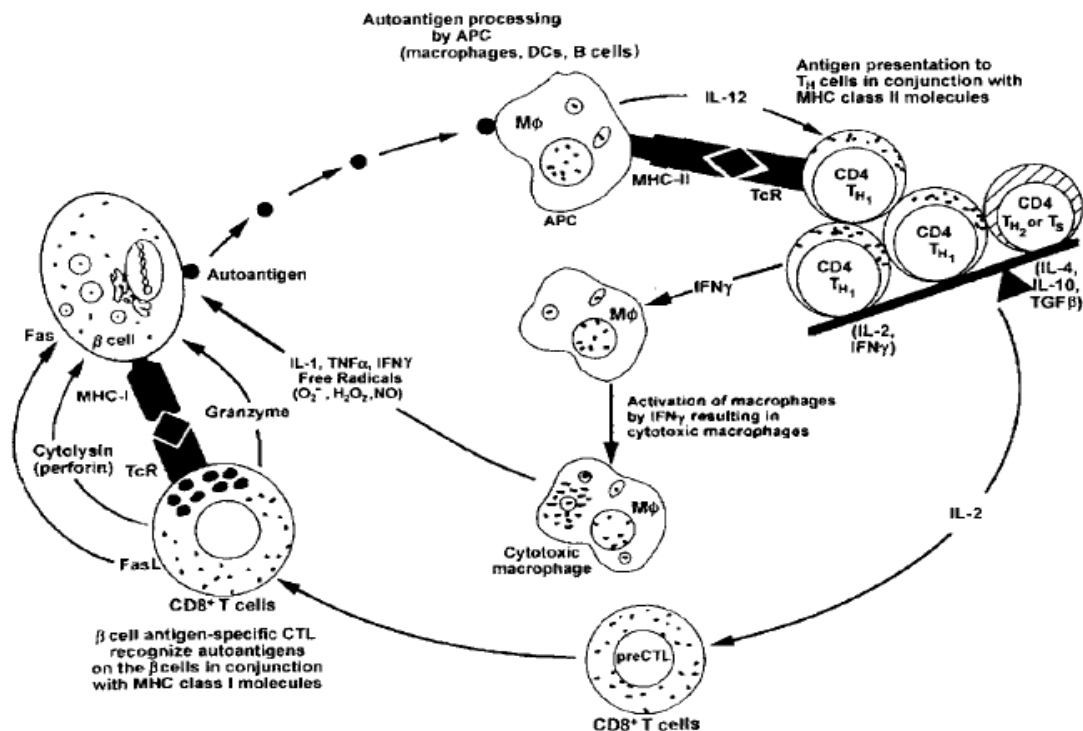


Fig. 1. Figuur afkomstig uit Yoon et al (1999) *Cellular and Molecular Roles of β Cell Autoantigens, Macrophages and T Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diabetes*.

De verschillende T cellen spelen een belangrijke rol in de pathogenese van T1DM. Dit blijkt uit onderzoek waarbij de thymus in NOD muizen was verwijderd en er vervolgens geen rijping van T cellen kon plaatsvinden (Like et al, 1982). Bij deze muizen werd autoimmuun diabetes voorkomen. Ook werd er geen ontwikkeling van T1DM gevonden met monoclonale antilichamen, gericht tegen de antigenen die tot expressie komen op T cellen.

Uit studies blijkt dat zowel $CD4^+$ als $CD8^+$ T cellen aanwezig moeten zijn om auto-immuun diabetes te ontwikkelen (Thivolet et al, 1991). De reden hiervoor is nog onderwerp van discussie. Het is mogelijk dat $CD4^+$ geactiveerd kunnen worden om zich te differentiëren in T effector cellen door de aanwezigheid van β -cel autoantigenen. Deze autoantigenen kunnen het resultaat zijn van de destructie van β -cellen door $CD8^+$ T cellen. Een alternatieve hypothese die men geeft is dat de $CD8^+$ T cellen de aanwezigheid van $CD4^+$ T cellen nodig hebben om geactiveerd te kunnen worden en zo apoptose te induceren. Ander onderzoek van Wong et al (1996) wijst uit dat sommige autoreactieve $CD4^+$ of $CD8^+$ T cellen diabetes wel kunnen overdragen zonder hulp van andere cellen, wat tegenstrijdig is met deze hypothese. Het is echter bewezen dat $CD4^+$ T cellen aan de β -cellen hechten, maar dat $CD8^+$ T cellen nodig zijn voor de destructie van deze cellen. Het is daarom aannemelijk dat beide T cellen nodig zijn voor de auto-immunreactie.

Cytokinen die door de T cellen worden geproduceerd spelen ook een belangrijke, maar zeer complexe rol in de ontwikkeling van T1DM. $Th1$ cytokinen ($IL-2$ en $IFN-\gamma$) zorgen voor de ontwikkeling ervan, terwijl $Th2$ of $Th3$ cytokinen dit tegen gaan. Toediening van additionele $IFN-\gamma$ zorgt voor een vertraging van de ontwikkeling van de auto-immuun diabetes, maar kan deze niet voorkomen (Hultgren et al, 1996). De interacties van alle cytokinen zijn complex en de kans op T1DM kan afhankelijk zijn van de kant waar de Th balans naar uitslaat.

Alle processen die hierboven staan beschreven zijn ter verduidelijking schematisch weergegeven in figuur 1.

Vicieuze apoptose cyclus

Een andere theorie, beschreven door Kaminitz et al (2007), vult het bovenstaande mechanisme aan. Zij beschrijven dat als eenmaal apoptose geïnduceerd is in β -cellen, er een vicieuze cirkel ontstaat die na een bepaald punt niet meer onomkeerbaar is.

In de lymfeknopen bij de pancreas worden CTLs gevoelig gemaakt voor antigenen van de β -cellen door macrofagen en DCs, die ook regulatoire mechanismen inschakelen. Zo produceren ze bijvoorbeeld IL-4, waardoor de Th2 immuunrespons gestimuleerd wordt (Pearl-Yafe et al, 2007). Deze respons is echter niet sterk genoeg om de proliferatie van auto-reactieve CTLs tegen te gaan. Eén CTL kan tegen meerdere antigenen gevoelig gemaakt worden. De hierop volgende ontstekingsreactie recruteert andere immuuncellen en zorgt voor verhoogde gevoeligheid van de β -cellen voor apoptose door verhoogde expressie van bepaalde apoptose receptoren. Uit onderzoek bij muizen is gebleken dat al deze mogelijkheden om apoptose te induceren samen het effect uitvoeren, maar dat niet elke route perse nodig is.

Deze vicieuze cirkel begint met de productie van cytokinen door macrofagen en DCs die de immuunrespons verder opwekken, zoals IL-12, IL-2 en TNF- α . Ook de Fas receptor expressie wordt verhoogd, met als gevolg dat β -cellen een verhoogde kans hebben om apoptose te ondergaan. Dit destructieve gedrag lijkt op zichzelf raar, maar is waarschijnlijk een verdediging voor andere β -cellen in de buurt tegen de auto-immuunreactie (Fig.2a).

De macrofagen zullen NO (nitriet oxide) gaan produceren via inducible nitric oxide synthase (iNOS) wat toxisch is voor de β -cellen. De cellen zelf produceren ook NO, waardoor de suïcidale acties, ervan nog eens onderstreept worden (Fig. 2b).

Er zijn ook cytokinen die het effect van andere schadelijke mechanismen verhogen, waarvan de Fas/FasL apoptose pathway de meest bekende is. Voorbeelden van dit soort cytokinen zijn IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ , TNF- α en NO en worden geproduceerd door geïnfiltreerde macrofagen en lymfocyten (Fig.2c). Ook zorgt IFN- γ voor de expressie van class I MHC moleculen, (zie *Genetisch immunologische factoren*) waardoor de destructie van β -cellen door CTLs wordt gefaciliteerd. In figuur 2.d en 2.e worden alle genoemde aspecten samengevat.

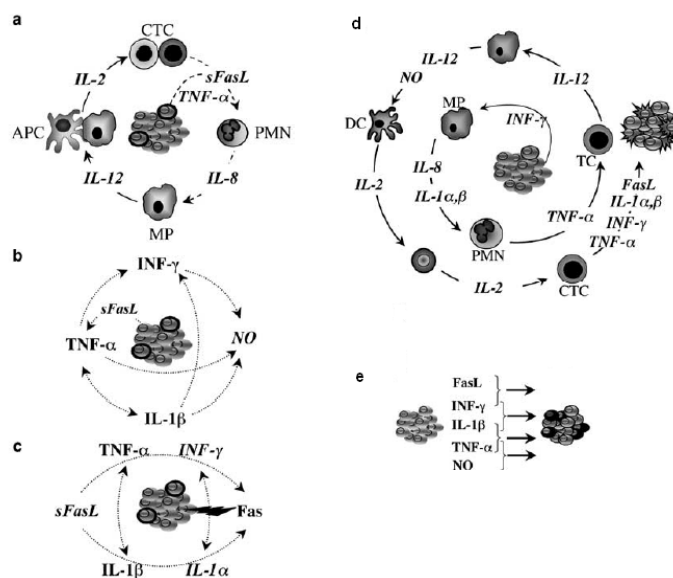


Fig. 2. Afkomstig uit Kaminitz et al (2007), *The vicious cycle of apoptotic β -cell death in type 1 diabetes.* (Bewerkt)

Genetisch immunologische factoren

De oorsprong van de auto-reactieve processen ligt grotendeels in de genen van de patiënten met T1DM. De ziekte wordt gezien als heterogeen met mono-, oligo- en polygenetische variaties. De genetische achtergrond is bewezen, doordat binnen bepaalde families er meer gevallen van T1DM zijn dan verwacht wordt met normale variatie. In de praktijk komt dit er op neer dat mensen die 1^e graads verwant zijn aan patiënten met T1DM een verhoogde kans hebben om de ziekte ook te ontwikkelen.

Volgens Morran et al (2008) is het wel een polygenetische ziekte, maar gaat het slechts om een paar genen die een groot effect hebben. Zij geven aan dat er slechts twee chromosomale regio's zijn die een rol spelen bij de ontwikkeling van T1DM, namelijk het humaan leukocyt antigen (HLA) complex op chromosoom 6p21 (dit wordt ook wel insulindependent diabetes mellitus 1 of IDDM1 genoemd) en het insuline gen (insulindependent diabetes mellitus 2 of IDDM2) op chromosoom 11p15. De bijdrage van deze twee loci op de ontwikkeling van T1DM door genetische overerving is volgens hun onderzoek 42% voor IDDM1 en 10% voor IDDM2.

HLA

Het HLA complex bevat een groep genen die betrokken zijn bij de immuunrespons en samen het major histocompatibility complex (MHC) genoemd worden. Deze genen coderen voor de drie verschillende HLA classes, die elk variëren in structuur en functie. Ze worden als volgt beschreven door Morran et al (2008).

Class I HLA moleculen zijn een dimeer van een α - of zware keten met een klein eiwit, β 2-microglobuline, dat op een ander chromosoom gecodeerd is. Een deel van de zware keten ligt extracellulair en is onderverdeeld in een α 1, α 2 en α 3 domein. De eerste twee zijn verantwoordelijk voor de peptide- en antigeenbinding van het molecuul. Ze zijn gecodeerd in de HLA-A, HLA-B en HLA-C loci (Fig. 3.).

Class II HLA moleculen hebben een α - en een β -keten en bestaan uit vier domeinen, genaamd α 1, α 2, β 1 en β 2. De domeinen verantwoordelijk voor de peptide-binding zijn α 1 en β 1. De loci DR, DQ en DP coderen voor deze moleculen (Fig. 3.).

In een derde regio van het MHC zijn andere moleculen, class III genaamd, gecodeerd. Dit zijn voornamelijk eiwitten van het complement systeem en tumor necrosis factor (TNF).

Uit onderzoek door Todd et al (1987) blijkt dat vooral de DQB β regio een sterke associatie toont met T1DM als er een neutraal aminozuur gecodeerd is. Bij een negatief geladen aminozuur blijkt het te beschermen tegen de ontwikkeling van T1DM. Dit heeft waarschijnlijk invloed op de chemische conformatie van de bindingsdomeinen en daardoor ook op de affiniteit voor bijvoorbeeld de autoantigenen betrokken bij T1DM (Morel et al, 1988).

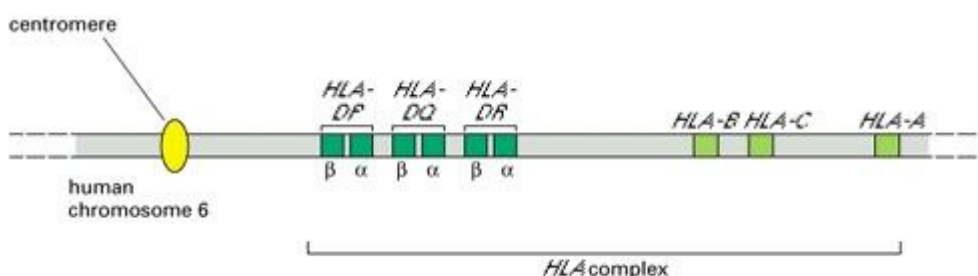


Fig. 3. De korte arm van chromosoom 6 met daarop de loci die coderen voor de class I en II HLA moleculen. Afbeelding afkomstig van: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cell&part=A6673>

Een verklaring hiervoor is dat bij deze class II HLA moleculen de conformatie van de antigeenbinding verandert, wat voor verhoogde affiniteit zorgt van CTLs voor eiwitten op β -cellen van de pancreas, ofwel het falen van het ontwikkelen van centrale tolerantie in de thymus.

Redondo et al (2002) bevestigen dat MHC genen voor ongeveer 50% van de overerving zorgt. Ze hebben twee HLA haplotypen beschreven die een hoog risico meedragen om T1DM te ontwikkelen, namelijk DQ2 en DQ8. Dit wordt onderbouwd door conclusies getrokken uit een onderzoek van Pugliese et al (1995) en. Bijna 90% van patiënten met T1DM blijkt ten minste één van deze twee HLA haplotypen te hebben, vergeleken met 20% van de normale populatie. Ongeveer 50% van kinderen onder de vijf jaar die T1DM ontwikkelen hebben een combinatie van DR3-DQ2 of DR4-DQ8, die de correlatie verder bevestigt.

Het risico dat DQ8 met zich meebrengt wordt gemodificeerd door het aanwezige andere allel op dezelfde haplotype. Dit geldt waarschijnlijk ook voor DQ4 en andere haplotypen. Zoals net genoemd neemt de DR4-DQ8 combinatie veel risico met zich mee, terwijl bijvoorbeeld DR2-DQ8 het best beschermd tegen de ontwikkeling van T1DM. De werking van DR2 moet dus dominant zijn, omdat het in combinatie met het hoog risico houdende DQ8 allel er voor zorgt dat er een verminderde kans is. In theorie betekend dit dat mensen met het DR2 allel nooit T1DM zullen ontwikkelen, maar uit onderzoek van Erlich et al (1991) volgt dat de bescherming niet absoluut is. Dit wijst dus op oorzaken buiten de genetica die bij T1DM een rol kunnen spelen.

Redondo et al (2002) hebben dezelfde theorie als Morran et al (2008), met als verklaring dat de conformatie van HLA moleculen door de verschillende haplotypen er voor kan zorgen dat bepaalde peptiden niet effectief kunnen worden gepresenteerd aan T cellen in de periferie. Hierdoor zal er dus geen activering van T effector cellen plaats vinden en blijft een auto-reactief proces uit.

Ondanks bewijs voor deze theorie door verschillende onderzoeken vinden Pociot et al (2002) dat het door linkage disequilibrium (LD) te moeilijk is om de precieze effecten van individuele allelen te onderzoeken. LD betekent dat er een associatie bestaat tussen specifieke allelen bij verschillende loci (non-random association) en dat sommige allelen altijd met elkaar gepaard zijn. Ook zeggen ze dat ondanks de rol in peptide binding van class II moleculen, ze niet verantwoordelijk kunnen zijn voor alle associaties tussen HLA en de ontwikkeling van T1DM aangezien een replicatie van dit experiment in Japan niet hetzelfde resultaat opleverde. De oorzaak zou de genetische variatie tussen de patiënten in Japan en elders kunnen zijn.

IDDM2

Het insuline gen, ook wel IDDM2 genoemd, is een ander gen dat in verband wordt gebracht met auto-immuun diabetes. Het bewijs hiervoor komt voornamelijk uit case-control- en cohort studies. Het gen komt volgens Pociot et al (2002) in aanmerking als kandidaat gen, omdat insuline of precursors daarvan als auto-antigenen kunnen dienen.

Een unieke minisatelliet (VNTR) ligt op dit gen en bestaat uit herhalingen van een 14-15 base paren lange oligonucleotide sequence. Allelen voor deze minisatelliet bestaan uit drie klassen; class I heeft 23-63 herhalingen, class II gemiddeld 80 en class III 141-209 herhalingen. Er wordt gedacht dat het mechanisme hierachter ervoor zorgt dat de insuline mRNA expressie bij class III VNTR in de thymus twee tot drie keer zo hoog is als bij de pancreas. Hierdoor bestaat er minder kans op auto-reactiviteit door de opbouw van centrale tolerantie in de thymus, door middel van negatieve selectie van CTLs. Bij class I is dit andersom, er is een verhoogd risico voor het optreden van T1DM. Dit komt, omdat de mRNA expressie van insuline heel laag is in de thymus en er een grotere kans bestaat dat auto-reactieve CTLs, die hier een hoge affiniteit voor hebben, geen insuline tegenkomen. Dit heeft als gevolg dat de CTLs niet binden met insuline en er zo geen negatieve selectie kan optreden.

Redondo et al (2002) bevestigen deze theorie, ondanks kleine verschillen in het aantal herhalingen per klasse. Bovendien zeggen ze dat deze bevindingen aantonen dat bepaalde genetische verschillen in expressie van lichaamseigen antigenen in de thymus invloed kunnen hebben op auto-immuniteit.

Andere verdachte loci

Er zijn maar liefst 18 IDDM loci bepaald, waarvan IDDM12 volgens zowel Redondo et al (2002) en Pociot et al (2002) veelbelovend is. De IDDM12 loci codeert voor het cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4). Dit eiwit wordt tot expressie gebracht op het celmembraan van Th cellen en regulatoire T cellen (Tregs). In dierexperimenten is aangetoond dat muizen met gereduceerde aantallen Tregs relatief snel T1DM ontwikkelen. Deze functie werd bewezen door Tregs uit het bloed te filteren, waardoor er een T cel respons op een pancreas antigeen werd geïnduceerd.

Bij binding van CTLA-4 met Th of Tregs B7 moleculen, dit zijn receptoren op het membraan van CTLs, wordt de activering van deze CTLs onderdrukt, waarvan sommige autoreactief kunnen zijn. De hierboven genoemde T cellen onderdrukken de (auto-immuun) reacties van CTLs, doordat B7 normaal gesproken de costimulatie geeft aan de CTLs die nodig is voor activering. CTLA-4 heeft een hogere affiniteit voor de B7 receptoren dan de gebruikelijke receptoren waardoor geen activering plaatsvindt. Mutaties of polymorfisme in dit gen kan leiden tot verlaging van de activiteit van CTLA-4 en dus de inhiberende functie hiervan. Definitief bewijs voor een correlatie tussen IDDM12 en T1DM ontbreekt.

Er zijn nog veel meer verdachte loci waarvan gezegd wordt dat ze invloed hebben op de ontwikkeling van auto-immuniteit bij diabetes. Pociot et al (2002) geven bijvoorbeeld de genen aan die coderen voor eiwitten die betrokken zijn bij de antigeenpresentatie, bijvoorbeeld TAP1 en TAP2. Deze eiwitten zorgen voor het transport van lichaamsvreemde eiwitten uit het cytosol naar het lumen van het endoplasmatisch reticulum. Zonder TAP1 en TAP2 kan een MHC molecuul niet binden aan een antigeen en vindt er geen antigeen presentatie plaats. Hier is echter nog geen bewijs voor. Wel valt uit deze veronderstelling te concluderen dat alle genen die te maken hebben met de antigeenpresentatie mogelijk betrokken kunnen zijn bij patiënten met T1DM.

SNP: PTPN22

De voorbeelden die hierboven genoemd zijn maken deel uit van allel variaties. Er zijn ook genen die door puntmutaties een persoon gevoelig kunnen maken voor het ontwikkelen van T1DM. Deze single nucleotide polymorphisms (SNPs) kunnen overal plaatsvinden, maar het is moeilijk om ze in verband te brengen met bepaalde ziekten. Een voorbeeld waar een mogelijke associatie kan zijn is het proteïne tyrosine fosfatase N22 Lyp, ofwel PTPN22. Onengut-Gumuscu et al (2006) vinden dat het bewijs hiervoor komt uit een experiment met muizen die een homoloog produceren, genaamd Pep. Pep heeft een inhiberende functie op de activering van antigeen specifieke T cellen door bepaalde onderdelen van de signaal cascade te defosforyleren. Een puntmutatie in het gen dat codeert voor Pep zou er voor kunnen zorgen dat de inhiberende functie weg valt, door een veranderde chemische conformatie en verlaagde affiniteit voor de moleculen die het moet defosforyleren, waardoor auto-reactieve CTLs geactiveerd blijven (Hasegawa et al, 2004).

Omdat deze inhiberende werking waarschijnlijk ook voor Lyp geldt, is het PTPN22 gen mogelijk betrokken bij het induceren van T1DM. In ander onderzoek van Bottini et al (2004) werd gevonden dat bij een SNP op plaats 1858 van dit gen de base cytosine (C) of thymine (T) voorkomt, waarbij de T variant geassocieerd wordt met T1DM. Uit weer een ander onderzoek van Vang et al (2005) bleek juist dat de inhiberende functie werd versterkt door de 1858T variant. Er is dus nog geen correlatie aangetoond van PTPN22 met T1DM. Een alternatieve hypothese van deze de auteurs, is dat er vier andere genen bij liggen en dat wellicht een ander gen dan PTPN22 verantwoordelijk is voor auto-immuniteit bij diabetes.

Wel betekent dit dat SNPs op andere genen ook een invloed zouden kunnen hebben op de ontwikkeling van T1DM en dat dit bij andere auto-immuunziekten ook voor kan komen.

Four loci with strong evidence of association with T1D risk					
Gene or locus	Variant	Chromosomal location	Frequency in T1D cases ^a	Odds ratio ^a	λ_s ^a
HLA	DR3 or DR4	6p21	90%	36	2.5–3.4
INS	VNTR class I	11p15	71%	1.9	1.1
PTPN22	1858C>T rs2476601 ^b	1p13	17%	1.7–1.83	1.05–1.25
CTLA4	CT60 rs3087243 ^b	2q33	60%	1.15–1.2	1.01–1.07

^a Estimates and ranges for allele frequency, odds ratios and sibling risk ratios (λ_s) are taken from multiple studies of T1D in populations of Northern European origin [4,7^{**},8,28–32].

^b Reference SNP number in dbSNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

Abbreviations: CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4; HLA, human leukocyte antigen; INS, insulin; LOD, logarithm of the odds; PTPN22, protein tyrosine phosphatase N22; SNP, single nucleotide polymorphism; T1D, type 1 diabetes; VNTR, variable number of tandem repeats.

Tabel 1. Tabel afkomstig uit Onengut-Gumuscu et al (2006), *Recent advances in the immunogenetics of human type 1 diabetes*.

In tabel 1 staan de vier genoemde kandidaat genen die mogelijk in staat zijn de ontwikkeling van T1DM te kunnen stimuleren met daarbij de frequentie in patiënten. Ondanks de relatief kleine bijdrage van PTPN22 maakt dit wel deel uit van de genetische gevoeligheid voor T1DM en zouden alle diabetogeenische genen opgezocht moeten worden om een goede risicoanalyse te kunnen maken voor het ontstaan hiervan.

Virale infecties

Zoals hierboven vermeld spelen er naast genetische, ook factoren uit het milieu een rol bij de auto-immuniteit. Van deze triggers uit het milieu zijn er nog niet veel bekend, maar veelbelovende en veel onderzochte triggers zijn virale infecties. Dit volgt uit een constatering van Richer et al (2009) dat genetisch identieke tweelingen niet altijd dezelfde ziektes ontwikkelen, waaronder T1DM. Ook blijkt de opkomst van T1DM gevallen overeen te komen met de seizoenspatronen van virale infecties en epidemiologische studies wezen uit dat virus uitbraken gepaard gingen met een uitbarsting van T1DM gevallen (Richer et al, 2008)..

Volgens Goldberg et al (2009) kan een virus via drie bepaalde mechanismen T1DM veroorzaken;

1. Activering van polyclonale B- en T cellen door het virus. Hierbij worden auto-antilichamen geproduceerd die destructie van de cellen in de Eilandjes van Langerhans tot gevolg kunnen hebben. De T cellen zullen de β -cellen via de genoemde processen in *De rol van T cellen en autoantigenen* vernietigen via cel-cel contact.
2. Virussen produceren homologen van autoantigenen, ook wel mimicking genoemd. Dit is beschreven in *De rol van T cellen en autoantigenen*.
3. Activering van de ontstekingsreactie door de infectie. Hierdoor wordt de expressie van moleculen die deel uit maken van het proces van auto-antigeen herkenning verhoogd en is er een grotere kans op herkenning en destructie door CTLs.

Meerdere virussen worden verdacht van het op gang brengen van T1DM. (Tabel 2) Een aantal zullen hieronder behandeld worden.

Virus	Potential mechanisms
Coxsackievirus	Bystander Damage Release of sequestered antigens
Cytomegalovirus	Molecular mimicry Congenital infections
Epstein–Barr virus	Molecular mimicry
Hepatitis A virus	Unknown
Hepatitis C virus	Molecular mimicry
Human endogenous retrovirus	Superantigens
Mumps virus	Unknown
Parvovirus B19	Change in Treg/effector T cell balance
Rotavirus	Molecular mimicry Repeated infections
Rubella	Molecular mimicry Congenital infections

Tabel 2. Virussen met de mens als gastheer die geassocieerd worden met het induceren van T1DM. Richer et al (2009), *Preventing Viral-induced Type 1 Diabetes. Are Regulatory T Cells the Answer?*

Voorbeelden uit dierexperimenten

Er zijn voorbeelden uit dierexperimenten waar duidelijk een relatie is gevonden tussen het op gang brengen van auto-immuniteit en het ontstaan van T1DM. Dit is het encephalomyocarditis (EMC) virus bij muizen en het Kilham rat virus (KRV) bij ratten. Yoon et al (2006) geven de volgende verklaringen.

De EMC-D variant van het EMC virus bij muizen kan veel duidelijkheid geven over het auto-immuunproces bij T1DM in mensen, omdat het 776^e aminozuur, alanine (Ala-776), deel uitmaakt van het eiwit dat codeert voor VP1, een eiwit dat de capside van het virus vormt. Dit eiwit is als enige hetzelfde in alle varianten van het EMC virus die T1DM faciliteren. Door deze veranderde chemische configuratie is er meer oppervlakte beschikbaar voor virussen om aan β -cellen te binden (Yun et al, 1998). Door de infectie zal er destructie plaatsvinden met T1DM als gevolg. Gedane experimenten toonden aan dat bij hoge doseringen van het EMC-D virus er acute destructie van de β -cellen volgt, waarbij de immunrespons niet betrokken is. Bij lagere doseringen werden er macrofagen geactiveerd. Deze infiltreren de Eilandjes van Langerhans, gevolgd door migratie van NK-, T- en B-cellen naar dit gebied. De werking van dit mechanisme is niet helemaal bekend, maar er wordt gedacht dat tyrosine kinases de macrofagen activeren. Deze produceren op hun beurt IL-1 β en TNF- α waardoor iNOS tot expressie wordt gebracht. De NO productie door iNOS, zoals verteld, zet de cel aan tot apoptose.

Bij ratten zorgt KRV voor een auto-immunrespons tegen de β -cellen. Er is geopperd dat dit komt, doordat een KRV specifiek eiwit een zelfde epitoomp heeft als een β -cel autoantigeen (Guberski et al, 1991). Hierdoor kan er een kruisreactie van antigeen specifieke CTLs optreden tegen de β -cellen. Macrofagen spelen hierbij een belangrijke rol, doordat ze de immunrespons in gang zetten door het produceren van IL-1 β , TNF- α en IL-12. Een alternatieve hypothese is dat de KRV infectie de balans in het immuun systeem verstoort, waardoor autoreactieve T cellen worden geactiveerd, wat vervolgens tot T1DM leidt. Bij de rat zijn CD4+ T cellen te verdelen in cellen die lijken op humane Th1 en Th2 cellen. Th1 reguleert de cellulaire immunrespons en Th2 de humorale immunrespons. Een infectie met KRV leidt tot de up-regulatie van de op humaan lijkende Th1 cellen en tot een down-regulatie van de op humaan lijkende Th2 cellen. Hierdoor slaat de balans door naar de cellulaire immunrespons waardoor er meer effector T cellen worden geactiveerd die mogelijk schadelijk kunnen zijn voor de β -cellen.

Enterovirus

Enterovirussen zijn veel onderzocht voor hun rol in het induceren van T1DM. Dit zijn ssRNA virussen (ofwel virussen met enkelstrengs RNA als genoom) die vooral in de darmen van dieren worden gevonden. In de review van Goldberg et al (2009) wordt gezegd dat sommige van deze soort virussen direct de β -cellen kunnen vernietigen, maar uit diermodellen komt naar voren dat dit afhankelijk is van het feit of er al een andere infectie was, waardoor de pancreas gevoeliger is voor een secundaire virale infectie (Drescher et al, 2004). Andere studies kwamen tot de conclusie dat enterovirussen een indirect effect hebben op de auto-immunrespons.

Volgens Schulte et al (2010) wordt de hypothese van de door enterovirussen geïnduceerde T1DM onderbouwd, doordat cohort studies hebben aangetoond dat infectie met dit soort virussen samenvalt met het begin van auto-immunziektes (Hyoty et al, 2002). De destructie van de β -cellen kan via een auto-immunreactie door een enterovirus tot stand worden gebracht of door het infecteren van de cellen met apoptose als gevolg, beide routes sluiten elkaar niet uit. Andere bevindingen die hiermee in overeenstemming zijn is de aanwezigheid van enterovirus RNA in het bloed en in de cellen van de Eilandjes van Langerhans (Richardson et al, 2009). Er moet gezegd worden dat dit ook het gevolg kan zijn geweest van eerdere infecties, dit is echter nooit onderzocht. Als alternatieve hypothese geven ze dat mensen met T1DM misschien vatbaarder zijn voor enterovirussen of dat ze deze minder goed kunnen klaren.

In een experiment van de Leeuw et al (1998) tonen ze aan dat bij vier van de tien patiënten met T1DM het RNA van het enterovirus in mononucleaire cellen van het bloed terug te vinden is. Daarvan zijn er twee waarbij het ook in hun plasma is aangetroffen. Slechts bij één van de patiënten werd dit virus aangetroffen tijdens het enterovirus seizoen. Bij de controle groep werd niks aangetroffen. In tegenstelling tot bij voorgaande studies vonden zij geen verhoging van IFN- α , dit is een cytokine die de immuunrespons op gang brengt. Zij komen hierdoor tot de conclusie dat patiënten met T1DM een vertraging kunnen hebben in het verwijderen van het virus uit het lichaam en dat er dus geen directe relatie bestaat tussen het enterovirus en het tot stand komen van T1DM.

Een bekend enterovirus is het coxsackievirus. Richer et al (2009) hebben literatuuronderzoek verricht naar een bepaalde stam coxsackievirus, CB4 genaamd. Zij vonden bij patiënten met T1DM een verhoogd niveau aan coxsackievirus-antilichamen en isoleerden CB4 uit de pancreas van een diabetes patiënt. Door andere studies is aangetoond dat CB4 niet zelf T1DM kan veroorzaken, maar eerder faciliteren. Dit kwam voort uit een experiment (Serreze et al, 2000) waaruit bleek dat er naast een virale infectie wel genoeg autoreactieve T cellen aanwezig moesten zijn om de ziekte te kunnen veroorzaken. Het mechanisme hierachter is dat geïnfecteerde β -cellen aan het immuunsysteem worden gepresenteerd door macrofagen. Als gevolg komt er een immuunrespons dat gericht is tegen de pancreas. Daarnaast versnelt CB4 het auto-immuun proces door epitopen te presenteren waarop autoreactieve T cellen kunnen binden.

Een conclusie dat ze uit een onderzoek van Walker et al (2008) trokken was dat functie van de Tregs vermindert en niet de absolute aantallen. Dit komt overeen met de observatie dat T1DM patiënten even veel van deze Tregs hebben als gezonde mensen. Door de verminderde functie kunnen ze effector T cellen, zoals CTLs, minder goed kunnen inhiberen. De consensus is dat dit wordt veroorzaakt door APCs. De precieze mechanismen hierachter zijn onbekend, maar gedacht wordt dat er een verstoorde productie van IL-2 plaatsvindt bij deze APCs die normaal gesproken de activering van Tregs reguleren. Door de binding van een antigeen aan IL-2 wordt uiteindelijk FOXP3 gevormd. Dit eiwit is betrokken bij DNA transcriptie in de nucleus van cellen, maar de rol die het speelt bij de aansturing van Tregs is nog onbekend. Ook Toll-like receptoren (TLRs) spelen een rol bij het behouden van de functie, doordat ze aanleiding geven tot de productie van pro-inflammatoire cytokinen die de Treg functie verder onderdrukt.

Deze twee mechanismen samen, het activeren van autoreactieve T cellen en het onderdrukken van de Treg functie, zouden een oorzaak achter de acceleratie van T1DM na een virale infectie kunnen zijn.

Dotta et al (2007) hebben een immunohistochemisch experiment uitgevoerd met CB4 waaruit bleek dat het virus specifiek β -cellen infecteert (Fig. 4) en daarna doodt door cytolyse. Dit is een variatie op het eerste mechanisme genoemd door Goldberg et al (2009). Daarnaast vonden ze bij dit experiment dat bij drie van de zes patiënten infiltratie van natural killer (NK) cellen in de Eilandjes van Langerhans. De NK cellen zijn, net zoals macrofagen, vaak betrokken bij het op gang brengen van de ontstekingsreactie, waarna een volledige immuunrespons geactiveerd wordt. De aanwezigheid van NK cellen zou dus kunnen duiden op het begin van een auto-immunreactie.

Met behulp van electron microscopie observeerden ze virale partikels in β -cellen, maar niet in α - of δ -cellen. Ongeveer 40% van de β -cellen bleek schade aan de kern te vertonen wat erop duidt dat de cellen pycnotisch zijn. Hiermee wordt de condensatie van chromatine bedoeld, wat betekent dat de cel apoptose ondergaat.

CB4 hoeft niet perse β -cel destructie als gevolg te hebben, dit omdat er geen CTLs infiltratie is. Door IL-10 productie probeert het virus het immuunsysteem te ontsnappen. De α - en δ -cellen worden niet aangetast doordat ze waarschijnlijk anders te werk gaan om het virus te verwijderen. De virale infectie leidt wel tot insulitis, maar dit is niet genoeg om T1DM te veroorzaken en zal daarvoor altijd hulp nodig hebben van het immuunsysteem.

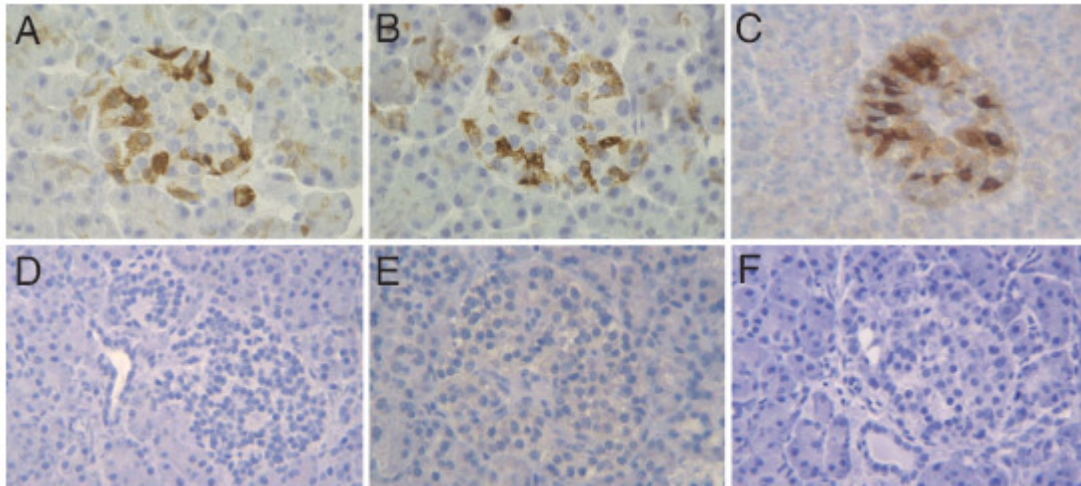


Fig. 4. Dit zijn β -cellen van de pancreas. Hier is VP-1 expressie (bruin) onderzocht. Dit is een eiwit die tot expressie komt op de capside van het enterovirus. A-C zijn cellen van drie verschillende T1DM pancreas donoren. D was van een patiënt die recent T1DM ontwikkeld had. E-F zijn van controle pancreas donoren.

Cytomegalovirus

Het cytomegalovirus (CMV) is een ander virus dat in verband wordt gebracht met T1DM. Er zijn verschillende experimenten uitgevoerd, maar volgens Goldberg et al (2009) zijn er tegenstrijdige resultaten. Zo is er een correlatie aangetoond door Pak et al (1988) tussen delen van het virale genoom van CMV in T cellen en antilichamen met de aanwezigheid van het virus in de β -cellen van T1DM patiënten. Dit betekent dat het CMV een auto-immunreactie kan veroorzaken. Dit is echter nog niet bevestigd. Ander onderzoek spreekt dit echter tegen. De precieze rol van CMV bij de inductie van T1DM is nog niet bekend en het mechanisme erachter wordt nog steeds onderzocht. Uit dierexperimenten volgt dat CMV wel T1DM kan veroorzaken door de activering van macrofagen en autoreactieve T cellen of door de inductie van antilichamen gericht tegen de β -cellen bij genetisch vatbare individuen (van der Werf et al, 2003). Over de processen die hierbij een rol spelen is slechts weinig bekend.

Hepatitis C

In een case studie door Masuda et al (2007) kwam naar voren dat Hepatitis C (HCV) de ontwikkeling van T1DM accelereert. Meestal beginnen de klassieke symptomen van auto-immuun diabetes een paar weken voor de diagnose, bij deze patiënt duurde dit slechts zes dagen. Dit was zeer interessant, omdat dit gepaard ging met acute HCV infectie. Bewijs voor het feit dat de infectie recent was bleek uit een hoog serum gehalte aan IL-18, een cytokine die de ontstekingsreactie bevordert. Ook wordt er IFN- γ geproduceerd door de geïnfecteerde β -cellen waardoor de Th1 respons gestimuleerd wordt. Daarnaast worden er IL-1 β en TNF- α geproduceerd, die de β -cellen beschadigen, auto-immuniteit kunnen induceren en insuline resistentie kunnen stimuleren. Het mechanisme is nog niet bekend en kan één, of een combinatie van, de mechanismen zijn die gegeven worden door Goldberg et al (2009). Ze geven als conclusie dat er geen bewijs is dat HCV T1DM veroorzaakt, maar dat IL-18 hierbij een belangrijke rol kan spelen.

Overige virussen

Het Paramyxovirus, dat de bof veroorzaakt, wordt ook genoemd door Goldberg et al (2009), omdat een epidemiologisch onderzoek uitwees dat er een correlatie bestaat. Het mechanisme van dit virus is onbekend, maar gedacht wordt dat de β -cellen bij infectie cytokinen produceren die de ontstekingsreactie op gang brengen waardoor insulitis kan ontstaan (Cavallo et al, 1992). Hierdoor kunnen geïnfecteerde β -cellen het doel worden van de immuunrespons en kan er via het proces beschreven in *Vicieuze apoptose cyclus* auto-immuun diabetes ontstaan.

Infecties veroorzaakt door het rotavirus worden ook verdacht van deze werking. Er is een correlatie gevonden tussen de opkomst van antilichamen tegen β -cellen en insuline en T1DM (Honeyman et al, 2000). Dit is echter nooit bevestigd.

Rubella virussen worden ook verdacht van het induceren van T1DM. Rubella blijkt homologen van antigenen te maken die herkend worden door CTLs bij patiënten met auto-immuun diabetes. Ander bewijs voor de inductie van T1DM bij het bof virus en rubella is dat na vaccinatie tegen beide het aantal patiënten met ontwikkeling van auto-immuun diabetes terugloopt (Hyoty et al, 1993). Dit wordt bevestigd door Gale et al (2008), met als voetnoot dat de patiënt genetische aanleg moet hebben voor de ontwikkeling van T1DM.

Bacteriële infecties

Andere micro-organismen, zoals bacteriën, kunnen volgens Goldberg et al (2009) ook infecties veroorzaken en misschien dus ook T1DM faciliteren. Van bacterieel DNA is bekend dat deze antilichaamproductie stimuleert (Pisetsky et al, 2008). Wederom zijn eerdere genoemde drie mechanismen waarschijnlijk verantwoordelijk voor de auto-immuniteit. Een nieuw mechanisme is dat bacteriën toxines produceren die de cellen in de pancreas beschadigen. De toxines veroorzaken ook glucose intolerantie en reductie van het aantal cellen (met name β -cellen) in de pancreas.

Veranderingen in de microbiota in de darmen hebben in dierexperimenten aangetoond de ontwikkeling van T1DM te stimuleren. Andere bacteriën zoals *Mycobacterium avium* en *Bordetella pertussis* (kinkhoest) worden ook verdacht van deze activiteit, maar er is nog geen correlatie aangetoond.

Behandelmethode gericht tegen auto-immuniteit

Immunomodulatie

Traditionele behandelmethoden bij T1DM, zoals diëten en insuline spuiten, bestrijden alleen de symptomen en bieden geen gehele genezing. Bij immunomodulatie wordt het immuunsysteem zodanig veranderd dat er geen auto-immunreactie meer optreedt en zo het proces van de destructie van β -cellen wordt voorkomen of zelf terug gedraaid. De hieronder genoemde immunomodulerende behandelmethoden worden nog steeds onderzocht.

Antilichaam therapie

Er bestaan antilichaamtherapieën die gericht zijn op het onderdrukken van de CTLs respons. Voorbeelden hiervan komen uit von Herrath et al (2006) en zijn anti-lymphocyte-antisera (ALS), anti-CD3 en anti-CD4 monoclonale antilichamen (mAbs). ALS en anti-CD4 mAbs zijn sterke immuun suppressors, doordat ze binden aan de CD4 receptoren van CTLs. Hierdoor wordt de binding van deze receptoren met MHC moleculen voorkomen en vindt er geen stimulatie van deze auto-reactieve CTLs plaats. Anti-CD3 mAbs is meer een immuun modulator, doordat het een veranderde structuur heeft in de Fc regio, waardoor deze niet meer kan binden aan de Fc receptoren op macrofagen. De Fc regio en receptor zorgen normaal gesproken voor binding van een antilichaam aan een cel of aan peptiden. Door deze Fc receptoren vindt er opsonisatie van peptiden of microben plaats, zodat deze uiteindelijk binden aan macrofagen. Door fagocytose zullen de cellen of peptiden onschadelijk worden gemaakt. Volgens von Herrath et al (2006) is de laatst genoemde antilichaam therapie veelbelovend doordat het onder andere het hele traject bij het ontstaan van T1DM kan omdraaien. Verhoogde C-peptide niveaus gaven het bewijs (Keymeulen et al, 2005). C-peptide is een bijproduct dat ontstaat bij de omzetting van pro-insuline naar insuline waarvan de hoeveelheid geproduceerde insuline en dus de toestand van de β -cellen afgeleid kan worden. Een nadeel van deze therapie is onder andere dat het geen blijvend effect heeft op de progressie van T1DM.

DiaPep277

DiaPep277 is een peptide dat is afgeleid van het menselijke heat shock proteïne (HSP) 60. Volgens Eldor et al (2009) is de functie van HSP60 het activeren van CD4⁺ Treg cellen via de Toll-like receptor 2 (TLR2). Hierdoor wordt de regulatoire activiteit van deze T cellen verbeterd. Deze CD4⁺ Treg cellen zorgen voor een verschuiving van de Th1 immuunrespons naar de Th2 immuunrespons door de productie van IL-10 en TGF- β . Ook activeert HSP60 het aangeboren immuunsysteem door het activeren macrofagen door binding aan TLR4 en door de productie van TNF- α , IL-1, IL-6, NO en vele andere cytokinen. Hierdoor wordt de Th1 immuunrespons bevorderd. HSP60 wordt ook beschouwd als een autoantigeen in de ontwikkeling van T1DM. Dit komt omdat in NOD muizen antilichamen werden gevonden die gericht waren tegen dit eiwit.

DiaPep277 verschilt in werking met HSP60 dat het wel aan de TLR2 bindt, maar niet aan de TLR4 (Nussbaum et al, 2006 en Eldor et al, 2005). Zonder de activering van macrofagen vindt er geen CTLs activering plaats, en wordt de immuunrespons verder naar de Th2 kant gebracht. Hierdoor zal de destructie van β -cellen voorkomen worden door de sterkte activering van Tregs en Th2 cellen. De werking van DiaPep277 is schematisch weergegeven in figuur 5.

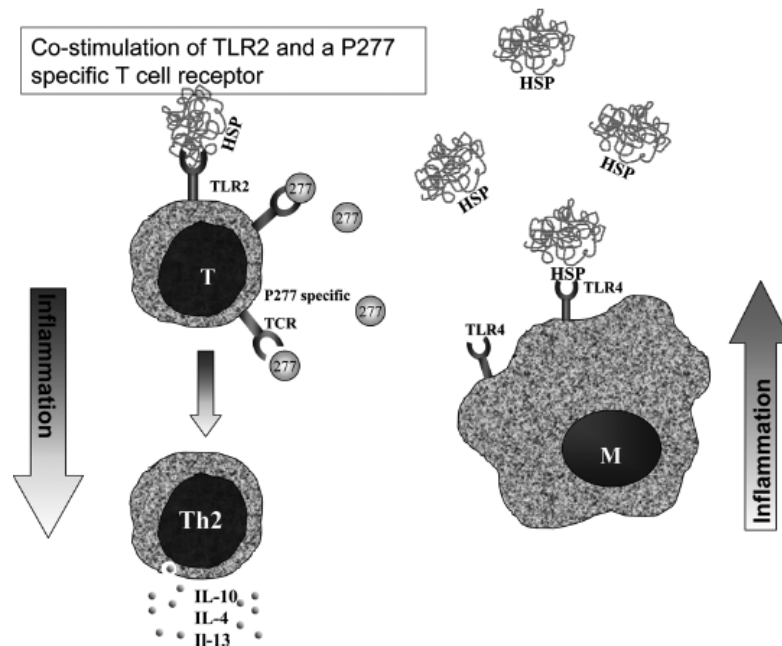


Fig. 5. Figuur afkomstig uit Eldor et al (2005) *Innovative Immune-Based Therapeutic Approaches for the Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus*.

GAD therapie

Een andere immunomodulerende therapie die onderzocht wordt is GAD-therapie. Zoals vermeld (*Rol van T cellen en autoantigenen*) zet dit enzym glutamaat om in GABA. Verder vermelden Ludvigsson et al (2009) dat bij verhoogde concentraties glucose in het bloed niet alleen insuline wordt geproduceerd, maar ook GAD. Gedacht wordt dat de werking van het product van dit enzym betrokken is bij het reguleren van hormoonafgifte en communicatie tussen β -cellen zelf of met andere endocriene cellen.

In een experiment van Agardh et al (2005) met toediening van GAD65 aan T1DM patiënten was als resultaat de verhoging van cytokine secretie te zien, zoals IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ en TNF- α , die allemaal de Th2 immuunrespons stimuleren. Ook werd er een verhoogde expressie van FOXP3 en TGF- β gevonden. FOXP3 is een regulator in de ontwikkeling en functie van Tregs, hoe dit precies werkt is nog onbekend. Of dit in verband staat met een verhoogde T cel regulatie is nog niet aangetoond, maar is zeer waarschijnlijk. GAD-therapie richt zich volgens hen op het voorkomen van het auto-immuunproces door modulatie van het immuunsysteem.

Tregs

Als laatste zijn de Tregs van bijzondere interesse, omdat ze de CTLs activering onder controle houden en zo auto-immuunreacties tegen gaan. Een groot nadeel is dat Tregs moeilijk genetisch te modificeren zijn omdat ze onder standaard ex vivo omstandigheden anergisch worden, waardoor ze niet reageren op lichaamsvreemde peptiden. Hombach et al (2009) heeft hier onderzoek naar gedaan en heeft aangetoond dat dit wel mogelijk is met behulp van CD3 en CD28 costimulatie. Met de genetische modificatie werd er een immunoreceptor tot expressie gebracht die andere Tregs activeerde, met IL-10 productie tot gevolg, die vervolgens de CTLs respons in vivo onderdrukte. De mogelijkheid voor verdere genetische modificatie van Tregs en het bewerken van de repressor functies kunnen nu onderzocht worden met eventuele behandelmethoden tot gevolg.

Anti-virale behandelmethoden

In recent onderzoek door Hultcrantz et al (2007) kwam naar voren dat β -cellen in antivirale toestand raken door interferons (INFs). INFs zijn eiwitten die worden geproduceerd door alle lymfocyten. Ze functioneren als signaalmoleculen tussen lichaamscellen waardoor er een verhoogde expressie van receptoren wordt bewerkstelligd die antigenen kunnen herkennen, zodat de verdediging hiertegen verbeterd. Zo werd een verhoogde expressie gevonden van genen die betrokken zijn bij de ontstekingsreactie en verdediging tegen virale infecties bij een infectie met een bepaald Coxsackie B virus (CVB3). Deze genen waren de Toll-like receptor 3 (TLR3), retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) en melanoma differentiation associated gene-5 (MDA-5) die als intracellulaire sensoren werken voor viraal DNA/RNA. Als deze receptoren binden aan antigenen start er een casade die als resultaat de productie van inflammatoire cytokinen heeft, waardoor er een immuunreactie tegen geïnficeerde cellen geïnduceerd wordt. Voornamelijk type I IFNs (IFN- α en β) zijn zeer effectief in het induceren van deze mechanismen.

Door deze antivirale toestand werd de replicatie van het CVB3 verhinderd wat uit de titers (concentratie van antilichamen) bleek van de gecultiveerde menselijke β -cellen. Dit biedt mogelijkheden voor behandelmethoden, omdat dit door deze respons tot verdediging van virale infecties en de eventuele ontwikkeling van T1DM leidt en reeds geïnficeerde cellen aanspoort tot apoptose.

Combineren van therapieën

Van alle immunomodulerende therapieën zijn slechts anti-CD3 antilichamen, DiaPep277 en GAD65 klinisch getest waaruit blijkt dat niet alle T1DM patiënten er even veel baat bij hebben en alsnog insuline afhankelijk zijn. Dit kan komen doordat de hoeveelheid β -cellen die nog functioneren en het T cel repertoire van patiënt tot patiënt verschilt. Bresson et al (2007) denken dat door deze verschillen een monotherapie niet zal werken. Zij stellen voor om twee belangrijke doelen te halen waarin variatie per patiënt mogelijk is. De twee doelen zijn;

1. Het blokkeren van de immuunrespons en er voor zorgen dat auto-reactieve processen worden stil gelegd zonder ernstige neveneffecten.
2. De regeneratie van β -cellen zodat insuline toediening niet meer noodzakelijk is.

Het eerste doel is volgens hen te bereiken door een combinatie van anti-CD3 antilichamen waardoor de proliferatie van Tregs wordt bevorderd. Door clonale expansie zullen andere Tregs migreren naar de ontsteking of naar de lymfeknopen in de pancreas, waar ze de auto-immuunprocessen onderdrukken. Dit gebeurt door de productie van IL-10 en TGF- β onder invloed van de Tregs. Een andere immunomodulator, zoals DiaPep277, zou ook een goede kandidaat zijn om te combineren met de anti-CD3 antilichamen.

Een andere mogelijkheid is het gebruiken van peptide-MHC (pMHC) multimeren, die Tregs kunnen activeren of anergie induceren in auto-reactieve CTLs. Dit is nog niet goed onderzoek.

Er zijn redenen om aan te nemen dat β -cellen een natuurlijk regeneratief vermogen hebben, maar dit kent een grens. Niet alle patiënten zullen daarom evenveel van de behandelingen die hierboven zijn genoemd profiteren. Bij een lage C-waarde is aangetoond dat EGF en gastrine β -cel neogenese mogelijk maken. Mocht er een extreem lage C-waarde zijn is de enige optie transplantatie van de pancreas of de Eilandjes van Langerhans.

Eldor et al (2005) pleiten voor een vaccin dat gericht is tegen meerdere auto-antigenen zoals GAD, insuline en DiaPep277 gecombineerd met anti-CD3 antilichamen. Deze zal al jaren voor de manifestatie van symptomen toegediend moeten worden aan patiënten waarbij uit een risicoanalyse is gebleken dat ze een verhoogd risico hebben op het ontwikkelen van T1DM.

De diagnose van T1DM zou volgens von Herrath et al (2006) moeten gebeuren door middel van non-invasieve methoden om de β -cel massa te bepalen. De volgende stap zou bestaan uit het stilleggen van het immuunsysteem en dus de auto-reactieve CTLs. Daarna zal een vaccinatie nodig zijn die is afgestemd op de T cel repertoire van die patiënt. Als laatste optie geven zij ook aan dat bij sommige patiënten met extreem lage C-waarden chemische of chirurgische maatregelen nodig zijn.

Bresson et al (2007) veronderstellen dat een combinatie van behandelmethoden de effectiviteit verbetert en het risico op neveneffecten verminderd wordt. Met antigeen specifieke therapie kan lange termijn tolerantie optreden waardoor verdere behandeling niet nodig is. Voor patiënten met C-waarden die niet voldoende zijn, zal een aanvulling regeneratieve medicijnen beschikbaar moeten zijn.

Uiteindelijk zal een goed gebalanceerde therapie een antigeen specifieke blokkade van auto-reactieve T cellen combineren met een herstel van de β -cel massa.

Discussie

De onderliggende auto-immuunprocessen van T1DM zijn zeer complex en de precieze mechanismen nog onbekend. Door het vele onderzoek dat naar deze auto-immuun ziekte gedaan wordt groeit de kennis gestaag en zullen de mechanismen ontrafeld worden. Niet alleen zal dit gevolgen hebben voor de zoektocht naar behandelmethoden, het zal ook kennis verschaffen over de complexe processen die zich voordoen in het menselijke lichaam, waardoor er ook meer geleerd kan worden over andere auto-immuun ziektes. Onderzoek is dus zeker de moeite waard.

Het auto-immuunproces bij T1DM heeft meerdere factoren waardoor er veel mogelijkheden zijn om in te grijpen. Doordat alle cellen in van de immuunrespons betrokken zijn zullen er meerdere mechanismen tegelijk moeten worden aangepakt. De CTLs respons zorgt voor de daadwerkelijke destructie van de β -cellen, maar deze worden geactiveerd door macrofagen en gereguleerd door Tregs. Deze interacties maken het een onmogelijk om slechts één aspect te veranderen. Alle betrokken cellen zullen verder moeten worden onderzocht.

Het aantal genetische factoren dat betrokken is bij de ontwikkeling van T1DM is groot. Uiteraard zijn al deze loci zeer interessant, maar de bijdrage hiervan zal gering zijn. Het HLA complex is misschien als enige aantrekkelijk voor de totstandkoming van behandelmethoden vanwege de $\pm 50\%$ overerving. Nieuwe loci die ontdekt worden kunnen bijdragen aan het complete beeld van T1DM, maar men moet rekening houden met de frequentie van het gen en het effect, waardoor ze waarschijnlijk niet betrokken zullen worden in het onderzoek naar genezing. Wel kan er via deze weg een risico analyse gemaakt worden waardoor vroege opsporing van T1DM gerealiseerd kan worden. Individuen met een genetische aanleg voor deze ziekte zouden regelmatig moeten worden gecontroleerd en eventueel uit voorzorg behandeld worden.

Ook virale infecties worden geassocieerd met de ontwikkeling van T1DM, maar is niet de belangrijkste oorzaak. Mensen die door hun genetische achtergrond meer risico lopen zouden extra in de gaten moeten worden gehouden bij infecties met deze virussen. Het toedienen van vaccins kan zeer nuttig werk verrichten om deze infecties te voorkomen, maar dit zal waarschijnlijk afhangen van de kosten-baten analyse. Dit vergt namelijk veel onderzoek en zal misschien niet opwegen tegen de uiteindelijke positieve effecten ervan. Als er sprake is van een infectie bij een persoon met een hoog risico op T1DM kan er een interferon therapie gestart worden om de anti-virale staat van de β -cellen te induceren.

Het beste perspectief wordt geboden door immunomodulerende behandelmethoden. Dit is niet alleen zeer effectief in het bestrijden van de symptomen, het kan ook dienen voor de regeneratie van β -cellen zodat de patiënten niet meer insuline afhankelijk zullen zijn. De processen pakken de kern van T1DM aan, namelijk het auto-immuunproces zelf. Deze is uit balans gebracht en wordt via deze weg weer hersteld. Het achterliggende mechanisme is de sleutel tot een snelle diagnose, door het daadwerkelijke mechanisme aan te pakken zal het proces gestopt en eventueel ook omgekeerd kunnen worden. Combinaties van deze therapieën kunnen bij aanvang van de eerste verschijnselen het immuunsysteem zo beïnvloeden dat niet alleen de auto-activiteit wordt gestopt, maar ook het aantal gezonde β -cellen hersteld wordt. Hier is echter nog veel onderzoek voor nodig.

Het belangrijkste doel in de toekomst van onderzoek naar T1DM is een snelle diagnose, ver voor de klinische symptomen zich voordoen, met een therapie die de kern van auto-immuunproces aanpakt wat uiteindelijk zal leiden tot de definitieve genezing.

Nawoord

Deze scriptie is geschreven in combinatie met de research cursus *Immunologie en Infectieziekten*, onderdeel van de bachelor Biomedische Wetenschappen. Ook zou ik via deze weg graag dr. M. M. Faas bedanken voor de begeleiding bij het opzetten en schrijven van deze scriptie.

Referenties

- Agardh C. D., Cilio C. M., Lethagen A., Clinical evidence for the safety of GAD65 immunomodulation in adult-onset autoimmune diabetes. *J Diabetes Complications* 2005; 19: 238–246.
- Bottini N., Musumeci L., Alonso A., Rahmouni S., Nika K., A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet*, 36:337-338 (2004)
- Bresson D., von Herrath M., Moving towards efficient therapies in type 1 diabetes: To combine or not to combine? *Autoimmunity Reviews* 6; 315–322 (2007)
- Cavallo M. G., Baroni M. G., Toto A., Gearing A. J., Forsey T., Andreani D., Viral infection induces cytokine release by beta islet cells. *Immunology* 1992;75:664–8 (1992)
- Centraal Bureau voor de Statistiek. Gezondheid en zorg in cijfers 2009. Beschikbaar: <http://www.cbs.nl/NR/rdonlyres/CC6F3071-309A-4D3C-B42B-2772F4C3F464/0/2009c156pub.pdf>
- Dotta F., Censini S., van Halteren A. G. S., Marselli L., Masini M., Coxsackie B4 virus infection of β cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *PNAS* Vol. 104 no. 12: 5115–5120 (2007)
- Drescher K. M., Kono K., Bopegamage S., Carson S. D., Tracy S., Coxsackievirus B3 infection and type 1 diabetes development in NOD mice: insulinitis determines susceptibility of pancreatic islets to virus infection. *Virology*; 329: 381–394 (2004)
- Eldor R., Cohen I. R., Raz I., Innovative Immune-Based Therapeutic Approaches for the Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus. *International Reviews of Immunology*, 24:327–339 (2005)
- Eldor R., Kassem S., Raz I., Immune modulation in type 1 diabetes mellitus using DiaPep277: a short review and update of recent clinical trial results. *Diabetes Metab Res Rev*; 25: 316–320 (2009)
- Erlich H. A., Griffith R. L., Bugawan T. L., Ziegler R., Alper C., Implication of specific DQB1 alleles in genetic susceptibility and resistance by identification of IDDM siblings with novel HLA-DQB1 allele and unusual DR2 and DR1 haplotypes. *Diabetes* 40: 478-481 (1991)
- Gale E. A. M., Congenital rubella: citation virus or viral cause of type 1 diabetes? *Diabetologia* 51:1559–1566 (2008)

- Geng, L., Solimena, M., Flavell, R. A., Sherwin, R. S., Hayday, A. C., Widespread expression of an autoantigen GAD65 transgene does not tolerize non-obese diabetic mice and can exacerbate disease. *Proc Natl Acad Sci., USA*, 95, 10055-10060 (1998)
- Goldberg E., Krause I., Infection and type 1 diabetes mellitus - A two edged sword? *Autoimmunity Reviews* 8: 682–686 (2009)
- Guberski D. L. *et al.*, Induction of type I diabetes by Kilham's rat virus in diabetes-resistant BB/Wor rats. *Science* 254: 1010–1013 (1991)
- Hasegawa K., Martin F., Huang G., Tumas D., Diehl L., Chan A. C., PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. *Science*, 303:685-689 (2004)
- von Herrath M., Rottembourg D., Bresson D., Progress in the Development of Immune-Based Therapies for Type 1 Diabetes Mellitus. *Biodrugs*; 20 (6): 341-350 (2006)
- Hombach A. A., Kofler D., Rappl G., Abken H., Redirecting human CD4+CD25+ regulatory T cells from the peripheral blood with pre-defined target specificity. *Gene Therapy*; 16, 1088–1096 (2009)
- Honeyman M. C., Coulson B. S., Stone N. L., Gellert S. A., Goldwater P. N., Steele C. E., Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes*;49:1319–24 (2000)
- Hultcrantz M., Hühn M. H., Wolf M., Olsson A., Jacobson S., Interferons induce an antiviral state in human pancreatic islet cells. *Virology* 367 92–101 (2007)
- Hultgren, B., Huang, X., Dybdal, N. and Stewart, T. A., Genetic absence of γ -interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 45, 812-817 (1996)
- Hyoty H., Hiltunen M., Reunanen A., Leinikki P., Vesikari T., Lounamaa R., Decline of mumps antibodies in type 1 (insulin-dependent) diabetic children and a plateau in the rising incidence of type 1 diabetes after introduction of the mumps–measles–rubella vaccine in Finland. *Group.Diabetologia*;36:1303–8 (1993)
- Hyoty H., Taylor K. W., The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia*;45:1353–1361 (2002)
- Kaminitz A., Stein J., Yaniv I., Askenasy N., The vicious cycle of apoptotic b-cell death in type 1 diabetes. *Immunology and Cell Biology* 85, 582–589 (2007)
- Keymeulen B., Vandemeulebroucke E., Ziegler A. G., Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med*; 352 (25): 2598-608 (2005)
- Lan, M. S., Wasserfall, C., Maclaren, N. K. Notkins, A. L., IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in IDDM. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 93, 6367-6370 (1996)
- de Leeuw N., Melchers W. J., Balk A. H., de Jonge N., and Galama J. M., No evidence for persistent enterovirus infection in patients with end-stage idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Infect Dis*; 178: 256–259 (1998)

- Like A. A., Kislauskis E., Williams R. M., Rossini A. A., Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat. *Science*, 216, 644-646 (1982)
- Lim, H. W., Huang, Q. Q., Yoon, C. S., Jun, H. S., Hirasawa, K., Yoon, J. W., Complete prevention of autoimmune IDDM by 13-cell-specific suppression of GAD expression in transgenic NOD mice. *Diabetes*, 47(Suppl. 1), A211 (1998)
- Ludvigsson J., Therapy with GAD in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* ; 25: 307–315 (2009)
- Martin J. M., Trink B., Daneman D., Dosch H. M., Robinson B. H., Milk proteins in the etiology of insulindependent diabetes mellitus (IDDM). *Ann Med.*, 23, 447-452 (1991)
- Masuda H., Atsumi T., Fujisaku A., Shimizu C., Yoshioka N., Acute onset of type 1 diabetes accompanied by acute hepatitis C: The potential role of proinflammatory cytokine in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 75 357–361 (2007)
- Morel P. A., Dorman J. S., Todd J. A., Aspartic acid at position 57 of the HLA-DQ beta chain protects against type I diabetes: a family study. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 85: 8111–8115 (1988)
- Morrán M. P., Omenn G. S., Pietropaolo, M., Immunology and Genetics of Type 1 Diabetes. *Mount Sinai Journal of Medicine* 75:314–327 (2008)
- Nussbaum G., Zanin-Zhorov A., Quintana F., Lider O., Cohen I. R., Peptide p277 of HSP60 signals T cells: inhibition of inflammatory chemotaxis. *Int Immunol*; 18: 1413–1419 (2006)
- Onengut-Gumuscu S., Concannon P., Recent advances in the immunogenetics of human type 1 diabetes. *Current Opinion in Immunology* 18:634–638 (2006)
- Oschilewski, U., Kiesel, U. and Kolb, H., Administration of silica prevents diabetes in BB rats. *Diabetes*, 34, 197-199 (1985)
- Pak C. Y., Eun H. M., McArthur R. G., Yoon J.W., Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet*; 2: 1–4 (1988)
- Pankewycz, O. G., Guan, J. X. and Benedict, J. E, Cytokines as mediators of autoimmune diabetes and diabetic complications. *Endocrin Rev.*, 16(2), 164-176 (1995)
- Pearl-Yafeh M., Kaminitz A., Yolcu E. S., Yaniv I., Stein J., Askenasy N., Pancreatic Islets Under Attack: Cellular and Molecular Effectors. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 749-760 (2007)
- Pilon M., Peng X., Spence A. M., Plasterk R.H.A., Dosch H., The Diabetes Autoantigen ICA69 and Its *Caenorhabditis elegans* Homologue, ric-19, Are Conserved Regulators of Neuroendocrine Secretion. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 11, 3277–3288 (2000)
- Pisetsky D. S., The role of innate immunity in the induction of autoimmunity. *Autoimmun Rev*; 8: 69–72 (2008)

- Pociot F., McDermott M. F., Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes and Immunity* 3, 235–249 (2002)
- Pugliese A., Gianani R., Moromisato R., 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 (1995)
- Redondo M. J., Eisenbarth, G. S., Genetic control of autoimmunity in Type 1 diabetes and associated disorders. *Diabetologica* 45:605-622 (2002)
- Richardson S. J., Willcox A., Bone A. J., Foulis A. K., Morgan N. G., The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia*; 52:1143–1151 (2009)
- Richer M.J., Horwitz M. S., Viral infections in the pathogenesis of autoimmune diseases: focus on type 1 diabetes. *Front. Biosci.* 13: 4241–4257 (2008)
- Richer M. J., Horwitz M. S., Preventing Viral-induced Type 1 Diabetes: Are Regulatory T Cells the Answer? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1173: 487–492 (2009)
- Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. Nationaal Kompas Volksgezondheid. Beschikbaar: http://www.rivm.nl/vtv/object_class/kom_suikerziekte.html
- Schulte B. M., Bakkers J., Lanke K. H. W., Melchers W. J. G., Westerlaken C., Detection of Enterovirus RNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Type 1 Diabetic Patients Beyond the Stage of Acute Infection. *Viral Immunology* Volume 23, Number 1: 99–104 (2010)
- Serreze, D.V., E.W. Ottendorfer, *et al.*, Acceleration of type 1 diabetes by a coxsackievirus infection requires a preexisting critical mass of autoreactive T-cells in pancreatic islets. *Diabetes* 49: 708–711 (2000)
- Thivolet, C., Bendelac, A., Bedossa, P., Bach, J. E., Carnaud, C., CD8 + T cell homing to the pancreas in the nonobese diabetic mouse is CD4 § T cell-dependent. *J. Immunol.*, 146, 85-88 (1991)
- Todd J. A., Bell J. I., McDevitt H. O., HLA-Dq β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*; 329: 599–604 (1987)
- Vang T., Congia M., Macis M. D., Musumeci L., Orru V., Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet* , 37:1317-1319 (2005)
- Walker L.S., Natural Treg in autoimmune diabetes: all present and correct? *Expert Opin. Biol. Ther.* 8: 1691–1703 (2008)
- van der Werf N., Hillebrands J. L., Klatter F. A., Bos I, Bruggeman CA, Rozing J. Cytomegalovirus infection modulates cellular immunity in an experimental model for autoimmune diabetes. *Clin Dev Immunol*; 10:153–60 (2003)
- Wilkin, T. J., Nicholson, S., Autoantibodies against human insulin. *Br Med J.*, 288, 349-352 (1984)

- Wong, F. S., Wen, L., Visintin, I., Flavell, R. A. and Janeway Jr, C. A., CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in the absence of CD4 cells. *J Exp Med.*, 183, 67-76 (1996)
- Yoon, J., Jun H., Cellular and Molecular Roles of 13 Cell Autoantigens, Macrophages and T Cells in the Pathogenesis of Autoimmune Diabetes. *Arch Pharm Res Vol 22*, No 5, 437-447 (1999)
- Yoon J., Jun H., Viruses Cause Type 1 Diabetes in Animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1079: 138–146 (2006)
- Jun, H.S. *et al.*, Determination of encephalomyocarditis viral diabetogenicity by a putative binding site of the viral capsid protein. *Diabetes* 47: 576–582 (1998)