

De rol van virussen in de pathogenese van diabetes mellitus type 1

Bachelorscriptie

Naam: Theo Broekema

Studentnummer: 1725378

Begeleider: P. de Vos

Cursus: Pathofysiologie research

Abstract

Diabetes mellitus type 1 (DT1) is het gevolg van vernietiging van β -cellen, waardoor patiënten afhankelijk worden van exogeen toegediende insuline en geconfronteerd worden met ernstige complicaties. Wereldwijd neemt de incidentie van DT1 met 3,0% per jaar toe. Naast genetica lijken verschillende omgevingsfactoren van invloed te zijn op de pathogenese van DT1, waaronder virusinfectie. Vele onderzoeken suggereren dat verschillende virussen tot DT1 kunnen leiden, via een aantal mechanismen. Toch lijkt virusinfectie soms te beschermen tegen de ontwikkeling van DT1. Verder onderzoek is nodig om duidelijkheid te scheppen.

Introductie

Diabetes mellitus type 1 (DT1) is het resultaat van een T-cel gemedieerd immuunproces gericht tegen de insuline producerende β -cellen van de pancreas. Tot 10% van alle gevallen van diabetes gaat het om DT1 [1]. De ziekte treft voornamelijk kinderen en is de meest voorkomende chronische jeugdandoening [2]. De incidentie van DT1 varieert geografisch gezien enorm, van slechts 0,1/100.000 personen per jaar in Venezuela tot 40,9/100.000 personen per jaar in Finland [3]. Ondanks deze onderlinge verschillen is sprake van een wereldwijde toename van de incidentie van DT1 bij vooral jonge kinderen van 3,0% per jaar [4]. De meerderheid van de diabetespatiënten lijdt aan diabetes type 2 (DT2). Dit is in tegenstelling tot DT1 niet een

immuungemedieerd proces maar een combinatie van insulineresistentie en het niet in staat zijn van de pancreas om voor deze ongevoeligheid te compenseren.

In het geval van DT1 moet 60-80% van de β -cellen vernietigd zijn voordat het zich uit in klinische symptomen als polyurie, polydipsie, gewichtsverlies en ketose [5]. Andere cellen van de eilandjes van Langerhans, die onder andere glucagon secreteren, worden normaal gesproken niet beïnvloed door de autoimmuunaanval gericht tegen de β -cellen. DT1 wordt histologisch gezien gekenmerkt door infiltratie van grote aantallen mononucleaire cellen en CD8+ T-cellen in of rond de eilandjes van Langerhans in de pancreas [6]. Door de afname van het aantal β -cellen wordt nauwelijks tot geen insuline meer geproduceerd en zijn DT1 patiënten van exogeen toegediende insuline afhankelijk om hun bloedglucose op normale niveau's te houden. Desondanks hebben DT1 sterk schommelende bloedglucoseniveaus, waardoor de patiënten op lange termijn een verhoogd risico lopen op diabetesgerelateerde complicaties. Deze complicaties kunnen verdeeld worden in micro- en macrovasculaire ziekten. De microvasculaire ziekten omvatten nefropathie, retinopathie en neuropathie; de macrovasculaire ziekten zijn cardiovasculaire ziekten [7]. De ontwikkeling van deze complicaties is verantwoordelijk voor het grootste deel van de toegenomen morbiditeit en mortaliteit van de ziekte.

Er komt steeds meer bewijs beschikbaar dat een genetische component een belangrijke factor vormt bij de ontwikkeling van DT1. Zo toonde een Fins tweelingenonderzoek dat de concordantie van DT1 bij genetisch identieke monozygote tweelingen veel hoger is dan bij dizygote tweelingen (42,9% tegenover 7,4%) [8]. Ook is de frequentie DT1 patiënten hoger onder familieleden van DT1 patiënten dan in de algemene populatie. Een groot populatieonderzoek in Finland toonde aan dat de frequentie van DT1 onder broers/zussen van DT1 patiënten gemiddeld 5,5% is bij de leeftijd van 30 jaar [9], tegenover 0,4% onder de algemene populatie [10]. Verscheidene loci betrokken bij ontvankelijkheid voor DT1 zijn geïdentificeerd, waarvan de HLA-regio de

meest potente determinant is en tot 40-50% bijdraagt aan het genetische risico [11]. Diabetes predisponerende allelen omvatten HLA klasse II loci HLA-DRB1, DQB1 and DQA1, die tezamen ook wel IDDM1 genoemd worden [12]. Naast de HLA loci zijn ook twee andere loci, genaamd IDDM2 en IDDM12 geïdentificeerd als kandidaat genen die predisponeren voor DT1 [13]. Samen zijn deze verantwoordelijk voor ongeveer 15% van de genetische ontvankelijkheid [14].

Naast genetische factoren lijken ook omgevingsfactoren een cruciale rol te spelen in de pathogenese van DT1. Zoals eerder genoemd, bedraagt de concordantie onder monozygote tweelingen slechts 42,9% [8], waaruit blijkt dat factoren uit de omgeving betrokken moeten zijn bij de pathogenese van DT1. Vermoedelijke omgevingsfactoren omvatten toxines uit de omgeving, antigenen uit voedsel en in het bijzonder virale infecties. Er is echter ook bewijs dat virale infecties juist beschermen tegen het ontstaan van DT1 door het ontstaan van de autoimmunreactie tegen gaan [15]. Dit idee is ontstaan uit de 'hygiëne hypothese', omdat dat de incidentie van autoimmuunziekten in ontwikkelde landen toeneemt, terwijl infectieziekten zeldzamer worden [16]. In deze scriptie wordt de rol van verschillende virussen bij het ontstaan van DT1 behandeld, alsmede de bestaande theoriën omtrent de betrokken mechanismen. Omdat er ook veel bewijs voor juist een beschermende rol van virussen bij het ontstaan van DT1, wordt dit aspect ook belicht.

Virussen

Mogelijke mechanismen waardoor virale infecties DT1 veroorzaken

Verschillende virale infecties zijn geassocieerd met humane DT1. Deze virussen omvatten onder meer cytomegalovirus (CMV), enterovirus, rubella, parvovirus bof en rotavirus. De mechanismen waarmee deze virussen DT1 veroorzaken zijn nog niet duidelijk, maar verschillende mogelijkheden zijn geopperd, afhankelijk van het betrokken virustype. Ten eerste leidt infectie van β -cellen

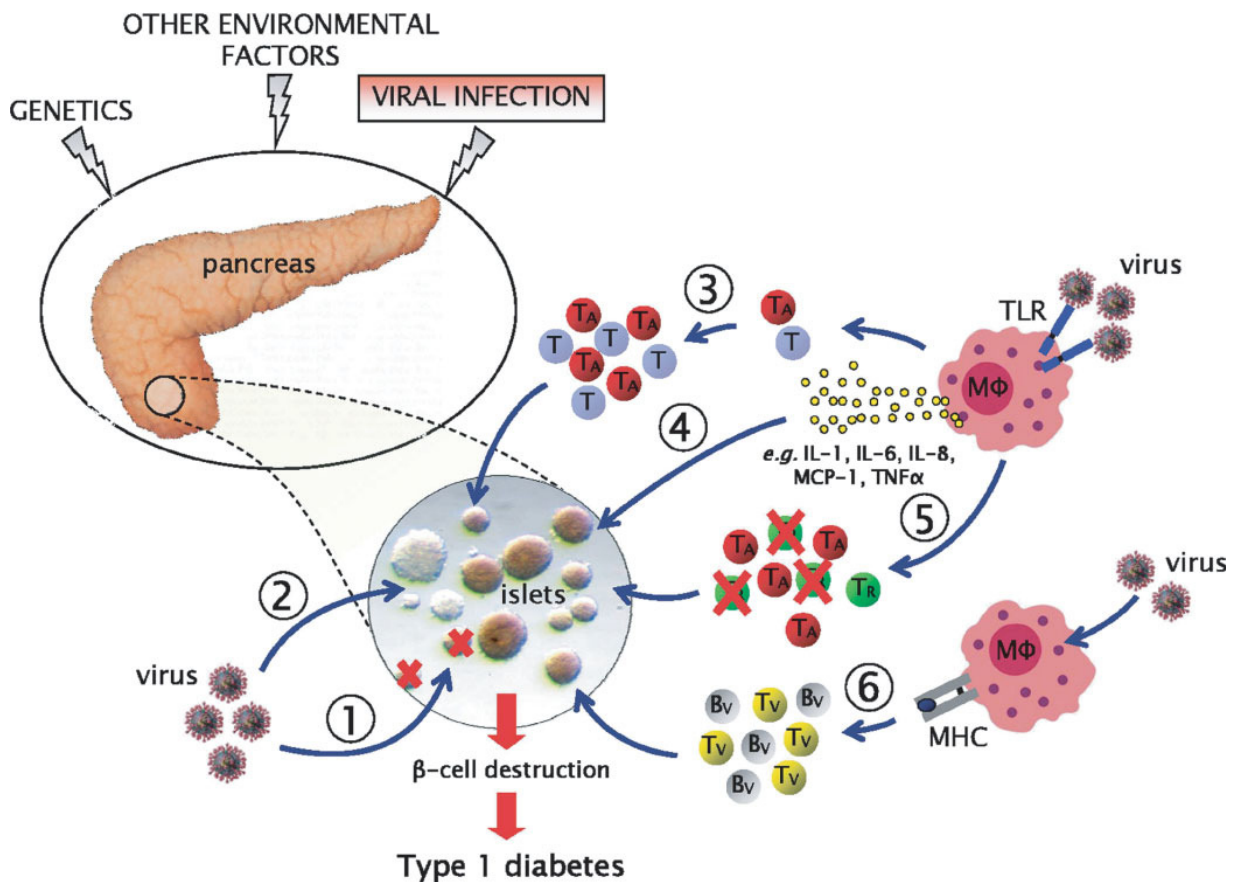
door virus mogelijk tot een cytolytische infectie die β -cellen tot gevolg heeft. Dit is een vorm van diabetes die niet immuungemedieerd is. Een tweede mogelijkheid is virale infectie van β -cellen die niet tot cytolyse leidt, maar wel tot het verlies van zelftolerantie. Het verlies van zelftolerantie zou komen door expressie van virale antigenen in β -cellen, blootstelling van het immuunsysteem aan veranderde β -cel antigenen en/of toegenomen expressie van MHC-antigenen of cytokines en chemokines [17]. *Bystander* activatie is een derde mechanisme. Antigen presenterende cellen (APC's) die geactiveerd zijn in het inflammatoire milieu van een pathogene infectie presenteren mogelijk zelf-antigenen, wat activatie en proliferatie van T- en B-cellen stimuleert [18]. Ten vierde brengen sommige virussen wellicht eiwitten tot expressie die optreden als superantigenen, wat tot gevolg heeft activatie en proliferatie van specifieke T-cellen, die de bepaalde T-cel receptor (TCR) tot expressie brengen [19]. Als autoreactieve T-cellen dezelfde TCR tot expressie brengen, veroorzaken virale superantigenen autoimmuniteit door autoreactieve T-cellen te activeren en te vermeerderen. Een vijfde mechanisme is dat virussen wellicht de fijne balans tussen autoreactieve T-cellen en regulatoire T-cellen (Tregs) verschuiven in het voordeel van autoreactieve T-cellen [17]. Een zesde en laatste mechanisme betreft *molecular mimicry*. Epitopen van virale eiwitten hebben misschien structurele homologie met β -celautoantigenen en activatie van *cross-reacting* T- of B-cellen induceert mogelijk vernietiging van β -cellen [20]. In het volgende deel worden de verschillende virussen behandeld, die geassocieerd zouden zijn met de inductie van DT1, en de mechanismen waardoor deze virussen β -cel autoimmuniteit en zo de ontwikkeling van DT1 zouden veroorzaken.

Cytomegalovirus

CMV behoort tot de familie van β -herpesviridae en is een dubbelstrengs DNA virus. Ward *et al.* waren de eersten die een verband tussen humaan CMV (HCMV) en de ontwikkeling van DT1 voorstelden [21]. In dit

onderzoek lijdde een kind aan een congenitale

[23]. Ook werd geen correlatie gevonden



CMV infectie en ontwikkelde deze DT1 op de

tussen CMV-antilichamen en DT1. Een

Figuur 1. Mechanismen betrokken bij β -celdestructie. (1) Directe cytolyse door infectie. (2) Directe infectie zonder cytolyse, maar met verminderde zelftolerantie tot gevolg. (3) Bystander activation. (4) β -cel beschadiging en verhoogde immunogeniciteit door proinflammatoire mediators. (5) Vermindering van het aantal Treg's. (6) Molecular mimicry. (Uit van der Werf et al.; 2007 [24])

leeftijd van 13 maanden. Een ander onderzoek ondersteunde dit [22]. Er bleek een correlatie te zijn tussen de aanwezigheid van HCMV genoom in perifere bloed mononucleaire cellen (PBMC's) en autoantilichamen gericht tegen eilandantigenen in patiënten met recent ontwikkelde DT1. Samen met andere data impliceert dit dat HCMV mogelijk betrokken is bij het ontstaan van DT1. Daarentegen werd geen CMV-specifieke IgM respons gezien in recentelijk gediagnoseerde diabetes patiënten

mogelijke verklaring hiervoor is dat CMV infectie vroeg in het leven voorgekomen is en de markers die een acute CMV-infectie aantonen al opgeruimd zijn ten tijde het tot uiting komen van de ziekte. Dientengevolge wordt dan geen correlatie waargenomen tussen de aanwezigheid van anti-CMV-antilichamen en de aanwezigheid van autoantilichamen specifiek gericht tegen eilandantigenen [24].

Er heeft een aantal prospectieve onderzoeken plaatsgevonden waaruit is gebleken dat congenitale CMV infectie in het algemeen geen directe cytolyse van β -cellen induceert. Deze data suggereert, in combinatie met andere onderzoeken, daarom dat directe β -cellulysis niet het onderliggende mechanisme is van mogelijke CMV-geïnduceerde ontwikkeling van DT1 is [25].

Een ander mechanisme waarmee HCMV de ontwikkeling van DT1 kan beïnvloeden is door

bystander activation van autoreactieve T-cellen. Dobrescu *et al.* lieten zien dat HCMV een superantigen codeert, dat in staat is proliferatie te induceren van een bepaalde subset T-cellen [26].

Molecular mimicry is een derde mechanisme waardoor CMV mogelijk betrokken is bij de pathogenese van DT1. Het bestaan van T-cel *cross-reactivity* tussen door HCMV-gecodeerd eiwit en een β -cel autoantigeen is aangetoond [27]. Dit onderzoek liet zien dat klonale CD4+ T-cellen, die β -cel autoantigeen GAD65 herkennen, *cross-reactive* waren met door HCMV gecodeerd *DNA-binding protein* UL57. UL57 kan efficiënt bewerkt worden voor presentatie door HLA-DR3, wat predisoneert voor DT1. Deze bevindingen suggereren een rol voor HCMV in de pathogenese van DT1 door middel van *molecular mimicry* tussen virale eiwitten en autoantigenen.

Een duidelijke causale relatie tussen HCMV infectie en de ontwikkeling van DT1 bestaat tot op heden niet. Er lijkt echter wel, althans in ratten, een causaal verband te bestaan tussen CMV infectie en versnelling van de ontwikkeling van DT1 [25], waarbij een cruciale rol weggelegd lijkt voor macrofagen, wat een betrokkenheid van het aangeboren immuunsysteem suggereert.

Ondanks dat er verschillende mogelijkheden zijn waarop CMV betrokken zou kunnen zijn bij de pathogenese van DT1, ontbreken duidelijke mechanismen. Gezien de hoge prevalentie van HCMV seropositiviteit (50-90% in de VS en zo goed als 100% in ontwikkelingslanden) [28] en de relatief lage incidentie van DT1 lijkt CMV geen cruciale rol in de pathogenese van DT1 te spelen.

Enterovirus

Humane enterovirussen zijn kleine kapselloze RNA virussen behorend tot de Picornavirusfamilie, waaronder coxsackie A en B virussen, echovirus en poliovirus vallen [29]. Al lange tijd wordt geïmpliceerd dat enterovirussen betrokken zijn bij de etiologie van DT1 [30,31]. In 1969 werd voor het eerst ontdekt dat anti-coxsackievirus B (CV-B) antilichamen vaker voorkwamen in DT1 patiënten dan in controles [32]. Tien jaar later leverde een *case-report* direct bewijs voor een

verband tussen enterovirusinfectie en de ontwikkeling van DT1 [33]. Uit een 10-jarige jongen die overleed aan diabetische ketoacidose werd een virus geïsoleerd, wat CV-B4 bleek te zijn. Dit virus leidde na injectie in ontvankelijke muizen tot destructie van β -cellen [33]. Eenzelfde resultaat werd bereikt met CV-B5, geïsoleerd uit een andere diabetische patiënt [34]. Een recentelijkere *case-report* gaat over een 23-jarige vrouw met diabetesachtige symptomen, die verhoogde aanwezigheid van CV IgM in het bloed had [35]. Retrospectieve onderzoeken uit verschillende landen lieten zien dat anti-enterovirus antilichamen en enterovirus RNA vaker in het bloed van patiënten met recent ontwikkelde diabetes voorkwamen dan in bloed van gezonde controles [36]. Het grootste deel van de betrokken enterovirussen betrof CV-B, en CV-B4 in het bijzonder. Ylipaasto *et al.* toonden met behulp van in situ hybridisatie in postmortem pancreasmonsters van DT1 patiënten de aanwezigheid van cellen positief voor enterovirus RNA wel aan, maar niet in monsters van controles [37]. Een recentelijker onderzoek naar virale eiwitten in pancreassen ondersteunt dit resultaat [38].

In grote prospectieve cohortonderzoeken werden kinderen met een genetische predispositie voor het ontwikkelen van DT1 of broers/zussen van diabetische kinderen gevolgd [39-42]. Door middel van antilichaamtiteratie en detectie van viraal genoom toonden zij aan dat enterovirusinfecties vaker voorkwamen bij kinderen die positief testten voor autoantilichamen gericht tegen β -cellen, dan bij gezonde controles. In al deze onderzoeken ging enterovirusinfectie ongeveer zes maanden vooraf aan het verschijnen van autoantilichamen.

Ook lijkt er een verband te zijn tussen enterovirusinfectie bij de moeder gedurende zwangerschap en het ontwikkelen van DT1 in het nageslacht [43,44].

Hoewel een ander prospectief onderzoek niet in staat was een verband aan te tonen tussen enterovirusinfectie en DT1 [45], lijkt enterovirusinfectie een rol te spelen in de pathogenese van DT1.

Mogelijke mechanismes waarmee CVB betrokken is bij de pathogenese van DT1 zijn onduidelijk, maar verschillende mogelijkheden zijn geopperd op basis van dierexperimenten en *in vitro* data. Verschillende CV-B4 stammen zijn in staat humane β -cellen *in vitro* te infecteren en beschadigen [37,46,47]. Daarnaast is recentelijker aangetoond dat verschillende CV-B en enterovirus serotypen in staat waren β -cellen te infecteren en vernietigen [48]. Ook heeft enterovirus in TD1 patiënten pancreas tropisme. In postmortem pancreasmonsters werden enterovirus RNA positieve cellen gevonden, welke enkel aanwezig waren in eilandjes van Langerhans [49]. Deze data suggereert, samen met andere onderzoeken, dat directe cytolyse van β -cellen door enterovirus een mogelijk mechanisme is waardoor enterovirusinfectie tot de ontwikkeling van DT1 leidt.

Een tweede mogelijk mechanisme betrokken bij CV-B-geïnduceerde DT1 is *molecular mimicry*. De meerderheid van DT1 patiënten ontwikkelt humorale en cellulaire immuunresponsen tegen eilandautoantigenen zoals GAD65. GAD65 vertoont homologie met CV eiwit P2C en *cross-reactivity* tussen GAD65-specifieke T-celklonen en P2C werd aangetoond [50], maar *cross-reactivity* die *molecular mimicry* ondersteunde werd niet gezien. Een ander onderzoek stelde vast dat er *cross-reactivity* was tussen tyrosinefosfatase autoantilichamen en enterovirusantigenen. De autoantilichamen van *non-obese diabetic* (NOD) muizen en sommige mensen waren inderdaad *cross-reactive* met enterovirus capsid-eiwitten [51].

Een laatste mogelijk mechanisme is *bystander damage*. Horwitz *et al.* toonden aan dat β -cellen door al aanwezige autoreactieve T-cellen kunnen worden aangevallen [52]. Transgene muizen met overexpressie van een eiland zelf-antigeen TCR, die normaal geen diabetes ontwikkelen, ontwikkelden 2-4 weken na CV-B4 injectie diabetes. De CV-B4 infectie induceert in dit model een inflammatie van de pancreas die leidt tot '*bystander*' activatie van al aanwezige autoreactieve T-cellen. Verder is aangetoond dat in NOD muizen CV-B4 de ontwikkeling van diabetes door een '*bystander*' effect kunnen versnellen, maar

alleen als er voldoende autoreactieve T-cellen reeds aanwezig zijn [53]. Autoreactieve T-cellen gericht tegen het antigen GAD65 van β -cellen zijn ook in perifere bloed van diabetespatiënten waargenomen [54], dus een inflammatie die leidt tot activatie van reeds aanwezige autoreactieve T-cellen speelt mogelijk bij mensen ook een rol in de pathogenese van DT1.

Rubella

Rubella (rodehond) enkelstrengs ingekapseld RNA virus en lid van de Togavirusfamilie.

Verschillende onderzoeken hebben een verhoogde prevalentie van DT1 bij patiënten met congenitale rubella aangetoond [55-57]. De eventuele betrokkenheid van rubella bij de pathogenese van DT1 is beperkt tot patiënten met een verhoogde genetische ontvankelijkheid. Het blijkt namelijk dat bij patiënten met congenitaal rubella syndroom (CRS) dat de frequentie van HLA antigenen DR2 en DR3 verlaagd zijn bij non-diabetische patiënten en juist verhoogd bij rubella-positieve patiënten die DT1 ontwikkelen [58]. Ginsberg-Fellner *et al.* hebben aangetoond dat het aantal personen met antilichamen gericht tegen eilandcellen toegenomen is bij patiënten met CRS vergeleken met ongeïnfecteerde personen [55]. Een wat recentelijker onderzoek slaagde er echter niet in een verband te vinden tussen CRS en de ontwikkeling van autoantilichamen gericht tegen eiland antigenen [59]. Dit leidde tot de conclusie dat ontwikkeling van diabetes bij personen met CRS wellicht niet immunogemedieerd is.

Een onderzoek waarin gebruik gemaakt werd van hamsters heeft aangetoond dat infectie van neonatale hamsters met rubella diabetes induceerde, wat duidt op een causale relatie tussen rubellainfectie en de ontwikkeling van DT1 [60]. Mogelijke mechanismen waardoor rubella diabetes induceert zijn directe infectie van β -cellen door rubella en *molecular mimicry*. *In vitro* en *in vivo* studies wijzen uit dat rubella in staat is humane β -cellen direct te infecteren en insulinesecretie te verminderen [60,61]. Directe vernietiging van β -cellen door rubella lijkt echter onwaarschijnlijk, aangezien geen cytopathologische effecten gezien zijn na

infectie van humane eilandjes met rubella [62]. Een alternatief mechanisme is *molecular mimicry*. Zo zagen Ou *et al.* dat T-cellen van congenital rubella syndroom patiënten *cross-reactive* waren met rubella virus peptides en GAD eiwit determinanten [63].

Parvovirus

Parvovirus behoort tot de Parvovirusfamilie en heeft een lineair enkelstrengs DNA molecuul. Hoewel een verband tussen parvovirusinfectie en de ontwikkeling van DT1 wel is gesuggereerd [64], konden O'Brayan *et al.* geen verschil in aanwezigheid van parvovirus B19 IgG aantonen tussen gezonde kinderen en kinderen met recent ontwikkelde DT1 [65].

De rol van parvovirusinfectie op de pathogenese van DT1 is het best bestudeerd bij ratten. Hierbij wordt gebruik gemaakt van Biobreedings Diabetes Resistant ratten (BBDR), waarin diabetes geïnduceerd wordt door middel van Kilham Rat Virus (KRV), een virus uit de Parvovirusfamilie [66]. KRV wekt bij ongeveer één derde van de proefdieren diabetes op, terwijl niet geïnfectede dieren de ziekte niet ontwikkelen. Verdere behandeling verhoogt de incidentie tot 80% [67]. KRV infectie in prediabetische Biobreedings Diabetes Prone ratten (BBDP) versnelde diabetes niet, maar na injectie met splenocyten van BBDR ratten versnelde diabetes wel, net zo als bij geïnfectede BBDR ratten [68].

Verschillende onderzoeken hebben het onderliggende mechanisme van KRV-geïnduceerde diabetes in BBDR ratten bestudeerd. B-cellen bleken niet ontvankelijk te zijn voor KRV, dus directe cytolyse van β -cellen kan het onderliggende mechanisme niet zijn [69]. Macrofagen en hun cytokines lijken een cruciale rol te spelen bij de ontwikkeling van KRV-geïnduceerde diabetes, omdat depletie van macrofagen de ontwikkeling van KRV-geïnduceerde diabetes in BBDR ratten voorkwam [70]. Ook vervolgonderzoek hiernaar wees op een cruciale rol voor KRV-geïnduceerde macrofaagactivatie in het opwekken van een Th1 immuunrespons en activatie van autoreactieve effectorcellen, wat leidt tot ontwikkeling van DT1 in BBDR ratten [71]. Een ander mechanisme kan zijn, dat KRV de fijne balans tussen autoreactieve T-cellen

en Tregs verstoort. Zo bleek KRV-infectie het percentage CD8+ T-cellen en Th1-achtige CD4+CD45RC+ T-cellen te verhogen, terwijl het percentage Th2-achtige CD4CD45RC-ART2+ T-cellen verlaagd was [72]. Overdracht van CD8+ T-cellen en de zonet genoemde Th1-achtige T-cellen van KRV-geïnfectede BBDR ratten in jonge BBDR ratten liet β -celdestructie en ontwikkeling van diabetes zien.

Een ander onderzoek toonde aan dat KRV-infectie het percentage CD4+CD25+ Tregs verlaagt. Deze verlaging bleek virusspecifiek want infectie met een KRV homoloog H1 verlaagde het percentage Tregs niet en induceerde ook geen diabetes [73]. Naast een effect op het adaptieve immuunsysteem lijkt KRV ook het aangeboren immuunsysteem te activeren [74]. Zo werd aangetoond dat KRV-infectie bij diabetes-ontvankelijk BBDR ratten resulteerde in een verhoogde expressie van IL-12 p40, IFN- γ en IP-10 met name in lymfeknopen rond de pancreas, terwijl dit niet het geval was na infectie met vaccinia virus of homoloog H1. Verder leidde toediening van *natural tolllike receptor* (TLR) agonisten tot een versnelde werking van KRV-infectie en ontwikkeling van diabetes [74]. Toediening van een agens dat de werking van TLR's verstoort, verhinderde bovendien de ontwikkeling van diabetes [75]. Deze data impliceren dat het aangeboren immuunsysteem een belangrijke rol speelt bij ontwikkeling van DT1 door virale infecties.

Encefalomyocarditis

Encefalomyocarditis (EMC) virus is een klein, enkelstrengs RNA virus dat behoort tot de Picornavirusfamilie. Hoewel er weinig bewijs is de EMC virus in mensen leidt tot ontwikkeling van DT1, zijn er wel diermodellen – met name muizen - waarin EMC virus duidelijk verbonden is met de ontwikkeling van DT1. Craighead *et al.* waren de eerste die hier bewijs voor leverden [76]. Zij toonden een door de M-variant van EMC (EMC-M) geïnduceerd diabetesachtig syndroom aan in muizen die genetisch ontvankelijk waren. De β -cellen van deze muizen waren selectief vernietigd. Plaque purificatie leidde tot isolatie van een zeer diabetogene EMC-D

variant, die in 90% van de proefdieren diabetes induceerde, en een niet-diabetogene EMC-B variant [77]. Ontwikkeling van diabetes vond echter wel slechts plaats in enkele muizenstammen. Toediening van een hoog titer EMC-D virus aan genetisch ontvankelijke SJL/J muizen leidde binnen 4 dagen tot ontwikkeling van diabetes. Dit was het gevolg van β -celdestructie door virale replicatie in deze cellen [78]. Behandeling met anti-T-cel-antilichamen had geen effect op de incidentie van diabetes, wat er op duidt dat de β -celdestructie niet T-cel gemedieerd is [79,80]. Eenzelfde behandeling, maar dan met antilichamen gericht tegen macrofagen, resulteerde in een significante daling van de diabetesincidentie. Dit duidt er op dat EMC-D virus en geactiveerde macrofagen samen tot destructie van β -cellen leiden na injectie van een hoge dosis EMC-D virus. Om normale(re) omstandigheden na te bootsen zijn de muizen ook geïnfecteerd met een lagere dosis EMC-D virus, wat resulteerde in replicatie van het virus in β -cellen en daarop volgende recrutering van macrofagen naar de geïnfecteerde eilandjes [80]. Uit recent onderzoek blijkt dat stikstofdioxide (NO) een belangrijke rol speelt bij de activatie van macrofagen [81]. iNOS deficiënte muizen vertoonden in tegenstelling tot wildtypes geen macrofaagactivatie en β -celapoptose. Het aangeboren immuunsysteem speelt in de vorm van NO-gemedieerde macrofaagactivatie dus een belangrijke rol in het proces dat leidt tot β -celdestructie en uiteindelijk diabetes door EMC-D virusinfectie.

Bof

Bof (oorspeekselklierontsteking/ parotitis) is een ingekapseld enkelstrengs RNA virus en lid van de Paramyxovirusfamilie. Er lijkt een verband tussen bof en DT1 te bestaan, omdat veel kinderen met bof ook autoantilichamen gericht tegen eilandjes bleken te hebben en soms diabetes ontwikkelden [82]. Ook gingen uitbraken van bof vaak gepaard met een toegenomen incidentie van DT1 2-4 jaar later [83]. Onlangs omschreven Goto *et al.* een *case-report* over een 56-jarige Japanse man, die na twee dagen misselijkheid en algehele moeheid in het ziekenhuis werd opgenomen [84]. Daar bleek dat hij een verhoogde

bloedglucose, metabole acidose en een verhoogde hoeveelheid ketonen in de urine had en werd fulminante DT1 vastgesteld. Serum tests voor autoantilichamen tegen eilandjes waren negatief, maar op basis van serologische tests werd vermoed dat het een bofinfectie had. Het onderliggende mechanisme waarmee bof mogelijk betrokken is bij de ontwikkeling van DT1 is onduidelijk. Uit *in vitro* onderzoek blijkt dat bof in staat is humane β -cellen te infecteren, zij het zonder een cytolytische effect te induceren [85]. Ook werd aangetoond dat bof virus een afgifte van IL-1 en IL-6 door humane insulinoomcellen induceerde, alsmede een verhoging van HLA klasse I en II moleculen [86]. Op basis van deze studies lijkt bof diabetes te veroorzaken door een autoimmunrespons op te wekken gericht tegen β -cellen of al aanwezige autoimmunprocessen te versterken [87]. De zojuist genoemde *case-report* spreekt echter van afwezigheid van autoantilichamen, wat de mogelijkheid van een autoimmunreactie als oorzaak van DT1 weerlegt. Meer onderzoek is nodig om hier duidelijkheid over te scheppen.

Rotavirus

Rotavirus is een kapselloos dubbelstrengs RNA virus, dat behoort tot de Reovirusfamilie. Het is een belangrijke oorzaak van gastroenteritis bij kinderen [88], maar wordt ook gezien als mogelijke veroorzaker of verergeraar van DT1 [89]. Een verband is gevonden tussen verhoogde hoeveelheden rotavirus specifieke IgG en IgA antilichamen en de verschijning of toename van autoantilichamen gericht tegen eilandjes in kinderen met risico op diabetes [90]. *In vitro* studies hebben aangetoond dat rotavirus in staat is eilandjes van muizen te infecteren [91] en reovirus - een ander virus uit de Reovirusfamilie - in staat is humane β -cellen te infecteren en vernietigen [92]. Dit wekt de suggestie dat rotavirusinfectie wellicht DT1 induceert door directe cytolytische infectie van β -cellen. *In vivo* versnelde rotavirus de ontwikkeling van DT1 in NOD muizen die al insulitis hadden [93]. Toediening van immuunsuppressieve drugs aan door reovirus geïnfecteerde muizen verminderde of voorkwam ontwikkeling van diabetes en mortaliteit [94]. Deze data

suggereert een autoimmunreactie als tweede mogelijke mechanisme. Honeyman *et al.* hebben aangetoond, dat tyrosinefosfatase IA-2 en GAD, autoantigenen van β -cellen, homologie vertonen met viraal eiwit VP7, wat *molecular mimicry* als derde mogelijk betrokken mechanisme aanwijst [95].

Retrovirus

De meeste zoogdieren bevatten endogene retrovirussen als onderdeel van hun DNA. Endogene retrovirussen bestaan uit 2 identieke moleculen van enkelstrengs RNA. Een virion bevat *reverse transcriptase*, een enzyme dat een DNA kopie produceert van het RNA genoom. Dit DNA wordt vervolgens opgenomen in het chromosomale DNA van de gastheer en kan aan de volgende generatie worden doorgegeven [87].

Bij NOD muizen is de expressie van endogene retrovirussen in β -cellen geassocieerd met insulitis en DT1 [96-98]. Daarnaast brachten eilandcellen verschillende retrovirale messenger RNA's (mRNA's) tot expressie en brachten met name β -cellen groepspecifiek antigeen p73 van A-type retrovirus tot expressie [99]. Ook waren retrovirale partikels, afkomstig van zowel retrovirus type A als retrovirus type B, aanwezig in de β -cellen van NOD muizen [97,98]. De aanwezigheid hiervan werd geassocieerd met de ontwikkeling van DT1. Een mogelijk onderliggend mechanisme waarmee retrovirussen betrokken zijn bij de ontwikkeling van DT1 in NOD muizen is presentatie van retrovirale antigenen afkomstig van β -cellen door APC's, wat uiteindelijk resulteert in vernietiging van de β -cellen [87]. Een andere mogelijkheid is dat integratie van het retrovirale genoom in dat van de β -cellen leidt tot een veranderde expressie van genen in β -cellen en willicht veranderde antigenen. Deze antigenen zouden herkend kunnen worden als niet-zelf, wat een autoimmunreactie gericht tegen β -cellen teweeg brengt.

Ook is een rol voor endogeen retrovirus in de pathogenese van DT1 bij mensen gesuggereerd. Een humaan endogeen retrovirus (IDDMK1,222) is geïsoleerd uit de pancreassen van twee patiënten met recent

ontwikkelde diabetes maar niet uit die van nondiabetische cotroles [19]. Het virus codeert voor een superantigeen dat betrokken zou zijn bij de systemische activatie van autoreactieve T-cellen en tot β -cel destructie leiden. Andere onderzoeken tonen echter dat de aanwezigheid van IDDMK1,222 niet predisponeert voor de ontwikkeling van DT1, wat een rol van IDDMK1,222 in de pathogenese van DT1 onwaarschijnlijk maakt [100,101].

Bescherming tegen DT1 door virale infecties

Na het voorgaande lijkt het misschien tegenstrijdig dat virussen en andere infectieziekten juist DT1 kunnen voorkomen, maar toenemend bewijs van verschillende diermodellen laat zien dat dit toch het geval is [102-104]. De basis hiervoor is de 'hygiëne hypothese', die stelt dat goede hygiëne één van de redenen is dat DT1 in ontwikkelde landen vaker voor komt. Hygiëne leidt tot minder infecties waardoor het immuunsysteem minder vaak 'getraind' wordt om zijn beschermende functie uit te voeren. Verschillende retrospectieve studies ondersteunen de hypothese [107,108].

Recentelijk ontdekten Von Herrath *et al.* dat infectie in NOD muizen kan leiden tot activatie van Tregs [105], welke *in vivo* een immunrespons kunnen onderdrukken door verscheidene mechanismen. NOD muizen die normaal spontaan autoimmunogemedieerde diabetes ontwikkelen, werden geïnfecteerd met *lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV), wat na 7-10 dagen over ging. Een daling van de incidentie van DT1 van ongeveer 75% tot ongeveer 15% werd gezien. Enkele weken na die beschermende infectie werden vervolgens Tregs geïsoleerd en overgebracht in naïeve prediabetische NOD muizen. Alleen de Tregs van muizen die infectie hadden ondergaan, waren potent genoeg om de ontvangende NOD muis te beschermen tegen ontwikkeling van diabetes. Aldus werd geconcludeerd dat systemische virale infectie de Tregs activeert. Verder onderzoek wees uit dat de versterkte werking van Tregs kwam

door een opregulatie van *transforming growth factor* (TGF) productie [105].

Naast activatie van Tregs lijken er ook andere mechanismen, die optreden tijdens de virusinfectie, een rol te spelen bij de preventie van DT1. Inductie van PD-1L en *tumor necrosis factor* (TNF) door de virusinfectie is hierbij betrokken [106]. Beide moleculen downreguleren immuunresponsen en zijn belangrijk voor het doen afnemen van de antivirale immuunrespons als de virale infectie is weggewerkt. Zo worden na, onder andere CV-B, infectie antivirale T-cellen geëlimineerd en zorgen PD-1L en TNF voor *bystander death* van autoreactieve T-cellen. Dit aspect resulteert in een vertraging van de progressie naar DT1, maar niet in een vermindering de totale incidentie – daarvoor is activatie van Tregs verantwoordelijk [105]. Deze twee aspecten illustreren samen mogelijk wat nodig is voor een succesvolle preventie of genezing van DT1: Eliminatie van autoreactieve T-cellen en activatie van Tregs om langetermijn tolerantie te bereiken [105].

Toch kan de ‘hygiëne hypothese’ niet alles verklaren. Zo is er van gradiënt van DT1 incidentie te zien van Noord- naar Zuid-Europa [66], terwijl de hygiëne in deze landen soortgelijk is. Ook binnen landen kunnen regio’s sterke verschillen in DT1 incidentie vertonen [66]. De reden voor deze variatie is onduidelijk, maar waarschijnlijk spelen onder andere verschillen in klimaat, leefstijl, dieet en genetica een rol.

Conclusie

Ondanks dat DT1 al tientallen jaren wordt onderzocht, blijven er veel onduidelijkheden bestaan. Verscheidene endogene en externe factoren lijken een rol te spelen bij de ontwikkeling van DT1. Virusinfectie is één van deze externe factoren. Verschillende virussen zijn in verband gebracht met de ontwikkeling de DT1, waaronder CMV, enterovirus, rubella, rotavirus, parvovirus en bof. Een aantal theoriën bestaan over mogelijke mechanismen waardoor dit gebeurt, waaronder directe cellysis, verlies van zelf-tolerantie, *bystander activation* en *molecular*

mimicry. Hiernaast is er veel bewijs voor, dat onder bepaalde omstandigheden virusinfectie juist een beschermende rol kan spelen bij de ontwikkeling van DT1. De ‘hygiëne hypothese’ is hier de basis voor, maar deze is niet allesverklarend. DT1 heeft een grote impact op zowel het individu als de economie. Nu de incidentie van DT1 wereldwijd toe blijft nemen, is het van groot belang dat er meer duidelijkheid over de ziekte komt. Meer onderzoek naar oorzaken en mechanismen is onontbeerlijk om tot een goede behandeling en preventie te komen.

Dankwoord

Graag wil ik mijn begeleider, Paul de Vos, bedanken voor zijn begeleiding en feedback.

Referenties

1. Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet* 2006;367:847–58.
2. S. Srikanta, O.P. Ganda, R.A. Jackson, R.E. Gleason, A. Kaldany, M.R. Garovoy, E.L. Milford, C.B. Carpenter, J.S. Soeldner, G.S. Eisenbarth, Type I diabetes mellitus in monozygotic twins: chronic progressive beta cell dysfunction, *Ann. Intern. Med.* 99 (1983) 320–326.
3. The DIAMOND Project Group, Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999, *Diabet. Med.* 23 (2006) 857–866.
4. Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, *et al.* Worldwide increase in incidence of Type I diabetes—the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia* 1999; 42: 1395–1403.
5. Greiner DL, Rossini AA, Mordes JP. Translating data from animal models into methods for preventing human autoimmune diabetes mellitus: caveat emptor and primum non nocere. *Clin Immunol* 2001; 100: 134–143.

6. Notkins AL, Lernmark A. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest* 2001; 108: 1247–1252.
7. Eiselein L, Schwartz HJ, Rutledge JC. The challenge of type 1 diabetes mellitus. *ILAR J* 2004; 45: 231–236.
8. Hyttinen V, Kaprio J, Kinnunen L, *et al.* Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes* 2003; 52: 1052–1055.
9. Harjutsalo V, Podar T, Tuomilehto J. Cumulative incidence of type 1 diabetes in 10,168 siblings of Finnish young-onset type 1 diabetic patients. *Diabetes* 2005; 54: 563–569.
10. Spielman RS, Baker L, Zmijewski CM. Gene dosage and susceptibility to insulin-dependent diabetes. *Ann Hum Genet* 1980; 44: 135–150.
11. Field LL. Genetic linkage and association studies of Type I diabetes: challenges and rewards. *Diabetologia* 2002; 45: 21–35.
12. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G; Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 2010; 464 : 1293-1300.
13. Bartsocas CS, Gerasimidi-Vazeou A; Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Endocrino Rev.* 2007; 5(1): 470.
14. Anjos S, Polychronakos C. Mechanisms of genetic susceptibility to type I diabetes: beyond HLA. *Mol Genet Metab* 2004; 81: 187–195.
15. Filippi CM, von Herrath MG; Viral trigger for type 1 diabetes pros and cons. *Diabetes* 2008; 57: 2863-2871.
16. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002;347:911–20.
17. Jun HS, Yoon JW. A new tool at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19: 8–31.
18. Zipris D, Lien E, Xie JX *et al.* TLR activation synergizes with Kilham rat virus infection to induce diabetes in BBDR rats. *J Immunol* 2005; 174:131–42.
19. Conrad B, Weissmahr RN, Boni J, *et al.* A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 1997; 90: 303–313.
20. Fujinami RS, Oldstone MB. Amino acid homology between theencephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanismfor autoimmunity. *Science* 1985; 230:1043–5.
21. Ward KP, Galloway WH, Auchterlonie IA. Congenital cytomegalovirus infection and diabetes. *Lancet* 1979; 1: 497.
22. Pak CY, McArthur RG, Eun HM, *et al.* Association of cytomegalo-virus infection with autoimmune Type-1 diabetes. *Lancet* 1988; 2: 1–4.
23. Banatvala JE, Schernthaner G, Schober E, *et al.* Coxsackie-B, Mumps, Rubella, and Cytomegalo-Virus Specific Igm responses in patients with Juvenile-Onset Insulin-dependent Diabetesmellitus in Britain, Austria, and Australia. *Lancet* 1985; 1: 1409–1412.
24. Van der Werf N, Kroese FGM, Rozing J, Hillebrands JL; Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23: 169–183.
25. Hillebrands JL, van der Werf N, Klatter FA, Bruggeman CA, Rozing J; Role of peritoneal macrophages in cytomegalovirus-induced acceleration of autoimmune diabetes in BB-rats. *Clinical & Developmental Immunology* 2003; 10(2-4) 133-139.
26. Dobrescu D, Ursea B, Pope M, *et al.* Enhanced Hiv-1 replication in V-Beta-12 T-Cells due to human cytomegalovirus in Monocytes–evidence for a putative herpesvirus superantigen. *Cell* 1995; 82: 753–763.
27. Hiemstra HS, Schloot NC, van Veelen PA, *et al.* Cytomegalovirusin autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic

- acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 3988–3991.
28. Loewendorf A, Benedict CA; *Journal of internal medicine* 2010; 267; 483–501
 29. Jaïdane H, Sauter P, Sane F, Goffard A, Gharbi J, Hober D; *Rev. Med. Vir.* 2010.
 30. Craighead JE. The role of viruses in the pathogenesis of pancreatic disease and diabetes mellitus. *Prog Med Virol* 1975; 19: 161–214.
 31. Jenson A, Rosenberg H. Multiple viruses in diabetes mellitus. *Prog Med Virol* 1984; 29: 197–217.
 32. Gamble DR, Kinsley MJ, Fitzgerald MG, et al. Viral antibodies in diabetes mellitus. *Br Med J* 1969; 3: 627–630.
 33. Yoon JW, Austin M, Onodera T, et al. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 1979; **300**: 1173–1179.
 34. Champsaur H, Dussaix E, Samolyk D, et al. Diabetes and Coxsackie virus B5 infection. *Lancet* 1980; 1: 251.
 35. Katona-Durekovic A; The role of virus infections in the pathogenesis of type 1 diabetes—a case report. *Med. Pregl.* 2007; 60(7-8):397-400.
 36. Hyöty H. Enterovirus infections and type 1 diabetes. *Ann Med* 2002; 34: 138–147.
 37. Ylipaasto P, Klingel K, Lindberg AM, et al. Enterovirus infection in human pancreatic islet cells, islet tropism in vivo and receptor involvement in cultured islet beta cells. *Diabetologia* 2004; 47: 225–239.
 38. Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, et al. The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia* 2009; 52: 1143–1151.
 39. Hyöty H, Hiltunen M, Knip M, et al. A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes* 1995; 44: 652–657.
 40. Lönnrot M, Salminen K, Knip M, et al. Enterovirus RNA in serum is a risk factor for beta-cell autoimmunity and clinical type 1 diabetes: a prospective study. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *J Med Virol* 2000; 61: 214–220.
 41. Lönnrot M, Korpela K, Knip M, et al. Enterovirusinfection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetes* 2000; 49: 1314–1318.
 42. Sadeharju K, Haama-laïnen AM, Knip M, et al. Enterovirus infections as a risk factor for type I diabetes: virus analyses in a dietary intervention trial. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 271–277.
 43. Elfving M, Svensson J, Oikarinen S, et al. Maternal enterovirus infection during pregnancy as a risk factor in offspring diagnosed with type 1 diabetes between 15 and 30 years of age. *Exp Diabetes Res* 2008; 2008: 271958.
 44. Dahlquist GG, Boman JE, Juto P. Enteroviral RNA and IgM antibodies in early pregnancy and risk for childhood-onset IDDM in offspring. *Diabetes Care* 1999; 22: 364–365.
 45. Graves PM, Rotbart HA, Nix WA, et al. Prospective study of enteroviral infections and development of beta-cell autoimmunity. Diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabetes Res Clin Pract* 2003; 59: 51–61.
 46. Roivainen M, Rasilainen S, Ylipaasto P, et al. Mechanisms of coxsackievirus-induced damage to human pancreatic beta-cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 432–440.
 47. Chehadeh W, Kerr-Conte J, Pattou F, et al. Persistent infection of human pancreatic islets by coxsackievirus B is associated with alpha interferon synthesis in beta cells. *J Virol* 2000; 74: 10153–10164.
 48. Frisk G, Diderholm H. Tissue culture of isolated human pancreatic islets infected with different strains of coxsackievirus B4: assessment of virus replication and effects on islet

- morphology and insulin release. *Int J Exp Diabetes Res* 2000; **1**: 165–175.
49. Roivainen M. Enteroviruses: new findings on the role of enteroviruses in type 1 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; **38**: 721–725.
50. Schloot NC, Willemsen SJ, Duinkerken G, *et al.* Molecular mimicry in type 1 diabetes mellitus revisited: T-cell clones to GAD65 peptides with sequence homology to Coxsackie or proinsulin peptides do not crossreact with homologous counterpart. *Hum Immunol* 2001; **62**: 299–309.
51. Harkonen T, Lankinen H, Davydova B, *et al.* Enterovirus infection can induce immune responses that cross-react with beta-cell autoantigen tyrosine phosphatase IA-2/IAR. *J Med Virol* 2002; **66**: 340–350.
52. Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, *et al.* Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 1998; **4**: 781–785.
53. Serreze DV, Ottendorfer EW, Ellis TM, *et al.* Acceleration of type 1 diabetes by a coxsackievirus infection requires preexisting critical mass of autoreactive T-cells in pancreatic islets. *Diabetes* 2000; **49**: 708–711.
54. Paronen J, Klemetti P, Kantele JM, *et al.* Glutamate decarboxylase-reactive peripheral blood lymphocytes from patients with IDDM express gut-specific homing receptor alpha4beta7-integrin. *Diabetes* 1997; **46**: 583–588.
55. Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Yagihashi S, *et al.* Congenital rubella syndrome as a model for Type-1 (insulin-dependent) diabetes-mellitus—increased prevalence of islet cell-surface antibodies. *Diabetologia* 1984; **27**: 87–89.
56. Menser MA, Forrest J, Bransby R. Rubella infection and diabetes mellitus. *Lancet* 1978; **1**: 57–60.
57. Rabinowe S, George K, Loughlin R, Soeldner J. Predisposition to type 1 diabetes and organ-specific autoimmunity in congenital rubella: T cell abnormalities in young adults. *Diabetes* 1986; **35**: 187A.
58. Rubinstein P, Walker ME, Fedun B, *et al.* The HLA system in congenital rubella patients with and without diabetes. *Diabetes* 1982; **31**: 1088–1091.
59. Viskari H, Paronen J, Keskinen P, *et al.* Humoral beta-cell autoimmunity is rare in patients with the congenital rubella syndrome. *Clin Exp Immunol* 2003; **133**: 378–383.
60. Rayfield EJ, Kelly KJ, Yoon JW. Rubella virus-induced diabetes in the hamster. *Diabetes* 1986; **35**: 1278–1281.
61. Numazaki K, Goldman H, Wong I, *et al.* Infection of cultured human fetal pancreatic islet cells by rubella virus. *Am J Clin Pathol* 1989; **91**: 446–451.
62. Numazaki K, Goldman H, Seemayer TA, *et al.* Infection by human cytomegalovirus and rubella virus of cultured human fetal islets of Langerhans. *In Vivo* 1990; **4**: 49–54.
63. Ou D, Mitchell LA, Metzger DL, *et al.* Cross-reactive rubella virus and glutamic acid decarboxylase (65 and 67) protein determinants recognised by T cells of patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000; **43**: 750–762.
64. Munakata Y, Kodera T, Saito T, *et al.* Rheumatoid arthritis, type 1 diabetes, and Graves' disease after acute parvovirus B19 infection. *Lancet* 2005; **366**: 780.
65. O'Brayan TA, Beck MJ, Demers LM, *et al.* Human parvovirus B19 infection in children with new onset Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2005; **22**: 1778–1779.
66. Zipris D; Epidemiology of type 1 diabetes and what animal models teach us about the role of viruses in disease mechanisms. *Clinical Immunology* 2009; **131**, 11–23.
67. Ellerman KE, Richards CA, Guberski DL, *et al.* Kilham rat virus triggers T-cell-dependent autoimmune diabetes in multiple strains of rat. *Diabetes* 1996; **45**: 557–562.

68. Guberski DL, Thomas VA, Shek WR, *et al.* Induction of type I diabetes by Kilham's rat virus in diabetes-resistant BB/Wor rats. *Science* 1991; **254**: 1010–1013.
69. Brown DW, Welsh RM, Like AA. Infection of peripancreatic lymph nodes but not islets precedes kilham rat virus-induced diabetes in Bb/Wor rats. *J Virol* 1993; **67**: 5873–5878.
70. Chung YH, Jun HS, Kang Y, *et al.* Role of macrophages and macrophage-derived cytokines in the pathogenesis of Kilham rat virus induced autoimmune diabetes in diabetes-resistant biobreeding rats. *J Immunol* 1997; **159**: 466–471.
71. Mendez II, Chung YH, Jun HS, *et al.* Immunoregulatory role of nitric oxide in Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in DR-BB rats. *J Immunol* 2004; **173**: 1327–1335.
72. Chung YH, Jun HS, Son M, *et al.* Cellular and molecular mechanism for Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in DR-BB rats. *J Immunol* 2000; **165**: 2866–2876.
73. Zipris D, Hillebrands JL, Welsh RM, *et al.* Infections that induce autoimmune diabetes in BBDR rats modulate CD4(+)CD25(+) T cell populations. *J Immunol* 2003; **170**: 3592–3602.
74. Zipris D, Lien E, Xie JX, *et al.* TLR activation synergizes with Kilham rat virus infection to induce diabetes in BBDR rats. *J Immunol* 2005; **174**: 131–142.
75. D. Zipris, E. Lien, A. Nair, J.X. Xie, D.L. Greiner, J.P. Mordes, A.A. Rossini, TLR9-signaling pathways are involved in Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in the biobreeding diabetes-resistant rat, *J. Immunol.* 178 (2007) 693–701.
76. Craighead JE, McLane MF. Diabetes mellitus: induction in mice by encephalomyocarditis virus. *Science* 1968; **162**: 913–914.
77. Yoon JW, McClintock PR, Onodera T, *et al.* Virus-induced diabetes mellitus. XVIII. Inhibition by a nondiabetogenic variant of encephalomyocarditis virus. *J Exp Med* 1980; **152**: 878–892.
78. Yoon J, Onodera T, Notkins AL. Virus-induced diabetes mellitus: VIII. Passage of encephalomyocarditis virus and severity of diabetes in susceptible and resistant strains of mice. *J Gen Virol* 1977; **37**: 225–232.
79. Yoon JW, McClintock PR, Bachurski CJ, *et al.* Virus-induced diabetes mellitus. No evidence for immune mechanisms in the destruction of beta-cells by the D-variant of encephalomyocarditis virus. *Diabetes* 1985; **34**: 922–925.
80. Baek HS, Yoon JW. Role of macrophages in the pathogenesis of encephalomyocarditis virus-induced diabetes in mice. *J Virol* 1990; **64**: 5708–5715.
81. Lee YS, Li N, Shin S, Jun HS; Role of nitric oxide in the pathogenesis of encephalomyocarditis virus-induced diabetes in mice. *J. Virol.* 2009; **83**(16):8004-11.
82. Helmke K, Otten A, Willems W. Islet cell antibodies in children with mumps infection. *Lancet* 1980; **2**: 211–212.
83. Hyoty H, Leinikki P, Reunanen A, *et al.* Mumps infections in the etiology of type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetes Res* 1988; **9**: 111–116.
84. Goto A, Takahashi Y, Kishimoto M, Nakajima Y, Kajio H, Noda M; A case of fulminant type 1 diabetes associated with significant elevation of mumps titers. *Endocr. J.* 2008; **55**(3):561-4.
85. Vuorinen T, Nikolakaras G, Simell O, *et al.* Mumps and Coxsackie B3 virus infection of human fetal pancreatic islet-like cell clusters. *Pancreas* 1992; **7**: 460–464.
86. Cavallo MG, Baroni MG, Toto A, *et al.* Viral infection induces cytokine release by beta islet cells. *Immunology* 1992; **75**: 664–668.3
87. Jun HS, Yoon JW; A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2003; **19**: 8–31.
88. Bishop RF, Unicomb LE, Barnes GL. Epidemiology of rotavirus serotypes in Melbourne, Australia, from 1973 to

1989. *J Clin Microbiol* 1991; **29**: 862–868.
89. Honeyman M. How robust is the evidence for viruses in the induction of type 1 diabetes? *Curr Opin Immunol* 2005; **17**: 616–623.
90. Honeyman MC, Coulson BS, Stone NL, *et al.* Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes* 2000; **49**: 1319–1324.
91. Coulson BS, Witterick PD, Tan Y, *et al.* Growth of rotaviruses in primary pancreatic cells. *J Virol* 2002; **76**: 9537–9544.
92. Yoon JW, Selvaggio S, Onodera T, *et al.* Infection of cultured human pancreatic B-cells with reovirus type-3. *Diabetologia* 1981; **20**: 462–467.
93. Graham KL, Sanders N, Tan Y, Allison J, Kay TW, Coulson BS; Rotavirus infection accelerates type 1 diabetes in mice with established insulinitis. *J Virol*. 2008; (13):6139-49.
94. Onodera T, Ray UR, Melez KA, Suzuki H, Toniolo A, Notkins AL. Virus-induced diabetes mellitus: autoimmunity and polyendocrine disease prevented by immunosuppression. *Nature* 1982; **297**: 66–69.
95. Honeyman MC, Stone NL, Harrison LC. T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents. *Mol Med* 1998; **4**: 231–239.
96. Suenaga K, Yoon JW. Association of beta cell-specific expression of endogenous retrovirus with the development of insulinitis and diabetes in NOD mice. *Diabetes* 1988; **37**: 1722–1726.
97. Gaskins H, Prochazka M, Hamaguchi K, Serreze D, Leiter E. Beta cell expression of endogenous xenotropic retrovirus distinguishes diabetes-susceptible NOD/Lt from resistant NON/Lt mice. *J Clin Invest* 1992; **90**: 2220–2227.
98. Nakagawa C, Hanafusa T, Miyagawa J, *et al.* Retrovirus gag protein p30 in the islets of nonobese diabetic mice: relevance for pathogenesis of diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992; **35**: 614–618.
99. Pak CY, Jun HS, Lee M, Yoon JW. Beta cell-specific expression of retroviral mRNAs and group-specific antigen and the development of beta cell-specific autoimmunity in non-obese diabetic mice. *Autoimmunity* 1995; **20**: 19–24.
100. Kim A, Jun HS, Wong L, *et al.* Human endogenous retrovirus with a high genomic sequence homology with IDDMK(1,2)22 is not specific for type I (insulin-dependent) diabetic patients but ubiquitous. *Diabetologia* 1999; **42**: 413–418.
101. Jaeckel E, Heringlake S, Berger D, *et al.* No evidence for association between IDDMK(1,2)22, a novel isolated retrovirus, and IDDM. *Diabetes* 1999; **48**: 209–214.
102. Smith KA, Efsthathiou S, Cooke A: Murine gammaherpesvirus-68 infection alters self-antigen presentation and type 1 diabetes onset in NOD mice. *J Immunol* 179:7325–7333, 2007.
103. Bach JF: Infections and autoimmune diseases. *J Autoimmun* 25 2005 (Suppl.): 74–80
104. Feillet H, Bach JF: On the mechanisms of the protective effect of infections on type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol* 11:191–194, 2004
105. Von Herrath M; Can we learn from viruses how to prevent type 1 diabetes? *Diabetes* 2009; **58**: 2-11.
106. Christen U, Benke D, Wolfe T, Rodrigo E, Rhode A, Hughes AC, Oldstone MB, von Herrath MG: Cure of pre-diabetic mice by viral infections involves lymphocyte recruitment along an IP-10 gradient. *J Clin Invest* 113:74–84, 2004
107. C. Gibbon, T. Smith, P. Egger, P. Betts, D. Phillips, Early infection and subsequent insulin dependent diabetes, *Arch. Dis. Child.* 77 (1997) 384–385.

108. C. Gibbon, T. Smith, P. Egger, P. Betts, D. Phillips, Early infection and subsequent insulin dependent diabetes, *Arch. Dis. Child.* 77 (1997) 384–385.