



**TİP 1 DİYABET ANTİJENLERİNE SPESİFİK T HÜCRE KLONLARININ İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

Süheyla HASGÜR

**DOKTORA TEZİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

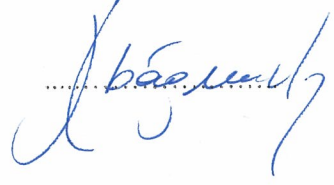
ŞUBAT 2015

Süheyla Hasgür tarafından hazırlanan "Tip 1 Diyabet Antijenlerine Spesifik T Hücre Klonlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi İmmünoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.



İkinci Danışman: Prof. Dr. Ayşegül ATAĞ YÜCEL

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

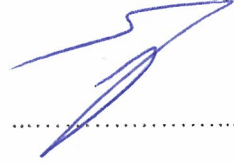
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak doktora tezi olduğunu onaylıyorum.



Başkan: Prof. Dr. Vedat BULUT

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

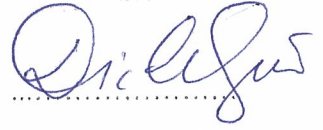
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak doktora tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Prof. Dr. Dicle GÜÇ

Temel İmmünoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Onkoloji Enstitüsü

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak doktora tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Prof. Dr. Cemalettin AYBAY

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

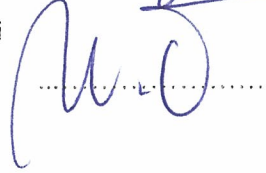
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak doktora tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Prof. Dr. Hüseyin TUTKAK

İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

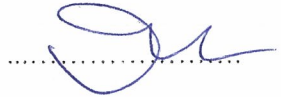
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak doktora tezi olduğunu onaylıyorum.



Üye: Doç. Dr. Resul KARAKUŞ

İmmünoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak doktora tezi olduğunu onaylıyorum.



Tez Savunma Tarihi: 24/ 02/ 2015

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.



Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Süheyla Hasgür

24.02.2015

TİP 1 DİYABET ANTİJENLERİNE SPESİFİK T HÜCRE KLONLARININ İZOLASYONU VE
KARAKTERİZASYONU
(Doktora Tezi)

Süheyla HASGÜR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Şubat 2015

ÖZET

Tip 1 diyabet (T1D), T hücre ilişkili otoimmün bir hastalık olup, insülin üreten beta (β) hücrelerinin yıkımı ile karakterizedir. β hücrelerine karşı oluşan T hücre yanıtlarının tespiti, hastalık mekanizmalarının derinlemesine anlaşılabilmesi adına oldukça önemlidir. Bu amaçla, sunulan çalışmada, T1D hastalarında periferik kandan GAD65 reaktif $CD4^+$ T hücre serileri izole ve karakterize edildi. T1D hastalarından izole edilen PKMN hücreleri, GAD65 antijeni ile her 14 günde bir uyarıldı ve antijen reaktif T hücreleri MTT proliferasyon testi ile belirlendi. Makroskopik olarak büyüme gözlemlenen ve MTT testinde en iyi proliferatif yanıt veren kuyucukların antijen ile uyarılmasına devam edildi. Çoğalan hücrelerin hücre yüzey belirteçleri ve aktivasyon fenotipleri akım sitometrisi ile analiz edildi. Elde edilen otoreaktif T hücre serilerinin $CD4^+$ T hücreler oldukları saptandı. T1D hastalarda aktive $CD4^+CD25^+$ T ve $CD4^+CD69^+$ T hücre oranları sağlıklı kontrole oranla oldukça yüksek bulundu. Otoreaktif T hücre serilerinin sitokin sekresyon profilleri ELİSA testi ile analiz edildi. T hücre serilerinin heterojen fenotip sergiledikleri, ancak T1D hastalarında baskın olarak İFN- γ salgılayan $CD4^+$ Th1 hücrelerin bulunduğu görüldü. Bunun yanında İL-4 salgılayan Th2, İL-17 salgılayan Th-17 ve İL-10 salgılayan T hücre serilerinin varlığı da gözlemlendi. Sağlıklı kontrol bireyden izole edilen T hücre serilerinin düşük düzeyde İFN- γ , İL-4 ve İL-17, ancak yüksek düzeyde İL-10 salgıladıkları görüldü. Sonuç olarak, T1D hastalarından GAD65 otoantijenine reaktif T hücre serileri izole edildi, bu hücrelerin kontrol bireye oranla yüksek aktivasyon fenotipi sergiledikleri ve daha çok sitokin saldıkları gösterildi. Bu sonuçlar T1D patogenezinde GAD65 spesifik otoreaktif T hücrelerin rollerini ortaya koyması bakımından faydalı olacak, ileride T hücre temelli immünoterapilerin geliştirilmesine ışık tutacaktır.

Bilim Kodu	: 1039.2
Anahtar Kelimeler	: Tip 1 diyabet, Otoreaktif T hücre, Th1, Th2, Th17, İFN- γ
Sayfa Adedi	: 155
Danışman	: Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK
İkinci Danışman	: Prof. Dr. Ayşegül Atak Yücel

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TYPE 1 DIABETES ANTIGEN SPECIFIC T CELL CLONES

(Ph. D. Thesis)

Süheyla HASGÜR

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

February 2015

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is a T cell mediated autoimmune disease characterized by the destruction of the insulin producing beta (β) cells. Detection of T cell responses directed against β cells is critical for understanding detailed mechanisms underlying the disease. In this study, with this aim, we isolated and characterized human GAD65 reactive $CD4^+$ T cells from peripheral blood of T1D patients. Isolated PBMC cells from T1D patients were stimulated with GAD65 every 14 days and antigen reactive T cells were determined by MTT proliferation assay. Later, wells with best proliferation index in MTT assay were chosen for other stimulations with the antigen. Cell surface markers and activation phenotypes of proliferating cells were analyzed by flow cytometry. We observed that, isolated autoreactive T cell lines were $CD4^+$ T cell phenotype. Also, the percentages of activated $CD4^+$ $CD25^+$ T cells and $CD4^+$ $CD69^+$ T cells were found to be higher in T1D patients than in healthy control individual. Cytokine profiles of autoreactive T cells were analyzed by ELISA. Although, GAD65 reactive $CD4^+$ T cells were capable of expressing heterogeneous phenotypes, we found that IFN- γ producing cells were dominant among GAD65 specific $CD4^+$ Th1 cells in T1D patients. Additionally, the presence of IL-4 producing Th2 cells, IL-17 secreting Th17 cells and IL-10 producing cells in T cell lines were observed in T1D patients. T cells in healthy individual secreted higher amounts of IL-10 and lower amounts of IFN- γ , IL-4 and IL-17 compared to T1D patients. In conclusion, GAD65 specific T cells in T1D patients served a high activation phenotype and secrete higher amounts of cytokines as compared to healthy donors. These observations will be useful to enhance our understanding of GAD65 specific autoreactive T cell roles in T1D pathogenesis, and may help to generate T cell based immunotherapies against autoimmune diseases.

Science Code : 1039.2
Key Words : Type 1 Diabetes, Autoreactive T cell, Th1, Th2, Th17, IFN- γ
Page Number : 155
Advisor : Prof. Dr. Emin Ümit Bağrıaçık
Co-Advisor : Prof. Dr. Ayşegül Atak Yücel

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren danışmanlarım Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK'a ve Prof. Dr. Ayşegül ATAK YÜCEL'e, deneyim ve bilgilerini benimle paylaşan ve çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli Anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Vedat Bulut ve Anabilim dalımızın kıymetli öğretim üyelerine, tez çalışmalarım konusunda bilgi, deneyim ve tecrübeler kazandığım ve tez konusuna ilişkin bazı çalışmalar gerçekleştirdiğim Massachusetts Üniversitesi Diyabet Merkezi'nde insanlaştırılmış fare modelleri teknolojisini öğrenmemde ve çalışmalarımın olumlu sonuçlar almamda katkısı büyük olan hocalarım Prof. Dr. Dale L. GREINER ve Doç. Dr. Michael BREHM'e, T hücre klonu oluşturmada engin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Doç. Dr. Sally Kent'e teşekkürü bir borç bilirim. Bu tez kapsamında yurtdışı araştırmalarım için burs sağlayan TÜBİTAK'a (BİDEB Yurtdışı Araştırma Burs Programı, Program no: 2214A) teşekkür ederim. Tezimin çeşitli aşamalarında, laboratuvar çalışmalarım ve zor günlerimde sonsuz destek ve yardımlarıyla her zaman teşviklerini gördüğüm Gazi Tıp Fakültesi, İmmünoloji Araştırma Merkezindeki arkadaşlarım Melek Yaman, Emine Yavuz, Nihan Örüklü, Mehmet Ali Çivi'ye, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Hastanesi'nde tezimin ek testlerinde ve hasta örnekleri bulmamda yardımcı olan arkadaşlarım Nilnur Eyerci ve Meral Saban Tiryaki'ye ve ABD'de bulunduğum süreçte her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen arkadaşım Ken Edwin Aryee'ye, maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Prof. Dr. E. Ümit BAĞRIAÇIK'ın Kalkınma Bakanlığı (Proje No: 2009K120670), Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı (Proje No: 0192-SANTEZ-2013-1) ve TÜBİTAK (Proje No: 112S451) projeleri tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR	3
2.1. Tip 1 Diyabet	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Tip 1 diyabetin sınıflandırılması	4
2.1.3. Tip 1 diyabetin tanısı	6
2.1.4. Tip 1 diyabetin etiyolojisi ve gelişim evreleri	8
2.1.5. Tip 1 diyabette efektör mekanizmalar	21
2.1.6. Tip 1 diyabette regülatör mekanizmalar	39
2.1.7. Tip 1 diyabette otoantijene spesifik T hücre fonksiyonlarının ölçümü	53
3. METOT ve YÖNTEM	59
3.1. Araç-Gereçler	59
3.1.1. Antikorlar	59
3.1.2. Kitler	59

	Sayfa
3.1.3. Kimyasallar.....	59
3.2. GAD65 Reaktif T Hücre Serilerinin (line) Oluşturulması.....	60
3.2.1. Hastalar ve kontroller	60
3.2.2. Periferik kan mononükleer hücrelerin (PKMN) izolasyonu	61
3.2.3. PKMN hücrelerin antijen ile uyarımı	62
3.2.4. PKMN hücrelerin antijen ile tekrar eden uyarımları	62
3.2.5. Limiting dilüsyon testi.....	64
3.2.6. MTT testi.....	64
3.2.7. Akım sitometrisi.....	65
3.2.8. ELİSA ile sitokin konsantrasyonunun ölçümü	65
3.2.9. HLA tiplendirme	66
3.3. İstatistiksel Analiz	66
4. BULGULAR ve YORUM	67
4.1. İnsan GAD65 Otoantijenine Spesifik CD4 ⁺ T Hücrelerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu	67
4.1.1. PKMN hücrelerinin GAD65 ile uyarılması ve kümeleşmenin gözlenmesi ..	67
4.1.2. “Limiting dilüsyon” yöntemi ile T hücrelerin klonlaştırılması.....	75
4.1.3. Antijen reaktivitesine bağlı hücre çoğalmasının ölçülmesi	77
4.1.4. Otoreaktif T hücre serilerinin akım sitometri yöntemi ile analizi.....	82
4.1.5. Otoreaktif T hücre serilerinin sitokin salgılama profilleri.....	88
4.1.6. HLA analizi.....	100
5. TARTIŞMA.....	103
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	107
KAYNAKLAR	109
EKLER.....	139

	Sayfa
EK-1. Massachusetts Üniversitesinde Yapılan Çalışmalar Hakkında.....	140
EK-2. Etik Kurul İzni	150
EK-3. Gönüllü Bilgi Onay Formu	151
ÖZGEÇMİŞ	153

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Antikorlar	59
Çizelge 3.2. Kitler.....	59
Çizelge 3.3. Kimyasallar.....	60
Çizelge 3.4. Çalışmaya dahil edilen hastalar ve özellikleri.....	61
Çizelge 4.1. Dört numaralı hastadan elde edilen GAD65 reaktif T hücre serilerinin sitokin salgılama fenotipleri.	99
Çizelge 4.2. Beş numaralı hastadan elde edilen GAD65 reaktif T hücre serilerinin sitokin salgılama fenotipleri	99
Çizelge 4.3. Çalışmaya dahil edilen T1D hastalarının sınıf I HLA alelleri	101
Çizelge 4.4. Çalışmaya dahil edilen T1D hastalarının sınıf II HLA alelleri	101

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tip 1 diyabetin klinik olarak ortaya çıkışına kadar geçen süreçte zamana bağlı β hücre kütlelerinin kaybı	8
Şekil 2.2. Genom analizi sonuçlarına göre, Tip 1 diyabet riskinden sorumlu olduğu düşünülen genetik lokuslardan bazıları.....	11
Şekil 2.3. Tip 1 diyabette viral enfeksiyonların rolü	15
Şekil 2.4. Pankreas β hücre patolojisinin immünolojik mekanizmaları	22
Şekil 2.5. T hücrelerin aktivasyonu için gerekli olan üç sinyal hipotezi	24
Şekil 2.6. $CD4^+$ T yardımcı hücre alt gruplarının farklılaşması	27
Şekil 2.7. B lenfositlerin Tip 1 diyabet patogeneğinde efektör ve regülatör fonksiyonları	29
Şekil 2.8. Ortamın enflamatuvar yanıtına bağlı gelişen makrofaj polarizasyonu	31
Şekil 2.9. Otoreaktif T hücre cevabının oluşumunda veya regülasyonunda dendritik hücrelerin potansiyel rolleri	35
Şekil 2.10. NK hücrelerin otoreaktif T hücreleri aktive ve inhibe etme mekanizmaları.	38
Şekil 2.11. Öz antijenlere reaktif T hücrelere merkezi ve periferik tolerans mekanizmaları	40
Şekil 2.12. T hücrelerin merkezi negatif seleksiyonunda AIRE proteininin rolü	42
Şekil 2.13. T hücre periferik tolerans mekanizmaları	43
Şekil 2.14. Regülatör T hücrelerinin T1D patolojisini kontrol etme mekanizmaları.	46
Şekil 2.15. Regülasyon ve enflamasyon arasındaki denge.....	48
Şekil 2.16. B regülatör (Breg) hücrelerin immün regülatör etki mekanizmaları.....	49
Şekil 2.17. Tolerojenik dendritik hücrelerin indüklenmesi ve fonksiyonel etkilerinin şematik gösterimi	51
Şekil 2.18. Tip 1 diyabetin gelişimi ve önlenmesinde hücresel ve moleküler mekanizmalar	53

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Periferik kan mononükleer hücrelerinin elde edilme yönteminin şematik olarak gösterimi.....	62
Şekil 3.2. Antijen spesifik T hücre yapımının şematik gösterimi.....	63
Şekil 3.3. “Split well assay” testinin uygulanışı	65
Şekil 4.1. Birinci (a), ikinci (b) ve üçüncü (c) hastaların MTT proliferasyon testine verdikleri cevap.	79
Şekil 4.2. Dört numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijenine olan cevaplarının MTT proliferasyon testi ile taranması.....	80
Şekil 4.3. İkinci tur uyarım sonrası 4 numaralı hasta hücrelerinin antijen reaktivitesinin MTT testi ile analizi.....	81
Şekil 4.4. Beş numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası MTT proliferasyon testi ile antijen reaktivitelerinin ölçümü.....	81
Şekil 4.5. İkinci tur uyarım sonrası 5 numaralı hasta hücrelerinin antijen reaktivitesinin MTT testi ile analizi.....	82
Şekil 4.6. Dört numaralı hastaya ait otoreaktif T hücrelerin GAD65 antijeni ile belirli periyotlarla uyarımı sonrasında yüzey belirteçlerinin akım sitometrisi ile analizi.....	84
Şekil 4.7. Beş numaralı hastaya ait otoreaktif T hücrelerin GAD65 antijeni ile belirli periyotlarla uyarımı sonrasında yüzey belirteçlerinin akım sitometrisi ile analizi.....	85
Şekil 4.8. Sağlıklı kontrol hastasından alınan PKMN hücrelerinin GAD65 antijeni ile uzun süreli kültürü sonrasında hücrelerin fenotipik özelliklerinin akım sitometrisi ile analizi.....	86
Şekil 4.9. Dört numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası hücrelerin antijene verdikleri İFN- γ yanıtı.....	89
Şekil 4.10. Beş numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası hücrelerin antijene verdikleri İFN- γ yanıtı.....	90

Şekil	Sayfa
Şekil 4.11. Dört numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası	
hücrelerin antijene verdikleri İL-4 yanıtı	92
Şekil 4.12. Beş numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası	
hücrelerin antijene verdikleri İL-4 yanıtı	93
Şekil 4.13. Dört numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası	
hücrelerin antijene verdikleri İL-10 yanıtı	95
Şekil 4.14. Beş numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası	
hücrelerin antijene verdikleri İL-10 yanıtı	95
Şekil 4.15. Dört numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası	
hücrelerin antijene verdikleri İL-17 yanıtı.	97
Şekil 4.16. Beş numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası	
hücrelerin antijene verdikleri İL-17 yanıtı	97
Şekil 4.17. Sağlıklı kontrol birey hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası	
hücrelerin sitokin salgılama fenotipleri.....	98

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. PKMN hücreleri izole edilerek GAD65 antijeni ile uyarılmış 1 numaralı hasta hücrelerinin antijene verdikleri yanıt.....	69
Resim 4.2. PKMN hücrelerinin izolasyonunu takiben belirli zaman aralıklarıyla GAD65 antijeni ile kültüre edilen 2 numaralı hasta hücrelerinin antijene verdikleri yanıt..	70
Resim 4.3. PKMN hücrelerinin belirli zaman aralıklarıyla GAD65 antijeni ile kültüre edilmesi sonucu, 3 numaralı hasta hücrelerinin antijene verdikleri yanıt ...	71
Resim 4.4. GAD65 antijeni ile seri uyarımlar sonrası aktive olan 4 numaralı hastanın otoreaktif T hücrelerinde oluşan kümeleşmenin ışık mikroskobu ile görünümü.....	73
Resim 4.5. GAD65 antijeni ile seri uyarımlar sonrası aktive olan 5 numaralı hastanın otoreaktif T hücrelerde oluşan kümeleşmenin ışık mikroskobu ile görünümü.....	74
Resim 4.6. GAD65 antijeni reaktif 4.2C, 4.6A ve 5.3C T hücre serilerinin “limiting dilüsyon” sonrası çoğalmalarının ışık mikroskobu ile gösterimi.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
CO ₂	Karbon dioksit
dk	Dakika
μ g	Mikrogram
mL	Mililitre
mg	Miligram
DL	Desilitre

Kısaltmalar

Açıklamalar

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADCC	Antikor bağımlı hücrel sitotoksisite
AIRE	Otoimmün regülatör (<i>Autoimmune regulator</i>)
APS	<i>Autoimmune poly-endocrine syndrome</i>
ASH	Antijen sunucu hücre
Breg	Regülatör B (<i>B regulatory</i>)
cDC	Konvansiyonel dendritik hücreler
CLR	C-tip lektin reseptörü
CTL	Sitotoksik T lenfosit (<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>)
CVB4	Coxsackie tip B-4 virüsü
cTEC	Kortikal timik epitel hücreler
CTLA-4	Sitotoksik T lenfosit antijen-4
DC	Dendritik hücre (<i>Dendritic Cell</i>)

Kısaltmalar**Açıklamalar****DIAMOND***World Health Organization Multinational Project for Childhood Diabetes***DM***Diabetes Mellitus***DPT-1***Diyabeti Önleme Çalışması-1 (Diabetes Prevention Trial Type-1)***FcγR***Fc gama reseptörü***FoxP3***Forkhead box P3***GADA***Glutamik asit dekarboksilaz otoantikoru***GAD65***Glutamik asit dekarboksilaz 65***GATA-3***GATA bağlayıcı protein-3 (GATA binding protein-3)***GDM***Gestasyonel Diyabet (Gestational Diabetes Mellitus)***HLA***İnsan lökosit antijeni (Human Leukocyte Antigen)***HSP***Isı şoku proteini (Heat Shock Protein)***IA***İnsülin antijeni***IAA***İnsülin otoantikoru (Insulin AutoAntibody)***IAPP***Adacık amiloid polipeptidi***IA-2***İnsülinoma ilişkili antijen-2 (Insulinoma-associated Antigen-2)***IA-2A***İnsülinoma ilişkili 2 otoantikor***ICA***Adacık otoantijeni (Islet Cell Autoantigen)***IFG***Bozulmuş açlık glikozu (impaired fasting glucose)***IFIH1***Interferon induced with helicase C domain 1***Ig***İmmünoglobulin***IGRP***Adacığa özgül glukoz-6 fosfataz katalitik alt ünite- ilişkili protein***IGT***Bozulmuş glikoz toleransı***INS***İnsülin***İFN***İnterferon***İL***İnterlökin*

Kısaltmalar**Açıklamalar****İL-2RA/CD25**

İnterlökin-2 reseptör alfa

KIR

Öldürücü hücre immüoglobulin-benzeri reseptör

LADAGeç başlangıçlı erişkin diyabeti (*Latent autoimmune diabetes of adults*)**LYP**

Lenfoid spesifik tirozin fosfataz

M1 (CAM)

Klasik aktive makrofajlar

M2 (AAM)

Alternatif aktive makrofajlar

MDA-5Melanoma Farklılaşması ile ilişkili Protein-1
(*Melanoma Differentiation-Associated protein*)**MEM-NEAA***Minimum essential medium non-essential aminoacid***MHC**Ana doku uygunluk kompleksi (*Major histocompatibility complex*)**MIP-1 α** Makrofaj enflamatuvar protein 1 α (*Macrophage Inflammatory Protein-1 α*)**MODY**

Maturity-onset diabetes of the young

mTEC

Medullar timik epitel

MZ

Marjinal zon

NCR

Doğal sitotoksikite reseptörü

NIDDMİnsüline bağımlı olmayan diyabet (*Non-insulin dependent diabetes mellitus*)**NK**Doğal öldürücü (*Natural Killer*)**NKT**Doğal öldürücü T (*Natural Killer T*)**NLR**

İntrasitoplazmik nükleotid-oligomerizasyon domain benzeri reseptör

NO

Nitrik oksit

NSGNOD-Scid IL-2 γ^{null} **PAMPs**Patojenle ilişkili moleküler yapılar (*Pathogen associated molecular patterns*)

Kısaltmalar**Açıklamalar**

pDC	Plazmasitoid dendritik hücreler
PD-1	Programlanmış hücre ölümü proteini-1 (<i>Programmed cell Death protein 1</i>)
PD-L	<i>Programmed cell Death protein- Ligand</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PTPN22	<i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor 22</i>
pDC	Plazmasitoid dendritik hücreler
RLR	Retinoik asit benzeri reseptör (<i>Retinoic acid-like receptor</i>)
RORγ T	<i>RAR-related orphan receptor gamma T</i>
SEARCH	<i>The SEARCH for Diabetes in Youth</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
T-bet	<i>T-box transcription factor</i>
TCR	T hücre reseptörü
Th	T yardımcı (<i>T helper</i>) hücre
TFH	Foliküler yardımcı T hücre (<i>T follicular helper</i>)
TNF	Tümör nekroze edici faktör
Treg	Regülatör T hücre
TLR	Toll benzeri reseptör (<i>Toll-like receptor</i>)
TSA	Doku spesifik antijenler (<i>Tissue specific antigen</i>)
T1D	Tip 1 diyabet
T2D	Tip 2 diyabet
ZnT8	Çinko taşıyıcı 8 (<i>Zinc transporter 8</i>)

1. GİRİŞ

Tip 1 diyabet (T1D), insülin bağımlı diyabet olup, immün sistemin Langerhans adacıklarındaki beta (β) hücrelerini parçalayarak, insülin üretiminde yokluğa sebep olması sonucu oluşan otoimmün kaynaklı bir hastalıktır [1]. Genellikle genetik olarak yatkın bireylerde çevresel faktörlerin tetiklemesi ile meydana gelir [2, 3]. Hastalık tablosu 4-5 yıllık immünolojik yıkım sonrasında yaklaşık %80-90'dan fazla β hücre hasarı meydana geldiğinde açığa çıkar [4]. Hastalık, hiperglisemiden kaynaklanan poliüri, polidipsi, polifaji gibi semptomlarla görülebileceği gibi ketoasidoz, böbrek ve kalp yetmezliği, görme bozuklukları gibi ağır semptomlarla da seyredebilir [5]. T1D, diğer diyabet çeşitlerinden hastalarda otoantikorların tespit edilebilmesi ve otoreaktif T hücrelerin varlığı ile ayırt edilebilir. T hücre reaktivitesi GAD, IGRP, IA-2 gibi birçok farklı adacık proteinine karşı oluşabilmektedir [6]. Hastalığın oluşumunda, HLA polimorfizminin etkileri çok büyük olmakla beraber, HLA dışında 40'dan fazla genin de diyabet oluşumunu etkilediği bilinmektedir [7]. Bunun yanında viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, beslenme gibi çevresel faktörlerin tetiklemesi ile hastalık tablosu ortaya çıkar [8].

Genetik olarak yatkın bireylerde çevresel etmenlerin tetiklemesi ile immünolojik hadiseler baş gösterir. β hücre hasarı sonucu açığa çıkan antijenler konvansiyonel dendritik hücreler (cDC) tarafından yakalanarak bölgesel lenf düğümlerine götürülürler. Aktive olan cDC'ler tarafından işlenen antijenler MHC sınıf II molekülleri ile adacık antijenlerine spesifik $CD4^+$ T hücrelere sunulurlar. Bu sırada makrofajlar ve diğer doğal immün sistem hücreleri tarafından salgılanan İL-12 gibi proenflamatuvar sitokinlerle T hücrelerin aktivasyonları indüklenir. Aktive olan $CD4^+$ T hücreler adacık antijeni spesifik B lenfositleri aktive ederek, B hücrelerin plazma hücrelerine farklılaşıp antikor üretmelerini uyarır. $CD8^+$ T hücrelere antijen sunucu hücreler ve β hücreler üzerinde eksprese olan sınıf I MHC molekülleri ile antijen sunumu gerçekleştirilir. $CD4^+$ T lenfositler salgıladıkları sitokinler ile $CD8^+$ T lenfositlerin aktivasyonuna yardım ederler. Aktive olan $CD8^+$ T hücreler sitotoksik T hücrelere (CTL) farklılaşarak perforin ve granzim gibi sitotoksik moleküller üreterek β hücre hasarını başlatırlar. Bunun yanında İFN (interferon)- γ gibi proenflamatuvar sitokinler salgılayarak var olan patolojiyi artırır. $CD4^+$, $CD8^+$ hücrelerin ve makrofajların

salgıladıkları sitokinler ile diğer doğal immün sistem hücreleri de devreye girerek, oluşan yangısal ortam daha da artırılır [9-11].

T1D'in meydana gelişinde en büyük patolojik etki T lenfositler tarafından oluşturulur [12, 13]. T1D teşhisinde her ne kadar otoantikor varlığına bakılarak β hücre hasarı tahmin edilmeye çalışılsa da aslında otoantikorların varlığı, var olan T hücre ilişkili patolojinin bir ürünüdür [14]. Bu nedenle araştırmacılar T hücrelerin fonksiyonel analizlerini yaparak β hücre patolojisi altında yatan sebepleri araştırmaya çalışmışlardır [15]. T hücre analiz çalışmaları uygulaması zor bir yöntem olup, reaktif hücrelerin kanda çok düşük düzeyde bulunmaları sebebiyle halen sadece bilimsel araştırmalar amacıyla kullanılmakta, klinikte prediyabetik ve diyabetik hastaların teşhisi amacıyla kullanılamamaktadır [16]. T1D hastalığının altında yatan sebepleri ve T hücre efektör mekanizmalarını daha ayrıntılı olarak araştırmak amacıyla otoreaktif T hücre klonlarının izolasyon ve karakterizasyon çalışmaları vazgeçilmez bir yöntemdir [17]. Şimdiye kadar birçok T hücre klonu izole edilmiş, birbirleri ile benzerlikleri ve farklılıkları gösterilmiştir. Her bir izole edilen klon kişiye özel özellikler sergilemekte, bulunan her yeni klon bilimsel olarak anlam ifade etmektedir. T hücre klonu çalışmaları ile birlikte yapılan T hücrelerin reaktif oldukları antijenik epitopların belirlenmesi ile ileride kişiye özel immünoterapilerin geliştirilmesi adına gelecek vaad etmektedir [17, 18].

Çalışmamızda T1D hastalarının periferik kanlarından GAD65 antijenine spesifik otoreaktif T hücrelerin izolasyonları yapılmış, elde edilen spesifik hücrelerin hücre yüzey belirteçleri akım sitometrisi ile sitokin fenotipleri ELİSA yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde ettiğimiz veriler, henüz Türk T1D hasta popülasyonu içerisinde otoreaktif T hücrelerle ilişkili ayrıntılı bir veri ortaya konmadığı için oldukça önemli ve literatüre katkı sağlayacak değerli bir çalışmadır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ARAŞTIRMALAR

2.1. Tip 1 Diyabet

İnsülin bağımlı Tip 1 diyabet, pankreas Langerhans adacıklarındaki insülin üreten beta (β) hücrelerinin parçalanması sonucu ortaya çıkan insülin yetersizliği ve hiperglisemi ile seyreden kronik metabolik bir hastalıktır. İnsülin hormonunun yetersizliği sonucunda kan glikoz kontrolü bozulur, bu da klinik olarak poliüri, polidipsi, polifaji, glikozüri, ketoasidoz gibi akut semptomların ortaya çıkmasına, ilerleyen dönemlerde kardiovasküler hastalıklar, nefropati, nöropati, retinopati gibi ikincil komplikasyonlara sebep olabilmektedir. Tip 1 diyabet (T1D), genellikle çocuklar ve gençlerde görülmekle birlikte, yetişkin bireylerde de ortaya çıkabilmektedir [12, 19-21].

2.1.1. Epidemiyoloji

Dünyada görülen diyabet vakalarının %5-10 kadarını T1D oluşturmaktadır. Diyabet vakalarının büyük bir kısmını ise insülin bağlanmasıyla ilgili direnç sonucu insülin cevabındaki azalma ile karakterize olan Tip 2 diyabet (T2D) oluşturur. T1D çocukluk çağında görülen en yaygın diyabet tipidir [22]. Vakaların %85'i 20 yaş altındaki bireylerde gözlemlenir. Hastalığın görülme insidansı bebeklik döneminde başlar, puberte çağlarında pik yapar ve bundan sonraki dönemlerde giderek azalır. Yetişkin bireylerde risk oranı tam olarak kaybolmamakla beraber, T1D vakalarının ancak %20-25 kadarını yetişkin bireyler oluşturmaktadır [23, 24]. Amerika Birleşik Devletleri'nin yaklaşık 300 milyon nüfusu içerisinde 1,5 milyonu T1D iken, bunların yaklaşık 170 000'ini 20 yaş altındaki çocuklar ve gençler oluşturmaktadır [8]. Birçok otoimmün hastalık kadınlarda erkeklere oranla daha fazla görülürken, T1D'in her iki cinsi eşit oranda etkilediği saptanmıştır. Ancak insidansın puberte döneminden sonra kadınlarda düştüğü, 29-35 yaş arası erkeklerde ise yüksekliğini koruduğu tespit edilmiştir [25].

T1D epidemiyolojisi ülkelere göre çok çeşitli varyasyonlar göstermektedir, bu durum genellikle T1D'ten sorumlu olan baskın genlerin ırksal dağılımına bağlanır. Genlerin yanında çevresel faktörler, coğrafik bölge ve beslenme de insidansı etkileyen

faktörlerdendir [26]. DIAMOND (*World Health Organization Multinational Project for Childhood Diabetes*)'ın raporuna göre en yüksek insidans Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde saptanmaktadır. Avrupa'da yılda 100 000 kişide 4-41 vaka saptanırken, Kuzey Amerika'da insidans 100 000'de 11-25 arasında değişkenlik göstermektedir. T1D'in en yaygın olduğu ülkeler Finlandiya ve Sardinya (İtalya) olarak rapor edilmiştir. Yılda 100 000 kişide yaklaşık 50 vaka T1D olarak saptanmaktadır. Norveç, İsveç, İngiltere, Kanada, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda ve Portekiz'de 100 000 kişide yaklaşık 20 vakaya T1D teşhisi konulmaktadır. Çin, Hindistan ve Venezuela T1D'in en az rastlandığı ülkelerdendir; buralarda hastalığın görülme insidansı yılda 100 000 kişide 0,1 oranındadır [24, 27]. T1D insidansı yılda 100 000 kişide Afrika'da 1-9, Güney Amerika'da <1-10 arasında çeşitlilik göstermektedir. Asya'da ise insidans yılda 100 000 kişide 1'in altındadır [1, 28]. Ülkemizde 0-15 yaş arası T1D insidansı 100 000 kişide yaklaşık 2,5 olarak gösterilmiştir. DIAMOND'un 1990-1999 yılı raporuna göre dünyada T1D insidansı her yıl ortalama %2,8 civarında artış göstermektedir. Kıtasal dağılıma bakıldığında T1D insidansının Asya'da %4, Avrupa'da %3,2, Kuzey Amerika'da %5,3, Güney Amerika'da %3,6 yıllık ortalama artış gösterdiği rapor edilmiştir [1, 24]. Yine SEARCH (*the SEARCH for Diabetes in Youth*) isminde bir araştırma grubunun verilerine göre yılda 15 000 gence T1D teşhisi konulmaktadır [29].

2.1.2. Tip 1 diyabetin sınıflandırılması

Diabetes Mellitus (DM), hiperglisemi ile karakterize insülin salgılanması veya insülin etkilerindeki bozukluklar sonucu oluşan, çoklu metabolik hastalıklar grubudur. Amerikan Diyabet Birliği'nin (ADA) sınıflandırmasına göre DM; (a) T1D, (b) T2D, (c) diğer spesifik diyabet tipleri, (d) gestasyonel *diabetes mellitus* ve (e) prediyabet olmak üzere beş gruba ayrılır. Bunlardan birincisi insülin salgılanmasındaki yetersizlik sonucu açığa çıkan ve genellikle pankreas adacıklarındaki otoimmün patolojik yıkımın serolojik ürünleri ile tanısı konulabilen insülin bağımlı "Tip 1 diyabet"tir (*Insulin-dependent Diabetes Mellitus: IDDM*). IDDM). [22, 30]. İkinci ana grup ise diyabet türlerinin %90-95'ini oluşturan, immün ilişkili sebeplere dayanmayan ve insülin etkilerindeki direnç sonucu insülin salınımındaki yetersizlik ile karakterize "Tip 2 diyabet"tir (*Non-insulin Dependent Diabetes Mellitus: NIDDM*) (T2D) [31].

T1D kendi içinde “Tip 1A” ve “Tip 1B” olarak iki gruba ayrılır. Dünyadaki diyabetli çocukların yaklaşık %80’ini Tip 1A diyabetli çocuklar oluşturmaktadır. “Tip 1A diyabet”, hücre ilişkili otoimmün mekanizmalarla pankreasın β hücrelerinin parçalanması sonucu oluşur. Bu hastaların kanında β hücre yapılarına spesifik otoantikorlar (GAD, IA-2, IAA, ZNT8A, ICA) saptanır. Bu diyabet türü baskın şekilde insan lökosit antijenleri (*Human Leukocyte Antigen: HLA*) ile ilişkili olmakla beraber çevresel etmenlerin de hastalık üzerinde etkileri vardır. “Tip 1B diyabet”, “idiyopatik diyabet” olarak da adlandırılan, etiyolojisi bilinmeyen, kalıcı insülinopeni ve ketoasidoza yatkınlık ile seyreden T1D türüdür. Hastalıkta otoimmün belirtiler gözlenmez ve HLA ile ilişkili değildir [22, 32, 33].

Tip 1A ve Tip 1B dışında immün kaynaklı diyabetler arasında “fulminant tip 1 diyabet”, “duble diyabet” ve “erişkinlerin latent/gizli otoimmün diyabeti (LADA: *Latent Autoimmune Diabetes of Adults*)” diyabet olarak 3 sınıflandırma daha yapılır [33]. “Fulminant T1D”, diyabet semptomlarının şiddetli ve akut olarak baş göstermesi ile karakterize, hiperglisemiye eşlik eden ketoasidozis ve plazma glikozunun 288 mg/dL’den yüksek olması ile teşhisi konulan T1D şeklidir [34, 35]. “Duble (*Double*) diyabet”, bir bireyde (çocuk veya yetişkin) hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabetin aynı anda gelişmesi ile olur. İnsülin direnci ve obezite, pankreastaki otoimmünite belirteci olan adacık antijenlerine spesifik otoantikorlar ile beraber görülür [36]. “LADA diyabet” tipi erişkin bireylerde latent (gizli) otoimmün diyabetin saptanmasıdır. Başlangıçta yetişkin diyabetik bireylerde otoimmün testler pozitif olup, insüline ihtiyaç duymayan bir diyabet teşhis edilir. Ancak ilerleyen dönemlerde insülin kullanımına ihtiyaç duyulduğu ve klinik olarak T2D gibi görünse de aslında T1D’in patolojik özelliklerini sergilediği rapor edilmiştir [37, 38].

Diğer spesifik diyabet tipleri arasında en çok adı geçen, “Gençlerin Erişkin Yaşta Ortaya Çıkan Diyabeti (*maturity-onset diabetes of the young: MODY*)” tipi DM’ tur. Pankreas β hücresi fonksiyonlarındaki genetik bozukluk sonucu insülin etkilerinde azalma olmaksızın, insülin salgılanmasında azalma ile karakterize olup yetişkin bireylerde ortaya çıkar. Altı farklı monogenik formu vardır [39]. Bunun dışında diğer spesifik diyabet tipleri arasında; insülin etkisinde genetik bozukluk, ekzokrin pankreas hastalıkları (pankreatit gibi), endokrinopatiler, ilaç veya kimyasallar ile indüklenen diyabet, enfeksiyonlar, immün diyabetin nadir olan diğer formları ve bazı genetik sendromlarla ilişkili diyabetler

sayılabilir [22]. DM'un dördüncü grubunda gebelikte özellikle üçüncü trimesterde glikoz intoleransının oluşumu ve dolayısıyla hiperglisemi ile karakterize "Gestasyonel *Diabetes Mellitus* (GDM)" yer alır [40].

DM'un sınıflandırılmasında son grup, ara dönem grubu olarak görülen genellikle "prediyabet" olarak adlandırılan "bozulmuş açlık glikozu (*impaired fasting glucose: IFG*)" ve "bozulmuş glikoz toleransı (*impaired glucose tolerance: IGT*)" ile karakterize kısmi hiperglisemidir. Bu bireylerin glikoz seviyeleri diyabet olacak kadar yüksek değilken normal olacak kadar da düşük değildir. Bu yüzden diyabet geliştirme açısından yüksek risk taşımaları sebebiyle diyabete geçiş fazı olarak düşünülmüştür [22].

2.1.3. Tip 1 diyabetin tanısı

Tip 1 diyabet (T1D), insülin salınımındaki bozukluk ile birlikte glikoz metabolizmasının bozulması sonucu kronik hiperglisemiye ve sonrasında hayatı tehdit eden akut ketoasidoz ve kronik komplikasyonlara sebep olur [41, 42]. Genel klinik semptomlar; polidipsi, poliüri, açıklanamayan kilo kaybı, bazı enfeksiyonlara karşı artmış hassasiyet ve güçsüzlüktür. Amerikan Diyabet Birliği'nin (ADA) tanı koyma kriterlerine göre randomize plazma glikoz düzeyi 200 mg/dl veya $\geq 11,1$ mmol/L'e eşit veya fazla olması, 8-12 saat açlık sonrası plazma glikoz düzeyi 126 mg/dl veya 7 mmol/L'e eşit veya fazla olması ve oral glikoz tolerans testinin (GTT) 2. saatinde bakılan plazma glikoz değeri 200mg/dl veya 11,1 mmol/L veya daha yüksek olması ile T1D tanısı konur [5].

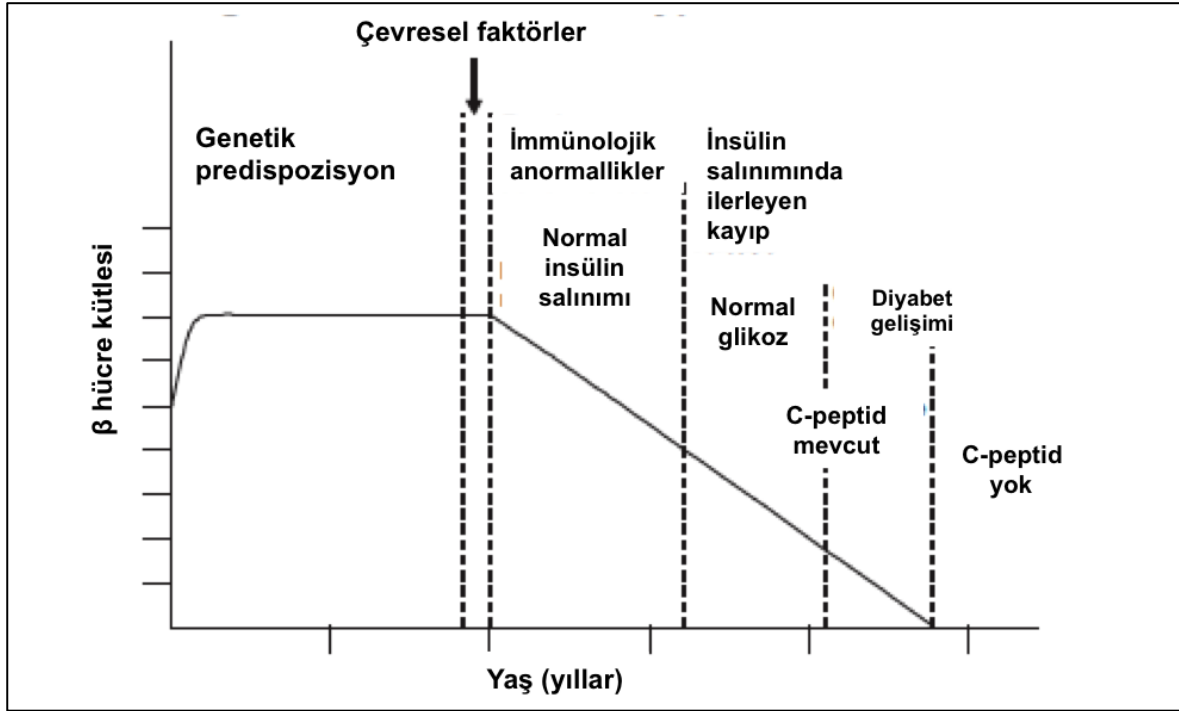
HbA1c değeri, diyabetin kan verilmesinden 2-3 ay önceki periyodunu ve ortalama kan glikoz seviyesini yansıttığından HbA1c'ye bakılması teşhis açısından oldukça önem taşır. HbA1c; glikozillenmiş hemoglobin manasına gelir. Eritrositlerin ortalama ömrü 120 gün olduğundan ve hemoglobinin glikozillenmesi kan glikoz oranına paralel olarak arttığından 120 günlük kan şekeri düzeyini tahmin etmemizi sağlar. ADA'ya göre, bu değer % 6,5 veya daha fazla olması diğer açlık, tokluk veya 2 saatlik OGTT plazma glikoz düzeyleriyle beraber diyabetin teşhisinde göz önünde bulundurulması gereken bir kriterdir [5, 43].

T1D'i Tip 2 diyabetten ayıran en önemli nokta, pankreas β hücrelerini otoimmün mekanizmalarla parçalayan T hücrelerin var olmasıdır. Ancak T hücrelerin varlığını

gösterecek klinik testler olmadığı için otoimmünitinin varlığı adacık antijenlerine spesifik otoantikörlerin varlığının tespiti ile olur. Glutamik asit dekarboksilaz 65 (GAD65), insülin otoantikörü (IAA), insülinoma ilişkili antijen-2 (IA-2), adacık otoantijeni (ICA), zink transporter 8 (ZnT8) otoantikörlerinden 2 veya daha fazlasının tespit edilmesi ile Tip 1 Diyabet teşhisi konur. Genellikle T1D hastalarının %90'ında otoantikör varlığı tespit edilir [8, 33, 44].

Yine en önemli ayırıcı tanılardan bir tanesi, T1D hastalarının büyük bir çoğunluğunun 14 yaşın altındaki çocuklar olmasıdır. Bunun yanında T1D hastalarında, proinsülinin insüline parçalanırken açığa çıkan C-peptid düzeyi, insülin salgılanma düzeyini gösterdiğinden ayırıcı tanıda önem arz eder. Bu hastalarda C-peptid düzeyinin oldukça düşük olması ile Tip 2 diyabet ve MODY diyabet tiplerinden ayrılır [45, 46].

T1D'in klinik olarak ortaya çıkışı, sessiz bir immünolojik faz ve sonrasında artmış b hücre kütle kaybı sonrasında gerçekleşir. Özetle, genetik olarak yatkın bireylerde (çoğunlukla HLA polimorfizmi, APS-1, IPEX, insülin, IL-2RA, CTLA-4, PTPN22, IFIH gibi) çevresel etmenlerin (viral enfeksiyonlar, beslenme gibi) de tetiklemesiyle β hücre otoimmünitesi başlar. Aktive olmuş otoreaktif T hücreler pankreası istila eder ve Langerhans adacıklarındaki insülin üreten β hücrelerini parçalarlar. Bu süreçte aktive olmuş B hücreleri, plazma hücrelerine dönüşür ve otoantikörler üreterek pankreasta oluşan patolojiye katkıda bulunurlar. β hücrelerinde oluşan immünolojik yıkım ve β hücre kütle kaybı sonucu insülin salınımında azalma ve hiperglisemi ile beraber, c-peptid düzeyinde ciddi bir azalma meydana gelir. Hastalığın klinik semptomlarının %80-90'ı β hücre hasarı meydana gelmeden önce ortaya çıkmamaktadır. Hasta kliniğe şikayetlerle geldiğinde hastalığın patolojik geçmişi 4-5 yıl öncesine dayanmaktadır (Şekil 2.1) [4, 47].



Şekil 2.1. Tip 1 diyabetin klinik olarak ortaya çıkışına kadar geçen süreçte zamana bağlı β hücre kütlesinin kaybı [47].

2.1.4. Tip 1 diyabetin etiolojisi ve gelişim evreleri

Genetik yatkınlık

Diğer otoimmün hastalıklar gibi Tip 1 diyabete yatkınlık kalıtsal özellik taşır. Ancak genetik yatkınlığın önemli olmasının yanında hastalık multifaktöriyel ve poligenik olduğu için genetik predispozisyon ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu T1D gelişiminin indüklendiği düşünülmüştür. %85'den fazla T1D hastasının ailesinde diyabet hikayesi bulunmamasının yanında, birinci derece yakını hasta olan bireyler %5 oranında T1D geliştirme riski ile karşı karşıyadır. Babası hasta çocukların (yaklaşık %7), annesi hasta çocuklara oranla (yaklaşık %2) daha fazla T1D geliştirme riski vardır. Kardeşi etkilenmiş bireylerin %5-6, tek yumurta ikizlerinin %30-50, çift yumurta ikizlerinin %6-10 oranında diyabet geliştirme riskleri vardır [1, 27, 48].

Tip 1 diyabet monogenik etiyojile de meydana gelebilir. Bunlardan birincisi APS (*Autoimmune Poly-endocrine Syndrome*)'dir. APS, otoimmün regülatör (AIRE) geninde otozomal resesif mutasyon sonucu meydana gelir [49]. AIRE geni, periferik öz antijenlerin

timusta eksprese edilerek T hücrelere sunumunda rol alır. AIRE geninde mutasyon sonucu insülin timusta T hücrelere tanıtılamaz ve otoreaktif T hücrelerin negatif seleksiyonu gerçekleştirilemez [50]. APS-1 hastaları genellikle T1D ile birlikte birden fazla otoimmün hastalığa (Addison, Graves, çölyak, vitiligo, otoimmün tiroidit, Stiff-Man sendrom gibi) sahip olabilir. Ayrıca bu hastaların serumunda çok çeşitli otoantikorlar tespit edilebilir [51]. T1D'e sebep olan diğer monogenik hastalık "IPEX (*Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*) sendromu"dur. IPEX sendromu, FoxP3 (*Forkhead box P3*) geninde mutasyon sonucu gelişir. FoxP3 transkripsiyon faktörü regülatör T (regulatory T: Treg) hücrelerinin gelişimi için gerekli olduğundan, bu hücrelerin gelişiminde bozukluk oluşur. Dolayısıyla otoreaktif T hücrelere karşı periferik tolerans mekanizmaları devreye girememiş olur. Doğumu takiben birkaç ay içerisinde ortaya çıkar. T1D, dermatit, çoklu (multipl) endokrinopati ve tekrarlayan enfeksiyonlar gibi çoklu hastalık tablosu sergiler [8, 52, 53].

HLA polimorfizmi

Son yapılan genom analizi çalışmalarında T1D'te insan genomunda 40'tan fazla T1D ile ilişkili lokus gösterilmiştir (Şekil 2.2). Bunlardan en önemli ve hastalık üzerinde yatkınlık ve koruyuculuk anlamında etkili olanlar kromozom 6p21 üzerindeki HLA lokuslarıdır [47]. Bu bölgeler, %40-60 oranında T1D yatkınlığından sorumlu olan gen bölgeleridir. HLA genleri sınıf I (A, B, C), sınıf II (DR, DQ, DP) ve sınıf III (non-klasik MHC genleri) olmak üzere üç sınıftan oluşur. Bu gen lokuslarının kodladığı antijenler hücre yüzeyinde eksprese edilen moleküllerdir ve antijenik peptidlere bağlanarak onları T hücrelere sunarlar.

T1D ile en çok ilişkili olan CD4⁺ T hücrelere antijen sunumunda görevli olan molekülleri kodlayan HLA sınıf II genleridir [54-56]. HLA sınıf II'ler arasında T1D'e en yakın lokuslar HLA-DRB1 ve HLA-DQB1 olarak gösterilmiştir. %30-50 arasında genetik riskten sorumlu DR ve DQ haplotiplerinin birbirleri ile heterozigot kombinasyonları T1D riskini önemli miktarda artırmaktadır. Örneğin; DQA1*0501-DQB1*0201'in DR3 ile kombinasyonu, DQA1*0301-DQB1*0302'nin DR4 ile kombinasyonu %30-50 oranında hastalığa yatkınlıkta rol oynadığı rapor edilmiştir [57, 58]. T1D hastalarının %40'ı HLA-DR3/DR4 heterozigotluğu sergilemektedir. Ayrıca Amerika'da 1000 hastada yapılan genom analizi

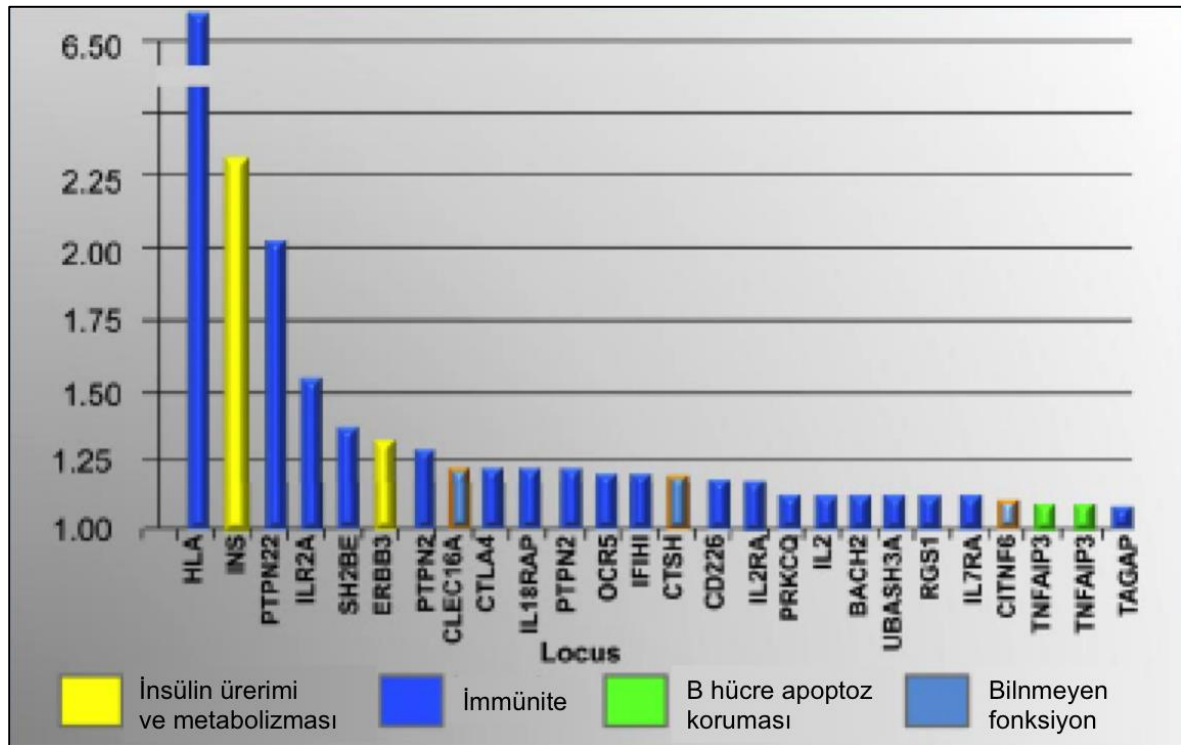
çalışmasında %95 hastanın HLA-DR3 veya HLA-DR4 alellerinden en az birini taşıdığı gösterilmiştir. Sadece %5 hastanın HLA-DR3 ve HLA-DR4'ten yoksun olduğu gözlemlenmiştir [1]. Yine Amerika'daki beyaz ırk (*Caucasian*) yeni doğan bebeklerin %2,4'ünde yüksek risk genotipi olan HLA-DR3/DR4 varlığı tespit edilmiştir. Bu çocukların genel popülasyona oranla (300'de 1) T1D geliştirme riski 15'te 1 oranındadır [59]. HLA'ları identik kardeşlerin bir tanesi diyabet hastası ise diğerlerinin hastalanma oranı 7'de 1 iken, HLA-DR3/DR4 genomik yapısına sahiplerse hastalanma oranları 4'te 1'dir [1].

HLA ilişkili T1D çalışmaları neredeyse 40 yıldır süregelmektedir. Bu çalışmaların büyük çoğunluğu beyaz ırk popülasyonu üzerinde yapılmıştır. Beyaz ırk ve Asya popülasyonlarında HLA sınıf II genleri T1D ile yakından ilişkilidir. Ancak T1D ile ilişkili haplotiplerin her bir popülasyonda varlığı ve yokluğu veya kombinasyonları çok çeşitli farklılıklar gösterebilir. Afrika kökenli Amerika'lıların genomik analizlerine bakıldığında, HLA-DR4'ün diyabete yakınlıkta önemli rolü varken, DR3'ün bu popülasyonda her hangi bir rol üstlenmediği gösterilmiştir [1, 56]. Ülkemizde yapılan genom analizi çalışmalarında DRB1*0402 - DQA1*0301, DQB1*0302 ve DRB1*0301 - DQA1*0501, DQB1*0201 kombinasyonlarının T1D patogenezinin en çok sorumlu aleller olduğu ortaya konmuştur [60, 61]. Bütün bu veriler T1D'in toplumdan topluma değişen etiyolojik heterojenitesini kanıtlar niteliktedir.

HLA sınıf II'nin yanında HLA sınıf I'in de T1D'e olan yakınlığı etkilemektedir. HLA sınıf I molekülleri T1D'in patogenezinin başlıca sorumlu olan CD8⁺ T hücrelere antijen sunumunu gerçekleştirirler. Özellikle HLA-A24 aleli T1D'e yüksek düzeyde yakınlık etkileri vardır. HLA-A24, DR3/DR4 genotipine sahip bireylerde bulunuyorsa T1D'in erken yaşlarda gelişmesine sebep olduğu yapılan popülasyon çalışmalarında gösterilmiştir. Ayrıca HLA-B39 aleli de bireyleri T1D'e yakınlık kılan önemli HLA sınıf I aleli olup, T1D'in genç yaşta oluşumu ile ilişkilidir. [62-64]. HLA-A2 de T1D'e zemin hazırlama da önemli rol oynar. %60-70 T1D hastasının HLA-A2 alelini eksprese ettiği gösterilmiştir HLA-A2 allotipleri β hücre antijenlerine karşı oluşan otoreaktif T hücre yanıtıyla yakından ilişkili olduğu ortaya çıkarılmış ve bu amaçla HLA-A2 eksprese eden fare modelleri geliştirilerek T1D'in mekanizması araştırılmaya çalışılmıştır. HLA A,B,C alelleri DR/DQ bağımsız olarak T1D ile ilişkilendirilebildiği gibi DR/DQ bağımlı olarak da hastalık yakınlığında yer alabilirler.

Finlandiya’da A2, Cw1, B56, DR4, DQ8 haplotipi, diyabetik haplotiplerin %33’ünü oluşturmaktadır [64-66].

HLA genleri T1D’e genetik yatkınlık oluşturmalarının yanında bazı HLA haplotipleri de koruyucu özellik taşırlar. HLA-DQB1*0602, HLA-DR2 ve HLA-DR5 alelleri T1D’e karşı koruyucu alellerdir. Örneğin; HLA-DQA1*0102, DQB1*0602 haplotipini taşıyan bireyler, adacık otoantikorları pozitif olsa dahi T1D’e karşı korunmuş olurlar. DR2-DQB1*0602 haplotipi T1D’e tam bir koruma sağlarken multiple skleroz için yüksek risk teşkil etmektedir. HLA-A*01, HLA-A*11 ve HLA-A*31 koruyucu iken, HLA-A*24 T1D için risk oluşturan aleldir [7, 47, 64, 67, 68].



Şekil 2.2. Genom analizi sonuçlarına göre, Tip 1 diyabet riskinden sorumlu olduğu düşünülen genetik lokuslardan bazıları [47].

İnsülin gen polimorfizmi

HLA polimorfizminin yanında HLA dışında diyabete zemin hazırlayıcı 40'dan fazla gen bölgesi belirlenmiştir [69, 70]. T1D için, insülin (INS) gen promoter'larındaki polimorfizmler, HLA'dan sonra en fazla T1D için risk oluşturan genetik faktörlerdir. Bu bölgedeki bazı polimorfizimler timusta insülin ekspresyonunun düşmesine sebep olur. Düşük eksprese olan insülin, lenfositlerin timusta negatif seleksiyonu için yeterli düzeyde olmaz. Dolayısıyla otoreaktif T hücrelerin apoptozu veya diğer tolerans mekanizmaları gerçekleşememiş olur [71, 72].

PTPN22 gen polimorfizmi

T1D için risk oluşturan üçüncü önemli genetik faktör PTPN22 (*protein tyrosine phosphatase non-receptor 22*) genidir. Lenfoid spesifik tirozin fosfataz (LYP), PTPN22 geni tarafından kodlanır ve durağan T hücre aktivasyonunu engelleme de rol alır. Bu genin tek bir aminoasidindeki polimorfizm T hücre reseptöründeki (*T Cell Receptor: TCR*) sinyalizasyonun inhibisyonunu artırır. Bu da timusta T hücrelerin negatif seleksiyonunu azalttığı yönünde sonuca varılmıştır. Bu durum T1D de dahil birçok otoimmün hastalık risklerinin artışına sebep olmaktadır [7, 73].

CTLA-4 gen polimorfizmi

Sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte-Associated protein-4: CTLA-4*), T hücreler üzerinde eksprese olan ve T hücrelerin aktivasyonunun baskılanmasında görev alan kostimulatör reseptördür. T hücrelerin aktivasyon fazına geçebilmeleri için, T hücreler üzerindeki CD28 ile antijen sunucu hücreler (ASH) (Antigen presenting cell: APC) üzerindeki B7 molekülleri arasındaki etkileşim sonucu oluşan ikinci sinyalin gerçekleşmesi gerekmektedir. Aksine, T hücreler üzerindeki CTLA-4 ile ASH'ler üzerindeki aynı B7 molekülleri bağlandığında T hücrelerin aktivasyonu düşer ve immün cevap regüle edilir. Bu mekanizma öz antijenlere karşı periferik T hücre toleransı için gereklidir [74]. CTLA-4 genindeki aminoasitlerde nükleotid polimorfizmleri sonucu T hücre çoğalma ve aktivasyonundaki kontrol azalmış olur. CTLA-4 gen polimorfizmi ile T1D'in yakından ilişkili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir [75-77].

IL-2RA gen polimorfizmi

İnterlökin-2 reseptör alfa (İL-2RA/CD25) gen polimorfizmi birden fazla T1D ile ilişkili tek nükleotid polimorfizmleri (*SNP: single nucleotide polymorphism*) içerir [78]. İL-2RA, İL-2 reseptör kompleksinin α zincirini oluşturur ve İL-2'ye bağlanır. Regülatör T hücrelerin (Treg) çoğalması ve sağ kalımı için anahtar rol oynar. T1D hastası olan bireylerde İL2RA'nın düşmüş konsantrasyonu sonucu ligandı olan İL-2'ye az miktarda bağlanır ve Treg hücrelerin otoreaktif T hücrelerini baskılama oranı azalmış olur [79].

IFIH1 gen polimorfizmi

Helikaz C 1 domaini tarafından indüklenen interferon (*Interferon induced with helicase C domain 1: IFIH1*) veya Melanoma Farklılaşması ile ilişkili Protein-1 (*Melanoma Differentiation-Associated protein: MDA-5*) veya Helikard intrasellüler bir protein olup, viral RNA'yı tanıyarak antiviral immün cevabın oluşumunda rol alır. IFIH1 geninde birden çok tek nükleotid polimorfizmleri (SNP)'ler sonucunda, bu genin transkripsiyonunda azalma olur. Bu durumun viral enfeksiyonlarla indüklenen T1D'in patogenezi ile doğrudan ilişkili olabileceği düşünülmüştür [80, 81].

Çevresel faktörler

T1D; genler, çevre ve immün sistem üçlüsünün birbirleri ile etkileşimi sonucu ortaya çıkan multifaktöriyel bir hastalıktır. Çoğunlukla genetik yatkınlık tek başına hastalığın oluşumu için yeterli olmaz. Çevresel faktörlerle hastalığın tetiklenmesi gerekmektedir. İkizler arasındaki T1D'i geliştirme açısından uyumsuzluk çevresel faktörlerin hastalığın tetiklemesindeki rolünü kanıtlar niteliktedir [2, 82]. Genç yaşta hastalığın oluşumundaki baskın olan genetik faktörler iken, yaşlılarda daha çok çevresel faktörlerin tetiklemesi ile oluşur [1].

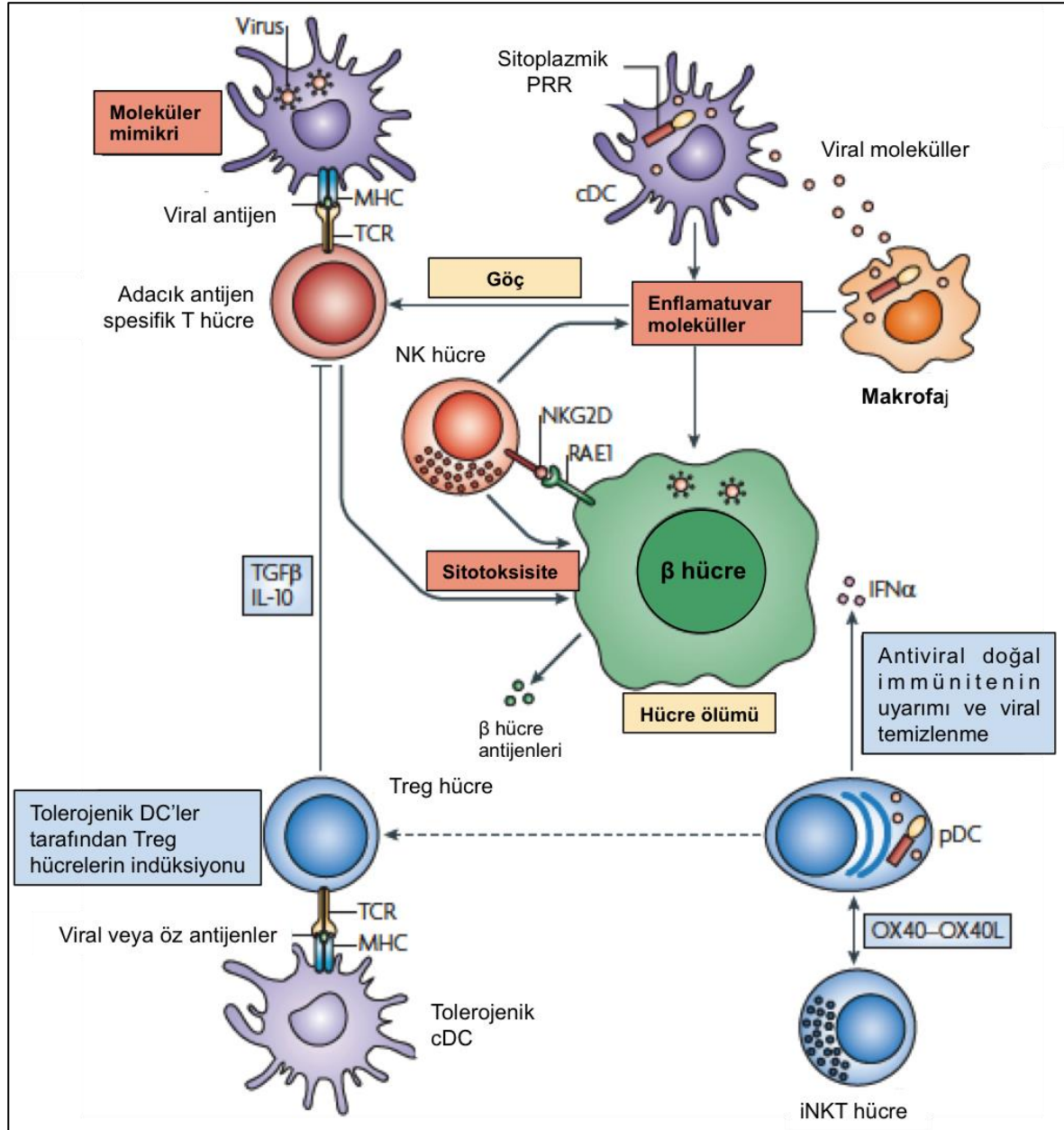
T1D insidansının, düşük insidanslı bölgeden yüksek insidanslı bölgeye göç edildiğinde arttığını gösteren birçok göçmen çalışması yapılmıştır [83]. Bu çalışmalar yaşam tarzı ve çevre değişikliklerinin, T1D riskini ne denli etkilediğini gözler önüne sermektedir. Bu durum "hijyen hipotezi" adı altında açıklanırsa, patojenlere maruz kalmayan çocuklarda

immün regülasyonun kaybı sonucu astım ve otoimmün hastalıkların görülme sıklığı artar. Bu nedenle genelde otoimmün hastalıkların insidansı Batı ülkelerinde daha çok yaygındır. Ancak bu durum maruz kalınan virüslerin otoimmüniteyi indüklemesi hipotezi ile çakışmaktadır. Bu soru işaretini açıklar nitelikte hipotezler öne sürülmüştür. Gelişmiş ülkelerde virüslere maruziyetin azalması sonucu çocuklarda koruyucu bağışıklık azalır. Genetik olarak T1D'e yatkın, bağışıklık sistemi zayıflamış çocuklar, enterovirüslere daha duyarlı hale gelir. Bu durumda otoimmünite, her iki yoldan da indüklenmiş olur [84-86].

Viral enfeksiyonlar

T1D'i indükleyen en önemli çevresel faktörlerden birisi virüslerdir. Virüsler T1D'i çeşitli mekanizmalarla indükleyebilirler. Viral yapılar ile β hücre antijenlerinin yapısal benzerliği sonucu oluşan moleküler mimikri, β hücrelerinin yancı (bystander) aktivasyon ile hasarlanması, bazı virüslerin direk olarak β hücreleri parçalayarak hasara sebep olması, virüslerin etrafa saldıdığı epitopların, Treg hücre ve T efektör hücre sayılarının arasındaki dengeyi değiştirmesi ile gerçekleşir [3, 9, 87].

Virüslerin T1D'i indüklemeye mekanizması şu şekilde özetlenebilir. Virüsler ile enfekte olan β hücrelerinin hasarlanmaları sırasında açığa β hücre antijenleri çıkar. Açığa çıkan antijenler, antijen sunucu hücreler tarafından alınarak, antijen spesifik T hücrelere sunulurlar. Bazı durumlarda virüs antijenleri ile öz antijenler moleküler benzerlik gösterdiğinden dolayı, sunulan viral antijenler, adacık antijenlerine spesifik T hücreleri aktive edebilir (moleküler mimikri). Bu sırada pankreas hasarı sonucu oluşan proenflamatuvar ortam ile doğal immün sistem hücreleri aktive olurlar ve enflamasyonun olduğu bölgeye göç ederler. Bu oluşan proenflamatuvar ortam ve antijen sunumu tekrar T hücrelerin aktivasyonunu tetikler. Virüslerin meydana getirdikleri β hücre hasarı, T hücreler ile daha da tetiklenerek devam eder. Oluşan proenflamatuvar hasar, invaryant NK hücreler, plazmasitoid dendritik hücreler, tolerojenik dendritik hücreler ve Treg hücreler tarafından çeşitli mekanizmalarla kontrol altına alınmaya çalışılır [9, 84, 88] (Şekil 2.3) .



Şekil 2.3. Tip 1 diyabette viral enfeksiyonların rolü [9]

Viral enfeksiyonlar içerisinde T1D ile ilişkilendirilen en yaygın grup enterovirüslerdir. Enterovirüslerin varlığı genellikle otoantikorlar ile birlikte görüldüğünden, otoimmüniteyi tetiklemede rolü olduğu çıkarımına varılmıştır. Enterovirüslere karşı tespit edilen antikorlar ile T1D'e karşı gelişen otoantikorların varlığı aynı bireylerde sıklıkla tespit edilmiştir. Bunun yanında T1D ve kontrol bireylerde yapılan çalışmada, diyabetik bireylerin bağırsaklarında enterovirüsler saptanırken, kontrol bireylerde virüsün varlığı gösterilememiştir. T1D hastasının pankreasından izole edilen Cocksackie virüs fareye nakledildiğinde, hiperglisemi ile beraber β hücrelerde immün sistem hücrelerinin sebep olduğu patolojik yanıt saptanmıştır. Bütün bu çalışmalar, enterovirüslerin hastalık patogeneğinde başlatıcı ve tetikleyici role sahip olduklarını göstermektedir. T1D ile ilişkilendirilen enterovirüslerin başlıcaları Cocksackie tip B-4 virüsüdür (CVB4) [89-92].

Enterovirüslerin adacık otoimmünitesinin gelişimi üzerine etkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak bu konuda fare çalışmaları doğrultusunda kuvvetli hipotezler ortaya konmuştur. Virüsle enfekte hücrelerden fazla miktarda proenflamatuvar sitokinler başlıca tip 1 ve tip 2 interferonlar (İFN) salgılanır. Hücre ve doku hasarı sonucu açığa çıkan öz (self) antijenler, ortamdaki yangısal çevre ile aktive olan ASH'ler tarafından T hücrelere sunularak, T ve B hücrelerin aktivasyon ve çoğalmasını uyarırlar. [88, 93, 94].

Enterovirüsler dışında kabakulak virüsü, sitomegalovirus, Epstein-Barr virüsü, paramiksovirus, kızamıkçık (rubella) virüsü, rotavirus ve retroviruslerin de T1D ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çoğunlukla bu virüslere ait antikorların T1D'e yatkın bireylerdeki otoantikorlarla beraber görülmesi ile bu virüslerin hastalığı indüklediği veya hızlandığı sonucuna varılmıştır. [2, 95].

Beslenme

En çok antijene maruz kalma beslenme yolu ile olur. Özellikle 3 yaşın altındaki çocuklarda oluşan T1D patogeneğinde, çevresel faktörlerin ve erken beslenme döneminin β hücre otoimmünitesinde önemli etkilerinin olduğu düşünülmektedir [96]. Süt emme süresinin uzunluğunun T1D riskini indüklediği tartışmalı ve henüz kesinlik kazanmamış bir konudur. Bazı araştırmacılar süt emme süresinin kısa olması ile β hücre otoimmünitesinin

indüklenebileceğini ortaya koymuşlardır [97, 98]. Buna karşın diğer çalışmalar, süt emme süresinin T1D riskini etkilemeyeceğini vurgulamışlardır [99, 100]. Bu çalışmalar arasındaki farklılığın sebebi olarak, farklı ülkelerde yapılan çalışmalar olduğu için ülke şartlarının çalışma sonuçlarını etkilediği düşünülebilir.

Yine benzer şekilde erken yaşlarda inek sütü içirilen genetik olarak T1D'e yatkın çocuklarda inek sütü içerisindeki bazı proteinlerin, β hücre otoimmünitesini indükleyebildiği gösterilmiştir. Bu çalışmalara karşıt olarak gösterilen bazı çalışmalarda ise inek sütünün erken beslenme döneminde T1D oluşturma açısından hiçbir risk oluşturmadığı öne sürülmüştür. Bu farklılıkların sebebi ülke ve kültürlerin yeme alışkanlıkları, çocuklara verilen öğün miktarları ve sütün yanında ek gıda verilip verilmemesi gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebildiği düşünülmüştür [2, 101]. İnek sütü içerisindeki sığır (*bovine*) insülinin, bağırsaklarda bulunan (*intestinal*) T hücrelerini sensitize ettiği, sonrasında bu T hücrelerinin insan insülini ile çapraz reaksiyon verip insülin salgılayan β hücrelerinin otoimmün yıkımında rol aldığı hipotezi öne sürülmüştür[102].

Bebeklik döneminde verilen kahvaltılık tahıl gevreğinin diyabet riskini artırdığı öne sürülmüştür. Bu gıdaların gluten içerip içermemesinin sonuçları değiştirmedeği gösterilmiştir [99, 100, 103]. Ancak fareler üzerinde yapılan çalışmada, gluten içeren besinle beslenen hayvanlarda glutensiz beslenen hayvanlara oranla daha çok T1D'in indüklendiği gözlemlenmiştir. [104]. Yine benzer bir çalışmada buğday içerikli diyetle beslenen obez olmayan diyabetik (*Non-Obese Diabetic*: NOD) farelerin proteinle beslenen farelere oranla bağırsaklarında Th1 tipi immün yanıtı indüklediği gösterilmiştir [105]. Yapılan çalışmalar doğrultusunda buğday gluteni T1D için riskli gıdalar arasında yer almaktadır. Bu nedenledir ki, T1D teşhisi konmuş hastaların %10'u çölyak hastalığı da taşımaktadır [106]. Bunun yanında çölyak hastalığındaki kronik bağırsak enflamasyonunun T1D'i indükleyebileceği düşünülmüştür [107]. Özellikle her iki hastalıkta da HLA (HLA-DR3, HLA-DQ2) yapı benzerliği olduğu için birbirlerini tetikleyebilmektedirler.

Diğer besinsel faktörler de T1D'i indükleyebilir. Bunlardan vitamin D yetmezliğinin T1D gelişimi üzerine çok önemli etkileri vardır. Vitamin D'nin immün sistem üzerinde regülatör

etkileri göz ardı edilemeyecek bir gerçektir [108]. İnsan vücudunun vitamin D sentezleyebilmesi için derinin güneşten gelen UV ışınlarına maruz kalması gerekmektedir. Bu nedenle T1D'in en çok görüldüğü ülke olan Finlandiya gibi az güneş alan Kuzey ülkelerinde Tip 1 diyabet oldukça yaygındır [109, 110]. Oral olarak vitamin takviyesi almayan çocuklarda T1D riskinin arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca çocuklara ve gebelik dönemindeki kadınlara verilen vitamin D takviyesi ile T1D'e karşı korunma sağlanmıştır [87, 111]. Balık karaciğerinin vitamin D ve omega-3 yağ asitlerinden zengin olması sebebiyle, gebelik döneminde balık karaciğeri ile beslenen kadınlarda T1D riskinin oldukça düştüğü tespit edilmiştir [112].

Otoantikörler

Adacık reaktif otoantikörlerin tespiti, devam eden otoimmün sürecin belirleyicisi olarak hastalığın tanısında en çok kullanılan yöntemdir [4, 27]. T1D'te otoantikörler başlıca 5 ana adacık otoantijenine spesifik oluşurlar. Bunlar; adacık otoantijeni (ICA), insülinoma ilişkili antijen-2 (IA-2), insülin antijeni (IA), glutamik asit dekarboksilaz 65 (GAD65) ve çinko taşıyıcı proteini 8 (*zinc transporter 8: ZnT8*) [4]. Bunlara ilaveten “adacığa özgül glukoz-6 fosfataz katalitik altünite-ilişkili protein (IGRP: *islet specific glucose-6 phosphatase catalytic subunit related protein*)”, glima-38, amilin (*amylin*)/ adacık amiloid polipeptidi (*islet amyloid polypeptide: IAPP*), ısı şoku proteini 60 (*Heat Shock Protein 60: HSP-60*) ve HSP-70, sulfatid, gangliozid, 38 kDa granül antijen, karboksipeptidaz otoantijenleri de vardır [113]. Adacık antijenlerinden insülin dışındakiler sadece β hücreye spesifik olmayıp, başka hücrelerde de eksprese edilirler. Bu nedenledir ki, diyabetik tabloda bu antijenlere karşı oluşan antikörlerden ilk ortaya çıkan IAA'dır. İkinci en yaygın otoantikör ise GAD65 antikörüdür. T1D tanısı konmuş hastaların %75-85'inde IAA ve GAD65 otoantikörleri pozitiflik gösterir. Genetik olarak T1D'e yatkın bireylerden sözü edilen her iki antikoru da taşıyan bireyler yüksek hastalık riski ile karşı karşıyadır [56, 114, 115]. Pozitif otoantikör sayısı arttıkça hastalık riski de o oranda artar. *Diabetes Prevention Trial Type-1* (DPT-1)'de T1D'in hastalarda önceden öngörülebilmesi ile ilgili yaptıkları analizde, 3 ve üzeri antikör pozitif bireylerin %50, 2 antikör pozitif bireylerin %16,1, 1 antikör pozitif bireyler %3,1, hiçbir antikör taşımayan bireylerin %0,5 hastalık riski taşıdıkları rapor edilmiştir [115, 116].

İnsülin otoantikoru (Insulin AutoAntibody: IAA)

IAA, β hücre antijenlerine spesifik olarak oluşan bir otoantikordur. İlk kez 1983 yılında Palmer ve arkadaşları tarafında yeni teşhis edilen konmuş T1D hastalarında tanımlanmıştır [117]. Genellikle çocuklarda yaygın olup, %40-50 yeni teşhis edilen T1D hastası çocukta pozitiflik gösterir [118]. Ancak tek başına IAA antikoru pozitifliği, T1D tanısı ve şüphesi için yeterli değildir. Bunun yanında ICA, GAD65 veya IA-2 antikoru da pozitifse T1D gelişmesi riski artar [115]. Genetik riske sahip çocuklarda IAA pozitifliği hayatın erken dönemlerinde başlar ve daha sonraları diğer otoantikorların da pozitif olmasıyla hasta diyabetik hale geçer [119]. Eksojen insülin enjeksiyonu yapıldıktan sonra kanda bu antikorun pozitifliğine bakılmasının bir anlamı yoktur. Enjekte edilen insüline karşı antikorlar geliştiği ve hastada sentezlenen IAA'dan ayrımının yapılamadığı için hasta insülin kullanmaya başladıktan sonra insülin antikor düzeyi kanda artmış görünür. Bu nedenle IAA düzeyi sadece ilk teşhiste önem taşır [116].

Glutamik asit dekarboksilaz otoantikoru (Glutamic acid decarboxylase autoantibody: GADA)

Glutamik asit dekarboksilaz (GAD), glutamik asidin, inhibitor bir nörotransmitter olan gama-amino butirik aside (GABA) dönüşümünü katalizleyen intrasellüler bir enzimdir. GAD65-GAD2 (65-kDa) ve GAD67-GAD1 (67-kDa) olarak iki formda bulunur [120]. Her iki form yoğun olarak sinir sisteminde bulunurken, GAD2 pankreas adacıklarının tüm hücre tiplerinde bulunur. Ancak β hücrelerdeki spesifik rolü henüz bilinmemektedir. GAD65, 585 aminoasitten oluşan bir polipeptittir [120]. Yeni teşhis edilmiş T1D hastalarında %70-80 oranında GADA pozitifliği görülür [116]. GADA, genelde anti-IA-2 otoantikorları birlikte bulunur. Yeni teşhis edilmiş veya prediyabetik hastaların %90'ında GADA ve IA-2 antikoru birlikte bulunur [121]. Ayrıca GADA pztifliği hastalarda uzun süreli kalıcılık gösterir. Bu nedenle LADA hastalarının tanısında en çok bakılan antikor tipi GADA'dır [122].

Adacık hücre otoantikoru (Islet Cell Autoantibody: ICA)

1974’de donmuş pankreas dokularından elde edilen ilk antikordur [123]. Yeni T1D tanısı almış beyaz ırktan çocukların %70-80’inde ICA pozitifliği tespit edilir. Ancak zaman içerisinde bu pozitiflik yüzdesi azalma gösterir [124]. Diyabetik olmayan bireylerde ICA titresi yüksek ise diyabet gelişme riski de yüksektir. Eğer yeni teşhis edilmiş T1D hastalarının yüksek ICA titreleri varsa, bu durum c-peptid salgılanmasının çok hızlı bir şekilde kaybolacağına işaret eder [1].

İnsülinoma ilişkili 2 otoantikör (IA-2A, ICA512)

Endokrin ve nöroendokrin dokularda bulunan tirozin fosfataz-benzeri protein ailesine ait transmembranöz bir protein olan IA-2 antijenine karşı oluşmuş otoantikörlerdir. IA-2’nin otoreaktif epitopları C-terminalin intrasellüler kısmında olduğu için bu bölgeye immün reaktivite gelişir [125]. IA-2 ve IA-2 β olmak üzere iki gruba ayrılır. Yeni tanı almış T1D hastalarında ICA veya GADA’ya oranla daha az oranda IA-2A antikörleri (yaklaşık %60) tespit edilir [126].

Çinko taşıyıcı (Zinc transporter 8:ZnT8) otoantikoru

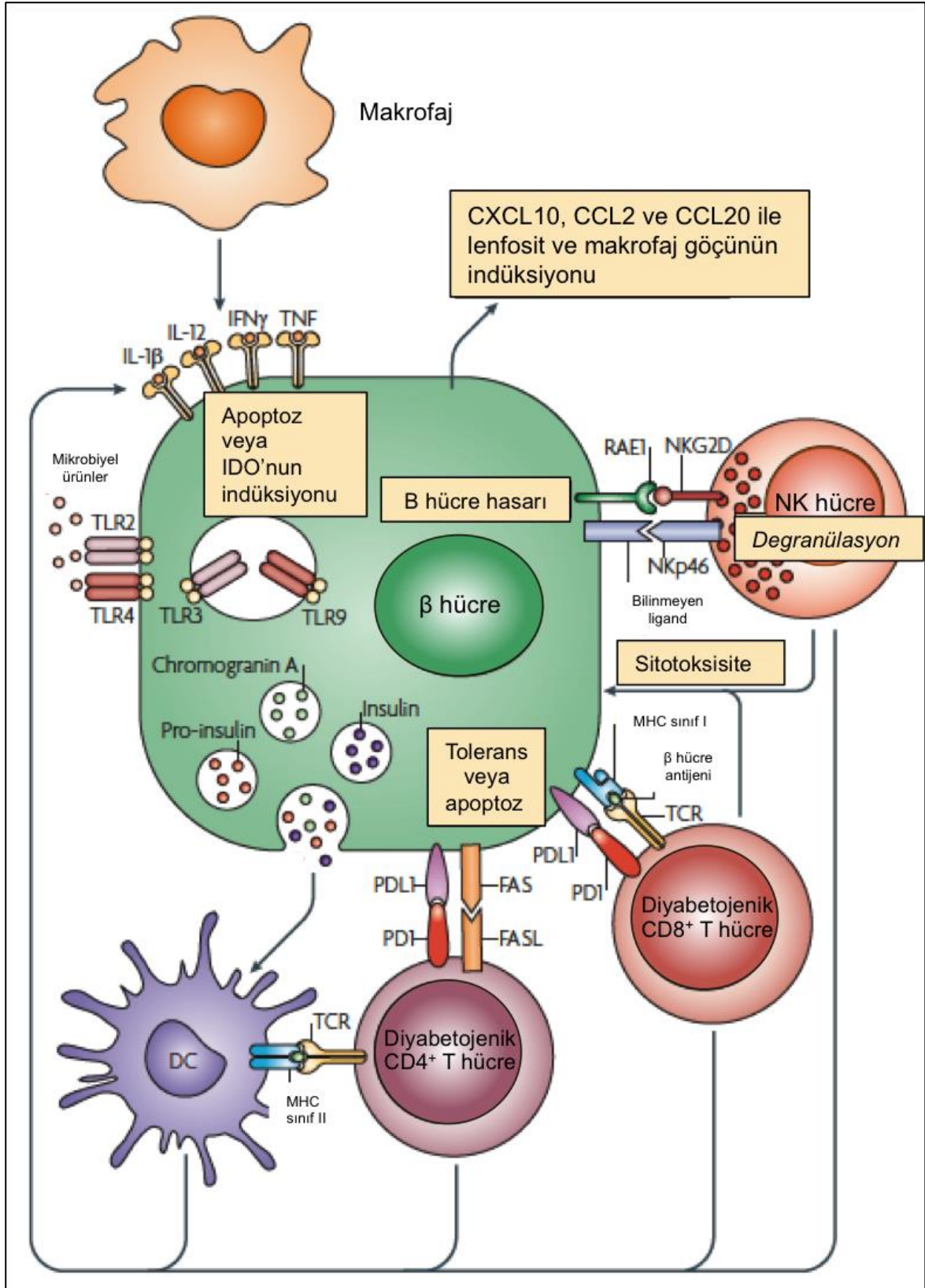
İlk kez 2007 yılında tanımlanan ZnT8 (Slc30A8), transmembranöz bir protein olup spesifik olarak insülin salgılayan β hücrelerinden eksprese edilir [127, 128]. ZnT8’in görevi, çinkoyu (Zn^{2+}) sitoplazmadan insülin sekreter granüllerinin içerisine taşımaktır. Daha sonra insülin ile kompleks bir yapı meydana getirerek insülin kristallerini oluştururlar [56]. Yeni teşhis edilmiş T1D hastalarının %60-80’i anti-ZnT8 otoantikörünü taşır. Diğer otoantikörlerden hiçbirisi pozitif olmayan T1D hastalarının %26’sında anti-ZnT8 otoantikoru tespit edilebilir [127]. T1D’in klinik olarak ortaya çıkışından sonra anti-ZnT8 otoantikoru hızlı bir şekilde azalır [129]. Genetik yatkınlığı olan bireylerde anti-ZnT8 ile beraber iki veya daha fazla otoantikör pozitif ise; kişide T1D riski yüksek demektir [130, 131].

2.1.5. Tip 1 diyabette efektör mekanizmalar

T1D, öze karşı toleransın kaybedilmesi sonucu, başta T hücreler olmak üzere diğer immün hücrelerin de iştirakiyle Langerhans adacıklarındaki pankreas β hücrelerinin selektif olarak hasarlanması ve yok edilmesi ile ortaya çıkan bir hastalıktır. β hücre hasarlanmasından en fazla sorumlu olan hücre tipi $CD8^+$ T lenfositlerdir [18, 132]. Bunun yanında $CD4^+$ T lenfositler, B lenfositler ve makrofajlar da immünolojik yıkımdan sorumlu olan önemli hücre tipleridir. Ayrıca başlangıçta pankreas lenf düğümlerinde antijen sunarak olaylar zincirinin başlamasına sebep olan dendritik hücreler (*Dendritic Cell*: DC) de immün patogeneze çok önemli bir role sahiptir [133]. Bunların dışında doğal öldürücü (NK) hücreler ve doğal öldürücü T hücreler (NKT) gibi doğal (*innate*) immün sistem hücreleri ve çözünür (*soluble*) mediatörler de pankreas dokusundaki olaylar zincirine katkıda bulunurlar (Şekil 2.4).

Adacıklarda virüsler veya fizyolojik nedenlerden dolayı gerçekleşen β hücre ölümü ile salgılanan antijenler, DC'ler tarafından yakalanarak diyabetojenik T hücrelerin indüksiyonu gerçekleşir. Bunun yanında β hücreler doğrudan $CD8^+$ T hücrelere de antijen sunumunu gerçekleştirebilmektedir. $CD4^+$ T lenfositler sitokinler salgılayarak oluşan patolojiye katkıda bulunurlar. $CD8^+$ T hücreler ise Fas-FasL aracılığıyla veya perforin ve granzimleri ile β hücrelerin apoptozuna sebep olurlar. Benzer şekilde NK hücreler de yüzeylerinde eksprese ettikleri NKG2D gibi aktivatör reseptörler aracılığıyla β hücrelere bağlanarak doğrudan apoptotik etkilerini gösterirler. Bu sırada viral enfeksiyonlar veya oluşmuş olan stres faktörleri sebebiyle makrofajlar, DC'ler, NK hücreler, T lenfositler gibi immün hücrelerden $IL-1\beta$, $IFN\gamma$, $IL-12$ ve tümör nekroze edici faktör- α (TNF- α) gibi sitokinler salgılanır. Bu sitokinler β hücreler üzerindeki reseptörlerine bağlanarak direk olarak β hücrelerinin apoptozuna veya yangısal cevabın daha da artmasına sebep olabilmektedir. Sitokinlerin yanında salgıladıkları kemokin sınıfı sitokinler ile, makrofajları ve diğer immün hücreleri adacık bölgesine çağırırlar. Böylelikle oluşan patoloji artarak devam eder [9, 11, 134].

Patolojik olayların yanında oluşan immünolojik olayları dengeleme ve baskılama amacıyla bazı immün hücre grupları da enflamasyon bölgelerine göç ederler. Ancak immünite ve tolerans arasındaki dengede patolojik immünitenin ağır basması ile pankreatit tablosu gelişir [9].

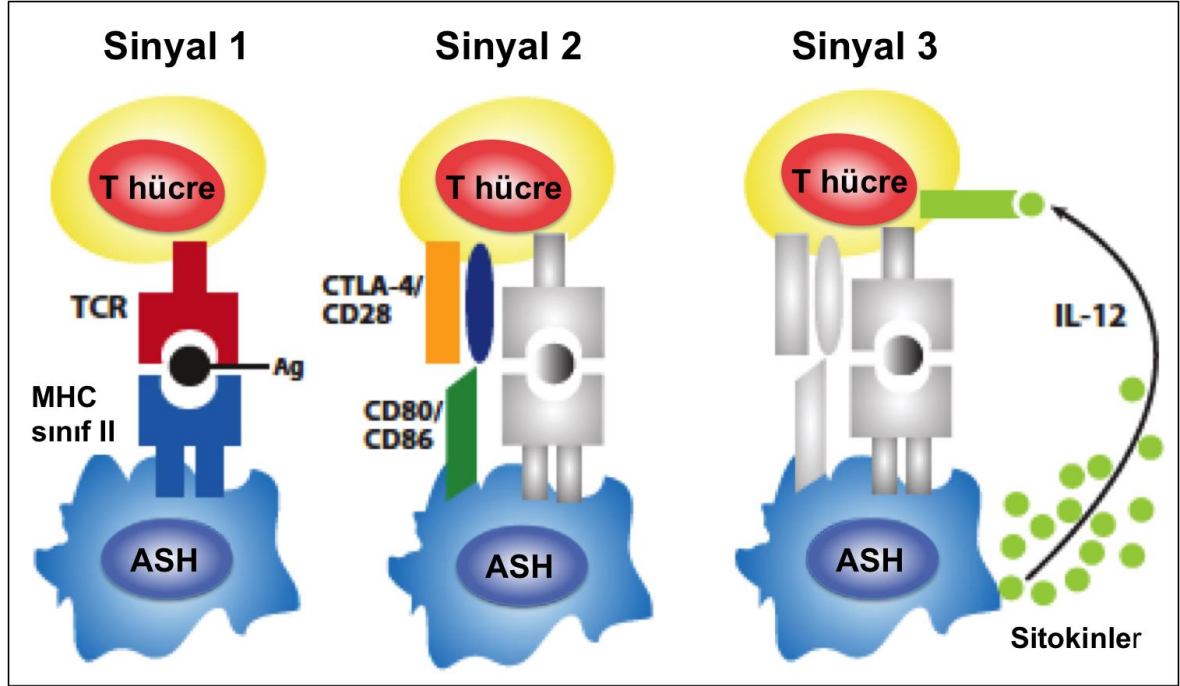


Şekil 2.4. Pankreas β hücre patolojisinin immünolojik mekanizmaları [9]

T lenfositler

T1D'in gelişimi ve ilerlemesindeki en büyük rol T hücrelere aittir. Hem hayvan modellerinde hem de insan pankreas infiltratlarında baskın olarak T hücrelerin varlığı yapılan birçok çalışmayla kuvvetle kanıtlanmıştır [132, 135-137]. NOD farelerde, diyabetik farelerden alınan $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin singenik farelere nakledilerek T1D'in gelişmesi, ancak sadece bir hücre grubu nakledildiğinde T1D'in oluşmaması; her iki hücre grubunun da T1D patolojisindeki önemini vurgular niteliktedir [138]. Bunun yanında T1D hastalarının kanından otoreaktif T hücrelerinin izole edilebilmesi ve T hücreyi baskılar nitelikte yapılan terapötik yaklaşımlarla hastalığın ilerlemesinin azalması; T hücrelerin bu hastalıktaki birincil rollerini ortaya koymaktadır [18].

T lenfositlerin aktive olabilmeleri için otoantijenik proteinlerin öze-reaktif T hücrelere Sınıf I MHC veya Sınıf II MHC molekülleri aracılığıyla sunulmaları gerekmektedir. Sınıf I MHC molekülleri bütün çekirdekli hücrelerde eksprese edilirken, sınıf II MHC molekülleri ASH hücreler olan dendritik hücreler, makrofajlar ve B lenfositlerden eksprese edilir. T hücre aktivasyonu için 3 sinyalin de sağlanması gerekir (Şekil 2.5). (a) Bunlardan birincisi T hücre üzerindeki T hücre reseptörü (*T cell receptor*: TCR) ile uygun peptid-MHC kompleksinin etkileşimi ile oluşur. (b) İkinci sinyal, T lenfositler üzerindeki CD28 molekülü ile ASH'ler üzerindeki CD80 veya CD86'nın etkileşimi sonucu gerçekleşir. İkinci sinyal birinci sinyali desteklediği ve aktivasyonun meydana gelmesi için destek sağladığı için "kostimülasyon" olarak isimlendirilir. T hücreler üzerinde CD28 ile yarışmalı olarak B7 moleküllerine bağlanabilen CTLA-4 ise T hücrelerin aktivasyonunun inhibisyonundan sorumludur. (c) Üçüncü sinyal ASH'ler tarafından salgılanan İL-12 gibi sitokinlerdir. Bu sitokinler T hücrelerinin aktivasyonu ve farklılaşması için son adımdır [139].



Şekil 2.5. T hücrelerin aktivasyonu için gerekli olan üç sinyal hipotezi [139].

ASH'ler tarafından fagosit edilen antijenler işlenir ve uygun peptid parçalarına ayrılarak yüzeylerinde Sınıf II MHC molekülleri aracılığıyla $CD4^+$ T lenfositlere sunulur. $CD4^+$ T hücreler yüzeylerinde eksprese ettikleri CD40L aracılığıyla ASH'ler üzerinde eksprese edilen CD40 molekülüne bağlanarak ASH hücreleri aktive ederler. Aktive olmuş ASH hücreler işlemiş oldukları antijenleri yüzeylerinde Sınıf I MHC aracılığıyla $CD8^+$ T hücrelere çapraz sunarak, $CD8^+$ T hücrelerin sitotoksik T lenfositlere (*Cytotoxic T Lymphocytes*: CTL) dönüşümünü indüklerler [139-141].

$CD8^+$ T hücre aracılı β hücre ölümü çeşitli mekanizmalar ile gerçekleşebilir. $CD8^+$ T hücreler, hedef hücrelerden eksprese edilen peptid-Sınıf I MHC kompleksini tanıyarak sitotoksik hasarı başlatırlar. $CD8^+$ T hücrelerin aktive olabilmeleri için mutlaka Sınıf I MHC ve kostimulatör moleküllere bağlanmaları gereklidir. NOD farelerde $CD8^+$ T lenfositlerin ve Sınıf I MHC moleküllerinin yokluğunda diyabetin gelişmediği, β hücrelerde Sınıf I MHC genetik olarak yok edildiğinde ise diyabet gelişiminin oldukça düştüğü, farelerin hiperglisemi geliştirmedeği gözlemlenmiştir [142, 143]. İkinci mekanizma olarak doku spesifik antijenler DC'ler tarafından alınarak işlenir, Sınıf I MHC aracılığıyla çapraz sunumla $CD8^+$ T lenfositlere sunulur [144]. $CD8^+$ T hücreler aktive olarak CTL'lere dönüşürler. Daha sonra salgıladıkları interferon gama ($IFN-\gamma$) ile, β hücrelerinden ölüm reseptörü olan FAS

(CD95)'in ekspresyonunu ve diğer bazı kemokinlerin salınımını indüklerler [9]. CTL üzerindeki FAS-Ligand (FAS-L/CD95-L), β hücreler üzerindeki FAS ile bağlanarak β hücrelerinin apoptozunu başlatır [145]. Bunun yanında CTL'ler, perforin ve granzim içeren sitotoksik granüllerini hücre üzerine bırakarak da β hücrelerini öldürürler [146]. Perforin hücre membranında por açarak, granzim ve diğer sitotoksik moleküllerin içeri girmesini sağlayan granül komponentidir. Granzim ise hücre içerisine reseptör, endositoz veya perforin aracılığıyla girebilen ve hücre içerisinde bir dizi reaksiyonunu başlatarak hücreyi apoptoza sokan bir enzimdir [147].

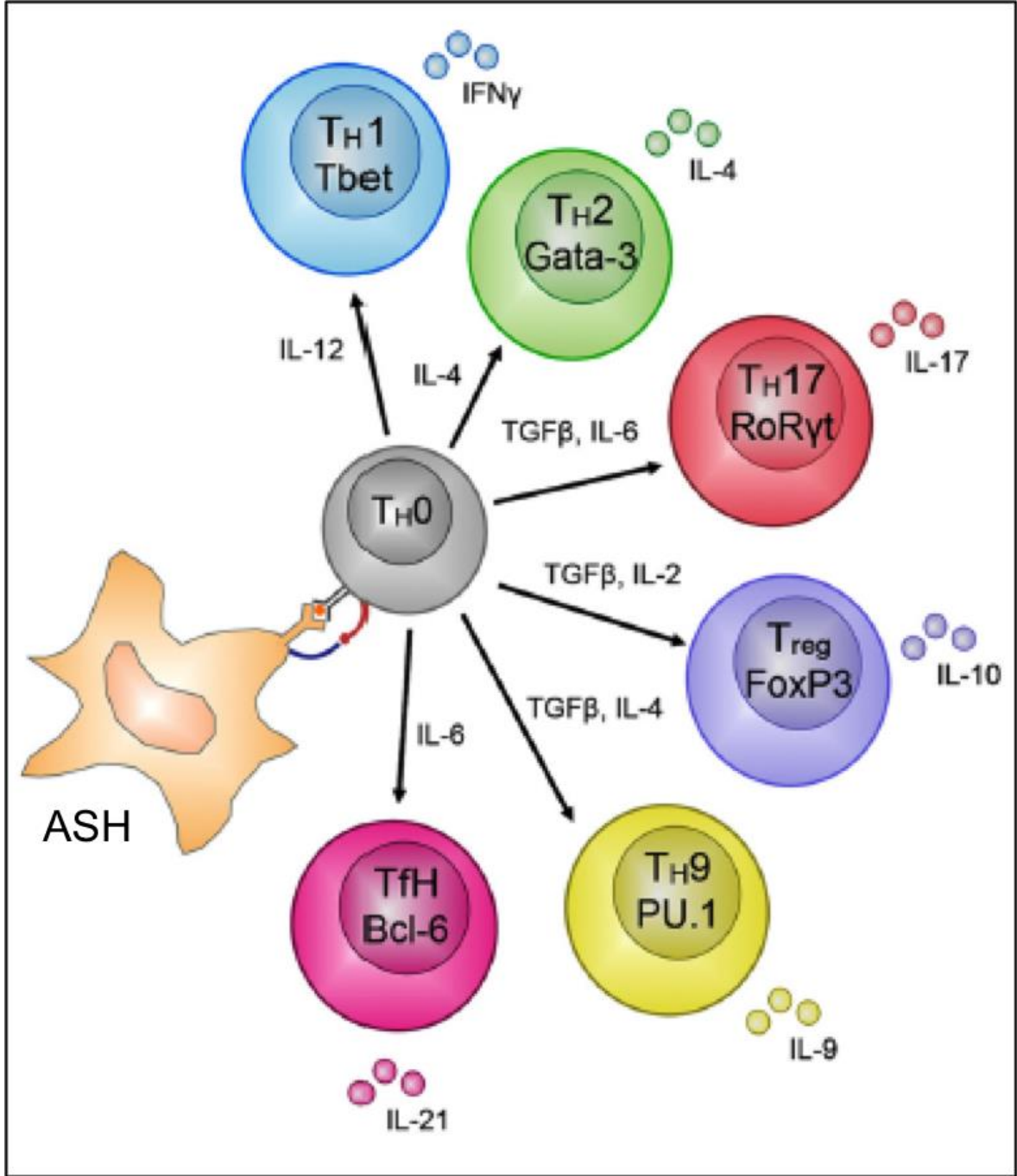
$CD4^+$ T lenfositlerin de β hücre ölümünde önemli rolleri vardır. NOD farelerde $CD4^+$ T lenfositlerin anti CD4 antikoru ile yok edilmesiyle hastalığın ortaya çıkışı gerilemiştir [148]. Antijen sunucu hücreler tarafından uygun MHC-peptid kompleksiyle karşılaşan naif $CD4^+$ T hücreler bölünmeye ve farklı efektör T yardımcı (Th) hücre alt gruplarına polarize olmaya başlarlar (Şekil 2.6). $CD4^+$ T hücrelerin başlıca alt grupları; Th1, Th2, Th17 ve Treg hücrelerdir. Bu farklılaşma ortamdaki ASH'lerin sunduğu antijen tipi, salgıladıkları sitokinler ile ortamdaki enflamasyonun şekli ve sitokin yoğunluğuna göre gerçekleşir [149].

Naif $CD4^+$ T hücrelerin Th1 yönüne farklılaşmaları için ortamda yüksek miktarda İL-12 ve İFN γ 'nın olması gerekmektedir. Th2 yönünde farklılaşmanın olması için İL-4 tarafından indüklenmesi, Th17 farklılaşması için ise İL-6, İL-21 ve transforme edici büyüme faktörü (*Transforming Growth Factor*: TGF)- β 'nın sağlanması gerekmektedir. Aktive olan Th hücreler, ekstrasellüler sinyaller alarak transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu indükler, bu da Th hücrelerin farklılaşmasını sağlar. İL-12/İFN γ , T-bet (*T-box transcription factor*) transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu indükleyerek T hücrelerin Th0 fazından Th1 fazına farklılaşmasına yol açarlar. İL-4 sitokini, GATA bağlayıcı protein-3 (*GATA binding protein-3*: GATA-3) transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu, İL-6/İL-21/TGF- β sitokinleri ise ROR γ T (*RAR-related orphan receptor gamma T*) transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu indükleyerek istenilen yönde farklılaşma sağlanır. Farklılaşan Th hücrelerin her birinin salgıladıkları sitokinler farklılık gösterir. Th1 hücreler; İL-2, İFN- γ ve TNF- α salgılayarak intrasellüler savunmada, otoimmünitede ve anti-tümör cevabında gerekli olan hücresel immüniteyi sağlarlar. Th2 hücreler; İL-4, İL-5 ve İL-13 üreterek ekstrasellüler savunmada gerekli olan humoral immüniteyi artırır. Th17 hücreler; İL-17A, İL-17F, İL-22 sitokinlerini salgılayarak bazı enfeksiyonlara karşı koruma sağlarlar. Ayrıca birçok otoimmün hastalık patolojileriyle ilişkilendirilirler [149-153]. Treg hücrelerin

farklılaşması ve efektör fonksiyonları, T1D'in regülatör mekanizmaları bölümünde ayrıntılı olarak anlatılmaktadır.

CD4⁺ T lenfosit alt gruplarından özellikle Th1 ve Th17 hücrelerin patolojiyi artırma ve destek olma rolleri gösterilmiştir. T1D patogeneğinde Th1 lenfositlerin en önemli görevi sitokin salgılayarak oluşan patogeneze katkıda bulunmaktır. Bunun yanında CD8⁺ T hücreleri ve diğer doğal immün sistem hücrelerini de indüklerler. ASH'lerin Sınıf II MHC aracılığıyla antigen sunumunu takiben Th1 hücreler yüksek düzeyde İFN- γ salgırlarlar. CD4⁺ T hücrelerin salgıladıkları İFN- γ 'nın, T1D'in indüklenmesinde çok önemli bir yeri vardır. Öyle ki, NOD farelerde İFN- γ 'nın bloke edilmesiyle T1D indüksiyonunun tamamen ortadan kalktığı gözlemlenmiştir [154]. İFN- γ , özellikle makrofajların bölgeye göçü ve aktivasyonu için çok önemlidir. Aktive olan makrofajlar İL-1 β ve TNF- α salgırlarlar [13, 132, 155]. Ortaya çıkan bu sitokin kokteyli (İFN- γ , TNF- α , IL-1 β), β hücrelerde reaktif oksijen radikallerinin ekspresyonunu indükleyerek β hücreleri apoptoza sürüklerler. β hücreler üzerinde eksprese olan İL-1 reseptörünün ligandıyla bağlanması sonucunda da β hücrelerde apoptoz indüklenebilir [9]. Th0 hücreler Th1 yönüne farklılaştığında Th2 hücre popülasyonu üzerine kısmen inhibisyon gelişir. Th2 hücrelerin T1D üzerinde baskılayıcı özelliklerinin olduğu bildirilmiştir. Bu özelliklerini İL-4 ve İL-10 salgılayarak var olan patolojiyi giderme amaçlı uygularlar. Salgıladıkları sitokinler Th1 aktivasyonunu baskılar. Ancak Th1 ve Th2 arasındaki inbalans sonucu T1D patolojisi gelişir [156]. Th2 hücrelerin T1D üzerine fonksiyonları T1D'in regülatör mekanizmaları bölümünde anlatılmaktadır.

T1D hastalarının periferik kanlarında sağlıklı insanlara oranla Th17 hücre sayısının çok daha fazla olup çoğaldıkları gösterilmiştir. Th17 hücrelerinin β hücre otoantijenlerini tanıyarak İL-17 salgılamasının hastalığın gelişiminde çok önemli etkisinin olduğu vurgulanmıştır [157, 158]. Th17 hücrelerin salgıladıkları IL-17, diğer proenflamatuvar sitokinlerle sinerjik etki oluşturarak, β hücrelerinin apoptozunu indüklemektedir [157, 159]. Ancak anti İL-17 antikoru kullanılarak, İL-17 salınımı bloke edildiğinde hastalık oluşumunun önlenmediği sadece pankreastaki yangının kısmen azaldığı görülmüştür. Bunun sebebi olarak da CD4⁺ T hücrelerinin Th17 yerine Th1 yönünde farklılaşarak İFN- γ salgılama yolu ile patolojiye neden oldukları öne sürülmüştür [160].



Şekil 2.6. CD4⁺ T yardımcı hücre alt gruplarının farklılaşması [149].

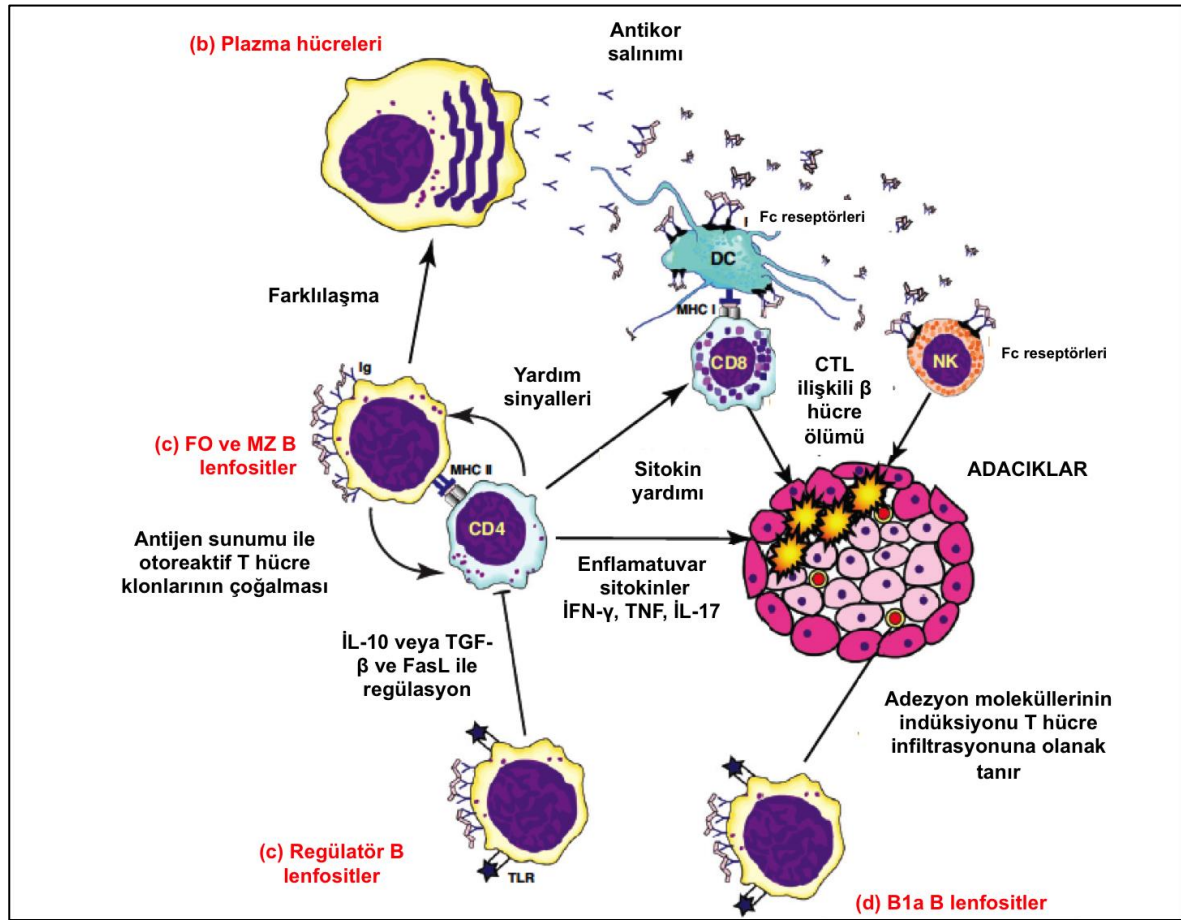
B lenfositler

T1D hastalığı T hücre kaynaklı bir hastalık olmasına rağmen, B lenfositlerin de bu hastalık üzerinde patolojik rolleri vardır. T1D’te B lenfositlerin rolü ilk kez NOD farelerde gösterilmiştir. İmmünoglobulinlerin (İg) μ zincirini kodlayan gende yapılan mutasyonlar veya farelerin anti İgM antikoruna uzun süre maruz bırakılması ile B hücreler yok edilmiş, bu farelerin T1D’e karşı korundukları gözlemlenmiştir [161, 162]. NOD farelerde, CD20’ye bağlanan monoklonal antikor verilerek B hücre deplesyonu yapıldığında ise bu farelerin uzun süre T1D’e karşı korunduğu ve bazı hayvanlarda oluşan hipergliseminin düzeldiği saptanmıştır [163, 164]. Tüm bu veriler B hücrelerin, β hücre patolojisinde destekleyici rollerinin olduğunu göstermektedir.

Otoantijenler, B hücreler üzerindeki İg’ler tarafından yakalanır. B hücreler yakaladıkları antijenleri İg’ler ile birlikte endositozla hücre içine alır ve Sınıf II MHC molekülleri ile naif $CD4^+$ T lenfositlere sunarlar. B ve T hücrelerin aktivasyonları birbirlerine bağımlıdır. $CD4^+$ T hücreler, yüzeylerindeki CD40L aracılığıyla B hücreler üzerindeki CD40 molekülüne bağlanarak B hücrelere yardımcı sinyallerini iletirler. Bunun yanında üçüncü sinyal olarak da İL-4 ve İL-5 salgırlar. Sitokin ve CD40/CD40L bağlanması ile B hücrelerin aktivasyonu, farklılaşması ve çoğalması indüklenir [165, 166].

Aktive olan B hücreler, yüzeylerinde B7 moleküllerinin ekspresyonunu ve sitokin salınımını artırır. B7 molekülleri, T hücreler üzerindeki CD28 moleküllerine bağlanarak $CD4^+$ T hücrelerin aktivasyonu için kostimulatör reseptör bağlanmasını sağlamış olur. Bu bağlanma ve sitokin desteği sonucunda $CD4^+$ T hücreler aktive olarak çoğalır, farklılaşır ve yangısal sitokinler salgılayarak, β hücrelerinin apoptozunu ve $CD8^+$ T hücrelerinin farklılaşmasını indüklerler. Bu arada aktive olan B hücreleri plazma hücrelerine farklılaşarak, β hücre spesifik otoantikorlar salgırlar. Otoantikorlar otoantijenlerle kompleks bir yapı oluştururlar. NK ve DC hücreler üzerinde bulunan Fc gama reseptörü (Fc γ R), oluşan kompleksteki antikorun Fc kısımları ile bağlanır. Bu bağlanma sonucu antikor bağımlı hücrel sitotoksikite (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity: ADCC*) başlamış olur. Yani NK hücreler, perforin ve granzim içeren sitotoksik granüllerini β hücreler üzerine salarak hücreyi apoptoza sürüklerler. DC’ler antijen-antikor kompleksini

endositoz yolu ile hücre içine alarak, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücreleri aktive ederler. Ayrıca, peritoneal B1a ($CD5^+$) B hücreler hastalığın ilk aşamasında pankreası infiltre ederek patolojiye katkıda bulurlar. T hücre infiltrasyonunu indükleyecek adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indüklerler. Bunun yanında bazı proenflamatuvar sitokinler salgırlar (Şekil 2.7) [165-167]. B hücrelerin T1D patogenezini indüklemenin yanında regüle etme fonksiyonu da vardır. B hücrelerin regülatör etkileri T1D'in regülatör mekanizmaları bölümünde anlatılacaktır.



Şekil 2.7. B lenfositlerin Tip 1 diyabet patogenezinde efektör ve regülatör fonksiyonları [165]

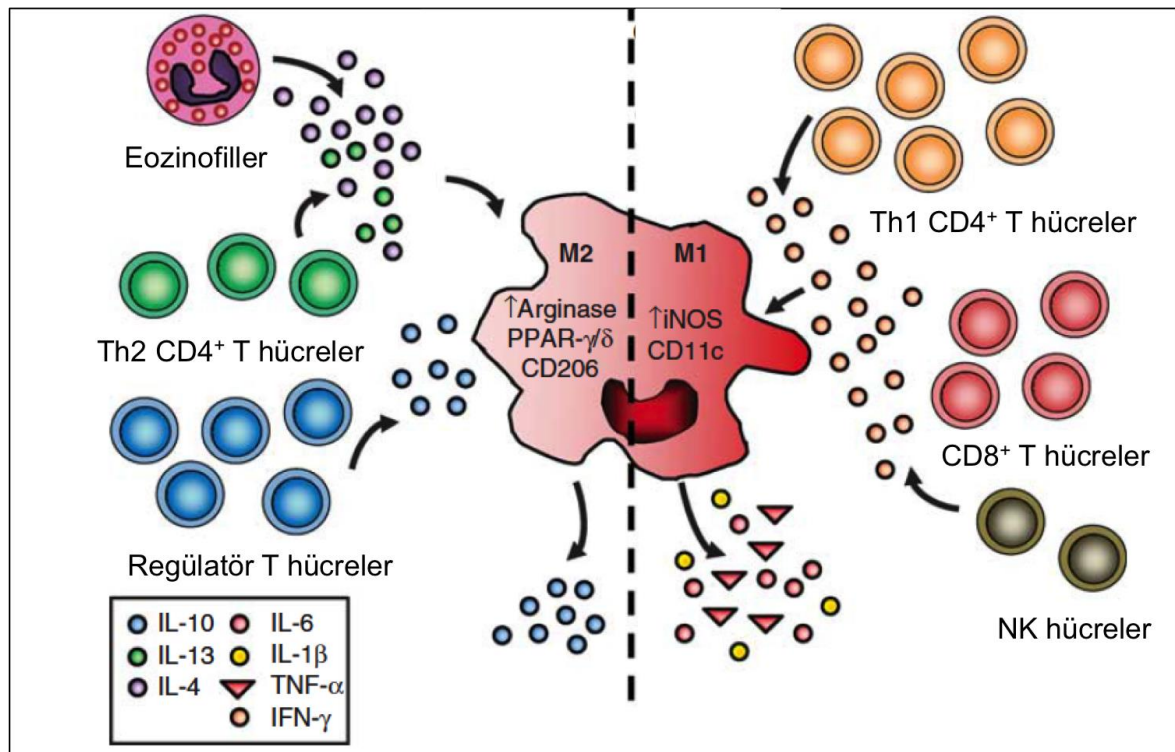
Makrofajlar

T1D hastalığının patogeneğinde T hücrelerinin anahtar rollerinin yanı sıra, bu etkinin ortaya çıkmasında yardımcı olan edinsel ve doğal immün sistem etkileşimi önemli bir yer tutar [168]. T1D ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda NOD farelerin diyabetik pankreaslarında makrofajların yüksek düzeyde infiltrasyonu gösterilmiş, makrofajlar yok edildikten sonra ise hastalık gelişiminin önlendiği gözlemlenmiştir [169]. Makrofajların T1D'e olan etkilerini daha çok sitokin salgılayarak meydana getirdikleri birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Özellikle ürettikleri İL-12'nin CD8⁺ T hücreleri aktive ederek farklılaşmalarına sebep olduğu, dolayısıyla CD8⁺ T hücrelerden kaynaklanan en büyük patolojiye destek oldukları ortaya konmuştur [168]. Diyabetik fareler non-diyabetik farelerle kıyaslandığında, uyarım sonrası makrofajların yüksek düzeyde İL-12, İL-1 β ve TNF- α salgıladıkları gözlemlenmiştir [170]. Makrofajların salgıladıkları İL-1 β , TNF- α ve reaktif oksijen radikallerinin β hücreler üzerinde apoptotik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir [171, 172]. T1D hastalarının pankreas adacık infiltratlarında İL-1 β ve TNF- α üreten makrofajların varlığına rastlanmıştır [173]. Tüm veriler, T1D'in başlaması ve gelişiminde makrofajların patolojik rollerini ortaya koyar niteliktedir.

Makrofajların doğal ve edinsel immün cevapta ve doku hemostazında çok önemli rolleri vardır. İmmün sistemde; fagositoz, apoptotik ve nekrotik hücrelerin ortamdan temizlenmesi, antimikrobiyel savunma gibi fonksiyonlar üstlenirler. Bunun yanında Sınıf II MHC ekspresyonu ve sitokin salgısı yaparak CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerin aktivasyonunda ve CD4⁺ T lenfositlerin alt gruplarına farklılaşmalarında çok önemli rol oynarlar. Makrofajlar; klasik aktive makrofajlar (M1, CAM) ve alternatif aktive makrofajlar (M2, AAM) olarak iki gruba ayrılırlar (Şekil 2.8) [174, 175]. M1 makrofajlar, proenflamatuvar sitokinler ve ROS'lar üreterek intrasellüler patojenlere yanıtta görev alırlar. Tip diyabette, pankreas β hücre hasarı ve pankreatit tablosunun gelişmesine sebep olan yangısal cevabı artırır. Th1 CD4⁺ T lenfositler, CD8⁺ T lenfositler ve NK hücrelerden salınan İFN- γ , makrofajların klasik yönde aktive olmalarını indüklerken, Th17 hücreleri de benzer şekilde makrofajların tip 1 yönünde farklılaşmalarına etki eder [174-176]. Ortamdaki İFN- γ ve hasarlanan β hücrelerinden üretilen CCL2 (*CC-chemokine ligand 2*), CCL20, CXCL10 (*CXC-chemokine ligand 10*) kemokinleri, M1 makrofajların adacık bölgesinde toplanmalarına sebep olur. M1 makrofajlardan üretilen TNF- α , İL-1 β , İL-12 ve kostimulatör ekspresyonu ile T

hücrelerin aktive olması indüklenirken aynı zamanda salgıladıkları sitokinler, nitrik oksit (NO) ve ROS'lar ile β hücrelerinin doğrudan apoptoza girmesine sebep olurlar [9, 134, 176].

Alternatif aktive makrofajlar ise regülatör fonksiyonlar göstererek pankreastaki enflamasyonu azaltmaya yönelik çalışırlar. M2 makrofajlar helmint enfeksiyonları veya alerjik reaksiyonlar gibi Th2 tipi immün yanıtlarda indüklenirler. Bu nedenle hijyen hipotezinden yola çıkılarak helmint enfeksiyonlarının T1D üzerine koruyucu etki gösterdiği ortaya konmuştur [177-179]. IL-4, IL-13 sitokinlerinin IL-4R α 'ya bağlanması sonucu makrofajlar tip 2 yönüne farklılaşırlar. Pankreasta oluşan insülitis ve enflamasyon tablosunu azaltmak amacıyla IL-10 ve TGF- β salgırlar. Bunun haricinde yüzeylerinde eksprese ettikleri programlanmış ölüm ligandı 1 (*programmed death ligand 1: PDL-1*) ve PDL-2 molekülleri aracılığıyla T hücreler üzerindeki PD-1 ve PD-2 reseptörlerine bağlanarak otoreaktif T hücrelerinin baskılanmalarını indüklerler [174, 180, 181].



Şekil 2.8. Ortamın enflamatuvar yanıtına bağlı gelişen makrofaj polarizasyonu. [182].

Dendritik hücreler

Dendritik hücreler; antijenin alınması, taşınması, işlenmesi ve T hücrelere sunulmasında çok büyük rol oynayan heterojen bir gruptur. Doğal ve edinsel immün sistem arasında köprü vazifesi gören, miyeloid projenitör hücrelerden köken alan profesyonel antijen sunucu hücrelerdir. Salgıladıkları sitokinler ve antijen sunumu ile T hücre aktivasyonunda rol oynayan en önemli hücre grubudur. Yabancı antijenlere karşı immün sistemin yangısal cevabını, öz antijenlere karşı ise tolerans mekanizmalarını indükleyerek işlev gösterirler [183-185]. Birçok dokuda immatür ve matür formlarda olmak üzere çok yaygın bir dağılım gösterirler.

İmmatür DC'ler; makropinositoz, antijen-antikör komplekslerini reseptör ilişkili endositoz veya tüm organizma veya hücreyi fagositoz yöntemlerini kullanarak antijenik yapıları içerisine alan endositik karakter gösteren hücrelerdir. DC hücrelerin bu formu daha çok antijenlerin yakalanması ve hücre içine alınması (internalizasyonu) için yapılanmıştır. Sınıf II MHC ve kostimulatör ekspresyonu oldukça düşüktür [186]. Buna karşın antijen tanımda rol alan Toll benzeri reseptörler (*Toll-like receptor: TLR*), C-tip lektin reseptörleri (CLR), retinoik asit benzeri reseptörler (*Retinoic acid-like receptor: RLR*), intrasitoplazmik nükleotid-oligomerizasyon domain benzeri reseptörler (NLRs), *scavenger* (çöpçü) reseptörler gibi patern tanıma reseptörleri yüksek düzeyde eksprese edilir. Bu dönemde kemokin reseptörü ve FcR (Fc reseptör) ekspresyonları da artar. Uyarılara ve çevreden gelen immün yanıtlara cevap verebilme adına birçok sitokin reseptörünün de yüksek düzeyde ekspresyonu görülür. Eksprese ettikleri tüm bu reseptörler T hücreleri aktive etmek için yeterli değildir, bunun için mutlaka matür (olgun) forma geçmeleri gerekir [176, 187].

Matür DC'ler T hücreler tarafından immünolojik olarak görülebilecek ve T hücre aktivasyonunu başlatabilecek hücre yüzey reseptörleri eksprese ederler. DC'ler, olgunlaşmaya başladıklarında antijen reseptörlerinin ekspresyonu ile makropinositoz ve fagositoz azalarak antijen alımı sınırlanır. Sınıf I ve Sınıf II MHC antijenlerinin ekspresyonu ve yarılanma ömrü artırılarak CD8⁺ ve CD4⁺ T lenfositlere etkili sunum yapabilme yetisi geliştirilir [186]. Bu dönemde yüksek düzeyde İL-1, İL-6, İL-10, İL-12, İL-23, TNF- α , CCL17,

CCL12, CCL19 ve CCL22 gibi sitokin ve kemokin salgılanması görülür. Bunun yanında CD80, CD86, CD40, CD54 gibi kostimulatör reseptör ekspresyonlarında artış görülür. DC'lerin sitoplazmik iskeletinin reorganizasyonu ile migrasyon yeteneği artarak, T hücrelerine antijen sunumunu başlatma amacıyla bölgesel lenf düğümlerine göç ederler [176, 188].

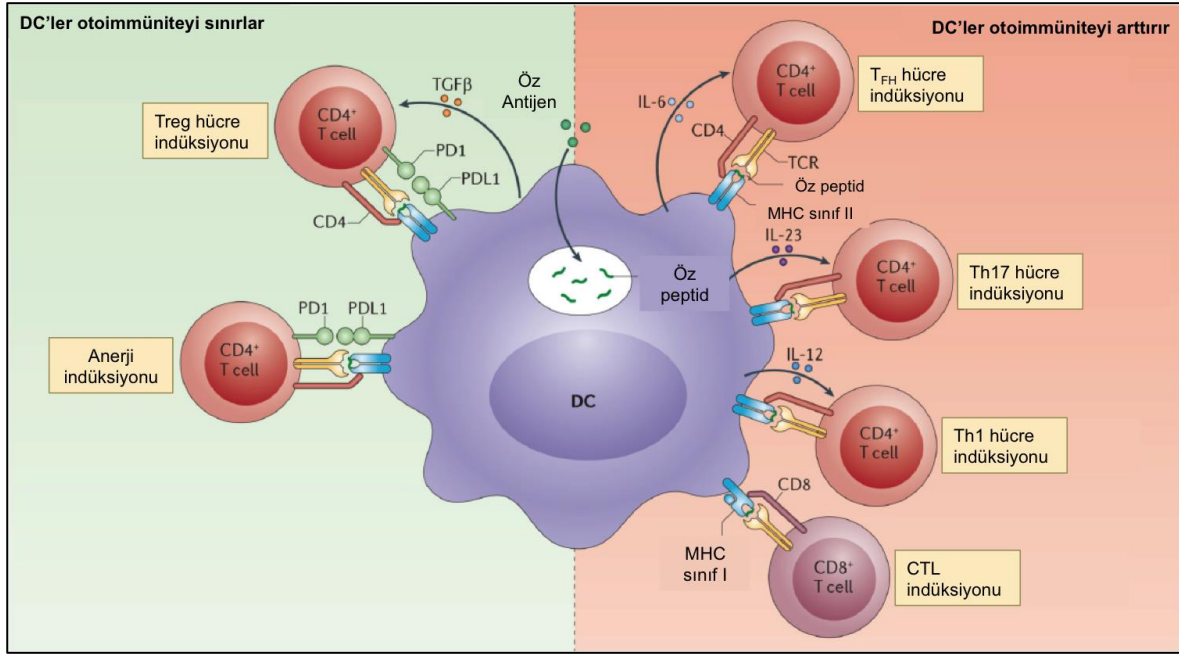
DC'ler başlıca "klasik veya konvansiyonel dendritik hücreler (cDC)" ve "plazmasitoid dendritik hücreler (pDC)" olmak üzere iki ana gruba ayrılır. cDC'ler, klasik DC morfolojisi sergileyen, profesyonel antijen sunucu hücre (ASH) olarak görev yapan ve yüksek düzeyde Sınıf II MHC molekülü eksprese eden hücre tipidir. cDC'ler kendi aralarında bulundukları dokulara ve eksprese ettikleri hücre yüzey belirteçlerine göre farklı alt gruplara ayrılırlar. Genel olarak Sınıf II MHC molekülü eksprese ederek $CD4^+$ T hücrelere sunum yaparken, Sınıf I MHC molekülü eksprese ederek $CD8^+$ T hücrelere çapraz sunum yaparlar. Bunun yanında, TLR gibi PRR'ler eksprese ederek patojenleri tanırlar ve proenflamatuvar sitokinler salgırlar [188-191]. pDC'ler, yuvarlak ve dendritleri olmayan, uzun ömürlü ve dolaşımda bulunabilen hücrelerdir. Yüksek miktarda TLR7 ve TLR9 eksprese ederek viral veya bazı mikrobiyel uyarılardan gelen uyarımları alırlar. Bunun sonucunda İFN- α salgılayarak anti-viral savunmada rol alırlar [190, 192].

Tip 1 diyabet patogeneğinde dendritik hücrelerin hem otoimmünite hem de tolerans gelişimi üzerine etkileri vardır. Ortamdaki yangısal fenotipe bağlı olarak DC kaynaklı antijen sunumu, otoimmün cevabı artırabilir veya inhibe edebilir. Proenflamatuvar mediatörlerin varlığında öz antijenleri alan DC'ler otoreaktif $CD4^+$ T hücrelerin ve sitotoksik $CD8^+$ T hücrelerin gelişimini ve aktivasyonunu indüklerler. $CD4^+$ T hücreleri Th1, Th17 veya T foliküler yardımcı (TFH) hücrelere farklılaşmalarını uyarırlar. Aktive olan T hücreler, patolojik otoimmünitenin gerçekleşmesini sağlarlar. Ortamda TGF- β gibi anti-enflamatuvar sitokinlerin yoğun konsantrasyonlarda bulunması, antijen sunumu yapan DC'lerin, Treg hücrelerin farklılaşmasını indüklediği bilinmektedir. Bunun yanında otoreaktif T hücrelere gerekli kostimulatörleri sağlamayarak T hücreleri anerjik forma dönüştürebilmektedirler [189] (Şekil 2.9).

Sağlıklı insanlarda DC'ler patojenik T hücreler ile T regülatör hücreler arasında dengeyi sağlayan hücreler olarak görev alırlar [189]. T1D hastalarında otoimmünite ve tolerans arasındaki DC regülasyonun bozulduğu görülmektedir. NOD farelerde cDC'lerin proenflamatuvar fenotip sergiledikleri, T hücreleri aktive etme kapasitelerinin çok yüksek olduğu ve fazla miktarda proenflamatuvar sitokin salgıladıkları gösterilmiştir [193].

T1D hastalığında DC'lerin varlığı ve yol açtığı patolojiler birçok çalışma ile ortaya konmuştur. DC'lere diyabetik bireylerin pankreas adacıklarında bol miktarda rastlanırken, sağlıklı bireylerde pankreası istila eden DC'lerin varlığı gösterilememiştir [194]. İki haftalık NOD farelerde fizyolojik veya viral sebeplerden pankreas hücrelerinin ölmesi ile açığa çıkan antijenlerin DC'ler tarafından alınarak otoreaktif T hücrelere sunulması sonucu T1D'in başladığı ortaya konmuştur [133]. Daha sonraki çalışmalarda da β hücre ölümünden sonra salınan antijenlerin cDC'ler tarafından alınarak pankreas lenf düğümlerinde T hücrelere sunulduğunu, dolayısıyla diabetojenik T hücre yanıtının DC'ler tarafından başlatıldığı doğrulanmıştır [195, 196]. NOD farelerde cDC'lerin yüksek düzeyde İL-12 ve kostimulatör ekspresyonu yaparak T hücreleri aktive ettikleri gösterilmiştir [197, 198]. Tüm bu çalışmalar cDC'lerin hastalığın başlatılmasındaki diabetojenik rolünü ortaya koyar niteliktedir.

Tip 1 diyabetik pankreaslarda İFN- α ekspresyonuna rastlanmış ve Tip 1 İFN'ların da T1D'i indüklediği düşünülmüştür [199, 200]. Transgenik olarak İFN- α eksprese eden diyabete yatkın olmayan farelerin diyabet geliştirdiği gösterilmiştir [201]. NOD farelerde İFN- β 'nın transgenik ekspresyonu, varolan diyabeti artırmış, diyabete dirençli farelerde ise öze karşı toleransı kırarak hastalık oluşumuna sebep olmuştur [202]. Başka bir çalışmada, β adacıklarında bulunan pDC'lerin TLR-9 aracılığıyla indüklenerek tip 1 İFN'ları üretmesi ve bu durumun diabetojenik T hücrelerinin aktive olmalarında çok önemli rol oynadığını göstermişlerdir. [203]. Tüm bu veriler pDC'lerin varolan patolojiye katkıda bulunduğu ve enflamasyonu artırma yönünde etki gösterdiğini vurgulamaktadır. pDC'ler ve cDC'ler, β hücre antijenlerine karşı immünolojik toleransı indükleyerek otoreaktif T hücre yanıtını baskırlar. Her iki hücreye ait tolerojenik etkiler, T1D'in regülatör mekanizmaları bölümünde anlatılmaktadır.



Şekil 2.9. Otoreaktif T hücre cevabının oluşumunda veya regülasyonunda dendritik hücrelerin potansiyel rolleri [189].

Doğal Öldürücü (NK) Hücreler

NK hücreler, virüsle enfekte hücelere ve tümörlere karşı erken savunma basamağında rol alan hücrelerdir. Hedef hücreleri doğrudan (direk olarak) sitotoksik etkileri ile öldürebildikleri gibi, İFN- γ gibi yangısal sitokinler salgılayarak dolaylı (indirek) yoldan da etkilerini gösterirler [10]. Diğer immün sistem hücre tipleriyle kıyaslandığında enflamasyonun olduğu hedef organa en çabuk giden hücre tipidir. Aldıkları tehlike sinyallerine bağlı olarak sürekli yer değiştirirler. NK hücreler doğal immün sistem hücreleri arasında yer alsa da T hücelere benzerlik gösterirler. NK hücreler eksprese ettikleri CD56 molekülünün yoğunluğuna göre sınıflandırılırlar: NK hücrelerinin %90'ı CD56 molekülünü düşük düzeyde eksprese edip aynı zamanda Fc γ RIII, (CD16) yüksek düzeyde eksprese ederler. (CD56^{low}CD16^{bright}). Bunun dışında CD56^{bright}CD16^{dim} ve CD56^{bright}CD16⁻ alt grupları da mevcuttur [204]. CD56^{low}CD16^{bright} NK hücreler daha çok periferde sirküle olur. Hedef hücelere karşı yüksek düzeyde sitotoksik etkilere sahip olup, düşük düzeyde sitokin salgısı yaparlar. CD56^{bright}CD16⁻ NK hücreler ise daha çok periferik lenfoid organlarda bulunur. Daha çok regülatör etkileri olup, İFN- γ , TNF- α ve GM-CSF, İL-5, İL-10, İL-13 gibi sitokinler salgırlar [205, 206].

NK hücrelerin yüzeylerinde inhibisyonu veya stimülasyonu indükleyen reseptörler vardır. (a) İnhibitör reseptörler; öldürücü hücre immünoglobulin-benzeri (*killer cell Immunoglobulin-like Receptor*: KIR) reseptörleri ve NKG2A/CD94 olmak üzere iki gruba ayrılır. NKG2A/CD94 heterodimeri HLA-E'ye bağlanır. KIR reseptörlerinin ligandı HLA-A, -B ve -C molekülüdür. (b) KIR reseptörlerinden aktivatör olanları da mevcuttur. Aktivatör reseptörler NKG2D ve doğal sitotoksikite reseptörleri (*Natural Cytotoxicity Receptor*: NCR) olmak üzere başlıca iki gruptur. NCR reseptörleri NKp46, NKp30, NKp44, NKp80 olarak isimlendirilmiş olup ligandları henüz kesinlik kazanmamıştır. NKG2D reseptörü, NK hücrelerinin büyük çoğunluğunda eksprese edilirken bazı CD8⁺ T hücrelerinde de ekspresyonu rapor edilmiştir. Ligandı, klasik olmayan (*non-classical*) Sınıf I MHC moleülleri olan (*Major histocompatibility complex (MHC) class I polypeptide sequence-related gene sequence*) MIC-A ve MIC-B'dir. Bu ligandlar ısı şoku, metabolik stres ve enfeksiyonlar gibi stres oluşturan durumlarda artar. KIR-2DS ve KIR-3DS ise KIR reseptörlerinden olup aktivatör olarak işlev görürler [207, 208].

NK hücrelerin T1D'in gelişiminde indükleyici roller üstlendikleri birçok hayvan ve insan çalışmasında gösterilmiştir. NOD farelerde NK hücrelerinin adacık hücrelerini parçalama yetilerinin olduğu gösterilmiştir [209]. Kimyasalla indüklenen T1D modelinde NK hücrelerin yok edilmesi ile T1D'in gelişiminin azaldığı rapor edilmiştir [210, 211]. Ancak başka bir çalışmada, NOD farelerde NK hücrelerin diyabet gelişiminde şart olmadığı belirtilmiştir [212]. NK hücrelerinin insan diyabetindeki etkilerini gösteren çalışmalar hayvan çalışmalarına oranla daha sınırlı olmakla beraber, yeni tanı almış T1D hastalarının pankreaslarında da NK hücre infiltratlarına rastlanmış, hastalık üzerinde etkilerini gösteren çalışmalar yapılmıştır [213].

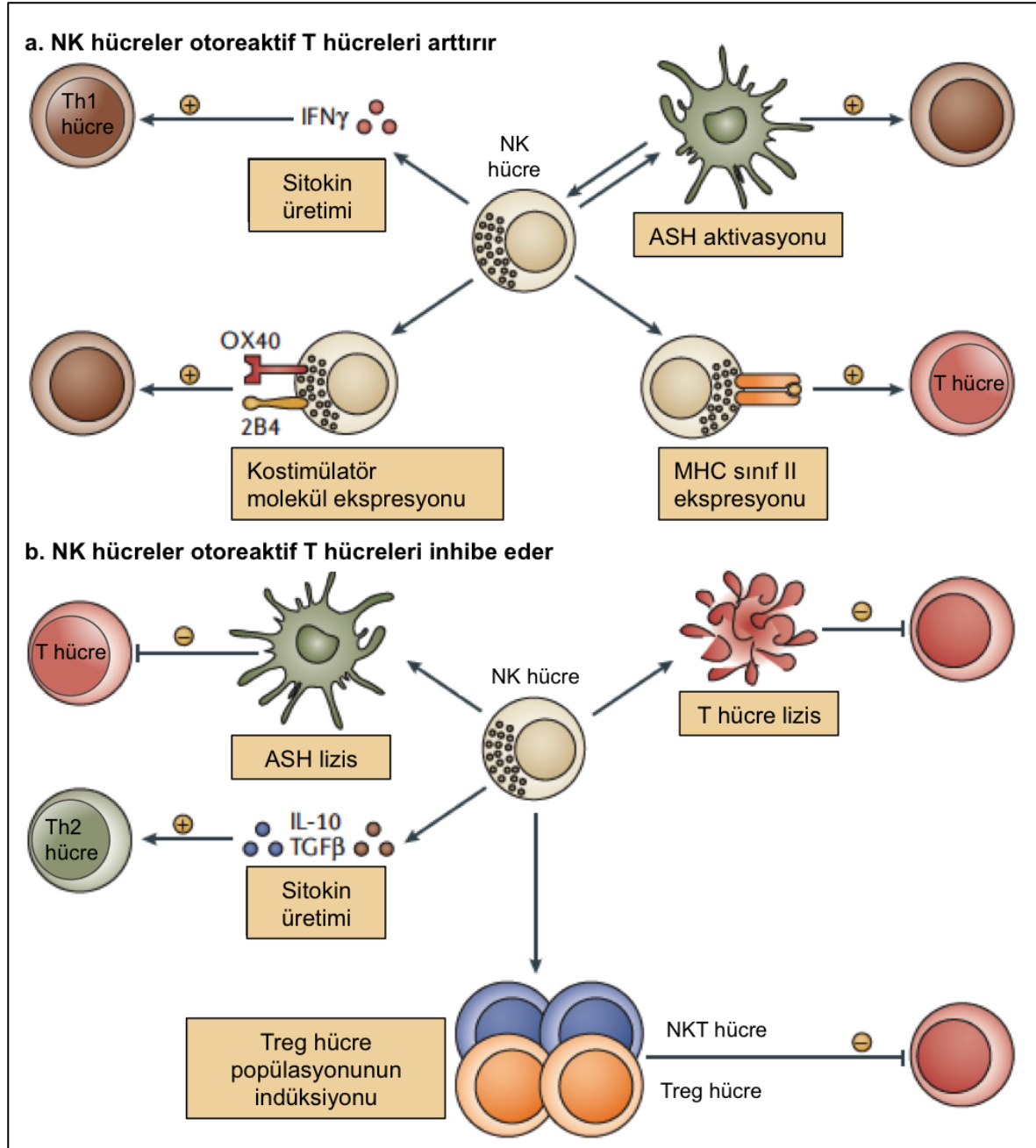
NK hücreler hedef hücreleri öldürme, sitokinler salgılama, T hücreler ve antijen sunucu hücrelerle etkileşime girebilme gibi yetileriyle potansiyel olarak T1D gelişmesinde önemli rol oynayabilirler (Şekil 2.10). NK hücreler, hedef hücreleri yüzeylerinde eksprese ettikleri moleküller ile tanırırlar. NK hücrelerin aktivatör reseptörlerinden NKp46, β hücreler üzerindeki bilinmeyen ligandına bağlanarak β hücrelerin parçalanmasına yol açar [214]. Yine NK hücrelerden eksprese edilen NKG2D, β hücrelerden eksprese edilen RAE (*Retinoic Acid Early inducible gene*) ligandına bağlanarak β hücre hasarına sebep olabilir. NOD

farelerde NK hücrelerde eksprese olan bu iki ligand bloke edildiğinde T1D'in önlenemediği görülmüştür [215, 216].

Aktive olan NK hücreler hedef hücreleri perforin ve granzimleri aracılığıyla parçalar. Bunun yanında yüksek miktarda İFN- γ , TNF- α , GM-CSF, makrofaj enflamatuvar protein 1 α (*Macrophage Inflammatory Protein-1 α* : MIP-1 α) ve MIP-1 β salgırlarlar. Bunlar içinde en önemlisi ve diğer hücreleri aktivasyon yönünde indükleyen sitokin İFN- γ 'dır. Yüksek miktarda üretilen İFN γ , özellikle diyabetojenik hücreleri aktive etme yönünde patolojiye katkıda bulunur [207, 217-219].

NK hücrelerinin ortaya konmuş aktivatör mekanizmalarının yanında T1D hastalarının kanından izole edilen NK hücrelerinin fonksiyonlarında zayıflama saptanmıştır. Kontrol hastalarla kıyaslandıklarında NKG2D reseptörünü düşük düzeyde eksprese ettikleri, az miktarda İFN- γ salgıladıkları aynı zamanda sayılarının daha az oldukları gösterilmiştir [220]. Yine NOD farelerde yapılan çalışmalarda diyabetin sonraki aşamalarında NK hücrelerinin cevapsız hale geldiği, sitokin salgılanmasının az olduğu ve granül ekzositozunun azaldığı belirtilmiştir [221, 222]. Yeni dönem hastalarda NK aktivitesinin yüksek olup, uzun dönem hastalarda düşük olması hastalığın bir sonucu ve karakteri olduğu düşünülmüştür [218].

NK hücrelerinin indükleyici fonksiyonlarının yanı sıra önleyici ve regülatör etkileri de mevcuttur. NK hücrelerinin bu etkileri T1D'in regülatör mekanizmaları bölümünde anlatılmaktadır.



Şekil 2.10. NK hücrelerin otoreaktif T hücreleri aktive ve inhibe etme mekanizmaları [205]

Nötrofiller

Nötrofiller doğal immün sistemin önemli elamanları olup, ekstrasellüler mikroorganizmalara karşı non-spesifik erken savunma basamağını oluştururlar. Başlıca efektör fonksiyonları fagositoz, granüllerinden litik enzimler salgılamaları, reaktif oksijen radikalleri üretmeleri, kemotaksis olarak sıralanabilir [223].

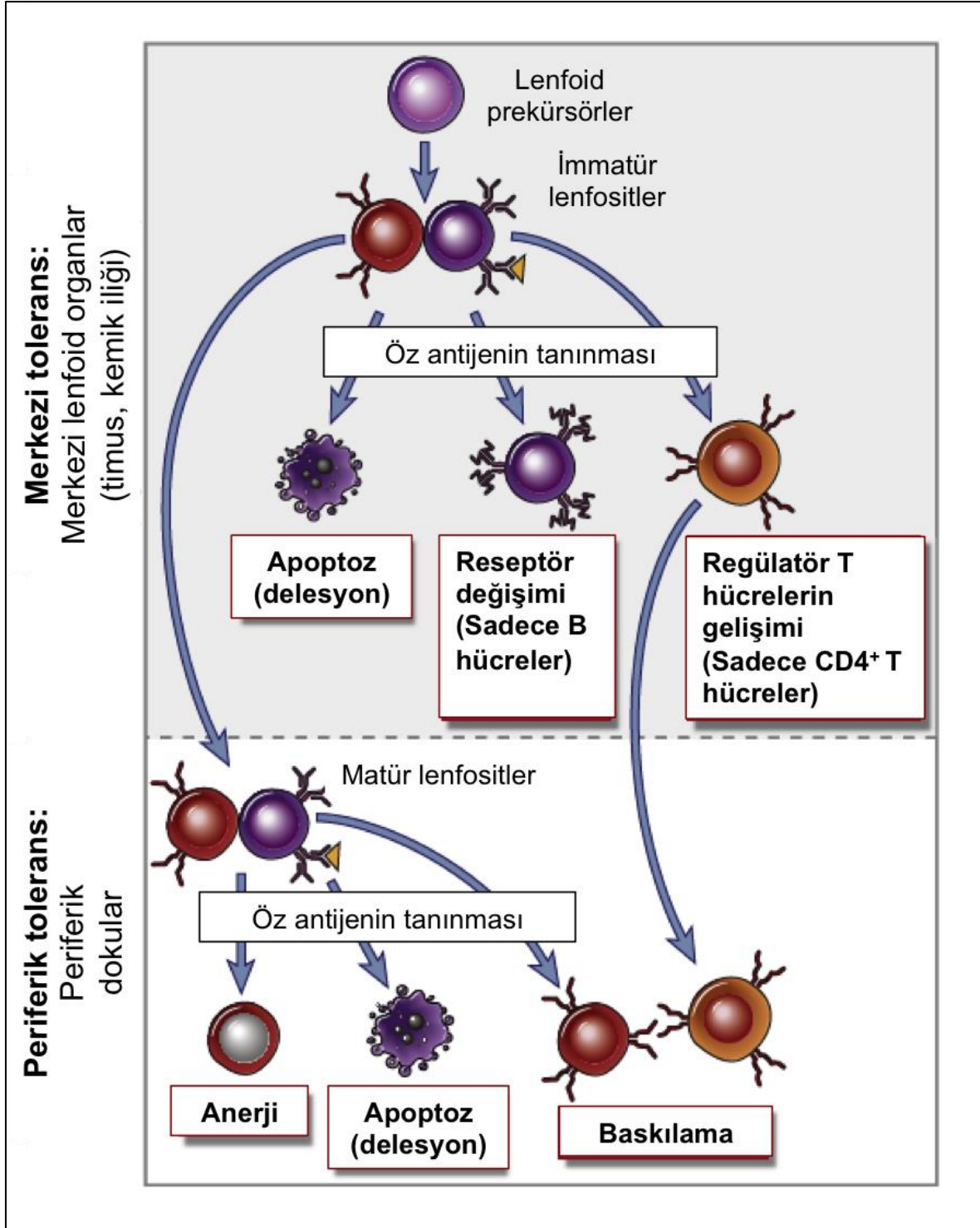
T1D'in patogenezinde nötrofillerin rolü tartışmalı, kesinleşmemiş ve üzerinde araştırılan bir konudur. Nötrofillerin T1D hastalığındaki etkileri araştırmak üzere birçok çalışma yapılmıştır. T1D hastalarının dolaşımdaki nötrofil sayıları sağlıklı bireylere oranla daha düşük olarak gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin yıkım sürecine fazla miktarda katılan nötrofillerin sayılarının azalmasına ve nötrofillerin daha çok dokularda birikmesine bağlı olabileceği düşünülmüştür [224, 225].

Nötrofillerin T1D'in patogenezinin nasıl etki ettiği hakkındaki hipotezler çelişkilidir. Hasarlanan β hücrelerinden salınan öz antijenler konvansiyonel dendritik hücreler (cDC) tarafından alınır. cDC'ler antijeni pankreastaki lenf düğümlerinde $CD4^+$ T ve $CD8^+$ T hücrelere sunarlar. $CD4^+$ T hücreler Th17 yönünde farklılaşırlar. Aktivasyon sonrası T hücreler pankreas adacıklarına göç ederek proenflamatuvar bir sitokin olan İL-17 salgırlar. Nötrofiller, salgılanan İL-17 ile pankreasta birikip pankreas dokusuna hasar verirler [226].

2.1.6. Tip 1 diyabette regülatör mekanizmalar

İmmün sistem patojenlerden kaynaklanan yabancı antijenlerle, vücutta eksprese olan öz antijenler arasındaki farklılığı algılamak üzere geliştirilmiş mekanizmalara sahiptir. Normal sağlıklı bireylerde öz antijene reaksiyon veren lenfositler ortadan kaldırıldığı veya inaktive edildiğinden dolayı birey kendi öz antijenlerine karşı toleranttır. Vücutta tolerans mekanizmaları başlıca iki farklı aşamada kontrol edilir (Şekil 2.11). (a) Bunlardan birincisi olan “merkezi (santral) tolerans”, timusta immatür T hücrelerinin gelişimi ve farklılaşmaları sırasında otoantijenlere reaktif olanların eliminasyonunun gerçekleştirilmesidir. (b) “Periferik tolerans” ise merkezi toleranstan kaçan matür T hücrelerinin, antijenle karşılaşılma, antijen işlenmesi ve sunumunun gerçekleştiği lenfoid

ve non-lenfoid dokularda çeşitli tolerans mekanizmalarıyla eliminasyonu veya inaktivasyonudur. Merkezi tolerans veya periferik tolerans mekanizmalarında herhangi bir aksaklık sonucunda öz antijenlere reaktif efektör T hücrelerin çoğalması ve aktivasyonu kontrol altına alınamaz ve otoimmünite tetiklenir [227, 228].

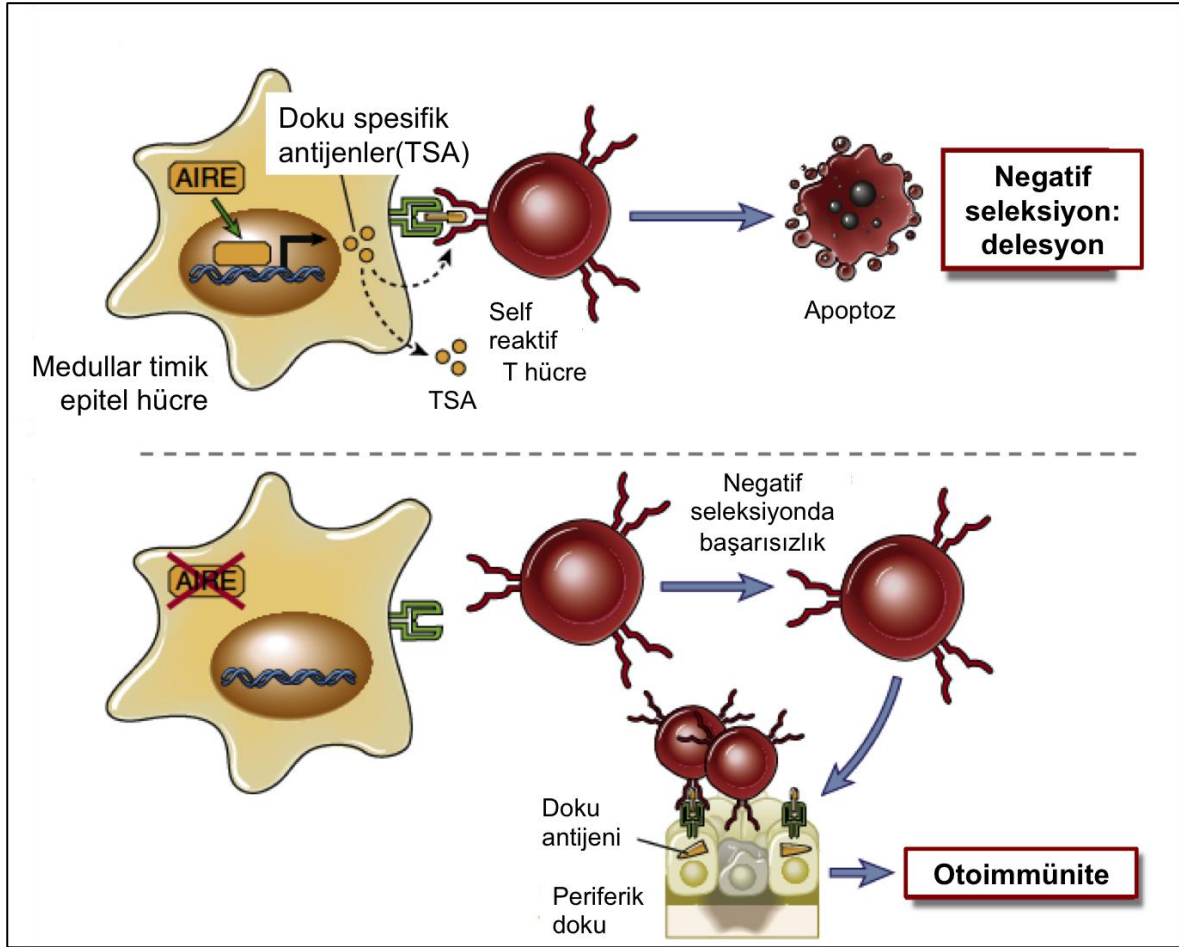


Şekil 2.11. Öz antijenlere reaktif T hücrelere merkezi ve periferik tolerans mekanizmaları [229]

Merkezi tolerans

Kemik iliği kökenli immatür T hücrelerin matürasyon ve farklılaşması timusta gerçekleşir. Rastgele oluşan T hücrelerin antijenik repertuarları timusta merkezi tolerans mekanizmaları ile kontrol edilir. Dendritik hücreler, makrofajlar, endoderm kökenli kortikal timik epitel hücreler (cTEC) ve medulla timik epitel (mTEC) hücreleri, timusta T hücrelere antijen sunumunu gerçekleştiren hücrelerdir. Timusun kortikal bölgesinde antijen sunucu hücrelerin öz peptid eksprese eden MHC molekülü ile TCR molekülünün etkileşimi gerçekleşir. Öz peptid - öz MHC kompleksine düşük ve orta düzeyde afinite ile yanıt veren timositler yaşam sinyallerini alarak hayatta kalır ve medullaya doğru ilerler. T hücrelerin öz antijenlerden sinyal alarak matürasyonlarına devam etmeleri “pozitif seçim (seleksiyon)” olarak adlandırılır. Pozitif seleksiyonu geçen T hücreler korteks-medulla sınırında ve medullada tekrar öz peptid - MHC kompleksiyle etkileşirler. Bu aşamada öz antijene yüksek afinite ile bağlanan T lenfositler apoptoza uğratılır. Bunun yanında öz antijenlerle karşılaşan bazı öze reaktif CD4⁺ T hücreler apoptoza uğratılmaz. Öz antijenlere spesifik regülatör T hücrelere farklılaşırlar. Timusta farklılaşan Treg hücreler perifere giderek öz antijenlere reaktif T hücrelerin inhibisyonunda görev alırlar. T hücre reseptörlerinin öz antijene çok fazla yanıt vermesi durumunda timositlerin ortadan kaldırılması veya Treg hücrelere farklılaştırılması ise “negatif seleksiyon” olarak adlandırılır [227, 230, 231].

Timusta eksprese edilen doku spesifik antijenler (TSA), otoimmün regülatör protein (*Auto-Immune Regulatory protein: AIRE*) kontrolünde mTEC hücrelerinden eksprese edilirler (Şekil 2.12). Bu nedenle AIRE geninde oluşan bir mutasyon sonucu öz antijenlere spesifik olan T hücreler negatif seleksiyona maruz kalmadan perifere kaçarlar ve birçok organda otoimmün hastalıklara sebep olurlar [232-235]. Aire eksprese eden mTEC hücrelerinin reaktif timositler ile etkileşiminin, Treg hücrelerin farklılaşmasında önemli olduğu, timik DC’lerinin ise reaktif hücrelerin apoptozunda daha çok rol oynadığı belirtilmiştir [236]. Bazı öz antijenlerin timusta düşük veya yüksek düzeyde eksprese olması da otoimmüniteyi indükleyebilir. Örneğin, insülin geninin timusta düşük düzeyde eksprese olup, pankreas β hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese olması, insüline karşı merkezi T hücre toleransının kaybı ile sonuçlanarak T1D’i indükler [237].

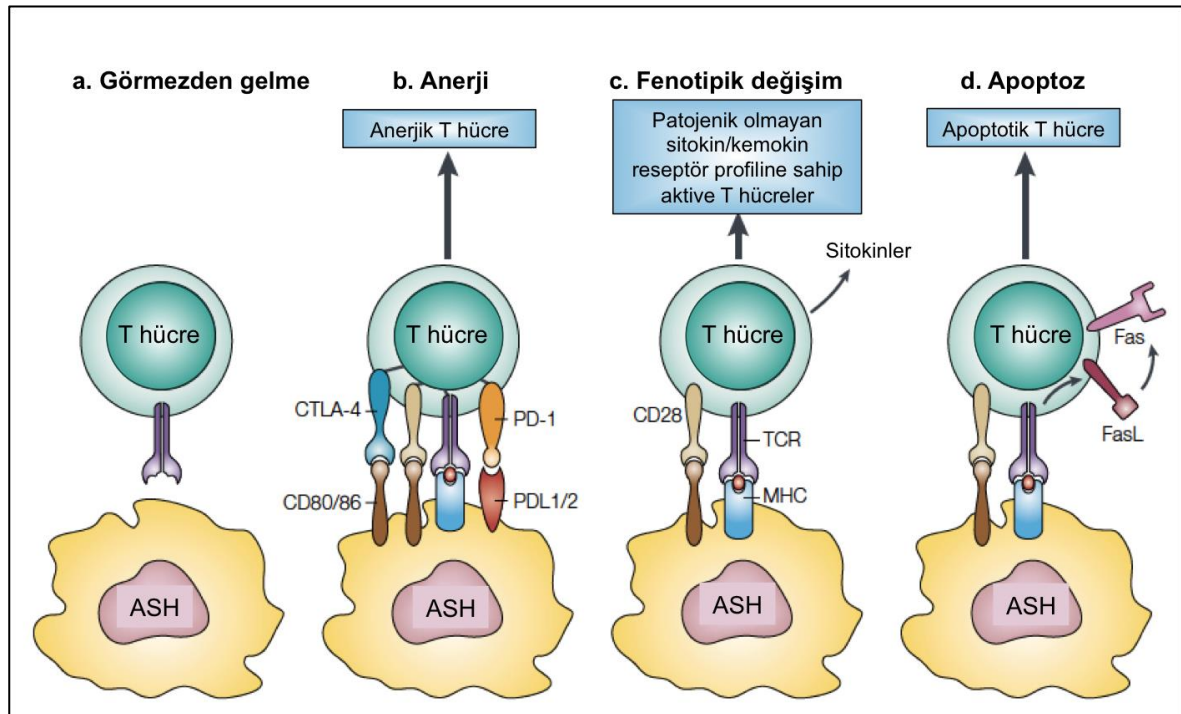


Şekil 2.12. T hücrelerin merkezi negatif seleksiyonunda AIRE proteininin rolü [229].

Periferik tolerans

Merkezi tolerans mekanizmasından kaçarak periferik bölgelere giden matür (olgun) öze reaktif T hücrelerin periferde de aktivasyonunu kontrol eden çok çeşitli mekanizmalar vardır (Şekil 2.13). Periferik dokularda eksprese olan öz antijenlere karşı cevapsızlığın sürdürülmesinde periferik tolerans çok önemli rol oynar. Periferik tolerans mekanizmaları; (a) otoreaktif T hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan apoptoz, (b) otoreaktif hücrelerin fonksiyonel olarak cevapsızlaştırılması (anerji) ve (c) Treg hücrelerle otoimmünitenin baskılanması olarak başlıca 3 ana mekanizma ile gerçekleşir. Öz antijenleri yüksek afinite ile tanıyan ve stimüle olan T lenfositler apoptoz mekanizması ile öldürülürler. Apoptoz iki şekilde indüklenebilir. Öz antijen: MHC kompleksine yüksek afinite ile bağlanan T lenfositler kostimulatör moleküllerden gelen sinyalleri alamayınca hücrede stres sensörlerini aktive edebilir. Bunun sonunca hücre içindeki apoptotik

proteinlerin aktivasyonu ve sitozolik enzimler olan kaspazların aktivasyonu gerçekleşerek hücre apoptotik olarak elimine edilmiş olur. İkinci apoptoz mekanizması olarak, öz antijenle tekrarlayan uyarımlarla aktive olan T hücrelerde ölüm reseptörü olan Fas ve onun ligandı olan FasL'in ekspresyonu indüklenerek hücre kendi kendini apoptoza sokar veya başka hücreler tarafından Fas-FasL etkileşimi sağlanarak hücrede apoptoz mekanizması başlatılmış olur. T lenfositlerin öz antijenle karşılaşmalarını takiben kostimülatör reseptör ekspresyonunun yokluğu (B7-1 ve B7-2) veya sitotoksik T lenfosit ilişkili protein-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte-Associated protein-4*: CTLA-4) ve programlanmış hücre ölümü proteini-1 (*Programmed cell Death protein-1*: PD-1) gibi inhibitör reseptörlerin T hücreler üzerindeki CD28 molekülü ile ligasyonu sonucu lenfositler öz antijene karşı cevapsızlaştırılmış olurlar. Bu mekanizma "anergi" olarak adlandırılmaktadır. Son mekanizma olarak Treg hücrelerin immün cevabı baskılayarak öze karşı toleransı sürdürmesidir [238-242]. Treg hücrelerin otoimmün hastalıkların regülasyonunda çok önemlidir. Tip 1 diyabetin regülasyonunda Treg hücrelerin yanında farklı hücreler de regülasyonun sürdürülmesinde çok önemli işlevler görürler.



Şekil 2.13. T hücre periferik tolerans mekanizmaları [238].

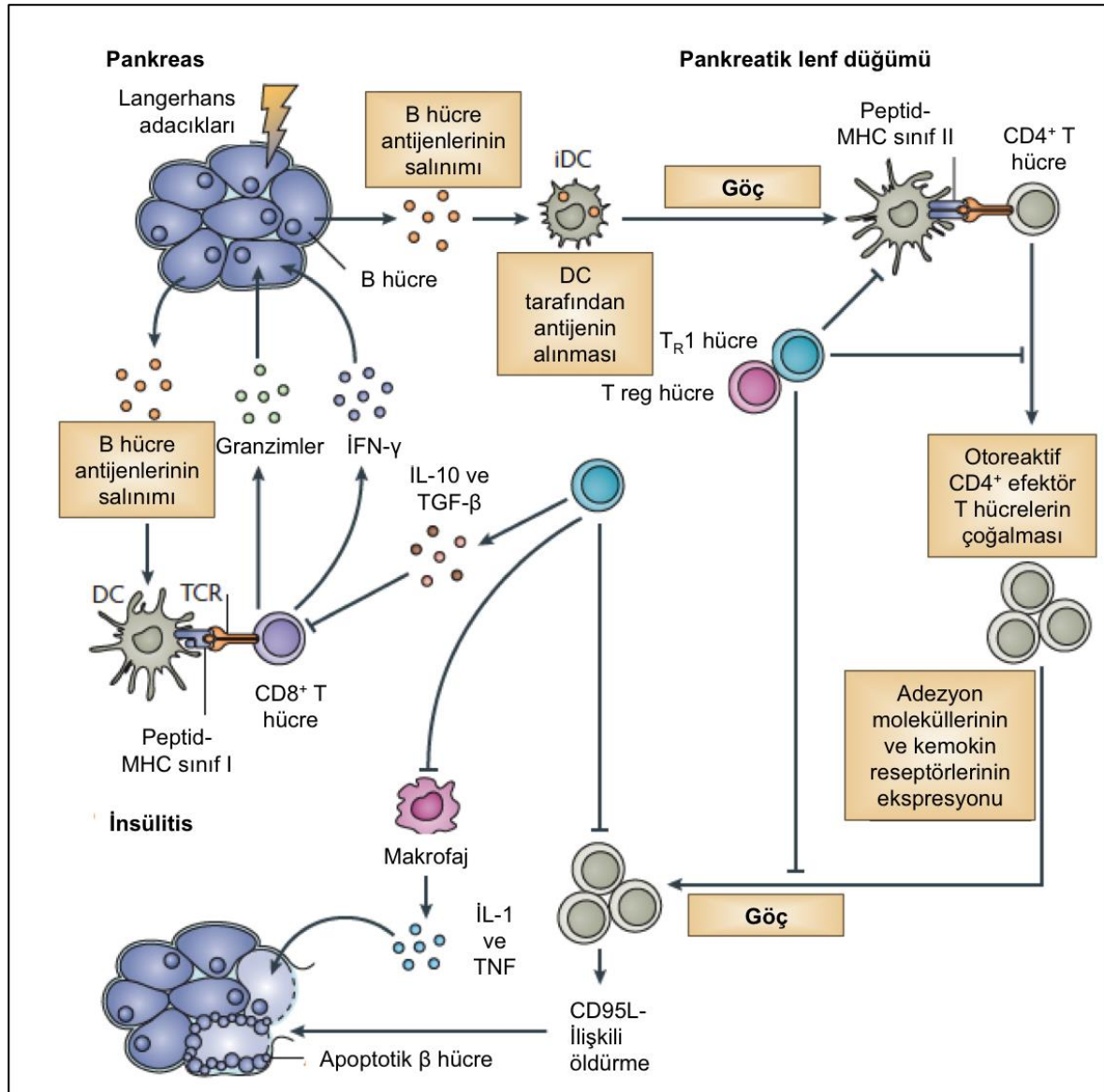
T regülatör hücreler

Regülatör T hücreler $CD4^+$ T lenfositlerin alt grubudur ve yüksek düzeyde İL-2 reseptör α zinciri (CD25) ekspresyonu ile karakterizedir. Transkripsiyon faktörü olan FoxP3 Treg hücrelerin gelişimi, farklılaşması, sağ kalımı ve fonksiyonları için şarttır. CD4, CD25, FoxP3 ekspresyonlarının yanı sıra düşük düzeyde CD127 (İL-7 reseptörü) ekspresyonu da yaparlar [243]. Treg hücreler timusta ve periferde oluşabilir. Timusta öz antijenleri tanıyan $CD4^+$ hücreler Treg hücrelere farklılaşabilir. Timusta oluşan bu regülatör hücreler “doğal Treg (nTreg) veya timik Treg (tTreg)” olarak adlandırılırlar. nTreg hücreler FoxP3 eksprese ederler ve periferik dokularda %5-10 düzeyinde bulunurlar. Periferik lenfoid organlarda ise öz antijenin tanınmasını takiben doğal immün hücrelerin yardımı olmadığında $CD4^+$ T hücreler, Treg hücrelere farklılaşabilir. Bu hücreler FoxP3’ten yoksun olup periferde TGF- β ’nın indüksiyonu ile Foxp3 pozitifliğini edinerek Treg hücrelere farklılaşırlar. Aynı zamanda öz olmayan antijenlerden kaynaklanan yangısal reaksiyonlarda bazı T hücreler Treg hücrelere farklılaşabilir. Periferik dokularda TGF- β indüksiyonu ile oluşan Treg hücreler “indüklenen Treg (iTreg), periferik Treg (pTreg) veya adaptif Treg (aTreg)” olarak adlandırılırlar [244, 245]. TGF- β , Foxp3 transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu indüklediği için Treg hücrelerin oluşumunda TGF- β sitokinine ihtiyaç duyulur. Bunun yanında oluşan Treg hücrelerin sağ kalımı ve çoğalması için İL-2’nin mutlaka ortamda olması gereklidir. Ayrıca CD28 sinyalizasyonunun Treg hücrelerinin gelişimi ve periferik homeostazı için gerekli olduğu belirtilmiştir [243].

Treg hücreler immün baskılamayı birkaç farklı yoldan yapabilirler (Şekil 2.14, Şekil 2.18). Bunlardan birincisi İL-10 ve TGF- β gibi anti-enflamatuvar sitokinler salgılamaktır. TGF- β , makrofaj aktivasyonunu inhibe eder, T hücre ve ASH’lerin çoğalmalarını ve efektör fonksiyonlarını baskılar. İL-10 ise dendritik hücre ve makrofajlardan Sınıf II MHC ve kostimulatör ekspresyonu ayrıca İL-12 salınımını inhibe eder. Treg hücreler sitokin salgılamasının yanında CTLA-4 molekülleri eksprese ederek T hücrelerde kostimulatör inhibisyonuna sebep olur. Ayrıca, efektör T hücrelerden eksprese edilen adezyon moleküllerini ve kemokin reseptörlerini bloke ederek, efektör T hücrelerinin ve diğer yangısal hücrelerin pankreasa gidişini önlerler. Bunun yanında Treg hücreler yüksek düzeyde İL-2 reseptör ekspresyonu yaptıklarından dolayı ortamda bulunan İL-2’lerin kendi

reseptörlerine bağlanmalarını indüklerler. Dolayısıyla ortamdaki efektör T hücreler için İL-2 tükendiği için T hücre aktivasyonu dolaylı yoldan baskılanmış olur [227, 246].

Öze reaktif T hücrelerin periferik dokularda regülatör hücreler ile aktif olarak eliminasyonu birçok bireyde gerçekleşen ve otoimmün hastalıkların oluşumuna fırsat vermeyen bir durumdur. Ancak otoimmün hastalıklara genetik yatkınlığı olan bazı bireylerde çevresel streslerinde tetiklemesiyle periferik tolerans kırılarak T1D gibi otoimmün hastalıklar baş gösterir [247]. Tolerans durumunda, pankreas adacıklarında ve lenf düğümlerinde DC'ler öz antijen - MHC kompleksini eksprese ederek efektör T hücreleri aktive ederler. Treg hücreler; İL-10, TGF- β gibi baskılayıcı sitokinler salgılayanın yanında ve CTLA-4, PD-1 inhibitör reseptörleri aracılığıyla efektör T hücreleri baskırlar. Bunun yanında DC'lerin antijen sunum özelliklerini değıştirirler ve bu hücrelerden indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) gibi baskılayıcı faktörlerin salınımını indüklerler. Ayrıca Th1 yangısal yanıtını Th2 tarafına yönlendirirler. Otoimmünite oluşmuş olan bireylerde ise DC'ler yüksek düzeyde öz peptid - MHC kompleksini ve kostimülatör molekülleri eksprese ederler. Bunun yanında fazla miktarda İL-12 salgırlar. Bu durum otoreaktif T hücreleri aktive eder. Treg hücrelerinin düşük sayıda olmaları, sağ kalımları için gerekli sinyalleri alamamaları, fonksiyonel yetersizlikleri ve efektör T hücrelerin Treg hücreler tarafından baskılanmaya dirençli olmaları gibi sebeplerden dolayı yangısal yanıt Th1 yönünde devam ederek otoimmün süreç başlar. T1D hastalığında, efektör mekanizmalar regülatör mekanizmalara galip geldiği için %80-90 β hücre hasarı oluşarak hastalığın klinik semptomları ortaya çıkar (Şekil 2.15) [4, 247-249].

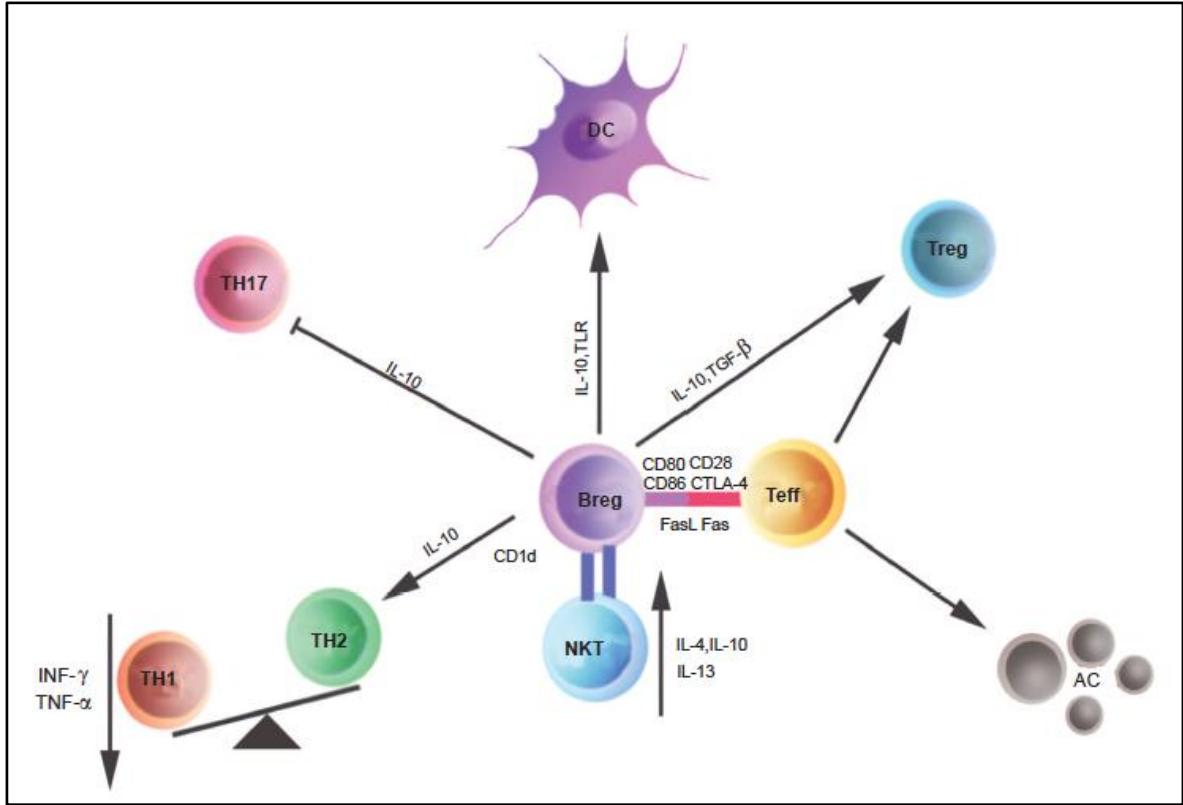


Şekil 2.14. Regülatör T hücrelerinin T1D patolojisini kontrol etme mekanizmaları. [250].

T1D hastalığında Treg hücrelerin sayılarının veya fonksiyonlarının azalmasının toleransın kırılmasına, dolayısıyla β hücrelerde T hücre kaynaklı yıkımın baskılanamamasına neden olur (Şekil 2.15). Yeni teşhis edilmiş T1D hastalarının kanından izole edilen $CD4^+CD25^+$ Treg hücrelerin sağlıklı kontrollerin Treg hücrelerine kıyasla T efektör hücreleri baskılama yetileri 2 kat daha az etkin olarak saptanmıştır [251, 252]. T1D hastalarından izole edilen Treg hücrelerinden eksprese edilen CD25 seviyesi normal olarak tespit edilirken, IL-2 reseptör sinyalizasyonunda görev alan STAT5 fosforilasyonunun bozukluğu dolayısıyla FoxP3 ekspresyonunda azalma saptanmıştır [253].

Diyabetik insan ve NOD farelerde yapılan araştırmalarında patojenik T hücrelerin Treg hücreler tarafından regüle edilmeye dirençli veya daha az hassas oldukları ortaya konmuştur [254, 255]. Treg hücrelerin diyabet üzerindeki koruyucu rollerini ortaya koyma amacıyla Treg hücrelerin depleksyonu veya transplantasyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. NOD farelerde $CD4^+CD25^+$ Treg hücreler yok edildiğinden T1D gelişiminin oldukça arttığı gözlemlenmiştir [256]. Yine başka bir çalışmada FoxP3 mutasyonu ile Treg hücreleri yok edilmiş farelerde, NK hücrelerinden $\text{IFN-}\gamma$ salınımının arttığı dolayısıyla efektör T hücrelerinin otoreaktivitesinin artarak T1D gelişiminin hızlandığı gözlenmiştir [257]. Bu ve benzeri birçok çalışmadan yola çıkılarak otolog Treg hücreler T1D hastalarına transplante edilerek terapötik anlamda hastalığın önüne geçebilmek amaçlanmış ve bu alanda çok çeşitli çalışmalar planlanmıştır [258, 259]. Adacık antijenine spesifik Treg hücreler NOD farelerden izole edilip, *in vitro* ortamda çoğaltılıp tekrar NOD fareye enjekte edildiğinde otoimmüitenin baskılandığı saptanmıştır [260, 261]. İnsan Treg hücreleri *in vitro* ortamda çoğaltılarak süpresör fonksiyonları analiz edilmiş ve insana transplate edilebilir canlı ve fonksiyonel hücreler olduğu ortaya konmuştur [262]. Bu çalışmalar T1D'in hücresel terapilerle tedavi edilebilmesi adına gelecek vaad etmektedir.

T1D hastalığından korunma ve önüne geçme mekanizmalarında daha çok nTreg'ler rol alsada, bunlar haricinde diğer başka T regülatör hücreler de hastalığın engellenmesinde çok önemli roller üstlenirler [247]. iTreg, TGF- β bağımlı yardımcı T hücresi tip 3 (*T helper: Th3*), IL-10 bağımlı tip 1 regülatör T (*type 1 regulatory T: Tr1*) ve $CD8^+$ Treg hücrelerin de otoimmün hastalıklar üzerindeki tolerojenik rolleri birçok insan ve hayvan çalışmalarında gösterilmiştir [227, 263, 264].



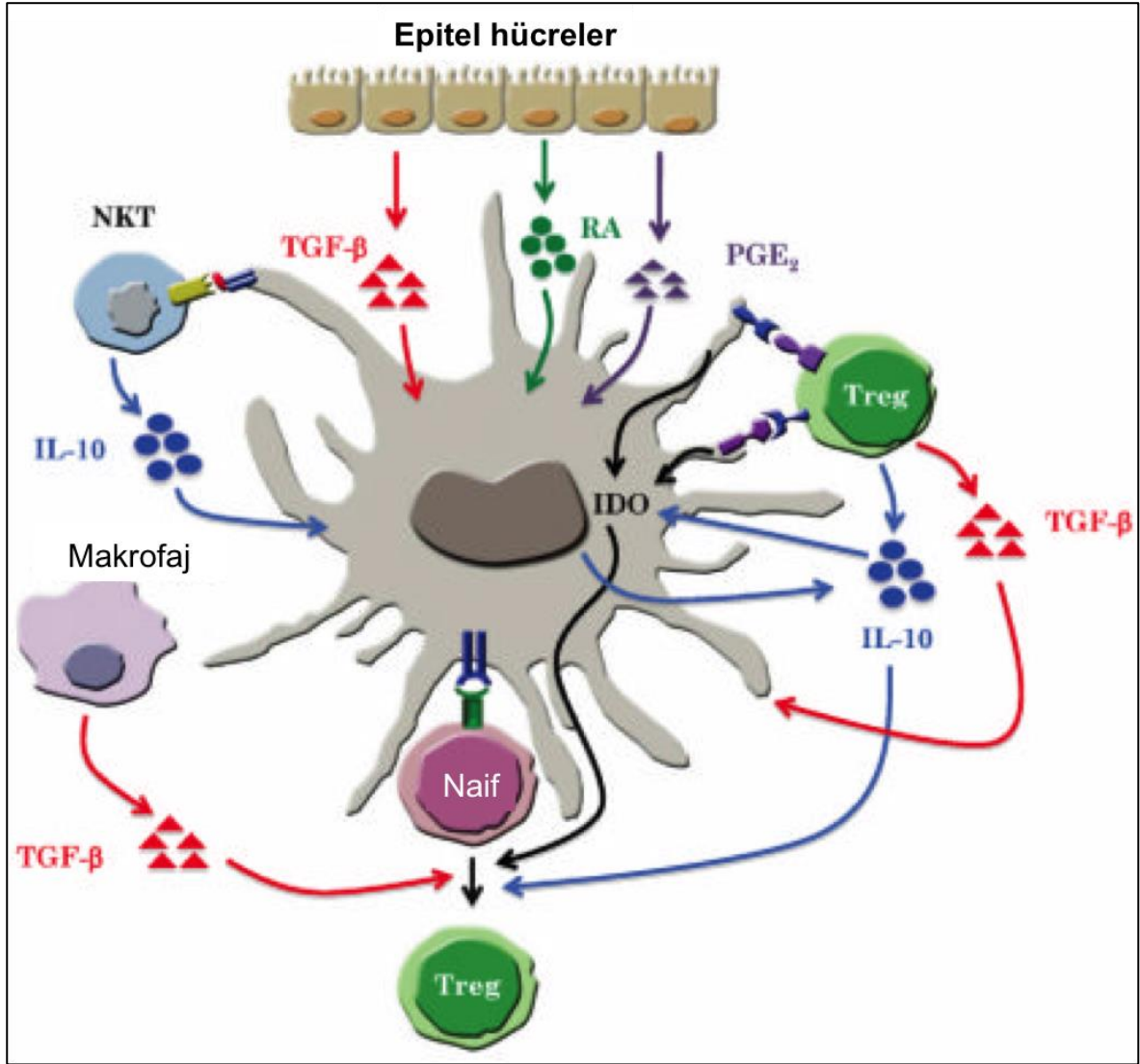
Şekil 2.16. B regülatör (Breg) hücrelerin immün regülatör etki mekanizmaları. [267].

Tolerojenik dendritik hücreler

Dendritik hücreler (*Dendritic Cell*: DC) her ne kadar T1D patogenezinde efektör yanıtı indükleyen birincil antijen sunucu hücre tipi olsa da, toleransın indüklenmesinde de aktif ve çok önemli roller üstlenirler (Şekil 2.19). DC'leri deneysel yöntemlerle yok edilmiş fare modellerinde otoimmünite gelişmesi DC'lerin tolerojenik fonksiyonlarını kanıtlar niteliktedir [268]. İmmün sistemin durağan (*steady-state*) olması durumunda DC'ler bütün dokularda yaygın dağılım göstererek öz antijen repertuarlarının hepsiyle temas halinde bulunur. Antijen alımı yapan ve bölgesel lenf düğümlerine göç eden DC'ler buralarda öz antijeni T hücrelere sunarlar. Ancak DC'lerin eksprese ettikleri Sınıf II MHC ve kostimülatör molekülleri ile salgıladıkları sitokinlerin azlığı dolayısıyla öz antijene reaktif T hücreler aktive olamaz, anergi veya apoptoza maruz bırakılarak inhibe edilirler. Aynı zamanda DC'ler, bu fazda antijen spesifik Treg hücrelerin oluşumunu ve devamını uyararak da periferik toleransı sürdürürler. Aktive olan Treg hücreler de periferde otoreaktif T hücreleri baskırlar [227, 269]. Durağan durumdaki DC'lerin tolerans

indüksiyonu bazı durumlarda kırılabilir. Örneğin, enfeksiyon ve patojenlerin sebep olduğu doku hasarı gibi durumlarda DC'ler, TLR'ler gibi PRR'ler aracılığıyla tehlike sinyalleri olarak yüksek düzeyde MHC ve kostimulatör molekül ekspresyonu yaparlar. Aktive olan DC'ler, matür hale geçerek periferik lenf düğümlerine giderler ve T hücreleri aktive ederler [269].

DC'lerin immünolojik veya tolerojenik forma geçişinde birçok faktör etkilidir (Şekil 2.17). Bunlar; farklı mikrobiyel uyarılara bağlı farklı forma dönüşüm, DC'lerin içinde bulundukları çevresel ortam, DC altgrupları, DC'lerin matürasyon fazları gibi durumlar olarak sıralanabilir [270]. Patojenik etkenlerden bazıları immünojenik DC'lerin oluşumunu indüklerken, bazıları tolerojenik DC'leri indükleyebilmektedir. Örneğin, genelde TLR'ler üzerinden gelen sinyaller DC'leri proenflamasyon yönünde indüklerken, TLR-2 aracılığıyla gelen sinyaller DC'leri tolerojenik forma geçirerekIDO salınımını indükler, Th2 veya Treg hücrelerin oluşumunu indükler [271]. Benzer şekilde DC'ler üzerinde bulunan C-tip lektin reseptörlerinin sinyalizasyonu enflamasyonu tetiklerken, bu reseptörlerden DEC205'in sinyalizasyonu DC'lerin tolerojenik forma dönmelerine sebep olur [272]. DC alt gruplarının PRR'lerinin sinyalizasyonlarına verdikleri cevaplar da farklı olabilmektedir. Örneğin, TLR9 sinyalizasyonu genelde bütün DC'lerde enflamasyonu indüklerken, plazmasitoid DC'lerde toleransı indükler [273]. Anti-enflamatuvar sitokinlere ve immünosupresif mediatörlere maruz kalan DC'ler, tolerojenik forma dönüşebilmektedir. İL-10, TGF- β ,IDO, prostoglandin E-2, retinoik asit, Vitamin D-3 uygulanan DC'lerin tolerojenik forma dönüşerek T hücre toleransını indükledikleri ve enflamasyonu baskıladıkları otoimmün modellerde gösterilmiştir [270, 274-276]. Bunların yanında CD40, CD80 ve CD86 gibi kostimulatör moleküllerin baskılanması veya İL-10, TGF-B veya CTLA-4 yüksek düzeyde eksprese ettirilmesi ile DC'ler tolerojenik forma dönüştürülerek otoimmünite baskılanabilmektedir [270, 274].



Şekil 2.17. Tolerogenik dendritik hücrelerin indüklenmesi ve fonksiyonel etkilerinin şematik gösterimi [270].

Tolerogenik DC'lerin yanında plazmasitoid DC'ler (pDC) de tolerogenik fonksiyonlar gösterirler (Şekil 2.18). pDC'ler TLR9 aktivasyonunu takiben Tip 1 İFN'ların salınımını bu da dolaylı olarak yüksek miktarda IDO sentezini indükler. pDC'ler üzerinde indüklenebilen T hücre kostimülatör ligandı (*inducible T-cell costimulator ligand*: ICOSL) ekspresyonu uyarılır [274]. Sonuç olarak T1D'in tolerans mekanizmasında pDC'ler; PDL1, ICOSL ve IDO aracılığıyla T hücre toleransını indükleyerek etki gösterirler. Özellikle IDO'nun fonksiyonu T1D'in önlenmesinde çok etkilidir. IDO, T hücreler için gerekli olan triptofan amino asidinin oksidatif katabolizmasını katalize ederek T hücreleri regüle eder. Tüm bu pDC'lerin etkileri İL-10 salgılayan CD4⁺ regülatör hücrelerinin oluşumunu katalize eder [9].

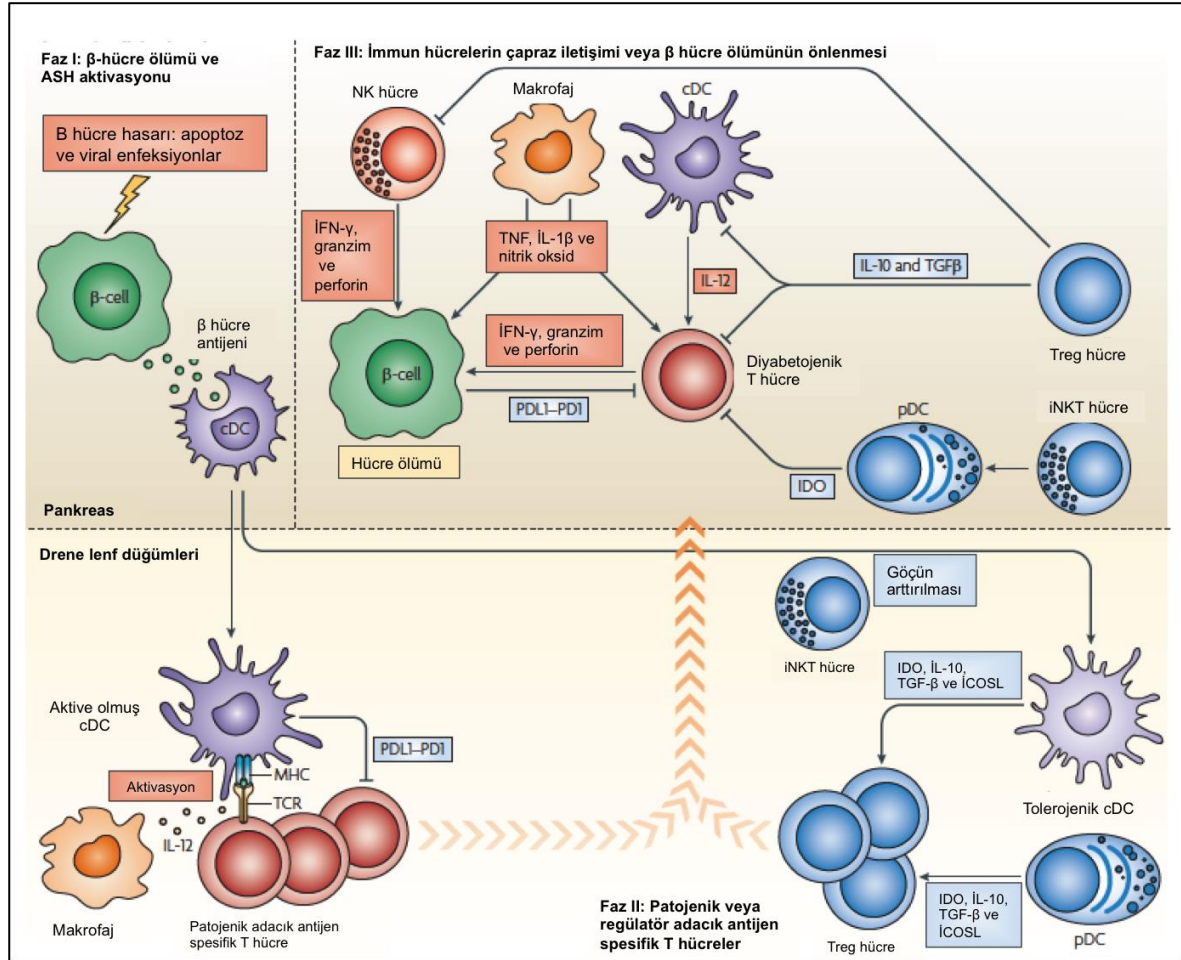
Tolerojenik ve pDC'lerin T1D üzerindeki çok önemli regülatör etkilerinden yola çıkılarak bu hücrelerin hastalığın tedavisine yönelik hücre terapisinde kullanımı gelecek vaad etmektedir.

İnvaryant (Değişmez) Doğal Öldürücü T (invaryant Natural Killer T: iNKT) hücreler

iNKT hücreler doğal immün hücre benzeri grupta sınıflandırılırlar. Ancak T hücre reseptörü (TCR) taşıdıkları için "Doğal Öldürücü T (NK-T) hücre" olarak da adlandırılırlar. Polimorfik yapıda olmayan, non-klasik Sınıf I MHC molekülü ve glikolipid antijenlerin sunumunu yapan CD1 molekülü eksprese ederler [277]. Patojenlere karşı cevapta yüksek miktarda sitokin üreterek etkilerini gösterirken, T1D'te bunun tam tersi olarak regülatör işlev görmektedirler (Şekil 2.18) [278]. iNKT hücrelerinin adacık oto-antijenlerine karşı Th2 hücre yanıtını indüklediği [279], CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin aktive hücrelere farklılaşmasını engellediği gösterilmiştir [280]. iNKT hücrelerinin Th2 hücreleri indükleyerek İL-4 salınımını uyarmasının yanı sıra [281], tolerojenik ve plazmasitoid dendritik hücrelerin regülatör fonksiyonlarını aktive ederek bu hücrelerin enflamasyon bölgesine toplanmalarını indükler. Tolerojenik DC'ler ve pDC'ler de yüksek miktarda İDO salgılayarak Treg hücrelerin oluşumunu ve çoğalmasını indükler [9].

Koruyucu NK hücreler

NK hücrelerin T1D'i artırma yönünde patolojik rollerinin yanı sıra koruyucu fonksiyonları da bulunmaktadır. NK hücrelerinin T1D gelişiminde patojenik veya koruyucu fonksiyona sahip olmaları NK hücrelerinin anatomik yerleşimine ve içinde bulundukları sitokin mikroçevresine göre değişkenlik gösterir [282]. Bunun yanında ortamda bulunan DC'lerin tipleri (cDC, pDC), reseptör aktivasyonlarının farklı yollardan gerçekleşmesi, enfeksiyonlar ve diğer çevresel faktörler gibi etmenler de etkili olmaktadır. Koruyucu NK hücreler, etkilerini TGF- β ve İL-5, İL-10, İL-13 gibi Th2 sitokinlerini salgılayarak gösterirler. Bunun yanında cDC'leri öldürerek, DC'lerin antijen sunumu ve T hücre aktivasyonunu engelleyerek etki gösterdiği düşünülmüştür [283].



Şekil 2.18. Tip 1 diyabetin gelişimi ve önlenmesinde hüresel ve moleküler mekanizmalar [9].

2.1.7. Tip 1 diyabette otoantijene spesifik T hücre fonksiyonlarının ölçümü

T lenfositler Tip 1 diyabet patogenezinin anahtar rol oynayan hücre grubudur. T1D teşhisinde en çok kullanılan yöntem otoantikor tayinidir, ancak tanı için ne doğrudan antikorlar patolojik kabul edilmektedir ne de adacık antijenine spesifik T hücre fonksiyonlarındaki değişiklikleri göstermekte yeterlidir. Bu nedenle T1D hastalarında T hücre fonksiyon ve karakterizasyon testlerinin yapılmasına ihtiyaç vardır. Klinik olarak hastaya yapılan çeşitli immünolojik müdahalelerde antikor titresi değişmemekte ve T hücre cevabıyla korelasyon göstermemektedir. Ancak adacık reaktif T hücre analizleri ile, yapılan müdahaleler sonucunda T hücre fonksiyonlarındaki değişiklikler kolaylıkla saptanabilmektedir. Otokoreaktif T hücreleri T1D hastalarından izole etmek, tanımlamak ve karakterize etmek, bu hücrelerin sayı ve fonksiyonlarındaki değişiklikleri göstermek

otoimmün beta hücre yıkımına sebep olan immünolojik hadiseleri daha iyi anlamamıza yardımcı olacaktır [16]. Özellikle T hücre klon çalışmaları tek bir prekürsörden köken almaları ve homojen olmaları sebebiyle T hücrelerin otoimmün yıkımdaki fonksiyonlarını anlamak amacıyla yapılan çalışmalar için oldukça elverişlidir. İzole edilen otoreaktif T hücrelerin antijen reaktivitesi, T hücre reseptör analizi, sitokin salgılama fenotipi, bunun yanında *in vivo* olarak adoptif transfer çalışmaları yapılarak T1D patogenezi ve immünoregülatör mekanizmaları ayrıntılı olarak araştırılabilmektedir [17]. Sonuç olarak, T hücre çalışmaları tedaviye veya hastalığı önlemeye yönelik kişiye özel immünoterapilerin geliştirilmesinde gelecek vaad etmektedir.

T hücre çalışmalarının T1D'i anlama açısından büyük bir öneme sahip olmasının yanında bazı dezavantajlara sahiptir. Öncelikle otoreaktif T hücrelerin daha çok insülitis alanında yoğunlaşması ve periferik kanda çok daha düşük oranlarda bulunması T hücre klonu çalışmalarını kısıtlayan en büyük faktördür [284]. Örneğin proinsülin₇₃₋₉₀ spesifik T hücrelerin kanda bulunma oranı yaklaşık 300 000'de 1'dir [285]. Bunun yanında oto-reaktif T hücreler düşük T hücre reseptör aviditesine sahip oldukları için çok zor tespit edilebilir. Bunun, yüksek aviditeli otoreaktif T hücrelerin perifere çıkmadan önce timusta apoptoza uğrama olasılığına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Tüm bu sebepler T hücre klonu çalışmalarını oldukça zor ve meşakkatli bir süreç haline getirmektedir [16, 286]. T hücre klonu çalışmaları yüksek oranda kan hücreleri kullanılarak yapılmakla beraber son yıllarda kadaverik donör dalak ve pankreaslarından da izole edilmeye çalışılmaktadır [287, 288]. Ancak pankreas çok hasar gördüğü ve çok az miktarda hücre izole edilebildiği için periferik kan, T hücre çalışmaları için birincil tercih sebebi olarak kullanılmaya devam edilmektedir.

Tip 1 diyabet hastalarının kanlarından birçok adacık proteinine spesifik T hücre klonları veya serileri izole edilebilmektedir [289-292]. Otoreaktif T hücrelerin spesifik reaksiyon gösterdikleri β hücre antijenlerinden başlıcaları proinsülin, GAD65 ve IA-2 olarak sayılabilir [117, 293, 294]. Kullanılan antijen formları T hücre klonu oluşturmada önem arz etmektedir. Birçok farklı antijen formları T hücre cevabını oluşturma amacıyla kullanılmıştır. Örneğin bazı araştırmacılar, insan adacıklarından izole ettikleri protein ekstraktlarını kullanmışlardır. Adacık ekstraktları, adacık antijenlerinin hemen hemen

hepsini ihtiva etmekte, hangi antijene karşı T hücre cevabı oluştuğu bilinmemektedir [295]. Bunun yanında, bakteriler, mayalar ve böceklerde üretilen otoantijenler de T hücre cevabını oluşturmak amaçlı kullanılmıştır. Ancak antijenlerin bu gibi formları zenojenik reaksiyon ihtimalini doğurmakta ve nonspesifik T hücre aktivasyonunu beraberinde getirmektedir [296]. Bunların haricinde rekombinant proteinler ve sentetik peptidler en çok kullanılan antijenik formlardır. Yüksek saflıkta elde edilebilir olmaları ve ucuza temin edilebilmeleri sebebiyle tercih edilmektedirler [251, 297, 298]. Belirli sekans aralıklarında peptit kullanımı, oluşacak olan T hücre klonunun hangi peptid aralığına karşı reaktif olmasını bilmek açısından önem taşımaktadır. Ancak insan kanında bulunan tüm adacık ilişkili antijenlere reaktif T hücrelerin oranı % 1'in altındadır [16]. Spesifik T hücre klonlarını peptid kullanarak izole etmek, işlemi çok daha meşakkatli hala getirmektedir. Bu nedenle rekombinant bütün antijen kullanımı, otoreaktif T hücrelerin tespit edilebilirliğini kısmen de olsa artırmaktadır. Ayrıca bu yöntemde antijen, doğal yollarla MHC molekülleri ile kırılmakta ve sunulmaktadır. İzole edilen T hücre klonları aynı antijenin birçok farklı peptid aralığına reaktif gelişebilir. Hangi peptid aralığına reaktif T hücrelerin izole edildiğini öğrenmek için ileriki aşamalarda epitop analizi yöntemine gidilebilmektedir.

T hücrelerin kısa süreli olan karakterizasyon çalışmaları genelde izole edilen periferik kan mononükleer (PKMN) hücrelerin (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*: PBMC) 3-10 gün arası antijenle uyarılması sonucunda uygulanır. Antijen spesifik T hücre çoğalması ve sitokin sekresyonu kolaylıkla analiz edilebilmektedir. Kısa dönem T hücre fonksiyon testleri; kolay olması, kısa sürede sonuç alınabilmesi, uzun süreli kültüre ihtiyaç bırakmaması nedeniyle klinikte T1D'in teşhis ve izlenmesinde immün biyomarker olarak kullanılabilir. Ancak bu metotlarda T hücreler, B hücreler, makrofajlar, monositler ve dendritik hücreler beraber enkübe edildiği ve elde edilen sonuçlar tek bir hücre grubunun cevabını yansıtmadığı için doğru ve gerçek bir değerlendirme yapılamayabilmektedir. Dolayısıyla tek bir otoreaktif T hücrenin fonksiyonel analizi ve karakterizasyonunun yapılmasına ihtiyaç vardır.

İnsan PKMN hücrelerinin uzun dönem adacık antijenleri ile tekrarlayan uyarımlara maruz bırakılması sonucu T hücre dizileri veya klonları elde edilebilmektedir. Antijen spesifik T hücre dizileri oluştururken insan PKMN hücreleri istenilen antijen ve radyasyona maruz

bırakılmış ASH'ler ile uzun dönem tekrarlayan uyarımlar ile enkübe edilir. Belli aralıklarla kültüre IL-2 ilavesi yapılarak otoreaktif T hücrelerin çoğalması için gerekli olan sitokin desteği sağlanır. Bunun sonucunda antijene reaktif tam olarak homojen olmayan T hücre grubu elde edilmiş olunur. Bu T hücre dizileri kullanılarak antijen spesifitesi ve epitop taraması yapılabilmektedir. Ancak T hücre dizileri birçok reaktif T hücre grubunu içerdiğinden ve birçok farklı peptide çapraz reaktivite gösterdiğinden dolayı yapılan analizler dikkatli yorumlanmalıdır. Bir diğer dikkat edilmesi gereken husus T hücre dizilerinin aktivasyonunda antijen ile uyarımı ve IL-2 ilavesini takiben yüksek oranda bystander aktivasyonu gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle T hücre karakteri kültürde değişkenlik gösterebilmektedir. Tüm bu kısıtlamaları gidermek ve daha homojen ve uzun ömürlü reaktif hücreler elde etmek amacıyla, T hücre dizileri bir sonraki aşama olan T hücre klonu aşamasına taşınabilmektedir. Otoantijen ile bir süre uyarılan T hücreler kuyucuk başına tek hücre veya 0,3 hücre düşürülerek T hücre dizilerini dilüe etme yöntemi (*Limiting Dilution Assay: LDA*) uygulanır [17]. "Limiting dilüsyon" yöntemi antijene cevap veren hücrelerin klonlaştırılmasının devamına dayanır [299]. Bu yöntem oldukça zahmetli ve zaman alan bir uygulamadır. Ancak güvenilir ve eskiden beri gerek hayvan gerekse insanlardan klon elde etmek amacıyla tercih edilmiş bir yöntemdir. Bunun yanında son yıllarda oldukça revaçta olan HLA tetramerleri kullanılarak, otoantijene spesifik T hücreler direk olarak insan periferik kan hücrelerinden seçilebilmektedir. Normal şartlarda HLA-TCR etkileşimi düşük affinitelidir. Bunu gidermek amacıyla kovalent bağlarla birbirine bağlanmış birçok spesifik HLA-peptid kompleksleri içeren tetramer veya pentamerler kullanılarak affinite ve aviditenin artırılması hedeflenir. HLA tetramerleri, çalışılmak istenilen insan rekombinant sınıf I veya sınıf II HLA molekülüne bağlanmış spesifik peptid antijenlerinden oluşturulmuş kompleks yapılardır. Üç ila dört HLA molekülü tek bir yapı üzerine tutturularak T hücre reseptörlerinin bağlanma aviditesi artırılmaya çalışılmıştır [300]. PKMN hücreler izole edilir edilmez veya T hücre dizisi aşamasından sonra istenilen antijene spesifik T hücreler, sınıf I HLA veya sınıf II HLA tetramer ve eşlik eden hücre yüzey molekülü ile (CD4, CD8) boyanarak tek hücre tek kuyucuk olacak şekilde FACS (*fluorescence activated cell sorting*) cihazı kullanılarak izole edilir [301-305]. Tetramer yönteminin çok masraflı olması ve sadece belirli peptid epitoplarına spesifik kullanılabilmesi tercihin dışında tutulmasına sebep olmaktadır. Limiting dilüsyon ve tetramer yöntemlerinin dışında Ciantar ve arkadaşları karboksiflöresein diasetat

suksinimidil ester (CFSE) yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem, CFSE flöresan boyası ile boyanan hücrelerden, çoğalanlarının tespit edilebilmesine dayanan bir yöntemdir [306].

Otoreaktif T hücre serilerinin tek tek kuyucuklara paylaştırılması sonrasında, antijen veya peptid ile önceden enkübe edilmiş ve ardından radyasyona maruz bırakılmış ASH'ler belli oranlarda kültüre eklenir. Bunun yanında T hücre klonlarının büyümeleri ve sağ kalımları için sitokinler ve bazı büyüme faktörleri destekleyici olarak kültüre eklenebilmektedir. Bu işlem sabit bir T hücre klonu elde edene kadar sürekli tekrar edilmelidir. Heterojen ve non-spesifik birçok farklı T hücre dizisi içerisinde istenilen antijen spesifitesine uygun T hücre klonu yakalama işi oldukça nadir, uzun zaman isteyen ve şansa dayalı bir süreçtir. İstenilen antijen spesifitesine uygun T hücre klonu yakalandıktan sonra detaylı karakterizasyon işlemleri için uygun hale gelmiş olur. Bu amaçla akım sitometrisi ile hücre yüzey molekülleri analizi, sitokin profili analizi, TCR analizi, epitop analizi, HLA tiplendirmesi yapılabilir. Bunların yanında T hücre klonları hayvan modellerine nakledilerek *in vivo* diyabet modeli oluşturulması, diyabet patogenezinin ve regülatör mekanizmaların *in vivo* ortamda ayrıntılı olarak araştırılması ve bu doğrultuda terapötik yaklaşımların geliştirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. [17].

Adacık antijen spesifik T hücre cevaplarını ölçebilmek amacıyla çok farklı yöntemler uygulanmış, bu alanda farklı yöntemleri içeren birçok derleme sunulmuştur [6, 16, 17, 307]. Bu yöntemler daha çok T hücrelerin çoğalma indekslerinin belirlenmesine ve sitokin üretimlerinin ölçümüne dayanmaktadır. Sitokin sekresyon ölçümüne dayanan testler; ELİSA, ELİSPOT ve sitokin sekresyon testi (CSA) olarak sıralanabilir. ELİSPOT testi; ek olarak uyarım gerekmeksizin hücreler üzerine uygulanabilen, genellikle İFN- γ ölçümüne dayanan ve pozitiflik gösteren hücrelerin nokta şeklinde ayırt edilebilmesiyle ölçülebilen bir yöntemdir [284]. Antijen reaktif T hücrelerin sitokin üretiminin tespitine dayalı bir diğer yöntem ise ELİSA tekniğidir. T hücrelerin öz antijeni ile uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreleri ile uyarımından 48 veya 72 saat sonra toplanan süpernatantlarda var olan sitokinlerin tespit edilmesine dayanan bir yöntemdir [308]. Antijenle aktive olan T hücrelerin salgıladıkları sitokinler CSA testi ile de tespit edilebilmektedir. T hücrelerin antijenle uyarımlarının ardından, salınan sitokinlerin uygun antikorlar ile boyanarak akım sitometrisi ile analizi yapılır [309]. Sitokin sekresyon

taayinlerinin haricinde, T hücrelerin antijenle uyarımlarının ardından, çoğalma indekslerinin  l   m  ile yapılan testler uygulanmaktadır. Bunlardan en çok uygulanan [³H]-timidin çoğalma testidir. Hastanın otolog PKMN hücreleri antijenle enkübe edilip radyasyona maruz bırakıldıktan sonra, bu hücreler ile T hücrelerin 2 gün uyarımı sonrasında açığa çıkan radyoaktivitenin   sintilasyon sayımı ile ölçümüne dayanan çok güvenilir bir yöntemdir [310]. Ancak radyasyon ile ilişkili bir yöntem olduğu için özel kısıtlamalar ve yönetmeliklerle kontrol edilen bir uygulamadır. Bu testin haricinde MTT testi, hücre çoğalmasının tespitinde uygulanabilir bir yöntemdir. MTT içerisindeki tetrazolium tuzlarının endoplazmik retikulum içerisindeki enzimler ile formazan formuna parçalanmasına, ve oluşan formazanın ELİSA okuyucusu ile tespitine dayanır [311].

3. METOT ve YÖNTEM

3.1. Araç-Gereçler

3.1.1. Antikorlar

Çalışmalar sırasında kullanılan antikorlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Antikorlar

Antikor Adı	Klon Numarası	Markası
Anti-human CD25-FITC	2A3	BD Biosciences
Anti-human CD8-PerCP	SK1	BD Biosciences
Anti-human CD69-APC	L78	BD Biosciences
Anti-human CD4-PE	SK3	BD Biosciences

3.1.2. Kitler

Çalışmalar sırasında kullanılan kitler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kitler

Kit Adı	Katalog Numarası	Markası
Human İL-10 ELİSA	BMS215/2	ebioscience
Human İFN-G ELİSA	BMS228	ebioscience
Human İL-4 ELİSA	BMS225/2	ebioscience
Human İL17-A ELİSA	BMS2017	ebioscience
MTT hücre proliferasyon kiti	11465007001	ROCHE

3.1.3. Kimyasallar

Çalışmalar sırasında kullanılan kimyasallar Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kimyasallar

Kimyasal adı	Katalog numarası	Markası
RPMI 1640 Medium	31870	GIBCO
PBS	14190	GIBCO
Sodium pyruvate	11360	GIBCO
MEM-NEAA	11140	GIBCO
2-mercaptoethanol	21985-023	GIBCO
Penisilin-streptomisin	15140	GIBCO
L-glutamine	25030	GIBCO
Biocoll Separating Solution	L 6115	Biochrome
Purified recombinant human IL-2	14-8029-63	eBioscience
Recombinant GAD65 protein	10-65702-18-01	Diamyd Medical
Phytohemagglutinin-L	M 5030	Biochrome
DMSO	A3672,0100	AppliChem
Sodium dodecyl sulfate	L43390	Sigma
Sodium azide	A1430	AppliChem
Hydrochloric acid 25 %	UN1789	Merck

3.2. GAD65 Reaktif T Hücre Serilerinin (line) Oluşturulması

3.2.1. Hastalar ve kontroller

Bu çalışma Dışkapı Yıldırım Beyazıt hastanesinden 17.12.2012 tarihli 06/48 karar numaralı etik kurul kararı (Bkz Ek-2) alınarak Endokrin Hastalıklar Polikliniğinde değerlendirilen ve teşhis konulan 5 Tip 1 diyabet hastası ve bir kontrol hastası ile yapıldı. Çalışmaya dahil edilen hastalar çalışma hakkında bilgi veren onam formu imzalatılarak çalışma hakkında bilgilendirildi. (Bkz Ek-3).

Çalışmaya 15-28 yaş arası ve GAD65 antikor pozitifliği olan hastalar dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların özellikleri çizelge 3.4'te gösterilmiştir. Hastaların belli aralıklarla çalışma için kan vermeleri talep edildi. 50-100 ml venöz kan heparinli *Vacutainer* tüplere

alınarak, 2 saat içerisinde PKMN hücre izolasyonu yapıldı. HLA tipinin belirlenebilmesi içinde EDTA'lı tüplere 2 ml kan alındı.

Çizelge 3.4. Çalışmaya dahil edilen hastalar ve özellikleri

Hastalar	Yaşı	Cinsiyeti	GAD65 pozitifliği
Hasta 1 (H-1)	19	Erkek	+
Hasta 2 (H-2)	23	Kadın	+
Hasta 3 (H-3)	19	Kadın	+
Hasta 4 (H-4)	15	Erkek	+
Hasta 5 (H-5)	15	Erkek	+
Sağlıklı Kontrol	27	Erkek	-

3.2.2. Periferik kan mononükleer hücrelerin (PKMN) izolasyonu

T1D hastalarından heparinli *Vacutainer* tüplere 50-100 ml periferik venöz kan alındı (Şekil 3.1). Tüpler 931 g'de oda sıcaklığında 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan plazma toplanarak, kompleman inaktivasyonu amacı ile, 56 °C'de 30 dakika bekletildi. Kan üzerinden alınan plazma miktarı kadar 20 U/ml heparin içeren izotonik sodyum klorür (%0.9 NaCl) kan üzerine ilave edilerek hafifçe karıştırıldı. Kan 50 ml'lik konik polipropilen tüplere alınarak 1:1 oranında izotonik sodyum klorür ile hafifçe karıştırılarak homojen olması sağlandı. 50 ml'lik tüp içerisine 15 ml fikol (1077) yoğunluk gradienti konularak, üzerine 30 ml izotonik sodyum klorür ile dilüe edilmiş kan 45 derecelik açıyla yavaşça yayıldı. 931 g'de 24 °C'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası lökosit zengin bulutsu katma (*buffy coat*) kısmı 50 ml'lik tüp içerisinde toplandı. 2 kez izotonik sodyum klorür ile yıkanarak (335 g'de, 5 dk santrifüj) fikolden arındırıldı. Hücreler zenginleştirilmiş %5 otolog serum, 100 U/ml penisilin, 100 U/ml streptomisin, 2 mmol/l L-glutamin, 1 mM esansiyel olmayan aminoasitler, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 1 mM sodyum piruvat içeren RPMI besiyeri içerisinde resüspande edilerek tripan mavisi ile boyanarak hemositometrede sayıldı.



Şekil 3.1. Periferik kan mononükleer hücrelerinin elde edilme yönteminin şematik olarak gösterimi.

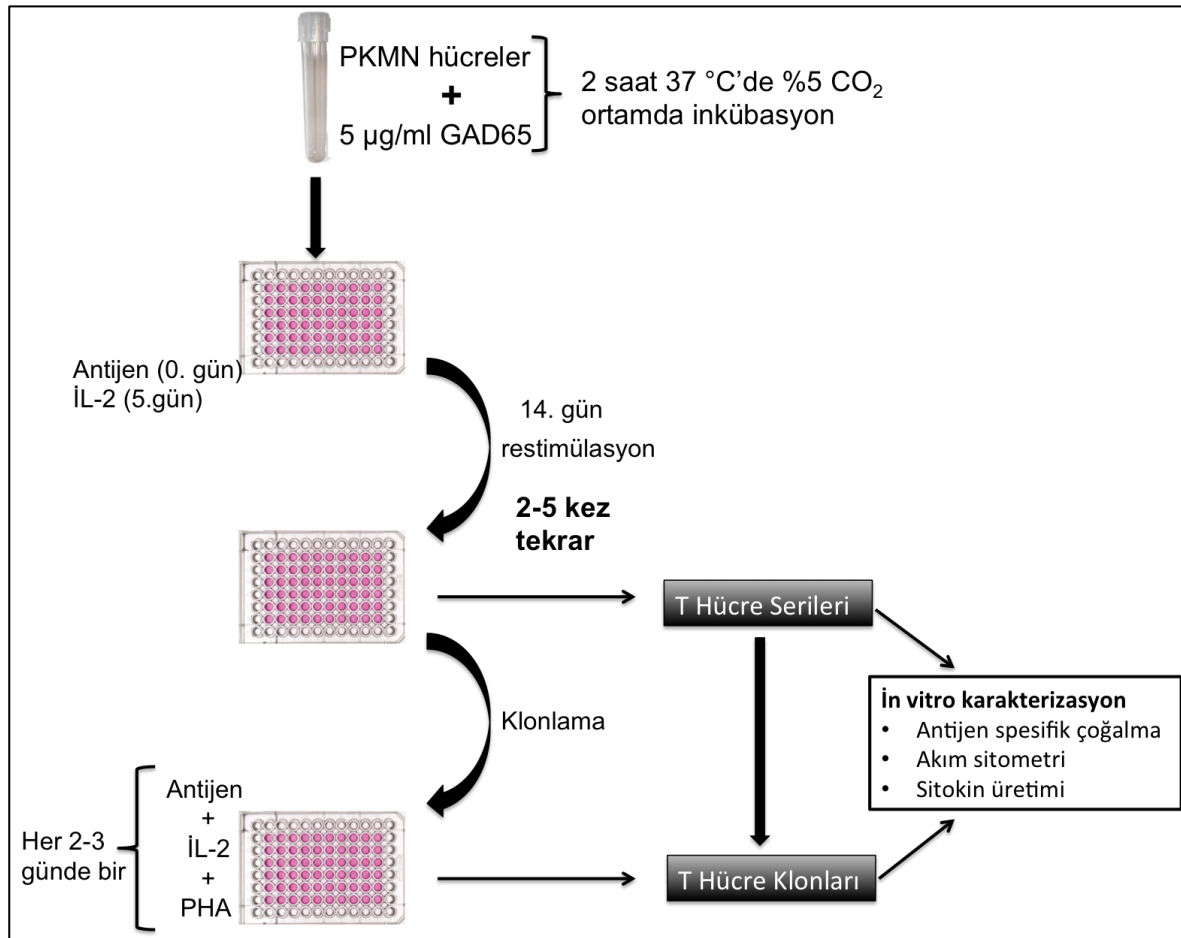
3.2.3. PKMN hücrelerin antijen ile uyarımı

PKMN hücreler, Şekil 3.2'de gösterildiği gibi uyarılarak otoreaktif T hücre serileri elde edildi. 9×10^6 PKMN hücre 500 μ l %5 zenginleştirilmiş besiyeri içerisinde toplandı. 5 μ g/ml GAD65 (Diamyd Medical, Stocholm, Sweden) antijeni ile yuvarlak tabanlı 6 ml'lik polipropilen tüp içerisinde (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA), 37 °C'de %5 CO₂'li su ceketli etüvde 2 saat inkübe edildi. Enkübasyon sırasında her yarım saatte bir hafifçe karıştırıldı. Enkübasyon sonunda $1,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olmak üzere 96 kuyucuklu "U" tabanlı plağın iç kısmındaki 60 kuyucuğuna hücreler paylaştırıldı. Kuyucuk başına son hacim 200 μ l olmak üzere zenginleştirilmiş RPMI besiyeri ile tamamlandı. Dışta kalan kuyucuklara yüksek nemli ortam oluşturabilmek amacıyla PBS ilave edildi. Hücreler 37 °C'de, %5 CO₂'li su ceketli etüve kaldırıldı. Geriye kalan hücreler %5 DMSO, insan serumu karışımı ile steril kriyoviyal tüplere konarak -86 °C'ye kaldırıldı. Beşinci gün 20 U/ml rekombinant insan İL-2 (rhIL-2) sitokini kültüre eklendi. On dördüncü gün mikroskopta büyüme gözlenen kuyucuklara MTT proliferasyon testi yapıldı.

3.2.4. PKMN hücrelerin antijen ile tekrar eden uyarımları

On dördüncü günden sonra büyüme gözlenen kuyucuklara tekrar antijen ile uyarım gerçekleştirildi. Bunun için aynı hastanın daha önceden dondurulmuş PKMN hücreleri, -86°C'den çıkarılıp 37 °C'de çözündürülerek %5 besiyeri ile yıkandı. Daha sonra 2 kez

zenginleştirilmiş %5 RPMI ile yıkandı. 5 µg/ml GAD65 antijeni ile polipropilen yuvarlak tabanlı 6 ml'lik tüp içerisinde, 2 saat 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde enkübe edildi. Enkübasyon sonrası hücreler 335 g'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrası hücreler 1 ml besiyeri içerisinde toplandı. Hücreler gama irradiatörde (CIS IBL 437 C Pharmalucence CsCl) 25 Gray (Gy)'de 730 sn radyasyona maruz bırakıldı. Radyasyon ile muamele sonrası hücreler sayılarak $1,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olmak üzere ilave edildi. Bu işlem her 14 günde bir yapıldı. 5. gün 20 U/ml rhIL-2 kültüre eklendi [308]. Elde edilen otoreaktif T hücre serilerini çoğaltmak amacıyla, her iki günde bir kültüre 20 U/ml rekombinant IL-2 ve 2,5 µg/ml fitohemagglütinin (PHA) ilave edildi. Çoğaltılan kuyucuklar toplanarak akım sitometri çalışması için hazırlandı.



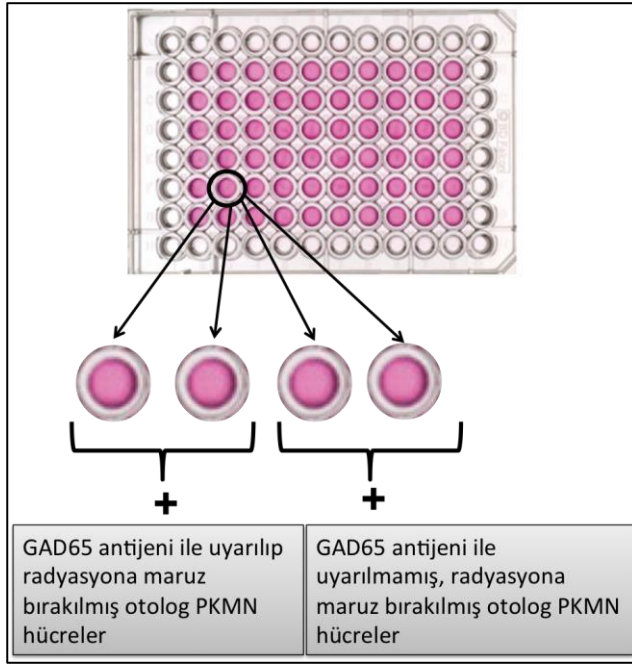
Şekil 3.2. Antijen spesifik T hücre yapımının şematik gösterimi.

3.2.5. Limiting dilüsyon testi

Antijene reaktif T hücre serilerinden klon oluşturabilmek amacıyla otoantijene reaktivitenin ve çoğalmanın görüldüğü kuyucuklar limiting dilüsyon yöntemi ile tek hücre tek kuyucuğa düşecek şekilde ayarlandı. Üzerine 5 µg/ml GAD65 antijeni ile uyarılan ve sonrasında radyasyona maruz bırakılarak çoğalmaları durdurulmuş yaklaşık 20 000 PKMN hücre ilave edildi.

3.2.6. MTT testi

Antijen uyarımından 14 gün sonra üreme görülen kuyucuklara şekil 3.3'te gösterildiği gibi *"split well assay"* uygulandı. Yani, üreme görülen her bir kuyucuktan 40'ar µl alınarak, yeni bir plağa 4 parçaya bölündü. Ana kuyucuk içerisinde de 40 µl bırakıldı. 4 kuyucuktan ikisine antijen ile enkübe edilmiş ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreler ($1,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk) eklenirken, diğer iki kuyucuğa radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreler eklendi. Ana kuyucuklara da antijen ile enkübe edilen ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreler ($1,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk) ilave edildi. Hücreler 96 kuyucuklu "U" tabanlı plağa 200 µl total besiyeri hacmi ayarlanarak kondu. 48 saat enkübasyona bırakıldı. Enkübasyon sonucu kuyucuklardaki besiyeri 100 µl'ye getirildi. Her bir kuyucuğa 10 µl (0,5 mg/ml final konsantrasyon) MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) solüsyonu eklendi. 4 saat 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde enkübe edildi. Enkübasyon sonrası kuyucuklara 100'er µl %10'luk SDS (0,01 molar HCL içerisinde hazırlanmış) solüsyonu eklendi. 1 gece 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde enkübe edildi. Enkübasyon sonrası kuyucuklar düz tabanlı 96 kuyucuklu plağa nakledildi. Açığa çıkan mor formazan kristallerinin oluşturduğu abzorbanda dalga boyu mikro plaka okuyucu cihazında 570-670 nm'de ölçüldü. "Split well assay" ve MTT testleri her 14 günde bir tekrar edilerek doğru otoreaktif T hücre serileri tespit edilmeye çalışıldı. Yüksek değer bulunan ana kuyucuklar 14 günlük zaman aralıklarıyla antijen ile muamele edilmiş ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreler ile uyarıldı.



Şekil 3.3. “Split well assay” testinin uygulanışı

3.2.7. Akım sitometrisi

Çoğalan ve GAD65'e yanıt gösteren otoreaktif T hücre serileri kuyucuklardan toplanarak sayıldı. $0,5-1 \times 10^6$ hücre 100 μ l soğuk FACS (%1 FBS, PBS içerisinde) solüsyonu içerisinde toplandı. Hücre süspansiyonu FACS tüplerine alındı. Hücrelere Fc reseptörlerinin bloke edilmesi amacıyla 10 μ l insan serumu ilave edildi. Hafifçe karıştırıldı. 4 °C'de 10 dk enkübe edildi. Üzerine 5'er μ l insan CD4, CD8, CD25 ve CD69 antikoru ilave edildi. Her bir antikor için tek boyalı izotip kontrol tüpleri hazırlandı. 30 dk 4 °C'de karanlıkta enkübe edildi. Enkübasyon sonrası 2 ml soğuk FACS solüsyonu eklenerek, 335 g'de 4 °C'de 5 dk santrifüj edildi. Hücreler kaybedilmemeye çalışılarak süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi. Son olarak hücreler %1-4 paraformaldehid ile fikse edildi. Örnekler akım sitometrisi cihazında (FC500, Beckman Coulter, USA) okutuldu.

3.2.8. ELİSA ile sitokin konsantrasyonunun ölçümü

Antijenle uyarılmış PKMN hücreleri ve antijenle uyarılmamış PKMN hücrelerinin T hücre serilerine ilave edildikten sonraki 48. saatte toplanan hücre kültürü süpernatantları ELİSA testi yapılana kadar -20 °C'de saklandı. Süpernatantlar çözdürüldükten sonra 2 kat RPMI

besiyeri ile sulandırıldı. İFN- γ , İL-4, İL-17A, İL-10 sitokin düzeyleri ticari ELİSA kitleri (eBioscience, USA) ile kit prosedürüne uygun olarak çalışıldı. Öncelikle, standart dilüsyonları hazırlandı. Her bir kuyucuğa 50'şer μ l test solüsyonu eklendi. Üzerine 50'şer μ l örnekler eklendi. Her bir örnek ve standart çift kuyucuk olarak çalışıldı. Üzerlerine her bir kuyucuğa 50'şer μ l biotin-konjugat solüsyonu eklendi. İki saat oda sıcaklığında enkübe edildi. Enkübasyon sonrası 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. Her bir kuyucuğa streptavidin-HRP solüsyonu eklendi. Bir saat oda sıcaklığında enkübe edildi. Enkübasyon sonunda 3 kez yıkandı. Bütün kuyucuklara 100'er μ l TMB substrat solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında karanlıkta 10 dk enkübe edildi. Her bir kuyucuğa durdurma (*stop*) solüsyonu eklendi. Hiç beklenilmeden mikroparka okuyucusunda 450 nm'de (Synergy, Biotek, USA) okutuldu. Sensitiviteler: İL-10=1,0 pg/ml, IL-4=1,3 pg/ml, İFN- γ =0,99 pg/ml, İL-17=0,5 pg/ml

3.2.9. HLA tiplendirme

Hastaların EDTA'lı tüplere alınan periferik venöz kanlarından otomatik DNA izolasyon cihazı kullanılarak (EZ1 DNA blood kit, Qiagen) DNA izole edildi. İlgili polimorfik HLA lokuslarının (A, B, C, DR, DQ, DP) ekzon 2-3 bölgeleri birden fazla biyotinlenmiş PCR primerleri yardımıyla, HLA tiplendirme kiti (Lifecodes, Immucor) kullanılarak PCR'da amplifiye edildi. Ardından multipleks boncuklar ile konjuge edilmiş oligonükleotid problemler ile hibridize edilen örnekler, PE konjuge edilmiş streptavidin solüsyonu ile 56 °C'de enkübe edildi. Enkübasyonun ardından işaretli boncuklar üzerindeki flöresan yansıma Luminex cihazında okutuldu. Verilerin analizi "Match-It DNA" yazılımıyla yapıldı. HLA genotiplendirme verileri 4 basamaklı sayı olarak sunuldu.

3.3. İstatistiksel Analiz

Parametrik verilerin karşılaştırılması ve gruplar arası farklılıkların anlamlılık değerleri student t testi ve iki yönlü ANOVA testi uygulanarak değerlendirildi. Bütün istatistiksel analizler GraphPad Prism yazılımı (version 4.0c, GraphPad, San Diego, CA) kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR ve YORUM

4.1. İnsan GAD65 Otoantijenine Spesifik CD4⁺ T Hücrelerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

4.1.1. PKMN hücrelerinin GAD65 ile uyarılması ve kümeleşmenin gözlenmesi

Tip 1 diyabet hastalarından elde edilen periferik kandan mononükleer hücre izolasyonu yöntem bölümünde bahsedildiği gibi uygulandı. Elde edilen hücreler (9×10^6), polipropilen yuvarlak tabanlı tüplerde, 500-600 μ l %5 insan serumu ve diğer katkı maddeleri ile zenginleştirilmiş besiyeri içerisinde, 5 μ g/ml GAD65 antijeni ile 2 saat 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde uyarıldı. Enkübasyon sonrasında uyarılmış hücreler, $1,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olmak üzere 96 kuyucuklu "U" tabanlı plağın 60 kuyucuğuna paylaştırıldı. Otuz yedi °C'de CO₂ inkübatörde enkübasyona bırakıldı. Enkübasyonun 5. gününde rekombinant insan İL-2 sitokini (20 U/ml) eklendi. Kültürün 14. gününde makroskopik büyümeler gözle görünür hale geldi.

Her ne kadar 1 numaralı hastadan elde edilen hücrelerde uyarımı takiben ilk 14 günde gözle görünür özgül olmayan çoğalma ve kümeleşme benzeri oluşumlar gözlenmiş olsa da, bu hücreler kültürün ve uyarımın ilerleyen günlerinde çoğalma yetilerini kaybettiler. Dolayısıyla 1 numaralı hastadan elde edilen hücrelerden GAD65 antijenine spesifik otoreaktif T hücre serileri elde edilemedi (Resim 4.1).

Benzer şekilde 2 numaralı hastada da antijen ile uyarımı takiben yaklaşık 1 ay çoğalma ve antijene özgün bir yanıt saptandı. Ancak sonrasında gerek hücrelerin canlılıkları gerekse çoğalma kabiliyetleri azaldı, antijen spesifik T hücre serileri oluşamadı (Resim 4.2).

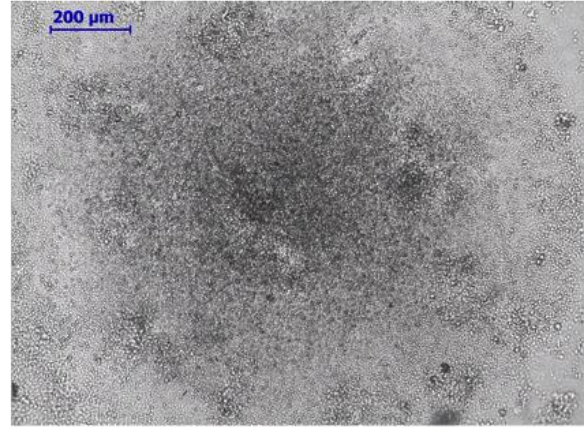
Üç numaralı hastanın hücrelerinde gözlemlenen durum da önceki iki hastadan farklı olmadı. Yaklaşık ilk 30 günlük zaman dilimi içerisinde 3 numaralı hastanın hücreleri antijene cevap verdi ve kümeleşme tarzında çoğalmaya başladı. Ancak 30 gün sonrasında hücre canlılıkları azaldı, antijene cevap veren T hücreler bulunmadığı için çoğalamadılar (Resim 4.3).

Dört numaralı hastadan izole edilen PKMN hücrelerin antijen ile uyarılmasını takiben çoğalma ve kümeleşme kinetikleri artarak devam etti. Başlangıçta 1-2 adet kümeleşme gözlenirken, 30 gün sonrası zaman diliminde kümeleşme oranı her geçen gün daha da arttı (Resim 4.4). Mikroskop görüntüsünü doğrular nitelikte antijen reaktivitesinin MTT testi ile ölçümünde benzer cevaplar saptandı. Çoğalma gösteren kuyucukların akım sitometrisi yapıldı. Ayrıca 72. günden sonra hücreler tek hücre/tek kuyucuk olacak şekilde hesaplanarak limiting dilüsyon yöntemi ile kuyucuklara bölündü. Üzerlerine yaklaşık 20 000 antijen ile uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreler ilave edildi.

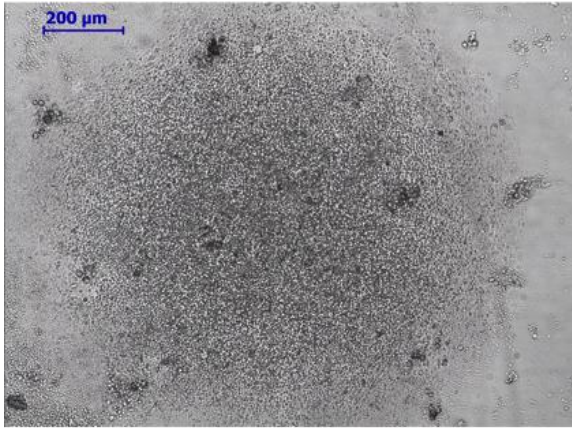
Beş numaralı hastadan elde edilen PKMN hücreler 5 µg/ml GAD65 antijeni ile her 14 günde bir uyarıldı. Dört numaralı hastaya benzer şekilde oluşan kümeleşme gün geçtikçe artarak devam etti (Resim 4.5). Çoğalmanın görüldüğü kuyucuklar her iki günde bir ayrı kuyucuklara bölündü. İL-2 ve PHA eklenerek hücreler çoğaltıldı. Çoğalan kuyucuklardan akım sitometrisi yapılarak elde edilmiş olan T hücre serisinin karakterizasyonu yapıldı. Kültürün 60. gününden sonra hücreler tek hücre tek kuyucuk olacak şekilde limiting dilüsyon yöntemi ile kuyucuklara paylaştırıldı. Üzerine GAD65 antijeni ile uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış yaklaşık 2×10^4 otolog PKMN hücre ilave edildi.



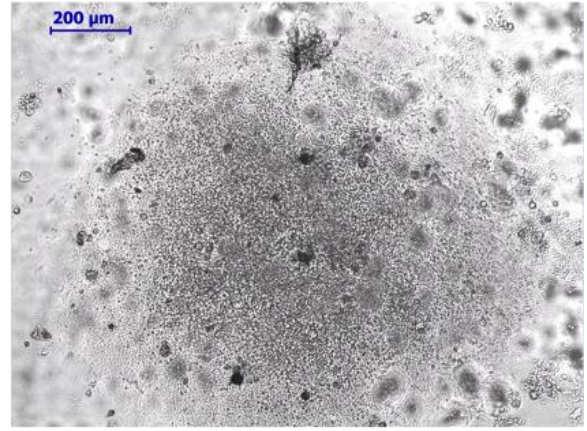
10.gün



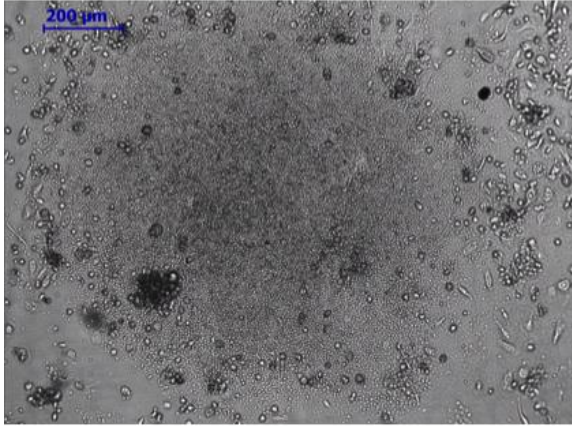
27.gün



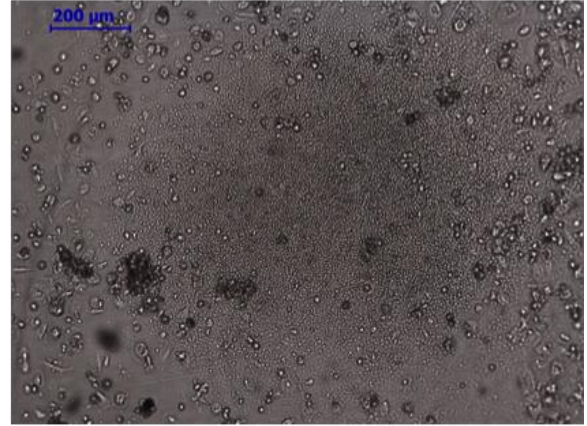
29.gün



38.gün

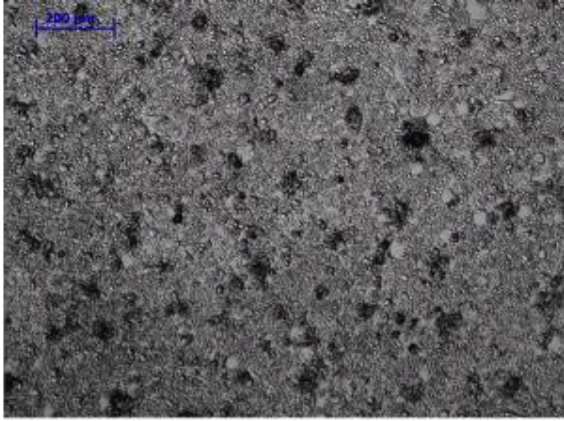


48.gün

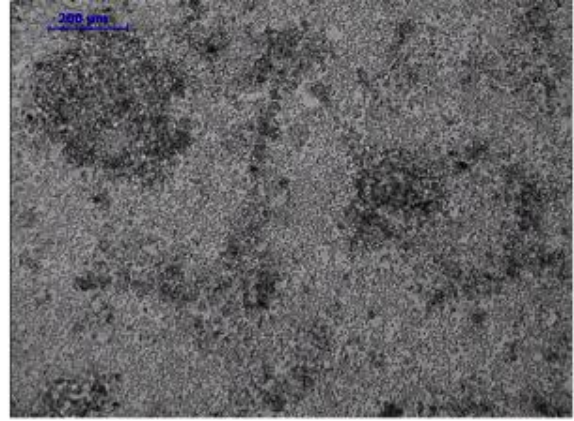


50.gün

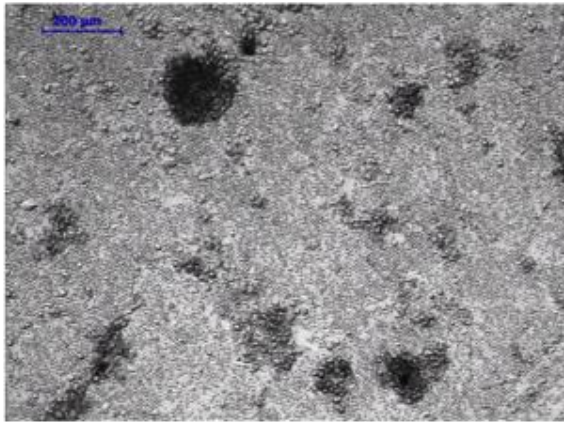
Resim 4.1. PKMN hücreleri izole edilerek GAD65 antijeni ile uyarılmış 1 numaralı hasta hücrelerinin antijene verdikleri yanıt.



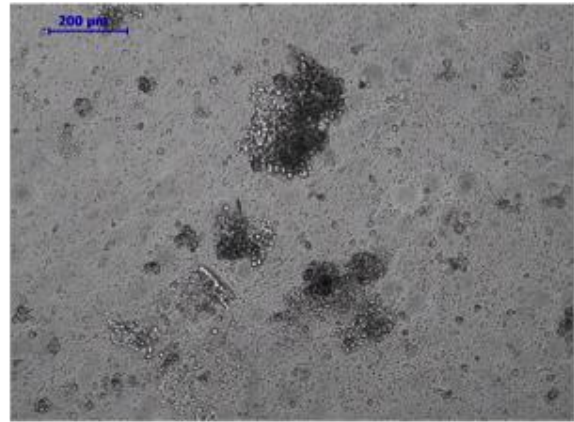
13. gün



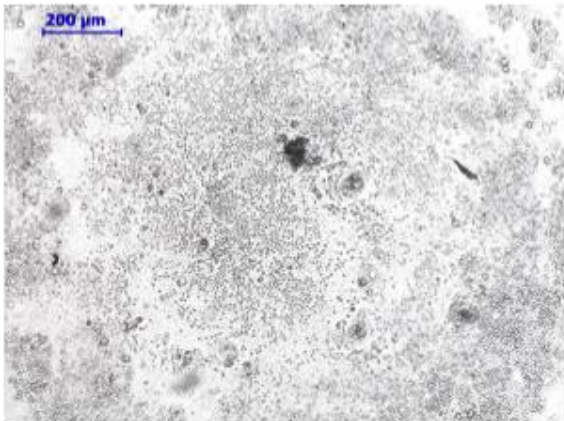
16. gün



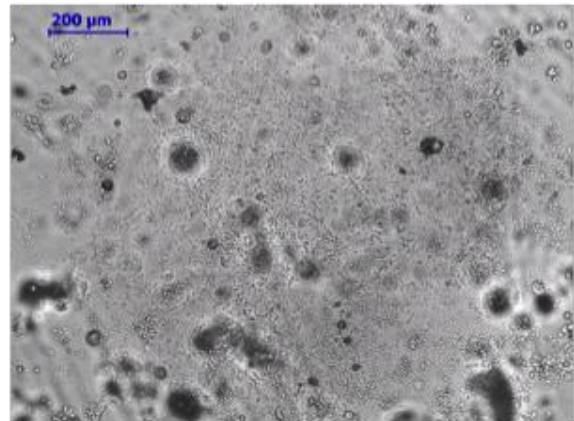
19. gün



22. gün

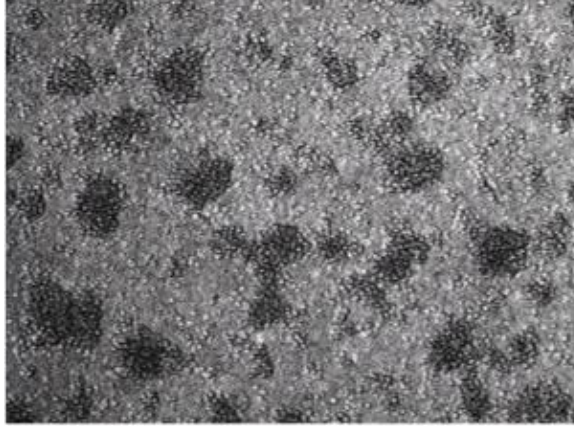


27. gün

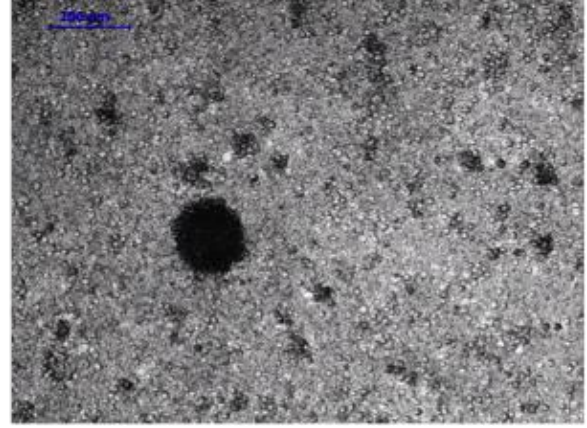


36. gün

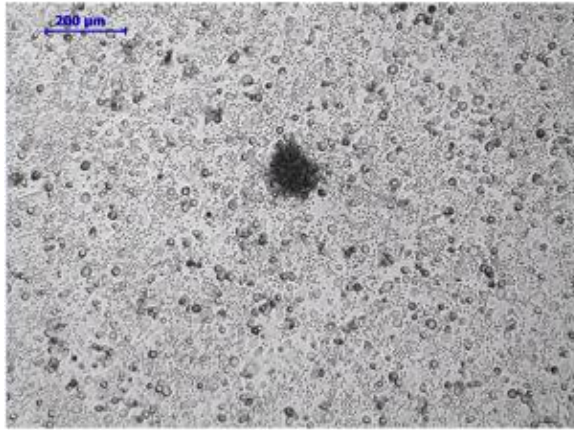
Resim 4.2. PKMN hücrelerinin izolasyonunu takiben belirli zaman aralıklarıyla GAD65 antijeni ile kültüre edilen 2 numaralı hasta hücrelerinin antijene verdikleri yanıt.



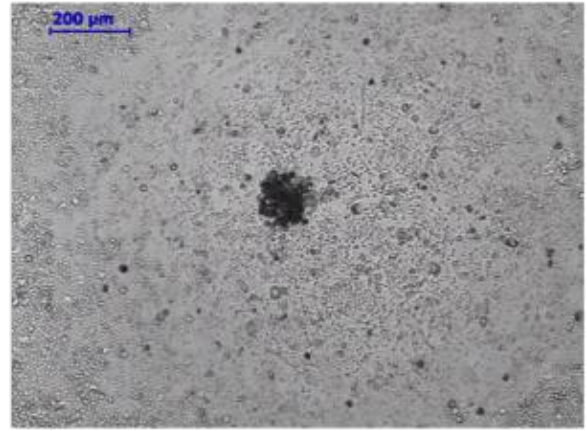
10. gün



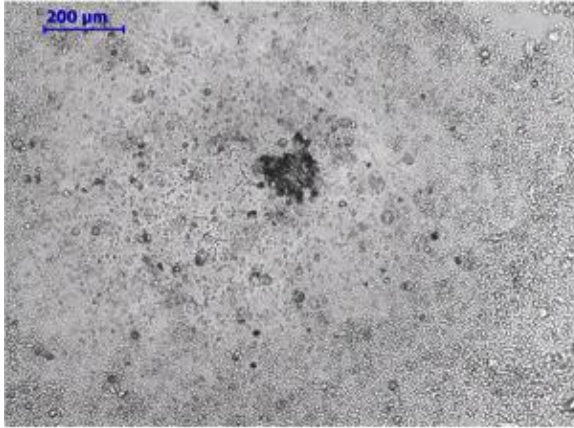
14. gün



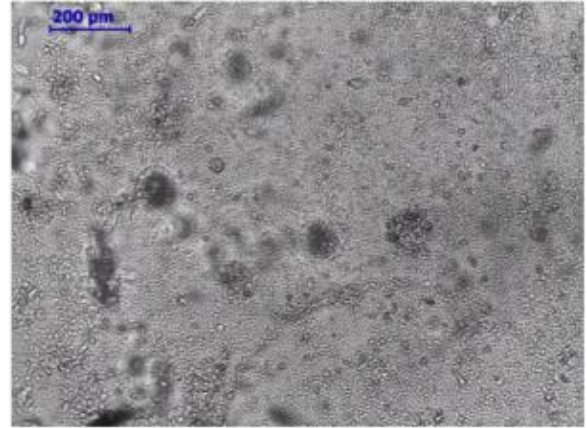
20. gün



26. gün

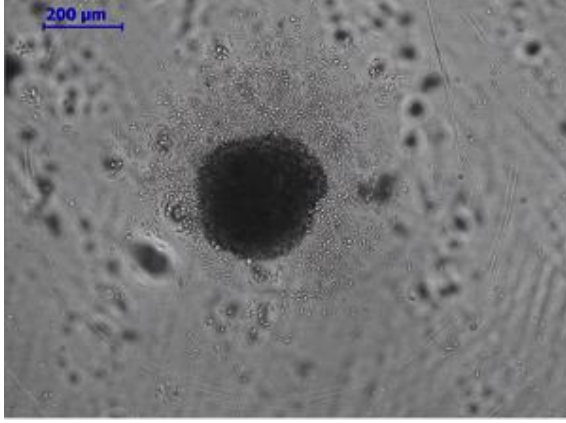


30. gün

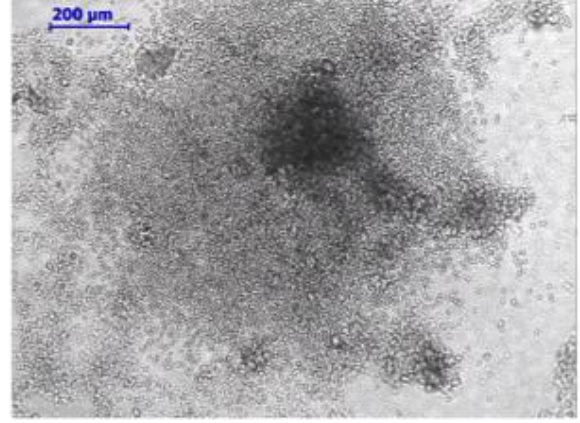


37. gün

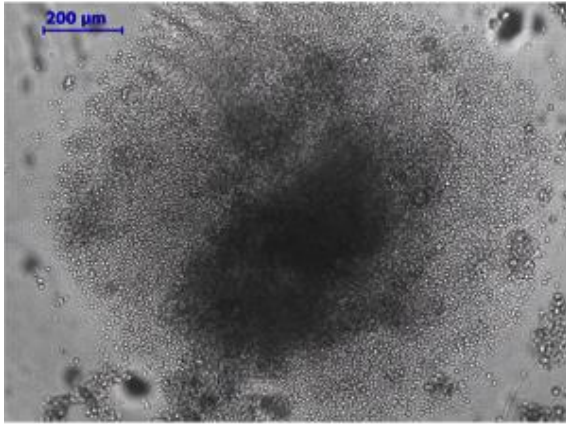
Resim 4.3. PKMN hücrelerinin belirli zaman aralıklarıyla GAD65 antijeni ile kültüre edilmesi sonucu, 3 numaralı hasta hücrelerinin antijene verdikleri yanıt.



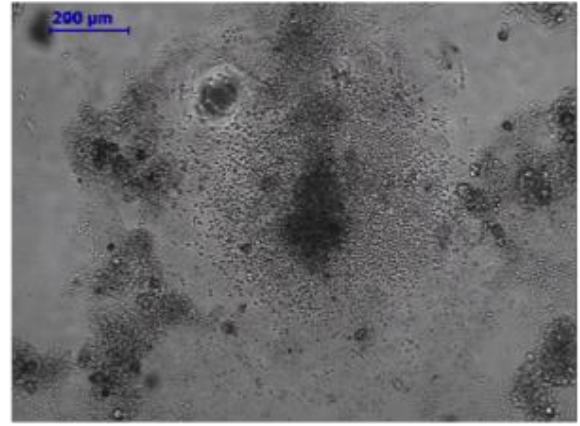
15. gün



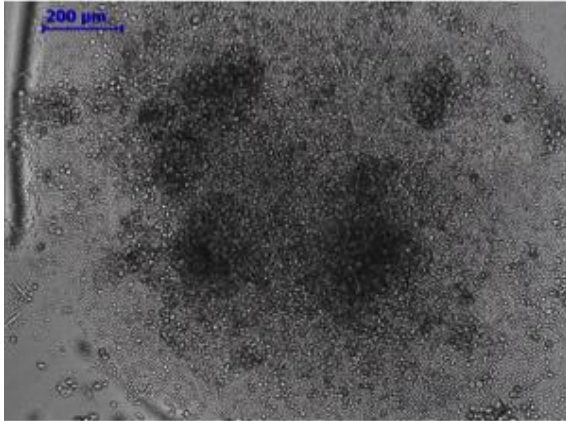
18. gün



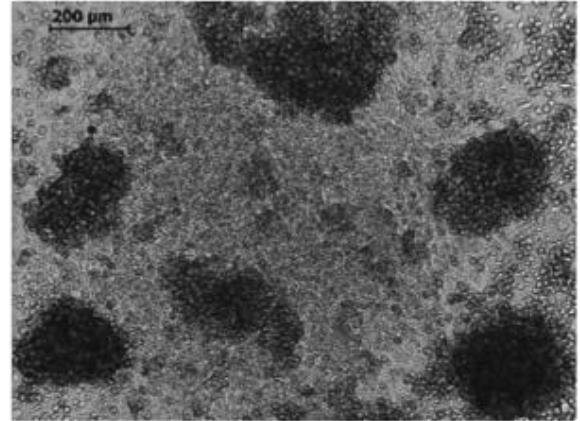
22. gün



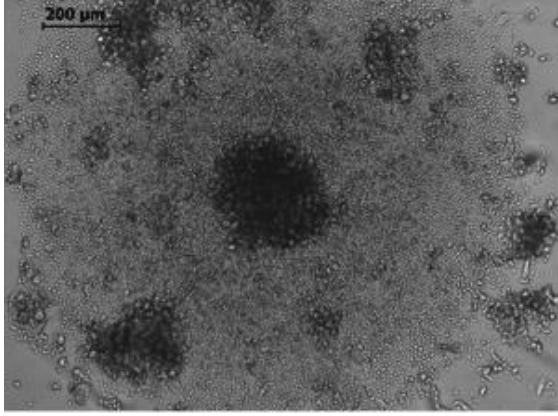
28. gün



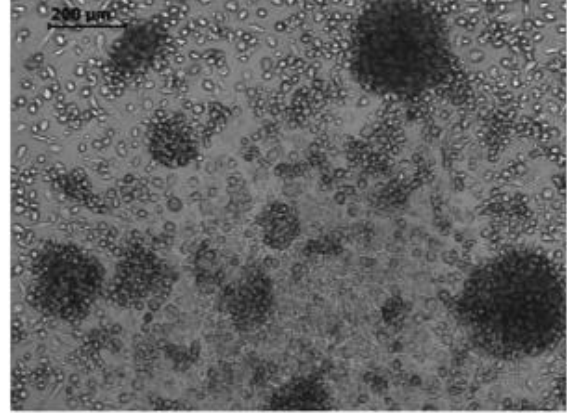
33. gün



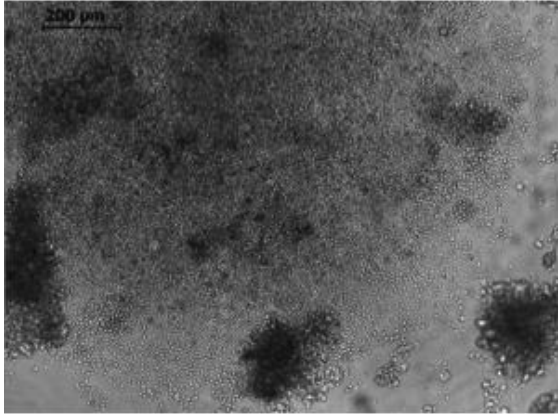
35. gün



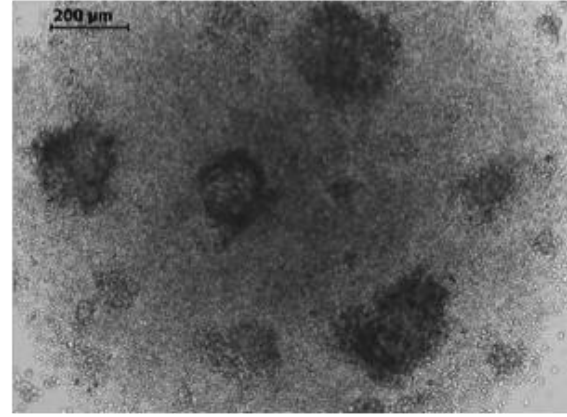
41. gün



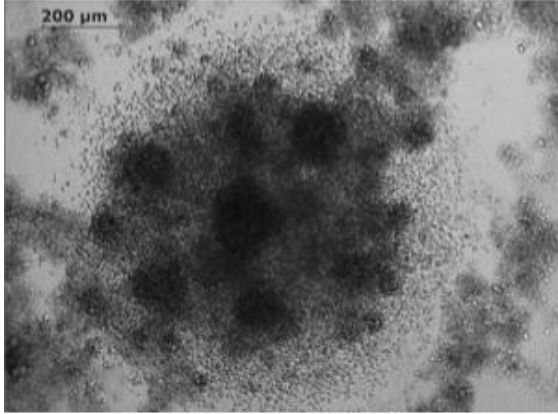
44. gün



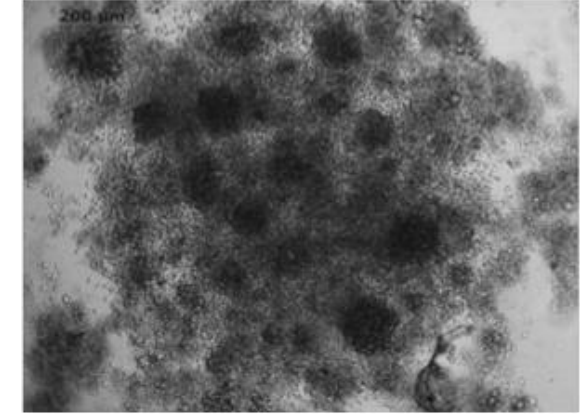
53. gün



59. gün

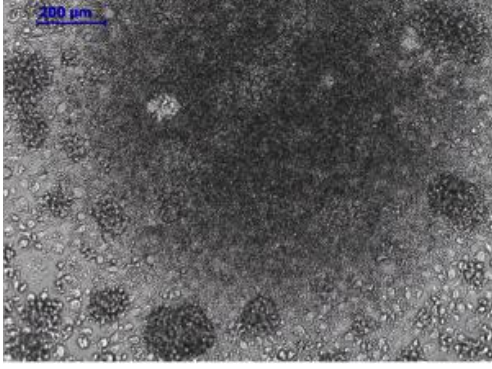


69. gün

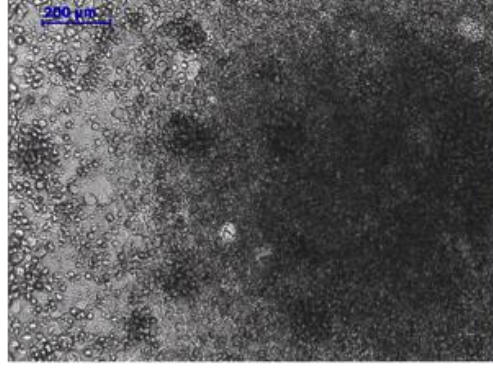


72. gün

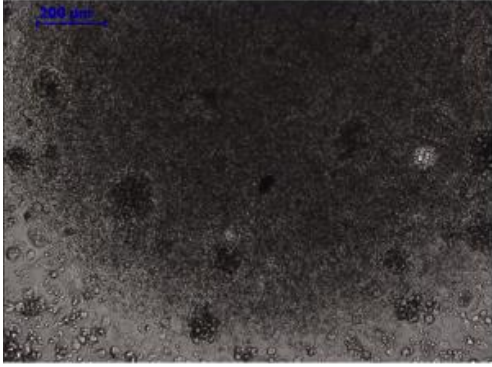
Resim 4.4. GAD65 antijeni ile seri uyarımlar sonrası aktive olan 4 numaralı hastanın otoreaktif T hücrelerinde oluşan kümeleşmenin ışık mikroskobu ile görünümü.



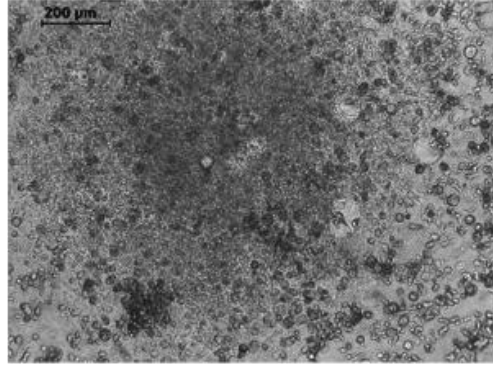
9. gün



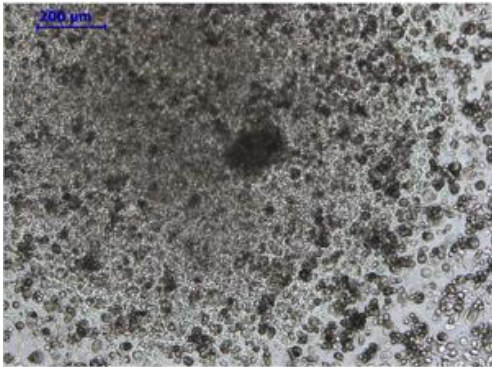
13. gün



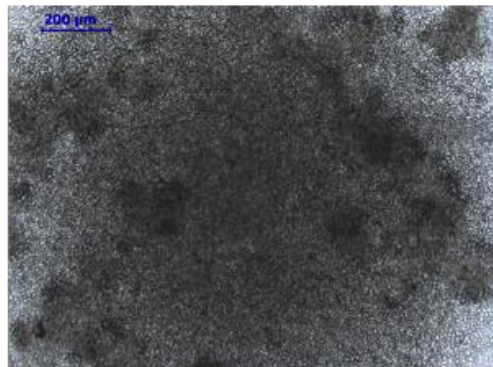
23. gün



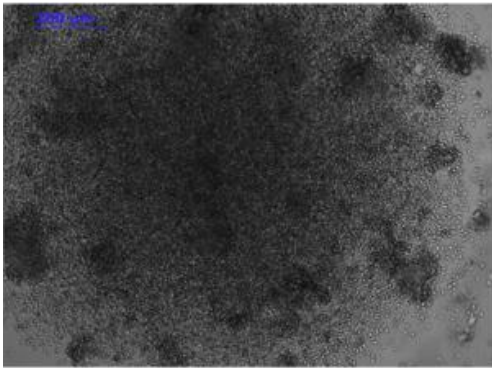
29. gün



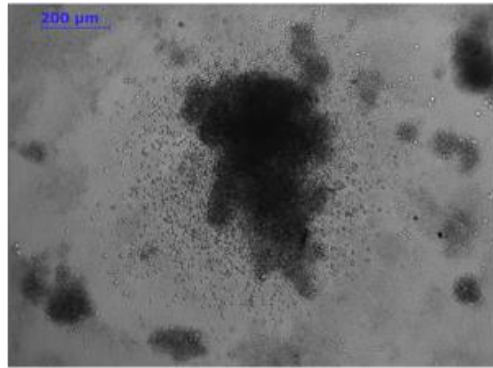
42. gün



47. gün



57. gün



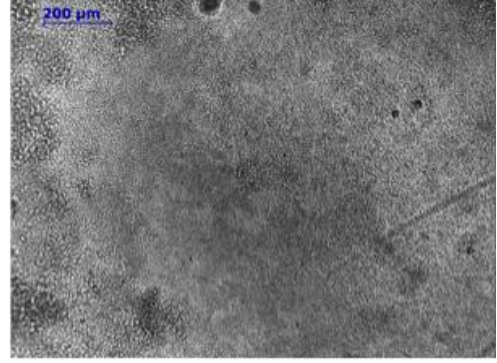
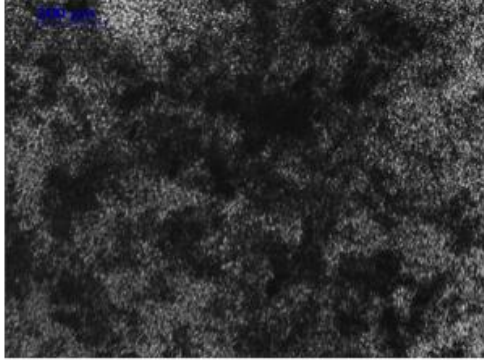
60. gün

Resim 4.5. GAD65 antijeni ile seri uyarımlar sonrası aktive olan 5 numaralı hastanın otoreaktif T hücrelerde oluşan kümeleşmenin ışık mikroskobu ile görünümü

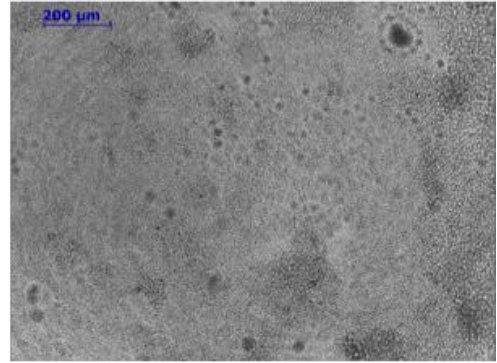
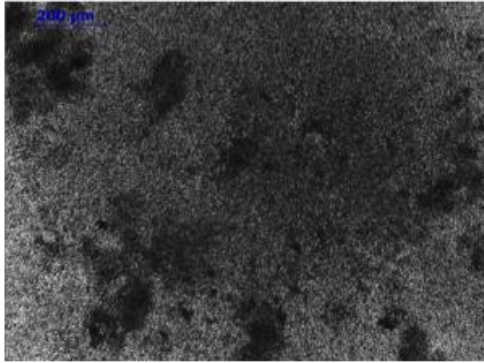
4.1.2. “Limiting dilüsyon” yöntemi ile T hücrelerin klonlaştırılması

Tip 1 diyabet hastalarından izole edilen PKMN hücrelerinin her 14 günde bir antijenle uyarımı sonrasında antijene yanıt veren T hücre serilerinin klonlaştırılması amacıyla “limiting dilüsyon” yöntemi uygulandı. Bu sürece kadar MTT testinde yüksek proliferatif yanıt veren ve/veya hücre kültüründe yüksek kinetikle çoğalan ve kümeleşen T hücre serileri seçildi. Kültürün 60. gününden sonra hücreler tek hücre tek kuyucuk olacak şekilde kuyucuklara paylaştırıldı. Üzerine GAD65 antijeni ile uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış yaklaşık 2×10^4 otolog PKMN hücre ilave edildi. Her 2-3 günde bir 20 U/ml rh-İL-2 ve 2,5 µg/ml PHA ilave edildi. Kültürün 15. gününde ışık mikroskopunda çoğalan kuyucuklar gözlendi. Resim 4.6’da limiting dilüsyon yapılan 4.2C, 4.6A ve 5.3C T hücre serilerinin antijene yanıt veren/çoğalan kuyucukları ve antijene yanıt vermeyen kuyucukları gösterildi.

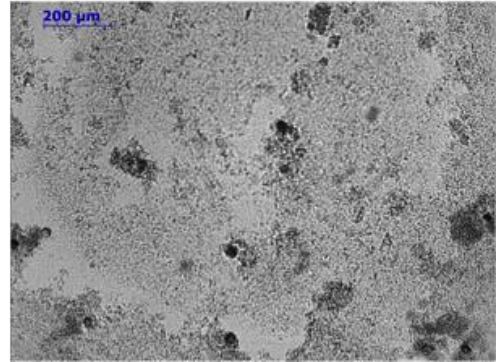
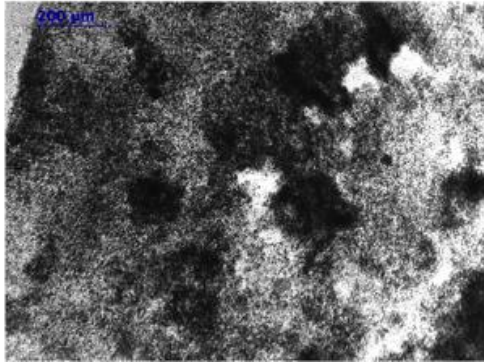
4.2C



4.6A



5.3C



Resim 4.6. GAD65 antijeni reaktif 4.2C, 4.6A ve 5.3C T hücre serilerinin “limiting dilüsyon” sonrası çoğalmalarının ışık mikroskobu ile gösterimi. Sol sütun antijene yanıt veren ve çoğalan kuyucukları, sağ sütun antijene cevap vermeyen kuyucukları göstermektedir.

4.1.3. Antijen reaktivitesine bağı hücre çoğalmasının ölçülmesi

Kültürde GAD65 antijenine spesifik T hücrelerin sağ kalımlarının ve çoğalmalarının artırılması amacıyla, hücreler her 14 günde bir GAD65 antijeni ile uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreleri ile kültüre edildi. Çoğalmanın görüldüğü kuyucuklarda antijen reaktivitesini ölçmek amacıyla ilk antijenle uyarımı takiben 1 ay sonra MTT proliferasyon testi uygulandı. Bu amaçla her kuyucuk 4 ayrı kuyucuğa bölündü (toplam 5 kuyucuk). Dört parçaya bölünen kuyucukların ikisine antijen ile uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreler ($1,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk) eklenirken, diğer iki kuyucuğa antijen ile uyarılmamış radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreler eklendi. Hücreler 48 saat 37 °C'de enkübe edildi. Enkübasyonun 48. saatinde MTT solüsyonu hücrelerin üzerine eklendi. Dört saat sonra %10'luk SDS solüsyonu eklenerek hücreler parçalandı ve açığa çıkan formazan konsantrasyonu mikropilaka okuyucuda okutuldu.

Bir, iki ve üç numaralı hasta

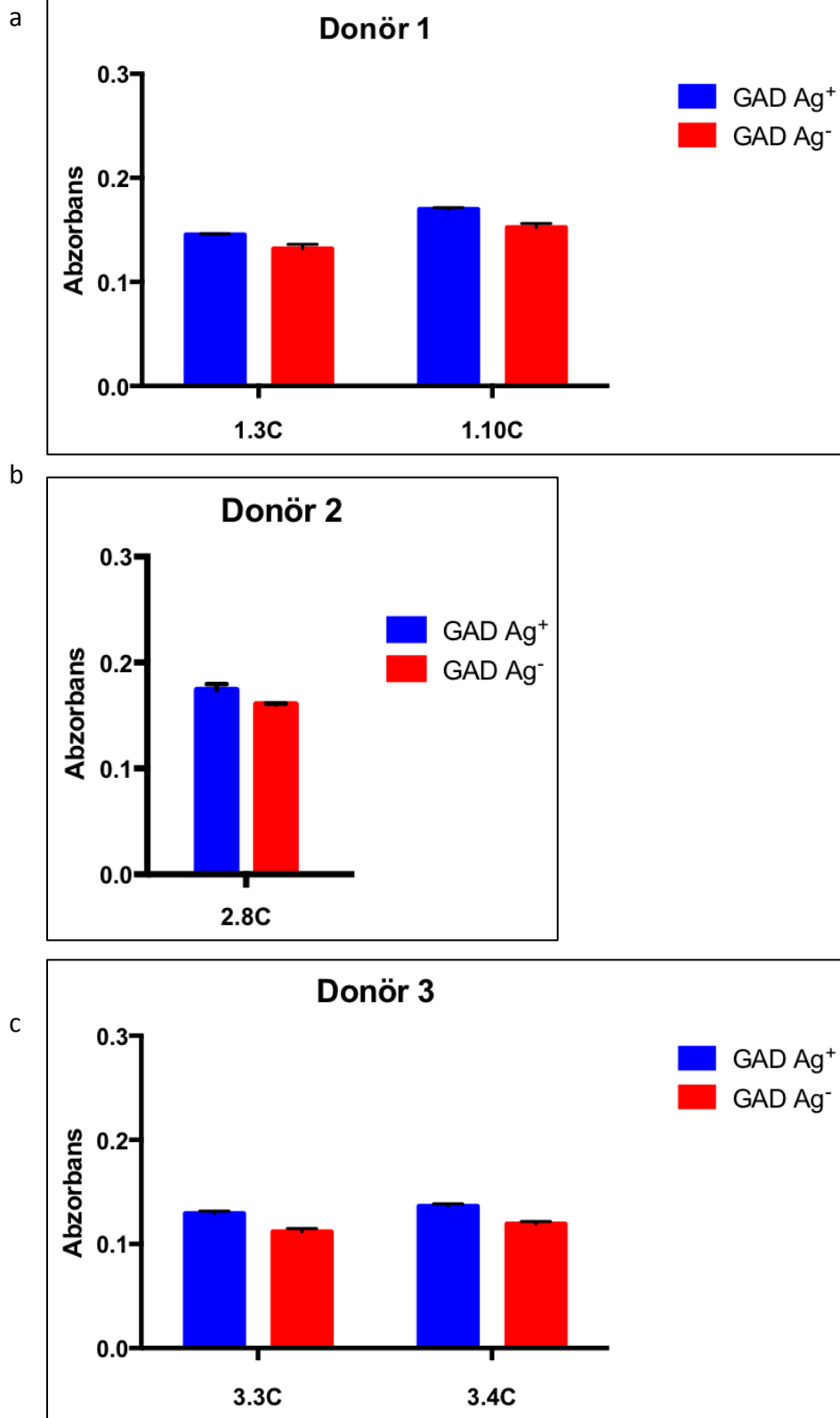
Hücre kültürünün 30. gününden uyarım sonrası uygulanan MTT testinde, 1, 2 ve 3 numaralı hastaların antijenle uyarılmış ve antijenle uyarılmamış kuyucukları arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Bu hastaların hücreleri 30. günden sonra tamamen çoğalma yetilerini kaybettiler. Bu nedenle daha sonraki MTT testi için yeterli hücre barındırmadıkları için sonraki tur MTT testleri yapılamadı (Şekil 4.1).

Dört numaralı hasta

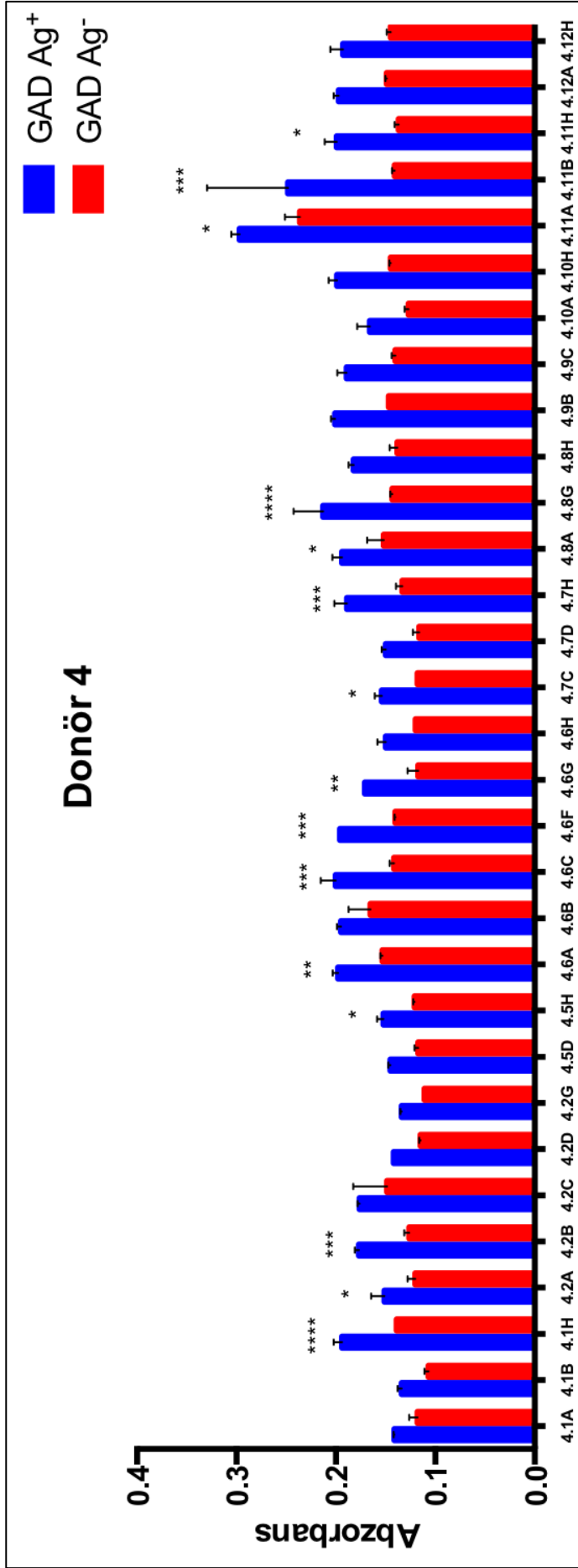
Dört numaralı hastanın 30 gün sonrası antijen ile uyarımında antijenle uyarılmış ve antijenle uyarılmamış kuyucukları arasında yüksek düzeyde farklılık saptanmadı (Şekil 4.2). Düşük düzeyde de olsa iki grup arasında farklılık gösteren kuyucuklara GAD65 antijeni ile uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreler eklenerek kültürün devam etmesine çalışıldı. İkinci tur stimülasyonda bazı kuyucuklarda, antijenle uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücrelerin eklendiği grup ile, antijen ile uyarılmamış ve radyasyona maruz bırakılmış PKMN hücrelerinin eklendiği grup arasında anlamlı farklılık gözlemlendi (Şekil 4.3).

5 numaralı hasta

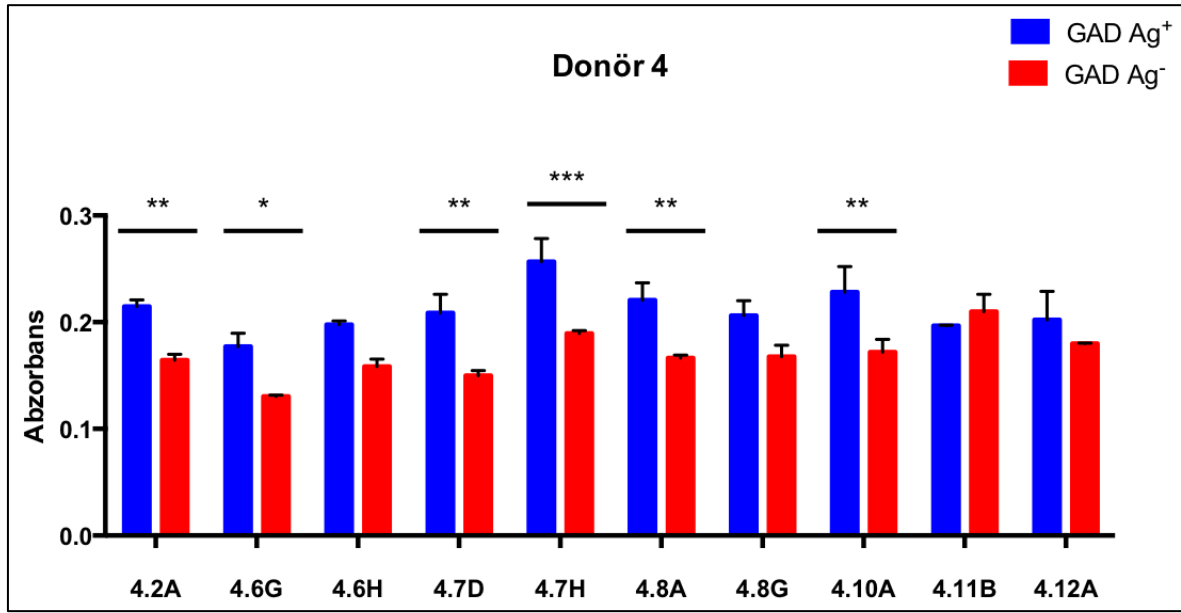
Beş numaralı hastanın GAD65 antijeni ile uyarımının 30. gününde, hücreler MTT testi amacıyla tekrar antijen ile uyarıldı. Uyarımın 48. saatinde bazı kuyucukların negatif ve pozitif grupları arasında anlamlı farklılık gösterildi (Şekil 4.4). MTT testinde proliferatif yanıt veren kuyucukların GAD65 antijeni ile her 14 günde bir uyarımlarına devam edildi. Mikroskopik olarak da kümeleşme görülen kuyucuklar, ikinci tur MTT stimülasyonu için ayrıldı. İkinci tur MTT stimülasyonu sonrası, GAD65 antijeni ile uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış PKMN hücrelerin eklendiği grup, GAD65 antijeni ile uyarılmamış ve radyasyona maruz bırakılmış PKMN hücrelerinin eklendiği gruba oranla anlamlı düzeyde yüksek bulundu (Şekil 4.5).



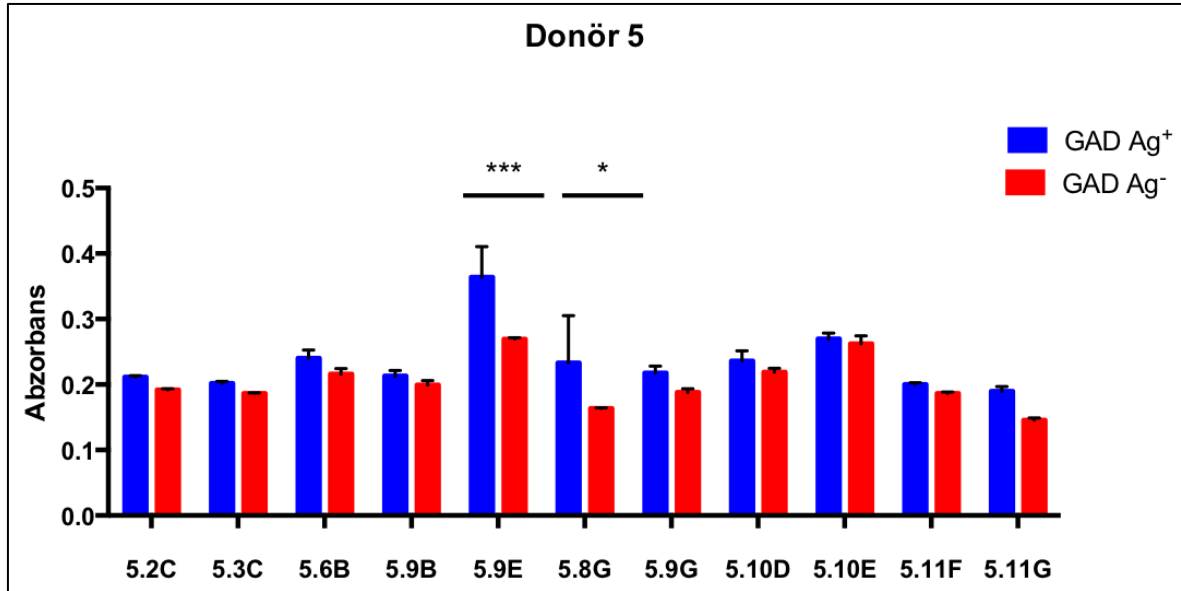
Şekil 4.1. Birinci (a), ikinci (b) ve üçüncü (c) hastaların MTT proliferasyon testine verdikleri cevap. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış grubu, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış grubu göstermektedir. X eksenı kuyucuk numaralarını, Y eksenı OD değeri göstermektedir. MTT testi çift kuyucuk olarak çalışılmıştır.



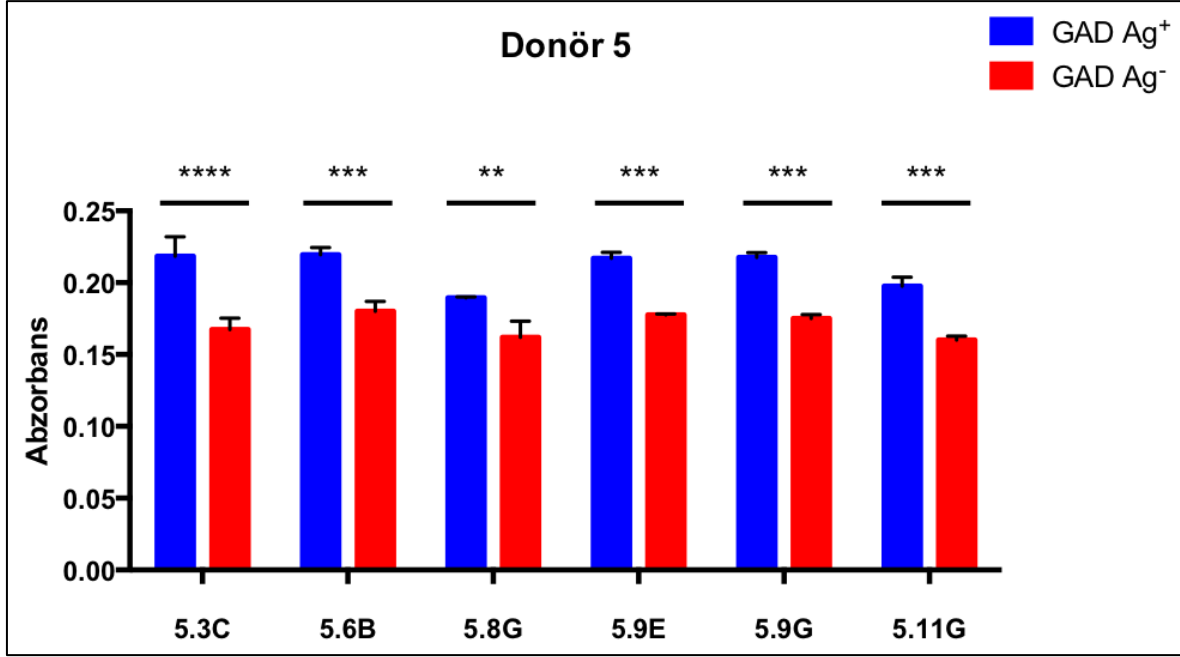
Şekil 4.2. Dört numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijenine olan cevaplarının MTT proliferasyon testi ile taranması. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış grubu, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış grubu göstermektedir. X eksenı kuyucuk numaralarını, Y eksenı OD değeriini göstermektedir. MTT testi çift kuyucuk olarak çalışılmıştır. *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$.



Şekil 4.3. İkinci tur uyarım sonrası 4 numaralı hasta hücrelerinin antijen reaktivitesinin MTT testi ile analizi. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış grubu, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış grubu göstermektedir. X eksenı kuyucuk numaralarını, Y eksenı OD değeri göstermektedir. MTT testi çift kuyucuk olarak çalışılmıştır. *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$.



Şekil 4.4. Beş numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası MTT proliferasyon testi ile antijen reaktivitelerinin ölçümü. Her kuyucuk için GAD65 ile uyarılarak ve uyarılmayarak stimülasyon indekslerine bakıldı. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış grubu, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış grubu göstermektedir. X eksenı kuyucuk numaralarını, Y eksenı OD değeri göstermektedir. MTT testi çift kuyucuk olarak çalışılmıştır. *, $p<0.05$, ***, $p<0.001$.



Şekil 4.5. İkinci tur uyarım sonrası 5 numaralı hasta hücrelerinin antijen reaktivitesinin MTT testi ile analizi. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış grubu, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış grubu göstermektedir. X eksenı kuyucuk numaralarını, Y eksenı OD değeri göstermektedir. MTT testi, çift kuyucuk olarak çalışılmıştır. **,p<0.01, ***,p<0.001.

4.1.4. Otoreaktif T hücre serilerinin akım sitometri yöntemi ile analizi

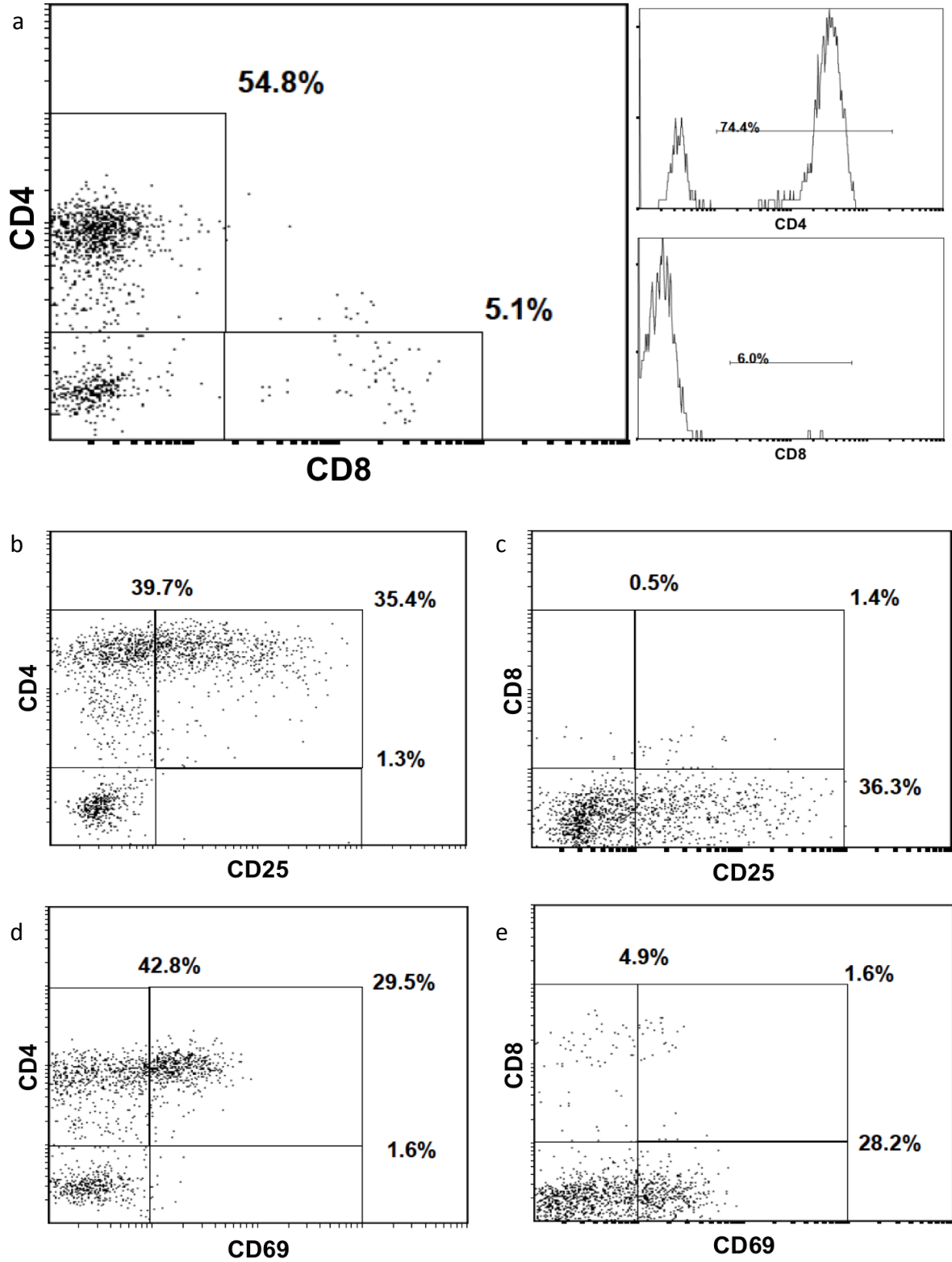
MTT testi sonucunda çoğalma görülen kuyucuklar seçilerek yaklaşık 2 hafta boyunca her iki günde bir hücreler yeni kuyucuklara bölünüp, 20 U/ml İL-2 ve 2,5 µg/ml PHA ilavesi yapılarak çoğaltıldı. Yaklaşık $0,5-1 \times 10^6$ hücre elde edildikten sonra CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ ve CD69⁺ antikorları ile boyanarak akım sitometrik analizleri yapıldı. Dört ve beş numaralı hastanın otoreaktif hücre serilerinde yapılan akım sitometrik analizde T hücre serilerinin büyük çoğunluğunun CD4⁺ T hücreler oldukları gösterildi (Şekil 4.6a, Şekil 4.7a). Buna karşın 4 numaralı hasta (%6) ve beş numaralı hasta (%3,5) hücrelerinde düşük düzeylerde CD8⁺ T hücrelere rastlandı (Şekil 4.6a, Şekil 4.7a).

Elde edilen CD4⁺ T hücrelerin aktivasyon fenotiplerini analiz etmek amacıyla CD25 antikorları kullanıldı. Dört numaralı hastadan izole edilen antijen spesifik CD4⁺ T hücre serilerinin yüksek düzeyde CD25 eksprese ettikleri (% 35.4) (Şekil 4.6b) gözlemlendi. Bunun yanında var olan CD8⁺ T hücrelerin büyük çoğunluğunun CD25 ekspresyonu yaptığı gösterildi (Şekil 4.6c). Benzer şekilde beş numaralı hastanın CD4⁺ T hücrelerinde de kayda

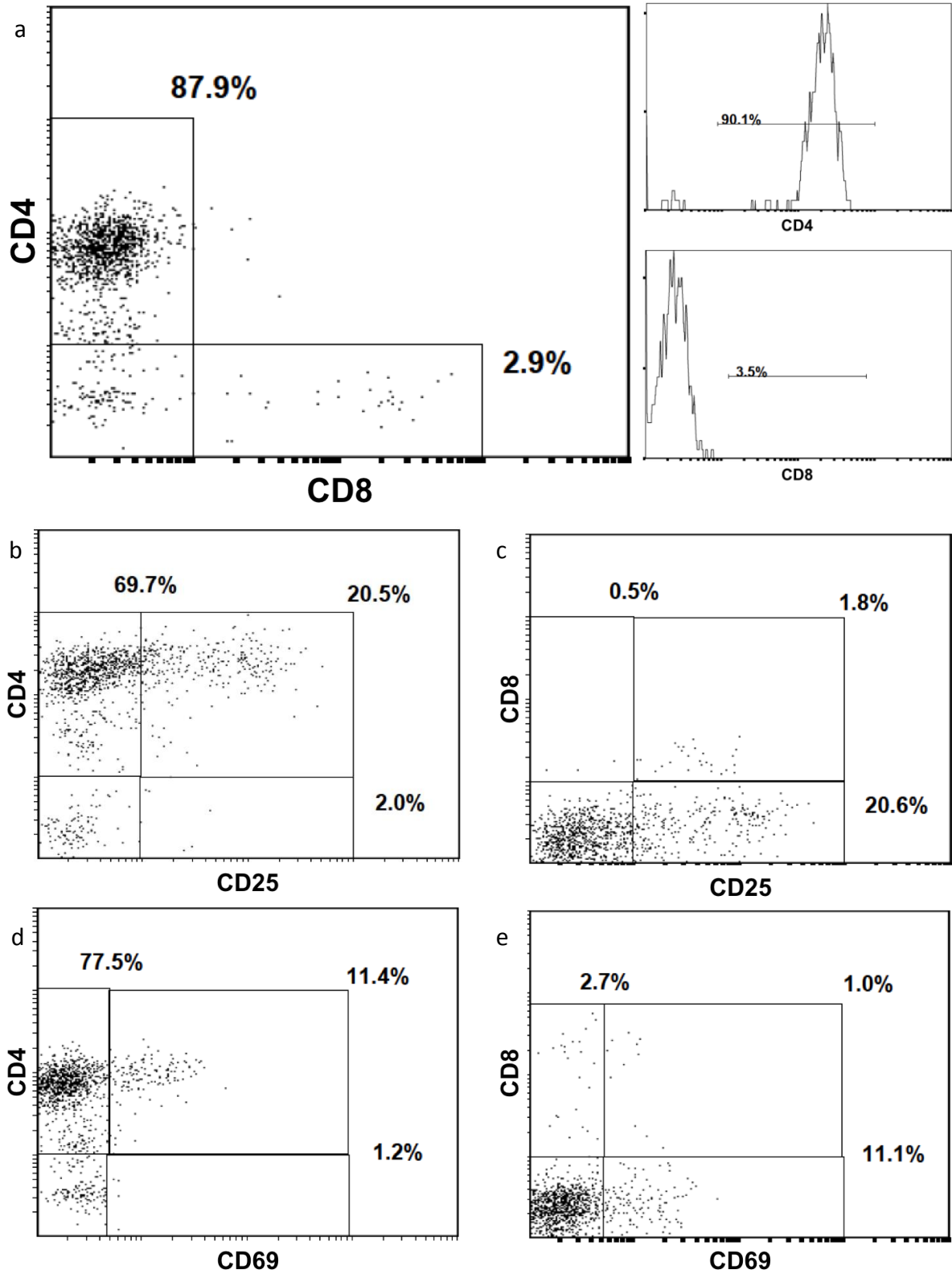
değer CD25 ekspresyonun (%20,5) (Şekil 4.7b) varlığı gözlemlendi. Beş numaralı hastanın var olan düşük miktardaki CD8⁺ T hücrelerinin büyük çoğunluğunun CD25 pozitifliği gösterdiği saptandı (Şekil 4.7c).

CD25 ekspresyonuna ilave olarak, bir diğer aktivasyon belirteci olan CD69'un ekspresyon düzeyi analiz edilerek, T hücrelerin aktive fenotipte olup olmadıkları belirlendi. Dört numaralı hastanın CD4⁺ T hücrelerinin yüksek düzeyde CD69 eksprese ettikleri (% 29,5) (Şekil 4.6d), bunun yanında CD8⁺ T hücrelerin de bir miktar CD69 eksprese ettikleri (%1,6) gözlemlendi (Şekil 4.6e). Beş numaralı hasta da ise 4 numaralı hastaya oranla daha düşük düzeyde CD4⁺CD69⁺ T hücre popülasyonu (% 11,4) saptandı (Şekil 4.7d). Beş numaralı hastanın var olan CD8⁺ T hücrelerinde, düşük düzeyde CD69 eksprese eden (%1) hücre popülasyonuna rastlandı (Şekil 4.7e).

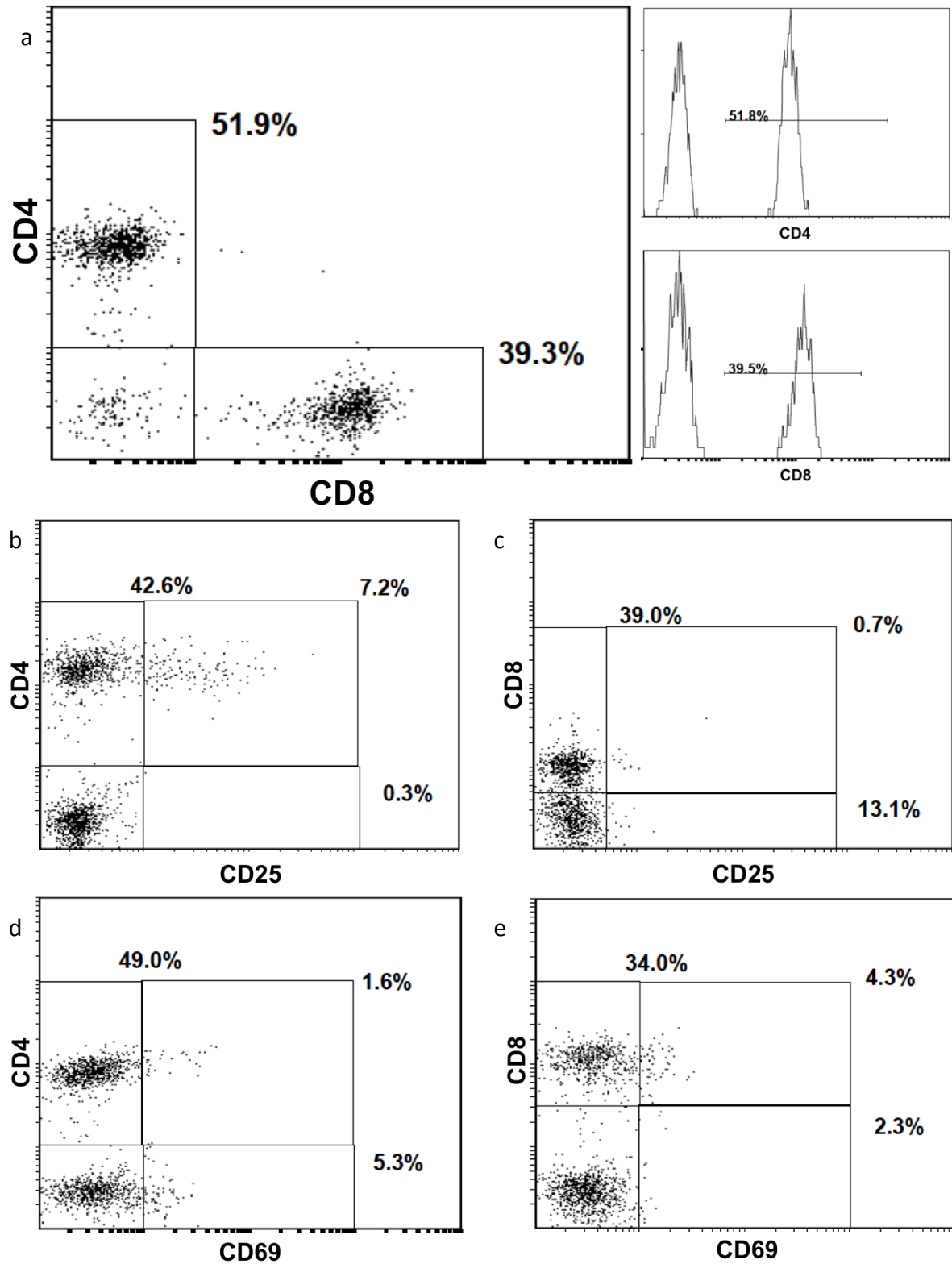
Sağlıklı kontrol hastanın CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre yüzdeleri analiz edildiğinde, hem CD4⁺ (%51,9) hem de CD8⁺ (%39,3) T hücreleri yüksek miktarda barındırdıkları gözlemlendi (Şekil 4.8a). CD25 ekspresyonları incelendiğinde, CD4⁺CD25⁺ (%7,2) (Şekil 4.8b), CD8⁺CD25⁺ (%0,7) (Şekil 4.8c), T hücrelerin dört ve beş numaralı hastaya oranla oldukça düşük düzeyde oldukları saptandı. Benzer şekilde, CD4⁺CD69⁺ (% 1,6) (Şekil 4.8d) ve CD8⁺CD69⁺ (% 4,3) (Şekil 4.8e) hücre yüzdeleri diyabetik hastalara göre oldukça düşük düzeyde olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.6. Dört numaralı hastaya ait otoreaktif T hücrelerin GAD65 antijeni ile belirli periyotlarla uyarımı sonrasında yüzey belirteçlerinin akım sitometrisi ile analizi. Hücreler CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ ve CD69⁺ hücre yüzey antikorları ile boyandı. CD4⁺, CD8⁺ (a), CD4⁺CD25⁺ (b), CD8⁺CD25⁺ (c), CD4⁺CD69⁺ (d), CD8⁺CD69⁺ (e) hücre popülasyonları analiz edildi.



Şekil 4.7. Beş numaralı hastaya ait otoreaktif T hücrelerin GAD65 antijeni ile belirli periyotlarla uyarımı sonrasında yüzey belirteçlerinin akım sitometrisi ile analizi. Hücreler CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ ve CD69⁺ hücre yüzey antikörleri ile boyandı. CD4⁺, CD8⁺ (a), CD4⁺CD25⁺ (b), CD8⁺CD25⁺ (c), CD4⁺CD69⁺ (d), CD8⁺CD69⁺ (e) hücre popülasyonları analiz edildi.



Şekil 4.8. Sağlıklı kontrol hastasından alınan PKMN hücrelerinin GAD65 antijeni ile uzun süreli kültürü sonrasında hücrelerin fenotipik özelliklerinin akım sitometrisi ile analizi. Hücreler CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺ ve CD69⁺ hücre yüzey antikorları ile boyandı. CD4⁺, CD8⁺ (a), CD4⁺CD25⁺ (b), CD8⁺CD25⁺ (c), CD4⁺CD69⁺ (d), CD8⁺CD69⁺ (e) hücre popülasyonları analiz edildi.

Yorum

T1D ve sağlıklı bireylerden elde edilen PKMN hücreler, GAD65 antijeni ile kültür ortamında 14 gün boyunca uyarıldılar. Ardından uygulanan MTT testi ile çoğalan ve antijene cevap veren kuyucuklar seçilerek uyarılmaya devam edildi. Her 14 günde bir GAD65 antijeni ile uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreler kültür ortamına ilave edildiler. Yaklaşık 60 günlük hücre kültürü ve antijen uyarımının ardından MTT testi sonuçları ve mikroskopik olarak çoğalma gösteren kuyucuklar göz önünde bulundurularak, antijen reaktif kuyucuklar seçildi. T hücre serilerini içeren bu kuyucuklar, her iki günde bir bölünerek İL-2 ve PHA ilavesi yapıldı. Böylelikle kümeleşmenin olduğu kuyucuklar çoğaltılıp, akım sitometrisi için uygun hücre sayısına erişilmeye çalışıldı. Hücreler CD4, CD8, CD25 ve CD69 antikorları ile boyanarak fenotipik analizleri yapıldı.

Diyabetik bireylerden elde edilen otoreaktif T hücrelerin büyük çoğunluğunun CD4⁺ T hücreler olduğu gösterildi. Ancak sağlıklı kontrol bireyden elde edilen ve aynı şartlarda kültür ortamında çoğaltılan hücrelerin hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. Bu sonuçlar diyabetik hastalardan elde ettiğimiz T hücrelerin tek tip T hücre alt grubu olduklarını ve otoreaktif T hücre klonu olmaya adandıklarını göstermektedir. Aksine sağlıklı bireyin T hücrelerinin heterojen popülasyondan oluştukları, dolayısıyla T hücre klonu yada serilerinin elde edilemediğini gösterdi. Elde edilen T hücre serilerinin aktivasyon fenotiplerinin analizi, CD69 ve CD25 hücre yüzey moleküllerinin ekspresyon düzeylerine bakılarak yapıldı. Diyabetik hasta grubunda GAD65 reaktif CD4⁺CD25⁺ T hücre ve CD4⁺CD69⁺ T hücre yüzdeleri kontrol bireye oranla oldukça yüksek bulundu. Bu sonuçlar, T1D hastalarından izole edilen otoreaktif T hücrelerinin GAD65 antijenine karşı aktive olarak yanıt verdiklerini kanıtlar niteliktedir. Sağlıklı kontrol hastada ise antijen spesifik T hücreler yer almadığı için var olan T hücreler aktive olamadılar, bu nedenle CD25 ve CD69 ekspresyonları düşük düzeyde saptandı.

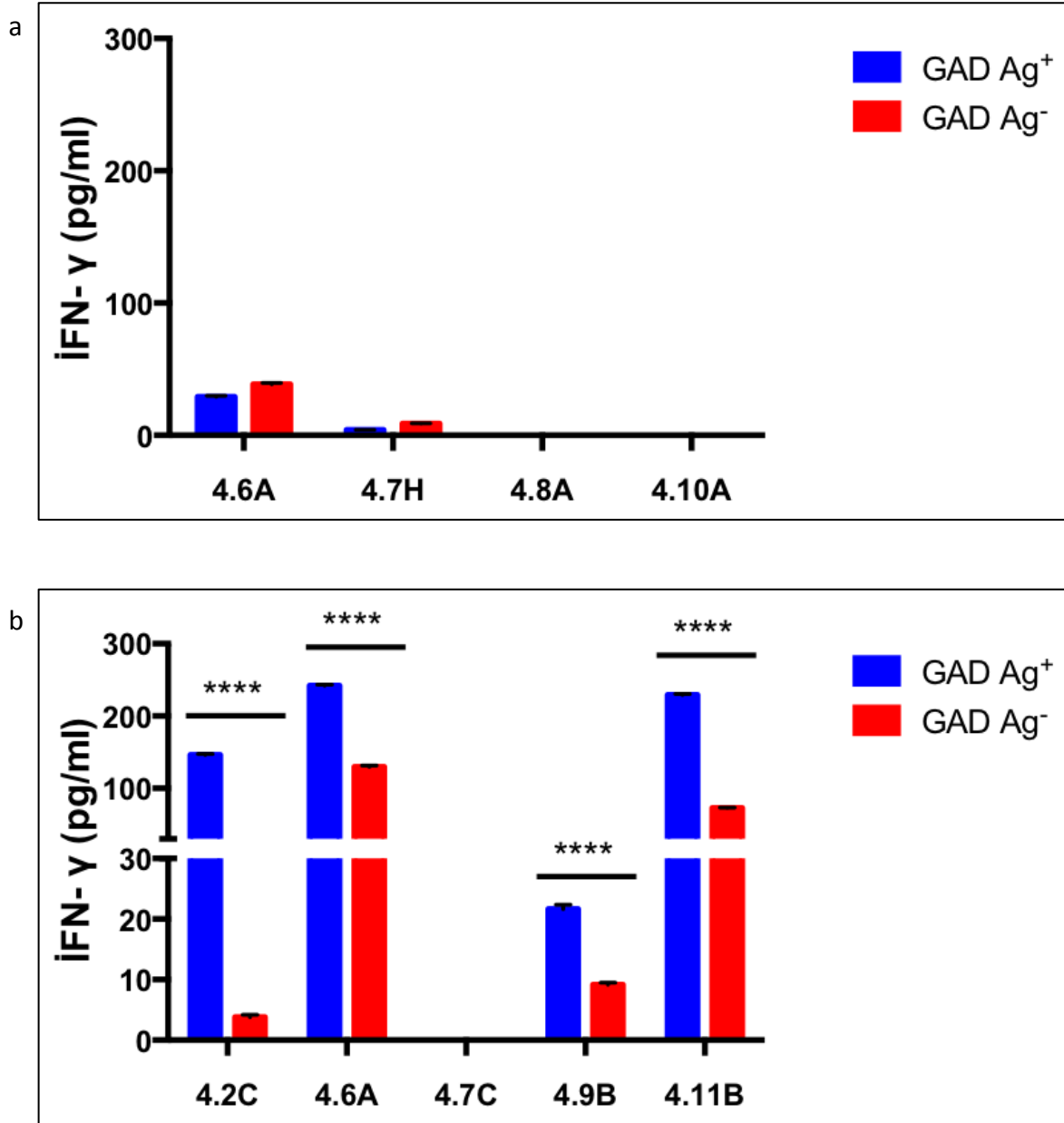
4.1.5. Otoreaktif T hücre serilerinin sitokin salgılama profilleri

Hastalardan elde edilen hücrelerin konuldukları kuyucuklarda mikroskobik büyüme gözlenen ve MTT testinde kontrol grubuna oranla çoğalan kuyucuklar GAD65 antijeni ile uyarılarak salgıladıkları sitokin cevapları analiz edildi. Kültürün başladığı birinci ve ikinci aylık zaman dilimleri sonrasında hücreler, antijen ile uyarılmış otolog PKMN hücreler ile uyarıldı. Uyarımdan 48 saat sonra hücre kültür süpernatanı toplanarak İFN- γ , İL-4, İL-10 ve İL-17 sitokinlerinin seviyeleri ticari ELİSA kitleri kullanılarak saptandı. Dört (Bkz Çizelge 4.1) ve beş (Bkz Çizelge 4.2) numaralı hastaların otoreaktif T hücre serilerinin salgıladıkları sitokinler ve miktarları gösterildi.

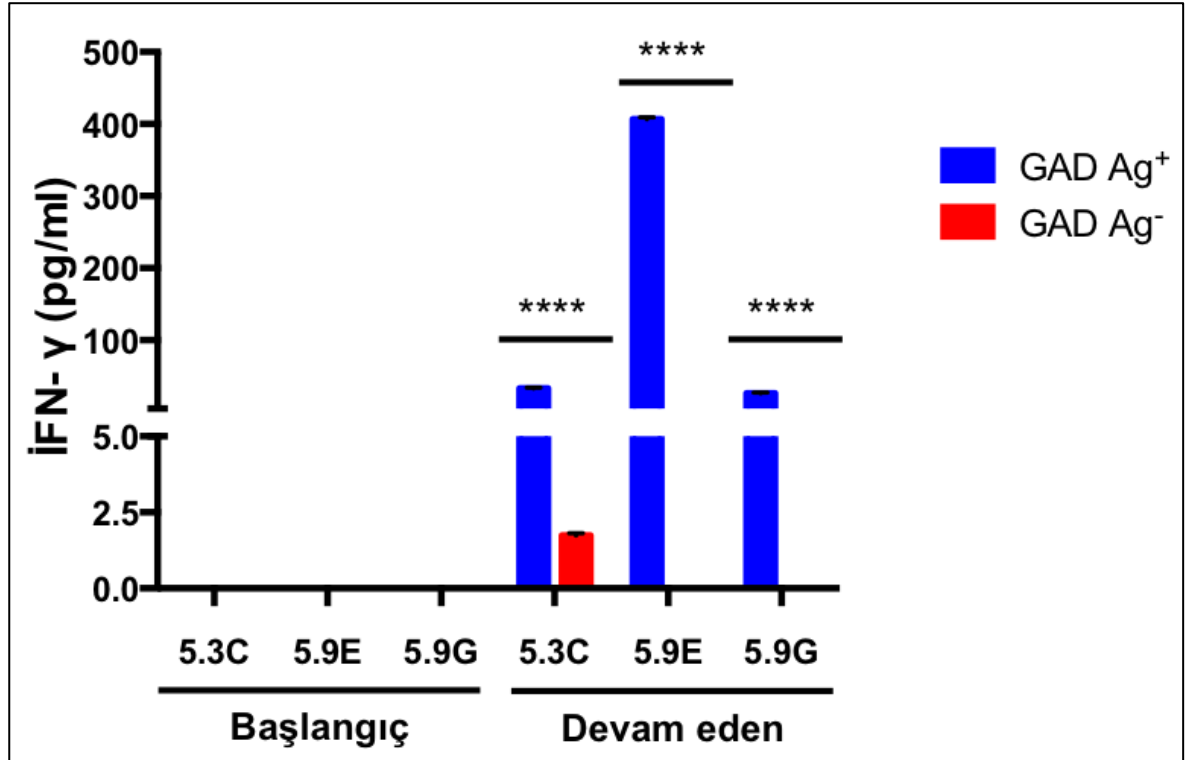
İFN- γ salınımı

Dört numaralı hastanın 1 aydır kültüre edilen hücrelerine uygulanan antijen uyarımı sonucunda İFN- γ salınımı açısından antijen ile uyarılan ve uyarılmayan kuyucuklar arasında herhangi bir farklılık tespit edilmedi (Şekil 4.9a). Kültürün 2. ayında uygulanan uyarımda ise GAD65 antijeni, İFN- γ salınımını anlamlı bir biçimde artırdı. Aynı zamanda artmış İFN- γ salınımı otoreaktif T hücre serilerinin izole edildiğine dair gösterge olarak değerlendirildi (Şekil 4.9b). Özellikle 4.2C, 4.6A ve 4.11B hücre serilerinde İFN- γ salınımı oldukça yüksek seviyelerde tespit edildi.

Beş numaralı hastada da benzer durum ile karşılaşıldı. Kültürün ilk 1 ayında mikroskobik olarak kümeleşme gözlenen ve çoğalan kuyucuklar seçilerek antijen ile uyarıldı. Uyarım sonrasında İFN- γ salınımının değişmediği gözlemlendi. Bu da başlangıçta henüz GAD65'e reaktif T hücre klonlarının yakalanamadığını gösterdi. Ancak kültürün 2. ayında GAD65 antijeni ile uyarılan bazı kuyucuklarda, uyarılmayan kontrol grubuna oranla yüksek düzeyde İFN- γ salınımı gözlemlendi (Şekil 4.10). Ayrıca, sağlıklı kontrol hastanın T hücreleri ile kıyaslandığında, T1D hastaların T hücre serilerinde yüksek İFN- γ salınımı, T hücrelerin antijene karşı çoğalma ve proenflamatuvar yanıtlarının oldukça yüksek olduklarını ortaya koyar niteliktedir (Şekil 4.17).



Şekil 4.9. Dört numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası hücrelerin antijene verdikleri İFN-γ yanıtı. Çoğalma gözlemlenen kuyucuklarda kültürün 1. (a) ve 2. (b) ayında otoantijen ile uyarım sonrası 48 saatlik İFN-γ düzeyleri ELİSA testi ile analiz edildi. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış grubu, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış grubu göstermektedir. X eksenini kuyucuk numaralarını göstermektedir. ****, $p < 0.0001$.

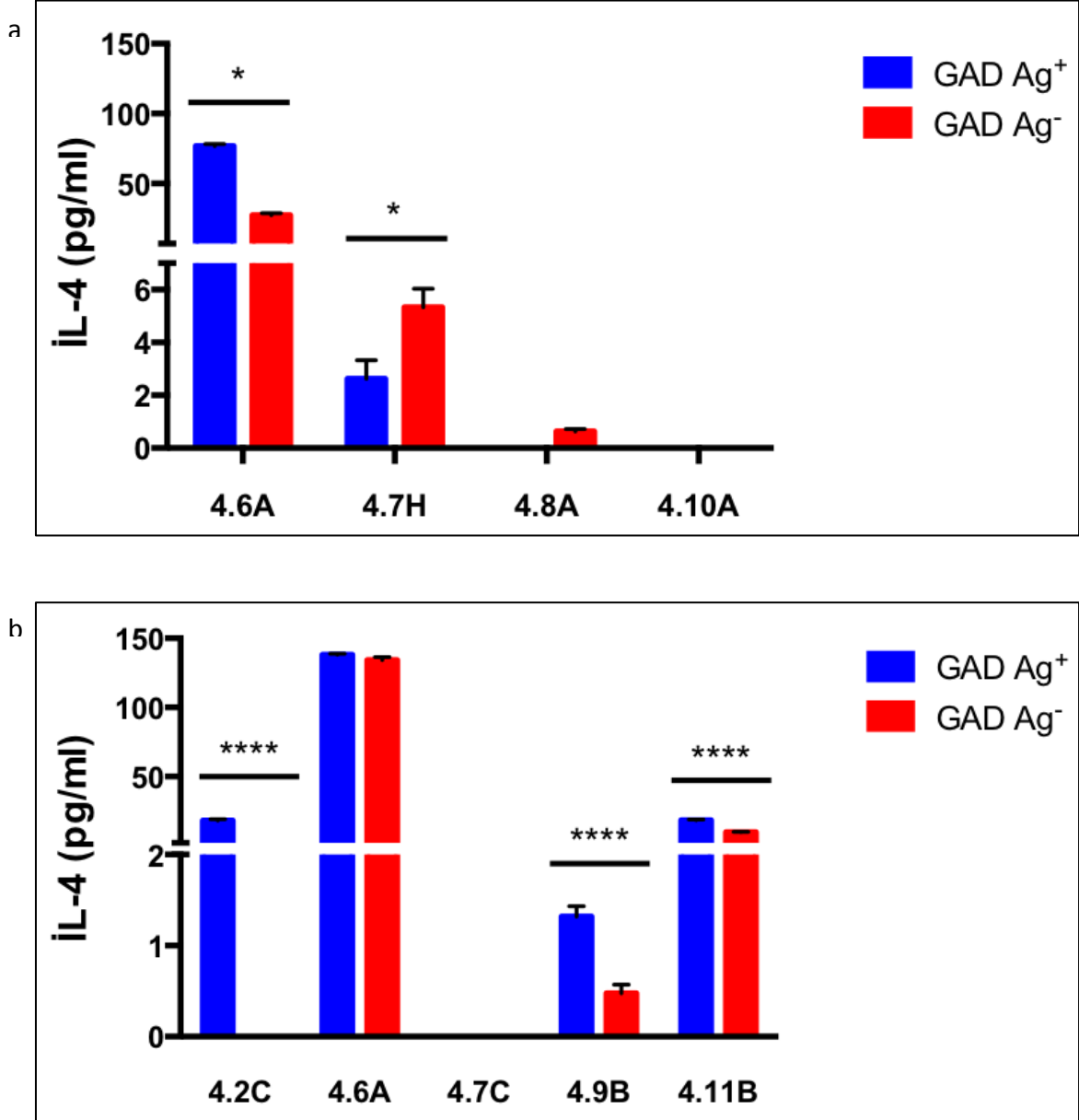


Şekil 4.10. Beş numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası hücrelerin antijene verdikleri İFN-γ yanıtı. Çoğalma gözlemlenen kuyucuklarda kültürün 1. (başlangıç) ve 2. (devam eden) ayında otoantijen ile uyarım sonrası 48 saatlik İFN-γ düzeyleri ELİSA testi ile analiz edildi. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış gruba, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış gruba göstermektedir. X eksen kuyucuk numaralarını göstermektedir. ****, $p < 0.0001$.

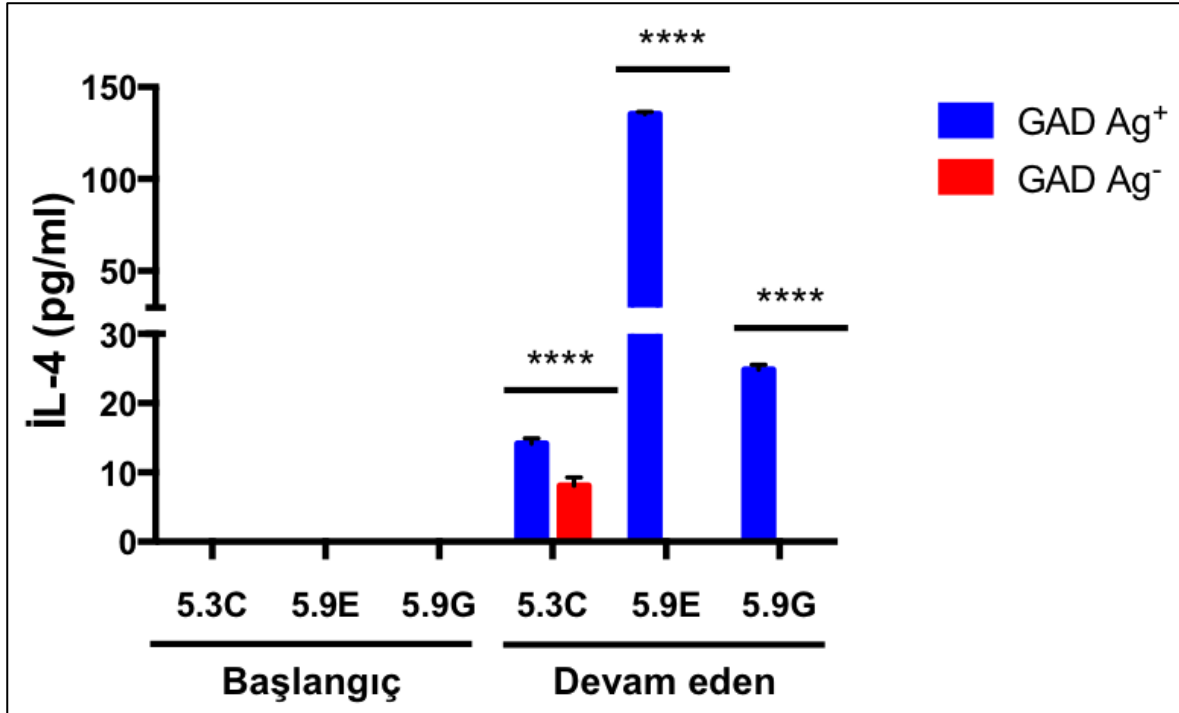
İL-4 salınımı

Hücrelerin adacık antijeni olan GAD65 ile uyarımından 48 saat sonra hücre kültür süpernatantlarında Th2 T hücrelerinin yanıtlarını belirleyebilmek amacıyla İL-4 sitokin yanıtı analiz edildi. Dört numaralı hastanın sadece bir hücre serisinde (4.6A), İL-4 salınımı uyarılmamış gruba oranla yüksek seviyede saptandı (Şekil 4.11a). Kültürün 2. ayında GAD65 antijeni ile uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreleri ile uyarılmasının ardından 4.6A T hücre serisinde yüksek düzeyde İL-4 salınımı saptandı (Şekil 4.11b). Ancak antijen ile uyarılmamış grupta da yüksek düzeyde İL-4 salınımının olduğu görüldü. Bu T hücre serisinde görülen yüksek düzeydeki İL-4 salınımının (uyarımli, uyarımsız) antijenle uyarılmaya bağlı olmadan gerçekleşen spontan bir salgı olduğu çıkarımına varıldı. Diğer T hücre serilerinden 4.2C, 4.9B ve 4.11B serilerinde İL-4 salınımı yüksek düzeyde görülme de antijen ile uyarılmamış gruba oranla anlamlı olarak artmış olduğu görüldü. Bu T hücre serilerinin düşük oranlarda Th2 hücreleri barındırıyor olabilecekleri kanısına varıldı.

Beş numaralı hastanın T hücre serilerinin İL-4 yanıtı, kültürün 1. ve 2. ayında GAD65 antijeni ile uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreleri ile uyarımın ardından analiz edildi. Kültürün 1. ayında uyarılan T hücre serilerinde İL-4 salınımı saptanmadı. Ancak ilerleyen dönemde 5.9E T hücre serisinin uyarılmış grubunda İL-4 salınımının, uyarılmamış gruba oranla oldukça yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12). Bu durum, 5.9E T hücre serisinin yüksek miktarda Th2 hücrelerden oluştuğunu göstermektedir. Bunun dışında 5.3C ve 5.9G T hücre serilerinde de uyarılmamış gruba oranla İL-4 salınımında anlamlı artış saptandı. Ancak salınan İL-4 miktarının düşük düzeylerde olması bu T hücre serilerinin az miktarda Th2 hücrelerini ihtiva ettikleri düşünüldü.



Şekil 4.11. Dört numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası hücrelerin antijene verdikleri İL-4 yanıtı. Çoğalma gözlemlenen kuyucuklarda kültürün 1. (a) ve 2. (b) ayında otoantijen ile uyarım sonrası 48 saatlik İL-4 düzeyleri ELİSA testi ile analiz edildi. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış grubu, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış grubu göstermektedir. X eksenini kuyucuk numaralarını göstermektedir. ****, $p < 0.0001$.



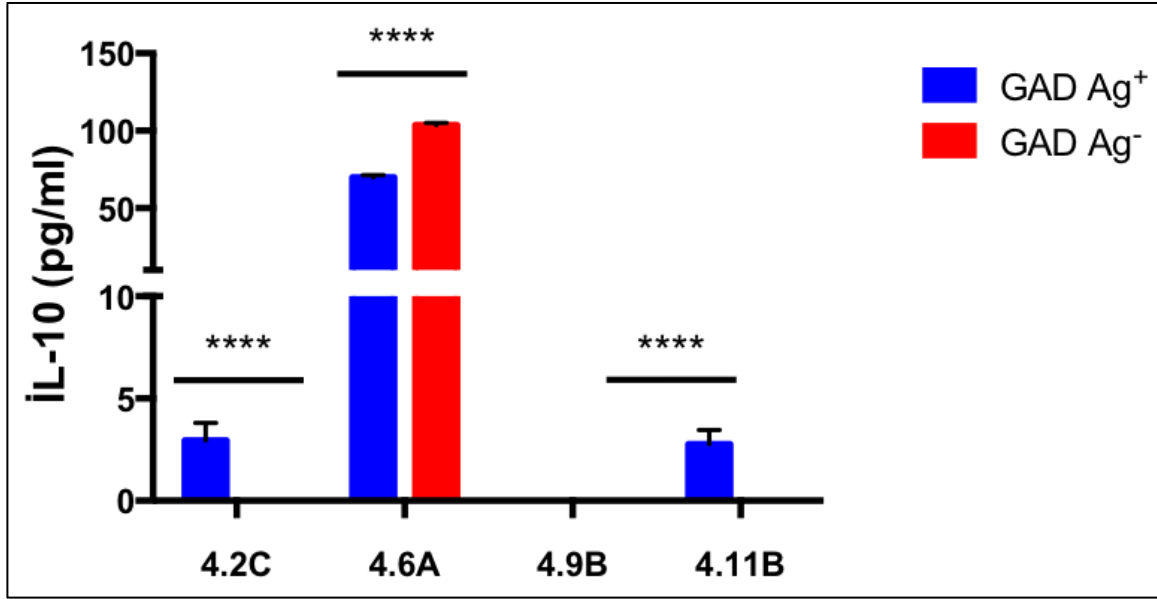
Şekil 4.12. Beş numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası hücrelerin antijene verdikleri İL-4 yanıtı. Çoğalma gözlemlenen kuyucuklarda kültürün 1. (başlangıç) ve 2. (devam eden) ayında otoantijen ile uyarım sonrası 48 saatlik İL-4 düzeyleri ELİSA testi ile analiz edildi. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış grubu, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış grubu göstermektedir. X eksenı kuyucuk numaralarını göstermektedir. ****, $p < 0.0001$.

İL-10 salınımı

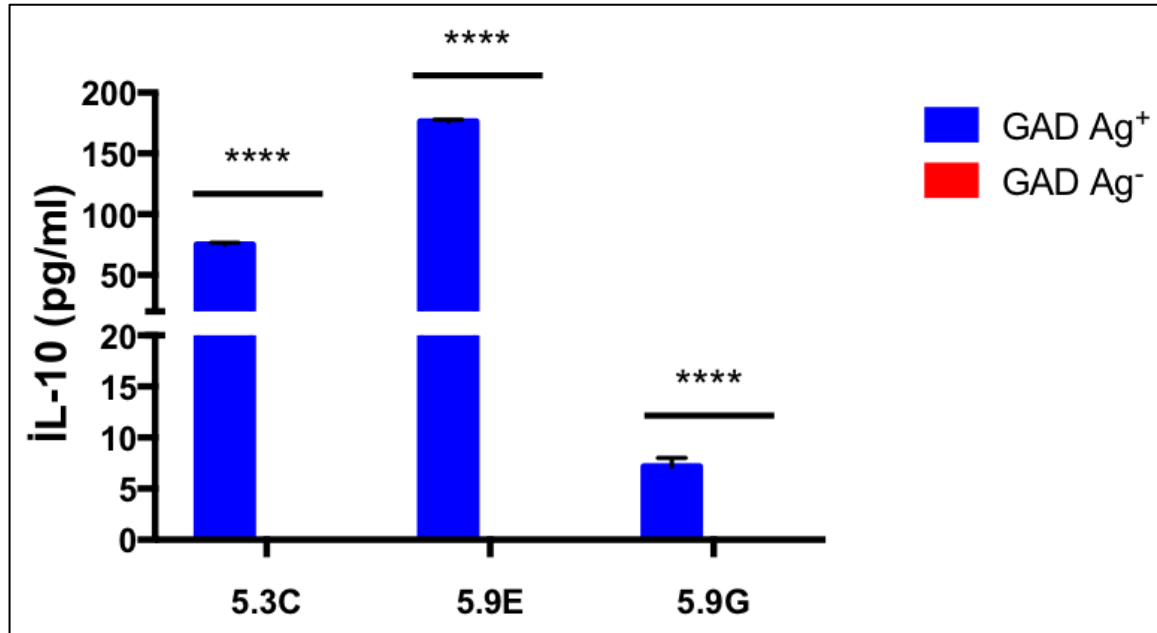
Kültürde 2 ay süreyle her 14 günde bir GAD65 antijeni ile stimüle edilerek antijen reaktif T hücrelerinin çoğalması ve sağkalımı sağlanan T hücre serilerinin GAD65 antijenine karşı verdiği süpresör tip baskılayıcı yanıtları belirleyebilmek amacıyla İL-10 sekresyonları analiz edildi. GAD65 antijeni ile uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış PKMN hücrelerinin kültüre eklenmesinden sonraki 48 saatte kültür süpernatantları toplanarak İL-10 düzeyi analiz edildi.

Dört numaralı hastada İL-10 salınımı çok düşük miktarlarda saptandı. Ancak 4.6A T hücre serisinde hem uyarılmış hem de uyarılmamış grupta yüksek düzeyde İL-10 düzeyi görüldü (Şekil 4.13). Farklı olarak uyarılmamış grupta uyarılmış gruba nazaran daha yüksek İL-10 düzeyi gözlemlendi. Bu durumun antijenle uyarılmış olan grupta, artmış İFN- γ salınımının İL-10 salınımı üzerinde kısmi blokaj etkisi göstermiş olabileceği, uyarılmamış kültürde ise artmış İL-10 salınımının azalmış İFN- γ salınımdan kaynaklanabileceği düşünüldü.

Beş numaralı hastanın hücrelerinin benzer şekilde kültürün 2. ayında GAD65 antijeni ile uyarılmasının ardından İL-10 salgı düzeyine bakıldığında 4 numaralı hastaya göre yüksek düzeylerde İL-10 salınımı gözlemlendi (Şekil 4.14). Özellikle 5.9E T hücre serisinde uyarılmamış gruba nazaran çok yüksek seviyelerde İL-10 salındığı görüldü. Bu T hücre serisinin İL-10 salgılayan Treg hücreleri yüksek yoğunlukta barındırdıkları çıkarımına varıldı. Diğer T hücre serilerinde de (5.3C ve 5.9G) uyarılmamış gruba oranla yüksek İL-10 salınımının varlığı saptandı. Ancak bu T hücre serilerinde daha düşük düzeyde İL-10 salgılanması, bu T hücre serilerinin daha düşük düzeyde Treg hücreleri barındırdıkları düşünüldü.



Şekil 4.13. Dört numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası hücrelerin antijene verdikleri İL-10 yanıtı. Çoğalma gözlemlenen kuyucuklarda kültürün 2. ayında otoantijen ile uyarım sonrası 48 saatlik İL-10 düzeyleri ELİSA testi ile analiz edildi. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış grubu, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış grubu göstermektedir. X eksenı kuyucuk numaralarını göstermektedir. ****, $p < 0.0001$.



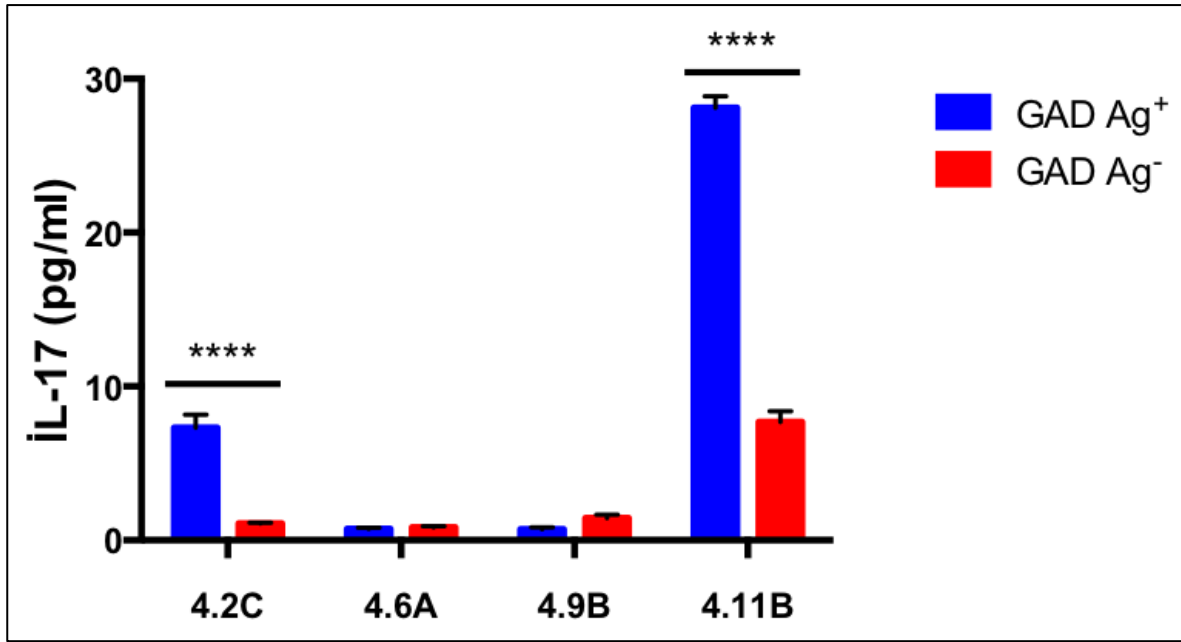
Şekil 4.14. Beş numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası hücrelerin antijene verdikleri İL-10 yanıtı. Çoğalma gözlemlenen kuyucuklarda kültürün 2. ayında otoantijen ile uyarım sonrası 48 saatlik İL-10 düzeyleri ELİSA testi ile analiz edildi. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış grubu, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış grubu göstermektedir. X eksenı kuyucuk numaralarını göstermektedir. ****, $p < 0.0001$.

İL-17 salınımı

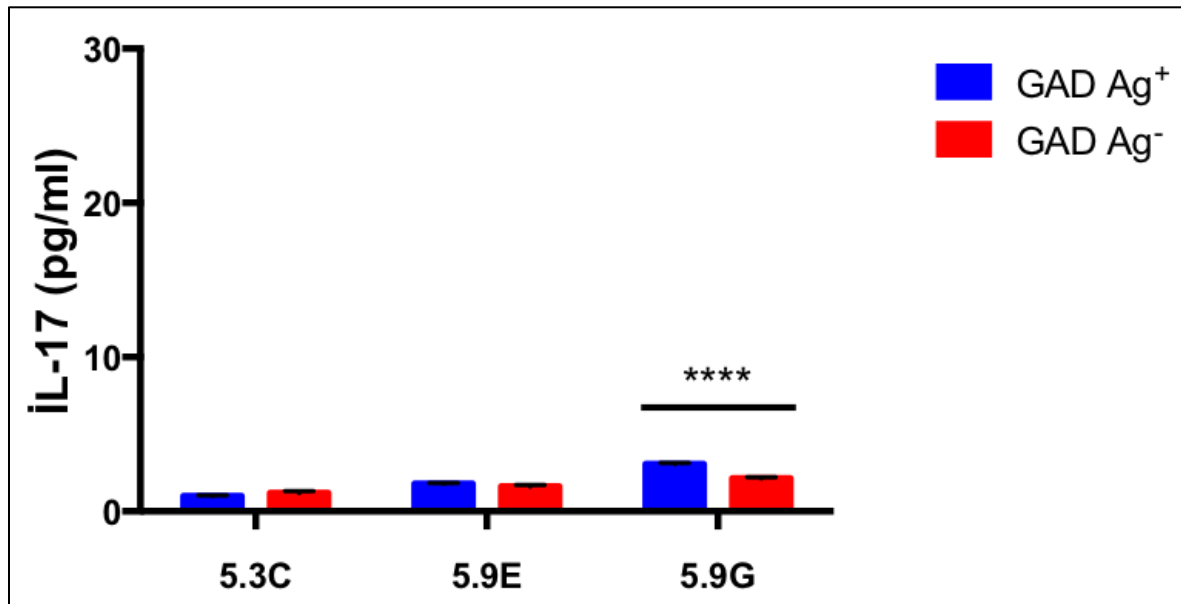
T1D hastalarından izole edilen PKMN hücrelerinin her 14 günde bir kültürde GAD65 antijeni ile uyarılmasının 2. ayında sağ kalan ve proliferatif yanıt gösteren T hücrelerin İL-17 yanıtı analiz edildi. Bunun için hücreler GAD65 antijeni ile 48 saat kültür ortamında uyarıldı. Enkübasyon sonrası süpernatantlar toplanarak İL-17 sekresyon düzeyi ELİSA yöntemi ile çalışıldı.

Dört numaralı hastanın T hücre serilerinde GAD65 antijeni ile uyarım sonrası T hücre serilerinden 4.11B serisinde uyarılmamış gruba oranla yüksek düzeyde İL-17 salgısının olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15). Bunun yanında 4.2C T hücre serisinin uyarılmış grubunda uyarılmamış grubuna oranla artmış İL-17 düzeyi saptandı. Bu da, 4.11B ve 4.2C T hücre serilerinin İL-17 salgılayan Th17 tipi T hücrelerini barındırdıklarını göstermiştir.

Beş numaralı hastanın otoreaktif T hücre serilerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrasında çok düşük miktarda İL-17 salgıladığı görüldü (Şekil 4.16). 5.9G T hücre serisinde uyarılmamış gruba oranla minimal düzeyde artış saptandı.



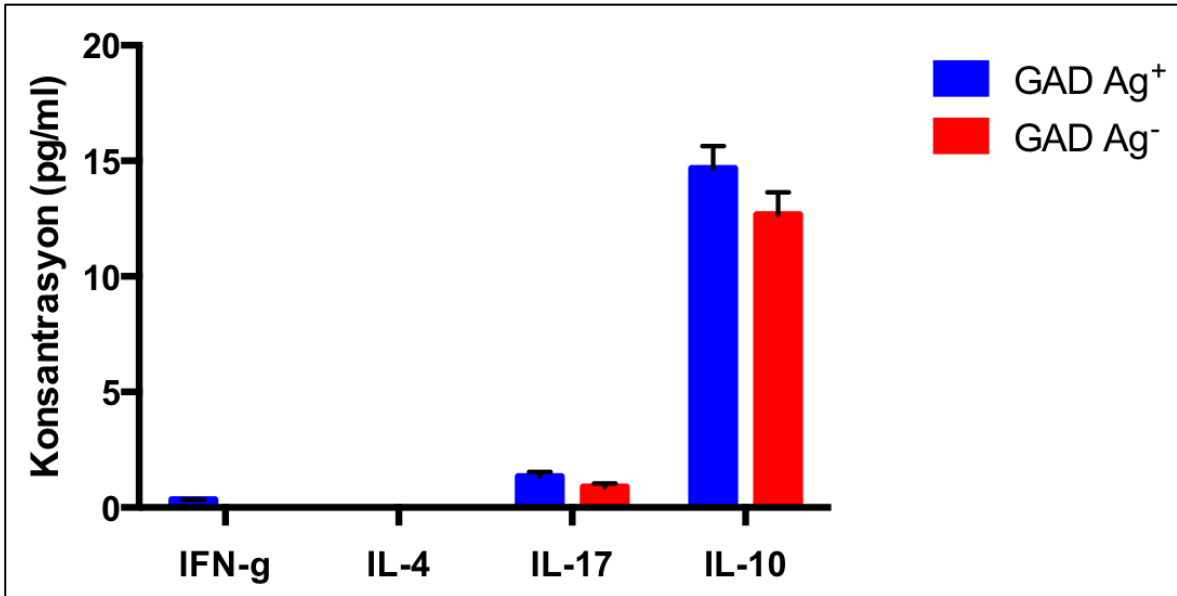
Şekil 4.15. Dört numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası hücrelerin antijene verdikleri İL-17 yanıtı. Çoğalma gözlemlenen kuyucuklarda kültürün 2. ayında otoantijen ile uyarım sonrası 48 saatlik İL-17 düzeyleri ELİSA testi ile analiz edildi. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış grubu, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış grubu göstermektedir. X eksenı kuyucuk numaralarını göstermektedir. ****, $p < 0.0001$.



Şekil 4.16. Beş numaralı hasta hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası hücrelerin antijene verdikleri İL-17 yanıtı. Çoğalma gözlemlenen kuyucuklarda kültürün 2. ayında otoantijen ile uyarım sonrası 48 saatlik İL-17 düzeyleri ELİSA testi ile analiz edildi. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış grubu, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış grubu göstermektedir. X eksenı kuyucuk numaralarını göstermektedir. ****, $p < 0.0001$.

Sağlıklı kontrol bireyde sitokin salgılama fenotipi

Sağlıklı kontrol birey hücrelerinin GAD65 antijeni ile stimüle edilmiş ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreleri ile uyarımından 48 saat sonra hücre kültür süpernatantları toplanarak İFN- γ , İL-4, İL-10 ve İL-17 sitokin salınımları analiz edildi (Şekil 4.17). Sağlıklı kontrolde diyabetik bireylere nazaran İFN- γ salınımı oldukça düşük düzeylerde saptandı. İL-4 salınımı kontrol bireylerde görülmedi. İL-17 salınımı çok düşük konsantrasyonlarda tespit edilmekle beraber uyarılmış kültürde uyarılmamışa oranla daha fazla görüldü. İL-10 salınımının ise beklendiği üzere yüksek düzeyde olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.17. Sağlıklı kontrol birey hücrelerinin GAD65 antijeni ile uyarımı sonrası hücrelerin sitokin salgılama fenotipleri. Çoğalma gözlemlenen kuyucuklarda kültürün 2. ayında otoantijen ile uyarım sonrası 48 saatlik İFN- γ , İL-4, İL-10 ve İL-17 sitokin düzeyleri ELİSA testi ile analiz edildi. Mavi sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmış grubu, kırmızı sütunlar GAD65 antijeni ile uyarılmamış grubu göstermektedir. X eksen kuyucuk numaralarını göstermektedir.

Çizelge 4.1. Dört numaralı hastadan elde edilen GAD65 reaktif T hücre serilerinin sitokin salgılama fenotipleri

T hücre Serileri	İFN- γ (pg/ml)	İL-4 (pg/ml)	İL-10 (pg/ml)	İL-17 (pg/ml)
4.2C	146,2	18,3	2,9	7,3
4.6A	242	138,153	69,9	0,7
4.9B	21,6	1,3	0	0,7
4.11B	229,3	18,46	2,7	28,1

Çizelge 4.2. Beş numaralı hastadan elde edilen GAD65 reaktif T hücre serilerinin sitokin salgılama fenotipleri

T hücre Serileri	İFN- γ (pg/ml)	İL-4 (pg/ml)	İL-10 (pg/ml)	İL-17 (pg/ml)
5.3C	33	14,1	75	0,9
5.9E	406,6	135,1	176,2	1,7
5.9G	26,1	24,8	7,1	3,06

4.1.6. HLA analizi

Çalışmada kullandığımız Tip 1 diyabet hastalarının HLA genotiplendirmesi PCR yöntemine dayalı sekansa spesifik oligonukleotid (SSO) yöntemi ile yapıldı. Beklenildiği üzere Tip 1 diyabet hastalarının HLA-A, HLA-B, HLA-C alellerinden diyabete yakınlıkta yüksek risk taşıyan [7, 62] HLA-A*0201, 0101, 0301, 1101, HLA-B*0702, 1801, 5001, 5101, 3901 HLA-C*0303, 0401, 0602, 0701, 0702 alellerine sahip oldukları gösterildi (Çizelge 4.1). Benzer şekilde HLA-DR ve HLA-DQ alellerinden T1D'e yakınlıkta önemli roller üstlendiği düşünülen [60, 312] HLA-DRB1*0301, 0402, 0101, HLA-DQB1*0201, 0302, 0501 alellerini T1D hastalarının taşıdığı gösterildi (Çizelge 4.2). T1D'e yüksek risk teşkil eden DR/DQ haplotiplerinden HLA-DRB1*0301 ve HLA-DQB1*0201 haplotiplerinin (alel kombinasyonları) 1 ve 3 numaralı hastalarda olduğu gözlemlendi. Beş numaralı hastada görülen HLA-DRB1*0401 homozigot ve HLA-DQB1*0302 homozigot alel kombinasyonu T1D için yüksek yakınlık oluşturan kombinasyonlardır [7]. Sınıf II HLA lokusunda bulunan HLA-DP genlerinin düşük immünoestimülatör kapasiteleri ve ekspresyon düzeyleri sebebiyle T1D ile ilişkili genotipik çalışmalarda bu gen bölgesinin T1D ile yakınlığı üzerine olan araştırmalara başlangıçta çok fazla yer verilmemiştir. Daha sonraları yapılan çalışmalarda bazı HLA-DP alellerinin T1D'e olan yakınlıkta rol aldıkları gösterilmiştir [313, 314]. Bu çalışmaları doğrular nitelikte T1D hastalarımızın bu hastalığa yakınlıkta rol oynadığı bilinen HLA-DPB1*0201, 0301 alellerini taşıdıkları ortaya kondu (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen T1D hastalarının sınıf I HLA alelleri

HASTA	HLA-A*	HLA-B*	HLA-C*
H-1	0201 , 2901	1801 , 3901	0701 , 0702
H-3	0101 , 1101	4701, 5001	0401 , 0602
H-4	0201 , 2601	0702 , 3503	0702 , 1201
H-5	0301 , 1101	5501, 5101	0303 , 1402

Çizelge 4.2. Çalışmaya dahil edilen T1D hastalarının sınıf II HLA alelleri

HASTA	HLA-DRB1*	HLA-DQB1*	HLA-DPB1*
H-1	0410, 0301	0201 , 0402	0201 , 0301
H-3	0701, 0301	0201 , 0202	0401, 1001
H-4	0408, 0101	0304, 0501	0201 , 1501
H-5	0402 , 0402	0302 , 0302	0201 , 0201

5. TARTIŞMA

Tip 1 diyabet, T hücre kaynaklı insülin üreten pankreas β hücrelerinin yıkımı ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. β hücrelerinin yıkımı sonucu glikoz homeostazını sağlayan insülinin üretiminde yetersizlik oluşur ve hiperglisemi ile seyreden hastalık tablosu ortaya çıkar. Hastalık oluşumuna insülin, IA-2 ve GAD65 antijenleri gibi adacık antijenlerine reaktif T hücreler ve otoantikorlar iştirak eder. NOD farelerde yapılan çalışmalarda $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerin β hücre yıkımında önemli roller üstlendikleri açıkça gösterilmiştir [299]. Benzer şekilde anti CD3 antikorı verilen T1D hastalarında β hücre fonksiyonlarındaki düşüşün geciktiği ortaya konmuştur [315]. Yeni teşhis edilen T1D hastalarının pankreas adacıklarında $CD8^+$ CTL hücre infiltrasyonlarının varlığı gösterilmiştir [132]. Bu veriler, T1D patogenezinde T hücrelerin anahtar rolünün olduğunu ispat etmektedir. Bu sebeplerden dolayı, T hücrelerin otoimmün T1D patogenezindeki fonksiyonlarını aydınlatmak araştırmacılar için birincil hedef haline gelmiştir. Bu amaçla daha çok T1D hastaların periferik kanlarından antijen spesifik T hücre serilerinin veya klonlarının izolasyonu yapılarak, bu hücrelerin hastalık patogenezinde sergiledikleri davranışları karakterize etmek tercih edilmektedir. Adacık antijenlerine spesifik T hücrelerin sayı ve fonksiyonlarındaki değişiklikleri analiz etmek, otoimmün β hücre yıkımındaki immünolojik hadiselerin anlaşılmasında yardımcı olacaktır [16].

Çalışmamızda, GAD65 antijenine spesifik T hücre serilerinin izolasyonu ve karakterizasyonu yapıldı. β hücre otoantijenlerinden GAD65'in insan ve NOD farelerde oldukça antijenik olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Kontrol hastaların periferik kanlarında dahi GAD65'e karşı otoreaktif T hücreler bulunabilmektedir [316, 317]. GAD65'in yüksek antijenik yapıya sahip olması ve T1D hastalarının büyük çoğunluğunda GADA antikorunun varlığı sebebiyle çalışmamızda adacık hücre antijeni olarak GAD65'i seçtik. Çalışmamıza katılmak üzere 28 yaşın altı 5 adet diyabetik ve 1 adet kontrol birey gönüllü oldu. T1D hastalarında GAD65 otoantikorları pozitiflik gösteren bireyler çalışmaya dahil edildi. Hasta ve kontrol bireylerden alınan PKMN hücreler, bütün rekombinant GAD65 antijeni ile 14 gün uyarıldı, böylece epitopların antijen sunucu hücreler tarafından doğal olarak kırılarak sunulmalarına imkan sağlandı. 14. günden sonra antijene yanıt vererek çoğalan hücreler, MTT testi yapılarak tespit edildi. Her aşamada yanıt veren

kuyucuklarda T hücre serilerinin tekrar eden uyarımlarla devamına çalışıldı. Yanıt veren T hücreler, her 14 günde bir GAD65 antijeni ile uyarılmış ve radyasyona maruz bırakılmış otolog PKMN hücreler ile uyarılarak çoğalmaları ve özgülleşmeleri sağlandı. Mikroskopik olarak çoğalma gösteren ve MTT testinde proliferatif yanıt veren T hücre serileri limiting dilüsyon yöntemi ile tek hücre tek kuyucukta olmak üzere yerleştirildi. Üzerine GAD65 antijeni ile uyarılan ve radyasyona maruz bırakılan PKMN hücreleri ilave edildi. Bu yöntem ile T hücre serilerinin klonlaştırılmasına çalışıldı.

Çalışmaya dahil ettiğimiz her hastadan otoreaktif T hücre seri/klonları elde edemedik. Bunun sebebinin otoreaktif T hücrelerin insan kanında oldukça düşük oranlarda bulunması ve tespit edilebilme imkanlarının oldukça sınırlı olmasına bağlandı. Ayrıca kandaki otoreaktif T hücrelerin antijene olan aviditelerinin oldukça düşük olması, antijene bağlanma ve reaksiyon vermelerini güçleştirmiştir [16].

Elde edilen hücrelerin hücre yüzey belirteçleri akım sitometrisi ile incelendiğinde, CD4 tipi T hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. İzole edilen ve GAD65 antijenine özgülleştirilen hücrelerin, T hücre alt gruplarından ($CD4^+$ ve $CD8^+$) yalnızca bir tanesinden pozitif olmaları tek tip T hücre serisinden oluştuklarını göstermektedir. Ayrıca bu $CD4^+$ T hücre serilerinin kontrol bireyden elde edilen T hücrelere oranla, yüksek miktarda CD25 ekspresyonu yaptıkları gösterildi. Bulgularımız daha önce izole edilen T hücre klonu karakterizasyon çalışmalarında kontrol bireylere oranla yüksek CD25 ekspresyonu tespit edilen çalışmalarla örtüşmektedir [304]. Bunun yanında çalışmamızda, diyabetik hastalardan elde edilen otoreaktif T hücre serilerinin CD69 aktivasyon molekülünü kontrol bireylere oranla daha yüksek miktarda eksprese ettikleri ortaya kondu. Elde ettiğimiz sonuçlar, T1D hastalarından elde edilen GAD65 proteinine reaktif T hücrelerin aktive fenotipe olduklarını gösterdi. Bu aktivasyon fenotipine sağlıklı bireyde rastlanmadı. T1D hastalarından elde edilen T hücrelerin TCR molekülünün spesifik peptidle uyarılmaları sonucu CD25 ve CD69 ekspresyonunun arttığı düşünüldü.

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında T1D hastalardan ve kontrol bireyden elde ettiğimiz GAD65 reaktif T hücre serilerinin sitokin sekresyon profilleri ELİSA yöntemi ile analiz edildi. T1D hastaların T hücre serileri GAD65 antijenine karşı heterojen bir yanıt oluşturdıkları,

İFN- γ , İL-4, İL-10 ve İL-17 sitokinlerinin her birini salgıladıkları gösterildi. Ancak dominant cevabın İFN- γ salgısı olduğu ve adacık patolojik hasarının İFN- γ salgılayan Th1 tipi CD4⁺ T hücreler tarafından kaynaklanmış olabileceği düşünüldü [318, 319]. Bu sitokin profilinin, daha önce izole edilen T hücre serilerinin sitokin profilleri ile uyumlu olduğu doğrulandı [299, 320]. Özellikle 4.2C, 4.11B ve 4.9B T hücre serilerinde yüksek düzeyde İFN- γ salgısı, İL-4 salgılanmasını kısmi düzeyde inhibe ettiği ve Th1 tipinde immünolojik reaksiyon oluşturduğu gözlemlendi. Bunun yanında İL-4 salgılayan Th2 hücrelerin de izole ettiğimiz T hücre serilerinde yer aldıkları saptandı. Daha önce yapılan birçok çalışmada T1D hastalarından izole edilen bazı T hücre klonlarının Th2 tipinde immünolojik cevap oluşturdukları, İL-4 ve İL-13 gibi tip 2 sitokinleri salgıladıkları gösterilmiştir [285, 321]. Genelde Th2 tipi T hücreler T1D’i önlemeye yönelik anti-enflamatuvar yanıtlar sergilediği bilirse de kısmen de olsa adacık hücre hasarına katkıda bulundukları düşünülmektedir [322]. Bundan dolayı elde edilen T hücre serilerimizin bazılarının Th2 tipinde T hücre popülasyonunu içerdikleri ve immünolojik reaksiyona katkıda bulundukları düşünüldü. Bunların yanında T1D hastalarından elde ettiğimiz T hücre serilerinde İL-10 salgılayan T hücrelerinin varlığı saptandı. Bu durumun, antijen ile tekrar eden stimülasyonların, PKMN hücreler içerisindeki Treg hücreleri uyarması sonucu kaynaklandığı düşünüldü. Bu nedenle, varolan enflamatuvar yanıtı dengelemek amacıyla bazı T hücre serilerinde yüksek düzeyde İL-10 salgılandığı çıkarımına varıldı. İL-10 salgılayan hücrelerin regülatör fonksiyon gösterdikleri bilinmektedir. Bu nedendir ki, sağlıklı kontrol bireyde İL-10 seviyesi yüksek bulundu. Schloot ve arkadaşları T1D hastalarından hem İL-10 hem de İFN- γ üreten T hücre serileri ve klonları oluşturmuşlardır [320]. Benzer şekilde Dromey ve arkadaşları T1D hastalarından rekombinant GAD65 ve proinsülin antijenlerini kullanarak İL-10 salgılayan Treg hücre klonu oluşturmuşlardır [323]. Bizim çalışmamızda da yukarıdaki çalışmaları doğrular nitelikte İFN- γ , İL-4 ve İL-10 salgılayan tipte T hücre serileri oluşturuldu.

Tüm bu sitokinlerin yanında çalışmamızda İL-17 sitokin salgısına bakarak Th17 tipi T hücrelerin otoreaktif T hücre serilerinde var olup olmadığına bakıldı. T1D hastadan izole ettiğimiz T hücre serilerinin bir tanesinde, sağlıklı kontrol ile kıyaslandığında yüksek düzeyde İL-17 salgılandığı saptandı. Bu sonuç elde ettiğimiz bazı otoreaktif T hücre serilerinin Th17 tipi T hücreleri barındırdıklarını ortaya koydu. Th17 hücrelerin, adacık patolojisinde proenflamatuvar ortam oluşumuna katkıda bulundukları ve hastalığın

ilerlemesinde rol oynadıkları bilinmektedir [324]. Daha önce yapılmış birçok çalışmada T1D hastaları ve kontrol bireylerde İL-17 salgılayan Th17 hücrelerin varlığı gösterilmiş, bu hücrelerin var olan adacık patolojisine önemli katkılarda bulunduğu ortaya konmuştur [157, 158, 293, 325]. Ancak T1D hastalarından İL-17 salgılayan Th17 tipi T hücre seri yada klonları izole edilememiştir. Bizim çalışmamızda Th1 CD4⁺ T hücrelerine ilave olarak Th17 CD4⁺ T hücreler de izole ve karakterize edilmiştir.

T hücre serilerinin/klonlarının izolasyonu ve karakterizasyonunun yanında, çalışmaya dahil ettiğimiz T1D hastalarının HLA genotipik yapılarını ve hastalık ile olan ilişkilerini inceledik. HLA genotiplendirme, sekans spesifik oligonükleotid (SSO) yöntemi ile yapıldı. T1D hastalarının hastalık oluşumunda yüksek risk oluşturan sınıf II HLA alelleri (HLA-DRB1*0301, 0402, 0101, HLA-DQB1*0201, 0302, 0501, HLA-DPB1*0201, 0301) taşıdıkları, buna karşın koruyucu alellerden (HLA-DQB1*0602, 0301, HLA-DP*0402, HLA-DRB1*0403) yoksun oldukları gösterildi. Benzer şekilde sınıf I HLA alellerinden T1D için yatkınlık oluşturan alelleri (HLA-A*0201, 0101, 0301, 1101, HLA-B*0702, 1801, 5001, 5101, 3901 HLA-C*0303, 0401, 0602, 0701, 0702) barındırdıkları gösterildi. Bunlardan özellikle HLA-A*0201 ve HLA-B*3901'in T1D oluşumunda yüksek risk faktörü oluşturduğu bilinmektedir [64]. Sonuç olarak çalıştığımız T1D hastalarında hastalık oluşumundaki yatkınlıkta rol oynayan HLA alellerinin ve haplotiplerinin varlığı doğrulandı.

T1D hastalık patogeneze dahil olan mekanizmaları ortaya çıkarmak amacıyla T hücre klonu çalışmaları oldukça faydalıdır. Klonların spesifik antijenlerinin epitoplarının belirlenmesi ile spesifik antijen terapileri amaçlanmakta, bu da T1D'in tedavisinde gelecek vaad etmektedir. Bizim çalışmamızda diğer çalışmalarla benzer şekilde GAD65 antijenine reaktif T hücreler diyabetik hastalardan izole edilmiş ve fenotipik özellikleri ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Şimdiye kadar Türk T1D hastalarında otoreaktif T hücre serilerinin fonksiyonel özellikleri ile ilgili herhangi bir veri ortaya konmamıştır. Bu çalışma Türkiye'deki diyabet hastalarında, T hücre serilerinin fonksiyonlarını ve aktivasyon fenotiplerini, bunun yanında otoreaktif T hücre serilerinin ait oldukları hastaların HLA genotiplerinin ortaya koyması bakımından oldukça anlamlıdır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda Tip 1 diyabet hastalarından T hücre serileri izole edilmiş, *in vitro* koşullarda fenotipik ve fonksiyonel analizleri ortaya konulmuştur. Elde edilen T hücre klonlarının CD4⁺ T hücreler oldukları gösterilmiş, sağlıklı kontrol T hücrelerle kıyaslandığında yüksek düzeyde CD25 ve CD69 aktivasyon fenotipi sergiledikleri görülmüştür. Sitokin sekresyon düzeyleri analiz edildiğinde baskın oranda İFN- γ üreten Th1 tipi CD4⁺ T hücrelerden oluştukları, bunun yanında yüksek düzeyde İL-17 üreten Th17 T hücre serisi de tespit edilmiştir. Ayrıca T hücre serilerinin düşük miktarda İL-4 ve İL-10 üreten hücrelere sahip oldukları da gözlemlenmiştir.

Tip 1 diyabette otoreaktif T hücre klon çalışmaları, T1D'in immünopatogenezini araştırmada vazgeçilmez bir yöntem olmuştur. Birçok araştırmacı farklı metotlar kullanarak T1D hastalarından farklı fenotiplere sahip T hücre klonları elde etmişlerdir. Elde edilen T hücre klonlarının benzerlikleri olsa da tamamen kişiye özel değişebilen farklı formlarda da açığa çıkabilmektedirler. Bu nedenle her bir izole edilen klon, şahsa özel olup bilim dünyası adına önem arz etmektedir. T1D'in önlenmesi ve immünolojik sürecin takip edilmesi adına T hücrelerin fenotipik özellikleri ve spesifitelerinin açığa çıkarılması gerekmektedir. İzole edilen T hücre klonlarının spesifik özellikleri iyi yorumlandığında hastalığa dair gizli kalmış bazı mekanizmalar ve devamında hastalığın tedavisine yönelik çalışmalar planlanabilmektedir. T hücrelerin spesifik oldukları β hücre antijenlerinin peptid epitoplarının analizleri yapılarak, peptid kaynaklı immünoterapilerin geliştirilmesi gelecek vaad etmektedir. Bizim çalışmamızda diğer T hücre klon çalışmalarına benzer şekilde otoreaktif CD4⁺ T hücreler elde edilmiş, fonksiyonel ve karakteristik özellikleri ortaya konmuştur. Bu çalışma, Türk T1D hasta popülasyonunda daha önce hiç yapılmamış otoreaktif T hücre analizleri ve fonksiyonel özellikleri ile ilgili boşluğu dolduracak, bilim dünyasına önemli katkılar sağlayacaktır. İleriki aşamalarda elde edilen otoreaktif T hücrelerin fonksiyonel ve genetik özellikleri daha da derinlemesine araştırılarak, açığa çıkmamış T1D mekanizmalarının ortaya çıkarılması ve kişiye özel immünoterapilerin geliştirilmesi planlanmaktadır.

Tüm bu çalışmaların sonucunda, T1D alanında yapılan *in vitro* T hücre çalışmaları ileride daha da geliştirilerek T1D'e karşı çeşitli immünoterapötik yaklaşımların geliştirilmesi adına önem arz etmektedir. Özellikle ülkemizde T1D vakalarının sıklığı ve bu alanda yapılan çalışmaların yetersizliği göz önüne alındığında, yaptığımız çalışma ve deneysel yaklaşımlar ülkemizde de bu alanda yapılacak olan çalışmalara ışık tutmaktadır. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler, bilimsel literatüre çok büyük katkı sağlayacak, daha önce yapılmış otoimmünite ve T hücre çalışmaları üzerine olan yaklaşımlara yeni bir bakış açısı getirecektir.

KAYNAKLAR

1. Gan, M. J., Albanese-O'Neill, A., and Haller, M. J. (2012). Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research. *Current Problems Pediatric Adolescent Health Care*, 42, 269-291.
2. Knip, M., and Simell, O. (2012). Environmental triggers of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, a007690.
3. Akerblom, H. K., Vaarala, O., Hyoty, H., Ilonen, J., and Knip, M. (2002). Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *American Journal of Medical Genetics*, 115, 18-29.
4. van Belle, T. L., Coppieters, K. T., and von Herrath, M. G. (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological Reviews*, 91, 79-118.
5. American Diabetes, A. (2012). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 35 Suppl 1, S64-71.
6. Lebastchi, J., and Herold, K. C. (2012). Immunologic and Metabolic Biomarkers of beta-Cell Destruction in the Diagnosis of Type 1 Diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, a007708.
7. Steck, A. K., and Rewers, M. J. (2011). Genetics of type 1 diabetes. *Clinical Chemistry*, 57, 176-185.
8. Michels, A. W., and Eisenbarth, G. S. (2010). Immunologic endocrine disorders. *J Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, S226-237.
9. Lehuen, A., Diana, J., Zacccone, P., and Cooke, A. (2010). Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature Reviews Immunology*, 10, 501-513.
10. Diana, J., Gahzarian, L., Simoni, Y., and Lehuen, A. (2011). Innate immunity in type 1 diabetes. *Discovery Medicine*, 11, 513-520.
11. Wallberg, M., and Cooke, A. (2013). Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends in Immunology*, 34, 583-591.
12. Roep, B. O., and De Vries, R. R. (1992). T-lymphocytes and the pathogenesis of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *European Journal of Clinical Investigation*, 22, 697-711.
13. Roep, B. O., and Peakman, M. (2011). Diabetogenic T lymphocytes in human Type 1 diabetes. *Current Opinion in Immunology*, 23, 746-753.
14. Mallone, R., Brezar, V., and Boitard, C. (2011). T cell recognition of autoantigens in human type 1 diabetes: clinical perspectives. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 513210.

15. Mallone, R., and Roep, B. O. (2013). Biomarkers for immune intervention trials in type 1 diabetes. *Clinical Immunology*, 149, 286-296.
16. Mannering, S. I., Wong, F. S., Durinovic-Bello, I., Brooks-Worrell, B., Tree, T. I., Cilio, C. M., Schloot, N. C., and Mallone, R. (2010). Current approaches to measuring human islet-antigen specific T cell function in type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*, 162, 197-209.
17. Schloot, N. C., and Roep, B. O. (1997). Islet antigen-specific T cell clones in autoimmune diabetes: from mice to men. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 13, 127-138.
18. Roep, B. O. (2003). The role of T-cells in the pathogenesis of Type 1 diabetes: from cause to cure. *Diabetologia*, 46, 305-321.
19. Rossini, A. A., Mordes, J. P., and Like, A. A. (1985). Immunology of insulin-dependent diabetes mellitus. *Annual Review of Immunology*, 3, 289-320.
20. Bach, J. F. (1997). Autoimmunity and type I diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 8, 71-74.
21. Bluestone, J. A., Herold, K., and Eisenbarth, G. (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*, 464, 1293-1300.
22. American Diabetes, A. (2009). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 32 Suppl 1, S62-67.
23. Group, S. f. D. i. Y. S., Liese, A. D., D'Agostino, R. B., Jr., Hamman, R. F., Kilgo, P. D., Lawrence, J. M., Liu, L. L., Loots, B., Linder, B., Marcovina, S., Rodriguez, B., Standiford, D., and Williams, D. E. (2006). The burden of diabetes mellitus among US youth: prevalence estimates from the SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Pediatrics*, 118, 1510-1518.
24. Group, D. P. (2006). Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999. *Diabetic Medicine*, 23, 857-866.
25. Soltesz, G., Patterson, C. C., Dahlquist, G., and Group, E. S. (2007). Worldwide childhood type 1 diabetes incidence--what can we learn from epidemiology? *Pediatric Diabetes*, 8 Suppl 6, 6-14.
26. Atkinson, M. A., and Maclaren, N. K. (1994). The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 331, 1428-1436.
27. Haller, M. J., Atkinson, M. A., and Schatz, D. (2005). Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. *Pediatric Clinics of North America*, 52, 1553-1578.
28. National Diabetes Data Group (U.S.), National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (U.S.), and National Institutes of Health (U.S.). (1995).

Diabetes in America. Bethesda, Md., National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases,

29. Dabelea, D., Mayer-Davis, E. J., and Imperatore, G. (2010). The value of national diabetes registries: SEARCH for Diabetes in Youth Study. *Current Diabetes Reports*, 10, 362-369.
30. Expert Committee on the, D., and Classification of Diabetes, M. (2003). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 26 Suppl 1, S5-20.
31. Malecki, M. T., and Klupa, T. (2005). Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. *Pharmacological Reports*, 57 Suppl, 20-32.
32. Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M., and Mayer-Davis, E. J. (2010). Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, 39, 481-497.
33. Canivell, S., and Gomis, R. (2014). Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmunity Reviews*, 13, 403-407.
34. Imagawa, A., and Hanafusa, T. (2011). Fulminant type 1 diabetes--an important subtype in East Asia. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 27, 959-964.
35. Hanafusa, T., and Imagawa, A. (2007). Fulminant type 1 diabetes: a novel clinical entity requiring special attention by all medical practitioners. *Nature Clinical Practice Endocrinology Metabolism*, 3, 36-45; quiz 32p following 69.
36. Pozzilli, P., and Buzzetti, R. (2007). A new expression of diabetes: double diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 18, 52-57.
37. Tuomi, T., Groop, L. C., Zimmet, P. Z., Rowley, M. J., Knowles, W., and Mackay, I. R. (1993). Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes*, 42, 359-362.
38. Pozzilli, P., and Di Mario, U. (2001). Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult): definition, characterization, and potential prevention. *Diabetes Care*, 24, 1460-1467.
39. Giuffrida, F. M., and Reis, A. F. (2005). Genetic and clinical characteristics of maturity-onset diabetes of the young. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 7, 318-326.
40. Buchanan, T. A., and Xiang, A. H. (2005). Gestational diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 485-491.
41. Makinen, V. P., Forsblom, C., Thorn, L. M., Waden, J., Kaski, K., Ala-Korpela, M., and Groop, P. H. (2009). Network of vascular diseases, death and biochemical

- characteristics in a set of 4,197 patients with type 1 diabetes (the FinnDiane Study). *Cardiovascular Diabetology*, 8, 54.
42. Onyiriuka, A. N., and Ifebi, E. (2013). Ketoacidosis at diagnosis of type 1 diabetes in children and adolescents: frequency and clinical characteristics. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12, 47.
 43. Herman, W. H., and Fajans, S. S. (2010). Hemoglobin A1c for the diagnosis of diabetes: practical considerations. *Polish Archives of Internal Medicine*, 120, 37-40.
 44. Seissler, J., and Scherbaum, W. A. (2006). Autoimmune diagnostics in diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44, 133-137.
 45. Lambert, P., and Bingley, P. J. (2006). What is type 1 diabetes? *Medicine*, 34, 47-51.
 46. Palmer, J. P., Fleming, G. A., Greenbaum, C. J., Herold, K. C., Jansa, L. D., Kolb, H., Lachin, J. M., Polonsky, K. S., Pozzilli, P., Skyler, J. S., and Steffes, M. W. (2004). C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001. *Diabetes*, 53, 250-264.
 47. Eisenbarth, G. S. (2010). Banting Lecture 2009: An unfinished journey: molecular pathogenesis to prevention of type 1A diabetes. *Diabetes*, 59, 759-774.
 48. Redondo, M. J., Jeffrey, J., Fain, P. R., Eisenbarth, G. S., and Orban, T. (2008). Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *The New England Journal of Medicine*, 359, 2849-2850.
 49. Cutolo, M. (2014). Autoimmune polyendocrine syndromes. *Autoimmunity Reviews*, 13, 85-89.
 50. Kont, V., Laan, M., Kisand, K., Merits, A., Scott, H. S., and Peterson, P. (2008). Modulation of Aire regulates the expression of tissue-restricted antigens. *Molecular Immunology*, 45, 25-33.
 51. Michels, A. W., and Eisenbarth, G. S. (2009). Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 (APS-1) as a model for understanding autoimmune polyendocrine syndrome type 2 (APS-2). *Journal of Internal Medicine*, 265, 530-540.
 52. Bacchetta, R., Passerini, L., Gambineri, E., Dai, M., Allan, S. E., Perroni, L., Dagna-Bicarelli, F., Sartirana, C., Matthes-Martin, S., Lawitschka, A., Azzari, C., Ziegler, S. F., Levings, M. K., and Roncarolo, M. G. (2006). Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *The Journal of Clinical Investigation*, 116, 1713-1722.
 53. Otsubo, K., Kanegane, H., Kobayashi, I., and Miyawaki, T. (2010). [IPEX syndrome and human Treg cells]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 33, 196-206.

54. Qiao, Q., Osterholm, A. M., He, B., Pitkaniemi, J., Cordell, H. J., Sarti, C., Kinnunen, L., Tuomilehto-Wolf, E., Tryggvason, K., and Tuomilehto, J. (2007). A genome-wide scan for type 1 diabetes susceptibility genes in nuclear families with multiple affected siblings in Finland. *BMC Genetics*, 8, 84.
55. Concannon, P., Erlich, H. A., Julier, C., Morahan, G., Nerup, J., Pociot, F., Todd, J. A., Rich, S. S., and Type 1 Diabetes Genetics, C. (2005). Type 1 diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families. *Diabetes*, 54, 2995-3001.
56. Zhang, L., and Eisenbarth, G. S. (2011). Prediction and prevention of Type 1 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes*, 3, 48-57.
57. Noble, J. A., Valdes, A. M., Cook, M., Klitz, W., Thomson, G., and Erlich, H. A. (1996). The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *The American Journal of Human Genetics*, 59, 1134-1148.
58. She, J. X. (1996). Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. *Immunology Today*, 17, 323-329.
59. Rewers, M., Bugawan, T. L., Norris, J. M., Blair, A., Beaty, B., Hoffman, M., McDuffie, R. S., Jr., Hamman, R. F., Klingensmith, G., Eisenbarth, G. S., and Erlich, H. A. (1996). Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabetologia*, 39, 807-812.
60. Saruhan-Direskeneli, G., Uyar, F. A., Bas, F., Gunoz, H., Bundak, R., Saka, N., and Darendeliler, F. (2000). HLA-DR and -DQ associations with insulin-dependent diabetes mellitus in a population of Turkey. *Human Immunology*, 61, 296-302.
61. Keskin, M., Aygun, A., Pehlivan, S., Keskin, O., Kor, Y., Balat, A., and Coskun, Y. (2012). Trends in the frequency of HLA DR-DQ haplotypes among children and adolescents with type 1 diabetes mellitus in the Southeast Region of Turkey. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 4, 189-192.
62. Noble, J. A., Valdes, A. M., Varney, M. D., Carlson, J. A., Moonsamy, P., Fear, A. L., Lane, J. A., Lavant, E., Rappner, R., Louey, A., Concannon, P., Mychaleckyj, J. C., Erlich, H. A., and Type 1 Diabetes Genetics, C. (2010). HLA class I and genetic susceptibility to type 1 diabetes: results from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Diabetes*, 59, 2972-2979.
63. Noble, J. A., and Erlich, H. A. (2012). Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, a007732.
64. Nejentsev, S., Howson, J. M., Walker, N. M., Szeszko, J., Field, S. F., Stevens, H. E., Reynolds, P., Hardy, M., King, E., Masters, J., Hulme, J., Maier, L. M., Smyth, D., Bailey, R., Cooper, J. D., Ribas, G., Campbell, R. D., Clayton, D. G., Todd, J. A., and Wellcome Trust Case Control, C. (2007). Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature*, 450, 887-892.

65. Fennessy, M., Metcalfe, K., Hitman, G. A., Niven, M., Biro, P. A., Tuomilehto, J., and Tuomilehto-Wolf, E. (1994). A gene in the HLA class I region contributes to susceptibility to IDDM in the Finnish population. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetologia*, 37, 937-944.
66. Unger, W. W., Pearson, T., Abreu, J. R., Laban, S., van der Slik, A. R., der Kracht, S. M., Kester, M. G., Serreze, D. V., Shultz, L. D., Griffioen, M., Drijfhout, J. W., Greiner, D. L., and Roep, B. O. (2012). Islet-specific CTL cloned from a type 1 diabetes patient cause beta-cell destruction after engraftment into HLA-A2 transgenic NOD/scid/IL2RG null mice. *PLoS One*, 7, e49213.
67. International Multiple Sclerosis Genetics, C., Hafler, D. A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E. S., Daly, M. J., De Jager, P. L., de Bakker, P. I., Gabriel, S. B., Mirel, D. B., Ivinson, A. J., Pericak-Vance, M. A., Gregory, S. G., Rioux, J. D., McCauley, J. L., Haines, J. L., Barcellos, L. F., Cree, B., Oksenberg, J. R., and Hauser, S. L. (2007). Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *The New England Journal of Medicine*, 357, 851-862.
68. Maclaren, N., Riley, W., Skordis, N., Atkinson, M., Spillar, R., Silverstein, J., Klein, R., Vadheim, C., and Rotter, J. (1988). Inherited susceptibility to insulin-dependent diabetes is associated with HLA-DR1, while DR5 is protective. *Autoimmunity*, 1, 197-205.
69. Grant, S. F., Qu, H. Q., Bradfield, J. P., Marchand, L., Kim, C. E., Glessner, J. T., Grabs, R., Taback, S. P., Frackelton, E. C., Eckert, A. W., Annaiah, K., Lawson, M. L., Otieno, F. G., Santa, E., Shaner, J. L., Smith, R. M., Skraban, R., Imielinski, M., Chiavacci, R. M., Grundmeier, R. W., Stanley, C. A., Kirsch, S. E., Waggott, D., Paterson, A. D., Monos, D. S., Group, D. E. R., Polychronakos, C., and Hakonarson, H. (2009). Follow-up analysis of genome-wide association data identifies novel loci for type 1 diabetes. *Diabetes*, 58, 290-295.
70. Barrett, J. C., Clayton, D. G., Concannon, P., Akolkar, B., Cooper, J. D., Erlich, H. A., Julier, C., Morahan, G., Nerup, J., Nierras, C., Plagnol, V., Pociot, F., Schuilenburg, H., Smyth, D. J., Stevens, H., Todd, J. A., Walker, N. M., Rich, S. S., and Type 1 Diabetes Genetics, C. (2009). Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nature Genetics*, 41, 703-707.
71. Vafiadis, P., Bennett, S. T., Todd, J. A., Nadeau, J., Grabs, R., Goodyer, C. G., Wickramasinghe, S., Colle, E., and Polychronakos, C. (1997). Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nature Genetics*, 15, 289-292.
72. Pugliese, A., Zeller, M., Fernandez, A., Jr., Zalcberg, L. J., Bartlett, R. J., Ricordi, C., Pietropaolo, M., Eisenbarth, G. S., Bennett, S. T., and Patel, D. D. (1997). The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nature Genetics*, 15, 293-297.

73. Vang, T., Congia, M., Macis, M. D., Musumeci, L., Orru, V., Zavattari, P., Nika, K., Tautz, L., Tasken, K., Cucca, F., Mustelin, T., and Bottini, N. (2005). Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nature Genetics*, 37, 1317-1319.
74. Fife, B. T., and Bluestone, J. A. (2008). Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological Reviews*, 224, 166-182.
75. Kavvoura, F. K., and Ioannidis, J. P. (2005). CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE Review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, 162, 3-16.
76. Nistico, L., Buzzetti, R., Pritchard, L. E., Van der Auwera, B., Giovannini, C., Bosi, E., Larrad, M. T., Rios, M. S., Chow, C. C., Cockram, C. S., Jacobs, K., Mijovic, C., Bain, S. C., Barnett, A. H., Vandewalle, C. L., Schuit, F., Gorus, F. K., Tosi, R., Pozzilli, P., and Todd, J. A. (1996). The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Human Molecular Genetics*, 5, 1075-1080.
77. Ueda, H., Howson, J. M., Esposito, L., Heward, J., Snook, H., Chamberlain, G., Rainbow, D. B., Hunter, K. M., Smith, A. N., Di Genova, G., Herr, M. H., Dahlman, I., Payne, F., Smyth, D., Lowe, C., Twells, R. C., Howlett, S., Healy, B., Nutland, S., Rance, H. E., Everett, V., Smink, L. J., Lam, A. C., Cordell, H. J., Walker, N. M., Bordin, C., Hulme, J., Motzo, C., Cucca, F., Hess, J. F., Metzker, M. L., Rogers, J., Gregory, S., Allahabadia, A., Nithiyananthan, R., Tuomilehto-Wolf, E., Tuomilehto, J., Bingley, P., Gillespie, K. M., Undlien, D. E., Ronningen, K. S., Guja, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Savage, D. A., Maxwell, A. P., Carson, D. J., Patterson, C. C., Franklyn, J. A., Clayton, D. G., Peterson, L. B., Wicker, L. S., Todd, J. A., and Gough, S. C. (2003). Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, 423, 506-511.
78. Lowe, C. E., Cooper, J. D., Brusko, T., Walker, N. M., Smyth, D. J., Bailey, R., Bourget, K., Plagnol, V., Field, S., Atkinson, M., Clayton, D. G., Wicker, L. S., and Todd, J. A. (2007). Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nature Genetics*, 39, 1074-1082.
79. Mehers, K. L., and Gillespie, K. M. (2008). The genetic basis for type 1 diabetes. *British Medical Bulletin*, 88, 115-129.
80. Smyth, D. J., Cooper, J. D., Bailey, R., Field, S., Burren, O., Smink, L. J., Guja, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Widmer, B., Dunger, D. B., Savage, D. A., Walker, N. M., Clayton, D. G., and Todd, J. A. (2006). A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nature Genetics*, 38, 617-619.
81. Todd, J. A., Walker, N. M., Cooper, J. D., Smyth, D. J., Downes, K., Plagnol, V., Bailey, R., Nejentsev, S., Field, S. F., Payne, F., Lowe, C. E., Szeszko, J. S., Hafler, J. P.,

- Zeitels, L., Yang, J. H., Vella, A., Nutland, S., Stevens, H. E., Schuilenburg, H., Coleman, G., Maisuria, M., Meadows, W., Smink, L. J., Healy, B., Burren, O. S., Lam, A. A., Ovington, N. R., Allen, J., Adlem, E., Leung, H. T., Wallace, C., Howson, J. M., Guja, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Genetics of Type 1 Diabetes in, F., Simmonds, M. J., Heward, J. M., Gough, S. C., Wellcome Trust Case Control, C., Dunger, D. B., Wicker, L. S., and Clayton, D. G. (2007). Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nature Genetics*, 39, 857-864.
82. Kaprio, J., Tuomilehto, J., Koskenvuo, M., Romanov, K., Reunanen, A., Eriksson, J., Stengard, J., and Kesaniemi, Y. A. (1992). Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia*, 35, 1060-1067.
 83. Akerblom, H. K., and Knip, M. (1998). Putative environmental factors in Type 1 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 14, 31-67.
 84. Coppieters, K. T., Boettler, T., and von Herrath, M. (2012). Virus infections in type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, a007682.
 85. Gale, E. A. (2002). A missing link in the hygiene hypothesis? *Diabetologia*, 45, 588-594.
 86. Bach, J. F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England Journal of Medicine*, 347, 911-920.
 87. Peng, H., and Hagopian, W. (2006). Environmental factors in the development of Type 1 diabetes. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 7, 149-162.
 88. Fairweather, D., and Rose, N. R. (2002). Type 1 diabetes: virus infection or autoimmune disease? *Nature Immunology*, 3, 338-340.
 89. Sadeharju, K., Lonnrot, M., Kimpimaki, T., Savola, K., Erkkila, S., Kalliokoski, T., Savolainen, P., Koskela, P., Ilonen, J., Simell, O., Knip, M., and Hyoty, H. (2001). Enterovirus antibody levels during the first two years of life in prediabetic autoantibody-positive children. *Diabetologia*, 44, 818-823.
 90. Lonnrot, M., Korpela, K., Knip, M., Ilonen, J., Simell, O., Korhonen, S., Savola, K., Muona, P., Simell, T., Koskela, P., and Hyoty, H. (2000). Enterovirus infection as a risk factor for beta-cell autoimmunity in a prospectively observed birth cohort: the Finnish Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetes*, 49, 1314-1318.
 91. Oikarinen, M., Tauriainen, S., Honkanen, T., Oikarinen, S., Vuori, K., Kaukinen, K., Rantala, I., Maki, M., and Hyoty, H. (2008). Detection of enteroviruses in the intestine of type 1 diabetic patients. *Clinical and Experimental Immunology*, 151, 71-75.

92. Yoon, J. W., Austin, M., Onodera, T., and Notkins, A. L. (1979). Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *The New England Journal of Medicine* 300, 1173-1179.
93. Lind, K., Huhn, M. H., and Flodstrom-Tullberg, M. (2012). Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: the innate immune response to enteroviruses and its possible role in regulating type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*, 168, 30-38.
94. Munz, C., Lunemann, J. D., Getts, M. T., and Miller, S. D. (2009). Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature Reviews Immunology*, 9, 246-258.
95. Craig, M. E., Nair, S., Stein, H., and Rawlinson, W. D. (2013). Viruses and type 1 diabetes: a new look at an old story. *Pediatric Diabetes*, 14, 149-158.
96. Knip, M., Virtanen, S. M., and Akerblom, H. K. (2010). Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 1506S-1513S.
97. Holmberg, H., Wahlberg, J., Vaarala, O., Ludvigsson, J., and Group, A. S. (2007). Short duration of breast-feeding as a risk-factor for beta-cell autoantibodies in 5-year-old children from the general population. *British Journal of Nutrition*, 97, 111-116.
98. Kimpimaki, T., Erkkola, M., Korhonen, S., Kupila, A., Virtanen, S. M., Ilonen, J., Simell, O., and Knip, M. (2001). Short-term exclusive breastfeeding predisposes young children with increased genetic risk of Type I diabetes to progressive beta-cell autoimmunity. *Diabetologia*, 44, 63-69.
99. Norris, J. M., Barriga, K., Klingensmith, G., Hoffman, M., Eisenbarth, G. S., Erlich, H. A., and Rewers, M. (2003). Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA*, 290, 1713-1720.
100. Ziegler, A. G., Schmid, S., Huber, D., Hummel, M., and Bonifacio, E. (2003). Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA*, 290, 1721-1728.
101. Akerblom, H. K., Virtanen, S. M., Ilonen, J., Savilahti, E., Vaarala, O., Reunanen, A., Teramo, K., Hamalainen, A. M., Paronen, J., Riikjarv, M. A., Ormiston, A., Ludvigsson, J., Dosch, H. M., Hakulinen, T., Knip, M., and National, T. S. G. (2005). Dietary manipulation of beta cell autoimmunity in infants at increased risk of type 1 diabetes: a pilot study. *Diabetologia*, 48, 829-837.
102. Vaarala, O., Atkinson, M. A., and Neu, J. (2008). The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes*, 57, 2555-2562.

103. Poole, J. A., Barriga, K., Leung, D. Y., Hoffman, M., Eisenbarth, G. S., Rewers, M., and Norris, J. M. (2006). Timing of initial exposure to cereal grains and the risk of wheat allergy. *Pediatrics*, 117, 2175-2182.
104. Funda, D. P., Kaas, A., Bock, T., Tlaskalova-Hogenova, H., and Buschard, K. (1999). Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 15, 323-327.
105. Flohe, S. B., Wasmuth, H. E., Kerad, J. B., Beales, P. E., Pozzilli, P., Elliott, R. B., Hill, J. P., Scott, F. W., and Kolb, H. (2003). A wheat-based, diabetes-promoting diet induces a Th1-type cytokine bias in the gut of NOD mice. *Cytokine*, 21, 149-154.
106. Mones, R. L. (2009). Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 48, 645-646.
107. Ludvigsson, J. F., Ludvigsson, J., Ekbom, A., and Montgomery, S. M. (2006). Celiac disease and risk of subsequent type 1 diabetes: a general population cohort study of children and adolescents. *Diabetes Care*, 29, 2483-2488.
108. Mathieu, C., van Etten, E., Decallonne, B., Guilietti, A., Gysemans, C., Bouillon, R., and Overbergh, L. (2004). Vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D3 as modulators in the immune system. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 89-90, 449-452.
109. Nielsen, D. S., Krych, L., Buschard, K., Hansen, C. H., and Hansen, A. K. (2014). Beyond genetics. Influence of dietary factors and gut microbiota on type 1 diabetes. *FEBS Letters* 588, 4234-4243.
110. Karvonen, M., Viik-Kajander, M., Moltchanova, E., Libman, I., LaPorte, R., and Tuomilehto, J. (2000). Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care*, 23, 1516-1526.
111. Hypponen, E., Laara, E., Reunanen, A., Jarvelin, M. R., and Virtanen, S. M. (2001). Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet*, 358, 1500-1503.
112. Stene, L. C., Ulriksen, J., Magnus, P., and Joner, G. (2000). Use of cod liver oil during pregnancy associated with lower risk of Type I diabetes in the offspring. *Diabetologia*, 43, 1093-1098.
113. Roep, B. O., and Peakman, M. (2012). Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, a007781.
114. Ziegler, A. G., and Nepom, G. T. (2010). Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes. *Immunity*, 32, 468-478.
115. Orban, T., Sosenko, J. M., Cuthbertson, D., Krischer, J. P., Skyler, J. S., Jackson, R., Yu, L., Palmer, J. P., Schatz, D., Eisenbarth, G., and Diabetes Prevention Trial-Type

- 1 Study, G. (2009). Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care*, 32, 2269-2274.
116. Winter, W. E., and Schatz, D. A. (2011). Autoimmune markers in diabetes. *Clinical Chemistry*, 57, 168-175.
 117. Palmer, J. P., Asplin, C. M., Clemons, P., Lyen, K., Tatpati, O., Raghu, P. K., and Paquette, T. L. (1983). Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*, 222, 1337-1339.
 118. Atkinson, M. A., Maclaren, N. K., Riley, W. J., Winter, W. E., Fisk, D. D., and Spillar, R. P. (1986). Are insulin autoantibodies markers for insulin-dependent diabetes mellitus? *Diabetes*, 35, 894-898.
 119. Achenbach, P., Bonifacio, E., Williams, A. J., Ziegler, A. G., Gale, E. A., Bingley, P. J., and Group, E. (2008). Autoantibodies to IA-2beta improve diabetes risk assessment in high-risk relatives. *Diabetologia*, 51, 488-492.
 120. Uibo, R., and Lernmark, A. (2008). GAD65 autoimmunity-clinical studies. *Advances in Immunology* 100, 39-78.
 121. Aanstoot, H. J., Kang, S. M., Kim, J., Lindsay, L. A., Roll, U., Knip, M., Atkinson, M., Mose-Larsen, P., Fey, S., Ludvigsson, J., Landin, L., Bruining, J., Maclaren, N., Akerblom, H. K., and Baekkeskov, S. (1996). Identification and characterization of glima 38, a glycosylated islet cell membrane antigen, which together with GAD65 and IA2 marks the early phases of autoimmune response in type 1 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 97, 2772-2783.
 122. Zimmet, P. Z., Tuomi, T., Mackay, I. R., Rowley, M. J., Knowles, W., Cohen, M., and Lang, D. A. (1994). Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetic Medicine*, 11, 299-303.
 123. Bottazzo, G. F., Florin-Christensen, A., and Doniach, D. (1974). Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, 2, 1279-1283.
 124. Neufeld, M., Maclaren, N. K., Riley, W. J., Lezotte, D., McLaughlin, J. V., Silverstein, J., and Rosenbloom, A. L. (1980). Islet cell and other organ-specific antibodies in U.S. Caucasians and Blacks with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, 29, 589-592.
 125. Morran, M. P., Casu, A., Arena, V. C., Pietropaolo, S., Zhang, Y. J., Satin, L. S., Nelson, P., Omenn, G. S., Trucco, M., Becker, D. J., and Pietropaolo, M. (2010). Humoral autoimmunity against the extracellular domain of the neuroendocrine autoantigen IA-2 heightens the risk of type 1 diabetes. *Endocrinology*, 151, 2528-2537.

126. Libman, I. M., Pietropaolo, M., Trucco, M., Dorman, J. S., LaPorte, R. E., and Becker, D. (1998). Islet cell autoimmunity in white and black children and adolescents with IDDM. *Diabetes Care*, 21, 1824-1827.
127. Wenzlau, J. M., Juhl, K., Yu, L., Moua, O., Sarkar, S. A., Gottlieb, P., Rewers, M., Eisenbarth, G. S., Jensen, J., Davidson, H. W., and Hutton, J. C. (2007). The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 17040-17045.
128. Chimienti, F., Devergnas, S., Favier, A., and Seve, M. (2004). Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes*, 53, 2330-2337.
129. Vaziri-Sani, F., Oak, S., Radtke, J., Lernmark, K., Lynch, K., Agardh, C. D., Cilio, C. M., Lethagen, A. L., Ortqvist, E., Landin-Olsson, M., Torn, C., and Hampe, C. S. (2010). ZnT8 autoantibody titers in type 1 diabetes patients decline rapidly after clinical onset. *Autoimmunity*, 43, 598-606.
130. Wenzlau, J. M., Moua, O., Sarkar, S. A., Yu, L., Rewers, M., Eisenbarth, G. S., Davidson, H. W., and Hutton, J. C. (2008). SLc30A8 is a major target of humoral autoimmunity in type 1 diabetes and a predictive marker in prediabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1150, 256-259.
131. De Grijse, J., Asanghanwa, M., Nouthe, B., Albrecher, N., Goubert, P., Vermeulen, I., Van Der Meeren, S., Decochez, K., Weets, I., Keymeulen, B., Lampasona, V., Wenzlau, J., Hutton, J. C., Pipeleers, D., Gorus, F. K., and Belgian Diabetes, R. (2010). Predictive power of screening for antibodies against insulinoma-associated protein 2 beta (IA-2beta) and zinc transporter-8 to select first-degree relatives of type 1 diabetic patients with risk of rapid progression to clinical onset of the disease: implications for prevention trials. *Diabetologia*, 53, 517-524.
132. Willcox, A., Richardson, S. J., Bone, A. J., Foulis, A. K., and Morgan, N. G. (2009). Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology* 155, 173-181.
133. Turley, S., Poirot, L., Hattori, M., Benoist, C., and Mathis, D. (2003). Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *The Journal of Experimental Medicine*, 198, 1527-1537.
134. Adorini, L. (2001). Interleukin 12 and autoimmune diabetes. *Nature Genetics*, 27, 131-132.
135. Yagi, H., Matsumoto, M., Kunimoto, K., Kawaguchi, J., Makino, S., and Harada, M. (1992). Analysis of the roles of CD4+ and CD8+ T cells in autoimmune diabetes of NOD mice using transfer to NOD athymic nude mice. *European Journal of Immunology*, 22, 2387-2393.
136. Matsumoto, M., Yagi, H., Kunimoto, K., Kawaguchi, J., Makino, S., and Harada, M. (1993). Transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to NOD athymic

- nude mice: the roles of T cell subsets in the pathogenesis. *Cell Immunology*, 148, 189-197.
137. Christianson, S. W., Shultz, L. D., and Leiter, E. H. (1993). Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes*, 42, 44-55.
 138. Phillips, J. M., Parish, N. M., Raine, T., Bland, C., Sawyer, Y., De La Pena, H., and Cooke, A. (2009). Type 1 diabetes development requires both CD4+ and CD8+ T cells and can be reversed by non-depleting antibodies targeting both T cell populations. *The Review of Diabetic Studies*, 6, 97-103.
 139. Pietropaolo, M., Surhugh, J. M., Nelson, P. W., and Eisenbarth, G. S. (2008). Primer: immunity and autoimmunity. *Diabetes*, 57, 2872-2882.
 140. Bevan, M. J. (2004). Helping the CD8(+) T-cell response. *Nature Reviews Immunology*, 4, 595-602.
 141. Kurts, C., Robinson, B. W., and Knolle, P. A. (2010). Cross-priming in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 10, 403-414.
 142. Katz, J., Benoist, C., and Mathis, D. (1993). Major histocompatibility complex class I molecules are required for the development of insulitis in non-obese diabetic mice. *European Journal of Immunology*, 23, 3358-3360.
 143. Hamilton-Williams, E. E., Palmer, S. E., Charlton, B., and Slattery, R. M. (2003). Beta cell MHC class I is a late requirement for diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 100, 6688-6693.
 144. Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annual Review of Immunology*, 19, 47-64.
 145. Stassi, G., De Maria, R., Trucco, G., Rudert, W., Testi, R., Galluzzo, A., Giordano, C., and Trucco, M. (1997). Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Experimental Medicine*, 186, 1193-1200.
 146. Thomas, H. E., Trapani, J. A., and Kay, T. W. (2010). The role of perforin and granzymes in diabetes. *Cell Death and Differentiation*, 17, 577-585.
 147. Trapani, J. A., and Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology*, 2, 735-747.
 148. Makhoulouf, L., Grey, S. T., Dong, V., Csizmadia, E., Arvelo, M. B., Auchincloss, H., Jr., Ferran, C., and Sayegh, M. H. (2004). Depleting anti-CD4 monoclonal antibody cures new-onset diabetes, prevents recurrent autoimmune diabetes, and delays allograft rejection in nonobese diabetic mice. *Transplantation*, 77, 990-997.

149. Russ, B. E., Prier, J. E., Rao, S., and Turner, S. J. (2013). T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Frontiers in Genetics*, 4, 218.
150. O'Shea, J. J., and Paul, W. E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science*, 327, 1098-1102.
151. Zhou, L., Chong, M. M., and Littman, D. R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity*, 30, 646-655.
152. Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y., and O'Shea, J. J. (2012). Helper T cell diversity and plasticity. *Current Opinion in Immunology*, 24, 297-302.
153. Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlaschi, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudici, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E., and Romagnani, S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *Journal of Experimental Medicine*, 204, 1849-1861.
154. Bending, D., De la Pena, H., Veldhoen, M., Phillips, J. M., Uyttenhove, C., Stockinger, B., and Cooke, A. (2009). Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 119, 565-572.
155. Mathis, D., Vence, L., and Benoist, C. (2001). beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature*, 414, 792-798.
156. Sia, C. (2005). Imbalance in Th cell polarization and its relevance in type 1 diabetes mellitus. *The Review of Diabetic Studies*, 2, 182-186.
157. Arif, S., Moore, F., Marks, K., Bouckenooghe, T., Dayan, C. M., Planas, R., Vives-Pi, M., Powrie, J., Tree, T., Marchetti, P., Huang, G. C., Gurzov, E. N., Pujol-Borrell, R., Eizirik, D. L., and Peakman, M. (2011). Peripheral and islet interleukin-17 pathway activation characterizes human autoimmune diabetes and promotes cytokine-mediated beta-cell death. *Diabetes*, 60, 2112-2119.
158. Marwaha, A. K., Crome, S. Q., Panagiotopoulos, C., Berg, K. B., Qin, H., Ouyang, Q., Xu, L., Priatel, J. J., Levings, M. K., and Tan, R. (2010). Cutting edge: Increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *The Journal of Immunology*, 185, 3814-3818.
159. Honkanen, J., Nieminen, J. K., Gao, R., Luopajarvi, K., Salo, H. M., Ilonen, J., Knip, M., Otonkoski, T., and Vaarala, O. (2010). IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *The Journal of Immunology*, 185, 1959-1967.
160. Martin-Orozco, N., Chung, Y., Chang, S. H., Wang, Y. H., and Dong, C. (2009). Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *European Journal of Immunology*, 39, 216-224.

161. Serreze, D. V., Chapman, H. D., Varnum, D. S., Hanson, M. S., Reifsnyder, P. C., Richard, S. D., Fleming, S. A., Leiter, E. H., and Shultz, L. D. (1996). B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.Ig mu null mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 184, 2049-2053.
162. Noorchashm, H., Noorchashm, N., Kern, J., Rostami, S. Y., Barker, C. F., and Naji, A. (1997). B-cells are required for the initiation of insulitis and sialitis in nonobese diabetic mice. *Diabetes*, 46, 941-946.
163. Xiu, Y., Wong, C. P., Bouaziz, J. D., Hamaguchi, Y., Wang, Y., Pop, S. M., Tisch, R. M., and Tedder, T. F. (2008). B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. *The Journal of Immunology*, 180, 2863-2875.
164. Hu, C. Y., Rodriguez-Pinto, D., Du, W., Ahuja, A., Henegariu, O., Wong, F. S., Shlomchik, M. J., and Wen, L. (2007). Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 117, 3857-3867.
165. Marino, E., Silveira, P. A., Stolp, J., and Grey, S. T. (2011). B cell-directed therapies in type 1 diabetes. *Trends in Immunology*, 32, 287-294.
166. Hinman, R. M., and Cambier, J. C. (2014). Role of B lymphocytes in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Current Diabetes Reports*, 14, 543.
167. Wong, F. S., and Wen, L. (2005). B cells in autoimmune diabetes. *The Review of Diabetic Studies*, 2, 121-135.
168. Jun, H. S., Yoon, C. S., Zbytniuk, L., van Rooijen, N., and Yoon, J. W. (1999). The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of Experimental Medicine*, 189, 347-358.
169. Hutchings, P. R., and Cooke, A. (1990). The transfer of autoimmune diabetes in NOD mice can be inhibited or accelerated by distinct cell populations present in normal splenocytes taken from young males. *Journal of Autoimmunity*, 3, 175-185.
170. Alleva, D. G., Pavlovich, R. P., Grant, C., Kaser, S. B., and Beller, D. I. (2000). Aberrant macrophage cytokine production is a conserved feature among autoimmune-prone mouse strains: elevated interleukin (IL)-12 and an imbalance in tumor necrosis factor-alpha and IL-10 define a unique cytokine profile in macrophages from young nonobese diabetic mice. *Diabetes*, 49, 1106-1115.
171. Dahlen, E., Dawe, K., Ohlsson, L., and Hedlund, G. (1998). Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *Journal of Immunology*, 160, 3585-3593.

172. Arnush, M., Scarim, A. L., Heitmeier, M. R., Kelly, C. B., and Corbett, J. A. (1998). Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *Journal of Immunology*, 160, 2684-2691.
173. Uno, S., Imagawa, A., Okita, K., Sayama, K., Moriwaki, M., Iwahashi, H., Yamagata, K., Tamura, S., Matsuzawa, Y., Hanafusa, T., Miyagawa, J., and Shimomura, I. (2007). Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia*, 50, 596-601.
174. Espinoza-Jimenez, A., Peon, A. N., and Terrazas, L. I. (2012). Alternatively activated macrophages in types 1 and 2 diabetes. *Mediators of Inflammation*, 2012, 815953.
175. Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* 3, 23-35.
176. Szablewski, L. (2014). Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *International Immunopharmacology*, 22, 182-191.
177. Liu, Q., Sundar, K., Mishra, P. K., Mousavi, G., Liu, Z., Gaydo, A., Alem, F., Lagunoff, D., Bleich, D., and Gause, W. C. (2009). Helminth infection can reduce insulinitis and type 1 diabetes through CD25- and IL-10-independent mechanisms. *Infection and Immunity*, 77, 5347-5358.
178. Maizels, R. M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M. D., and Allen, J. E. (2004). Helminth parasites--masters of regulation. *Immunological Reviews*, 201, 89-116.
179. Kreider, T., Anthony, R. M., Urban, J. F., Jr., and Gause, W. C. (2007). Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Current Opinion in Immunology*, 19, 448-453.
180. Martinez, F. O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*, 27, 451-483.
181. Noel, W., Raes, G., Hassanzadeh Ghassabeh, G., De Baetselier, P., and Beschin, A. (2004). Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in Parasitology*, 20, 126-133.
182. Winer, S., and Winer, D. A. (2012). The adaptive immune system as a fundamental regulator of adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Immunology and Cell Biology*, 90, 755-762.
183. Guernonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 20, 621-667.

184. Belz, G. T., Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2002). The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunology and Cell Biology*, 80, 463-468.
185. Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252.
186. Tan, J. K., and O'Neill, H. C. (2005). Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 78, 319-324.
187. Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspod, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J. W., Pascual, V., Palucka, A. K., and Banchereau, J. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunological Reviews*, 219, 118-142.
188. Villadangos, J. A., and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature Reviews Immunology*, 7, 543-555.
189. Ganguly, D., Haak, S., Sisirak, V., and Reizis, B. (2013). The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, 13, 566-577.
190. Collin, M., McGovern, N., and Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 140, 22-30.
191. Shortman, K., and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology*, 2, 151-161.
192. Shortman, K., and Naik, S. H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Reviews Immunology*, 7, 19-30.
193. Wheat, W., Kupfer, R., Gutches, D. G., Rayat, G. R., Beilke, J., Scheinman, R. I., and Wegmann, D. R. (2004). Increased NF-kappa B activity in B cells and bone marrow-derived dendritic cells from NOD mice. *European Journal of Immunology*, 34, 1395-1404.
194. Summers, K. L., Behme, M. T., Mahon, J. L., and Singh, B. (2003). Characterization of dendritic cells in humans with type 1 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1005, 226-229.
195. Calderon, B., Suri, A., Miller, M. J., and Unanue, E. R. (2008). Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present beta cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 6121-6126.
196. Marleau, A. M., Summers, K. L., and Singh, B. (2008). Differential contributions of APC subsets to T cell activation in nonobese diabetic mice. *Journal of Immunology*, 180, 5235-5249.

197. Steptoe, R. J., Ritchie, J. M., and Harrison, L. C. (2002). Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice. *Journal of Immunology*, 168, 5032-5041.
198. Poligone, B., Weaver, D. J., Jr., Sen, P., Baldwin, A. S., Jr., and Tisch, R. (2002). Elevated NF-kappaB activation in nonobese diabetic mouse dendritic cells results in enhanced APC function. *Journal of Immunology*, 168, 188-196.
199. Huang, X., Yuang, J., Goddard, A., Foulis, A., James, R. F., Lernmark, A., Pujol-Borrell, R., Rabinovitch, A., Somoza, N., and Stewart, T. A. (1995). Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes*, 44, 658-664.
200. Li, Q., Xu, B., Michie, S. A., Rubins, K. H., Schreiber, R. D., and McDevitt, H. O. (2008). Interferon-alpha initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 12439-12444.
201. Stewart, T. A., Hultgren, B., Huang, X., Pitts-Meek, S., Hully, J., and MacLachlan, N. J. (1993). Induction of type I diabetes by interferon-alpha in transgenic mice. *Science*, 260, 1942-1946.
202. Alba, A., Puertas, M. C., Carrillo, J., Planas, R., Ampudia, R., Pastor, X., Bosch, F., Pujol-Borrell, R., Verdager, J., and Vives-Pi, M. (2004). IFN beta accelerates autoimmune type 1 diabetes in nonobese diabetic mice and breaks the tolerance to beta cells in nondiabetes-prone mice. *Journal of Immunology*, 173, 6667-6675.
203. Diana, J., Simoni, Y., Furio, L., Beaudoin, L., Agerberth, B., Barrat, F., and Lehuen, A. (2013). Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature Medicine*, 19, 65-73.
204. Cooper, M. A., Fehniger, T. A., and Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 22, 633-640.
205. Shi, F. D., and Van Kaer, L. (2006). Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells. *Nature Reviews Immunology*, 6, 751-760.
206. Fan, Y. Y., Yang, B. Y., and Wu, C. Y. (2008). Phenotypically and functionally distinct subsets of natural killer cells in human PBMCs. *Cell Biology International*, 32, 188-197.
207. Rodacki, M., Milech, A., and de Oliveira, J. E. (2006). NK cells and type 1 diabetes. *Clinical and Developmental Immunology*, 13, 101-107.
208. Moretta, L., and Moretta, A. (2004). Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *The EMBO Journal*, 23, 255-259.
209. Flodstrom, M., Shi, F. D., Sarvetnick, N., and Ljunggren, H. G. (2002). The natural killer cell -- friend or foe in autoimmune disease? *Scandinavian Journal of Immunology*, 55, 432-441.

210. Maruyama, T., Watanabe, K., Yanagawa, T., Kasatani, T., Kasuga, A., Shimada, A., Takei, I., Suzuki, Y., Kataoka, K., and Saruta, T. (1991). The suppressive effect of anti-asialo GM1 antibody on low-dose streptozotocin-induced diabetes in CD-1 mice. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 16, 171-175.
211. Maruyama, T., Watanabe, K., Takei, I., Kasuga, A., Shimada, A., Yanagawa, T., Kasatani, T., Suzuki, Y., Kataoka, K., Saruta, and et al. (1991). Anti-asialo GM1 antibody suppression of cyclophosphamide-induced diabetes in NOD mice. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 17, 37-41.
212. Beilke, J. N., Meagher, C. T., Hosiawa, K., Champsaur, M., Bluestone, J. A., and Lanier, L. L. (2012). NK cells are not required for spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice. *PLoS One*, 7, e36011.
213. Dotta, F., Censini, S., van Halteren, A. G., Marselli, L., Masini, M., Dionisi, S., Mosca, F., Boggi, U., Muda, A. O., Del Prato, S., Elliott, J. F., Covacci, A., Rappuoli, R., Roep, B. O., and Marchetti, P. (2007). Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 5115-5120.
214. Colucci, F., and Cilio, C. M. (2010). Taming killer cells may halt diabetes progression. *Nature Immunology*, 11, 111-112.
215. Gur, C., Porgador, A., Elboim, M., Gazit, R., Mizrahi, S., Stern-Ginossar, N., Achdout, H., Ghadially, H., Dor, Y., Nir, T., Doviner, V., HersHKovitz, O., Mendelson, M., Naparstek, Y., and Mandelboim, O. (2010). The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nature Immunology*, 11, 121-128.
216. Ogasawara, K., Hamerman, J. A., Ehrlich, L. R., Bour-Jordan, H., Santamaria, P., Bluestone, J. A., and Lanier, L. L. (2004). NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity*, 20, 757-767.
217. Backstrom, E., Kristensson, K., and Ljunggren, H. G. (2004). Activation of natural killer cells: underlying molecular mechanisms revealed. *Scandinavian Journal of Immunology*, 60, 14-22.
218. Rodacki, M., Svoren, B., Butty, V., Besse, W., Laffel, L., Benoist, C., and Mathis, D. (2007). Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes*, 56, 177-185.
219. Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., and Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual Review of Immunology*, 17, 189-220.
220. Qin, H., Lee, I. F., Panagiotopoulos, C., Wang, X., Chu, A. D., Utz, P. J., Priatel, J. J., and Tan, R. (2011). Natural killer cells from children with type 1 diabetes have defects in NKG2D-dependent function and signaling. *Diabetes*, 60, 857-866.

221. Ogasawara, K., Hamerman, J. A., Hsin, H., Chikuma, S., Bour-Jordan, H., Chen, T., Pertel, T., Carnaud, C., Bluestone, J. A., and Lanier, L. L. (2003). Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity*, 18, 41-51.
222. Brauner, H., Elemans, M., Lemos, S., Broberger, C., Holmberg, D., Flodstrom-Tullberg, M., Karre, K., and Hoglund, P. (2010). Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice. *Journal of Immunology*, 184, 2272-2280.
223. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., and Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11, 519-531.
224. Valle, A., Giamporcaro, G. M., Scavini, M., Stabilini, A., Grogan, P., Bianconi, E., Sebastiani, G., Masini, M., Maugeri, N., Porretti, L., Bonfanti, R., Meschi, F., De Pellegrin, M., Lesma, A., Rossini, S., Piemonti, L., Marchetti, P., Dotta, F., Bosi, E., and Battaglia, M. (2013). Reduction of circulating neutrophils precedes and accompanies type 1 diabetes. *Diabetes*, 62, 2072-2077.
225. Harsunen, M. H., Puff, R., D'Orlando, O., Giannopoulou, E., Lachmann, L., Beyerlein, A., von Meyer, A., and Ziegler, A. G. (2013). Reduced blood leukocyte and neutrophil numbers in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Hormone and Metabolic Research*, 45, 467-470.
226. Battaglia, M. (2014). Neutrophils and type 1 autoimmune diabetes. *Current Opinion in Hematology*, 21, 8-15.
227. Bluestone, J. A. (2011). Mechanisms of tolerance. *Immunological Reviews*, 241, 5-19.
228. Starr, T. K., Jameson, S. C., and Hogquist, K. A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annual Review of Immunology*, 21, 139-176.
229. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., and Pillai, S. (2015). *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia, PA, Elsevier Saunders,
230. Nossal, G. J. (1994). Negative selection of lymphocytes. *Cell*, 76, 229-239.
231. Chentoufi, A. A., Binder, N. R., Berka, N., Abunadi, T., and Polychronakos, C. (2008). Advances in type I diabetes associated tolerance mechanisms. *Scandinavian Journal of Immunology*, 68, 1-11.
232. Gregersen, P. K., and Behrens, T. W. (2006). Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis. *Nature Reviews Genetics*, 7, 917-928.
233. Anderson, M. S., Venzani, E. S., Chen, Z., Berzins, S. P., Benoist, C., and Mathis, D. (2005). The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity*, 23, 227-239.

234. Eisenbarth, G. S. (2004). Autoimmune polyendocrine syndromes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 552, 204-218.
235. Metzger, T. C., and Anderson, M. S. (2011). Control of central and peripheral tolerance by Aire. *Immunological Reviews*, 241, 89-103.
236. Aschenbrenner, K., D'Cruz, L. M., Vollmann, E. H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L. K., Rolink, A., and Klein, L. (2007). Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nature Immunology*, 8, 351-358.
237. Chentoufi, A. A., and Polychronakos, C. (2002). Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. *Diabetes*, 51, 1383-1390.
238. Walker, L. S., and Abbas, A. K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nature Review of Immunology*, 2, 11-19.
239. Van Parijs, L., and Abbas, A. K. (1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science*, 280, 243-248.
240. Macian, F., Im, S. H., Garcia-Cozar, F. J., and Rao, A. (2004). T-cell anergy. *Current Opinion in Immunology*, 16, 209-216.
241. Redmond, W. L., and Sherman, L. A. (2005). Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity*, 22, 275-284.
242. Mueller, D. L. (2010). Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nature Immunology*, 11, 21-27.
243. Rudensky, A. Y. (2011). Regulatory T cells and Foxp3. *Immunological Reviews*, 241, 260-268.
244. Bilate, A. M., and Lafaille, J. J. (2012). Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Annual Review of Immunology*, 30, 733-758.
245. Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology*, 6, 345-352.
246. Vignali, D. A., Collison, L. W., and Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Review of Immunology*, 8, 523-532.
247. Jeker, L. T., Bour-Jordan, H., and Bluestone, J. A. (2012). Breakdown in peripheral tolerance in type 1 diabetes in mice and humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, a007807.
248. Homann, D., and von Herrath, M. (2004). Regulatory T cells and type 1 diabetes. *Clinical Immunology*, 112, 202-209.

249. Tang, Q., and Bluestone, J. A. (2008). The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology*, 9, 239-244.
250. Roncarolo, M. G., and Battaglia, M. (2007). Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nature Review of Immunology*, 7, 585-598.
251. Arif, S., Tree, T. I., Astill, T. P., Tremble, J. M., Bishop, A. J., Dayan, C. M., Roep, B. O., and Peakman, M. (2004). Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *The Journal of Clinical Investigation*, 113, 451-463.
252. Lindley, S., Dayan, C. M., Bishop, A., Roep, B. O., Peakman, M., and Tree, T. I. (2005). Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 54, 92-99.
253. Long, S. A., Cerosaletti, K., Bollyky, P. L., Tatum, M., Shilling, H., Zhang, S., Zhang, Z. Y., Pihoker, C., Sanda, S., Greenbaum, C., and Buckner, J. H. (2010). Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes*, 59, 407-415.
254. Schneider, A., Rieck, M., Sanda, S., Pihoker, C., Greenbaum, C., and Buckner, J. H. (2008). The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4⁺ FOXP3⁺ regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 181, 7350-7355.
255. D'Alise, A. M., Auyeung, V., Feuerer, M., Nishio, J., Fontenot, J., Benoist, C., and Mathis, D. (2008). The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 19857-19862.
256. Salomon, B., Lenschow, D. J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A., and Bluestone, J. A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 12, 431-440.
257. Feuerer, M., Shen, Y., Littman, D. R., Benoist, C., and Mathis, D. (2009). How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. *Immunity*, 31, 654-664.
258. Brusko, T. M., Putnam, A. L., and Bluestone, J. A. (2008). Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunologic Reviews*, 223, 371-390.
259. Bluestone, J. A., and Tang, Q. (2004). Therapeutic vaccination using CD4⁺CD25⁺ antigen-specific regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 Suppl 2, 14622-14626.
260. Masteller, E. L., Warner, M. R., Tang, Q., Tarbell, K. V., McDevitt, H., and Bluestone, J. A. (2005). Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4⁺CD25⁺

- regulatory T cells from nonobese diabetic mice. *Journal of Immunology*, 175, 3053-3059.
261. Tang, Q., Henriksen, K. J., Bi, M., Finger, E. B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E. L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., and Bluestone, J. A. (2004). In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *The Journal of Experimental Medicine*, 199, 1455-1465.
 262. Putnam, A. L., Brusko, T. M., Lee, M. R., Liu, W., Szot, G. L., Ghosh, T., Atkinson, M. A., and Bluestone, J. A. (2009). Expansion of human regulatory T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 58, 652-662.
 263. Roncarolo, M. G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M. K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunologic Reviews*, 212, 28-50.
 264. Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J., Bluestone, J. A., and Herold, K. C. (2005). TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺CD25⁺ Tregs. *The Journal of Clinical Investigation*, 115, 2904-2913.
 265. Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A., and Kaufman, D. L. (2001). Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of Immunology*, 167, 1081-1089.
 266. Hussain, S., and Delovitch, T. L. (2007). Intravenous transfusion of BCR-activated B cells protects NOD mice from type 1 diabetes in an IL-10-dependent manner. *J Immunol*, 179, 7225-7232.
 267. Yang, M., Rui, K., Wang, S., and Lu, L. (2013). Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, 10, 122-132.
 268. Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S. B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., and Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of Experimental Medicine*, 206, 549-559.
 269. Mahnke, K., Johnson, T. S., Ring, S., and Enk, A. H. (2007). Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. *Journal of Dermatological Science*, 46, 159-167.
 270. Manicassamy, S., and Pulendran, B. (2011). Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunological Reviews*, 241, 206-227.
 271. Dillon, S., Agrawal, A., Van Dyke, T., Landreth, G., McCauley, L., Koh, A., Maliszewski, C., Akira, S., and Pulendran, B. (2004). A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *Journal of Immunology*, 172, 4733-4743.

272. Bruder, D., Westendorf, A. M., Hansen, W., Prettin, S., Gruber, A. D., Qian, Y., von Boehmer, H., Mahnke, K., and Buer, J. (2005). On the edge of autoimmunity: T-cell stimulation by steady-state dendritic cells prevents autoimmune diabetes. *Diabetes*, 54, 3395-3401.
273. Moseman, E. A., Liang, X., Dawson, A. J., Panoskaltsis-Mortari, A., Krieg, A. M., Liu, Y. J., Blazar, B. R., and Chen, W. (2004). Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 173, 4433-4442.
274. Morelli, A. E., and Thomson, A. W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 7, 610-621.
275. Penna, G., Amuchastegui, S., Giarratana, N., Daniel, K. C., Vulcano, M., Sozzani, S., and Adorini, L. (2007). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Immunology*, 178, 145-153.
276. Kleijwegt, F. S., Jansen, D. T., Teeler, J., Joosten, A. M., Laban, S., Nikolic, T., and Roep, B. O. (2012). Tolerogenic dendritic cells impede priming of naive CD8(+) T cells and deplete memory CD8(+) T cells. *European Journal of Immunology*,
277. Beckman, E. M., Porcelli, S. A., Morita, C. T., Behar, S. M., Furlong, S. T., and Brenner, M. B. (1994). Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature*, 372, 691-694.
278. Wilson, S. B., Kent, S. C., Patton, K. T., Orban, T., Jackson, R. A., Exley, M., Porcelli, S., Schatz, D. A., Atkinson, M. A., Balk, S. P., Strominger, J. L., and Hafler, D. A. (1998). Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature*, 391, 177-181.
279. Laloux, V., Beaudoin, L., Jeske, D., Carnaud, C., and Lehuen, A. (2001). NK T cell-induced protection against diabetes in V alpha 14-J alpha 281 transgenic nonobese diabetic mice is associated with a Th2 shift circumscribed regionally to the islets and functionally to islet autoantigen. *Journal of Immunology*, 166, 3749-3756.
280. Beaudoin, L., Laloux, V., Novak, J., Lucas, B., and Lehuen, A. (2002). NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. *Immunity*, 17, 725-736.
281. Mi, Q. S., Ly, D., Zucker, P., McGarry, M., and Delovitch, T. L. (2004). Interleukin-4 but not interleukin-10 protects against spontaneous and recurrent type 1 diabetes by activated CD1d-restricted invariant natural killer T-cells. *Diabetes*, 53, 1303-1310.
282. Kim, H. S., and Lee, M. S. (2009). Role of innate immunity in triggering and tuning of autoimmune diabetes. *Current Molecular Medicine*, 9, 30-44.

283. Johansson, S., Berg, L., Hall, H., and Hoglund, P. (2005). NK cells: elusive players in autoimmunity. *Trends in Immunology*, 26, 613-618.
284. Martinuzzi, E., Novelli, G., Scotto, M., Blancou, P., Bach, J. M., Chaillous, L., Bruno, G., Chatenoud, L., van Endert, P., and Mallone, R. (2008). The frequency and immunodominance of islet-specific CD8+ T-cell responses change after type 1 diabetes diagnosis and treatment. *Diabetes*, 57, 1312-1320.
285. Durinovic-Bello, I., Rosinger, S., Olson, J. A., Congia, M., Ahmad, R. C., Rickert, M., Hampl, J., Kalbacher, H., Drijfhout, J. W., Mellins, E. D., Al Dahouk, S., Kamradt, T., Maeurer, M. J., Nhan, C., Roep, B. O., Boehm, B. O., Polychronakos, C., Nepom, G. T., Karges, W., McDevitt, H. O., and Sonderstrup, G. (2006). DRB1*0401-restricted human T cell clone specific for the major proinsulin73-90 epitope expresses a down-regulatory T helper 2 phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 11683-11688.
286. Abreu, J. R., Martina, S., Verrijn Stuart, A. A., Fillie, Y. E., Franken, K. L., Drijfhout, J. W., and Roep, B. O. (2012). CD8 T cell autoreactivity to preproinsulin epitopes with very low human leucocyte antigen class I binding affinity. *Clinical and Experimental Immunology*, 170, 57-65.
287. Coppieters, K. T., Dotta, F., Amirian, N., Campbell, P. D., Kay, T. W., Atkinson, M. A., Roep, B. O., and von Herrath, M. G. (2012). Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *The Journal of Experimental Medicine*, 209, 51-60.
288. Codina-Busqueta, E., Scholz, E., Munoz-Torres, P. M., Roura-Mir, C., Costa, M., Xufre, C., Planas, R., Vives-Pi, M., Jaraquemada, D., and Marti, M. (2011). TCR bias of in vivo expanded T cells in pancreatic islets and spleen at the onset in human type 1 diabetes. *Journal of Immunology*, 186, 3787-3797.
289. Skowera, A., Ellis, R. J., Varela-Calvino, R., Arif, S., Huang, G. C., Van-Krinks, C., Zaremba, A., Rackham, C., Allen, J. S., Tree, T. I., Zhao, M., Dayan, C. M., Sewell, A. K., Unger, W. W., Drijfhout, J. W., Ossendorp, F., Roep, B. O., and Peakman, M. (2008). CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope. *The Journal of Clinical Investigation*, 118, 3390-3402.
290. Velthuis, J. H., Unger, W. W., Abreu, J. R., Duinkerken, G., Franken, K., Peakman, M., Bakker, A. H., Reker-Hadrup, S., Keymeulen, B., Drijfhout, J. W., Schumacher, T. N., and Roep, B. O. (2010). Simultaneous detection of circulating autoreactive CD8+ T-cells specific for different islet cell-associated epitopes using combinatorial MHC multimers. *Diabetes*, 59, 1721-1730.
291. Knight, R. R., Kronenberg, D., Zhao, M., Huang, G. C., Eichmann, M., Bulek, A., Wooldridge, L., Cole, D. K., Sewell, A. K., Peakman, M., and Skowera, A. (2013). Human beta-cell killing by autoreactive preproinsulin-specific CD8 T cells is predominantly granule-mediated with the potency dependent upon T-cell receptor avidity. *Diabetes*, 62, 205-213.

292. Kronenberg, D., Knight, R. R., Estorninho, M., Ellis, R. J., Kester, M. G., de Ru, A., Eichmann, M., Huang, G. C., Powrie, J., Dayan, C. M., Skowera, A., van Veelen, P. A., and Peakman, M. (2012). Circulating preproinsulin signal peptide-specific CD8 T cells restricted by the susceptibility molecule HLA-A24 are expanded at onset of type 1 diabetes and kill beta-cells. *Diabetes*, 61, 1752-1759.
293. Vcelakova, J., Blatny, R., Halbhuber, Z., Kolar, M., Neuwirth, A., Petruzalkova, L., Ulmannova, T., Kolouskova, S., Sumnik, Z., Pithova, P., Krivjanska, M., Filipp, D., and Stechova, K. (2013). The Effect of Diabetes-Associated Autoantigens on Cell Processes in Human PBMCs and Their Relevance to Autoimmune Diabetes Development. *Journal of Diabetes Research*, 2013, 589451.
294. Baekkeskov, S., Aanstoot, H. J., Christgau, S., Reetz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olesen, H., and De Camilli, P. (1990). Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, 347, 151-156.
295. Brooks-Worrell, B. M., Starkebaum, G. A., Greenbaum, C., and Palmer, J. P. (1996). Peripheral blood mononuclear cells of insulin-dependent diabetic patients respond to multiple islet cell proteins. *Journal of Immunology*, 157, 5668-5674.
296. Peakman, M., Tree, T. I., Endl, J., van Endert, P., Atkinson, M. A., Roep, B. O., and Second International Immunology of Diabetes Society Workshop for Standardization of, T. c. A. i. T. D. (2001). Characterization of preparations of GAD65, proinsulin, and the islet tyrosine phosphatase IA-2 for use in detection of autoreactive T-cells in type 1 diabetes: report of phase II of the Second International Immunology of Diabetes Society Workshop for Standardization of T-cell assays in type 1 diabetes. *Diabetes*, 50, 1749-1754.
297. Di Lorenzo, T. P., Peakman, M., and Roep, B. O. (2007). Translational mini-review series on type 1 diabetes: Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*, 148, 1-16.
298. Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., and Davis, M. M. (2011). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 1996. 274: 94-96. *Journal of Immunology*, 187, 7-9.
299. Schloot, N. C., Willemsen, S., Duinkerken, G., de Vries, R. R., and Roep, B. O. (1998). Cloned T cells from a recent onset IDDM patient reactive with insulin B-chain. *Journal of Autoimmunity*, 11, 169-175.
300. Nepom, G. T., Buckner, J. H., Novak, E. J., Reichstetter, S., Reijonen, H., Gebe, J., Wang, R., Swanson, E., and Kwok, W. W. (2002). HLA class II tetramers: tools for direct analysis of antigen-specific CD4+ T cells. *Arthritis & Rheumatology*, 46, 5-12.
301. Fierabracci, A. (2011). The potential of multimer technologies in type 1 diabetes prediction strategies. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 27, 216-229.

302. Chen, H. W., Liu, S. J., Chong, P., and Sia, C. (2007). The Development and Application of HLA Tetramers in the Detection, Characterization and Therapy of Type 1 Diabetes Mellitus. *The Review of Diabetic Studies*, 4, 56-61.
303. Scriba, T. J., Purbhoo, M., Day, C. L., Robinson, N., Fidler, S., Fox, J., Weber, J. N., Klenerman, P., Sewell, A. K., and Phillips, R. E. (2005). Ultrasensitive detection and phenotyping of CD4+ T cells with optimized HLA class II tetramer staining. *Journal of Immunology*, 175, 6334-6343.
304. Oling, V., Marttila, J., Ilonen, J., Kwok, W. W., Nepom, G., Knip, M., Simell, O., and Reijonen, H. (2005). GAD65- and proinsulin-specific CD4+ T-cells detected by MHC class II tetramers in peripheral blood of type 1 diabetes patients and at-risk subjects. *Journal of Autoimmunity*, 25, 235-243.
305. Reijonen, H., Novak, E. J., Kochik, S., Heninger, A., Liu, A. W., Kwok, W. W., and Nepom, G. T. (2002). Detection of GAD65-specific T-cells by major histocompatibility complex class II tetramers in type 1 diabetic patients and at-risk subjects. *Diabetes*, 51, 1375-1382.
306. Mannering, S. I., Dromey, J. A., Morris, J. S., Thearle, D. J., Jensen, K. P., and Harrison, L. C. (2005). An efficient method for cloning human autoantigen-specific T cells. *Journal of Immunological Methods*, 298, 83-92.
307. Mallone, R., Mannering, S. I., Brooks-Worrell, B. M., Durinovic-Bello, I., Cilio, C. M., Wong, F. S., Schloot, N. C., and T-Cell Workshop Committee, I. o. D. S. (2011). Isolation and preservation of peripheral blood mononuclear cells for analysis of islet antigen-reactive T cell responses: position statement of the T-Cell Workshop Committee of the Immunology of Diabetes Society. *Clinical and Experimental Immunology*, 163, 33-49.
308. Viglietta, V., Kent, S. C., Orban, T., and Hafler, D. A. (2002). GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 109, 895-903.
309. Manz, R., Assenmacher, M., Pfluger, E., Miltenyi, S., and Radbruch, A. (1995). Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 1921-1925.
310. Mannering, S. I., Pang, S. H., Williamson, N. A., Naselli, G., Reynolds, E. C., O'Brien-Simpson, N. M., Purcell, A. W., and Harrison, L. C. (2009). The A-chain of insulin is a hot-spot for CD4+ T cell epitopes in human type 1 diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*, 156, 226-231.
311. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H. A., Worzella, T. J., and Minor, L. (2004) Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual* (Sittampalam, G. S., Gal-Edd, N., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Lemmon, V., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Minor, L., Napper, A., Riss, T., Trask, O. J., and Weidner, J., eds), Bethesda (MD)

312. Erlich, H., Valdes, A. M., Noble, J., Carlson, J. A., Varney, M., Concannon, P., Mychaleckyj, J. C., Todd, J. A., Bonella, P., Fear, A. L., Lavant, E., Louey, A., Moonsamy, P., and Type 1 Diabetes Genetics, C. (2008). HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes*, 57, 1084-1092.
313. Varney, M. D., Valdes, A. M., Carlson, J. A., Noble, J. A., Tait, B. D., Bonella, P., Lavant, E., Fear, A. L., Louey, A., Moonsamy, P., Mychaleckyj, J. C., Erlich, H., and Type 1 Diabetes Genetics, C. (2010). HLA DPA1, DPB1 alleles and haplotypes contribute to the risk associated with type 1 diabetes: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes*, 59, 2055-2062.
314. Noble, J. A., Valdes, A. M., Thomson, G., and Erlich, H. A. (2000). The HLA class II locus DPB1 can influence susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes*, 49, 121-125.
315. Keymeulen, B., Vandemeulebroucke, E., Ziegler, A. G., Mathieu, C., Kaufman, L., Hale, G., Gorus, F., Goldman, M., Walter, M., Candon, S., Schandene, L., Crenier, L., De Block, C., Seigneurin, J. M., De Pauw, P., Pierard, D., Weets, I., Rebello, P., Bird, P., Berrie, E., Frewin, M., Waldmann, H., Bach, J. F., Pipeleers, D., and Chatenoud, L. (2005). Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 352, 2598-2608.
316. Atkinson, M. A., Kaufman, D. L., Campbell, L., Gibbs, K. A., Shah, S. C., Bu, D. F., Erlander, M. G., Tobin, A. J., and Maclaren, N. K. (1992). Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *Lancet*, 339, 458-459.
317. Nagata, M., and Yoon, J. W. (1992). Studies on autoimmunity for T-cell-mediated beta-cell destruction. Distinct difference in beta-cell destruction between CD4+ and CD8+ T-cell clones derived from lymphocytes infiltrating the islets of NOD mice. *Diabetes*, 41, 998-1008.
318. Eizirik, D. L., Colli, M. L., and Ortis, F. (2009). The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, 5, 219-226.
319. Yoon, J. W., and Jun, H. S. (2005). Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *American Journal of Therapeutics*, 12, 580-591.
320. Schloot, N. C., Willemsen, S. J., Duinkerken, G., Drijfhout, J. W., de Vries, R. R., and Roep, B. O. (2001). Molecular mimicry in type 1 diabetes mellitus revisited: T-cell clones to GAD65 peptides with sequence homology to Coxsackie or proinsulin peptides do not crossreact with homologous counterpart. *Human Immunology*, 62, 299-309.
321. Kent, S. C., Chen, Y., Bregoli, L., Clemmings, S. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Hering, B. J., and Hafler, D. A. (2005). Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature*, 435, 224-228.

322. Pakala, S. V., Kurrer, M. O., and Katz, J. D. (1997). T helper 2 (Th2) T cells induce acute pancreatitis and diabetes in immune-compromised nonobese diabetic (NOD) mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 186, 299-306.
323. Dromey, J. A., Lee, B. H., Yu, H., Young, H. E., Thearle, D. J., Jensen, K. P., Mannering, S. I., and Harrison, L. C. (2011). Generation and expansion of regulatory human CD4(+) T-cell clones specific for pancreatic islet autoantigens. *Journal of Autoimmunity*, 36, 47-55.
324. Shao, S., He, F., Yang, Y., Yuan, G., Zhang, M., and Yu, X. (2012). Th17 cells in type 1 diabetes. *Cell Immunology*, 280, 16-21.
325. Li, C. R., Mueller, E. E., and Bradley, L. M. (2014). Islet antigen-specific Th17 cells can induce TNF-alpha-dependent autoimmune diabetes. *Journal of Immunology* 192, 1425-1432.

EKLER

EK-1. Massachusetts Üniversitesinde Yapılan Çalışmalar Hakkında

AÇIKLAMA:

Bu bölümde tez çalışmam sırasında Tübitak'ın Bideb-2214-A yurt dışı araştırma projesi kapsamında bir yıllığına ziyaretçi doktora öğrencisi olarak gittiğim, Massachusetts Üniversitesi Moleküler Tıp Anabilim Dalı “Diabetes Center of Excellence” (Şeker Hastalığı Mükemmeliyet Merkezi)’nde Doç. Dr. Michael Brehm ile, kendisinin danışmanlığı ve sorumluluğunda, yaptığım çalışmaların tez konum ile ilgili olanlarının bir kısmı verilmiştir.

1. Tip 1 Diyabetik Hastalardan Alınan Otoreaktif T Hücrelerin İnsanlaştırılmış Fare Modellerinde (Humanize) *in vivo* Araştırılması

“İnsanlaştırılmış fare”, insan hematopoetik hücre veya doku transplante edilmiş ve transgenik olarak insan genlerini eksprese edebilen modellerdir. İnsanlaştırılmış fare modelleri insan dokuları, hematopoetik kök hücreler (*Hematopoietic Stem Cell*: HSC) veya olgun periferik kan mononükleer (PKMN) (*Peripheral Blood Mononuclear*: PBMN) hücreleri immün yetersiz farelere enjekte edilerek oluşturulabilir. Alıcı farenin genetik altyapısı insan hücrelerinin kimerizmi ve fonksiyonları için oldukça önem taşır. En son tanımlanan ve İL-2 reseptör gamma zincirinde (*İL-2 γ*) mutasyona sahip immün yetersiz fare modeli, insan hücrelerinin engraftmanını ve fonksiyonlarını oldukça artırmaktadır. *İL-2 γ* ; İL-2, İL-4, İL-7, İL-9, İL-15 ve İL-21 sitokinlerinin sinyalizasyonu için gerekli olup [1], ortak γ zincirinden yoksun olma durumunda adı geçen sitokinlerin etkileri de ortaya çıkamayacaktır. Bu reseptörden yoksun olan NOD-*scid* *İL-2 γ ^{null}* (NSG) farelerde, fare T ve B lenfosit gelişimleri [2, 3] ve NK hücre aktivitesi oldukça hasar görmüştür [4], böylelikle insan HSC ve PKMN hücre engraftmanı için en elverişli ortamı oluşturmaktadırlar. Bu fare modellemeleri kullanılarak normalde mümkün olmayan *in vivo* araştırmalar mümkün hale getirilerek, insan hayatını risk altına sokmadan insan biyolojisinin derinlemesine ve detaylarıyla kavramak amacıyla çalışmalar yapılabilir. Etik ve teknik anlamda sınırlı olan *in vivo* çalışmalar böylelikle daha yapılabilir hale gelmektedir. Bu fare modelleri; insan hematopoez, doğuştan ve edinilmiş immünite, otoimmünite, enfeksiyöz hastalıklar,

kanser biyolojisi ve rejeneratif tıp gibi çeşitli alanlarda çalışma imkanları sunmaktadır. Bu fareler kullanılarak çeşitli hastalıklar için yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilebilir [5, 6].

Bu kısımda sunulan ve tez çalışmaları dahilinde Massachusetts Üniversitesi'nde yaptığım çalışmalarda genetik olarak insanlaştırılmış fare pankreas β hücrelerinde, insan T hücrelerinin *in vivo* patoloji oluşturmaları planlanmıştır. Bu amaçla, genetik olarak HLA molekülleri, kostimulatör moleküller ve otoantijenler NSG farelerin β hücrelerinde eksprese ettirildi, böylece otoreaktif T hücrelerin β hücrelerini tanımları kolaylaştırıldı. T hücre klonlarının insanlaştırılmış fare modellerinde yaşama güçlüğü göz önünde bulundurularak T1D hastalarından alınan PKMN hücrelerinin farklı formlarda immün yetersiz farelere enjeksiyonu yapılarak, T1D *in vivo* modeli oluşturulmaya çalışıldı.

1.2. İnsan IGRP₂₆₆₋₂₇₃, PPI₁₅₋₂₄ spesifik otoreaktif CD8⁺ T hücrelerin *in vitro* aktivasyonu sonrasında NSG-(K^bD^b)^{null} HHD-A2 RIP-B7 farelere intrapankreatik olarak transplantasyonu ve *in vivo* patolojik etkilerinin incelenmesi

Bu aşamada aktive olmuş insan IGRP ve PPI spesifik CD8⁺ T hücrelerinin, HLA-A2 eksprese eden pankreas β hücrelerini hasarlayıp hasarlayamayacağı araştırıldı. Bu amaçla HLA-A2 spesifik T hücreler için fare adacık hücrelerinde HLA-A2 eksprese eden NSG-(K^bD^b)^{null} HHD-A2 RIP-B7 fare modeli kullanıldı. Bu fareler, fare sınıf II MHC molekül eksprese etmeyip, yerine insan HLA-A2 molekül eksprese etmektedirler. Ayrıca bu fare modelleri T hücre aktivasyonu için kostimulatör molekül desteği sağlamak amacıyla, B7-1 kostimulatör molekül ekspresyonunu sıçan insülin promoter molekülü (*rat insulin promoter (RIP)*) öncüllüğünde transgenik olarak yapmaktadırlar [7].

Öncelikle, HLA-A2 genetik yapısına sahip T1D hastalarından edinilen periferik tam kandan PKMN hücre izolasyonu yapıldıktan sonra CD8⁺ T hücreler izole edildi. Bu amaçla, MACS yöntemi ile CD8⁺ T hücrelerin dışındaki hücreler manyetik boncuk bağlı antikör (insan CD8 izolasyon kiti, Miltenyi Biotec) kiti kullanılarak işaretlenirken, CD8⁺ T hücreler işaretlenmeyerek (*non-touch*) ayrıldı. Böylece antikörle işaretlemeye bağlı aktivasyondan kaçınılmış olundu. Daha sonra CD8⁺ T hücreler insan ve farede ortak aminoasit sekanslarına sahip HLA-A2 sınırlı otoreaktif peptid havuzu (IGRP₂₆₆₋₂₇₃, PPI₁₅₋₂₄) ile 7 gün

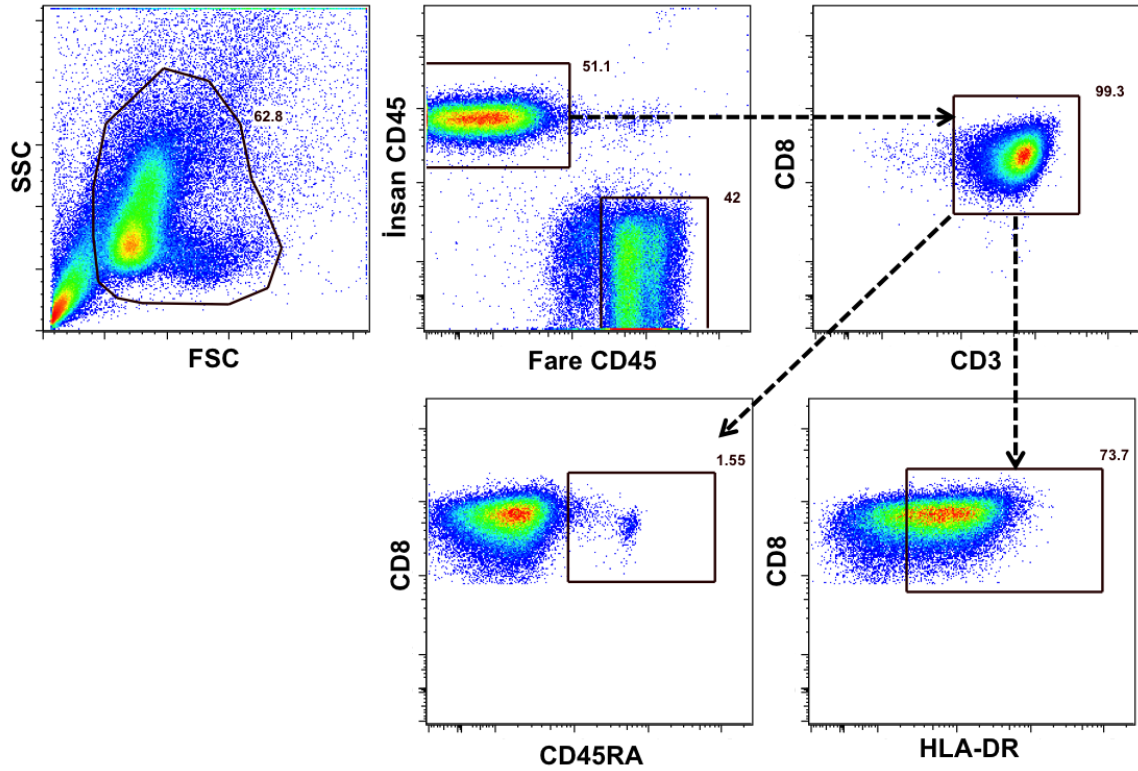
kültür ortamında uyarıldı. HLA-A2 sınırlı Flu-M1 peptidi ile uyarılan $CD8^+$ T hücreler pozitif kontrol, antijenle uyarılmamış T hücreler negatif kontrol olarak kullanıldı. Enkübasyon sırasında kültüre, insan $IL-2$, $IL-7$ ve $IL-15$ sitokinleri eklendi. 7 gün sonunda hücreler toplanarak aktive ve naif $CD8^+$ T hücre fenotip oranlarına bakıldı. Bu amaçla hücreler insan $CD45RA$, $CD62L$ ve HLA-DR antikorları ile boyanarak akım sitometrisi ile analiz edildi (Şekil 3a).

NSG-HHD farelerin homeostatik T hücre çoğalması ve sağ kalımı için gerekli sitokinlerden yoksun oldukları göz önünde bulundurularak, $IL-2$ eksprese eden plasmid enjeksiyonun T hücre aktivasyonu için gerekli üçüncü sinyali sağlayabileceğini, insan $CD8^+$ T hücrelerin sağ kalımını artırabileceği hipotezini kurduk. Bu amaçla hücre transplantasyonundan 1 gün önce hidrodinamik olarak $IL-2$ plasmid enjeksiyonunu gerçekleştirdik. Plasmid enjeksiyonu sonrası, peptid havuzu ile aktive olmuş, Flu-M1 peptidi ile aktive olmuş ve kontrol $CD8^+$ T hücreleri NSG- $(K^bD^b)^{null}$ HHD-A2 RIP-B7 farelere intrapancreatik olarak enjekte edildi. $CD8^+$ T hücrelerin adoptif transferinden 30 ve 60 gün sonrası insan $CD45^+$ T hücrelerin engraftman ve aktivasyon düzeyleri analiz edildi (Şekil 1).

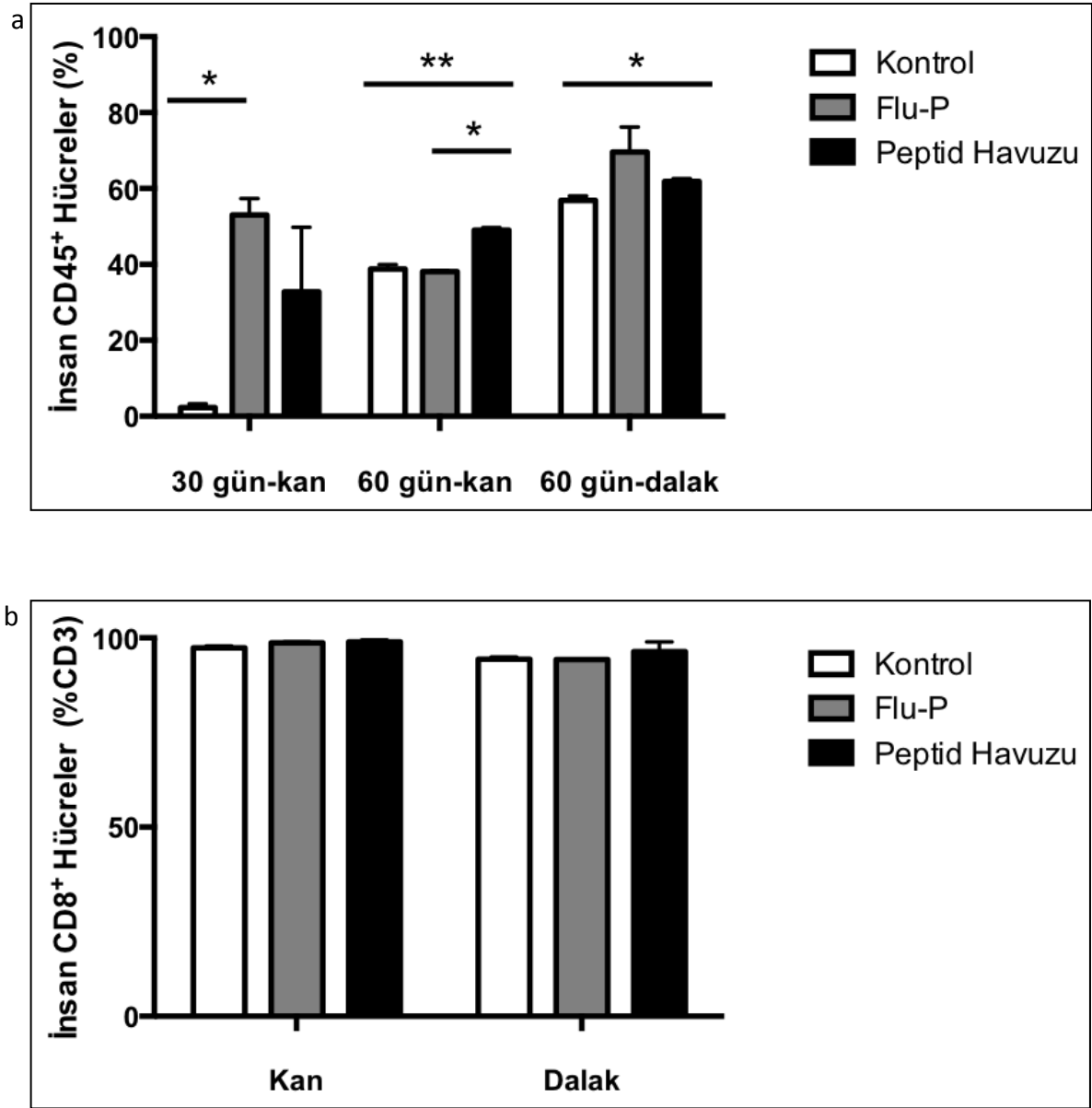
Hücre transplante edilmiş tüm farelerde engraftmanın başarılı olduğu, zamana paralel engraftman seviyesinin arttığı gözlemlendi. Yaklaşık 60 gün sonra dalak ve kanda $CD45^+$ hücre seviyesinin oldukça yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 2a). Engrafte olan $CD3^+$ hücrelerin %95'ten fazlasının $CD8^+$ T hücreler olduğu doğrulandı (Şekil 2b). Ayrıca transplantasyondan 30 gün sonra $CD8^+$ T hücrelerin aktivasyon fenotipleri analiz edildi. $CD8^+$ T hücrelerin akım sitometrik analizi sonucunda, $CD8^+$ T hücrelerin efektör fonksiyon sergiledikleri ($CD8^+/HLA-DR^+$), naif fenotiplerinin ($CD8^+/CD45RA^+$, $CD8^+/CD62L^+$) ise enjeksiyon öncesi fenotipleriyle kıyaslandığında azaldığı ortaya kondu (Şekil 3a). Benzer şekilde transplantasyondan 60 gün sonra kan ve dalakta efektör $CD8^+$ T hücre sayılarının naif $CD8^+$ T hücrelerinden fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 3b).

İnsan $CD8^+$ T hücrelerinin, intrapancreatik olarak, NSG- $(K^bD^b)^{null}$ HHD-A2 RIP-B7 farelere enjeksiyonundan 8 hafta sonra farelerin pankreasları çıkartılarak immünohistokimyasal analizleri yapıldı. IGRP-PPI spesifik T hücreler adacıkların çevresine ve iç kısmına infiltre olurken, kontrol T hücrelerin adacık çevresi alanlarda sınırlı kaldıkları gözlemlendi. Flu-M1

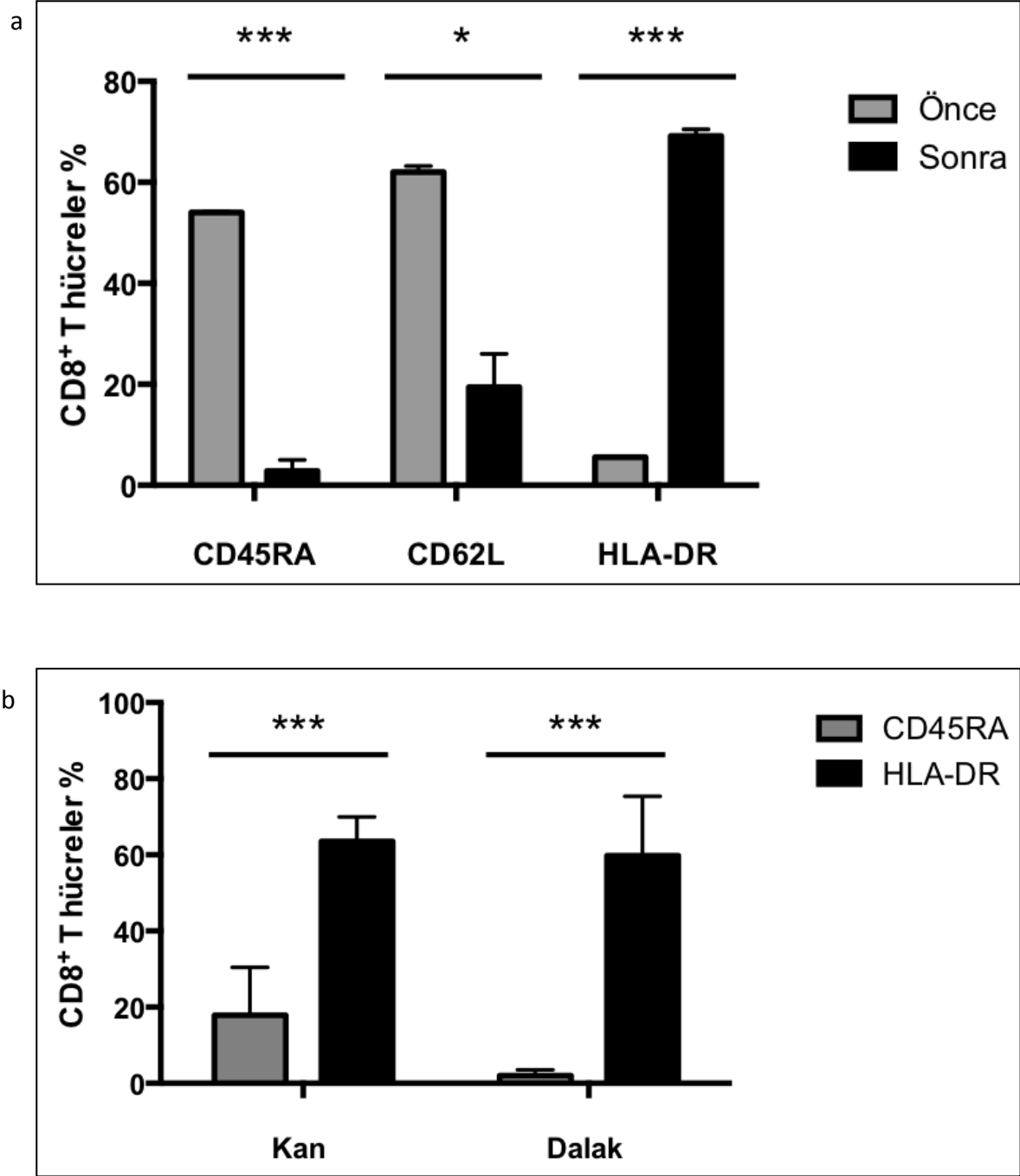
peptidine spesifik T hücreler ise perivasküler alanlarda infiltre olmuşlardı (Resim 1). 3 grubun oluşturulmasında da aynı hastadan gelen PKMN hücreler kullanıldığı için, kontrol grubunda otoreaktif CD8⁺ T hücrelerin adacık çevresi infiltrasyonu muhtemel bir sonuç olarak beklenmekteydi. Ancak aynı CD8⁺ T hücrelerin fare ve insanlarda ortak aminoasit sekanslarına sahip otoreaktif peptidlerle kısa dönem enkübasyonu pankreas adacıklarının içine T hücre infiltrasyonunu arttırdı (Resim 1a). Her 3 grupta da ekzokrin pankreasta insan CD45 boyanması tespit edildi. Bunun intrapankreatik enjeksiyon sırasında oluşmuş olabilecek doku hasarı ve enflamasyondan kaynaklanabileceği düşünüldü.



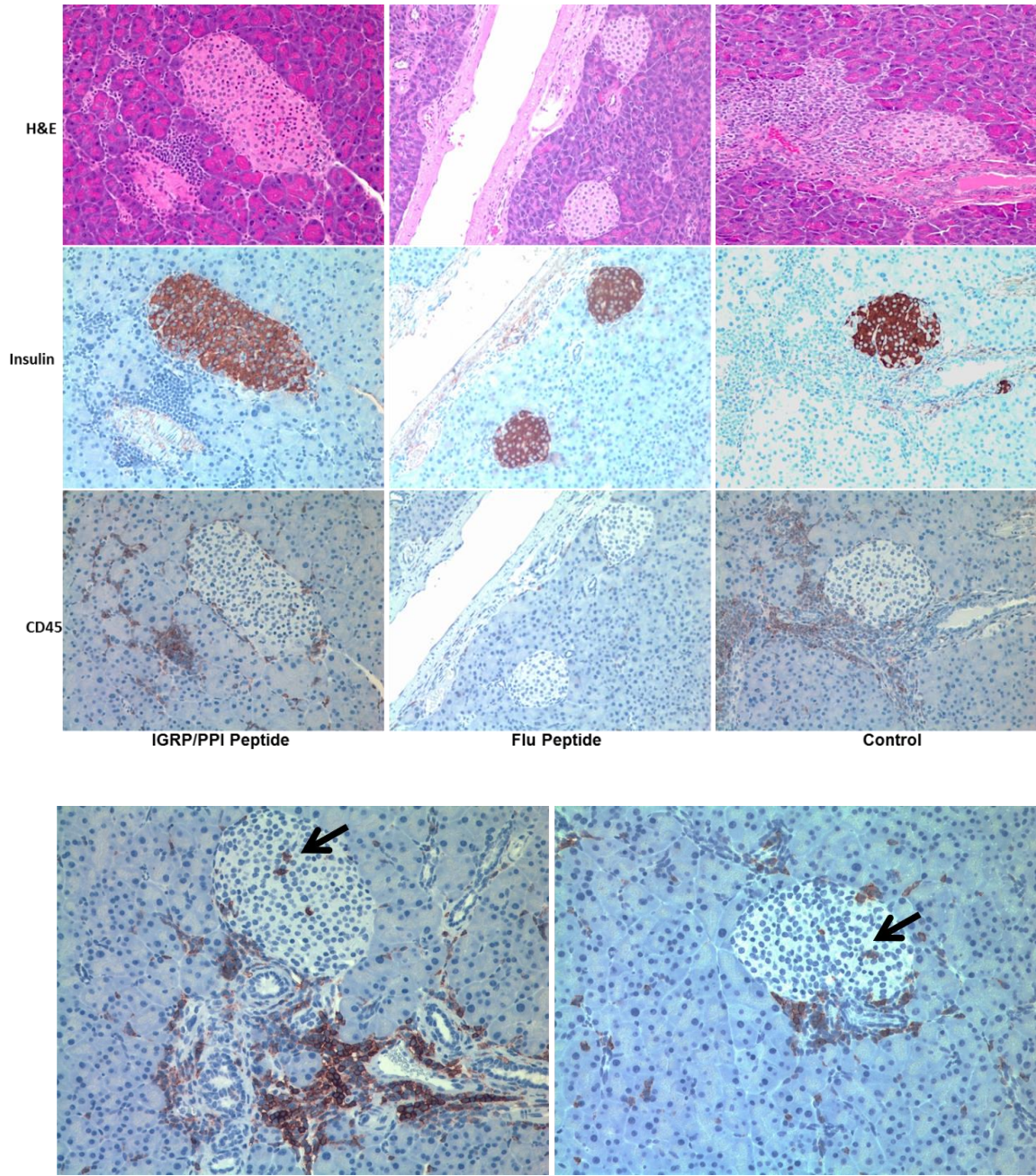
Şekil 1. IGRP₂₆₆₋₂₇₃, PPI₁₅₋₂₄ spesifik CD8⁺ T hücrelerin insanlaştırılmış farelere transplantasyonu sonrası aktivasyon ve engrafman düzeylerinin akım sitometrisi ile analizi. Aktivasyon fenotiplerini ve engrafman düzeylerini saptamak amacıyla anti CD45-APC-H7, anti-CD3-FITC, anti-CD8-pacific blue, anti CD45RA-APC, anti-HLA-DR-BV-605, fare anti- CD45-PerCP antikorları kullanılarak çok renkli akım sitometri LSR II cihazında yapıldı. İnsan CD45⁺ hücreleri kapılanarak fare CD45⁺ hücrelerinden ayrıldı. İnsan CD45⁺ hücrelerinde CD3⁺ ve CD8⁺ olanlar kapılandı. Bu hücre popülasyonundan CD8⁺ CD45RA⁺ ve CD8⁺ HLA-DR⁺ olan hücrelerin yüzdeleri belirlendi.



Şekil 2. *In vitro* koşullarda peptid havuzu ile aktive edildikten sonra NSG-(K^bD^b)^{null} HHD-A2 RIP-B7 farelere enjekte edilen CD8⁺ T hücrelerin engrafman kinetiği. İnsan CD8⁺ T hücrelerinin insanlaştırılmış farelere enjeksiyonundan sonraki 30. günde kan, 60 günde kan ve dalaktaki CD45⁺ (a) ve CD8⁺ (b) T hücrelerin varlığı analiz edildi). *,p<0.05, **,p<0.01.



Şekil 3. CD8⁺ T hücrelerin aktivasyon fenotipleri. Önceden aktive edilen CD8⁺ T lenfositlerin enjeksiyon öncesi ve sonrası aktivasyon fenotipleri gösterildi (a). Adoptif transferden 8 hafta sonra periferik kan ve dalakta, efektör CD8⁺ T hücrelerin (HLA-DR⁺) venaif CD8⁺ T hücrelerin (CD45RA⁺) oranları analiz edildi (b). *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$.



Resim 1. $CD8^+$ T hücrelerin NSG-(K^bD^b)^{null} HHD-A2 RIP-B7 farelere intrapankreatik olarak enjeksiyon sonrasında pankreas adacık hücre infiltrasyonları. T1D hastasından izole edilen $CD8^+$ T hücrelerinin Flu-M1, IGRP-PPI peptidleriyle enküasyonlarından 7 gün sonra hücreler insanlaştırılmış farelere intrapankreatik olarak enjekte edildi. 8 hafta sonra fare pankreasları çıkartılarak H&E, insan CD45 ve insülin ile boyandı ve histopatolojik analizi yapıldı (a). IGRP₂₆₆₋₂₇₃, PPI₁₅₋₂₄ peptidleriyle enkübe edilen $CD8^+$ T hücrelerinin adacıkların içlerine infiltre oldukları gözlemlendi (ok işaretleri) (b). H&E boyaması adacıkların histolojik bütünlüğünü gözlemlemek, insülin boyaması β hücrelerini tanımlamak, CD45 boyaması da insan T hücre infiltrasyonunu göstermek amacıyla yapıldı.

Yorum

Çalışmamızın bu kısmında önceden aktive edilen T hücrelerinin immün yetersiz farelerde T hücre aktivitesi araştırılmıştır. Öncelikle HLA-A2⁺ T1D hastalarının CD8⁺ T hücreleri ayrılarak, kısa dönem otoantijenik peptidlerle kültürde enkübe edildi. Kullanılan peptidler (IGRP₂₆₆₋₂₇₃, PPI₁₅₋₂₄), insan ve farede ortak aminoasit sekansları olan, dolayısıyla her iki tür için de ortak peptid tanınması ve sunulmasına imkan veren peptidlerdir. İnkübasyon sonrası peptidlerle ön tanışmadan ve aktivasyondan geçen ve çoğalan CD8⁺ T hücreleri, intrapankreatik yolla insan HLA molekülü ile uyumlu NSG-(K^bD^b)^{null} HHD-A2 RIP-B7 farelere enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası belirli aralıklarla farelerin periferik kan ve dalaklarında insan CD45⁺ ve CD8⁺ T hücrelerin varlığı gösterildi, var olan T hücrelerin aktive fenotiplerinin arttığı ortaya kondu. Enjekte edilen aktive olmuş CD8⁺ T hücrelerin, insanlaştırılmış farelerin pankreaslarına infiltre oldukları ve düşük düzeyde insülitis tablosu oluşturdıkları gözlemlendi. IGRP, PPI peptidlerinin pankreas adacık hücrelerine doğru otoreaktif T hücre hareketini artırdığı gösterildi. IGRP,PPI peptidleriyle muamele edilen T hücrelerinin, bu peptidlerle önceden uyarılmamış T hücrelerine oranla NSG-(K^bD^b)^{null} HHD-A2 RIP-B7 farelerde adacık infiltrasyonu etkinliğinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Flu-M1 peptidi ile muamele edildiğinde ise, T hücrelerinin adacıklara infiltrasyonunda herhangi bir değişiklik oluşmadı. Bu çalışmada kullanılan fare modeli daha da geliştirilerek, ileride β hücre yıkımının ve infiltrasyonunun önlenmesine yönelik yeni immünoterapilerin geliştirilmesi adına gelecek vaad etmektedir.

Kaynaklar (Ek)

1. Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Ohbo, K., Nakamura, M., and Takeshita, T. (1996). The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol*, 14, 179-205.
2. DiSanto, J. P., Muller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A., and Rajewsky, K. (1995). Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 377-381.
3. Cao, X., Shores, E. W., Hu-Li, J., Anver, M. R., Kelsall, B. L., Russell, S. M., Drago, J., Noguchi, M., Grinberg, A., Bloom, E. T., and et al. (1995). Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity*, 2, 223-238.
4. Ohbo, K., Suda, T., Hashiyama, M., Mantani, A., Ikebe, M., Miyakawa, K., Moriyama, M., Nakamura, M., Katsuki, M., Takahashi, K., Yamamura, K., and Sugamura, K. (1996). Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Blood*, 87, 956-967.
5. Shultz, L. D., Ishikawa, F., and Greiner, D. L. (2007). Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*, 7, 118-130.
6. Pearson, T., Greiner, D. L., and Shultz, L. D. (2008). Creation of "humanized" mice to study human immunity. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 15, Unit 15 21.
7. Alkanani, A. K., Hara, N., Lien, E., Ir, D., Kotter, C. V., Robertson, C. E., Wagner, B. D., Frank, D. N., and Zipris, D. (2014). Induction of diabetes in the RIP-B7.1 mouse model is critically dependent on TLR3 and MyD88 pathways and is associated with alterations in the intestinal microbiome. *Diabetes*, 63, 619-631.

EK-2. Etik Kurul İzni


**T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU**
 Ankara İli 1. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
 Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi
 

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
KARAR TARİHİ: 17.12. 2012
KARAR NO : 06/48

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi ile Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesi Pankreas Adacık İzolasyon Merkezi' nde yapılacak olan ve sorumlu araştırmacı Prof. Dr. Emin Ümit BAĞRIAÇIK' ın yürüteceği **"Tip 1 Diyabet Antijenlerine Spesifik T Hücre Klonlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu"** konulu çalışma incelenmiş olup Etik Kurulu tarafından oybirliğiyle uygun görülmüştür.

Doç.Dr. Tuncay DELİBAŞI
 Başkan
KATILMADI

Doç.Dr. Muharrem DAĞLI
 Başkan Yard.

Doç.Dr. Ö. Taylan AKKAYA
 Üye

Doç.Dr. Bahadır KÜLAH
 Üye

Doç.Dr. Tevfik PINAR
 Üye

Uz. Dr. Zeynep SEÇKİN AKKILIK
 Üye

Av. Ayla VAR LAL
 Üye

Emre KOZALLIK
 Üye

Uz. Dr. S.Dinçer YETİŞ
 Üye

Doç.Dr. Güleser SAYLAM
 Üye

Doç.Dr. Gönül ERDEN
 Üye

Uz. Dr. M. Kürşat DERİCİ
 Üye

Dr. Ferda ALPAŞTAN PINARLI
 Üye

Doç. Dr. Ömer BAŞAR
 Üye

Ek-3. Gönüllü Bilgi Onay Formu

“Tip 1 Diyabet Antijenlerine Spesifik T hücre Klonlarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı ve sizden gönüllü olarak katılmanız istenen çalışma bir klinik araştırmadır. Bu çalışmanın amacı, Tip 1 diyabete sebep olan otoreaktif T hücrelerini kandan izole etmek ve bunların etki mekanizmalarını, özelliklerini incelemek ve analiz etmektir. Araştırmaya katılmanız durumunda, Endokrinoloji bölümümüzde kan tetkikleriniz değerlendirilecektir. Bu araştırma sonucunda Tip 1 diyabetin immünolojik mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılacak ve elde edilen veriler sonucunda ileriki süreçlerde tedaviye yönelik yaklaşımlar hedeflenecektir. Çalışmaya katılmaktan sonradan vazgeçmeniz durumunda da yine ilgili şikayetlerinize yönelik diğer tetkiklerinize devam edebilirsiniz. Yapılacak tetkikler için sizden herhangi bir ücret ödemeniz talep edilmemektedir. Ayrıca metabolik bozukluklarınız varsa buna yönelik tedbirler konusunda bölümümüzde bilgilendirileceksiniz.

Bu araştırmaya sizin gibi katılması istenen gönüllü sayısı 60’dır. Araştırma süresince ve sonunda şahsi bilgileriniz kesinlikle saklı tutulacak, tıbbi bilgileriniz ise bilimsel amaçlar doğrultusunda veri elde etmek amacıyla kullanılacaktır. Araştırma veya tedaviniz ile ilgili ayrıntılı soru veya sorunuz için Dr. Tuncay DELİBAŞI’nı 0 312 5962000 / 2922 nolu telefondan arayabileceksiniz. Çalışma ile ilgili şikayetleriniz için SB Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hasta Hakları Birimi, Başhekimlik veya Eğitim Koordinatörlüğüne başvurabilirsiniz. Çalışmaya katılmak suretiyle bilimsel çalışmalara verdiğiniz destekten dolayı teşekkür ederiz.

Araştırmacının Adı Soyadı

İmzası

Tarih

ONAM FORMU

İkinci bölüm: (Katılımcının/Hastanın Beyanı) (bu bölüm hazırlanan gönüllü olur formunun sonuna eklenmelidir)

Sayın Araştırmacı Süheyla Hasgür tarafından Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi ve DYBEAH Pankreas Adacık Hücre İzolasyon Merkezi 'nde tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” (denek) olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr Tuncay Delibaşı, DYBEAH Endokrinoloji Polikliniği-326 0010/1401-1415 'ten arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Benden alınan kan ve örneklerinin, patolojik materyallerinin ve yapılan tüm görüntüleme tetkiklerinin daha sonra çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

Hastanın Adı soyadı:

İmza :

Tarih :

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : HASGÜR, Süheyla
 Uyuğu : T.C
 Doğum tarihi ve yeri : 25.06.1985 / İzmir
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0536 799828 / 0312 4761753
 e-mail : suheyla_hasgur@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel İmmünoloji	2010-Devam ediyor
Lisans	İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi	2004-2009

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010-2015	Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi	Doktora öğrencisi
2013-2014	Umass Medical School, Diabetes Center of Excellence	Doktora öğrencisi
2013	Pankreas Adacık Araştırma Merkezi	Araştırmacı
2010	İstanbul Üniversitesi, Çapa Tıp Fakültesi, İmmünoloji/Viroloji Laboratuvarı	Araştırmacı
2008	İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi A.B.D	Veteriner Hekim
2008	Çankaya Belediyesi Hayvan Araştırma merkezi	Veteriner Hekim
2006	Alsancak Veteriner Hastanesi	Veteriner Stajer

Yabancı Dil

İngilizce

Projelerde Yaptığı Görevler:

1. İnsanlaştırılmış FLT3-L transgenik NOD-scid IL2ry^{null} (NSG) farelerde insan miyeloid hücre serilerinin gelişimi, farklılaşması ve fonksiyonel analizleri-Sorumlu Araştırmacı
2. İL-6 transgenik NOD-scid IL2ry^{null} (NSG) farelerde insan hematopoetik kök hücrelerinin nakli sonrası T ve B lenfositlerin engraftman etkinliği- Sorumlu Araştırmacı
3. Tip 1 diyabet hastalarından elde edilen otoreaktif T hücrelerin insanlaştırılmış fare modellerinde *in vivo* analizi-Sorumlu Araştırmacı
4. İnsan hematopoetik kök hücrelerinin immün yetersiz farelerde engraftman optimizasyonu çalışmaları-Sorumlu Araştırmacı
5. (Yukarıdaki 4 proje National Institutes of Health araştırma proje no: AI046629 ve DK032520, an institutional Diabetes Endocrinology Research Center (DERC) proje no: DK32520, University of Massachusetts Center for AIDS Research, proje no: P30 AI042845, the Juvenile Diabetes Research Foundation, International Helmsley Foundation tarafından, ayrıca TÜBİTAK yurt dışı araştırma desteği (2214A) tarafından desteklenmiştir).
6. Farelerden elde edilen dalak, lenf nodu ve timüs hücrelerinin yaşlanma ile değişen hücre yüzey belirteçlerinin akım sitometri ile analizi-Sorumlu Araştırmacı, Gazi Üniversitesi, İmmünoloji Araştırma Merkezi projesi
7. *T.gondii* ile enfekte edilmiş insan periferik kan monositlerinin sitokin sekresyon profillerinin analizi – Sorumlu Araştırmacı, Gazi Üniversitesi, İmmünoloji Araştırma Merkezi projesi
8. *T.gondii* parazitinin fare intestinal intraepitelyal T lenfositlerinden IL-17, IL-15, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-26, IL-27, IL-35 sitokinlerinin salınımları üzerine etkilerinin araştırılması-Sorumlu Araştırmacı, Gazi Üniversitesi, BAP projesi
9. Caco-2 Epitel Hücre ve THP-1 Monosit Hücrelerinin Kokültür Modelinde *Mycobacterium tuberculosis* Man-LAM ve 19kDa Lipoprotein Antijenleri ile Uyarımın Hücre Sitokin ve NO Yanıtlarına Etkisinin Araştırılması- Yardımcı Araştırmacı, Gazi Üniversitesi BAP Projesi

Eserler

1. Hasgur S, Shultz LD, Brehm MA. Human T cell development in HSC - engrafted NSG mice is dependent on age of the recipient. AAI Annual Meeting 2014. 192 (1).
2. Bagriacık EU, Hasgur S, Yavuz E, Atak A, Delibas T. Acute cytokine responses of human monocytes to *Toxoplasma gondii*. The Journal of Immunology, 2013, 190, 125.25

3. Yavuz E, Hasgür S, Bağrıaçık EÜ. Age-Related Changes In Cell Surface Markers in Balb/C Mice: A Flow Cytometric Analysis(2013). Front. Immunol. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI).
4. Hasgür S,Yavuz E, Albayrak N, Bağrıaçık EÜ. Secretion of IL-6 from *T. gondii* infected monocytes(2011)-Turkish Immunology Journal, Vol. 1, Number:15
5. Doğruman Al F, Adımayan G, Yantıra TN, Hasgür S, Bağrıaçık EÜ. Determination of the effect of anti-parasitic drugs on viability of Blastocystis isolates by MTT assay(2011)-17th Parasitology Congress Journal
6. Doğruman Al F, Yantıra TN, Adımayan G, Hasgür S, Bağrıaçık EÜ. Determination of the effect of different culture mediums on viability of Blastosistis spp by MTT assay(2011)-17th Parasitology Congress Journal
7. Doğruman Al F, Yantıra TN, Adımayan G, Hasgür S, Bağrıaçık EÜ. Investigation of the invitro reproduction kinetics of Blastosistis Protozoo in different environment(2011)-17th Parasitology Congress Journal
8. Doğruman Al F, Adımayan G, Yantıra TN, Hasgür S, Bağrıaçık EÜ. Determination of the Effects of Anti-parasitic Drugs on the Viability of Blastocystis Strains Via MTT Assay - Kafkas Univ Vet Fak Derg 18 (Suppl-A): A167-A170, 2012-(Article Code): KVFD-2012-6099

Sertifikalı Kurslar

1. International AAI Annual Meeting-2014, Pittsburgh, Pennsylvania - USA
2. Pancreas Islet and Stem Cell Correlation Course- 2012, Ankara
3. PCR Arrar Seminar-2012, Ankara
4. Confocal Microscopy Course 2011, Eskişehir
5. “21st National Immunology Congress “ Certificate of Attendance, 2011, Marmaris
6. “Innovation in Immunology and Otoimmunity Course” Certificate of Attendance-2010, Elazığ
7. “2nd Basic Immunology and Neurology Summer School ” Certificate of Attendance-2010, Bolu



GAZİ GELECEKTİR...