

Genetikai polimorfizmus vizsgálatok 1-es típusú cukorbetegségben

Doktori értekezés

Dr. Hermann Csaba



Témavezető: Prof. Dr. Madácsy László

Programvezető: Prof. Dr. Tulassay Tivadar

Készült: Semmelweis Egyetem I.Sz. Gyermekgyógyászati Klinika

Hivatalos bírálók: Dr. Andrikovics Hajnalka Ph.D, Dr. István Gábor Ph.D
egyetemi docens

Szigorlati Bizottság elnöke: Prof. Dr. Mátyus Péter Ph.D, D.Sc,
intézetvezető egyetemi tanár

Szigorlati Bizottság tagjai: Dr. Unger Zsuzsa Ph.D, Dr. Zima Endre Ph.D
egyetemi tanársegéd

Budapest, 2008

Összefoglalás

Az 1-es típusú cukorbetegség (T1DM) a hasnyálmirigy β -sejtjeinek folyamatos pusztulását okozó autoimmun folyamat következménye, mely kialakulását genetikai hajlam és környezeti tényezők egyidejű jelenlétével magyarázzák. A cöliákia (CD) a vékonybél súlyos gyulladással járó betegsége, melynek kialakulásában a gliadinnak van szerepe. A cöliákia prevalenciája T1DM gyerekekben a normál populációnál magasabb. A diabétesz fellépéséért felelős autoimmun környezet elősegítheti a szintén autoimmun jelleggel bíró CD kialakulását. A gyulladós folyamatokban szerepet játszó fehérjék génjein elhelyezkedő polimorfizmusok a kódolt fehérjék mennyiségi és minőségi változása révén fontos szabályozó szerepet játszhatnak T1DM, CD illetve mindkettő kialakulásában.

Munkánkban a TNF α G⁻³⁰⁸A, IL-1 β C³⁹⁵⁴T, IL-6 C⁻¹⁷⁴G, HSPA1B A¹²⁶⁷G egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP) és a T1DM közti összefüggést vizsgáltuk. Kerestük a TNF α G⁻³⁰⁸A, TNF α G⁻²³⁸A, CD14 C⁻²⁶⁰T, TLR-4 A⁸⁹⁶G SNP-k, egyes HLA-DQ haplotípusok és T1DM betegekben fellépő cöliákia közti kapcsolatot.

Munkánkban a magasabb citokin produkcióval járó TNF α ⁻³⁰⁸AA és AG genotípusok és alacsonyabb fehérjeprodukcióval járó HSPA1B ¹²⁶⁷AG és GG genotípusok együttes előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt diabéteszes betegekben a kontroll csoporthoz képest. A TNF α egy proinflammatorikus citokin, mely a destruktív inzulinitisz kialakulásában és fenntartásában is szerepet játszhat, míg az alacsonyabb HSP72 produkció miatt a β -sejtek védtelenebbé válnak a károsító autoimmun folyamatokkal szemben. A leírt mechanizmus magyarázhatja a polimorfizmusok és T1DM kialakulása közti kapcsolatot. Ugyancsak összefüggést találtunk az IL-6 ⁻¹⁷⁴G allél hordozása és a T1DM diagnosztizálásakor fennálló idősebb életkor közt, a kapcsolat csak magasabb citokin produkcióval járó IL-1 β (³⁹⁵⁴T allél) vagy TNF α genotípus egyidejű hordozásakor mutatható ki. A nagyobb mennyiségben termelődő IL-6 β -sejt protektív szerepe a T1DM kialakulásának késleltetésében nyilvánul meg.

A diabéteszes betegekben a magasabb fehérjeprodukcióval járó CD14 ⁻²⁶⁰TT genotípus ritkábban fordult elő, míg CD és T1DM egyidejű jelenlétekor ez az eltérés már nem figyelhető meg. A CD14 fontos szerepet játszik CD kialakulásáért felelős gyulladós folyamatokban, de T1DM patogenezisében protektív szereppel bírhat.

Summary

Type 1 diabetes (T1DM) is an autoimmune disease caused by multiple genes interacting with non-genetic factors. Coeliac disease (CD) is characterised by severe inflammation of the small intestine, which is triggered by gliadin. Prevalence of CD in type 1 diabetes mellitus children is higher than that in nondiabetic children. The environment of the ongoing diabetic autoimmunity may be a stimulant to the development of CD, a disease that possesses autoimmune features. The genes of the inflammatory proteins which contribute to the development of T1DM, coeliac disease or both may contain certain polymorphisms. These polymorphisms or combinations of polymorphisms might play an essential role in the pathogenesis of T1DM, CD or both by influencing the quality or the quantity of the protein coded by the gene.

In our study we investigated the association between TNF α G⁻³⁰⁸A, IL-1 β C³⁹⁵⁴T, IL-6 C⁻¹⁷⁴G, HSPA1B A¹²⁶⁷G single nucleotide polymorphisms (SNP) and T1DM. We also investigated the association between TNF α G⁻³⁰⁸A, TNF α G⁻²³⁸A, CD14 C⁻²⁶⁰T, TLR-4 A⁸⁹⁶G SNP-s, certain HLA-DQ haplotypes and coeliac disease in diabetic children.

We found an association between the joint presence of high TNF α (⁻³⁰⁸AA and AG) and low HSP72 (¹²⁶⁷AG and GG) producer genotypes in one hand and the risk of T1DM on the other. Higher production of TNF α may contribute to the development/maintenance of destructive insulinitis and lower level of HSP72 makes β -cells less resistant to the autoimmune process, and hereby might contribute to the development of T1DM. We found an association between IL-6 ⁻¹⁷⁴G allele carrier state and older age-at-onset of T1DM, but only in the presence of high IL-1 β (³⁹⁵⁴T allele carrier state) and TNF α producer genotypes. The higher IL-6 production associated with the ⁻¹⁷⁴G allele in Langerhans islets, might have a protective effect against the autoimmune process and might delay the destruction of the β -cells. We found a significantly higher rate of carriers of TNF α ⁻²³⁸A allele in the histology-proven CD group than in the non-CD group. We found that in children with T1DM the frequency of the high CD14 producer ⁻²⁶⁰TT genotype was decreased, but in children affected by both CD and T1DM the occurrence of the CD14 TT homozygous mutant genotype was not decreased. CD14 is an important factor of inflammation in coeliac disease, but may have some protective effect in the pathogenesis of T1DM.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	7
1.1 A T1DM patomechanizmusa.....	7
1.2 A T1DM genetikai háttere.....	12
1.2.1 HLA – IDDM1.....	13
1.2.2. Az inzulin gén - IDDM2.....	16
1.2.3. CTLA-4 – IDDM2.....	17
1.2.4. PTPN22.....	18
1.2.5 A gyulladási folyamatban részt vevő fehérjék polimorfizmusai.....	19
1.2.5.1 Tumor necrosis factor- α (TNF α).....	19
1.2.5.2 Interleukin-1 β (IL-1 β).....	20
1.2.5.3. Interleukin-6 (IL-6).....	21
1.2.5.4. Heat shock protein 72 (HSPA1B, stresszfehérje).....	22
1.2.5.5. Toll-Like receptor-4 (TLR).....	23
1.2.5.6. CD14.....	24
1.3 T1DM és cöliákia.....	25
2. Célkitűzések.....	26
3. Módszerek.....	27
3.1 A vizsgált populáció.....	27
3.1.1 Betegek.....	27
3.1.2 Kontroll csoport.....	28
3.2 Polimeráz láncreakció (PCR) - restrikciós fragment hosszúság polimorfizmus (RFLP) módszer.....	28
3.3 Cöliákia diagnózisa.....	32
3.4 Statisztikai elemzés.....	33
4. Eredmények.....	34
4.1 A TNF α G ⁻³⁰⁸ A, az IL-6 G ⁻¹⁷⁴ C és az IL-1 β C ³⁹⁵⁴ T polimorfizmusok és a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkor közti kapcsolat.....	34

4.2 HSPA1B (HSP72) A ¹²⁶⁷ G és a TNF α G ⁻³⁰⁸ A polimorfizmus és T1DM kialakulása közti összefüggés vizsgálata.....	36
4.3 A TNF α G ⁻³⁰⁸ A illetve TNF α G ⁻²³⁸ A polimorfizmus és cöliákia előfordulásának kockázata T1DM-ben szenvedő gyermekeknél.....	37
4.4 A CD14 C ⁻²⁶⁰ T, TLR-4 A ⁸⁹⁶ G SNP-k és HLA-DQ genotípusok előfordulásának gyakorisága T1DM-ben, cöliákiában illetve mindkettőben szenvedő betegeknél	38
5. Megbeszélés	41
5.1 A TNF α G ⁻³⁰⁸ A, az IL-6 G ⁻¹⁷⁴ C és az IL-1 β C ³⁹⁵⁴ T polimorfizmusok és a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkor közti kapcsolat	41
5.2 HSPA1B (HSP72) A ¹²⁶⁷ G és a TNF α G ⁻³⁰⁸ A polimorfizmus és T1DM kialakulása közti összefüggés vizsgálata.....	42
5.3 A TNF α G ⁻³⁰⁸ A illetve TNF α G ⁻²³⁸ A polimorfizmus és cöliákia előfordulásának kockázata T1DM-ben szenvedő gyermekeknél.....	43
5.4 A CD14 C ⁻²⁶⁰ T, TLR-4 A ⁸⁹⁶ G SNP-k és HLA-DQ genotípusok előfordulásának gyakorisága T1DM-ben, cöliákiában illetve mindkettőben szenvedő betegeknél	44
6. Következtetések.....	46
7. Köszönetnyilvánítás	50
8. Saját publikációk jegyzéke	51
8.1 A disszertációhoz kapcsolódó publikációk.....	51
8.2 A disszertációtól független közlemények.....	52
9. Irodalomjegyzék	54

Rövidítések jegyzéke

AH	ősi (ancestral) haplotípus
APC	antigén prezentáló sejt
BB	biobreeding (patkány)
CD	cöliákia
CTL4	citotoxikus T-limfocita asszociált antigén 4
DC	dendrítikus sejt
EMA	endomízium elleni antitest
GAD(A)	glutaminsav dekarboxiláz (ellenes antitest)
HbA_{1c}	hemoglobin A _{1c}
HLA	humán leukocita antigén
HSP	hősokk-(stressz)fehérje
IAA	inzulin ellenes antitest
IA-2	tirozin-foszfátáz ellenes autoantitest
ICA	szigetsejt-ellenes antitest
ICAM	intracelluláris sejt adhéziós molekula
ICOS	indukálható T-sejt kostimulátor
IGF	inzulinszerű növekedési faktor
IL-1β	interleukin-1 β
IL-6	interleukin-6
LD	linkage disequilibrium
LPS	lipopoliszacharid
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
NF-$\kappa$$\beta$	nukleáris faktor κ β
NO	nitrogén-monoxid
NOD	non-obese diabetic (egér)
OR	esélyhányados
PCR	polimeráz láncreakció
PTPN	protein tirozin foszfátáz
RPLP	restrikciós fragment hosszúság polimorfizmus
SDS	standard deviációs pontérték

Rövidítések jegyzéke

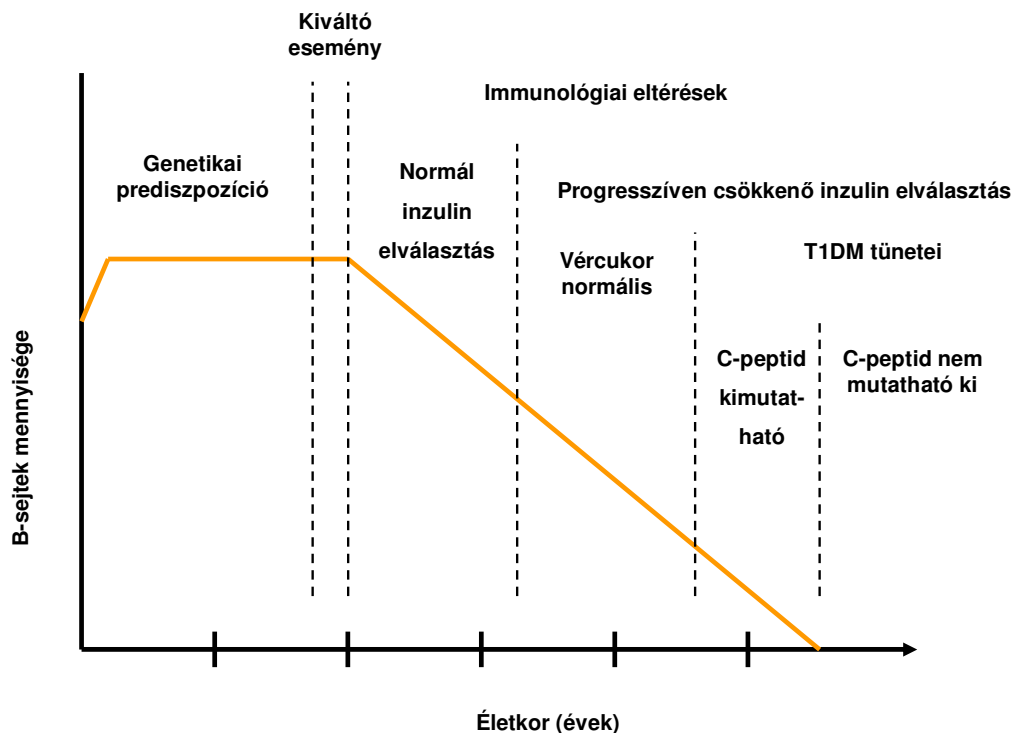
SNP	egyponos nukleotid polimorfizmus
T1DM	1-es típusú cukorbetegség
TCR	T-sejt receptor
TGFβ	transzformáló növekedési faktor béta
TH	tirozin hidroxiláz
TLR	toll-like receptor
TNFα	tumor necrózis factor- α
TNFβ	tumor necrózis factor- β

1. Bevezetés

A diabétesz első leírását i.e. 1550 körülre datálhatjuk. Egy egyiptomi papírusz egy ritka betegségről számolt be, mely testsúlycsökkenést és gyakori vizelést okozott. A diabétesz elnevezés egy görög orvostól Arataeustól származik. Az általa leírt betegség folyamatos szomjúságérzettel (polidipszia), excesszív vizeletválasztással (poliuria) és testsúlycsökkenéssel járt, a diabétesz szó is (jelentése: keresztül folyik, áthalad) ezeket a tüneteket jellemezte. Később Galenus is beszámolt erről a ritka kórról, melyet a vese betegségének tartott. A középkorban Avicenna írt a betegség komplikációjáról és progressiójáról. A vizeletvizsgálat elterjedésével a cukorürítés is igazolást nyert, a „mellitus” (jelentése: mézzel édesített) elnevezés ekkor társult a diabétesz szó mellé. 1869-ben Paul Langerhans, egy német orvostanhallgató disszertációjában a hasnyálmirigy kis szigeteiről számolt be, melyek funkcióját ekkor még nem ismerték. Akkoriban a diabétesz „kezelése” speciális diétás javaslatokból illetve éheztetésből állt, mely a diabéteszes kóma kialakulását átmenetileg megakadályozhatta, de elviselhető életminőséget nem nyújtott. 1920-ban Moses Barron találta meg az összefüggést a pankreász szigetek és a diabétesz mellitus között¹. 1921-ben Banting és Best felfedezte az inzulint és eredményesen kezelt egy pankreász eltávolításon átesett kutyát, majd 1922-ben egy 14 éves torontói fiú, Leonard Thomson az első sikeres humán alkalmazáson esik át². Az inzulin kezeléssel az akut anyagcsere kisiklás kialakulása elháríthatóvá vált. Az 1940-es évekre azonban a hosszútávú szövödmények közül a vese-, és a szemszövödmények is ismertté váltak, a diabétesz mellitus egy krónikus betegséggé alakult át magas morbiditással és korai halálozással.

1.1 A T1DM patomechanizmusa

A T1DM a hasnyálmirigy β -sejtjeinek folyamatos pusztulását okozó autoimmun folyamat következménye³, mely kialakulását genetikai hajlam és környezeti tényezők egyidejű jelenlétével magyarázzák. A β -sejtek károsodása a diagnózis felállítása előtt évekkal kezdődik, az inzulinválasztás csökkenése azonban csak a sejtek kb. 80 %-nak elpusztulása esetén vezet a T1DM típusos klinikai tüneteinek kialakulásához⁴ (1. ábra)



1. ábra A T1DM kialakulásának mechanizmusa. A β -sejtek károsodása az immunológiai eltérések és a klinikai tünetek megjelenése előtt évekkel kezdődik, a sejtek kb. 80 %-nak elpusztulása vezet a T1DM típusos klinikai tüneteinek kialakulásához³

Az autoimmun folyamat jelenlétét számos bizonyíték támasztja alá:

1. Gepts klasszikus munkájában⁵ 22, a diabétesz diagnózisának felállítását követő 6 hónapon belül meghalt páciens hasnyálmirigjét vizsgálta. A szövettani eredmények 15 páciensnél igazoltak gyulladós infiltrátumot (inzulitisz) a hasnyálmirigy szigeteiben. Későbbiekben más tanulmányok is igazolták az inzulitisz fennállását^{6,7,8} (2. ábra).
2. Autoimmun folyamatot valószínűsít egyes HLA haplotípusok és a diabétesz kialakulása közti kapcsolat kimutatása is^{9,10}.
3. Csontvelő transzplantáció által beteg egyedekből egészségesekbe is átvihető a betegség^{11,12}.
4. T1DM-ben szenvedő betegeknél az átlagpopulációhoz képest gyakrabban találkozunk más autoimmun betegségekkel is, így Hashimoto tireoiditisszel, Basedow kórral, atrofias gasztritisszel, Addison kórral, cöliákiával, vitiligoval, miaszténiával¹³.

5. Több kutató immunszuppresszív szerek alkalmazásával csökkenteni tudta a betegek inzulinszükségletét^{14,15}.



2. ábra Inzulitisz. Típusos limfocitász infiltrátum a hasnyálmirigy szigeteiben.

A T1DM, mint autoimmun betegség hipotézisét leginkább a szigetsejt ellenes autoantitestek (ICA) kimutatása erősítette meg^{16,17,18}. A szigetsejt ellenes antitestekkel foglalkozó kezdeti vizsgálatok az antitestek kötődésének helyét próbálták meghatározni. Az első lehetséges pontként egy 64 kD nagyságú fehérjét azonosítottak (GAD). Frissen felfedezett T1DM-ben szenvedő páciensek véréből a későbbiekben további antitesteket, döntően inzulin ellenes antitesteket (IAA), valamint tirozin foszfatáz ellenes antitesteket (islet cell antigen 2, IA-2) mutattak ki (1. táblázat).

1. táblázat. Major autoantigének T1DM-ban

Inzulin

GAD65

Tirozin foszfatáz (IA-2)

GM 2-1 gangliozid

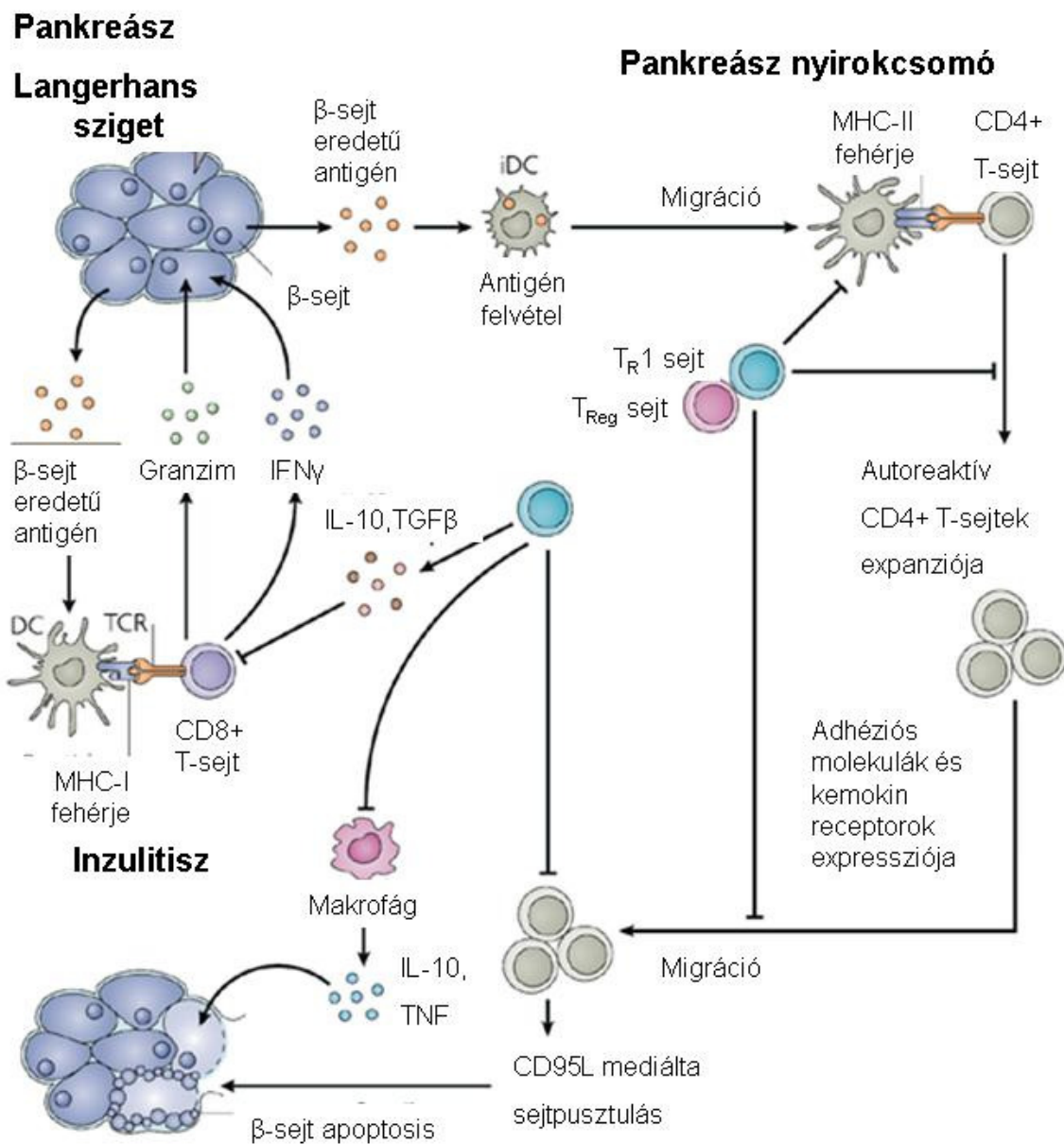
ICA12/SOX13

ICA69

CD38

A T1DM patogenezisében betöltött szerepük azonban további kérdéseket vetett fel. A szigetsejt ellenes antitestek ugyanis különböző intracelluláris antigénekhez kötődnek, míg a komplement-dependens antitest mediálta citotoxicitás kialakulásához sejtfelszíni antigének jelenléte szükséges. Lehetséges, hogy az ICA produkció nem kóroki tényező, csupán a β -sejtek pusztulására, és a szabaddá váló intracelluláris antigénekre adott válaszreakció. A spontán kifejlődő diabétesz állatmodeljeként szolgáló NOD egerekben¹⁹ illetve egy súlyos B-sejt hiányban, valamint agammaglobulaemiában szenvedő páciensnél²⁰ a humorális immunitás lényeges szerepe nélkül is kialakulhatott T1DM. A szigetsejt ellenes antitestek meghatározása azonban fontos szerepet tölt be a diabétesz különböző formáinak elkülönítésében, illetve a T1DM fellépésének kockázatát is megjósolhatják fokozott genetikai hajlammal rendelkező egyéneknél²¹.

A T1DM kialakulása eddigi ismereteink alapján döntően T-sejt dependens autoimmun folyamat (3. ábra)²². Első lépcsőként, még nem teljesen tisztázott körülmények között, a Langerhans szigetekben módosított β -sejt antigének válnak szabaddá. Ezek a korábbi „rejtett” antigének a szövetekben található antigén prezentáló sejtek (APC) membránján MHC-I molekulákkal együtt jelennek meg. Az antigén prezentációja CD8+ T limfociták aktiválásához vezet. Az aktiválódott limfociták citotoxikus citokinek elválasztása útján (pl.: IFN γ) illetve a perforin-granzim tengelyen keresztül a β -sejtek pusztulását okozzák²³. A szabaddá váló β -sejt eredetű antigéneket éretlen dendritikus sejtek is felveszik, majd a nyirokcsomókba szállítják, ahol az antigéneket a CD4+ limfociták felé prezentálják. Az aktiválódott limfocitáklónok adhéziós molekulák illetve citokin receptorok segítségével ismerik fel a korábbi, CD8+ sejtek által okozott sejtpusztulás nyomait, így visszajutnak a hasnyálmirigy szigeteibe. Itt aktiválják a gyulladáshoz részt vevő sejteket, inzulitisz alakul ki. A β -sejtek szelektív pusztulását végül citokinek (IL-1, TNF α) indukálta apoptózis, illetve a sejtek felszínén megjelenő CD95 által aktivált effektor T sejtek okozzák. Rabinovitch és mtsai²⁴ igazolták, hogy a β -sejtek érzékenyek az oxigén szabadgyökök és a nitrogén-monoxid (NO) okozta károsodásra, így az inzulitisz kialakulásában is szerepük lehet. Regulátor T sejtek a folyamat számos lépcsőjét gátolhatják, IL-10 és TGF β produkciója által gyengítik a gyulladáshoz vezető folyamatok intenzitását, így megakadályozhatják a betegség kialakulását is.



3. ábra A β -sejtek pusztulásának patomechanizmusa. A T1DM kialakulása eddigi ismereteink alapján döntően T-sejt dependens autoimmun folyamat, mely során autoreaktív T limfociták aktiválódnak. A β -sejtek szelektív pusztulását végül citokinek indukálta apoptózis, illetve aktivált effektor T sejtek okozzák.²²

1.2 A T1DM genetikai háttere

T1DM kialakulását genetikai hajlam és környezeti tényezők egyidejű jelenlétével magyarázzák. Környezeti faktorok szerepére utal a T1DM incidenciájának évenkénti 3 %-os emelkedése, valamint korai tehéntejfogasztás és a betegség kialakulása közti összefüggés kimutatása^{25,26}. Bár az új T1DM-es esetek 85 %-a sporadikus, a családi halmozódás már öröklött hajlam jelenlétére utal. Míg a T1DM kialakulásának rizikója átlagpopulációban 0,4 %, addig beteg gyermek testvérénél ez az érték 6 %-ra nő. Diabéteszes szülő gyermekeinél a rizikót hasonló nagyságúnak találták, érdekes módon az apa megbetegedése magasabb kockázattal jár (1,3-4 % rizikó beteg anya, 6-9 % rizikó beteg apa esetén)^{27,28}. Egypetűjű ikreknél 30-50 %-os konkordanciáról^{29,30} számoltak be, kétpetűjű ikreknél ez az arány 5-6 %. Eltérő környezetben felnövő egypetűjű ikernél a diabétesz kialakulásának esélye a diszkordancia hosszával párhuzamosan csökken, de akár 40 évvel később is konkordánssá válhat az addig egészséges ikertestvér. Autoantitestek megjelenésének esélye egypetűjű ikertestvér esetén magasabb, mint kétpetűjű ikreknél. Az egypetűjű ikrek nagy részénél az autoantitestek megjelenését követően diabétesz is kialakul³¹.

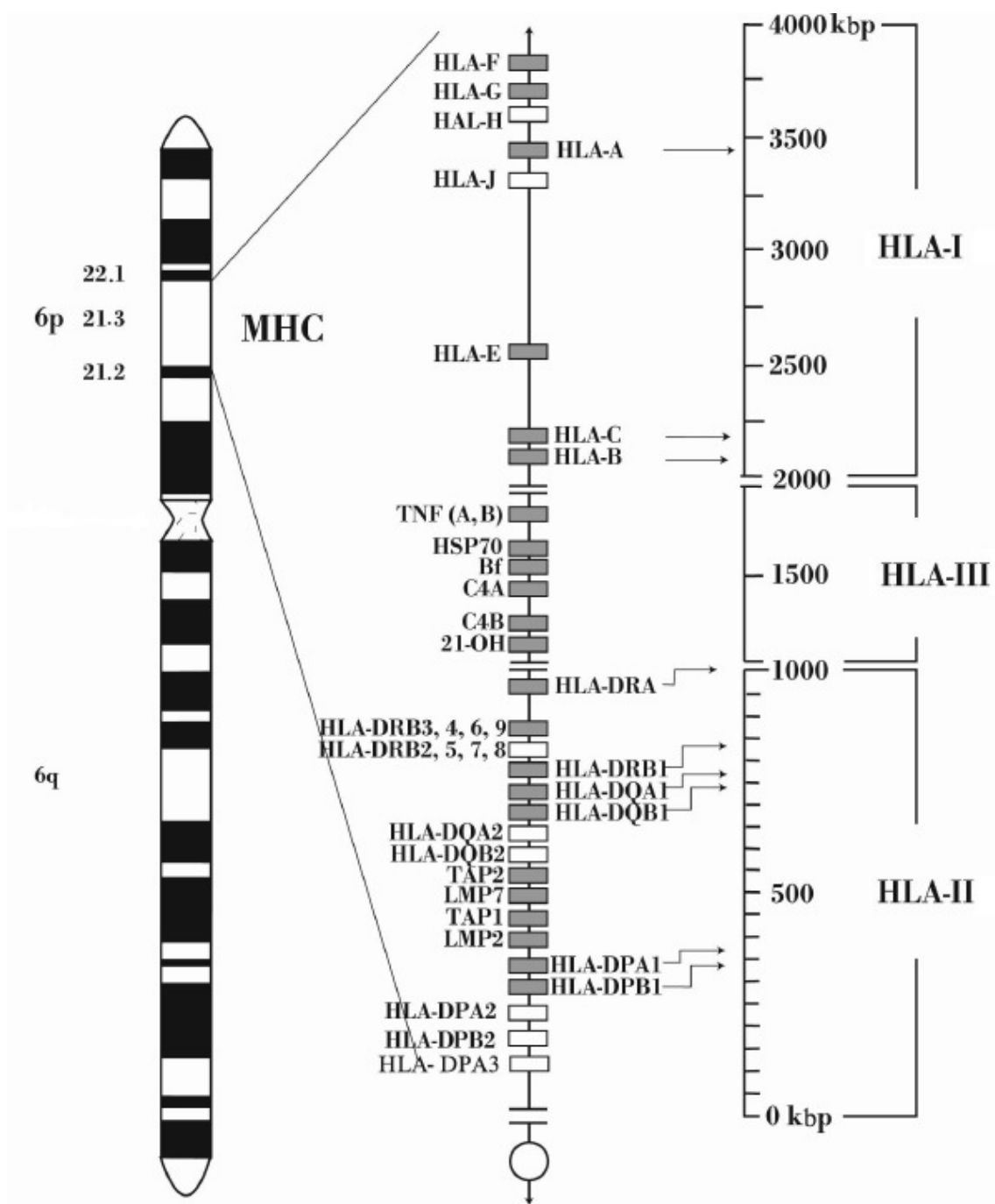
A genetikai predispozíció jelentőségét leginkább egyes genetikai variánsok és T1DM közti szoros kapcsolat kimutatása erősítette meg. Az első, fokozott genetikai kockázattal járó lókuszt Nerup és munkatársai 1974-ben fedezték fel³². Az azóta elmúlt több, mint 30 évben genom wide scan eljárás és asszociációs vizsgálatok kombinációjával számos kromoszóma szakaszt hoztak összefüggésbe a betegséggel³³. A 2. táblázatban felsorolt lókusztok többségénél a T1DM-ra hajlamos gén nem ismert. Független vizsgálatok sokszor egymástól eltérő eredményeket hoztak, korábban kimutatott összefüggéseket nem sikerült ismételtén igazolni. Kivételt 4 T1DM lókuszt jelent: HLA, inzulin gén, CTLA-4 és PTPN22 gén.

2. táblázat. T1DM-re hajlamosító lókuszek

Lókusz	Régió	Gén/marker	Hivatkozás
IDDM1	6p21.3	HLA-DRB1, DQB1, DQA1	34,35
IDDM2	11p15	INS VNTR	36,37,38
IDDM3	15q26	D15S107	39,40
IDDM4	11q13	FGF3, D11S1337	41,42,43,44,45
IDDM5	6q25	ESR	46,47,48
IDDM6	18q21	JK, D18S487	49,50
IDDM7	2q31	HOXD8, D2S152	51
IDDM8	6q27	D6S264, D6S446	52
IDDM9	3q21-25	D3S1576	53
IDDM10	10p11-q11	D10S10193	54
IDDM11	14q24.3-q31	D14S67	55
IDDM12	2q33	CTLA-4	56, 57
IDDM13	2q35	D2S164	58
IDDM14	-	Nem publikált lókusz	
IDDM15	6q21	D6S283	59
IDDM16	14q32.3	D14S542,IGH	59
IDDM17	10q25	D10S554	60
IDDM18	5q33-q34	IL-12B	61
	1q42	D1S1617	59
	16q22-q24	D16S3098	53
	19p13	D19S247	53
	19q13	D19S225	53
	Xp13-p11	DXS10698	42
	7p13	GCK	62
	12q14-q15	IFNG	63

1.2.1 HLA – IDDM1

A T1DM háttérében álló genetikai hajlam elsőként kimutatott lókusza, az IDDM1 a HLA (Humán leukocita antigén – MHC: fő hisztokompatibilitási komplex) régiót tartalmazza. A HLA-komplex mintegy 4 millió bázispárnyi szakaszon terül el a 6-os kromoszóma rövid karján (4. ábra). A HLA régió legalább 128 gént tartalmaz, a régióban található gének által kódolt fehérjék nagy része a gyulladásos-, illetve immunfolyamatokban játszik szerepet. A HLA-komplex 3 fő szakaszra osztható, az I. II. és III. osztályú gének által kódolt fehérjék a szervezet többi fehérjéihez képest egy nagyságrenddel nagyobb polimorfizmust mutatnak. Membrán fehérjeként fő feladatuk az intracelluláris peptidfragmentumok prezentálása a T-limfociták számára. Az I. osztályú HLA gének a veleszületett immunitásban vesznek részt, míg a II. osztályú



4. ábra A HLA régió géntérképe. A HLA régió a 6-os kromoszóma rövid karján (6p21.3) található. Az I. osztályú HLA gének a veleszületett immunitásban vesznek részt, míg a II. osztályú gének az adaptív immunrendszer részei. A köztük elhelyezkedő HLA III-as régióban gyulladás mediátorok képződésben, ill. magában a gyulladásos folyamatban szerepet játszó fehérjék génjei is megtalálhatók.⁶⁴

gének az adaptív immunrendszer részei. A HLA III-as régióban igen sokféle funkciójú géneket találhatunk. Ezek közül talán a legérdekesebbek azok, amelyek a gyulladás mediátorok képződésben, ill. magában a gyulladásos folyamatban szerepet játszó termékeket (citokinek, komplement fehérjék, 70 kd hőszokkfehérje) kódolnak.

A HLA-régió génei közül először az I. osztályú B8 és B15 molekulákat kódoló génekről mutatták ki, hogy összefügghetnek a T1DM kialakulásával^{32,35}. Hamarosan kiderült, hogy ez az összefüggés csak egy indirekt jel (linkage disequilibrium), a valódi összefüggésért HLA II. osztályú gének a felelősek.

3. táblázat T1DM kialakulását befolyásuló HLA haplotípusok

Magas kockázattal járó haplotípusok			
DR3	DRB1*0301	DQA1*0501	DQB1*0201
DR4	DRB1*0401	DQA1*0301	DQB1*0302
	DRB1*0402	DQA1*0301	DQB1*0302
	DRB1*0405	DQA1*0301	DQB1*0302
Közepes kockázattal járó haplotípusok			
DR1	DRB1*01	DQA1*0101	DQB1*0501
DR8	DRB1*0801	DQA1*0401	DQB1*0402
DR9	DRB1*0901	DQA1*0301	DQB1*0303
Protektív haplotípusok			
<i>Erős protekció</i>			
DR2	DRB1*1501	DQA1*0102	DQB1*0602
DR6	DRB1*1401	DQA1*0101	DQB1*0503
DR7	DRB1*0701	DQA1*0201	DQB1*0303
<i>Mérsékelt protekció</i>			
DR5	DRB1*1101	DQA1*0501	DQB1*0301
<i>Gyenge protekció</i>			
DR4	DRB1*0401	DQA1*0301	DQB1*0301
	DRB1*0403	DQA1*0301	DQB1*0302
DR7	DRB1*0701	DQA1*0201	DQB1*0201

HLA II. osztályú DQ és DR molekulák az 1. típusú diabétesz háttérében álló genetikai hajlam közel 50 %-ért felelősek. A legnagyobb kockázatot jelentő haplotípusok: a DQA1*0501-DQB1*0201 (DQ2), mely csaknem mindig együtt öröklődik DRB1*0301(DR3) génekkel valamint a DQA1*0301-DQB1*0302 (DQ8), mely a DRB1*0401 vagy DRB1*0402 (DR4) génekkel öröklődik együtt⁶⁵. A DQ2/DQ8 haplotípust hordozó heterozigóta egyéneknél a T1DM kialakulásának rizikója 5 %. Ez az érték diabéteszes családokban 20 %-ra nő. A diabéteszes gyermekek 20 %-a hordozza ezt a haplotípust, míg egészségeseknél csak 2 % a gyakorisága.

Egyes HLA gének a diabétesz kialakulása szempontjából protektív szerepet játszanak, különösen a DQA1*0102/DQB1*0602/DRB1*1501 haplotípus. A legfontosabbnak a DQB1*0602 allél tűnik (3. táblázat). Védő hatása még T1DM kialakulása szempontjából fokozott kockázatúnak számító betegcsoportnál, a diabéteszes betegek autoantitest pozitív elsőfokú rokonainál is kimutatható. A protektív tulajdonság azonban nem abszolút értékű, számos T1DM beteg is hordozza a DQB1*0602 allélt.

A HLA molekulák hajlamosító vagy protektív szerepét a T-sejtek felé történő antigén prezentációval magyarázzák. A tímuszban zajló saját antigén prezentáció hatására immuntolerancia jön létre. Amennyiben a folyamat zavart szenved (hajlamosító gének általt kódolt molekulák elégtelen antigénprezentációja) a saját antigénre reagáló T-limfociták negatív szelekciója nem jön létre. Egyes HLA molekulák pedig a periférián történő β -sejt eredetű antigén prezentációért felelősek, mely beindítja illetve fenntartja az autoimmun folyamatot⁶⁶.

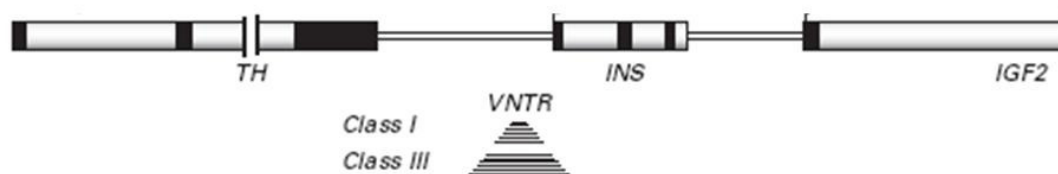
1.2.2. Az inzulin gén - IDDM2

T1DM a β -sejtek szelektív pusztulásával járó autoimmun folyamat, melyet autoreaktív limfociták okoznak. Számos adat támasztja alá az inzulin szerepét az autoimmun folyamatban. Az antitest produkciójáért felelős autoantigének közül egyedül az inzulinmolekula specifikusan β -sejt eredetű, GAD-65 és IA-2 megtalálható a glukagont elválasztó α -sejtekben is⁶⁷.

Az inzulinmolekula génje (lokalizáció 11p15) mindig is kutatások tárgyát képezte, a gén mellett található polimorf lókuszt már 2 évtizede kapcsolatba hozták a T1DM kialakulásával.

A diabetogén génszakasz nagy valószínűséggel az inzulin gén 5' végén elhelyezkedő polimorf régió (VNTR), mely 14-15 bázispárnyi szakasz ismétlődéseiből áll (5. ábra). Az ismétlődések száma bimodális eloszlást mutat (30-60 ismétlődés – Class-I; 120-170 ismétlődés – Class III), köztes nagyság (Class II) rendkívül ritka. A class-I allélre nézve homozigóta egyéneknél a T1DM relatív kockázata 2-3-szoros a legalább egy class-III allélt hordozó egyénekhez képest. Az INS-VNTR polimorfizmus nem befolyásolja az inzulin molekula aminosav szekvenciáját, hatását a gén átírásánál fejtí ki. A hasnyálmirigy szigeteiben ugyan szignifikáns, de klinikailag nem jelentős az

inzulinszekrécióban mutatkozó eltérés a különböző allélek között. Kis mennyiségű inzulinprodukción (hasonlóan más szöveti antigének expressziójához) azonban a tímusz epitéliumában is történik. Úgy tűnik, hogy az INS-VNTR polimorfizmus ezt a folyamatot befolyásolja. A class-I allél jelenléte 2-3-szor alacsonyabb inzulinkoncentrációt eredményez a tímuszban, mely saját antigénekkal szembeni tolerancia kialakulása során az inzulin-specifikus T-limfociták elégtelen delécióját eredményezheti⁶⁸. NOD egerekben az inzulinitisz és a diabétesz kialakulása felgyorsul, az inzulinnal szembeni fokozott reaktivitást nem kíséri más autoantigénnel szembeni autoimmunitás kialakulása. A tímuszban zajló inzulinszekréció jelentőségét támaszthatja alá egy újabb érdekes tény is. Két ritka class-III allél a többi class-III alléllal szemben totálisan gátolja az inzulin gén transzkripcióját a tímuszban. Genetikai vizsgálatokban ez az allél T1DM-re nézve nem védő, hanem hajlamosító faktornak bizonyult⁶⁹.



TH: tirozin hidroxiláz gén, INS: inzulin gén, IGF2: inzulinszerű növekedési faktor 2 gén

5. ábra Az inzulinmolekula génje a 11-es kromoszóma rövid karján található. A diabétesz kialakulásával elsősorban az inzulin gén 5' végén elhelyezkedő polimorf régiót (VNTR) hozták kapcsolatba.⁶⁸

A VNTR régió az inzulin génjén kívül elvileg az IGF2 transzkripcióját is befolyásolhatja, az eddigi vizsgálatokkal ezt a mechanizmust még nem sikerült bizonyítani.

1.2.3. CTLA-4 – IDDM12

A CTL-4 (citotoxikus T-limfocita asszociált antigén 4) gén egy T-limfocita receptort (TCR) kódol. A receptor egy transzmembrán glikoprotein, mely T-sejt aktivációt követő

2-3 napon belül expresszálódik. Az antigén prezentáló sejtek felszínén megtalálható CD80 illetve CD86-hoz kötődve gátolja az IL-2 receptor α -láncának expresszióját, mely csökkent IL-2 szintézishez, illetve a korábban aktivált sejtek apoptosishoz vezethet. A CTLA-4 molekula feltételezett fő funkciója a perifériás autotolerancia szabályozása, autoimmun folyamatok kialakulásának megelőzése⁷⁰. A CTLA-4 gén a korábban már diabétesszel kapcsolatba hozott IDDM12-es lókuszon belül helyezkedik el (2q33). Ugyanez a régió a T1DM mellett más autoimmun betegségekkel is összefüggést mutatott⁷¹. A kromoszómaszakasz a CD28 és az indukálható T-sejt kostimulátor (ICOS) génjét is tartalmazza (6. ábra).



6. ábra A CTLA-4 gén az IDDM12-es lókuszon belül helyezkedik el (2q33). A kromoszómaszakasz a CD28 és az indukálható T-sejt kostimulátor (ICOS) génjét is tartalmazza⁶⁸

Basedow kór esetén a 3' vég A⁶²³⁰G SNP-je mutatja a legszorosabb összefüggést. Ugyanez az SNP T1DM esetén is fontos, de az 5' vég A⁴⁹G nem szinonim (Thr17Ala) SNP-je és számos promoter polimorfizmus szerepe sem zárható ki. A polimorfizmusok hatásmechanizmusa pontosan nem ismert. Az A⁶²³⁰G SNP a szolubilis CTLA-4 produkcióját befolyásolja, míg a Thr17Ala aminosavcsere inkomplett glikozilációhoz vezet az endoplazmatikus retikulumban, melynek eredménye kisebb mértékű CTLA-4 expresszió a sejt felszínén.

1.2.4. PTPN22.

PTPN22 (protein tirozin foszfatáz; 1p13.3) gén egy limfocita protein tirozin foszfatázt kódol (LYP), mely az immunrendszer illetve a T-sejt aktiváció szabályozásában vesz

részt. A nem szinonim Arg620Trp cserét eredményező C¹⁸⁵⁸T SNP összefüggést mutatott az T1DM kialakulásával⁷². A Trp620-as variáns a fehérje fokozott működésével jár, mely a tímuszban az autoreaktív T sejtek elégtelen szelekciójához vezet. A C¹⁸⁵⁸T polimorfizmus egyéb autoimmun betegségekkel (reumatoid arthritisz, SLE, Basedow-kór) is kapcsolatba hozható⁷³.

1.2.5 A gyulladási folyamatban részt vevő fehérjék polimorfizmusai

A teljes genomon végzett kapcsoltsági vizsgálatok segítségével igazolni lehetett számos T1DM-re hajlamosító lókuszt jelenlétét. A módszer azonban nem tökéletes, az INS-VNTR szerepét 6 genom wide scan közül csupán 2 igazolta. Egy feltételezett, kandidáns gén pontos szerepének tisztázására az asszociációs vizsgálatok érzékenyebbnek bizonyultak⁷⁴, elsősorban alacsony genetikai hajlamot jelentő, és az átlagpopulációban is gyakran előforduló allélek esetén.

A T1DM kialakulásához vezető autoimmun folyamatban számos fehérje vesz részt²⁴, melyek génjein elhelyezkedő polimorfizmusok a kódolt fehérje mennyiségének illetve tulajdonságainak megváltoztatása útján az autoimmun folyamat kialakulását illetve lefolyását is megváltoztathatják.

1.2.5.1 Tumor necrosis factor- α (TNF α)

A TNF α proinflammatorikus és citotoxikus hatással is rendelkező citokin, mely a gyulladási és immunregulációs folyamatokban fontos szerepet játszik. Az endotel sejteiben az adhéziónak molekulák expressziójának fokozásával elősegíti a gyulladási folyamatban részt vevő sejtek megtapadását.

A T1DM patogeneze során a Langerhans szigeteket infiltráló makrofágok termelik^{75,76}, így centrális szerepet játszik a β -sejtek szelektív pusztulásában⁷⁷. Elősegíti az antigén prezentáló sejtek megjelenését és a szigetsejt fragmentumok prezentációját az autoreaktív T-sejtek felé⁷⁸. IL-1 β -val együtt serkenti az IL-6 elválasztást⁷⁹ is.

A spontán kifejlődő diabétesz két állatmodeljének, (non-obese diabetic (NOD)⁸⁰ egér és biobreding (BB) patkány⁸¹) szigetsejtjeiben jelenléte a β -sejtek pusztulásához vezető inzulitisz kialakulásával összefüggést mutatott.

Magasabb TNF α szérumszinteket találtak újonnan diagnosztizált T1DM-es betegek vérében a nem diabéteszes kontrollcsoporthoz, illetve régóta fennálló diabéteszes csoporthoz képest⁸². A TNF α szintek az extenzív β -sejt pusztulás előtt a Langerhans szigetekben zajló autoimmun destrukció indikátoraként is használhatók^{24,83}.

Génje a 6-os kromoszóma rövid karján, a 21:3 lokuszon helyezkedik el⁸⁴, az MHC III.osztályú régiójában (4. ábra). Számos tanulmány igazolta, hogy a TNF α gén néhány polimorfizmusa (SNP) megváltozott citokin produkcióval járhat^{85,86}. Valószínűleg a promoter régió, az első intron, a 3' végen transzlációban részt nem vevő régiók polimorfizmusai és mikroszatelliták befolyásolhatják a TNF α szintet. A promoter régió 308-as pozíciójának G/A polimorfizmusa (G⁻³⁰⁸A) az asszociációs vizsgálatok által használt legfontosabb SNP. Az A allél erősebb transzkripciós aktivátor, 20-40%-kal magasabb TNF α -t produkcióval jár a ⁻³⁰⁸GG genotípussal szemben^{85,87}. A gén elhelyezkedése miatt elképzelhető, hogy polimorfizmusa szerepet játszhat egyes HLA haplotípusok és T1DM között kimutatott összefüggésben⁸⁸. Pociot⁸⁹, Cox⁹⁰ és Deng⁹¹ a T1DM-ben szenvedő betegeknél a ⁻³⁰⁸A allél gyakoribb előfordulását írták le, amit többségében a polimorfizmus HLA-DR3-val való kapcsolt öröklődésének tulajdonítottak.

A promoter régió másik gyakran vizsgált polimorfizmusa a 238-as pozícióban megfigyelt G/A polimorfizmus (G⁻²³⁸A). Bár a polimorfizmus TNF α produkcióra gyakorolt hatása még nem tisztázott⁹², számos autoimmun^{93,94,95}, -, illetve gyulladással^{96,97,98} betegséggel mutatott összefüggést.

1.2.5.2 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Az IL-1 β a TNF α -hoz hasonlóan a proinflammatorikus citokinek közé tartozik, és újonnan diagnosztizált T1DM-es betegek vérében szintén emelkedett szérumszintjét találták a régóta fennálló diabéteszes betegekhez képest^{99,100}.

IL-1 β önmagában illetve IFN γ és TNF α segítségével stimulálja a β -sejtek iNOS (indukálható nitrodénmonoxid szintetáz) expresszióját. A fokozott NO produkció a Krebs-ciklus gátlásán keresztül akadályozza a glükóz oxidációját és csökkenti az ATP szintet. A glükóz indukálta inzulin elválasztás a β -sejtek depolarizációjának és Ca²⁺ beáramlásnak eredményeként alakul ki. Ez a folyamat az ATP-dependens K⁺-csatornák

magas ATP szint általi gátlásán alapul. A fokozott NO produkció által gátolt mitokondriális oxidáció végül csökkenő inzulinelválasztáshoz vezet^{101,102,103,104,105}. Az IL-1 β hatása a Langerhans szigeteken belül meglehetősen szelektív, az α -sejtekben nem képes gátolni az oxidációs folyamatokat¹⁰⁶.

A β -sejtek pusztulásának legfontosabb mechanizmusa az apoptózis, melyet extracelluláris szignálok (citokinek), az intracelluláris ATP-szint, a foszforilációs kaszkád és pro-, illetve antiapoptotikus gének szabályoznak illetve aktiválnak. IL-1 β a NF- κ B, a IFN γ pedig STAT1 transzkripciós faktort indukálja az apoptosishoz vezető folyamatokat¹⁰⁷.

Az IL-1 β -t kódoló gén a 2q14-es kromoszóma szakaszon található. Az exon 5 régiójában található C³⁹⁵⁴T polimorfizmus befolyásolja az elválasztott IL-1 β mennyiségét: a ³⁹⁵⁴T allél hordozás nagyobb mennyiségű IL-1 β produkcióval jár¹⁰⁸. A polimorfizmus T1DM-ben betöltött szerepéről korlátozott adatok állnak rendelkezésre¹⁰⁹.

1.2.5.3. Interleukin-6 (IL-6)

Az IL-6 számos funkciót ellátó citokin, mely a fertőzésekre és sérülésekre adott gyulladásszerű válasz fokozásában és gátlásában is szerepet játszhat^{110,111}. Eredetileg B-sejt differenciálódását befolyásoló faktornak tekintették, de pleiotrop citokinként szerepet játszik a hemopoézis, a fehérvérsejtek differenciálódásának és az akut fázis fehérvérsejt szintézisének szabályozásában is. Elősegíti a naív T sejtek túlélését, és szerepe van a DC sejtek antigén prezentációjában is. Számos sejttípus, például T-sejtek, monociták, fibroblasztok, endoteliális sejtek és a hasnyálmirigy szigeteinek β -sejtjei is termelik¹¹².

Az IL-6 T1DM kialakulásában betöltött szerepét az állatkísérletek vitatják. Lokálisan elválasztott IL-6 csak az inzulinitisz kialakulását segítette elő NOD egerekben¹¹³, a diabétesz felléptét késleltette.

Erbagci és mtsai⁸² újonnan diagnosztizált, gyermekkorban jelentkező T1DM-ban magasabb IL-6 szintet találtak, míg Foulis és mtsai¹¹⁴ a T1DM diagnózisa után nem sokkal meghalt betegek hasnyálmirigy szigeteiben mutatták ki IL-6 jelenlétét. IL-6 fontos szerepet játszik más autoimmun megbetegedésekben is (reumatoid arthritisz, SLE, gyulladásszerű bélbetegségek)¹¹⁵.

Génje a 7p21-es kromoszómaszakaszon található. A promoter régiójában található C⁻¹⁷⁴G polimorfizmus befolyásolja a citokin elválasztás mértékét, a ⁻¹⁷⁴G allélt hordozó sejtek in vitro és in vivo is nagyobb mennyiségű IL-6-t választanak el, mint a ⁻¹⁷⁴C allélt hordozó sejtek¹¹⁶. A gént tartalmazó régió és a T1DM között az eddigi genom wide scan vizsgálatok nem mutattak összefüggést⁷⁴.

1.2.5.4. Heat shock protein 72 (HSPA1B, stresszfehérje)

A hőszokk hatására létrejött génaktivációt már 1962-ben felfedezték, de a gének által kódolt fehérjéket, a „hőszokk fehérjét” 1974-ben izolálták először. Számos családjuk ismert, elnevezésük az átlagos molekulatömeg alapján történt (HSP70 molekulatömege 70 kDa). A HSP70 család a sejtet érő stresszre legnagyobb mennyiségben termelődő protein. Két alcsoportja ismert: a folyamatosan termelődő HSP73, illetve a stressz indukálta HSP72.

A hőszokk fehérjék, vagy stresszfehérjék a szervezett legkonzervatívabb polipeptidjei közé tartoznak, melyek citoprotektív szereppel bírnak, oxidatív károsodásoktól védik a lipideket, nukleinsavakat és a fehérjéket, akadályozzák az apoptosist, gátolják a proinflammatorikus citokineket, javítja a károsodott ioncsatornákat¹¹⁷. Citoprotektív szerepük mellett immunmoduláns hatásuk is van. A sejt felszínén illetve az extracelluláris térben megjelenve azonban befolyásolják az immunsejtek proinflammatorikus aktivációját. A HSP70 molekulák immunmoduláns szerepe a daganatsejtek elleni védekezőreakciók elősegítésén túl a saját antigénnel szembeni tolerancia fenntartásában, és az autoimmun folyamatok elindításában is megnyilvánul. Egyes autoimmun betegségekben potenciális autoantigénként viselkednek¹¹⁸. T1DM-ban elsősorban a β -sejtek expresszálják, Abulafia-Lapid és mtsai¹¹⁹ újonnan diagnosztizált cukorbeteg gyermekeknél HSP70 ellenes autoantitesteket mutattak ki.

A HSP72 a T1DM kialakulásához vezető szigetsejt károsodásban szerepet játszó NO ellen védi a β -sejteket¹²⁰. Burkart és társai 2008-ban megjelent tanulmánya a T1DM diagnózisakor a vér mononukleáris sejtjeiben jelentősen csökkent HSP70 elválasztást igazolt, melyet a pro-, illetve antiinflammatorikus citokinek is befolyásoltak¹²¹. Az alacsony HSP produkció a citoprotektív hatás elmaradása által hozzájárulhatott a diabétesz kialakulásához.

A környezeti hatásokon kívül a HSP72 genetikai polimorfizmusai (HSP72 A¹²⁶⁷G) is szerepet játszanak a termelődő stresszfehérje mennyiségében. A HSP72¹²⁶⁷GG homozigótákban csökkent mennyiségű HSP72-t mértek¹²².

1.2.5.5. Toll-Like receptor-4 (TLR)

A T1DM incidenciájának emelkedése a genetikai hajlam mellett a környezeti faktorok jelentőségét is hangsúlyozza. A környezeti faktorok közül a vírusinfekciók etiológiai szerepét legmeggyőzőbben a rubeolajárványok igazolták. A rubeola embriopátiában szenvedőkben gyermek-, és fiatal felnőttkorban nagy százalékban alakult ki diabétesz. Egyéb vírusok etiológiai szerepét számos tanulmány taglalta^{123,124}. A fertőzések elleni védekezésben szerepet játszó fehérjék funkcionális változást hozó polimorfizmusai a T1DM kialakulásában is szerepet játszhatnak.

A TLR (toll-like receptor) receptorcsalád számos szövetben illetve sejt felszínén megtalálható. Az antigén felismerésében vesz részt. A TLR-k transzmembrán receptorok, felépítésüket egy extracelluláris, leucinban gazdag domén (LRR), illetve egy intracelluláris toll/IL-1 domén jellemzi. A toll-like receptorokat számos mikrobiális stimulus aktiválja (baktérium sejtfalának lipopoliszaccharid (LPS) összetevője, bakteriális DNS és virális dupla-szálú RNS¹²⁵), mely proinflammatorikus citokinek termelődéséhez vezet. A toll-like receptorok az adaptív és veleszületett immunitás közti kapcsolatban is szerepet játszanak¹²⁶. Az immunrendszer számos sejtjein, különösen az antigén prezentáló sejtek felszínén sikerült TLR-kat kimutatni.

Az elsőként felfedezett humán TLR a TLR-4, egy elsősorban Gram-negatív baktériumok LPS-t felismerő receptor volt, de vírusok elleni immunitásban is kimutatták szerepét¹²⁷. Makrofágok, dendritikus sejtek felszínén elhelyezkedve egyes endogén molekulákkal is kapcsolatba lépnek (HSP60, HSP70, fibrinogén stb.).

A TLR4 génje a 9q32-33-as kromoszómaszakaszon helyezkedik el. A gén A⁸⁹⁶G polimorfizmusa a fehérje Asp299Gly cseréjét eredményezi a 4. exonban és megváltoztatja a receptor extracelluláris szerkezetét, így befolyásolja a jelátvitelt is¹²⁸. Kiechl és mtsai¹²⁹ a mutáns allélt hordozókban a keringő gyulladáscsökkentő citokinek

koncentrációját alacsonyabbnak találták, ami együtt járt a súlyos fertőzések gyakoribb előfordulásával, ugyanakkor csökkentette az atherosclerosis kockázatát.

Számos tanulmány talált összefüggést a TLR4 polimorfizmus és különböző autoimmun betegségek között, valamint TLR2 polimorfizmus és T1DM között¹³⁰. Santin és munkatársai azonban nem igazolták a TLR4 különböző mutációinak a T1DM kialakulásában betöltött szerepét¹³¹.

1.2.5.6. CD14

A CD14 molekula egy 53 – 55 kDa molekulatömegű glikoprotein, melyet egy glikozilfoszfatidilinozitol csoport (GPI) rögzít a sejtmembránhoz. Megtalálható a monociták, makrofágok és polimorfonukleáris neutrofil sejtek felszínén, hiányzik azonban a B-sejtek és endoteliális sejtek membránjáról. CD14 egy nagy affinitású LPS receptor¹³², de más bakteriális eredetű ligandhoz (pl.: peptidoglikánok¹³³, spirocheta eredetű lipoproteinek¹³⁴) illetve saját sejtkomponensekhez (apoptotikus sejtek)¹³⁵ is kötődik. Az LPS-t megkötő CD14 a TLR4/MD-2 receptorkomplexhez csatlakozik, mely a nukleáris faktor (NF)- κ B aktivációján keresztül proinflammatorikus citokinek fokozott produkciójához vezet. LPS-re reagáló sejtek (például epiteliális sejtek), melyek nem tartalmaznak membránhoz kötött CD14-t (mCD14), kis koncentrációjú LPS-re is érzékennyé válnak szolubilis CD14 (sCD14) jelenlétében¹³⁶.

A CD14 génje az 5q31 kromoszómaszakaszon helyezkedik el. A promoter régió 260-as pozíciójának C/T polimorfizmusa a leggyakrabban vizsgált SNP. A ⁻²⁶⁰TT genotípus hordozóiban szignifikánsan magasabb sCD14 szinteket mértek a ⁻²⁶⁰CT és ⁻²⁶⁰CC genotípusok hordozóival szemben, a monociták felszínén is nagyobb CD14 sűrűséget mértek^{137,138}.

Bizonyos bakteriális fertőzések és autoimmun folyamatok indukciója közti kapcsolat vezetett a polimorfizmus jelentőségének vizsgálatához egyes autoimmun illetve gyulladásos kórképekben (gyulladásos bélbetegség, atópiá, spondilitisz ankilopoetika)^{139,140,141,142}. Cöliákiás gyermekekben megfigyelt fokozott mukozális CD14 expresszió¹⁴³ a C⁻²⁶⁰T SNP lehetséges szerepét veti fel ebben a kórképben is.

A C⁻²⁶⁰T SNP jelentőségét cukorbetegségben még nem vizsgálták, de NOD egerekben a CD14^{-/-} egyedeknél szignifikánsan alacsonyabb diabétesz gyakoriságot figyeltek meg, Diabéteszes CD14^{-/-} egyedekben a tünetek később jelentkeztek¹⁴⁴.

1.3 T1DM és cöliákia

A cöliákia (CD) a vékonybél súlyos gyulladással járó krónikus betegsége, melynek kialakulásában a gliadinok van szerepe. Azok a gliadinok, melyek aminosav-összetételének legalább egyharmadát a glutamin teszi ki, a transzglutamináz enzim kiváló donorszubsztrátjaként szolgálnak. Deamidálás eredményeként egyes fehérjeépítők a szöveti transzglutaminázzal komplexet képezve az antigén prezentáló sejtek felszínén HLA-DQ2 illetve DQ8 fehérjékhez kötődnek és a CD4⁺ limfocitákat aktiválják. A CD4⁺ T-sejtek által vezérelt autoantitest képzés beindulása a tolerancia elvesztését, az autoimmun folyamat kezdeti lépését jelenti.

T1DM és cöliákia (CD) közötti kapcsolatot már az 1960-as években felfedezték, az összefüggést azóta számos tanulmány igazolta^{145,146}. A CD a második leggyakoribb, T1DM esetén előforduló autoimmun betegség (az autoimmun tiroiditisz után). A T1DM típusosan hamarabb alakul ki, így a legtöbb tanulmány a diabétesz populációban vizsgálta a CD prevalenciáját. Eredményeik alapján a CD prevalenciája T1DM-ben szenvedő betegeknél 1,3-16,4 % között mozog^{147,148,149}. A fokozott kockázatot az ellenkező irányban is igazolták, Ludvigsson és társai 2006-ban megjelent vizsgálatában CD-ben szenvedő beteg gyermekeknél a T1DM kialakulásának rizikóját a normál populációhoz képest két-háromszor nagyobbak találták¹⁵⁰.

A T1DM és a CD közötti kapcsolat valószínűleg közös genetikai hajlamon alapul. A CD-ben szenvedő betegek 95 %-nál kimutatták a HLA-DQ2 gént, mely T1DM esetén is hajlamosító tényezőnek számít, bár a legszorosabb összefüggést diabéteszben a DQ2/DQ8 haplotípus adta.

TNF α promotor polimorfizmusának vizsgálata CD esetén a HLA-DQ2-től független összefüggést mutatott a betegséggel, míg diabétesz esetén TNF α polimorfizmus szoros kapcsolatban áll egyes HLA haplotípusokkal¹⁵¹.

2. Célkitűzések

Munkánkban kutatócsoportunk korábbi eredményeiből kiindulva először a T1DM patogenezisében szerepet játszó fehérjék génjeit vizsgáltuk. A gének olyan polimorfizmusait (single nucleotid polymorphism, SNP) határoztuk meg, melyek az általuk kódolt fehérjék mennyiségi és minőségi változása révén szerepet játszhatnak a T1DM alapjául szolgáló autoimmun folyamat kialakulásában illetve klinikai lefolyásában. A vizsgált polimorfizmusokat a rendelkezésre álló klinikai adatokkal is összevetettük, illetve vizsgáltuk az egyes fehérjék polimorfizmusainak együttes hatását. A klinikai adatok között különös hangsúlyt helyeztünk a T1DM-ben szenvedő betegeknél gyakrabban előforduló cöliákiára. Vizsgáltuk a két betegség közös genetikai hátterét.

Kiindulópontként az alábbi kérdéseket tettük fel:

1. A TNF α G⁻³⁰⁸A polimorfizmusa összefügg-e a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkorról (1. vizsgálat)?
2. Az IL-1 β C³⁹⁵⁴T polimorfizmusa összefügg-e a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkorról (1. vizsgálat)?
3. Az IL-6 G⁻¹⁷⁴C polimorfizmusa összefügg-e a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkorról (1. vizsgálat)?
4. A fenti polimorfizmusok együttes hatása befolyásolja-e a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkort (1. vizsgálat)?
5. HSPA1B (HSP72) A¹²⁶⁷G polimorfizmus összefügg-e a T1DM kialakulásával (2. vizsgálat)?
6. HSPA1B (HSP72) A¹²⁶⁷G és a TNF α G⁻³⁰⁸A polimorfizmus együttes hatása összefügg-e a T1DM kialakulásával (2. vizsgálat)?
7. A TNF α G⁻³⁰⁸A illetve TNF α G⁻²³⁸A polimorfizmus összefügg-e a cöliákia előfordulásával T1DM-ben szenvedő gyermekeknél (3. vizsgálat)?
8. A CD14 C⁻²⁶⁰T illetve TLR-4 A⁸⁹⁶G SNP összefügg-e a T1DM és a cöliákia kialakulásának illetve a két betegség együttes előfordulásának kockázatával (4. vizsgálat)?
9. A HLA-DQ genotípus befolyásolja-e a cöliákia kialakulását T1DM betegek esetén (4. vizsgálat)?

3. Módszerek

3.1 A vizsgált populáció

3.1.1 Betegek

A vizsgálatba Semmelweis Egyetem I. Gyermekklinikáján gondozott T1DM-ban illetve cöliákiában szenvedő gyermeket vontunk be. A diabéteszes gyermekek klinikai adatait Microsoft Access adatbázis felhasználásával dolgoztuk fel. A gyermekek részletes adatai a különböző vizsgálatokban az alábbiak voltak:

Az 1. vizsgálatba bevont T1DM-ben szenvedő betegek klinikai adatai³

Betegek száma (fiú/lány)	165 (84/81)
Életkor: medián év (25 valamint 75 percentil)	17 (14,19)
Medián életkor a diagnóziskor (25 valamint 75 percentil)	6 (min.1-max. 15)
A T1DM időtartama medián érték (25 valamint 75 percentil)	9 (min.3-max.19)
Inzulin dózis (E/kg/nap)*	0,83 ± 0,26
HbA _{1C} (%)*	8 ± 1,07
Súly SDS*	0,11 ± 0,86
Magasság SDS*	0 ± 1,12
BMI (kg/m ²) SDS*	0,23 ± 0,97
Összkoleszterin (mmol/l)*	4,91 ± 1,31
Triglicerid (mmol/l)*	1,43 ± 1,2
Kreatinin (μmol/l)*	83,15 ± 18,07

*átlag ± SD; SDS: standard deviációs pontértékkel (standard deviation score)

A 2. vizsgálatba 372 (191 fiú, 181 lány; átlagéletkor 16 év; diabétesz átlagos fennállási ideje: 8 év) T1DM-ben szenvedő beteget vontunk be.

A 3. vizsgálatba 301 (154 fiú, 147 lány; átlagéletkor 14 év) T1DM-ben szenvedő beteget vontunk be. A T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkor 0,9 és 18 év között

változott (medián: 7 év), a diabétesz fennállási ideje 0,1 és 17 év között változott (medián: 5 év).

A 4. vizsgálatba bevont T1DM-ben, CD-ben illetve mindkettőben szenvedő betegek adatai¹:

	T1DM	CD	T1DM+CD
Betegek száma	80	100	47
Fiú/lány	41/39	47/53	21/26
Medián életév	15 (4-22)	16 (3-40)	14 (3-20)
Diabétesz fennállása (medián év)	9 (2-20)		8 (1-16)
Medián életkor a T1DM diagnózisakor	6 (1-15)		6 (1-14)
Medián életkor a CD diagnózisakor		6 (0,5-43)	8 (1-18)
Átlagos HbA _{1C} (%)	8,13		8,14

3.1.2 Kontroll csoport

Az 1. vizsgálatához nem volt szükség kontroll csoportra. A 2. és 3. vizsgálatokhoz kontroll csoportként egészséges magyar véradók eredményeit használtuk fel (saját mérések, illetve az irodalom alapján). A kontroll csoport a vizsgálati csoporttól nemi megoszlásban nem különbözött. A 4. vizsgálatban 146 egészséges újszülött anyagcsere szűrővizsgálat céljából levett vérének maradékát használtuk fel. HLA-DQ genotípus kontrollját szervdonorok OVSZ által meghatározott eredményei képezték.

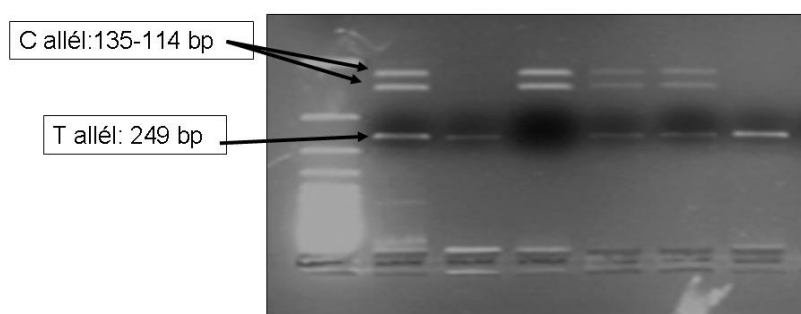
A vizsgálatok elvégzését a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága engedélyezte.

3.2 Polimeráz lánreakció (PCR) - restrikciós fragment hosszúság polimorfizmus (RFLP) módszer

A vérminták fehérvérsejtjeiből a DNS-t Miller és mtsai¹⁵² szerint vontuk ki. A vizsgálandó génszakaszt PCR segítségével amplifikáltuk. Az amplifikációt 50µl végtérfogattal végeztük el, ami 3 µl DNS-t, 1 µl primert, 0,2 mmol/L-t minden dNTP-ből, az adott reakcióhoz optimális mennyiségű MgCl₂-t, 2 U Promega Taq polymerase-t és a hozzá való buffert tartalmazta. A kapott terméket különböző - az adott SNP-nél hasító - restrikciós endonukleázzal emésztettük az enzim működéséhez optimális

hőmérsékleten, megfelelő ideig. Az így keletkezett terméket 0,4 mg/L ethidium bromiddal megjelölve agaróz gélen futtattuk meg és UV fény alatt értékeltük (7. ábra). Az elvégzett PCR reakciók a használt primerek, a PCR körülmények és az alkalmazott hasító enzim tekintetében tértek el egymástól. A különböző vizsgálatok körülményeit a 4. és 5. táblázatban foglaltam össze.

IL-1 β C³⁹⁵T polimorfizmus meghatározása



7. ábra PCR-RFLP gélkép. Jól elkülöníthetők az eltérő alléleknek megfelelő csíkok.

A PCR mastermix összetétele: 20 mM TRIS– HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 2,0 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTP, 2 U Taq polimeráz (Invitrogen, UK), a kontroll primert 0,13 μ M, a többi primert 0,4 μ M koncentrációban adtuk az 50 μ l-es mastermixhez. A PCR reakciót 30 ng templát DNS hozzáadásával végeztük. A mastermix végtérfogata 60 μ l volt, melyből 10 μ l-t a Guthrie program lefuttatása után, a Taq polimeráz hozzámérésével adagoltunk az előkezelt mintákhoz.

A PCR alapú HLA-DQ tipizálás kifelbontú kit (HLA-DQ Low–bulk, GenoVision, Oslo, Norvégia) felhasználásával a gyári leírásnak megfelelően történt. A DNS amplifikálást PCR-express Hybrid Thermal Cycler segítségével rekombináns Taq DNS-polimerázzal (Invitrogen, California, USA) végeztük. A PCR terméket agaróz gél elektroforézissel azonosítottuk. A DNS csíkokat Alpha Imager MultiImage Light

Cabinet (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA 94577) segítségével detektáltuk.

4. táblázat

Vizsgált gén	TNFα ¹⁵³
Polimorfizmus	G⁻³⁰⁸A és G⁻²³⁸A
Alkalmazott primerek	5'-ATCTGGAGGAAGCGGTAGTG-3' 5'-AGAAGACCCCCCTCGGAACC-3' 5'-AATAGGTTTTGAGGGCCATG-3'
PCR körülmények	
Ciklusszám	35
Denaturáció	94°C-10 mp
Annealing	55°C-60 mp
Extenzió	72°C-30 mp,
Emésztés	<i>NcoI és MspI</i>
Vizsgált gén	IL-6 ¹¹⁶
Polimorfizmus	Promoter C⁻¹⁷⁴G
Alkalmazott primerek	5'-TTGTCAAGACATGCCAAGTGCT-3' 5'-GCCTCAGAGACATCTCCAGTCC-3'
PCR körülmények	
Ciklusszám	35
Denaturáció	94°C-30 mp
Annealing	62°C-45 mp
Extenzió	72°C-60 mp
Emésztés	<i>NlaIII</i>
Vizsgált gén	IL-1β ¹⁵⁴
Polimorfizmus	Exon 5 C³⁹⁵⁴T
Alkalmazott primerek	5'-TTCAGTTCATATGGACCAGA-3' 5'-GTTGTCATCAGACTTTGACC-3'
PCR körülmények	
Ciklusszám	30
Denaturáció	94°C-30 mp
Annealing	55°C-30 mp
Extenzió	72°C-30 mp
Emésztés	<i>TaqI</i>

5. táblázat

Vizsgált gén	HSP72¹⁵⁵
Polimorfizmus	A¹²⁶⁷G
Alkalmazott primerek	5'-ACCCTGGAGCCCGTGGAGAA-3' 5'-CACCCGCCCGCCCCGTAGG-3'
PCR körülmények	
Ciklusszám	40
Denaturáció	94°C-30 mp
Annealing	61°C-60 mp
Extenzió	72°C-60 mp
Emésztés	<i>PstI</i>
Vizsgált gén	CD-14¹⁵⁶
Polimorfizmus	C²⁶⁰T
Alkalmazott primerek	5'-ATCATCCTTTTCCCACACC-3' 5'-AACTCTTCGGCTGCCTCT-3'
PCR körülmények	
Ciklusszám	40
Denaturáció	94°C-30 mp
Annealing	58°C-60 mp
Extenzió	72°C-60 mp
Emésztés	<i>HaeIII</i>
Vizsgált gén	TLR-4¹⁵⁷
Polimorfizmus	A⁸⁹⁶G
Alkalmazott primerek	5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG-3' 5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3'
PCR körülmények	
Ciklusszám	38
Denaturáció	94°C-20 mp
Annealing	55°C-60 mp
Extenzió	72°C-60 mp
Emésztés	<i>NcoI</i>

3.3 Cöliákia diagnózisa

Szérum IgA endomizium-ellenes antitest (EMA) meghatározása indirekt immunfluoreszcens módszer segítségével történt. A fals negatív eredmények kizárására szérum IgA szintet is mértünk. Jejunális biopsziát két független (egymástól 3 hónapnyi távolságban levett) vérmintában észlelt EMA pozitivitás esetén végeztünk. A biopsziát a duodenojejunális átmenetben a Treitz szalagnál vettük Crosby kapszula segítségével¹⁴⁷. A cöliákia diagnózisát csak szövettani vizsgálattal kimutatott szubtotális illetve totális villózus atrófia esetén állítottuk fel.

3.4 Statisztikai elemzés

A normál eloszlású változókat átlag \pm S.D.-vel, nem normál eloszlású változókat pedig minimum-maximum vagy 25-75 percentilis értékkel és mediánnal jellemeztük. A testsúly, magasság, BMI eredményeit SDS (standard deviation score) értékekben adtuk meg.

A különböző csoportoknál vizsgáltuk a Hardy-Weinberg kritériumok fennállását. Kategórikus adatok összehasonlításánál χ^2 próbát illetve Fisher tesztet alkalmaztunk.

A polimorfizmusok és folyamatos változók közti kapcsolatot normál eloszlás esetén (pl.: HbA_{1C}, inzulin igény) kétmintás t-teszttel, illetve egyszempontos variancia analízissel (ANOVA); nem normál eloszlás esetén (diabétesz kezdetekor életkor, diabétesz tartama) pedig Mann-Whitney, illetve Kruskal-Wallis teszttel valamint Dunn próbával vizsgáltuk. Az IL-6 T1DM kezdetétere gyakorolt független hatásának kimutatására többszörös logisztikus regressziót alkalmaztunk

A statisztikai számításokat SPSS 11.5 illetve S.A.S. 8.2 szoftverrel végeztük el.

4. Eredmények

4.1 A TNF α G⁻³⁰⁸A, az IL-6 G⁻¹⁷⁴C és az IL-1 β C³⁹⁵⁴T polimorfizmusok és a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkor közti kapcsolat

A 6. táblázat tartalmazza a T1DM-ben szenvedő gyermekek TNF α , IL-6 és IL-1 β genotípusainak eloszlását, illetve a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkort. A Hardy-Weinberg kritériumoktól való szignifikáns eltérést az IL-1 β polimorfizmus esetében találtunk. Egyéb klinikai adatok (inzulin dózisa, a HbA_{1C} szint, a súly, magasság illetve BMI SDS, a szérum koleszterin-, illetve kreatininszint) nem mutattak összefüggést a fenti polimorfizmusokkal.

6. táblázat A TNF α G⁻³⁰⁸A, az IL-6 G⁻¹⁷⁴C és az IL-1 β C³⁹⁵⁴T polimorfizmusok genotípusainak megoszlása és a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkor³

TNFα G⁻³⁰⁸A	n (%)	Életkor medián év (25 és 75 percentil)
(-308)GG	89(54)	6 (4 és 10)
(-308)GA	69(42)	6 (3 és 9.5)
(-308) AA	7(4)	6 (5 és 11)
(-308)A allél gyakorisága	0.25	
p: nem szignifikáns		
IL-1β C³⁹⁵⁴T		
(3954)CC	73 (44)	7 (3 és 10)
(3954)CT	82(50)	5 (4 és 9,5)
(3954)TT	10 (6)	7 (3 és 10,2)
p: nem szignifikáns		
IL-6 G⁻¹⁷⁴C		
(-174)CC	28(17)	4,5 (2 és 7)
(-174)CG	72(44)	6 (4 és 10)
(-174)GG	65(39)	8 (4 és 10)
p<0,01 a (-174)CC és (-174)GG genotípusok között		

Az IL-6 különböző genotípusai esetén szignifikáns eltérés találtunk a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkor tekintetében. A pácienseket a 6 éves medián életkor alapján két csoportra osztottuk (7. táblázat): korai kezdetű T1DM (életkor <6 év) és késői kezdetű T1DM (életkor ≥ 6 év). Korai kezdetű T1DM szignifikánsan gyakrabban fordult elő az IL-6 (-174)CC genotípus esetén (OR 2,875 (1,214-6,182)).

7. táblázat IL-6 genotípus és T1DM kezdetekor fennálló életkor közti kapcsolat³

IL-6 genotípus	(-174)CC	(-174)CG	(-174)GG
betegszám (%)			
Korai kezdetű T1DM	19 (24,7)	35 (45,5)	23 (29,9)
Késői kezdetű T1DM	9 (10,2)	37 (42)	42 (47,7)
p: 0,014			

A felsorolt polimorfizmusok közti kölcsönhatást vizsgálva nemre adjusztált többszörös logisztikus regressziós analízissel szignifikáns interakciót találtunk a T1DM kezdete valamint IL-6 (-174) SNP és TNF α (-308) SNP illetve T1DM kezdete valamint IL-6 (-174) SNP és IL-1 β (3954) SNP (p=0,021 illetve p=0,006) között. Az összefüggést tovább elemeztük alcsoportokat képezve (8. táblázat).

8. táblázat az IL-6 (174)CC genotípus és a T1DM kezdete közti kapcsolat különböző TNF α és IL-1 β genotípusok esetén (többszörös regressziós analízis)³

Alcsoport	OR (95 %-os konfidencia intervallum)*	P
IL-1 β (3954)CC	1,994 (0,571-6,958)	0,279
IL-1 β (3954)TC vagy TT	5,230 (1,351-20,238)	0,017
TNF α (-308)GG	2,437 (0,647-9,186)	0,188
TNF α (-308)GA vagy AA	3,540 (1,100-13,341)	0,034
*OR: diabétesz kialakulásának esélye 6 éves kor előtt		

Az IL-6 (-174)CC genotípus a 6 éves kor alatt kialakuló T1DM-el csak akkor mutatott összefüggést, amennyiben a páciens hordozta a magasabb fehérjeprodukciónal járó TNF α (-308)A illetve IL-1 β (3954)T allélt.

4.2 HSPA1B (HSP72) A¹²⁶⁷G és a TNF α G⁻³⁰⁸A polimorfizmus és T1DM kialakulása közti összefüggés vizsgálata

Hardy-Weinberg kritériumok a TNF α G(-308)A polimorfizmus esetén a vizsgált és a kontroll populációban is, míg HSPA1B A(1267)G polimorfizmusnál csak a kontroll csoportban teljesültek. A genotípusok megoszlását a 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat A TNF α és HSPA1B genotípusok megoszlása a T1DM-ben szenvedő gyermekekben és az egészséges kontroll populációban

TNFα	(-308)GG	(-308)GA	(-308)AA	(-308)A	p
	n (%)	n (%)	n (%)	allélfrekvencia	
T1DM	195 (52)	163 (44)	14(4)	0,26	<0,001
kontroll	332(71)	125(27)	10(2)	0,15	
HSPA1B	(1267)AA	(1267)AG	(1267)GG	(1267)G	p
	n (%)	n (%)	n (%)	allélfrekvencia	
T1DM	63 (17)	227(61)	82(22)	0,52	<0,001
kontroll	183 (39)	197(42)	87(19)	0,39	

A TNF α (-308)A illetve HSPA1B (1267)G allél hordozása a T1DM kialakulására nézve fokozott kockázatot jelent (OR: 2.23 (1,67-2,96) illetve 3,16 (2,27-4,39)). Haplotípus analízist végezve a két allél együttes előfordulása (10. táblázat) esetén a T1DM kialakulásának kockázata a TNF α (-308)A illetve HSPA1B (1267)G allélt nem hordozó kontrollcsoporthoz képest 2,38-szor magasabb volt (OR: 2,38 (1,78-3,20)).

10. táblázat TNF α G(-308)A és HSPA1B A(1267)G haplotípusok T1DM esetén és egészséges kontroll populációban

Genotípus	T1DM n (%)	Egészséges kontroll n (%)	P
TNF α (-308)AA és HSPA1B(1267)GG genotípus együtt	11 (3)	6(1)	
TNF α (-308)A és HSPA1B(1267)G együtt jelen van	152(41)	109(23)	<0,001
TNF α (-308)A és HSPA1B(1267)G nincs együtt jelen	209(56)	352(76)	

4.3 A TNF α G⁻³⁰⁸A illetve TNF α G⁻²³⁸A polimorfizmus és cöliákia előfordulásának kockázata T1DM-ben szenvedő gyermekeknél

A 11. táblázat mutatja a TNF α genotípusok megoszlását cöliákiában szenvedő illetve nem szenvedő diabéteszes gyermekeknél.

11. táblázat A TNF genotípusok megoszlása²

	EMA negatív esetek	EMA pozitív esetek	
	N=277 (100%)	Cöliákia N=19 (100%)	Normál biopszia N=5
TNFα G(-308)A polimorfizmus			
-308GG	148 (53,4)	8 (42,1)	3
-308GA	118 (42,6)	9 (47,4)	2
-308AA	11 (4)	2 (10,5)	0
TNFα G(-238)A polimorfizmus			
-238GG	260 (93,9)	15 (79)	5
-238GA*	16 (5,7)	4 (21)	0
-238AA*	1 (0,4)	0	0
*Az ⁻²³⁸ A allél a cöliákiás csoportban szignifikánsan gyakrabban fordult elő (p=0,036)			

A TNF α (-308)A allél nem mutatott szignifikáns különbséget a cöliákiás és nem cöliákiás csoportban (OR: 1,57 (0,61-404), p=0,32), de magasabb volt az egészséges egyénekben mért magyar referencia értéknél (0,34 és 0,25 a 0,14-hez képest, p<0,05 illetve p<0,001)¹⁵⁸. A TNF α (-308)A allél hordozása a T1DM kialakulásának kockázatát 2,42-szeresre emelte (konfidencia intervallum 1,68-3,48) az allélt nem hordozó egyénekhez képest. A TNF α (-238)AG genotípus illetve a (-238)A allél a cöliákiás csoportban gyakrabban fordult elő. A TNF α (-238)A allél hordozása a cöliákia kialakulásának kockázatát a T1DM betegeknél 4,07-szeresre emelte (konfidencia intervallum 1,22-13,63, p<0,05) az allélt nem hordozó egyénekhez képest. A teljes diabéteszes populációt (cöliákiás és nem cöliákiás gyermekek) tekintve a TNF α (-238)A allél hordozása nem mutatott szignifikáns különbséget az egészséges egyéneknél mért magyar referencia értékhez képest (0,11 és 0,03 a 0,046-al szemben)¹⁵⁸. Sem a (-308)A allél, sem a (-238)A allél nem mutatott összefüggést a cöliákia diagnosztizálásakor fennálló életkorral. Egyik polimorfizmus esetén sem találtunk nemi különbséget.

4.4 A CD14 C⁻²⁶⁰T, TLR-4 A⁸⁹⁶G SNP-k és HLA-DQ genotípusok előfordulásának gyakorisága T1DM-ben, cöliákiában illetve mindkettőben szenvedő betegeknél

A CD14 C(-260)T genotípusok megoszlását a 12. táblázat tartalmazza.

12. táblázat A CD14 C(-260)T genotípusok megoszlása cöliákiában, T1DM-ben illetve mindkettőben szenvedő gyermekeknél (%)¹

CD14 C(-260)T	T1DM*	Cöliákia	Mindkettő	Kontroll
CC	36,3	19	26	17,8
CT	43,7	54	48	54,8
TT	20	27	26	27,4
p=0,0081 a kontrollhoz képest				

A két mutáns allélt (TT) hordozó genotípus a kontrollcsoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabb arányban fordult elő a T1DM-ben szenvedő betegeknél, de a CD14 (-260)T allél gyakorisága önmagában nem mutatott szignifikáns különbséget (41,9 a T1DM

csoportban, 54 % a cöliákiás csoportban, 50 % a cöliákia+T1DM csoportban és 54,8 % a kontroll csoportban). A TLR4 A(+896)G polimorfizmus genotípusainak megoszlásában nem találtunk szignifikáns eltérést (13. táblázat). A mutáns G allél előfordulása 2,9 % (T1DM), 4 % (cöliákia) , 4 % (cöliákia és T1DM együtt) és 6 % (kontroll) volt.

13. táblázat A TLR4 A(+896)G genotípusok megoszlása cöliákiában, T1DM-ben illetve mindkettőben szenvedő gyermekeknél (%)¹

TLR4 A(+896)G	T1DM	Cöliákia	Mindkettő	Kontroll
AA	94,3	92	91,9	87
AG	5,7	8	8,1	13
GG	0	0	0	0

A 14. a és b táblázat tartalmazza a HLA-DQ genotípusok megoszlását a vizsgált csoportokban és a kontroll populációban. A homozigóta HLA-DQ8 genotípus szignifikánsan gyakrabban fordult elő T1DM-ben szenvedő betegeknek a cöliákiás páciensekhez képest. A homozigóta illetve heterozigóta HLA-DQ2 (DQ8 nélkül) genotípus kontroll csoport és T1DM esetén hasonló gyakorisággal található meg. Cöliákiás betegeknek a homozigóta és heterozigóta HLA-DQ2 (DQ8-) genotípus a T1DM-ben szenvedő betegekhez illetve kontroll csoporthoz képest szignifikánsan gyakrabban fordul elő, a HLA-DQ8 (DQ2-) genotípus esetén nem volt kimutatható különbség. A T1DM és a T1DM+cöliákia csoportban a HLA DQ2/8 heterozigóta genotípus szignifikánsan gyakoribb a cöliákiás betegcsoporthoz illetve kontroll csoporthoz képest.

14a táblázat. HLA-DQ genotípusok megoszlása T1DM-ben, cöliákiában illetve mindkettőben szenvedő gyermekeknél és a kontroll csoportban¹

DQ genotípus	T1DM n (%)	Cöliákia n (%)	Mindkettő n (%)	Kontroll n (%)
DQ2/X (DQ8-)	20 (25)	61 (61)	10(21,3)	452(21,7)
DQ2*/DQ2	3(3,8)	25(25)	12(25,5)	85(4,1)
DQ8/X(DQ2-)	10(12,5)	4(4)	3(6,4)	173(8,3)
DQ8/DQ8	2(2,5)	0(0)	0(0)	0(0)
DQ2/DQ8	29(36,3)	10(10)	20(42,6)	28(1,4)
DQX/X (DQ2-, DQ8-)	16(20)	0(0)	2(4,2)	1342(64,5)
*DQ2: HLA-DQB1*0201 vagy *0202 a HLA-DQA1*05-el együtt				

14b táblázat A csoportok statisztikai összehasonlítása (p érték)

	T1DM	Cöliákia	Mindkettő	Kontroll
T1DM	-			
Cöliákia	<0,0001	-		
Mindkettő	0.0014	<0,0001	-	
Kontroll	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-

5. Megbeszélés

5.1 A TNF α G⁻³⁰⁸A, az IL-6 G⁻¹⁷⁴C és az IL-1 β C³⁹⁵⁴T polimorfizmusok és a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkor közti kapcsolat

Vizsgálataink alapján csak az IL-6 G⁻¹⁷⁴C polimorfizmus mutatott összefüggést a T1DM kialakulásakor fennálló életkorral. Az IL-6 (-174)CC genotípus esetén az átlagéletkor alacsonyabb volt az IL-6 (-174)G allélt hordozó gyermekekhez képest. Az IL-6 (-174)CC genotípus és a T1DM diagnosztizálásakor fennálló fiatalabb életkor közti összefüggés csak magasabb citokin produkcióval járó IL-1 β (3954)T allél vagy TNF α (-308)A allél egyidejű hordozásakor mutatható ki.

IL-6 egy pleiotrop citokin, melyet számos sejttípus termel. Szerepet játszik a gyulladásos folyamatok szabályozásában. A T1DM kialakulásáért felelős autoimmun gyulladásos folyamatokban elsősorban β -sejt protektív szereppel bír^{113,159}. Az újonnan felfedezett T1DM-s betegek vérében kimutatott magasabb IL-6 szint¹⁶⁰ nem zárja ki a T1DM patogenezisében betöltött β -sejt protektív hatását, hisz a β -sejtek csaknem teljes pusztulásakor mért magas szérumszintért a hiperglikémia is felelős lehet¹⁶¹.

A TNF α és IL-1 β szintén fokozott IL-6 produkciót indukálhat^{162,163}. Lo és munkatársai¹⁶⁴ pozitív korrelációt találtak a TNF α és IL-6 szérumszintjei között T1DM-ben szenvedő gyermekekben. Magasabb TNF α és IL-6 szintet találtak az újonnan diagnosztizált T1DM esetén is a régóta diabéteszes gyermekekhez illetve a kontrollcsoporthoz képest⁸². Ezeket a magas IL-6 szérumszinteket a diagnózis felállítását követően mérték, míg az autoimmun folyamat kezdetekor fennálló szérumszintekről nincs adatunk. Valószínű, hogy a magas szérumszint és a lokális (hasnyálmirigy szigetekben mért) IL-6 koncentráció sem mutat szoros összefüggést.

Az IL-6 G(-174)C polimorfizmus és a T1DM közti kapcsolatról ellentmondó vélemények születtek Jahromi és társai által 2000-ben készített tanulmány a kaukázusi csoportokhoz tartozó T1DM betegeknél a kontroll csoportokhoz képest gyakrabban talált IL-6 (-174)GG genotípust¹⁶⁵. Ezzel szemben Kristiansen és társai munkájában¹⁶⁶ 253 T1DM-es dán családnál az IL-6 (-174)C allél mutatott összefüggést a cukorbetegséggel, de csak nők esetén. Ugyanebben a tanulmányban az IL-6 (-174)CC genotípus összefüggött a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkorral, azonban csak nők esetén.

Ez az eredmény egybevág Gillespie és társai munkájával¹⁶⁷. Mindkét vizsgálatban a T1DM kialakulásakor mért átlagéletkor több, mint 10 év volt, így a nemi különbséget az ösztrogén IL-6 produkcióra gyakorolt hatásával magyarázták. Ösztrogén fontos szerepet játszik a női pubertás létrejöttében, melynek kezdete a 9. életévet követő időszakra tehető. Vizsgálatunkban a diabétesz kezdetekor mért átlagéletkor 6 év volt, így ösztrogén indukálta különbségeket az általunk tanulmányozott populációban nem várhattunk.

Az IL-6 (-174)G allél csak a magasabb citokin produkcióval járó IL-1 β és TNF α genotípusok esetén mutatott összefüggést az idősebb korban kezdődő T1DM-val. IL-1 β és TNF α is proinflammatorikus citokin, mindkettő fontos szerepet játszik a T1DM patogenezisében, stimulálják az IL-6 produkciót is⁷⁹. IL-6 (-174)G allél hordozó páciensek esetén a magas citokinprodukcióval járó IL-1 β és TNF α genotípusok fokozzák az IL-6 termelést. A nagyobb mennyiségben elválasztott IL-6 β -sejt protektív hatása fokozottabban érvényesülhet. Hipotézisünket támasztja alá egy NOD egerekben végzett vizsgálat, melyben a lokális humán IL-6 produkció késleltette a T1DM kialakulását¹¹³. IL-6 β -sejt protektív hatását (gyulladásos citokinek indukálta sejtkárosodás illetve sejthalál gátlása) in vivo és in vitro is kimutatták¹⁶⁸.

A TNF α G⁻³⁰⁸A és az IL-1 β C³⁹⁵⁴T polimorfizmusok nem mutattak összefüggést a T1DM kialakulásakor fennálló életkorral, de korábbi tanulmányoknak megfelelően T1DM esetén a magasabb citokinprodukcióval járó TNF α és IL-1 β genotípus az egészséges egyéneknél mért magyar referenciaértékhez képest gyakrabban fordul elő^{169,170}.

5.2 HSPA1B (HSP72) A¹²⁶⁷G és a TNF α G⁻³⁰⁸A polimorfizmus és T1DM kialakulása közti összefüggés vizsgálata

Munkánkban elsőként vizsgáltuk a HSPA1B A(1267)G polimorfizmus jelentőségét nagyobb T1DM beteganyagban. Eredményeink alapján a (1267)G allél hordozása összefügg a T1DM kockázatával. Feltételezzük, hogy a (1267)G allélt hordozó gyermekek stresszre kisebb mértékű HSP72 produkcióval válaszolnak, így védtelesebbek a β -sejtet károsító autoimmun folyamatokkal szemben is, mely magyarázhatja a polimorfizmus és T1DM kialakulása közti kapcsolatot. Burkart és

társai 2008-ban megjelent tanulmánya T1DM diagnózisakor a vér mononukleáris sejtjeiben jelentősen csökkent HSP70 elválasztást talált, mely igazolhatja a β -sejt pusztulás és alacsony HSP szint közti összefüggést¹²¹.

Vizsgálatunkban ismételten megerősítettük a TNF α (-308)A allél hordozása és T1DM kialakulása közti kapcsolatot^{89,90,91}. A TNF α egy proinflammatorikus citokin, mely a (-308)A allélt hordozó egyénekben nagyobb mennyiségben termelődik, így a β -sejtek destrukciójához vezető inzulitisz kialakulásában és fenntartásában is szerepet játszhat. Több tanulmány leírta a TNF α ⁻³⁰⁸A allél gyakoribb előfordulását T1DM-ben szenvedő betegeknél azonban ezt az összefüggést elsősorban az allél HLA-DR3-val való kapcsolt öröklődésének tulajdonították. Marokkói T1DM populációban azonban a TNF α G⁻³⁰⁸A polimorfizmus és a betegség közötti kapcsolatot az MHC II osztályú génektől függetlennek találták¹⁷¹.

Munkánkban a magasabb citokin produkcióval járó TNF α (-308)AA és AG genotípusok és alacsonyabb fehérjeprodukcióval járó HSPA1B (1267)AG és GG genotípusok együttes előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt diabéteszes betegeknél a kontroll csoporthoz képest.

T1DM és egyes HLA haplotípusok közti összefüggés régóta ismert, de a pontos mechanizmus máig sem tisztázott. Korábbi vizsgálatok erős kapcsoltságot (linkage disequilibrium – LD) igazoltak az MHC régióban található egyes gének (HLA-DQ2-DR3, TNF α , HSPA1B) között^{172,173}, melyet 8.1 ősi (ancestral) haplotípusnak (AH) neveztek el. A haplotípus T1DM-ra és más autoimmun betegségekre is hajlamosító géneket tartalmaz. Vizsgálatunk eredményei alapján a haplotípussal összefüggő genetikai kockázat funkcionális hátterét - legalább részben – a TNF α (-308)A és HSPA1B (1267)G allélek okozta megváltozott fehérje produkcióval magyarázhatjuk.

5.3 A TNF α G⁻³⁰⁸A illetve TNF α G⁻²³⁸A polimorfizmus és cöliákia előfordulásának kockázata T1DM-ben szenvedő gyermekeknél

A vizsgálatunkba bevont T1DM gyermekek 6,3%-nál igazoltunk cöliakiát, ez az arány Holmes metanalízisében szereplő európai adatokhoz képest magasabbnak bizonyult¹⁴⁵. A TNF α (-308)A allél a cöliákia+T1DM csoportban gyakrabban fordult elő, mint a tisztán T1DM csoportban, a különbség azonban nem bizonyult szignifikánsnak. A (-

308)A allél hordozók aránya a korábbi adatoknak megfelelően a diabéteszes gyermekeknél magasabb volt, mint a magyar referencia érték. Bár egyes tanulmányok a TNF α (-308)A allél hordozását (diabétesztől függetlenül) magasabbnak találták cöliákiában szenvedő gyermekeknél¹⁷⁴ is, eredményeink alapján nem igazolódott az allél hordozása és a cöliákia kialakulásának kockázata közti kapcsolat.

Vizsgálatunkban a TNF α (-238)A allél szignifikánsan gyakrabban fordult elő cöliákiában is szenvedő gyermekeknél a tisztán T1DM csoporthoz képest. A G(-238)A polimorfizmus funkcionális jelentősége nem ismert, bár irodalmi adatok alapján egyes autoimmun és fertőző betegségek¹⁷⁵ progresszióját befolyásolhatja.

5.4 A CD14 C⁻²⁶⁰T, TLR-4 A⁸⁹⁶G SNP-k és HLA-DQ genotípusok előfordulásának gyakorisága T1DM-ben, cöliákiában illetve mindkettőben szenvedő betegeknél

Hipotézisünkben a CD14^{-/-} NOD egerekben megfigyelt alacsonyabb diabétesz fekvencia alapján a magasabb CD14 produkcióval járó (-260)TT genotípus gyakoribb előfordulását vártuk T1DM egyéneknél. Meglepetésünkre a CD14 (-260)TT genotípus előfordulása alacsonyabbnak adódott a diabéteszes csoportban a CD csoporthoz illetve kontroll csoporthoz képest, bár a mutáns T allél megoszlása önmagában nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget.

Ezt a váratlan eredményt a CD14 molekula apoptózis regulációjában betöltött szerepével magyarázhatjuk. A CD14 nem csak bakteriális komponensek immunreceptora, de az apoptotikus sejtek számos komponensével kapcsolatba lép (például ICAM-3 apoptotikus leukocitákon)^{176,177,178}. CD14 főként olyan fagociták felszínén aktiválódik, melyek az apoptotikus sejt eredetű antigéneket tolerogén módon prezentálják a T sejtek felé, így a potenciálisan autoreaktív T sejtek inaktivációját illetve delécióját váltják ki^{179,180}. A leírt mechanizmus alapján várható, hogy csökkent CD14 expresszió a tolerancia elvesztéséhez és a T1DM kialakulásáért felelős autoimmun folyamat beindulásához vezet. További magyarázatként szolgál a TT genotípusnál megfigyelt alacsony sCD14 szint. A sCD14 képes autoimmun T sejtekhez kapcsolódni és ezen sejteket inaktiválni¹⁸¹. Ez a folyamat alacsony sCD14 koncentráció esetén elégtelenné válhat.

T1DM-ben és cöliákiában egyszerre szenvedő gyermekeknél a CD14 (-260)TT genotípus gyakorisága nem csökkent a T1DM csoporthoz képest, így a T allél hordozása T1DM betegeknél a cöliákia kialakulása szempontjából fokozott kockázattal járhat. A receptor normál szintje a diabéteszes betegeket a cöliákia kialakulására fogékonyabbá teszi, hisz a CD14 molekula jelenléte fontos szerepet játszik a mukóza gyulladós folyamataiban¹⁸².

Mind a cöliákia mind a T1DM összefüggést mutat a HLA-DQ2 és HLA-DQ8 genotípusokkal. Eredményeink megerősítik a HLA-DQ2 genotípus és cöliákia közti szoros kapcsolatot. Vizsgálatunk is igazolta, hogy T1DM esetén magyar populációban a HLA-DQ8 hordozása erősebb genetikai hajlamot jelent, mint a DQ2 genotípus, de a legnagyobb kockázatot a DQ8/DQ2 heterozigótáság jelenti.

Sumnik¹⁵¹ és munkatársai T1DM betegeknél egyértelműen demonstrálták a cöliákia kialakulásának magasabb kockázatát HLA-DQB1*02-DQA1*05 haplotípus hordozásakor. Először Saukonen¹⁸³ és társai munkája igazolta a DQB1*02 magasabb arányát cöliákiás és egyidejűleg diabéteszes gyermekeknél. Egy későbbi tanulmányban a HLA-DQB1*02-DQA1*05 haplotípus T1DM esetén a cöliákia kialakulásának kockázatát a négyszeresére emelte¹⁸⁴. Ez az összefüggés feltehetően populáció specifikus. Olasz diabéteszes pácienseknél a HLA-DQB1*02-DQA1*05 haplotípus gyakorisága a CD+T1DM csoportban 68%, míg a diabéteszes egyéneknél 62 % volt. Az olasz diabéteszes pácienseknél a magyar populációhoz képest nagyobb arányban mutatható ki a HLA-DQB1*02-DQA1*05 haplotípus, ez magyarázhatja a CD+T1DM és T1DM csoportok között hiányzó különbséget¹⁸⁵.

Doolan és társai tanulmányában a HLA-DQB1*02-DQA1*05 haplotípus a T1DM+cöliákia csoportban 77%, míg T1DM esetén 59 % volt. Az eltérés nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak, melyért a CD+T1DM esetek alacsony száma is felelős lehetett¹⁸⁶.

Bao nagyobb esetszámú vizsgálata diabéteszes betegeknél a szöveti transzglutamináz ellenes antitest pozitivitásra fókuszált, mely a DQ2 homozigóta egyéneknél fordult elő leggyakrabban¹⁸⁷.

6. Következtetések

1. A TNF α G⁻³⁰⁸A polimorfizmusa nem mutatott összefüggést a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkorral. T1DM esetén a magasabb citokinprodukciónal járó TNF α (-308)A allél hordozása az egészséges egyéneknél mért magyar referenciaértékhez képest gyakrabban fordult elő.
2. Az IL-1 β C³⁹⁵⁴T polimorfizmusa nem mutatott összefüggést a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkorral. T1DM esetén a magasabb citokinprodukciónal IL-1 β (3954)T allél hordozása az egészséges egyéneknél mért magyar referenciaértékhez képest gyakrabban fordul elő.
3. Az IL-6 G⁻¹⁷⁴C polimorfizmusa összefüggött a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkorral. Az IL-6 (-174)CC genotípus esetén az átlagéletkor alacsonyabb volt az IL-6 (-174)G allélt hordozó gyermekekhez képest.
4. Az IL-6 (-174)CC genotípus és a T1DM diagnosztizálásakor fennálló fiatalabb életkor közti összefüggés csak magasabb citokin produkcióval járó IL-1 β (3954)T allél vagy TNF α (-308)A allél egyidejű hordozásakor mutatható ki.
5. HSPA1B (HSP72) A¹²⁶⁷G polimorfizmus összefüggést mutatott a T1DM kialakulásával. HSPA1B (1267)G allél hordozása a T1DM kialakulására nézve fokozott kockázatot jelent (OR: 3,16 (2,27-4,39)).
6. A TNF α (-308)A illetve HSPA1B (1267)G allél együttes hordozása esetén a T1DM kialakulásának kockázata a TNF α (-308)A illetve HSPA1B (1267)G allélt nem hordozó kontrollcsoportéhoz képest 2,38-szor magasabb volt (OR: 2,38 (1,78-3,20)).
7. A TNF α G⁻³⁰⁸A polimorfizmus nem mutatott összefüggést a cöliákia előfordulásával T1DM-ben szenvedő gyermekeknél. A TNF α (-238)A allél hordozása a cöliákia kialakulásának kockázatát a T1DM-ben szenvedő betegeknél 4,07-szeresre emelte (konfidencia intervallum 1,22-13,63, p=0,05) az allélt nem hordozó egyénekhez képest.
8. A TLR-4 A⁸⁹⁶G SNP nem mutatott összefüggést sem a T1DM, sem a cöliákia kialakulásának kockázatával. A CD14 (-260)TT genotípus a kontrollcsoportéhoz képest szignifikánsan alacsonyabb arányban fordult elő csak T1DM-ben szenvedő betegeknél, a különbség egyidejűleg fennálló T1DM és cöliákia esetén azonban már nem mutatható ki.

9. A homozigóta HLA-DQ8 genotípus szignifikánsan gyakrabban fordult elő T1DM-ben szenvedő betegeknél a cöliákiás páciensekhez képest. Cöliákiás betegeknél a homozigóta és heterozigóta HLA-DQ2 (DQ8-) genotípus a T1DM-ben szenvedő betegekhez illetve kontroll csoporthoz képest szignifikánsan gyakrabban fordul elő. A T1DM és a T1DM+cöliákia csoportban a HLA DQ2/8 heterozigóta genotípus szignifikánsan gyakoribb a cöliákiás betegcsoporthoz illetve kontroll csoporthoz képest.

A T1DM az inzulint elválasztó β -sejtek autoimmun pusztulása következtében fellépő kór állapot. Genetikailag egy komplex betegségről beszélhetünk, melynek kialakulásáért több gén és környezeti faktorok együttes jelenléte a felelős. A ritka, monogénes öröklődésű formáktól eltekintve a családvizsgálatok – a klasszikus mendeli törvényektől eltérően – poligénes öröklésmentet igazoltak. A HLA-hoz tartozó gének és ezek kombinációi (különböző nagyságú kockázatot jelentő illetve protektív haplotípusok) a genetikai hajlam 50-70 %-ért felelősek. A fennmaradó részért számos, eddig pontosan fel nem térképezett gén a felelős, melyek egyesével csak kis szerepet játszanak a fogékonyság kialakulásában. Újabb, T1DM-re hajlamosító gének azonosítása azonban hozzájárulhat a betegség patomechanizmusának részletesebb megismeréséhez, elősegítheti egy adott egyén genetikai kockázatának pontosabb meghatározását, egyénre szabott prevenció és terápia bevezetését.

Egy-egy fehérje, citokin a gyulladásos illetve autoimmun folyamatokban az egyidejűleg jelenlévő többi citokintól függően különböző szerepeket játszhat, egyszer károsító, máskor protektív funkcióval rendelkezhet. Ennek megfelelően a fehérjéket kódoló génszakaszok polimorfizmusainak vizsgálatokor egyes SNP-k szerepén túl célszerű ezek kombinációinak hatását is elemzeni. Munkánkban ismételtén igazoltuk a TNF α G³⁰⁸A és IL-1 β C³⁹⁵⁴T polimorfizmusok és T1DM illetve az IL-6 G⁻¹⁷⁴C SNP és a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkor közti összefüggést. A citokinek egymásra gyakorolt hatása TNF α , IL-1 β és IL-6 esetén is igazolódott, hisz az IL-6 (-174)CC genotípus csak magasabb citokin produkcióval járó IL-1 β (3954)T allél vagy TNF α (-308)A allél egyidejű hordozásakor hajlamosított a T1DM korai kialakulására. A HSPA1B (HSP72) A¹²⁶⁷G polimorfizmus is összefüggést mutatott a T1DM kialakulásával, melyet a TNF α

(-308)A allél hordozása befolyásolt. A T1DM kialakulásában a TNF α elsősorban hajlamosító, míg a HSPA1B protektív szereppel bír, így a magasabb citokinprodukciónal járó TNF α (-308)A allél és alacsonyabb fehérjeszintézissel járó HSPA1B (1267)G allél együttes hordozása egymást erősítve az autoimmun sejtdestrukción kialakulását segítheti elő.

A T1DM gyakran társul más autoimmun betegséggel, mely közös genetikai hajlam jelenlétére utal. Cöliákia a normál populációhoz képest nagyobb számban fordul elő T1DM gyermekek esetén. Közös genetikai hajlam egy részéért itt is a HLA a felelős. Cöliákiában a betegek 95 %-a hordozza a HLA-DQ2 haplotípust, diabétesben a fogékonyságot a DQ2 vagy DQ8 allél hordozása illetve DQ2/DQ8 heterozigótáság jelenti. Munkánkban cöliákiás betegeknél a homozigóta és heterozigóta HLA-DQ2 (DQ8-) genotípus a T1DM-ben szenvedő betegekhez illetve kontroll csoporthoz képest szignifikánsan gyakrabban fordul elő, míg a homozigóta HLA-DQ8 genotípus a T1DM-ben szenvedő betegeknél a cöliákiás páciensekhez képest szignifikánsan nagyobb számban volt kimutatható. Amennyiben a két betegség egymással társult, úgy a HLA DQ2/8 heterozigóta genotípus jelentősége nő meg.

A T1DM és a cöliákia patomechanizmusában is fontos szerepet játszanak a gyulladáson illetve autoimmun folyamatok, így a két betegség együttes előfordulásához a gyulladásban részt vevő citokinek és fehérjék génjein található SNP-k is hozzájárulhatnak. A TNF α G⁻³⁰⁸A polimorfizmus nem mutatott összefüggést a cöliákia előfordulásával T1DM-ben szenvedő gyermekeknél, míg a TNF α (-238)A allél hordozása a cöliákia kialakulásának kockázatát a T1DM-ben szenvedő betegeknél négyszeresére emelte az allélt nem hordozó egyénekhez képest. Ez utóbbi összefüggés funkcionális jelentősége még nem ismert.

A TLR-4 A⁸⁹⁶G SNP nem mutatott összefüggést sem a T1DM, sem a cöliákia kialakulásának kockázatával. Míg a receptorral komplexet alkotó CD14 esetén a magasabb fehérjeprodukciónal járó (-260)TT genotípus a csak T1DM-ben szenvedő betegeknél alacsonyabbnak bizonyult. A CD14 molekula a diabétesz kialakulásában protektív szereppel bírhat, hiánya a fogékonyságot növelheti. A teljes genetikai hajlamot tekintve azonban csak kismértékű hatással rendelkeznek, hisz cöliákia és T1DM együttes előfordulásakor az összefüggés eltűnik.

Cöliákia patogenezisében a CD14 molekula fontos szereppel bír, normál produkciója és az ehhez társuló CD14 (-260)T allél hordozása a diabéteszesben szenvedő betegeknél a CD kialakulásának esélyét növeli.

Terveink közt szerepel további citokinek poliorfizmusainak vizsgálata, kiemelve az egyes SNP-k egymásra gyakorolt hatásainak és a HLA haplotípusokkal való összefüggéseinek elemzését.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Tulassay Tivadar Professor Úrnak, Madácsy László Professor Úrnak és dr. Vásárhelyi Barnának, hogy egyéni fokozatszerzőként és alapvetően más klinikai szakterületen dolgozó orvosként befogadtak az 1. sz. Gyermekgyógyászati Klinikán létrehozott szellemi műhelybe, mely lehetővé tette a fokozatszerzéshez szükséges tudományos munka elvégzését.

Szeretnék köszönetet mondani Füst György Professor Úrnak, aki az adatok statisztikai elemzésében segített, illetve Dr Körner Annának és Dr Dezsőfi Antalnak akik a diabéteszes és cöliakiás gyermekek klinikai adatainak összegyűjtésében és értékelésében nyújtottak segítséget.

Köszönetemet szeretném kifejezni a diabétesz osztály és ambulancia dolgozóinak, elsősorban Négrádi Évának, Zeher Zsuzsannának és Szilvágyi Mártának, akik a munkámhoz szükséges klinikai adatokhoz való hozzáférést biztosították.

Köszönettel tartozom a klinika laboratóriumban dolgozó munkatársaknak és Ph.D. hallgatóknak: Bernáth Máriának, Dr Fekete Andreának, Dr Szebeni Beának és Dr Vannay Ádámnak az általuk nyújtott technikai segítségért.

A PCR módszerrel kapcsolatos kérdéseimben segített Dr Szalai Csaba és Kovács Margit, akiknek ezúton szeretnék köszönetet mondani.

8. Saját publikációk jegyzéke

8.1 A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Cikkek

1. Dezsőfi A, Szebeni B, **Hermann C**, Kapitány A, Veres G, Sipka S, Körner A, Madácsy L, Korponay-Szabó I, Rajczy K, Arató A. Frequencies of genetic polymorphisms of TLR4 and CD14 and of HLA DQ genotypes in children affected by coeliac disease, type I diabetes or both. JPGN - közlésre elfogadva
2. **Hermann C**, Krikovszky D, Vásárhelyi B, Dezsőfi A, Madácsy L. (2007) Polymorphisms of the TNF- α gene and risk of celiac disease in T1DM children. Pediatric Diabetes, 8: 138–141 **IF: 2.162**
3. **Cs Hermann**, D Krikovszky, G Füst, M Kovács, A Körner, A Szabó, Á Vannay, L Madácsy.(2005) Association between IL-6 polymorphism and the age-at-onset of type 1 diabetes. Epistatic influences of the TNF α and interleukin-1 β polymorphisms. Eur Cytokine Netw,16: 277-81 **IF: 1.073**

Poszterek/Absztraktok

4. Krikovszky D, **Hermann C**, Fust G et al.(2006) Association between IL-6 polymorphism and the age at the onset of type 1 diabetes. Epistatic influences of the TNF alpha and IL-1 beta polymorphisms. (poszter) American Diabetes Association, Annual Meeting, Washington. (absztrakt: Diabetes, 55(1) A252)
5. **Hermann Cs**, Krikovszky D, Erdei G, Fekete A, Füst G, Prohaszka Z, Kovács M, Madácsy L. (2005) Association between HSPA1B A(1267)G polymorphism and type 1 diabetes mellitus. (poszter) The European Association for the Study of Diabetes 41th Annual Meeting, Athen (absztrakt: Diabetologia 48, Suppl 1. A-111)
6. Krikovszky D, **Hermann Cs**, Erdei G, Fekete A, Füst Gy, Prohaszka Z, Madácsy L. (2006) HSPA1B A(1267)G polimorfizmus vizsgálata 1-es típusú cukorbeteg gyermekekben. Magyar Diabétesz Társaság XVIII. Kongresszusa, Tihany

8.2 A disszertációtól független közlemények

Cikkek

7. Krikovszky Dóra, **Hermann Csaba**, Török Dóra, Perjés Zsófia, Brandt Ferenc, Emri Enikő, Kis Éva, Machay Tamás. (2007) Congenitalis centrális hipovenilációs szindróma esete. *Medicina Thoracalis*, 60(2): 78-81.

8. Sipos, P., Szabó, Sz., Ondrejka, P., **Hermann, Cs.**, Elek, G., Sugár, I. (2004) Subtotalis colectomia epekő-ileus műtétje során. *Magyar Sebészet*, 57(5): 293-296

9. **Hermann Cs**, Diószeghy Cs, Péntes I. (2003) Nem szívűtétre kerülő ischaemiás szűbetegek perioperatív ellátása. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia*, 33(2): 16-32

10. Janecskó M., Darvas K., **Hermann Cs.** (1998) Az ambuláns egynapos sebészeti anesztázia perioperatív kérdései. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* 29, (Suppl. III): 8-11

11. Janecskó M., Pásztor M., **Hermann Cs.** (1997) Kombinált anesztázia bevezetés ambuláns nőgyógyászati beavatkozásoknál és hasi műtétéknél. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia*, 28 (Suppl. II): 12-20

Könyvfejezetek

12. Péntes I, Lorx A, **Hermann Cs**: Légzés és tűdű. In: Péntes I, Lencz L (szerk.): *Az aneszteziológia és intenzív terápia tankönyve*. Alliter, Budapest, 2003: 345-403

13. Péntes I, **Hermann Cs**: Endokrin elégtelenségek heveny jelentkezése. Endogén mérgezések In: Péntes I, Lencz L (szerk.): *Az aneszteziológia és intenzív terápia tankönyve*. Alliter, Budapest, 2003: 442-455

14. **Hermann Cs**: Katecholaminok és vazoaktív terápia. In: Péntes I, Lencz L (szerk.): *Az aneszteziológia és intenzív terápia tankönyve*. Alliter, Budapest, 2003: 577-582

15. **Hermann Cs**: Gázcsere. In: Péntes I, Lorx A (szerk.): *A lélegeztetés elmélete és gyakorlata*. Medicina, Budapest, 2004:62-67

16. **Hermann Cs**: Tűdűkeringés. In: Péntes I, Lorx A (szerk.): *A lélegeztetés elmélete és gyakorlata*. Medicina, Budapest, 2004: 68-72

17. **Hermann Cs:** A tüdő nem respiratorikus funkciói In: Péntes I, Lorx A (szerk.): A lélegeztetés elmélete és gyakorlata. Medicina, Budapest, 2004: 136
18. **Hermann Cs:** A gépi lélegeztetés indikációi In: Péntes I, Lorx A (szerk.): A lélegeztetés elmélete és gyakorlata. Medicina, Budapest, 2004: 277-294
19. **Hermann Cs:** A testhelyzet hatása a gázcsereire In: Péntes I, Lorx A (szerk.): A lélegeztetés elmélete és gyakorlata. Medicina, Budapest, 2004: 469-478
20. Péntes I, Madách Krisztina, **Hermann Cs:** Tüdőembolia In: Péntes I, Lorx A (szerk.): A lélegeztetés elmélete és gyakorlata. Medicina, Budapest, 2004: 553-568
21. **Hermann Cs,** Lorx A, Péntes I: Otthoni lélegeztetés. In: Péntes I, Lorx A (szerk.): A lélegeztetés elmélete és gyakorlata. Medicina, Budapest, 2004: 831-853

9. Irodalomjegyzék

¹ Barron M. (1920) The relation of the islets of Langerhans to diabetes with special reference to cases of pancreatic lithiasis. *Surg Gynec Obstet*, 31: 437-448.

² Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. (1922) Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus. Preliminary report. *Can Med Assoc J*, 22: 141-6.

³ Eisenbarth GS. (1986) Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*, 314: 1360–1368.

⁴ Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, Richmond JA, Weir RS. (1986) The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of death in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia*, 29: 267-74.

⁵ Gepts W. (1965) Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*, 14: 619-33.

⁶ Doniach D, Morgan AG. (1973) Islets of Langerhans in juvenile diabetes mellitus. *Clin Endocrinol*, 2: 233–248.

⁷ Foulis AK, Clark A. Pathology of the pancreas in diabetes mellitus. In: Kahn CR, Weir GC (szerk.), *Joslin's Diabetes Mellitus*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1994: 265–281.

⁸ Imagawa A, Hanafusa T, Tamura S, Moriwaki M, Itoh N, Yamamoto K, Iwahashi H, Yamagata K, Waguri M, Nanmo T, Uno S, Nakajima H, Namba M, Kawata S, Miyagawa J, Matsuzawa Y. (2001) Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in Type 1 diabetes: close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity. *Diabetes*, 50:1269–1273.

⁹ Solow H, Hidalgo R, Singal DP. (1979) Juvenile-onset diabetes HLA-A, -B, -C, and -DR alloantigens. *Diabetes*, 28: 1-4.

-
- ¹⁰ Sachs JA, Cudworth AG, Jaraquemada D, Gorsuch AN, Festenstein H. (1980) Type 1 diabetes and the HLA-D locus. *Diabetologia*,18: 41-3.
- ¹¹ Lampeter EF, Homberg M, Quabeck K, Schaefer UW, Wernet P, Bertrams J, Grosse-Wilde H, Gries FA, Kolb H. (1993) Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. *Lancet*, 341:1243-4.
- ¹² Vialettes B, Maraninchi D. (1993) Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. *Lancet*, 342:174.
- ¹³ Falorni A, Calcinaro F. (2003) Humoral Responses in Type 1 Diabetes Mellitus. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 4: 281-290.
- ¹⁴ Harrison LC, Colman PG, Dean B, Baxter R, Martin FI. (1985) Increase in remission rate in newly diagnosed type I diabetic subjects treated with azathioprine. *Diabetes*, 34: 1306-8.
- ¹⁵ Silverstein J, Maclaren N, Riley W, Spillar R, Radjenovic D, Johnson S. (1988) Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 319: 599-604.
- ¹⁶ Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. (1974) Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, 2: 1279-83.
- ¹⁷ Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. (1983) Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*, 222: 1337-9.
- ¹⁸ Pihoker C, Gilliam LK, Hampe CS, Lernmark A. (2005) Autoantibodies in Diabetes. *Diabetes*, 54 Suppl 2: S52–S61.
- ¹⁹ Bendelac A, Boitard C, Bedossa P, Bazin H, Bach JF, Carnaud C. (1988). Adoptive T cell transfer of autoimmune nonobese diabetic mouse diabetes does not require recruitment of host B lymphocytes. *J Immunol*, 141: 2625-8.

-
- ²⁰ Martin S, Wolf-Eichbaum D, Duinkerken G, Scherbaum WA, Kolb H, Noordzij JG, Roep BO. (2001) Development of type 1 diabetes despite severe hereditary B-lymphocyte deficiency. *N Engl J Med*, 345: 1036-40.
- ²¹ Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M., Chase PH, Eisenbarth GS. (1996) Number of Autoantibodies (Against Insulin, GAD or ICA512/IA2) Rather than Particular Autoantibody Specificities Determines Risk of Type I Diabetes. *J Autoimmun*, 9: 379-83.
- ²² Roncarolo MG, Battaglia M. (2007) Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nat Rev Immunol*, 7:585-98.
- ²³ Benoist C, Mathis D. (1997) Cell death mediators in autoimmune diabetes-no shortage of suspects. *Cell*, 89: 1-3.
- ²⁴ Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. (1998) Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*, 55:139-49.
- ²⁵ Savilahti E, Saukkonen TT, Virtala ET, Tuomilehto J, Akerblom HK. (1993) Increased levels of cow's milk and beta-lactoglobulin antibodies in young children with newly diagnosed IDDM. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetes Care*, 16: 984-9.
- ²⁶ Dahl-Jorgensen K, Joner G, Hanssen KF. (1991) Relationship between cows' milk consumption and incidence of IDDM in childhood. *Diabetes Care*, 14:1081-3.
- ²⁷ Warram JH, Krolewski AS, Gottlieb MS, Kahn CR. (1984) Differences in risk of insulin-dependent diabetes in offspring of diabetic mothers and diabetic fathers. *N Engl J Med*, 311:149-52.
- ²⁸ Tillil H, Kobberling J. (1987) Age-correlated empirical genetic risk estimates for first-degree relatives of IDDM patients. *Diabetes*, 36: 93-99.

-
- ²⁹ Olmos P, A'Hern R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA, Leslie RDG. (1988) The significance of the concordance rate for type 1 (insulin-dependent) diabetes in identical twins. *Diabetologia*, 31: 747-50.
- ³⁰ Redondo MJ, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke DA, Eisenbarth GS, Leslie RD. (2001) Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia*, 44: 354-62.
- ³¹ Redondo MJ, Rewers M, YU L, Garg S, Pilcher CC, Elliott RB, Eisenbarth GS. (1999) Genetic determination of islet cells autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type I diabetes: prospective twin study. *BMJ*, 318: 698-702.
- ³² Nerup J, Platz P, Andersen OO, Christy M, Lyngsoe J, Poulsen JE, Ryder LP, Staub Nielson L, Thomsen M, Svejgaard A. (1974) HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet*, 2: 864-6.
- ³³ Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Pociot F, Todd JA, Rich SS, The Type 1 Diabetes Genetics Consortium. (2005) Type 1 Diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families. *Diabetes*, 54: 2995-3001.
- ³⁴ Noble JA, Valdes AM, Cook M, Klitz W, Thomson G, Erlich HA. (1996) The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: Molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. *Am J Hum Genet*, 59:1134-48.
- ³⁵ Cudworth AG, Woodrow JC. (1974) Letter: HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet*, 2:1153.
- ³⁶ Bell GI, Selby MJ, Rutter WJ. (1982) The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature*, 295:31-5.
- ³⁷ Kennedy GC, German MS, Rutter WJ. (1995) The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nat.Genet*, 9: 293-8.

-
- ³⁸ Lucassen AM, Sreaton GR, Julier C, Elliott TJ, Lathrop M, Bell JI. (1995) Regulation of insulin gene expression by the IDDM associated, insulin locus haplotype. *Hum Mol Genet*, 4: 501-6.
- ³⁹ Field LL, Tobias R, Magnus T. (1994) A locus on chromosome 15q26 (IDDM3) produces susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat Genet*, 8: 89-94.
- ⁴⁰ Zamani M, Pociot F, Raeymaekers P, Nerup J, Cassiman JJ. (1996) Linkage of type I diabetes to 15q26 (IDDM3) in the Danish population. *Hum Genet*, 98: 491-96.
- ⁴¹ Luo D-F, Buzzetti R, Rotter JI, Maclaren NK, Raffel LJ, Nistico L, Giovannini C, Pozzilli P, Thomson G, She JX. (1996) Confirmation of three susceptibility genes to insulin-dependent diabetes mellitus: IDDM4, IDDM5, and IDDM8. *Hum Mol Genet*, 5: 693-8.
- ⁴² Davies JL, Kawaguchi S, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard P. (1994) A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature*, 371: 130-6.
- ⁴³ Hasimoto L, Habita C, Beressi JP, Delepine M, Besse C, Cambon-Thomsen A, Deschamps I, Rotter JI, Djoulah S, James MR, Froguel P, Weissenbach J, Lathrop GM, Julier C. (1994) Genetic Mapping of a Susceptibility locus for Insulin-dependent Diabetes Mellitus on Chromosome 11q. *Nature*, 371: 161-4.
- ⁴⁴ Cordell HJ, Todd JA, Bennett ST, Kawaguchi Y, Farrall M. (1995) Two-locus maximum lod score analysis of a multifactorial trait: joint consideration of IDDM2 and IDDM4 with IDDM1 in type I diabetes. *Am J Hum Genet*, 57: 920-34.
- ⁴⁵ Buhler J, Owerbach D, Schaffer AA, Kimmel M, Gabbay KH. (1997) Linkage analyses in type I diabetes mellitus using CASPAR, a software and statistical program for conditional analysis of polygenic diseases. *Hum.Hered*, 47: 211-22.

-
- ⁴⁶ Davies JL, Cucca F, Goy JV, Atta ZA, Merriman ME, Wilson A, Barnett AH, Bain SC, Todd JA. (1996) Saturation multipoint linkage mapping of chromosome 6q in type I diabetes. *Hum Mol Genet*, 5: 1071-4.
- ⁴⁷ Delepine M, Pociot F, Habita C, Hashimoto L, Frougel P, Rotter J, Cambon-Thomsen A, Deschamps I, Djoulah S, Weissenbach J, Nerup J, Lathrop M, Julier C. (1997) Evidence of a non-MHC susceptibility locus in type I diabetes linked to HLA on chromosome 6. *Am J Hum Genet*, 60: 174-87.
- ⁴⁸ Perez DN, Bilbao JR, Calvo B, Castano L. (2000) Analysis of chromosome 6q in Basque families with type 1 diabetes. GEPV-N. Basque-Navarre Endocrinology and Paediatric Group. *Autoimmunity*, 33: 33-6.
- ⁴⁹ Hodge SE, Anderson CE, Neiswanger K, Field LL, Spence MA, Sparkes RS, Sparks MC, Crist M, Terasaki PI, Rimo DL, Rotter JI. (1981) Close genetic linkage between diabetes mellitus and Kidd blood group. *Lancet*, 2: 893-5.
- ⁵⁰ Merriman TR, Eaves IA, Twells RC, Merriman ME, Danoy PA, Muxworthy CE, Hunter KM, Cox RD, Cucca F, McKinney PA, Shield JP, Baum JD, Tuomilehto J, Tuomilehto-Wolf E, Ionesco-Tirgoviste C, Joner G, Thorsby E, Undlien DE, Pociot F, Nerup J, Ronningen KS, Bain SC, Todd JA. (1998) Transmission of haplotypes of microsatellite markers rather than single marker alleles in the mapping of a putative type 1 diabetes susceptibility gene (IDDM6). *Hum.Mol.Genet*, 7: 517-24.
- ⁵¹ Copeman JB, Cucca F, Hearne CM, Cornall RJ, Reed PW, Ronningen KS, Undlien DE, Nistico L, Buzzetti R, Tosi R, Pociot F., Nerup J, Cornelis F, Barnett AH, Bain SC, Todd JA (1995) Linkage disequilibrium mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene (IDDM7) to chromosome 2q31-q33. *Nat Genet*, 9: 80-5.
- ⁵² Luo DF, Bui MM, Muir A, Maclaren NK, Thomson G, She JX. (1995) Affected-sib-pair mapping of a novel susceptibility gene to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM8) on chromosome 6q25-q27. *Am J Hum Genet*, 57: 911-919.

⁵³ Mein CA, Esposito L, Dunn MG, Johnson GCL, Timms AE, Goy JV, Smith AN, Sebag-Montefiore L, Merriman ME, Wilson AJ, Pritchard LE, Cucca F, Barnett AH, Bain SC, Todd JA. (1998) A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. *Nature Genetics*, 19: 297 – 300.

⁵⁴ Reed P, Cucca F, Jenkins S, Merriman M, Wilson A, McKinney P, Bosi E, Joner G, Ronningen K, Thorsby E, Undlien D, Merriman T, Barnett A, Bain S, Todd J. (1997) Evidence for a type 1 diabetes susceptibility locus (IDDM10) on human chromosome 10p11-q11. *Hum Mol Genet*, 6: 1011-6.

⁵⁵ Field LL, Tobias R, Thomson G, Plon S. (1996) Susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus maps to a locus (IDDM11) on human chromosome 14q24.3-q31. *Genomics*, 33: 1-8.

⁵⁶ Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram GS, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Tosi R, Pozzilli P, Todd JA. (1996) The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol Genet*, 5:1075-80.

⁵⁷ Marron MP, Zeidler A, Raffel LJ, Eckenrode SE, Yang JJ, Hopkins DI, Garchon HJ, Jacob CO, Serrano-Rios M, Martinez Larrad MT, Park Y, Bach JF, Rotter JI, Yang MC, She JX. (2000) Genetic and physical mapping of a type 1 diabetes susceptibility gene (IDDM12) to a 100-kb phagemid artificial chromosome clone containing D2S72-CTLA4–D2S105 on chromosome 2q33. *Diabetes*, 49: 492–499.

⁵⁸ Morahan G, Huang D, Tait BD, Colman PG, Harrison LC. (1996) Markers on distal chromosome 2q linked to insulin-dependent diabetes mellitus. *Science*, 272:1811-3.

-
- ⁵⁹ Concannon P, Gogolin-Ewens KJ, Hinds DA, Wapelhorst B, Annem Morrison V, Stirling B, Mitra M, Farmer J, Williams SR, Cox NJ, Bell GI, Risch N, Spielman RS: (1998) A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat Genet*, 19: 292-6.
- ⁶⁰ Verge CF, Vardi P, Babu S, Bao F, Erlich HA, Bugawan T, Tiosano D, Yu L, Eisenbarth GS, Fain PR. (1998) Evidence for oligogenic inheritance of type 1A diabetes in a large Bedouin Arab family. *J Clin Invest*, 102: 1569-75.
- ⁶¹ Morahan G, Huang D, Ymer S, Cancilla MR, Stephen K, Dabadghao P, Werther G, Tait BD, Harrison LC, Colman PG. (2001) Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. *Nat. Genet*, 27: 218-221.
- ⁶² Rowe RE, Wapelhorst B, Bell GI, Risch N, Spielman RS, Concannon P. (1995) Linkage and association between insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) susceptibility and markers near the glucokinase gene on chromosome 7. *Nat Genet*, 10: 240-2.
- ⁶³ Awata T, Matsumoto C, Urakami T, Hagura R, Amemiya S, Kanazawa Y. (1994) Association of polymorphism in the interferon gamma gene with IDDM. *Diabetologia*, 37: 1159-62.
- ⁶⁴ Kantárová D., Buc M. (2007): Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus in Humans. *Physiol Res*, 56: 255-266,
- ⁶⁵ Thomson G, Valdes AM, Noble JA, Kockum I, Grote MN, Najman J, Erlich HA, Cucca F, Pugliese A, Steenkiste A, Dorman JS, Caillat-Zucman S, Hermann R, Nerup J. (2007) Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: a meta-analysis. *Tissue Antigens*, 70: 110–27.
- ⁶⁶ Redondo MJ, Eisenbarth GS. (2002). Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. *Diabetologia*, 45: 605-622

⁶⁷ Gianini R, Eisenbarth GS. (2005). The stages of type 1A diabetes. *Immunological reviews*, 204: 232-249.

⁶⁸ Kim MS, Polychronakos C. (2005) Immunogenetics of type 1 Diabetes. *Horm Res*, 64: 180-188.

⁶⁹ Vafiadis P, Ounissi-Benkalha H, Palumbo M, Grabs R, Rousseau M, Goodyer CG, Polychronacos C. (2001) Class III alleles of the variable number of tandem repeat insulin polymorphism associated with silencing of thymic insulin predispose to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 3705–3710.

⁷⁰ Alizadeh BZ, Koeleman BPC (2008) Genetic polymorphism in susceptibility to Type 1 Diabetes. *Clinica Chimica Acta*, 387: 9-17.

⁷¹ Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Gough SC. (2003) Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*, 423: 506–511.

⁷² Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JMM, Vella A, Nutland S, Rance HE, Maier L, Barratt BJ, Guja C, Ionescu-Tîrgoviste C, Savage DA, Dunger DB, Widmer B, Strachan DP, Ring SM, Walker N, Clayton DG, Twells RCJ, Gough SCL, Todd JA. (2004) Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 Diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes*, 53: 3020-3023

⁷³ Viken MK, Amundsen SS, Kvien TK, Boberg KM, Gilboe IM, Lilleby V, Sollid LM, Forre T, Thorsby E, Smerdel A, Lie BA. (2005) Association analysis of the 1858C>T polymorphism in the PTPN22 gene in juvenile idiopathic arthritis and other autoimmune diseases. *Genes Immun*, 6: 271–3.

⁷⁴ Hornum L, Markholst H (2004) New Autoimmun Genes and the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Current Diabetes Reports*, 4: 135-142

-
- ⁷⁵ Dahlen E, Dawe K, Ohlsson L, Hedlund G (1998) Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol*, 160: 3585-93.
- ⁷⁶ Toyoda H, Formby B, Magalong D, Redford A, Chan E, Takei S, Charles MA. (1994) In situ islet cytokine gene expression during development of type I diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Immunol Lett*, 39: 283-288.
- ⁷⁷ Stephens LA, Thomas HE, Ming L, Grell M, Darwiche R, Volodin L, Kay TW. (1999) Tumor necrosis factor-alpha-activated cell death pathways in NIT-1 insulinoma cells and primary pancreatic beta cells. *Endocrinology*, 140: 3219-3227.
- ⁷⁸ Vaux DL, Flavell RA. (2000) Apoptosis genes and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 12: 719-724.
- ⁷⁹ Privat SJ, Oo A, Waterbury LD. (2001) Production of interleukin-6, but not interleukin-8, induced by TNF-alpha or IL-1 beta in human fibroblast-like synoviocyte increases over cell passage. *Proc West Pharmacol Soc*, 44: 9-13.
- ⁸⁰ Kataoka S, Satoh J, Fujiya H, Toyota T, Suzuki R, Itoh K, Kumagai K. (1983) Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. *Diabetes*, 32: 247-53.
- ⁸¹ Nakhoda AF, Like AA, Chappel CI, Wei CN, Marliss EB. (1978) The spontaneously diabetic Wistar rat (the "BB" rat). Studies prior to and during development of the overt syndrome. *Diabetologia*, 14: 199-207.
- ⁸² Erbagci AB, Tarakcioglu M, Coskun Y, Sivasli E, Sibel Namiduru E. (2001) Mediators of inflammation in children with type I diabetes mellitus: cytokines in type I diabetic children. *Clin Biochem*, 34: 645-650.

-
- ⁸³ El-Nawawy A, Soliman T, El-Azzouni O, Abbassy AA, Massoud MN, Marzouk S, Ibrahim F, Helal L. (1998) Interleukin-1- beta, tumor necrosis factor-alpha, insulin secretion and oral glucose tolerance in non-diabetic siblings of children with IDDM. *Indian Journal of Pediatrics*, 65: 455–460.
- ⁸⁴ Old LJ. (1985) Tumor necrosis factor (TNF). *Science*, 230: 630-2.
- ⁸⁵ Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, Mcdevitt HO, Duff GW. (1997) Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 3195–3199.
- ⁸⁶ Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. (1997) The -308 tumor necrosis factor- α promoter polymorphism effects transcription. *Molecular Immunology*, 34: 391–399.
- ⁸⁷ Bouma G, Crusius JB, Oudkerk Pool M, Kolkman JJ, von Blomberg BM, Kostense PJ, Giphart MJ, Schreuder GM, Meuwissen SGM, Pena AS. (1996) Secretion of tumour necrosis factor α and lymphotoxin α in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles: relevance for inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol*, 43: 456-63.
- ⁸⁸ Deja G, Jarosz-Chobot P, Polanska J, Siekiera U, Malecka-Tendera E. (2006) Is the Association Between TNF- α -308 A Allele and DMT1 Independent of HLA-DRB1, DQB1 Alleles? *Mediators of Inflammation*, 2006: 1–7
- ⁸⁹ Pociot F, Wilson AG, Nerup J, Duff GW. (1993) No independent association between a tumor necrosis factor-alpha promoter region polymorphism and insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol*, 23: 3050-3.
- ⁹⁰ Cox A, Gonzalez AM, Wilson AG, Wilson RM, Ward JD, Artlett CM, Wells K, Duff GW. (1994) Comparative analysis of the genetic associations of HLA-DR3 and tumour necrosis factor alpha with human IDDM. *Diabetologia*, 37: 500-3.

-
- ⁹¹ Deng GY, Maclaren NK, Huang HS, Zhang LP, She JX. (1996) No primary association between the 308 polymorphism in the tumor necrosis factor alpha promoter region and insulin-dependent diabetes mellitus. *Hum Immunol*, 45: 137-42.
- ⁹² Pociot F, D'Alfonso S, Compasso S, Scorza R, Richiardi PM. (1995) Functional analysis of a new polymorphism in the human TNF alpha gene promoter. *Scand J Immunol*, 42: 501-4.
- ⁹³ Brinkman BM, Huizinga TW, Kurban SS, van der Velde EA, Schreuder GM, Hazes JM, Breedvelt SC, Verwilj CL. (1997) Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? *Br J Rheumatol*, 36: 516-21.
- ⁹⁴ Fabris M, Di PE, D'Elia A, Damante G, Sinigaglia L, Ferraccioli G. (2002) Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism in severe and mild-moderate rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 29: 29-33.
- ⁹⁵ Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedvelt SC, Verwilj CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius JBA, Garca-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman C.H, Pena AS. (1997) TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol*, 72: 149-53.
- ⁹⁶ Vinasco J, Beraun Y, Nieto A, Fraile A, Mataran L, Pareja E, Martin J. (1997) Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*, 49: 74-8.
- ⁹⁷ Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenefelde KH, Rittner C. (1998) A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol*, 111: 579-82.
- ⁹⁸ Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenefelde KH, Rittner C. (1998) Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection. *J Med Virol*, 54 :173-7.

-
- ⁹⁹ Dogan Y, Akarsu S, Ustundag B, Yilmaz E, Gurkoze MK (2006) Serum IL-1beta, IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children. *Mediators Inflamm*, 2006: 1-6.
- ¹⁰⁰ Aribi M., Moulessehoul S, Kendouci-Tani M, Benabadji AB, Hichami A, Khan NA. (2007) Relationship between interleukin-1beta and lipids in type 1 diabetic patients. *Med Sci Monit*, 13: 372-8.
- ¹⁰¹ Southern C, Schulster D, Green IC. (1990) Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α via an L-arginine-dependent nitric oxide generation mechanism. *FEBS Lett*, 276:42-4.
- ¹⁰² Eizirik DL, Cagliero E, Bjorklund A, Welsh N. (1993) Interleukin-1-induced expression of nitric oxide synthase in insulin-producing cells is preceded by c-fos induction and depends on gene transcription and protein synthesis. *FEBS Lett*, 317: 62-6.
- ¹⁰³ Corbett JA, Kwon G, Misko TP, Rodi CP, McDaniel ML. (1994) Tyrosine kinase involvement in IL-1 β -induced expression of iNOS by β -cells purified from islets of Langerhans. *Am J Physiol*, 267: C48-C54
- ¹⁰⁴ Corbett JA, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster Jr JR, McDaniel ML. (1992) IL-1 β induces the formation of nitric oxide by β -cells from rodent islets of Langerhans. *J Clin Invest*, 90: 2384-91.
- ¹⁰⁵ Corbett JA, McDaniel ML. (1995) Intra-islet release of IL-1 inhibits β -cell function by inducing β -cell expression of iNOS. *J Exp Med*, 181: 559-68.
- ¹⁰⁶ Steer Sa, Scarim AL, Chambers KT, Corbett JA. (2006) Interleukin-1 stimulates beta-cell necrosis and release of the immunological adjuvant HMGB1. *PLoS Med*, 3: e17.
- ¹⁰⁷ Cnop M, Welsh N, Jonas JC, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DE. (2005) Mechanisms of pancreatic β -cell death in Type 1 and Type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*, 54 Suppl. 2: S97-S107.

-
- ¹⁰⁸ Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. (1992) A TaqI polymorphism in the human interleukin-1 beta (IL-1 beta) gene correlates with IL-1 beta secretion in vitro. *Eur J Clin Invest*, 22: 396-402.
- ¹⁰⁹ Pociot F, Ronningen KS, Bergholdt R, Lorenzen T, Johannesen J, Ye K, Dinarello CA, Nerup J. (1994) Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes--evidence for polygenicity in man. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Autoimmunity*, 19: 169-78.
- ¹¹⁰ Akira, S, Taga T, and Kishimoto T. (1993) Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol*, 54: 1-78.
- ¹¹¹ Baumann H, and Gauldie J. (1994) The acute phase response. *Immunol. Today*, 15: 74-80.
- ¹¹² Campbell LL, Cutri A, Wilson A, Harrison LC. (1989) Evidence for IL-6 production by and effects on the pancreatic beta-cell. *J. Immunol*, 143: 1188-1191.
- ¹¹³ DiCosmo BF, Picarella D, Flavell RA. (1994) Local production of human IL-6 promotes insulinitis but retards the onset of insulin-dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Int. Immunol*, 6: 1829-1837.
- ¹¹⁴ Foulis AK, Farquharson MA, Meager A. (1987) Immunoreactive alpha-interferon in insulin-secreting beta cells in type 1 diabetes mellitus. *Lancet*, 2: 1423-7.
- ¹¹⁵ Ishihara K, Hirano T. (2002) IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13: 357-368.
- ¹¹⁶ Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*, 102: 1369-76.
- ¹¹⁷ Benjamin IJ, McMillan DR. (1998) Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 83: 117-32.

-
- ¹¹⁸ Pockley AG. (2001) Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert Rev Mol Med*, 3: 1-21.
- ¹¹⁹ Abulafia-Lapid R, Gillis D, Yosef O, Atlan H, Cohen IR. (2003) T Cells and autoantibodies to human HSP70 in Type 1 diabetes in children. *J Autoimmun*, 20: 313-21.
- ¹²⁰ Eizirik DL, Pipeleers DG, Ling Z, Welsh N, Hellerstrom C, Andersson A. (1994) Major Species Differences Between Humans and Rodents in the Susceptibility to Pancreatic β -Cell Injury. *Proc Nat. Acad Sci USA*, 91: 9253-6.
- ¹²¹ Burkart V, Germaschewski L, Schloot MC, Bellmann K, Kold H. (2008) Deficient heat shock protein 70 response to stress in leukocytes at onset of type 1 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, 369: 421-5.
- ¹²² Pociot F, Ronningen KS, Nerup J. (1993) Polymorphic analysis of the human MHC-linked heat shock protein 70 (HSP70-2) and HSP70-Hom genes in insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Scand J Immunol*, 38: 491-5.
- ¹²³ Jaeckel E, Manns M, Von Herrath M. (2002) Viruses and diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 958: 7-25.
- ¹²⁴ Hyoty H, Taylor KW. (2002) The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia*, 45: 1353-61.
- ¹²⁵ Underhill DM, Ozinsky A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*, 14: 103-10.
- ¹²⁶ Akira, S, Takeda K, Kaisho T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immun*, 2: 675-680.
- ¹²⁷ Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg EW, Anderson LJ, Tripp RA. (2001) Involvement of Toll-Like Receptor 4 in Innate Immunity to Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, 75: 10730-7.

¹²⁸ Arbour NC, Lorenz E., Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. (2000) TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet*, 25: 187-91.

¹²⁹ Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA. (2002) Toll-like Receptor 4 Polymorphisms and Atherogenesis. *N Engl J Med*, 347: 185-92.

¹³⁰ Park Y, Park S, Yoo E, Kim D, Hyongdoo S. (2004) Association of the polymorphism for Toll-like receptor 2 with type 1 diabetes susceptibility. *Ann N Y Acad Sci*, 1037: 170-4.

¹³¹ Santin I, Bilbao JR, de Nanclares GP, Calvo B, Castano L. (2006) No association of TLR2 and TLR4 polymorphisms with type I diabetes mellitus in the Basque population. *Ann N Y Acad Sci*, 1079: 268-72.

¹³² Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249: 1431–1433.

¹³³ Dziarski R, Tapping RI, Tobias PS. (1998): Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J Biol Chem*, 273: 8680–8690.

¹³⁴ Sellati TJ, Bouis DA, Kitchens RL, Darveau RP, Pugin J, Ulevitch RJ, Gangloff SC, Goyert SM, Norgard MV and Radolf JD (1998) *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytic cells via a CD14-dependent pathway distinct from that used by lipopolysaccharide. *J Immunol*, 160: 5455–5464.

¹³⁵ Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD (1998) Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*, 392: 505–550.

-
- ¹³⁶ Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A., Bazil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD. (1992) Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 176: 1665–71.
- ¹³⁷ Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martinez FD. (1999) A Polymorphism* in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20: 976–83.
- ¹³⁸ Hubacek JA, Rothe G, Pit'ha J, Skodova Z, Stanek V, Poledne R. (1999) C(-260)T polymorphism in the promoter of the CD14 monocyte receptor gene as a risk factor for myocardial infarction. *Circulation*, 99: 3218–20.
- ¹³⁹ Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Duerig N, Epplen JT. (2002) A polymorphism in the CD14 gene is associated with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol*, 37: 189–191.
- ¹⁴⁰ Obana N, Takahashi S, Kinouchi Y, Negoro K, Takagi S, Shimosegawa T. (2002) Ulcerative colitis is associated with a promoter polymorphism of lipopolysaccharide receptor gene, CD14. *Scand J Gastroenterol*, 37: 699–704.
- ¹⁴¹ Koppelman GH, Reijmerink NE, Stine OC, Woward TD, Whittaker PA, Meyers DA, Postma DS, Bleeker ER. (2001) Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 965–969.
- ¹⁴² Van der Paardt M, Crusius JB, de Koning MH, Morre S, van de Stadt RJ, Dijkmans B, Pena A, van-der Horst-Bruisma IE. (2005) No evidence for involvement of the Toll-like receptor 4 (TLR4) A896G and CD14-C260T polymorphisms in susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis*, 64: 235–8.
- ¹⁴³ terSteege J, Buurman W, Arends JW, Forget P. (1997) Presence of inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, CD68 and CD14 in the small intestine in celiac disease. *Lab Invest* 1997;77:29–36.

-
- ¹⁴⁴ Klöting N, Klöting I, Jack RS. (2004) CD14 triggers autoimmune Type 1 diabetes in the NOD mouse. *Diabetologia*, 47:151-2
- ¹⁴⁵ Holmes GKT. (2001.) Coeliac disease and type 1 diabetes mellitus – the case for screening. *Diabetes*, 18: 169–177.
- ¹⁴⁶ De Vitis I, Ghirlanda G, Gasbarrini G. (1996) Prevalence of coeliac disease in type 1 diabetes: a multicentre study. *Acta Paediatr Suppl*, 412: 56–57.
- ¹⁴⁷ Arató A, Körner A, Veres G, Dezsőfi A, Újpál I, Madácsy L. (2003) Frequency of coeliac disease in Hungarian children with type 1 diabetes mellitus. *Eur. J. Pediatr*, 162:1-5.
- ¹⁴⁸ Carlsson AK, Axelsson IE, Borulf SK, Bredberg ACA, Lindberg BA, K, Sjöberg KG, Ivarsson SA. (1999) Prevalence of IgA-antiendomysium and IgA-antigliadin autoantibodies at diagnosis of insulin-dependent diabetes mellitus in Swedish children and adolescents. *Pediatrics*, 103: 1248–1252
- ¹⁴⁹ Aktay AN, Lee PC, Kumar V, Parton E, Wyatt DT, Werlin SL. (2001) The prevalence and clinical characteristics of celiac disease in juvenile diabetes in Wisconsin. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 33: 462–465
- ¹⁵⁰ Ludvigsson JF, Ludvigsson J, Ekbom A, Montgomery SM. (2006) Celiac disease and risk of subsequent type 1 diabetes: a general population cohort study of children and adolescents. *Diabetes Care*, 29: 2483-2488.
- ¹⁵¹ Sumnik Z, Cinek O, Bratanic N, Kordonouri O, Kulich M, Roszai B, Arato A, Lebl J, Soltesz Gy, Danne T, Battelino T, Schober E (2006) Risk of celiac disease in children with type 1 diabetes is modified by positivity for HLA-DQB1*02-DQA1*05 and TNF - 308A. *Diabetes Care*, 4: 858-63.
- ¹⁵² Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16:1215.

-
- ¹⁵³ Day CP, Grove J, Daly AK, Stewart MW, Avery PJ, Walker M. (1998) Tumour necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism and decreased insulin resistance. *Diabetologia*, 41: 430-4
- ¹⁵⁴ Moos V, Rudwaleit M, Herzog V, Hohlig K, Sieper J, Muller B. (2000) Association of genotypes affecting the expression of interleukin-1beta or interleukin-1 receptor antagonist with osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 2417-22
- ¹⁵⁵ Fekete A, Treszl A, Tóth-Hejn P, Vannay A, Tordai A, Tulassay T, Vásárhelyi B. (2003) Association between heat shock protein 72 gene polymorphism and acute renal failure in premature neonates. *Pediatr Res*, 54:452-5.
- ¹⁵⁶ Eng HL, Wang CH, Chen CH, Chou HM, Cheng CT, Lin TM. (2004) A CD14 promoter polymorphism is associated with CD14 expression and Chlamydia-stimulated TNF alpha production. *Genes Immun*, 5:426-430.
- ¹⁵⁷ Lorenz E, Frees KL, Schwartz DA. (2001) Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR. *Biotechniques*, 31:22-24.
- ¹⁵⁸ Szalai C, Füst G, Duba J, Kramer J, Romics L, Prohászka Z, Császár A.. (2002) Association of polymorphism and allelic combinations in the tumour necrosis factor- α -complement MHC region with coronary artery disease. *J Med Genet*, 39: 46–51.
- ¹⁵⁹ Campbell IL, Hobbs MV, Dockter J, Oldstone MB, Allison J. (1994) Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. *Am J Pathol*, 145: 157-166.
- ¹⁶⁰ Targher G, Zenari L, Bertolini L, Muggeo M, Zoppini G. (2001) Elevated levels of interleukin-6 in young adults with type 1 diabetes without clinical evidence of microvascular and macrovascular complications. *Diabetes Care*, 24: 956-7.
- ¹⁶¹ Devaraj S, Venugopal SK, Singh U, Jialal I. (2005) Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase c- α and - β . *Diabetes*, 54: 85-91.

-
- ¹⁶² Watanabe E, Hirasawa H, Oda S, Matsuda K, Hatano M, Tokuhisa T. (2005) Extremely high interleukin-6 blood levels and outcome in the critically ill are associated with tumor necrosis factor and interleukin-1-related gene polymorphisms. *Crit Care Med*, 33: 8997.
- ¹⁶³ Amosova EN, Shpak YV, Nedoždij AV, Produševich LV. (2004) Proinflammatory cytokine levels in patients with diastolic heart failure. *Kardiol Pol*, 61: 17-20.
- ¹⁶⁴ Lo HC, Lin SC, Wang YM. (2004) The relationship among serum cytokines, chemokine, nitric oxide, and leptin in children with type 1 diabetes mellitus. *Clin Biochem*, 37: 666-672.
- ¹⁶⁵ Jahromi MM, Millward BA, Demaine AG. (2000) A polymorphism in the promoter region of the gene for interleukin-6 is associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *J Interferon Cytokine Res*, 20: 885-888.
- ¹⁶⁶ Kristiansen OP, Nolsoe RL, Larsen L, Gjesing AM, Johannesen J, Larsen ZM. DIEGG; DSGD. (2003) Association of a functional 17-betaestradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. *Hum Mol Genet*, 12: 1101-10.
- ¹⁶⁷ Gillespie KM, Nolsoe R, Betin VM, Kristiansen OP, Bingley PJ, Mandrup-Poulsen T. (2005) Is puberty an accelerator of type 1 diabetes in IL6-174CC females? *Diabetes*, 54: 1245-8.
- ¹⁶⁸ Choi SE, Choi KM, Yoon IH, Shin JY, Kim JS, Park WY, Han DJ, Kim SC, Ahn C, Kim JY, Hwang ES, Cha CY, Szot GL, Yoon KH, Park CG. (2004) IL-6 protects pancreatic islet beta cells from proinflammatory cytokines-induced cell death and functional impairment in vitro and in vivo. *Transpl Immunol*, 13: 43-53.
- ¹⁶⁹ Demeter J, Messer G, Rajczy K, Patscht K, Péntzes M, Kenéz A. (2000) Hazai adatok a TNF-a, az IL-a, az IL-6 promóter és az IL-1 receptor-antagonista DNS-szintű polimorfizmusának megoszlásáról és ezen polimorfizmusok jelentősége fertőző, autoimmun és malignus betegségekben. *Magy Belorv Arch*, 53: 185-193.

-
- ¹⁷⁰ Krikovszky D, Vasarhelyi B, Treszl A, Korner A, Tordai A, Tulassay T, Madacsy L. (2002) Genetic polymorphism of interleukin-1beta is associated with risk of type 1 diabetes mellitus in children. *Eur J Pediatr*, 161: 507-8.
- ¹⁷¹ Bouqbis L, Akhayat O, Garchon HJ, Calafell F, Izaabel H. (2003) TNFA-TNFB haplotypes modify susceptibility to type I diabetes mellitus independently of HLA class II in a Moroccan population. *Tissue Antigens*, 61: 72-9.
- ¹⁷² Lio D, Candore G, Colombo A, Colonna Romano G, Gervasi F, Marino V, Scola L, Caruso C. (2001) Genetically determined high setting of TNF-alpha influences immunologic parameters of HLAB8, DR3 positive subjects: implications for autoimmunity. *Hum Immunol*, 62: 705-13.
- ¹⁷³ Candore G, Modica MA, Lio D, Colonna-Romano G, Listi F, Grimaldi MP, Russo M, Triolo G, Accardo-Palumbo A, Cuccia MC, Caruso C. (2003) Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: a genetically determined defect of C4 influences immunological parameters of healthy carriers of the haplotype. *Biomed Pharmacother*, 57: 274-7.
- ¹⁷⁴ Dela Concha EG, Fernandez-Arquero M, Vigil P, Rubio A, Maluenda C, Polanco I, Fernandez C, Figueredo MA. (2000) Coeliac disease and TNF promoter polymorphisms. *Hum Immunol*, 61: 513-517.
- ¹⁷⁵ Kaijzel EL, Van Krugten MV, Brinkman BM, Huizinga TW, van der Straaten T, Hazes JM, Ziegler-Heitbrock HW, Nedospasov SA, Breedveld FC, Verweij CL. (1998) Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. *Mol Med*, 4: 724-733.
- ¹⁷⁶ Schlegel RA, Krahling S, Callahan MK, Williamson P. (1999) CD14 is a component of multiple recognition systems used by macrophages to phagocytose apoptotic lymphocytes. *CellDeath Differ*, 6: 583-92.

-
- ¹⁷⁷ Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM. (1998) CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol*, 161: 6250–7.
- ¹⁷⁸ Moffatt OD, Devitt A, Bell ED, Simmons DL, Gregory CD. (1999) Macrophage recognition of ICAM-3 on apoptotic leukocytes. *J Immunol*, 162: 6800–10.
- ¹⁷⁹ Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. (1998) Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, 392: 86–9.
- ¹⁸⁰ Ronchetti A, Rovere P, Iezzi G, Galati G, Heltai S, Protti MP, Garancini MP, Manfredi AA, Rugarli C, Bellone M. (1999) Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells and cytokines. *J Immunol*, 163: 130–6.
- ¹⁸¹ Rey Nores JE, Bensussan A, Vita N, Stelter F, Arias MA, Jones M, Lefort S, Borysiewicz LK, Ferrara P, Labéta MO. (1999) Soluble CD14 acts as a negative regulator of human T cell activation and function. *Eur J Immunol*, 29: 265–76.
- ¹⁸² O'Neill LAJ, Dinarello CA. (2000) The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defence. *Immunol Today*, 21: 206–209.
- ¹⁸³ Saukkonen T, Savilahti E, Reijonen H, Ilonen J, Tuomilehto-Wolf E, Akerblom HK. (1996) Coeliac disease: frequent occurrence after clinical onset of insulin-dependent diabetes mellitus. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabet Med*, 13: 464–70.
- ¹⁸⁴ Sumnik Z, Kolouskova S, Cinek O. (2000) HLA-DQA1*05-DQB1*0201 positivity predisposes to coeliac disease in Czech diabetic children. *Acta Paediatr*. 89:1426–30.
- ¹⁸⁵ Contreas G, Valletta E, Ulmi D, Cantoni S, Pinelli L. (2004) Screening of coeliac disease in north Italian children with type 1 diabetes: limited usefulness of HLA-DQ typing. *Acta Paediatr*, 93: 628–32.

¹⁸⁶ Doolan A, Donaghue K, Fairchild J, Wong M, Williams AJ. (2005) Use of HLA typing in diagnosing celiac disease in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 28: 806-9.

¹⁸⁷ Bao F, Yu L, Babu S. (1999) One third of HLA DQ2 homozygous patients with type 1 diabetes express celiac disease-associated transglutaminase autoantibodies. *J Autoimmun*, 13: 143-8.