





Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Efecto de la inhibición de la molécula CD26/DPPIV sobre los mecanismos de tolerancia inmunológica central y periférica en el ratón diabético no obeso

Tesis doctoral presentada por **María Teresa Julián Alagarda**
para optar al grado de Doctor

Trabajo realizado bajo la dirección de
Manel Puig-Domingo y Nuria Alonso Pedrol

Tutor académico: **Manel Puig-Domingo**

PROGRAMA DE DOCTORAT EN MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA



Barcelona 2018

A la llum que il.lumina el meu camí

A tu mare

Sempre amb mi

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral es el resultado de un gran esfuerzo y de un trabajo en equipo. Gracias a todas aquellas personas que habéis formado parte de este proyecto, en especial a mis directores de tesis, Manel y Nuria. Gracias por haber creído en mí, por haberme introducido en el mundo de la investigación básica, y sobre todo, agradecer todo vuestro apoyo y amistad en mis momentos difíciles. Os admiro y respeto profundamente. Agradecer a mis chicas inmunólogas, Marta, Silvia e Irma y a Jorge por estar siempre ahí y dedicarme vuestro tiempo y atención. Gracias por las horas que hemos compartido en este proyecto. Sin duda representáis un pilar fundamental de este trabajo de tesis.

Agradecer al servicio de Endocrinología del Hospital Germans Trias i Pujol, en especial a la Dra. Anna Sanmartí, por todo vuestro cariño y amistad en una época dura de mi vida. Soy quien soy a nivel profesional gracias a todos vosotros. Con vosotros he compartido un maravilloso periodo de mi vida. A mis grandes compañeros del servicio de Endocrinología del Hospital de Mataró, Enric, Edu, Ester, Maribel y M^aJosé, por nuestro día a día juntos. Con vosotros he madurado como profesional y como persona. Gracias por vuestro apoyo y por hacerme las cosas más fáciles en circunstancias difíciles. Eternamente agradecida.

Especialmente quiero agradecer a mis padres todo lo que soy y lo que he conseguido. Gracias por vuestro esfuerzo en darme una carrera a pesar de todas vuestras dificultades, vuestro apoyo incondicional en todo este tiempo y vuestra comprensión en mis decisiones de la vida. Gracias por darme siempre la mano y no soltarla. A vosotros os dedico esta tesis con todo el amor que os siento. Especialmente a mi madre que allá donde esté seguro que estará orgullosa de todo el esfuerzo que ha supuesto llegar hasta aquí. En numerosas ocasiones te expliqué el proyecto aunque no lo entendías demasiado. Ojalá pudiera explicártelo 100 veces más. Significaría que estás aquí con nosotros. Agradecer a Grego, mi compañero de vida, su capacidad para entender la pasión por mi trabajo, su paciencia y su apoyo incondicional todos estos años. Gracias por este viaje que hemos recorrido juntos y por la bonita familia que hemos formado junto a Lucca. A mi hermano por el amor que nos une y por demostrarme su fortaleza y su capacidad de superación ante las adversidades. Gracias a toda mi familia, mi suegra, mis cuñados, mis sobrinos y amigos por todo el cariño y apoyo tanto

emocional como logístico. Sin ellos no hubiese sido posible dedicarle tiempo a este proyecto.

Finalmente, quiero dedicarle esta tesis a la personita más especial de mi vida. A ti, Lucca. Gracias por ser el motor de mi vida y por hacerme sonreír cada día. Yo te traje al mundo pero tú me has dado la vida. Gracias por hacerme creer que se puede volver a ser feliz.

A todos vosotros, gracias por formar parte de este proyecto y de mi vida.

ABREVIATURAS

Las abreviaturas más frecuentemente utilizadas son:

α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
AIRE	Regulador autoinmune; <i>Autoimmune Regulator</i>
APC	Célula presentadora de antígenos; <i>Antigen presenting cell</i>
CCL/CXCL	Quimioquina ligando; <i>Chemokine ligand</i>
CDs	<i>Células dendríticas</i>
CD8 ⁺ _{EM}	Linfocitos T CD8 ⁺ memoria efectora; <i>Efector memory</i>
CTLA-4	Factor 4 asociado a linfocitos T citotóxicos; <i>Cytotoxic T lymphocyte-associated factor 4</i>
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM 2	Diabetes mellitus tipo 2
DPPIV	Dipeptidilpeptidasa IV
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GAD	Decarboxilasa del ácido glutámico; <i>Glutamic acid decarboxylase</i>
GIP	Polipéptido insulínico glucosa-dependiente; <i>Gastric inhibitory polypeptide</i>
GLP-1	Péptido similar al glucagón; <i>Glucagón like peptide-1</i>
HLA	Antigen leucocitario humano; <i>Human leukocyte antigen</i>
IA-2	Proteína tirosina fosfatasa; <i>Islet antigen-2</i>
ICA-1	<i>Autoantígeno del islote pancreático 1; Islet cell autoantigen 1</i>
IDO	Indolamina 2,3-dioxigenasa
iDPPIV	Inhibidor del enzima dipeptidilpeptidasa IV
IFN	Interferón
IGRP	Glucosa-6-fosfatasa específica del islote; <i>Islet specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit –related protein</i>

IL	Interleuquina
iTregs	Células T reguladoras inducibles
LADA	Diabetes latente autoimmune del adulto; <i>Latent Autoimmune Diabetes of the Adults</i>
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad; <i>Major histocompatibility complex</i>
mTECs	Células epiteliales medulares tímicas
NOD	Ratón diabético no obeso; <i>Non obese diabetic mice</i> ,
nTegs	Células T reguladoras naturales
NK	Natural killer
NKT	Célula T natural killer
PD-1	<i>Programmed death-1</i>
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa; <i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative polymerase chain reaction</i>
TCR	Receptor de linfocitos T; <i>T cell receptor</i>
TGF	Factor de crecimiento y transformación; <i>Transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral; <i>tumor necrosis factor</i>)
Tregs	Células T reguladoras

INDICE

Resumen

1. PRESENTACIÓN DE LA TESIS	15
2. INTRODUCCIÓN	17
2.1. <u>DIABETES MELLITUS TIPO 1</u>	18
2.1.1. Generalidades	18
2.1.2. Etiopatogenia	19
2.1.2.1. Factores genéticos	19
2.1.2.2. Factores ambientales	20
2.1.2.3. Factores inmunológicos	20
2.2. <u>DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y AUTOINMUNIDAD</u>	20
2.2.1. Tolerancia inmunológica	21
2.2.1.1. Tolerancia inmunológica central	21
2.2.1.2. Tolerancia inmunológica periférica	23
2.2.2. Inmunopatogenia de la diabetes mellitus tipo 1	26

2.3.	<u>MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1: EL RATÓN NOD</u>	29
2.4.	<u>ESTRATEGIAS INMUNOMODULADORAS EN DIABETES MELLITUS TIPO 1</u>	31
2.5.	<u>MOLÉCULA CD26/DPPIV</u>	33
2.5.1.	Estructura y función	33
2.5.2.	Molécula CD26/DPPIV y sistema inmunitario	34
2.5.2.1.	CD26/DPPIV y linfocitos T	35
2.5.2.2.	CD26/DPPIV y citoquinas/quimiocinas	36
2.5.2.3.	CD26/DPPIV y timo	37
2.5.3.	Enfermedad autoinmunitaria e inhibición de la molécula CD26/DPPIV	38
3.	HIPÓTESIS	41
4.	OBJETIVOS	45
5.	ARTÍCULOS PUBLICADOS	49
5.1.	<u>ARTÍCULO NÚMERO 1</u>	51
	<i>Type 1 Diabetes Prevention in NOD Mice by Targeting DPPIV/CD26 Is Associated with Changes in CD8⁺T Effector Memory Subset</i>	

5.2. <u>ARTÍCULO NÚMERO 2</u>	76
<i>CD26/DPPIV inhibition alters the expression of immune response-related genes in the thymi of NOD mice</i>	
6. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS	90
6.1. <u>ARTÍCULO NÚMERO 1</u>	91
6.2. <u>ARTÍCULO NÚMERO 2</u>	92
7. DISCUSIÓN	94
8. CONCLUSIONES	106
9. LÍNEAS DE FUTURO	108
10. BIBLIOGRAFÍA	112
11. ANEXO 1	126
12. ANEXO 2	128

RESUMEN

Resumen en castellano

La molécula CD26 es una glicoproteína multifuncional transmembrana tipo II con actividad peptidasa intrínseca en su dominio extracelular, también conocida con dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV). En el sistema inmunitario, la molécula CD26/DPPIV desempeña importantes funciones en la activación de las células T, así como en los procesos de maduración y migración de los timocitos. Se ha descrito que la inhibición de la molécula CD26 puede prevenir e incluso revertir la diabetes autoinmune de reciente diagnóstico en el ratón NOD (*non obese diabetic*). Sin embargo, los mecanismos implicados en este efecto se desconocen. El objetivo de este proyecto de tesis doctoral fue evaluar el efecto del tratamiento con el inhibidor del DPPIV (iDPPIV), MK626, sobre la incidencia de diabetes mellitus tipo 1 (DM1), y analizar los mecanismos de tolerancia inmunológica periférica y central potencialmente involucrados en la reducción del ataque autoinmunitario contra la célula β pancreática.

El iDPPIV MK626 se administró a través de la dieta a un grupo de ratones NOD en una etapa pre-clínica de la diabetes (a las 6-8 semanas de edad), y se comparó con un grupo control de ratones NOD no tratados. Por un lado, se evaluó la incidencia de diabetes en un grupo de ratones NOD seguidos hasta las 30 semanas de vida. Por otro lado, se evaluaron cambios en el infiltrado linfocitario del islote pancreático así como en el porcentaje y fenotipo de las diferentes subpoblaciones periféricas y centrales por citometría de flujo. Asimismo, se analizó si el iDPPIV inducía modificaciones en la expresión génica del timo a través de tecnología de microarrays, y cambios en la expresión genética de los autoantígenos β pancreáticos y del gen *Aire* en las células epiteliales tímicas (TECs) mediante qRT-PCR. En general, estos efectos fueron evaluados a las 4 y 6 semanas de tratamiento.

El tratamiento con el iDPPIV disminuyó la incidencia de diabetes y la insulinitis a la semana 6 de tratamiento. No se observaron diferencias en el porcentaje de las diferentes subpoblaciones del compartimento periférico y central entre ratones tratados y controles. El MK626 aumentó la expresión de CD26 en la subpoblación de linfocitos T $CD8^+$ memoria efectora ($CD8^+_{EM}$) del bazo y ganglio pancreático, y en los linfocitos T $CD8^+$ del

infiltrado linfocitario pancreático. En estudios *in vitro*, los linfocitos T CD8⁺_{EM} mostraron una mayor capacidad proliferativa y de secreción de citoquinas en presencia del MK626, así como un efecto inmunosupresor sobre la activación de la célula T. A nivel central, el tratamiento con MK626 indujo una mayor expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria incluyendo tolerancia central. No se encontraron diferencias en la expresión génica de autoantígenos pancreáticos ni del gen *Aire* en la TECs.

En conclusión, la administración del iDPPIV en una etapa pre-clínica previene el desarrollo de DM1 en el modelo de ratón NOD y reduce el infiltrado linfocitario del islote pancreático. Este efecto se asocia a nivel periférico a un aumento de la expresión de CD26 en los linfocitos T CD8⁺_{EM}. Estudios *in vitro* sugieren un papel inmunoregulador de esta subpoblación, y podría estar implicada en la protección del ataque autoinmunitario contra la célula β pancreática observada al administrar el iDPPIV MK626. Asimismo, el iDPPIV MK626 altera la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario en el timo y podría contribuir a la prevención de la DM1 en el ratón NOD.

Resumen en inglés

The type II transmembrane glycoprotein CD26, also known as dipeptidyl peptidase IV, is a multifunctional protein with a biologically active extracellular domain. In the immune system, CD26/DPPIV plays a role in T-cell function and is also involved in thymic maturation and emigration patterns. It has been described that DPPIV inhibition delays the onset of type 1 diabetes and reverses the disease in *non obese diabetic* (NOD) mice. The aim of the present doctoral thesis project was to assess the effect of the DPPIV inhibitor MK626 in type 1 diabetes incidence (T1D), and to evaluate the mechanisms of peripheral and central tolerance potentially involved in the protection against autoimmunity to β pancreatic islets.

MK626 was administrated through the diet in a group of NOD mice during the pre-diabetic state (starting at 6-8 weeks of age), and compared with a group of untreated NOD mice. Diabetes incidence was evaluated in a group of NOD mice followed until 30 weeks of age. On the other hand, we evaluated the effects of MK626 on pancreatic islet infiltrate and percentage and phenotyping of the T lymphocyte subsets at central and peripheral compartments by flow cytometry were assessed. Moreover, we analyzed if the iDPPIV inhibitor modifies the expression of genes in the thymus by microarray analysis and changes in β -cell autoantigens and *Aire* gene expression in thymic epithelial cells (TECs) were also evaluated by using qRT-PCR. In general, these effects were evaluated at 4 and 6 weeks of treatment.

MK626 treatment reduces T1D incidence and insulinitis after 6 weeks of treatment. No differences were observed in the percentage of T lymphocyte subsets from central and peripheral compartments between treated and control mice. MK626 increased the expression of CD26 in CD8⁺ T effector memory (T_{EM}) from spleen and pancreatic lymph nodes and in CD8⁺ T cells from islet infiltration. In *in vitro* assays, CD8⁺T_{EM} cells showed an increased proliferation rate and cytokine secretion in the presence of MK626. Moreover, the combination of CD8⁺ T_{EM} cells and MK626 induces an immunosuppressive response. In the central compartment, MK626 treatment induced an increased expression in genes implicated mainly in the immune response including central tolerance. No differences were observed in the expression of β -cell autoantigens and *Aire* gene in TECs.

In conclusion, treatment with the DPPIV inhibitor MK626 in the pre-clinical stage prevents T1D in association to a reduction of insulinitis and an increased expression of CD26 in CD8⁺ T_{EM} lymphocyte subset. *In vitro* assays suggest an immunoregulatory role of CD8⁺ T_{EM} cells that may be involved in the protection against autoimmunity to β -cells associated to DPPIV inhibitor treatment. Likewise, the DPPIV inhibitor MK626 alters the expression of the immune response-related genes in the thymus, and may contribute to the prevention of T1D.

1. PRESENTACIÓN DE LA TESIS

Esta tesis se presenta en forma de compendio de publicaciones según la normativa aprobada por la Comisión de Doctorado de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral forman parte de una línea de investigación iniciada en 2011, y dirigida a evaluar el efecto del tratamiento con el inhibidor del DPPiV MK626 en la prevención de diabetes autoinmune en el ratón NOD e investigar los mecanismos de tolerancia inmunológica periférica y central que podrían estar implicados en dicha prevención. Los resultados obtenidos han aportado información relevante en este campo, con un notable interés translacional a la clínica. Estos resultados han sido publicados en forma de 2 artículos en revistas de impacto internacional, en donde el doctorando es el primer firmante en todos ellos.

El presente trabajo ha estado financiado por una beca de la European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD), del Instituto de Salud Carlos III (PI 1102621) así como de la Sociedad Española de Endocrinología.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. DIABETES MELLITUS TIPO 1

2.1.1. Generalidades

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad de origen autoinmunitario, que se caracteriza por la destrucción selectiva de las células β pancreáticas productoras de insulina (1). En la historia natural de la DM1, existe un primer periodo subclínico asintomático (pre-diabetes) que puede durar meses e incluso varios años, durante el cual se produce una infiltración linfocitaria progresiva de los islotes pancreáticos por células T autorreactiva que se acompaña de una destrucción de la masa de células β pancreáticas y, que conduce al déficit en la producción de insulina y a la hiperglucemia (2). En esta fase subclínica, los individuos aún mantienen un estado de normoglucemia, y es posible detectar anticuerpos en suero como marcadores de autoinmunidad frente a la célula β (3). La aparición de la enfermedad clínica se produce tras la destrucción de un 80-90% de la masa celular β . Por otro lado, existe un porcentaje de individuos adultos generalmente diagnosticados de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) que presentan positividad para los anticuerpos asociados a la DM1, pero a diferencia de ésta presentan un deterioro lento y progresivo de la función β pancreática. El término LADA (*Latent Autoimmune Diabetes of the Adults*) fue acuñado en 1993 para referirse a esta situación, y afecta al 5-15% de los pacientes que se presentan clínicamente en la edad adulta como DM2. Esta entidad clínica, a diferencia de la clásica DM1, puede ser controlada inicialmente con medidas higiénico dietéticas y/o hipoglucemiantes orales, pero debido a la disminución progresiva en la secreción de insulina y a la aparición de clínica de insulinopenia, los individuos afectados de diabetes tipo LADA precisarán de insulino terapia a corto plazo para el control metabólico, que en la mayoría de los casos ocurre entre los 3 y 6 años desde el momento del diagnóstico (4, 5). La diabetes tipo LADA es una enfermedad con un fenotipo altamente heterogéneo, de base autoinmune, pero que comparte características clínicas, genéticas y metabólicas tanto de DM1 como de DM2 según datos recientes (6, 7).

2.1.2. Etiopatogenia

Pese a los avances realizados en las últimas décadas, los mecanismos exactos de la etiopatogenia de la DM1 no se conocen. La DM1 es una enfermedad multifactorial, y aparece como resultados de diversas y complejas interacciones entre la predisposición genética, los factores ambientales y el sistema inmunológico (8). Así, sabemos que sobre una base de predisposición genética, la acción de factores ambientales desencadena un proceso autoinmune de destrucción selectiva de las células β del páncreas mediado por células T y B autorreactivas (Figura 2).

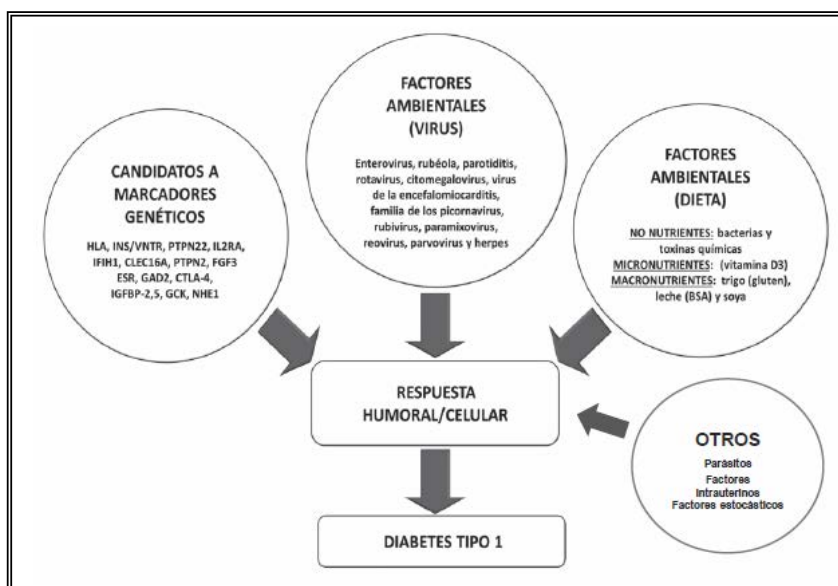


Figura 2: Interacción entre factores genéticos y ambientales sobre la respuesta inmunológica en la diabetes mellitus tipo 1. *Adaptada de Sala. F et al. 2013*

2.1.2.1. Factores genéticos

Aunque la mayoría de los pacientes con DM1 no tienen familiares de primer grado afectados, existe una agregación familiar significativa, con un riesgo del 6% en hermanos, mientras que no supera el 0.4% en el resto de la población (9). Aun así, la concordancia entre hermanos gemelos monocigotos es sólo de un 30-50%. Este hecho indica que los factores genéticos no explican completamente la aparición de la enfermedad, sino que también intervienen otros factores ambientales en el inicio del proceso autoinmunitario.

En la actualidad, mediante estudios de ligamiento y de asociación del genoma, se han identificado más de 50 *loci* (regiones cromosómicas) genéticos de susceptibilidad, denominados IDDM, para el desarrollo de la enfermedad e indican que, en la mayoría de los casos, la DM1 se trata de una enfermedad poligénica. La mayoría de estos genes codifican proteínas implicadas en la función y regulación del sistema inmunitario (10, 11). El factor genético de más riesgo (50%) es debido al polimorfismo de los genes de la región del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II (IDDM1) (10-17).

2.1.2.2. Factores ambientales

Existen evidencias que apoyan la hipótesis de que los factores ambientales tienen una influencia crucial en el inicio del proceso autoinmune, aunque a día de hoy no están del todo claros debido a que el proceso autoinmunitario se inicia años antes del diagnóstico dificultando así el estudio de los desencadenantes de la enfermedad. Entre los factores relacionados más estudiados destacan las infecciones víricas y la dieta (18, 19).

2.1.2.3. Factores inmunológicos

En la DM1, los linfocitos T tanto CD4⁺ como CD8⁺, y B autorreactivos juegan un papel activo en la destrucción de la célula β pancreática. No obstante, tal y como se ha comentado con anterioridad, y al igual que ocurre con otras enfermedades autoinmunitarias, los mecanismos exactos que llevan a una disfunción del sistema inmunitario y a la pérdida de la tolerancia inmunológica, se desconocen.

2.2. DIABETES MELLITUS TIPO 1 Y AUTOINMUNIDAD

El presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto del inhibidor del DPPIV (iDPPIV), MK626, sobre los mecanismos inmunológicos de tolerancia central y periférica implicados en el inicio de la respuesta autoinmunitaria en el modelo animal de

DM1, el ratón diabético no obeso (NOD: *non obese diabetic*). Por ello, a continuación se resumen los aspectos más relevantes relacionados con la tolerancia inmunológica y la respuesta autoinmunitaria asociada a la DM1

2.2.1. Tolerancia inmunológica

La tolerancia se define como la incapacidad del sistema inmunitario para reaccionar frente a un antígeno específico. En este sentido, existe un conjunto de mecanismos que tienen la función de asegurar la autotolerancia, que es la tolerancia frente a antígenos propios del organismo. El fallo de la autotolerancia contribuye a la autoinmunidad. Así, las enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano, como la DM1, se caracterizan por la existencia de un fallo en estos mecanismos de tolerancia a los antígenos propios. Los mecanismos centrales se desarrollan en los órganos linfoides primarios durante la diferenciación de los linfocitos (timo para linfocitos T y médula ósea para los linfocitos B), y su función principal es eliminar de manera selectiva los clones de linfocitos T y B que presentan receptores con alta afinidad para los antígenos propios antes de su salida a sangre periférica. Debido a que este mecanismo no es perfecto, algunos linfocitos autorreactivos llegan a los órganos linfoides secundarios. En este caso, son los mecanismos de tolerancia inmunológica periférica los encargados de la inactivación de estas células autorreactivas.

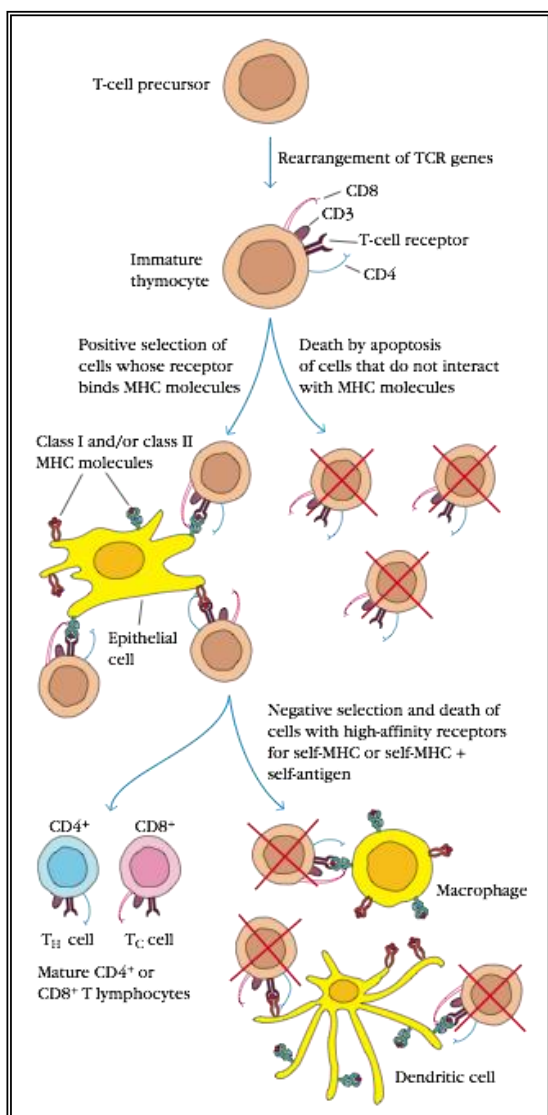
Aceptada la existencia de estos dos mecanismos protectores, es probable que para que se desarrolle una enfermedad autoinmunitaria, sea necesaria tanto la presencia de células autorreactivas, como la existencia de una ruptura en los mecanismos de tolerancia periférica. Es decir, que existan varios fallos o errores en diferentes puntos de control del proceso de tolerancia inmunológica (20, 21).

2.2.1.2. Tolerancia inmunológica central

La tolerancia central representa el primer y más importante punto de control de la respuesta autoinmunitaria. El timo es el órgano responsable del establecimiento de la tolerancia central a través de la eliminación de clones de linfocitos T autorreactivos. Se sabe, que un fallo de los mecanismos centrales de tolerancia en el timo frente a

autoantígenos de la célula β pancreática, juega un papel crucial en la patogénesis de la DM1 (22).

Las células epiteliales de la corteza tímica presentan péptidos derivados de autoantígenos en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; *major histocompatibility complex*). En el proceso de maduración de los linfocitos T (timocitos), aquellos cuyo receptor (TCR; *T-cell receptor*) no es capaz de interactuar adecuadamente con las moléculas del MHC, vuelven a reordenar su TCR o mueren por apoptosis. Mediante este proceso de selección positiva, sólo aquellos timocitos que reconocen con moderada afinidad los péptidos propios logran llegar a su fase final de maduración en la médula tímica. En la médula, las células epiteliales tímicas y las células dendríticas (CDs) son las responsables de la presentación de autoantígenos a los timocitos.



En esta fase, los timocitos con un TCR capaz de interactuar con gran afinidad ante los antígenos propios son eliminados por apoptosis, mecanismo conocido como selección negativa (Figura 3). La selección negativa es el mecanismo más importante del proceso de la autotolerancia (23). Así pues, tras los procesos de selección positiva y negativa, sólo maduran y salen del timo aquellos linfocitos que pueden interactuar con moléculas del MHC pero no reconocen autoantígenos.

Figura 3: Tolerancia inmunológica central. Mecanismos de selección positiva y negativa de los timocitos. Adaptado de *Kuby Immunology, 6th Edición, 2007.*

Por otro lado, se sabe que el timo es fundamental en el establecimiento de tolerancia central a antígenos ubicuos. No obstante, recientemente se ha observado que en el timo también se genera la tolerancia frente a muchos antígenos periféricos de baja expresión (24). Así, se ha demostrado que las células epiteliales medulares tímicas (mTECs) tienen capacidad para presentar de forma “promiscua” antígenos, en principio, restringidos a otros tejidos, como la insulina. Esta presentación está regulada por el cofactor de transcripción AIRE (*Autoimmune Regulator*), expresado por las mTECs, y es imprescindible para la inducción de tolerancia de los linfocitos T frente a autoantígenos específicos de tejido (25).

2.2.1.3. Tolerancia inmunológica periférica

En cualquier individuo puede considerarse normal la presencia en circulación de un porcentaje bajo linfocitos T maduros con capacidad autorreactiva. Esto puede suceder si el reconocimiento del autoantígeno es de baja afinidad, por lo que no es eficientemente deletado a nivel tímico. Alternativamente, es posible que el autoantígeno reconocido sea de expresión restringida a un tejido, y no hay sido presentado en el timo. Por esta razón, resulta necesaria la existencia de mecanismos, fuera de los órganos linfoides primarios, que mantengan la autotolerancia. Estos mecanismos de tolerancia periférica se desarrollan a nivel de órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo, sistema inmunitario cutáneo y mucosas) y en tejidos no linfoides. La tolerancia periférica de linfocitos T se lleva a cabo mediante diferentes mecanismos descritos: delección clonal, anergia, ignorancia inmunológica y supresión (26).

Uno de los mecanismos de tolerancia inmunológica periférica lo llevan a cabo las células T reguladoras (Tregs). Las células Tregs actúan suprimiendo la activación del sistema inmunitario mediante su influencia sobre otras poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y sobre células presentadoras de antígenos (APCs; *antigen presenting cells*), y tienen un papel relevante en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y la homeostasis inmune (27). Se sabe, que alteraciones en el desarrollo o en la función de las Tregs causa enfermedades autoinmunes tanto en humanos como en animales (28).

La familia de las células Tregs es heterogénea y compleja. Su caracterización a nivel de marcadores de superficie específicos ha sido históricamente controvertida debido a la falta de marcadores exclusivos para su identificación. La gran diversidad de

marcadores descritos hace pensar que existen distintas poblaciones de células Tregs las cuales presentan diferentes fenotipos y origen, así como distintos mecanismos de acción. El marcador más específico de Tregs es el factor de transcripción *Forkhead box P3* (Foxp3) que resulta imprescindible tanto para su desarrollo como para su funcionalidad (23, 29). No obstante, existe controversia sobre la exclusividad en la expresión de Foxp3 por las Tregs, ya que datos recientes apuntan a que las células T CD4⁺ activadas también expresan Foxp3 (30). Los dos principales tipos de linfocitos CD4⁺ Tregs son las células T reguladoras naturales (nTreg) y las células T reguladoras inducibles (iTreg) a partir de células CD4⁺ naïve. Los linfocitos nTregs, con fenotipo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, se originan en el timo y migran a los ganglios linfáticos regionales. Estas células, tras ser activadas por el antígeno específico, poseen la capacidad de suprimir la proliferación y diferenciación de las células T naïve, así como la capacidad efectora de las células T diferenciadas CD4⁺ y CD8⁺, las CD, las células B, natural killer (NK) y otros grupos celulares.

Se han propuesto diferentes mecanismos de acción por los cuales las células CD4⁺ Tregs median la supresión de las células efectoras (Figura 4). Dentro de los principales mecanismos descritos están: a) mecanismo dependiente de las citoquinas inmunosupresivas, especialmente de la interleuquina (IL) 10 y del factor de crecimiento β (TGF- β ; *transforming growth factor*); b) un mecanismo citolítico directo por medio de la vía de las granzimas-perforinas sobre células T efectoras y sobre APCs; c) un mecanismo de competencia, en el que las células Tregs consumen los factores de crecimiento y supervivencia tales como la IL-2; d) un mecanismo de inhibición de la maduración y función de las APCs. Las Tregs pueden disminuir la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 en las APCs a través de un mecanismo dependiente del factor 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4; *Cytotoxic T lymphocyte-associated factor 4*) (27, 31).

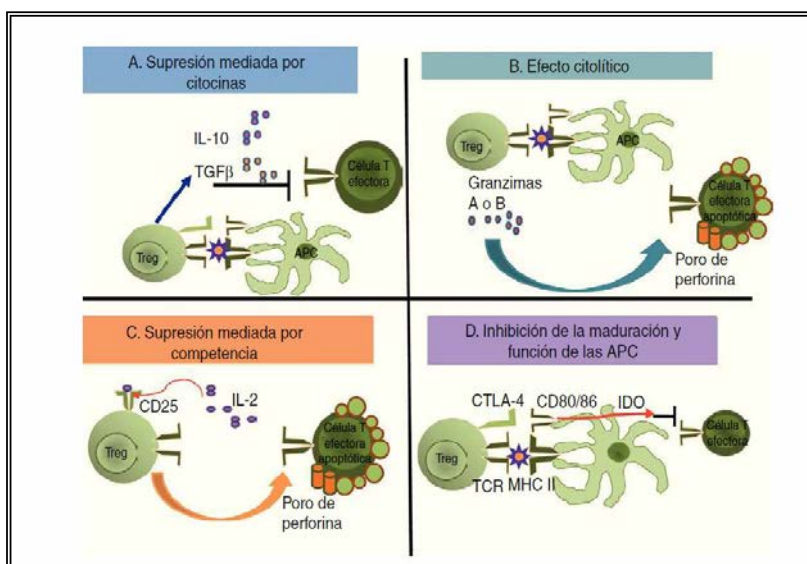


Figura 4: Mecanismos de supresión de células efectoras mediados por células T reguladoras CD4⁺CD25⁺. Adaptado Limón-Camacho L et al.²⁹

Desde un punto de vista clínico, se han estudiado las células $CD4^+$ Tregs de sangre periférica de pacientes con enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano, entre ellas la DM1. En la mayoría de estos estudios, no se han hallado diferencias cuantitativas entre las Tregs de sangre periférica de pacientes y de individuos sanos (32-34). En cambio, sí se han descrito, en la mayoría de ellos, alteraciones en la función de las Tregs de los pacientes con enfermedades autoinmunitarias al compararla con la de los sujetos sanos (35, 36).

Las células T $CD4^+$ no son las únicas con propiedades reguladoras, pues existe otras subpoblaciones con actividad inmunosupresora, que incluye a los linfocitos T supresores $CD8^+$, así como NK o linfocitos B reguladores. En relación a los linfocitos T $CD8^+$, se sabe que presentan un papel dual en las enfermedades autoinmunes: efectores y supresores de la respuesta autoinmunitaria (37-40). Defectos en la función y/o en el número de células Tregs $CD8^+$ se correlaciona con un aumento en la incidencia y gravedad de las enfermedades autoinmunitarias (34, 41). Dentro de las células Tregs $CD8^+$, se han descrito, tanto en humanos como en modelos animales, varias subpoblaciones con distintos marcadores fenotípicos y distintos mecanismos de acción, lo que da lugar a una subpoblación altamente heterogénea y de difícil caracterización puesto que no existe un marcador específico para su identificación (39, 40, 42). La mayoría de las células Tregs $CD8^+$ son inducidas tras una estimulación antigénica, y las más estudiadas son aquellas con fenotipo $CD8^+CD28^-$ (39, 40). Se ha descrito una disminución significativa de esta subpoblación en paciente afectados de DM1 comparado con controles sanos (34). Los mecanismos de acción propuestos a través de los cuales estas células Tregs $CD8^+CD28^-$ suprimen la respuesta inmunitaria incluyen: supresión mediada por contacto célula-célula, secreción de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF β) y citotoxicidad directa sobre las células diana (Figura 5) (42).

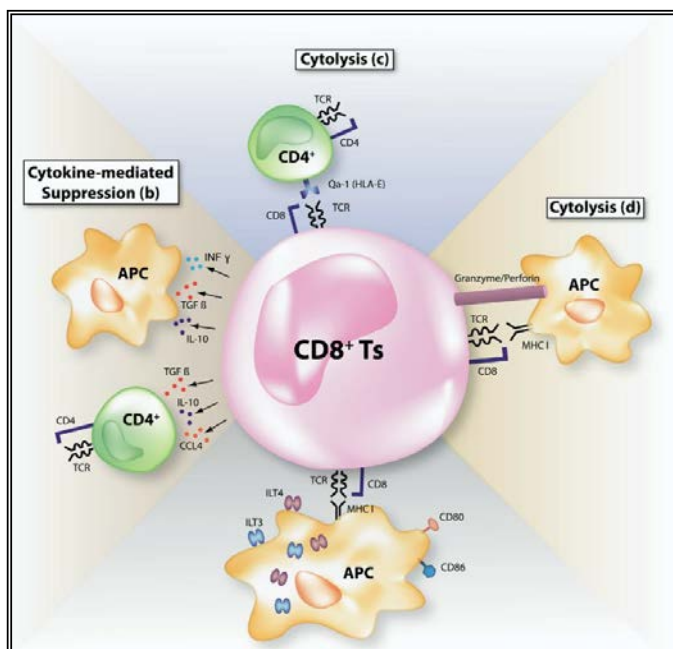


Figura 5: Mecanismos propuestos de supresión por las células T supresoras $CD8^+$. (a) $CD8^+CD28^-Foxp3^+$ aumentan la expresión de receptores inhibidores (ILT3 and ILT4 immunoglobulin-like transcript 3 y 4) y disminuyen la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80/CD86) en las APCs, induciendo un estado tolerogénico en las APCs. (b) Supresión sobre APCs o $CD4^+$ efectoras mediada por citoquinas como IL-10, TGF- β , IFN- γ y CCL4 secretadas por Ts $CD8^+$. (c) Citotoxicidad contacto célula-célula sobre linfocitos T $CD4^+$ que expresan Qa1 (molécula del MHC clase Ib). (d) Citotoxicidad directa sobre células diana a través de granzimas y perforinas. Adaptado de Suzuki, M et al.⁴⁰

Además en el modelo murino se ha identificado una subpoblación de células reguladoras con fenotipo $CD8^+CD122^+$, que podrían ser equiparables a las Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, pero cuya caracterización fenotípica ha sido menos estudiada y no está del todo establecida (43, 44). Y aunque los mecanismos de su capacidad supresora no se conocen con exactitud, parece que estos linfocitos Tregs $CD8^+CD122^+$ suprimen la autoinmunidad principalmente a través de la producción de IL-10 (43, 45, 46).

2.2.2. Inmunopatogenia de la diabetes mellitus tipo 1

En la DM1, el sistema inmunitario deja de tolerar a las células β productoras de insulina y las ataca selectivamente. La autoinmunidad contra la célula β es un proceso altamente dinámico que conlleva una compleja interacción entre las células β pancreáticas y diversos componentes del sistema inmunitario todavía hoy no bien conocidos, destacando un proceso inflamatorio que contribuye a la cronificación de la DM1. En esta compleja interacción participan los linfocitos T, las APCs, la inmunidad innata, los linfocitos B y otras células inmunitarias como las NK o linfocitos T de tipo NK (NKT) (47).

Los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ autorreactivos son los principales responsables del inicio y progresión de la destrucción de las células β pancreáticas. Ambas subpoblaciones son necesarias para el inicio de la diabetes, pero existen controversias sobre su papel específico en la patogénesis de la destrucción de la célula β (48). Existen datos que apuntan a que la citotoxicidad sobre la célula β pancreática está causada principalmente por linfocitos T $CD8^+$, pero éstos necesitan la colaboración de los linfocitos T $CD4^+$. No obstante, se desconoce con exactitud si el reclutamiento de linfocitos T $CD8^+$ precede, acompaña o sigue al reclutamiento de linfocitos T $CD4^+$ (49). Diferentes estudios en el modelo animal NOD apuntan a una captación inicial de autoantígenos procedentes de células β por las APCs del islote, coincidiendo con la apoptosis masiva de células β característica de la maduración fisiológica del páncreas endocrino en este modelo o tras un daño celular. Estas APCs se activarían y migrarían a los ganglios linfáticos donde presentarían los autoantígenos unidos a moléculas del MHC de clase II a linfocitos T autorreactivos $CD4^+$ y de clase I a $CD8^+$ que han escapado de la selección negativa del timo. Los linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos migrarían a los islotes e iniciarían la destrucción

directa de las células β a través del receptor Fas y mediante la secreción de perforinas y granzimas. Así pues, los linfocitos T $CD8^+$ son considerados los responsables del primer ataque contra la célula β . En una segunda fase, los autoantígenos liberados en el primer ataque serían de nuevo captados, procesados y presentados por APCs en el ganglio linfático o a nivel insular a linfocitos T $CD4^+$ colaboradores y citolíticos, que juntamente con los linfocitos T $CD8^+$ infiltrarían los islotes y a través de citoquinas y quimiocinas procedentes de la inmunidad innata, reclutarían más leucocitos, amplificando la respuesta autoinmunitaria y contribuyendo al proceso destructivo de la célula β pancreática (47, 50).

Recientes estudios sugieren que un defecto en la función supresora de las Tregs representa un factor importante en el desarrollo de la DM1 (51). La ablación completa o la disfunción de las Tregs puede provocar diabetes autoinmune. En cambio, la infusión de células Tregs autólogas preserva la función de la célula β en niños con DM1 de reciente diagnóstico (27, 52, 53).

Aunque las células responsables de la destrucción de las células β pancreáticas son los linfocitos T, en el desarrollo de la enfermedad también participan otros componentes del sistema inmunitario. En el inicio del proceso autoinmune, la inflamación mediada por la inmunidad innata produce y amplifica el ataque a las células β , y en estadios posteriores, estabiliza y mantiene la insulitis. (54). Por otro lado, las APCs (macrófagos y CD) juegan un papel relevante como puente entre la inflamación y la autoinmunidad. Los macrófagos tienen una gran capacidad fagocítica y secretora de mediadores de inflamación y citotóxicos. Además, inducen la apoptosis de las células β a través de citoquinas (TNF- α , IFN- γ e IL-1 β), lo que unido a un defecto para eliminar los cuerpos apoptóticos, perpetúa el proceso autoinmune. Se sabe que de manera fisiológica se produce la apoptosis masiva de células β tanto en humanos como en ratones NOD, coincidiendo con etapas de remodelación insular. Si estas células apoptóticas son captadas y eliminadas rápidamente por las APCs, se generan CD tolerogénicas que inactivan a los linfocitos autorreactivos e inducen tolerancia. Este proceso, denominado esferocitosis, contribuye a la homeostasis inmunológica. En la DM1 se han identificado defectos en este proceso, bien por defectos en la fagocitosis o por exceso de producción (55). Otro grupo celular, los linfocitos B desempeñan también un papel primordial en el desarrollo de la DM1, tal y como ha quedado demostrado en el ratón NOD (56, 57). Se ha propuesto dos funciones principales para las células B en la patogénesis de la DM1. Por un lado, parecen tener un papel importante en la respuesta autoinmunitaria actuando como APCs capaces de producir la activación y expansión de los linfocitos T autorreactivos $CD4^+$ y $CD8^+$. Por otro lado, los linfocitos B autorreactivos se diferencian en

células productoras de anticuerpos contra autoantígenos. Así pues, aunque la DM1 se ha descrito como una enfermedad autoinmunitaria mediada por mecanismos efectores de tipo celular, paralelamente se pueden detectar autoanticuerpos contra antígenos propios del islote pancreático en el suero de pacientes, incluso antes de la aparición de los primeros síntomas clínicos. Sin embargo, no se conoce con exactitud si estos autoanticuerpos juegan un papel directo en la patogénesis de la enfermedad o simplemente son meros marcadores periféricos del ataque autoinmunitario que se está desarrollando en los islotes pancreáticos (50, 58). De hecho, en etapas más avanzadas de la diabetes autoinmune, estos autoanticuerpos tienden a desaparecer, lo que traduce la destrucción total de los islotes pancreáticos y la consecuente atenuación de la respuesta autoinmunitaria.

Un punto clave en el entendimiento del ataque autoinmunitario que origina la DM1, es la identificación de los autoantígenos hacia los que éste va dirigido. Los autoantígenos diana en la DM1 son la insulina, descarboxilasa del ácido glutámico (GAD; *Glutamic acid decarboxylase*), proteína tirosina fosfatasa (IA-2; *Islet antigen-2*), la glucosa-6-fosfatasa específica del islote (IGRP; *islet specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit –related protein*), y el transportador de Zinc8 (ZNT8; *Zinc transporter 8*). Al inicio de la enfermedad, la respuesta T es restringida contra un reducido número de autoantígenos del islote pancreático, aunque más adelante, y posiblemente debido a la propia destrucción de las células β por parte de los linfocitos T, se produce una expansión en la diversificación de autoantígenos disponibles (proceso denominado *antigenic spreading*). No se sabe con certeza cuál es el autoantígeno reconocido inicialmente, aunque existen evidencias que sugieren que la insulina y su epítipo dominante B9-23 desempeñan un papel primordial en el inicio de la diabetes autoinmune, tanto en el ratón NOD como en humanos (48). Por otro lado, se sabe que un defecto en los mecanismos centrales de tolerancia frente a autoantígenos de la célula β pancreática, es crucial en la patogénesis de la respuesta autoinmunitaria en la DM1 (22). La presentación promiscua en el timo por parte de las mTECs de antígenos del islote pancreático promueve la selección negativa de clones de linfocitos T con TCR capaz de interactuar con gran afinidad hacia estos autoantígenos, y da lugar a la generación de células nTegs específicas de estos autoantígenos. Así, en modelos animales de DM1, se ha observado una ausencia o descenso en la presentación de autoantígenos del islote pancreático por las mTECs a los timocitos durante los procesos de selección tímica, lo que conlleva la presencia de un repertorio de células T autorreativas con TCR capaz de interactuar

contra antígenos relacionados con la DM1, así como un defecto en la generación tímica de células nTregs específicas (22).

Por último, existen evidencias que confieren a la célula β un papel activo en el proceso autoinmune (59). Recientemente, se ha demostrado que en condiciones de estrés e inflamación, las células β pueden hacer modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales de los autoantígenos, generando nuevos epítomos inmunogénicos. Así, si la nueva forma de un autoantígeno no ha sido previamente identificada en el timo y no ha generado tolerancia, se induce una respuesta autoinmunitaria contra el nuevo autoantígeno generado (54). Además, la capacidad de regeneración de las células β inducida por el microambiente inflamatorio insular, supondría una nueva fuente de autoantígenos que retroalimentaría la respuesta autoinmunitaria y la destrucción tisular (54, 60, 61).

2.3. MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA DM1: EL RATÓN NOD

Debido a la dificultad en el acceso al tejido diana en humanos, muchos de los conocimientos sobre la patogénesis de la DM1 se han obtenido usando modelos animales, siendo el más representativo el ratón NOD. La cepa murina NOD ha sido el modelo animal más ampliamente utilizado en el estudio de la DM1, desde que fue descrito en 1980, ya que desarrolla una diabetes autoinmune de forma espontánea con características similares a la enfermedad descrita en humanos, con presencia de linfocitos T autorreactivos CD4⁺ y CD8⁺ y presencia de anticuerpos anti-islole. Además, este modelo desarrolla también una respuesta autoinmunitaria contra otros órganos (glándulas salivales, tiroides, sistema nervioso, próstata). Este hecho refleja, que al igual que ocurre en algunos individuos con DM1, existe un defecto en la tolerancia del sistema inmunológico. Asimismo, al igual que se ha observado en humanos, el principal *loci* de susceptibilidad a la diabetes en el ratón NOD, se encuentra en los genes que codifican para las moléculas del MHC de clase II (Idd1), aunque existen otros *loci* que confieren susceptibilidad a la diabetes (62, 63). Así, este modelo experimental es fundamental en la investigación en DM1, tanto para la identificación de genes de resistencia/susceptibilidad y factores ambientales que modulan su aparición, como para el conocimiento de los mecanismos inmunitarios implicados y los autoantígenos contra los que se dirige la respuesta autoinmunitaria. Por otro lado, el ratón NOD ha contribuido al desarrollo de

nuevas estrategias terapéuticas o preventivas, especialmente mediante la utilización de terapias inmunomoduladoras.

Una de las ventajas de este modelo es que se conoce en qué momento se inicia la respuesta autoinmunitaria, y se dispone de una amplia ventana de tiempo durante la cual el infiltrado leucocitario (insulinitis) se desarrolla de forma subclínica (fase pre-clínica). El infiltrado leucocitario comienza a invadir los islotes pancreáticos a partir de las 3-5 semanas de edad, aunque los efectos clínicos de la enfermedad (glucosuria e hiperglucemia) se manifiestan a partir de las 12 semanas de edad. Si bien todos los individuos pertenecientes a la cepa NOD son genéticamente iguales y todos presentan insulinitis, no todos acaban desarrollando la diabetes clínica, lo que sugiere la existencia de factores estocásticos implicados, como el repertorio linfocitario. Las condiciones ambientales de estabulación (temperatura, humedad, dieta, etc.) en las que se mantiene una colonia de ratones NOD, es crucial en la incidencia y en la edad de aparición de la diabetes en la misma (64). Bajo las condiciones ambientales adecuadas (en condiciones libres de patógenos específicos), aproximadamente el 80% de las hembras y un 20% de los machos NOD acaban desarrollando una diabetes autoinmune antes de las 30 semanas de edad. En nuestra colonia desde 2000, la incidencia de DM1 en las hembras es del 70-99%.

El estudio de las diferentes etapas de la respuesta autoinmunitaria que se desarrolla en los ratones NOD, ha resultado en importantes avances en el conocimiento sobre la patogenia de la DM1. El desequilibrio entre las células T efectoras y las células Tregs es un factor clave que conduce al inicio de la diabetes en el NOD (65). Y, al igual que ocurre en humanos, los linfocitos T, tanto CD4⁺ como CD8⁺, son los principales responsables de la destrucción de las células β pancreáticas. Se han descrito diversos defectos en el sistema inmunitario de estos ratones que podrían afectar al correcto funcionamiento de los mecanismos de tolerancia, tanto central como periférica (66, 67). A nivel de tolerancia central, se han descrito alteraciones en el proceso de selección negativa de linfocitos T autorreactivos en el timo (68), así como un defecto en la expresión del gen *Aire* (69). Como se ha comentado anteriormente, el gen *Aire* es un factor de transcripción que controla la expresión ectópica de numerosos autoantígenos en las mTECs, especialmente aquellos cuya expresión está restringida a ciertos tejidos periféricos. A nivel periférico, se han descrito deficiencias en el número y/o funcionalidad de diversas poblaciones de células T con función reguladora, como las Tregs CD4⁺CD25⁺ (70) y las células T NK (71), así como alteraciones en el proceso de maduración y función de las CDs afectando a su capacidad para estimular la activación de los linfocitos T debido, en

parte, a deficiencias a nivel de moléculas co-estimuladoras (72, 73). Asimismo, se ha descrito una alteración en la función fagocítica de los macrófagos, cuya función es fagocitar y eliminar rápidamente las células apoptóticas resultantes del proceso fisiológico de apoptosis a nivel de las células β pancreáticas. De esta manera, restos de células β apoptóticas pueden quedar expuestas para su presentación por parte de APCs contribuyendo a la respuesta autoinmunitaria (74).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que el ratón NOD presenta peculiaridades en el desarrollo de DM1 que no se observan en humanos: mayor incidencia de diabetes en hembras, insulinitis de grado moderado e incluso severo, mayor predominio de células B y $CD4^+$ en el infiltrado leucocitario y baja diversidad de anticuerpos anti-islole (62). La insulinitis humana, contrariamente a lo que sucede en el ratón NOD, está formada por pocas células, mayoritariamente por linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos y también macrófagos. También se encuentran presentes linfocitos $CD4^+$, linfocitos B y células dendríticas, aunque parece que estas células dominan en etapas iniciales del proceso autoinmunitario (75). Asimismo se ha de tener en cuenta la existencia de diferencias tanto en la inmunidad adaptativa como en la innata entre los modelos murinos y los humanos (76).

2.4. ESTRATEGIAS INMUNOMODULADORAS EN LA DM1

La gran dificultad para el desarrollo de estrategias preventivas o terapéuticas para la DM1 es su etiología aún desconocida. Como enfermedad autoinmune, uno de los retos de las terapias inmunomoduladoras es frenar la destrucción de las células β productoras de insulina (77). En el momento del debut de la DM1, casi un 30% de la masa de células β está preservada manteniendo una secreción de insulina residual que puede durar años, lo que amplía potencialmente el periodo de inmunointervención. No obstante, las estrategias de base inmunológica deberían aplicarse idealmente en la fase pre-diabética asintomática donde se inicia la pérdida de la tolerancia inmunológica a la célula β .

En la última década, numerosas estrategias se han aplicado como inmunoterapias experimentales con el objetivo de prevenir, estabilizar e incluso revertir la DM1. Estas estrategias inmunomoduladoras se han basado en moléculas que bloquean la respuesta autoinmunitaria de forma no antígeno-específica (anticuerpos monoclonales, mayoritariamente) o estrategias antígeno-específicas (administración de autoantígenos), o basadas en terapias celulares, o más recientemente el uso de la nanotecnología, o

combinación de dos o más estrategias (77-83). Muchos de estos tratamientos han conseguido en el modelo NOD, prevenir la DM1, retrasar su aparición, e incluso en algunos casos revertirla (84). En humanos, los ensayos clínicos derivados de estas terapias experimentales inmunomoduladoras no han sido tan positivos y algunas han causado importantes efectos secundarios (85). No obstante, algunos de estos ensayos han conseguido incrementar la producción de insulina endógena, reflejando así la recuperación de la masa de células β y probablemente la disminución del ataque autoinmunitario, pero sin resultados permanentes. Y, evidentemente, la translación de la investigación en DM1 experimental a humanos ha de contemplar las limitaciones del modelo murino y sus diferencias en el sistema inmunológico (62).

Así pues, hasta la actualidad las estrategias de base inmunológica no han obtenido resultados positivos ni en la prevención ni en tratamiento de la DM1 en humanos, acompañándose en muchos casos de importantes efectos secundarios. La terapia inmunomoduladora utilizada en este proyecto, el MK626 pertenece a la familia de inhibidores de la enzima DPPIV. Los iDPPIV representan un grupo farmacológico ya comercializado y ampliamente utilizado para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 desde 2006. El péptido similar al glucagón (GLP-1; *glucagon like peptide-1*) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP; *gastric inhibitory polypeptide*) son péptidos secretados a nivel intestinal por las células enteroendocrinas, y que participan en la secreción pancreática de insulina dependiente de glucosa. Las formas biológicamente activas de GLP-1 y GIP tienen una vida media plasmática corta, al ser rápidamente inactivadas por la actividad proteolítica de la enzima DPPIV. La administración de iDPPIV prolonga la vida media de estos péptidos y estimula la secreción de insulina por la célula β pancreática, mejorando así la tolerancia a la glucosa. Con los fármacos iDPPIV se tiene una elevada experiencia clínica, presentan buena tolerancia y un perfil de seguridad aceptable. Como se comentará más adelante, datos pre-clínicos utilizando terapias con iDPPIV en el modelo murino NOD, han demostrado efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios así como resultados positivos en la preservación y regeneración de la masa de célula β , con un impacto en la prevención de la DM1, incluso, revirtiendo la diabetes autoinmune de reciente diagnóstico en este modelo experimental.

2.5. MOLÉCULA CD26/DPPIV

2.5.1. Estructura y función

El antígeno CD26 es una glicoproteína transmembrana tipo II con actividad peptidasa intrínseca en su dominio extracelular, también conocida con dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV). Fue descrita por primera vez en 1996 por Hopsu-Havu y Glenner. Tiene un peso molecular de 110 kDa y su secuencia está codificada en el cromosoma 2. La molécula CD26 humana está formada por 766 aminoácidos, incluyendo un dominio citoplasmático de 6 aminoácidos, una región transmembrana de 23 aminoácidos, y un dominio extracelular (86) (Figura 6). La molécula CD26/DPPIV se expresa ampliamente en la superficie de muchos tipos celulares de manera constitutiva (pulmón, cerebro, páncreas, riñón, vasos sanguíneos, próstata, útero, timo, ganglios linfáticos y bazo), incluyendo células epiteliales y endoteliales. En las células de estirpe linfoide, se expresa de manera regulada en timocitos maduros, células T y B activadas, monocitos y linfocitos NK. La molécula CD26/DPPIV puede ser considerada una proteína *housekeeping* (87).

Inicialmente se creyó que su única función era la de hidrolizar los dipéptidos a péptidos de aquellas proteínas que presentaban la prolina o alanina en su penúltima posición (actividad serina proteasa) a través de su actividad catalítica DPPIV presente en el dominio extracelular. Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que CD26 ejerce otras funciones además de la proteolítica a través de su unión a proteínas en la membrana celular o en la matriz extracelular, y por este motivo se la considera una proteína multifuncional. Dicha funcionalidad puede modificarse según su localización (intra o extracelular), el tipo celular que la expresa, su estado poli u oligomérico así como las concentraciones de su ligando. Entre sus funciones destacan: a) Actividad proteolítica múltiple: son muchos los péptidos biológicamente activos, como neuropéptidos, hormonas, citoquinas y quimiocinas, que actúan de sustrato para CD26/DPPIV. Esta hidrólisis supone la inactivación de la actividad biológica de estos péptidos y contribuye así la regulación de numerosos procesos biológicos; b) Actúa como receptor funcional del colágeno y la fibronectina, desempeñando un papel como molécula de adhesión; c) Función co-estimuladora en el sistema inmunitario tal y como se describe en el siguiente apartado; d) También está implicada en los mecanismos de apoptosis y adhesión celular (87, 88).

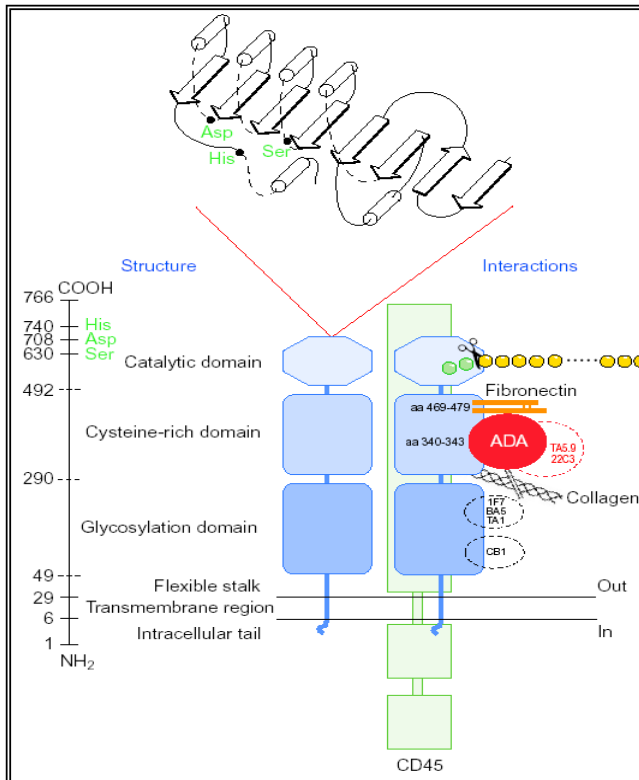


Figura 6: Estructura de la molécula CD26/DPPIV. Adaptado de De Meester. *I et al.*⁸⁵

Asimismo existe una forma soluble de la molécula CD26/DPPIV (sCD26) con ausencia de la región intracelular y transmembrana. sCD26 también posee actividad proteolítica DPPIV, y puede modular *in vitro* la proliferación de las células T (89).

2.5.2. Molécula CD26/DPPIV y sistema inmunitario

Son numerosos los estudios que apoyan el papel inmunomodulador de la molécula CD26/DPPIV desempeñando importantes funciones en la activación de las células T y el sistema inmunitario, aunque los mecanismos exactos se desconocen. Se ha demostrado que CD26/DPPIV participa en la regulación del desarrollo, maduración y migración de las células T, en la producción de citoquinas y de anticuerpos dependientes de células T. Es por ello que a la molécula CD26/DPPIV se le atribuye un importante rol en la patogénesis y desarrollo de las enfermedades autoinmunitarias (90).

2.5.2.2. CD26/DPPIV y linfocitos T

La molécula CD26/DPPIV se expresa de manera constitutiva en aproximadamente el 56% de las células T CD4⁺ y en el 35% de las células T CD8⁺ en la periferia (91). Se la considera un marcador de activación de la célula T, ya que la expresión de CD26/DPPIV en las células T se incrementa después de su activación, tanto en la subpoblación CD4⁺ como CD8⁺. De tal forma que las células T activadas presentan una mayor expresión de CD26, lo que se correlaciona con aumento de la respuesta proliferativa de estos linfocitos T (92). Existe una subpoblación de linfocitos T humanos CD4⁺ con fenotipo memoria (CD45R0+) que presenta una elevada expresión de CD26/DPPIV y que inducen: a) Proliferación de linfocitos T en respuesta al antígeno; b) Producción de citoquinas Th1 (IFN- γ , IL-2); c) Una mayor producción de inmunoglobulinas por las células B y diferenciación de las células B en células plasmáticas; d) Una mayor capacidad de migración transendotelial *in vitro* de estas células T CD26^{high} hacia regiones de inflamación, sugiriendo un papel de CD26/DPPIV en la migración de los linfocitos T. De hecho, en las enfermedades autoinmunes, existe un elevado número de células CD26⁺ en los sitios de inflamación (Figura 7) (86, 88). Por tanto, CD26/DPPIV es un marcador de activación, memoria y migración de los linfocitos T (92).

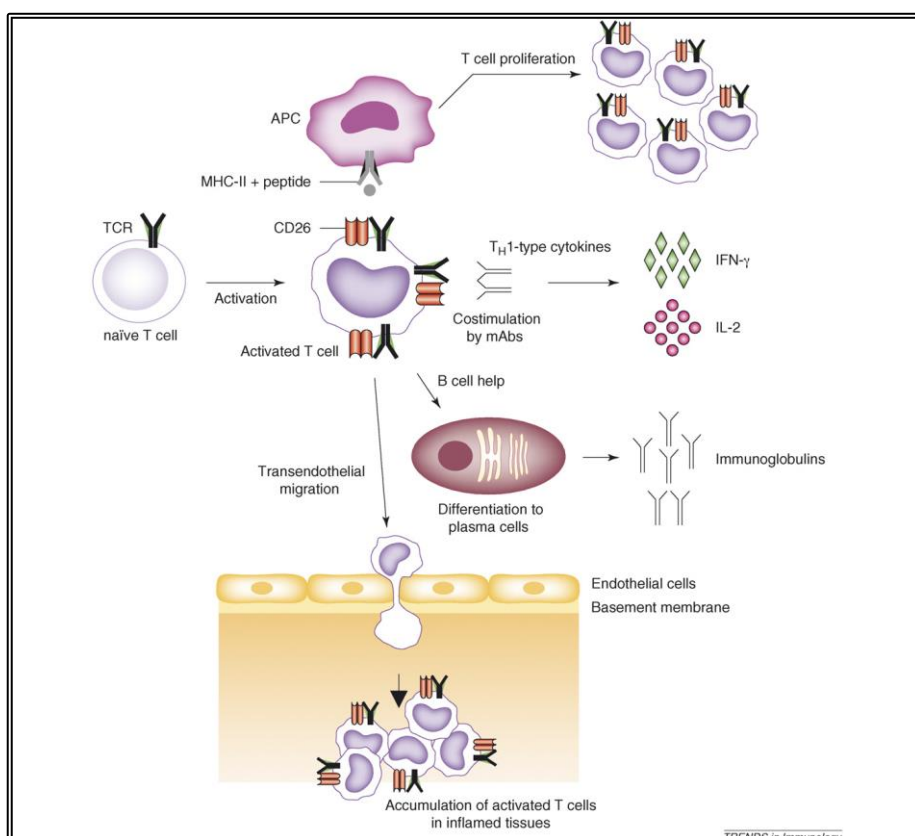


Figura 7: Funciones biológicas de las células T CD26⁺ humanas *in vitro*. Adaptado Ohnuma, K *et al.*⁸³

En los linfocitos T, la expresión de CD26/DPPIV ejerce una función co-estimuladora, aunque los ligandos y el mecanismo exacto por el cual las señales iniciadas por CD26 en la superficie celular son traducidas al interior de la célula no están del todo aclarados. Existen datos *in vitro* que sugieren que la actividad enzimática DPPIV juega un papel importante pero no es esencial para ejercer su función de co-estimulación (93, 94), aunque esta cuestión es controvertida (86). En modelos experimentales, se ha demostrado que CD26/DPPIV interacciona con moléculas como la adenosina deaminasa presente en las CDs, e induce la proliferación de los linfocitos T (88). La unión directa entre CD26 con otras moléculas presentes en la superficie celular como CD45 y ciertos componentes del complejo TCR-CD3 parece ser necesaria para la participación de CD26 en la activación de la célula T (92). Recientemente se ha descrito *in vitro* que la caveolina-1, una proteína de membrana expresada en las APCs, es un ligando de CD26/DPPIV presente en las células T memoria activadas. Dicha interacción podría resultar en un aumento de la expresión de la molécula co-estimuladora CD86 por las APCs, lo que daría lugar a la activación y proliferación de la célula T vía CD28. Adicionalmente, la unión de caveolina-1 y CD26 resulta en el reclutamiento de la molécula CARMA1, una caspasa, que participa en la proliferación de la célula T y la producción de IL-2 a través de la activación de NF- κ B (86, 95). Asimismo, estudios *in vitro* han demostrado la existencia de una interacción funcional entre CD26 y ciertos componentes de la matriz extracelular, como el colágeno y la fibronectina, promoviendo así la migración celular. Además, la molécula CD26/DPPIV actúa como receptor funcional del colágeno e induce la activación de la célula T humanas (90).

2.5.2.3. CD26 y citoquinas/quimiocinas

Como se ha comentado con anterioridad, la expresión de CD26 en las células T es un marcador de respuesta Th1. Sin embargo, a pesar de la existencia de una mayor expresión de CD26 en las células Th1 respecto a las Th2 tras su activación, existen datos que sugieren que ambas poblaciones muestran similar actividad DPPIV debido a modificaciones post-translacionales (87, 93). Estudios *in vitro* utilizando inhibidores competitivos de la molécula CD26/DPPIV, han demostrado una supresión en la producción de IL-2, IL-10, IL-12 e IFN γ en linfocitos T estimulados y un incremento en la secreción de TGF β , sugiriendo que la citoquina inmunosupresora TGF β juega un papel en la inmunosupresión inducida por los inhibidores de CD26/DPPIV (88).

Por otro lado, la actividad proteolítica DPPIV inactiva o altera la especificidad de una serie de quimiocinas que son sustrato de DPPIV como el CCL5, el SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*), la CCL11 (o eotaxina), CXCL11, CXCL12, neuropéptido Y, CXCL10 o CCL22 (o quimiocina derivada de macrófagos) (96).

2.5.2.4. CD26 y timo

El desarrollo y posterior migración de los timocitos en el timo es crucial en la selección de un repertorio de células T, y requiere una compleja interacción entre receptores celulares y otras moléculas accesorias y el microambiente circundante. Aunque existen pocos estudios, se ha descrito que la molécula CD26/DPPIV está implicada en la diferenciación y maduración de los timocitos (97). Asimismo, algunos estudios sugieren que CD26 participa en la migración intratímica de los timocitos posiblemente a través de su función como receptor funcional del colágeno interactuando con la matriz extracelular y mediante la modificación de la actividad biológica de quimiocinas. De tal manera, se han descrito efectos en la composición y migración de los linfocitos, así como modificaciones en la citoarquitectura del timo en modelos murinos deficientes en la molécula CD26; ratas deficientes en CD26 presentan menor densidad de linfocitos T en la médula ya en etapas precoces de la vida. Asimismo, también se ha observado una disminución en el número de células proliferativas y mayor tendencia a la apoptosis en el timo, y un descenso de los llamados *recent thymic emigrants* (RTE) en sangre periférica y bazo, lo que traduce cambios en la maduración y funcionalidad de los linfocitos T en el timo. Estos últimos cambios se observan fundamentalmente en ratas adultas (> 6 meses de edad) (98).

La expresión de la molécula CD26/DPPIV ha sido estudiada en varias subpoblaciones de timocitos y, al igual que ocurre en otras células de estirpe linfoide, la expresión de CD26 se encuentra estrechamente regulada, tanto en humanos como en ratones (98). Se ha descrito que la expresión de CD26 varía entre las diferentes subpoblaciones de timocitos. De tal manera que existe una mayor expresión de CD26 cuanto mayor es la maduración de las células tímicas, y que dicha expresión se reduce en las poblaciones de timocitos programados para su muerte celular; las células T CD4⁺ y CD8⁺ simples positivos son los que presentan una mayor expresión de CD26 dentro del timo. Estos hallazgos permiten sugerir que la molécula CD26 podría modificar su expresión de forma ontogénica durante la maduración de las células T y que podría estar

implicada en la deleción tímica de clones emergentes (99). Sin embargo, se desconoce si CD26 participa en los mecanismos de disfunción tímica que conducen a la autoinmunidad. La inhibición de CD26/DPPIV mediante compuestos específicos como el MK626 puede aportar información clarificadora en este sentido, aunque hasta la publicación de nuestros resultados de este proyecto de tesis, no existen estudios que evalúen el efecto de la inhibición de CD26/DPPIV sobre los mecanismos de tolerancia inmunológica central.

2.5.3. Enfermedad autoinmunitaria e inhibición de la molécula CD26/DPPIV

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la inhibición de DPPIV ejerce un papel inmunosupresor y un efecto anti-inflamatorio tanto en modelos animales como humanos. La utilización de iDPPIV inhibe la proliferación de linfocitos T estimulados con mitógenos o de manera antígeno-específica, así como la producción de citoquinas (92). Por otro lado, el tratamiento con iDPPIV ha demostrado aumentar la producción de la citoquina inmunosupresora TGF- β por las células mononucleares de sangre periférica y células T purificadas (86). Estos efectos supresores observados al inhibir CD26/DPPIV sobre la activación y función de la célula T, sugieren una aplicación potencial de los iDPPIV como terapias inmunomoduladoras en las enfermedades autoinmunitarias. Así, el efecto inmunosupresor del tratamiento con iDPPIV ha sido recientemente evaluado en varios modelos animales de enfermedades autoinmunitarias, como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide o la DM1 (100-104). Por ejemplo, se ha demostrado que la administración de un iDPPIV induce mejoría de la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, modelo animal de esclerosis múltiple. Esta mejoría se asoció a una supresión de la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IFN- γ , así como a una mayor secreción de la citoquina antiinflamatoria TGF- β (100).

En relación a la DM1, datos pre-clínicos en el modelo de ratón NOD, revelan que el uso de terapias con iDPPIV tiene un efecto inmunomodulador que se asocia a una reducción del infiltrado linfocitario del islote pancreático, y es capaz de prevenir o retrasar el inicio de la enfermedad e incluso revertir la diabetes de inicio reciente (65, 105-108). En este mismo modelo murino, el tratamiento con el MK0431 previo al trasplante del islote pancreático, prolonga la supervivencia del injerto mediante un posible mecanismo de modulación de la migración de las células T CD4⁺ esplénicas y del ganglio linfático

hacia el islote pancreático a través de vías independientes así como dependientes de incretinas. Además, el tratamiento previo al trasplante con el iDPPIV se asoció a una disminución en la incidencia de diabetes y a una disminución del grado de insulinitis (107, 108). En relación con los mecanismos de tolerancia inmunológica periférica, y más concretamente por lo que respecta a las células Tregs, en el estudio publicado con Tian *et al.*, el tratamiento con el iDPPIV, NVP-DPP728, puede revertir la diabetes de reciente diagnóstico en el ratón NOD. El tratamiento en el ratón diabético en remisión se asoció a una disminución del grado de insulinitis, a un incremento en el porcentaje de linfocitos Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ principalmente en el ganglio pancreático, y a una estimulación de la replicación de las células β . Conjuntamente con la expansión de células Tregs, también se observó un aumento de la citoquina inmunosupresora TGF- β . (65). En otro estudio, el tratamiento combinado con el iDPPIV MK626 y un inhibidor de la histona desacetilasa (vorinostat) administrado en una fase de prediabetes en el ratón NOD, se asoció a una reducción de la insulinitis score y a un aumento en el porcentaje de linfocitos Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en el ganglio pancreático. Estos efectos también se objetivaron en el subgrupo de ratones tratados con MK626 en monoterapia (109). Más recientemente, el tratamiento combinado con una dosis baja del anticuerpo monoclonal CD3 y el iDPPIV MK626 en el ratón NOD con diabetes de inicio reciente, también se ha asociado a una expansión de las células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ en los ganglios pancreáticos y localmente en el páncreas. Asimismo, el tratamiento combinado también se asoció a cambios en el porcentaje de algunas subpoblaciones linfocitarias como los linfocitos T memoria efectora y memoria central (105).

Además, el uso de terapias con iDPPIV ha demostrado tener un efecto de preservación y aumento de la masa de célula β promoviendo la regeneración y posible neogénesis de la célula β (65, 105-114). Estos efectos citoprotectores en la función de la célula β pancreática podrían ser debidos en parte, al aumento de los niveles circulantes y en el tejido diana del péptido incretínico GLP-1, cuyo beneficio en la diferenciación, proliferación y regeneración de la célula β ha quedado demostrado en varios estudios en modelos experimentales de diabetes (111, 115-118). Pero por otro lado, existen evidencias que sugieren un papel directo de los iDPPIV en la preservación e incremento de la masa de células β , posiblemente a través de la modulación de péptidos implicados en los procesos de señalización celular y/o bien a través de su efecto en reducir la respuesta autoinmunitaria y anti-inflamatoria dirigida sobre la célula β pancreática (96). En estudios experimentales, el tratamiento prolongado con el iDPPIV isoleucina thiazolidida obtuvo una mejoría del control glucémico en ratas con diabetes inducida por

estreptozocina. Esta mejoría se asoció a un incremento en la supervivencia de la célula β y a una estimulación en la neogénesis del islote pancreático (111). Además, en este mismo modelo se ha demostrado que el iDPPIV MK0431 (sitagliptina) prolonga la supervivencia del islote pancreático trasplantado (112). Otro estudio mostró que el tratamiento prolongado con el iDPPIV DA-1229 mejora la diabetes inducida por estreptozocina a través del incremento en la replicación y neogénesis de la célula β (113). Así pues, estos estudios en modelos experimentales apoyan el posible papel de los iDPPIV en la preservación e incremento de la masa de células β .

Existen varios estudios clínicos que han evaluado los efectos clínicos del tratamiento con iDPPIV en el control glucémico en pacientes con DM1 con resultados heterogéneos. La administración de 100 mg al día del iDPPIV sitagliptina durante 4 semanas se asoció a una mejoría significativa en el control glucémico global y a una reducción en los requerimientos de insulina prandial (119). En otro estudio, la terapia combinada de insulina con metformina y sitagliptina administrada durante más de 8 semanas disminuyó las necesidades diarias de insulina, aunque la mejora del control metabólico se obtuvo únicamente de manera temporal (120). En estudios pre-clínicos, el tratamiento con un inhibidor de la bomba de protones combinado con un iDPPIV se ha asociado a una mayor supervivencia y regeneración de la masa de células β a través del aumento del GLP-1 y la gastrina (121, 122). Sin embargo, el tratamiento combinado (lansoprazol y sitagliptina) administrado durante 12 meses a individuos afectados de DM1, no se asoció ni a una mejora en el control glucémico ni a cambios en la concentración del péptido C en respuesta a una comida mixta (123). En otro estudio, la adicción de sitagliptina a individuos con DM1 durante 16 semanas no se asoció a cambios en el control glucémico ni en la dosis de insulina (124). El efecto del tratamiento con varios iDPPIV también ha sido evaluado en ensayos clínicos con pequeñas cohortes o casos clínicos, en individuos afectados de diabetes tipo LADA (125-129). Esta forma de diabetes representa un buen modelo para evaluar los efectos de la inhibición de DPPIV en la función de la célula β , ya que la destrucción autoinmunitaria es progresiva y mantienen un porcentaje de células β funcionantes en los estadios iniciales. En un estudio randomizado, el tratamiento con sitagliptina añadido a insulina durante 12 meses se asoció a un retraso en la pérdida de la función de la célula β evaluada a través del péptido C tras la ingesta de una comida mixta, a pesar de no encontrar diferencias en el control glucémico (125). Además parece que este efecto en la preservación de la función de la célula β se mantendría a largo plazo (128).

3. HIPÓTESIS

La hipótesis general de esta tesis es que la inhibición de la molécula CD26/DPPIV previene la aparición de diabetes en el ratón NOD, al menos en parte, por su efecto sobre los mecanismos inmunológicos de tolerancia periférica y central. Dicho efecto se ejercería durante la fase previa a la aparición clínica de diabetes (pre-diabetes) a nivel de diferentes puntos de control del proceso de la tolerancia inmunológica, protegiendo a la célula β pancreática del ataque autoinmunitario.

Concretamente se evaluarán en el presente trabajo doctoral las siguientes hipótesis específicas:

HIPÓTESIS 1

El tratamiento con el iDPPIV MK626 administrado en una fase pre-clínica previene la diabetes en el ratón NOD. Esta prevención se ejerce a través de la modificación del porcentaje, cambios fenotípicos y/o funcionales de las diferentes subpoblaciones linfocitarias a nivel tanto del compartimento inmunológico periférico como del central.

HIPÓTESIS 2

La modulación inhibitoria de CD26/DPPIV en una fase pre-clínica de la diabetes, induce cambios en la expresión génica global del timo. Más específicamente, el tratamiento con el inhibidor MK626 afecta a la expresión de genes implicados directamente en el establecimiento de tolerancia a nivel central. La modificación de la expresión de estos genes en el timo se asocia a un efecto en la prevención de la evolución a la fase clínica de la diabetes en el ratón NOD.

HIPÓTESIS 3

El tratamiento con el iDPPV MK626 modifica la expresión del gen Aire y de antígenos pancreáticos en las células epiteliales tímicas, proceso que representa un punto clave en

la tolerancia central a autoantígenos periféricos. Dichos cambios asociados a la modulación inhibitoria de la molécula CD26/DPPIV reducen la respuesta autoinmunitaria contra la célula β pancreática, y ejercen un efecto preventivo en el desarrollo de diabetes en el ratón NOD.

4. OBJETIVOS

Objetivo principal:

- Valorar el efecto del tratamiento con el iDPPIV MK626 administrado en la fase pre-clínica, en la prevención de diabetes autoinmune en el ratón NOD y, en su caso, analizar los mecanismos de tolerancia inmunológica periférica y central por lo cuáles se protege a la célula β pancreática del ataque autoinmunitario.

Objetivos específicos:

- 1- Evaluar el efecto del tratamiento con el iDPPIV MK626 sobre la incidencia de diabetes autoinmune en un grupo de ratones NOD.
- 2- Valorar el efecto del tratamiento sobre el grado de infiltración linfocitaria (insulitis) en los páncreas de los ratones NOD tratados con el iDPPIV MK626 y no tratados.
- 3- Analizar las modificaciones porcentuales y cambios en la expresión de CD26 en las subpoblaciones linfocitarias periféricas (bazo, ganglios linfáticos y tejido pancreático) y centrales (timo) en ratones NOD tratados y compararlos con ratones NOD no tratados.
- 4- Analizar los cambios en la expresión génica global en el timo inducidos por la inhibición de CD26/DPPIV, así como valorar el efecto del tratamiento con el IDPPIV MK626 sobre la expresión de antígenos pancreáticos y del gen *Aire* en las células epiteliales tímicas en los timos de ratones NOD tratados y en los de los no tratados.

Los resultados de los objetivos 1 a 3 de esta tesis han sido publicados en el artículo:

Alonso N, Julián MT, Carrascal J, Colobran R, Pujol-Autonell I, Rodríguez-Fernández S, Teniente A, Fernández MA, Miñarro A, Ruiz de Villa MC, Vives-Pi M, Puig-Domingo M. Type 1 Diabetes Prevention in NOD Mice by Targeting DPPIV/CD26 Is Associated with Changes in CD8⁺T Effector Memory Subset. PLoS One. 2015 Nov 10;10(11):1-22;e0142186. doi: 10.1371.

Los resultados del objetivo 4 han sido publicados en el artículo:

Julián MT, Alonso N, Colobran R, Sánchez A, Miñarro A, Pujol-Autonell I, Carrascal J, Rodríguez-Fernández S, Ampudia RM, Vives-Pi M, Puig-Domingo M. CD26/DPPIV inhibition alters the expression of immune response-related genes in the thymi of NOD mice. Mol Cell Endocrinol. 2016 May 5;426:101-12.

5. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Con la finalidad de responder a las hipótesis y objetivos planteados con anterioridad, se administró el iDPPIV MK626 a través de la dieta a un grupo de ratones NOD de género femenino de 6-8 semanas de vida (etapa pre-clínica del desarrollo de diabetes). Un grupo de ratones NOD no tratado se utilizó como control. En diferentes momentos del inicio del tratamiento, concretamente a las 2, 4 y 6 semanas (n=5), los ratones tratados y no tratados fueron sacrificados. Se obtuvieron y procesaron los diferentes órganos (timo, bazo, páncreas y ganglios linfáticos peri-pancreáticos) sujeto de estudio para su posterior análisis. Por otro lado, con el objetivo de conocer el efecto de la inhibición de la molécula CD26/DPPIV en el desarrollo de diabetes, otro grupo de ratones NOD (n= 15), al que se administró el MK626 a través de la dieta, fueron seguidos hasta las 30 semanas de edad. La incidencia de DM1 se determinó al final del seguimiento, y se comparó con un grupo de ratones NOD no tratados.

Los resultados obtenidos han sido publicados en dos artículos.

5.1. ARTÍCULO NÚMERO 1

Type 1 Diabetes Prevention in NOD Mice by Targeting DPPIV/CD26 Is Associated with Changes in CD8⁺T Effector Memory Subset.

La prevención de la diabetes tipo 1 en el ratón NOD al inhibir CD26/DPPIV se asocia a cambios en la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ memoria efectora.

Alonso N, Julián MT, Carrascal J, Colobran R, Pujol-Autonell I, Rodriguez-Fernández S, Teniente A, Fernández MA, Miñarro A, Ruiz de Villa MC, Vives-Pi M, Puig-Domingo M

PLoS One. 2015 Nov 10;10(11):1-22;e0142186. doi: 10.1371.

Factor de impacto 2015: 3.057

RESEARCH ARTICLE

Type 1 Diabetes Prevention in NOD Mice by Targeting DPPIV/CD26 Is Associated with Changes in CD8⁺T Effector Memory Subset

Núria Alonso^{1,6*}, María Teresa Julián¹, Jorge Carrascal², Roger Colobran³, Irma Pujol-Autonell², Silvia Rodríguez-Fernández², Aina Teniente², Marco Antonio Fernández⁴, Antoni Miñarro⁵, María Carmen Ruiz de Villa⁵, Marta Vives-Pi^{2,6}, Manel Puig-Domingo^{1,6}

1 Department of Endocrinology and Nutrition, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Department of Medicine, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Immunology Department, Germans Trias i Pujol Research Institute, Autonomous University of Barcelona, Badalona, Spain, **3** Service of Immunology, Vall d'Hebron Research Institute, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain, **4** Cytometry Unit, Germans Trias i Pujol Research Institute, Badalona, Spain, **5** Department of Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, Barcelona, Spain, **6** CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM). Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

☞ These authors contributed equally to this work.

* nalonso32416@yahoo.es



OPEN ACCESS

Citation: Alonso N, Julián MT, Carrascal J, Colobran R, Pujol-Autonell I, Rodríguez-Fernández S, et al. (2015) Type 1 Diabetes Prevention in NOD Mice by Targeting DPPIV/CD26 Is Associated with Changes in CD8⁺T Effector Memory Subset. PLoS ONE 10 (11): e0142186. doi:10.1371/journal.pone.0142186

Editor: Paolo Fiorina, Children's Hospital Boston/ Harvard Medical School, UNITED STATES

Received: December 29, 2014

Accepted: October 18, 2015

Published: November 10, 2015

Copyright: © 2015 Alonso et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from European Foundation for the Study of Diabetes, the Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI 1102621) of the Carlos III Institute of Health as well as the Spanish Society of Endocrinology. JC was supported by a grant from Carlos III Institute of Health (PI 1102621). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation the manuscript.

Abstract

CD26 is a T cell activation marker consisting in a type II transmembrane glycoprotein with dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) activity in its extracellular domain. It has been described that DPPIV inhibition delays the onset of type 1 diabetes and reverses the disease in *non-obese diabetic* (NOD) mice. The aim of the present study was to assess the effect of MK626, a DPPIV inhibitor, in type 1 diabetes incidence and in T lymphocyte subsets at central and peripheral compartments. Pre-diabetic NOD mice were treated with MK626. Diabetes incidence, insulinitis score, and phenotyping of T lymphocytes in the thymus, spleen and pancreatic lymph nodes were determined after 4 and 6 weeks of treatment, as well as alterations in the expression of genes encoding β -cell autoantigens in the islets. The effect of MK626 was also assessed in two *in vitro* assays to determine proliferative and immunosuppressive effects. Results show that MK626 treatment reduces type 1 diabetes incidence and after 6 weeks of treatment reduces insulinitis. No differences were observed in the percentage of T lymphocyte subsets from central and peripheral compartments between treated and control mice. MK626 increased the expression of CD26 in CD8⁺ T effector memory (T_{EM}) from spleen and pancreatic lymph nodes and in CD8⁺ T cells from islet infiltration. CD8⁺T_{EM} cells showed an increased proliferation rate and cytokine secretion in the presence of MK626. Moreover, the combination of CD8⁺ T_{EM} cells and MK626 induces an immunosuppressive response. In conclusion, treatment with the DPPIV inhibitor MK626 prevents experimental type 1 diabetes in association to increase expression of CD26 in the CD8⁺ T_{EM} lymphocyte subset. *In vitro* assays suggest an immunoregulatory role of CD8⁺ T_{EM} cells that may be involved in the protection against autoimmunity to β pancreatic islets associated to DPPIV inhibitor treatment.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Type 1 diabetes (T1D) results from the progressive destruction of insulin-producing pancreatic β -cells by $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells [1]. Most self-reactive T cells are deleted by central tolerance mechanisms in the thymus; however even if central tolerance is highly efficient, a number of self-reactive cells escape from this barrier. In the *non-obese diabetic* (NOD) mouse, which spontaneously develops autoimmune T1D similar to the human disease, central and peripheral tolerance defects have been described [2].

CD26 is a type II transmembrane glycoprotein with dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) activity in its extracellular domain. CD26 is constitutively expressed on the surface of many cell types, including immune cells [3], and a soluble form is also present in plasma. CD26 has been extensively characterized and multifunctional effects have been demonstrated [4]. The protein has at least 5 functions: a) serine protease, b) receptor for adenosine deaminase and CD45, c) co-stimulatory protein, d) adhesion molecule for collagen and fibronectin and e) involvement in apoptosis [5]. The most prominent and well-known biological properties are those related to signal transduction ability as a co-stimulatory molecule and proteolysis [6]. CD26 is preferentially expressed on a specific population of T lymphocytes, the subset of $CD4^+CD45RO^+$ memory T cells, and is up-regulated following T cell activation [7]. The enzymatic activity of CD26 appears to be very important in enhancing cellular responses to external stimuli being necessary for its co-stimulatory function [8]. It has recently been described that caveolin-1 in antigen presenting cells (APCs) is a binding protein for CD26. Their interaction results in the up-regulation of CD86 in the APC and enhances T cell co-stimulation [9]. The same group demonstrated that the catalytic site of CD26 is located in the pocket structure involved in the caveolin-1 scaffolding domain.

In $CD4^+$ T cells, high CD26 cell surface expression correlates with the production of Th1-type cytokines and high transendothelial migratory activity, while $CD26^+$ T-helper cells stimulate antibody synthesis in B cells [10]. In $CD8^+$ T cells, $CD8^+CD26^{bright}$ T cell subset has recently been characterized as early effector memory T cells and reported to exert a cytotoxic effect, preferentially via B cells, TNF- α , IFN- γ and the Fas ligand [11]. In T1D patients, CD26 expression is reduced in the peripheral blood of $CD8^+$ T cell subset [12]. CD26 is also thought to be a thymic maturation marker and its impairment has remarkable effects on lymphocyte composition, memory T cell generation and thymic emigration patterns [13,14].

Inhibition of DPPIV/CD26 suppresses antigen-stimulated T cell proliferation and cytokine production, thus suggesting a potential application for DPPIV inhibitors as immunomodulatory drugs in autoimmune diseases [15]. In animal models of autoimmune diseases, such as experimental autoimmune encephalomyelitis, *in vivo* inhibition of CD26 delays and attenuates the severity of the disease [16]. In this model, DPPIV inhibitors suppress IFN- γ , IL-4 and TNF- α production by antigen-stimulated $CD4^+$ T cell clones [7]. In animal models of T1D, pre-treatment with a DPPIV inhibitor (sitagliptin) improves islet transplantation in both streptozotocin-induced diabetic mice [17] and in NOD mice [18]. In the latter, sitagliptin protects the islet graft through the modulation of $CD4^+$ T cell migration and reduction of insulinitis [19]. Moreover, DPPIV inhibition delays the onset of T1D [20] and reverses the disease in NOD mice [21]. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) is a form of less severe autoimmune diabetes than T1D. It has been recently reported that treatment with a DPPIV inhibitor in LADA patients attenuates the rate of decline of C-peptide levels, thus contributing to the maintenance of β -cell function [22]. Also, in the clinical setting, it has been described that the risk of autoimmune diseases is lower in those type 2 diabetes (T2D) patients who are being treated with a DPPIV inhibitor [23].

To our knowledge, the potential for modification of several T lymphocyte subsets from both the thymus and periphery with a DPPIV inhibitor in NOD mice, and its possible contribution to immune tolerance, have not been previously studied. The present work evaluates the effect of the DPPIV inhibitor MK626 in experimental T1D incidence and in thymic and peripheral T lymphocyte subsets, as well as functional mechanisms of action involved in β -cell tolerance reestablishment.

Materials and Methods

Ethics Statements

In vivo experiments were performed in strict accordance with the recommendations of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Generalitat de Catalunya, Catalan Government and the Principles of laboratory animal care (NIH pub.85–23 revised 1985; <http://grants1.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm>). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Germans Trias i Pujol Research Institute (Permit number: DMAH5928).

Mice

Wild-type NOD mice were obtained from our colony established with mice from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Only females were used for this study. Mice were kept under specific pathogen-free conditions in a 12 h dark/12 h light cycle with food and water *ad libitum*. At the end of the experiments, mice were sacrificed by cervical dislocation.

Reagents and diets

MK626, a DPPIV inhibitor analog of des-fluoro-sitagliptin (kindly donated by Richard D. Carr, MSD Research Laboratories, New Jersey, USA), was administered daily in the diet (21 mg/kg, Research Diets, Inc. New Brunswick, NJ) for *in vivo* studies. Moreover, MK626, from the same source as for *in vivo* experiments, was used for *in vitro* studies.

In vivo effect of MK626 treatment

NOD/LtJ mice were placed on either a normal chow diet (Research Diets, Inc. New Brunswick, NJ) or a diet containing the DPPIV inhibitor MK626. To determine the effect of MK626 in lymphocyte subsets, pre-diabetic mice (6–8 weeks of age) were treated during 4 and 6 weeks (5 mice/time-point). As control, untreated mice were used (5 mice/time-point). Spleen, pancreatic lymph nodes (PLNs) and pancreas were harvested for immunological analyses. All experiments were replicated twice.

To determine the *in vivo* effect of MK626 in T1D development, 15 NOD mice at 6–8 weeks of age were fed an MK626-containing diet. A control group of NOD mice ($n = 15$) was fed a normal chow diet. Mice were followed for diabetes onset until they reached 30 weeks of age. Incidence of the disease was determined at the end of the follow-up period.

Mice were monitored daily for urine glucose using Glucocard strips (Menarini, Barcelona, Spain). Mice with glycosuria were confirmed new-onset diabetic when successive blood glucose level was higher than 300 mg/dl after fasting for 2 hours (AccuCheck, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN).

DPPIV activity assessment

Plasma DPPIV enzymatic activity in mice receiving MK626 treatment and in control group was assessed by continuous fluorometric reaction (Edmonson SD, et al 2006) at 2, 4 and 6

weeks after treatment initiation (4 mice in each group/time-point). Briefly, the substrate Gly-Pro-Aminomethylcoumarin (AMC), containing a proline in a position cleaved by DPPIV, releases pro-AMC, generating a high fluorescent emission (RFU). The reaction substrate contains 50% plasma, 50 μ M Gly-Pro-AMC and buffer (100 mM HEPES pH 7.5, 0.1 mg/ml BSA) in a total volume of 50 μ l. AMC liberation was monitored at 460 nm at 37°C (Vioskan Fluorometer, Thermo Electron, Germany). Data are reported as percent of inhibition.

Insulinitis score

The degree of islet infiltration by leukocytes (insulinitis) was analyzed at 2, 4 and 6 weeks after treatment. Briefly, pancreases from 4 mice in each group were snap frozen in an isopentane/cold acetone bath. Cryosections of 5 μ m were obtained at 5 non-overlapping levels. The sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and analyzed by two independent observers. Each observer assessed a minimum of 40 islets per animal. Insulinitis was scored as described elsewhere [24]: 0, no insulinitis; 1, peri-insular; 2, mild insulinitis (<25% of the infiltrated islet); 3, moderate insulinitis (25–75% of the infiltrated islet); 4, severe insulinitis (>75% islet infiltration).

Tissue processing steps

Spleens and thymi were obtained at 4 and 6 weeks after treatment, whereas PLNs were obtained at 4 weeks. Thymic tissue was processed by enzymatic digestion. Briefly, small pieces of tissue were cut with a sterile blade, placed in 2% FCS-RPMI + 2 mg/ml Collagenase P (Boehringer Mannheim, IN, USA) and incubated for 20 minutes at 37°C. The thymocyte suspension was washed and filtered using a 70- μ m strainer and then re-suspended in Stain Buffer (BD Bioscience, San Jose, CA). The spleen was processed by mechanical disruption and mononuclear cells were isolated from the cell suspension by density gradient centrifugation using Lympholyte Mouse (Cedarlane Labs, Burlington, Canada), at 800g for 20 minutes at RT, and cells were then washed and filtered using a 70- μ m strainer. Cells were re-suspended in Stain Buffer (BD Bioscience). PLNs were removed from mice and put in Phosphate Buffer. Then, PLNs were mechanically disrupted and re-suspended in a single cell suspension before the staining.

Flow Cytometry

Thymocytes and peripheral T lymphocyte subsets from NOD, with or without MK626 treatment, were stained using an optimized panel of fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAb) (shown in Table 1). Specifically for T cell regulatory subset, T cells from spleen and PLNs were stained with anti-CD4-APCCy5.5 (BD), anti-CD25-PerCP (BD) and anti-FoxP3-eF450 (EBiosciences). Also T cells were stained with anti-CD8-V500 (BD), anti-PD1-PeCy7 (BD) and anti-CD122-biotin (BD). SA-APC (BD) was used as a secondary antibody. Analyses were run on a FACS Canto II flow cytometer (BD).

GLP-1 determination

Plasma was obtained at 2, 4 and 6 weeks after treatment (4 mice/time-point). GLP-1 was determined using the active GLP-1 ELISA kit (Millipore, Billerica, MA), specific for GLP-1 (7–36) amide form, the main form of circulating biologically active GLP-1.

The experiment was replicated twice.

Table 1. List of mAb used for the analysis of lymphocyte subsets. BD (BD Biosciences, San Jose, CA); eB (eBioscience, San Diego, CA); DN: double negative; DP: double positive; SP: single positive; T_{CM}: central memory T cell; T_{EM}: effector memory T cell; CD26 expression was assessed in all lymphocyte subsets.

Lymphocyte subset	Phenotype	Marker
DN	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁻	CD3-V450 (BD)
DP	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4-APC-Cy7 (BD)
SP CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD8a-V500 (BD)
SP CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	CD26-PerCP-Cy5.5 (eB)
DN1	CD8 ⁺ CD4 ⁻ CD44 ^{high} CD25 ⁻	CD25-PE (BD)
DN2	CD8 ⁺ CD4 ⁻ CD44 ^{high} CD25 ^{high}	CD62L-PerCP-Cy5.5 (BD)
DN3	CD8 ⁺ CD4 ⁻ CD44 ⁻ CD25 ^{high}	CD44-FITC (BD)
Naïve	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD8 ⁺ CD44 ^{low} CD62L ⁺	FoxP3-APC (eB)
T _{CM}	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD8 ⁺ CD44 ^{high} CD62L ⁺	PD1-PeCy7 (eB)
T _{EM}	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD8 ⁺ CD44 ^{high} CD62L ^{neg}	CD122-biotin (eB)
CD4 ⁺ T regulatory cells	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	
CD8 ⁺ T regulatory cells	CD8 ⁺ PD1 ⁺ CD122 ⁺	

doi:10.1371/journal.pone.0142186.t001

Plasma TGF-β concentration

TGF-β levels were quantified in serum at 4 and 6 weeks (5 mice/time-point) in MK626-treated and control NOD mice, using a specific Human/Mouse TGF-β1 ELISA Ready-SET-Go kit (e-Bioscience, USA). The experiment was replicated twice.

Phenotyping of pancreatic islet infiltrate

To characterize islet infiltrating leukocytes and to determine their CD26 expression, pancreases from treated (n = 4) and control NOD mice (n = 4) were obtained 4 weeks after treatment. The experiment was replicated twice. Briefly, pancreases were perfused with collagenase (Collagenase CLS-4; Worthington Biochemical, Lakewood, NJ) through the common bile duct as described [25]. Pancreases were removed and incubated at 37°C for 15 min. After digestion, collagenase was neutralized with HBSS medium and the digested tissue was placed into a petri dish. Islets were hand-picked, mechanically homogenized and filtered with a 70 μm cell strainer to obtain a single cell suspension. For the identification of cell subsets, cell suspension was stained with a primary antibody Rat anti-mouse CD8 (clone Lyt-2.2; MyBiosource, San Diego, CA). After a single wash, a secondary antibody Goat anti-Rat FITC (SouthernBiotech, Birmingham, AL) was used. Finally, a third stage staining was performed with an anti-CD3 V450 (BD), anti-CD4 APC-Cy7 (BD) and anti-CD26 PE antibody (BioLegend, San Diego, California).

T lymphocyte stimulation assay

Spleens were removed from treated (n = 5) and control mice (n = 5) and erythrocytes were lysed in 0.87% ammonium chloride. From each group 3x10⁷ splenocytes were firstly stained with biotinylated anti-CD62L (clone MEL14-H2.100, Miltenyi Biotech) and with the Pan T Isolation Kit II (Miltenyi, 130-095-130). Splenocytes were passed through a Magnetic LS MACS column (Miltenyi 130-042-401) and the unbound fraction corresponding to Effector memory (T_{EM}) T lymphocytes was isolated. A second stain was performed to purify CD8⁺ T_{EM} lymphocytes. Then, cells obtained were stained with an anti-CD4 antibody, clone L3T4 (Miltenyi Biotech) and passed through another LS column. The unbound eluted fraction, corresponding to the CD8⁺ T_{EM} lymphocytes subset, was finally used for the proliferation assays.

Stimulus consisted of 1 µg/ml of anti-CD3 monoclonal antibody (clone 145-2C11, BD Bioscience) plated 24 hours before the assay. 5×10^4 CD8⁺ T_{EM} lymphocytes from treated or control mice were cultured in round bottom 96 wells during 72 hours. Cells were pulsed with 1 µCi of [3H]thymidine in the last 18 hours of the assay. Cells were harvested (Harvester 96, Tomtec Inc., Hamden, CT) and analyzed using a scintillation counter (1450 Microbeta, TriluxWallac, Turku, Finland). T cell proliferation was expressed as counts per minute (c.p.m). After 54 hours of T lymphocyte stimulation, supernatants were collected and cytokine production was assessed by flow cytometry using the Bead Array-CBA kit (BD Bioscience), which measures IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IFN-γ and TNF-α concentration. Data were analysed using the CBA software. TGF-β levels were quantified using a specific Human/Mouse TGF-β1 ELISA Ready-SET-Go kit (e-Bioscience, USA). The experiments were replicated twice.

Biomarkers of β-cell regeneration by qRT-PCR

To determine if DPPIV inhibition allows specifically β-cell regeneration, we investigated whether MK626 alters the expression of genes encoding β-cell autoantigens. As control, *glucagon* gene expression was also evaluated to assess α-cell mass increase. CD45 (lymphocyte common antigen) expression was used as a marker of T-lymphocytic infiltrate. Total RNA was extracted using the kit RNeasy Micro (QIAGEN, Venlo, Limburg, The Netherlands) from whole pancreases from 5 control and 5 MK626-treated animals after 4 weeks of treatment. Prior to RNA isolation, cryosections of frozen pancreata were mechanically disaggregated when thawed. MinElute Spin Columns were used to extract RNA from samples following manufacturer's instructions. RNA integrity and concentration was measured using 2200 TapeStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). cDNA synthesis reactions were carried out using random hexamers (0.5 µg/µl, BioTools, Valle de Tobalina, Madrid, Spain) and reverse transcriptase Moloney-murine-Leukaemia-virus (M-MLV) (200 U/µl, Promega, Madison, WI), and samples were incubated for 60 minutes at 37°C. Finally, qRT-PCR were performed under Taqman universal assay on the Light Cycler 480 system using the following TaqMan assays: *Insulin II (Ins2)* (Mm00731595_gH), *Islet amyloid polypeptide (Iapp)* (Mm00439403_m1), *Glucagon (Gcg)* (Mm01269055_m1) and *CD45* (Mm01293577_m1). House-keeping gene *Gapdh* (Mm99999915_g1) expression was also assessed in order to normalize the expression of the target genes to that of the housekeeping gene, as described in the relative quantification method ($2^{-\Delta C_p}$) [26], and was referred as arbitrary units.

T lymphocyte suppressive assay

MK626 was diluted in water and tested *in vitro* at 10 µM to determine the effect on the viability of splenocytes, as a previous step for the suppression assay. Briefly, splenocytes were obtained after mechanical disruption of spleen and cultured in presence of different concentrations of MK626. Viability was assessed at 2, 24 and 48 hours by annexin V-PE and 7-aminoactinomycin D labelling (7aad) (BD Pharmingen, San Diego, CA).

To assess whether MK626 increases CD8⁺ T_{EM} lymphocytes' immunosuppressive function, the putative regulatory T lymphocytes and effector T lymphocytes obtained from non-diabetic NOD mice at 10–12 weeks of age were differentially labelled with intracellular fluorescent dyes CellTrace Violet (CTV, Molecular Probes, Molecular Probes, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc) and carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFSE, Molecular Probes, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA), respectively. Autologous suppression assays were established in 96-well plates with 4×10^4 CFSE-labelled splenic T lymphocytes and 4×10^3 autologous insulin-loaded mDCs, as antigen presenting cells (APCs), cocultured with CD8⁺ T_{EM} lymphocytes at different ratios (1:0.5, 1:1 and 1:2, being T cell:CD8 T_{EM}), in

presence or absence of MK626 (10 μ M). Splenic T lymphocytes were purified with the Pan T Isolation Kit II (Miltenyi) through a Magnetic LS MACS column (Miltenyi). CD8⁺ T_{EM} lymphocytes were purified as detailed before (see [T lymphocyte stimulation assay](#)). Insulin-loaded mature DCs (mDCs) were obtained as previously described [27]. Briefly, immature DCs (iDCs) were generated *in vitro* from bone marrow progenitors of NOD mice in culture medium containing GM-CSF (1000 U/ml; Prospec, Rehovot, Israel). iDCs were cocultured in presence of insulin (20 μ g/ml, Sigma) for 2 hours and stimulated with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml; Sigma) for 24 hours to obtain mDCs. Finally, after 3 days of coculture, cells were harvested and data were acquired by flow cytometry (FACSCanto II) and analysed using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). Dead cells were excluded from the analysis using 7aad (BD Pharmingen).

Statistical analysis

Data analysis was performed by applying a three-way ANOVA for every continuous variable, controlling by group (two levels, control and treatment), week (two levels, week 4 and week 6) and replicate (two levels, replicate 1 and 2). The replicate was considered a block factor, not affecting any interaction including replicate factor; thus the group-per-week interaction was the only interaction factor considered. Observations with a Studentized residual (in absolute value) greater than 3 were considered outliers and were removed from the analysis. This situation usually affected just one individual. Post-hoc analyses using Tukey's HSD were performed to detect differences between the combinations of factors per group and week. Otherwise, Mann-Whitney U-test was applied. Kaplan-Meier log-rank analysis was used to compare the incidence of diabetes between different groups. A p-value ≤ 0.05 was considered significant. Statistical analysis was performed using the Prism 5.0 software (GraphPad software Inc., San Diego, CA) and "R" software version 3.0 (www.rproject.org).

Results

DPPIV inhibitor MK626 reduces the incidence of diabetes and the insulinitis score

We first evaluated the effect of an MK626-containing diet. The percentage of plasma DPPIV activity was reduced by more than 90% in the MK626-treated group, and this inhibition was maintained throughout the study period (week 4: 95.82%; week 6: 92.44%), thus confirming that DPPIV activity was mostly inhibited in the MK626-administered mice (S1A Fig). Plasma levels of active GLP-1 displayed a biological increase in the MK626-treated mice, although statistically non-significant (S1B Fig).

At the end of the follow-up period of the incidence study at week 30, T1D incidence was significantly decreased in MK626-treated mice (37%) when compared with control mice (68%), ($p = 0.05$, Fig 1A). Thus, a 31% reduction in the incidence of diabetes was achieved in the treated group. In view of the reduced incidence of diabetes in MK626-treated mice, we next aimed to determine the impact of MK626 on insulinitis score at 2, 4 and 6 weeks of treatment. The insulinitis score was significantly lower in treated mice than in controls after 6 weeks of treatment (0.83 ± 0.27 vs. 1.52 ± 0.26 , respectively; $p = 0.022$) (Fig 1B), whereas no differences were observed between groups at week 2 and at week 4 of treatment. Representative images of islets from haematoxylin and eosin-pancreatic cryostat sections from treated and control mice at 6 weeks after treatment are showed in the lower panel of Fig 1B. Moreover, analysis of the percentage of islets classified in each of the five infiltration categories showed that in 6 weeks-treated mice most of the islets remained free of insulinitis or with peri-insulinitis, whereas in the

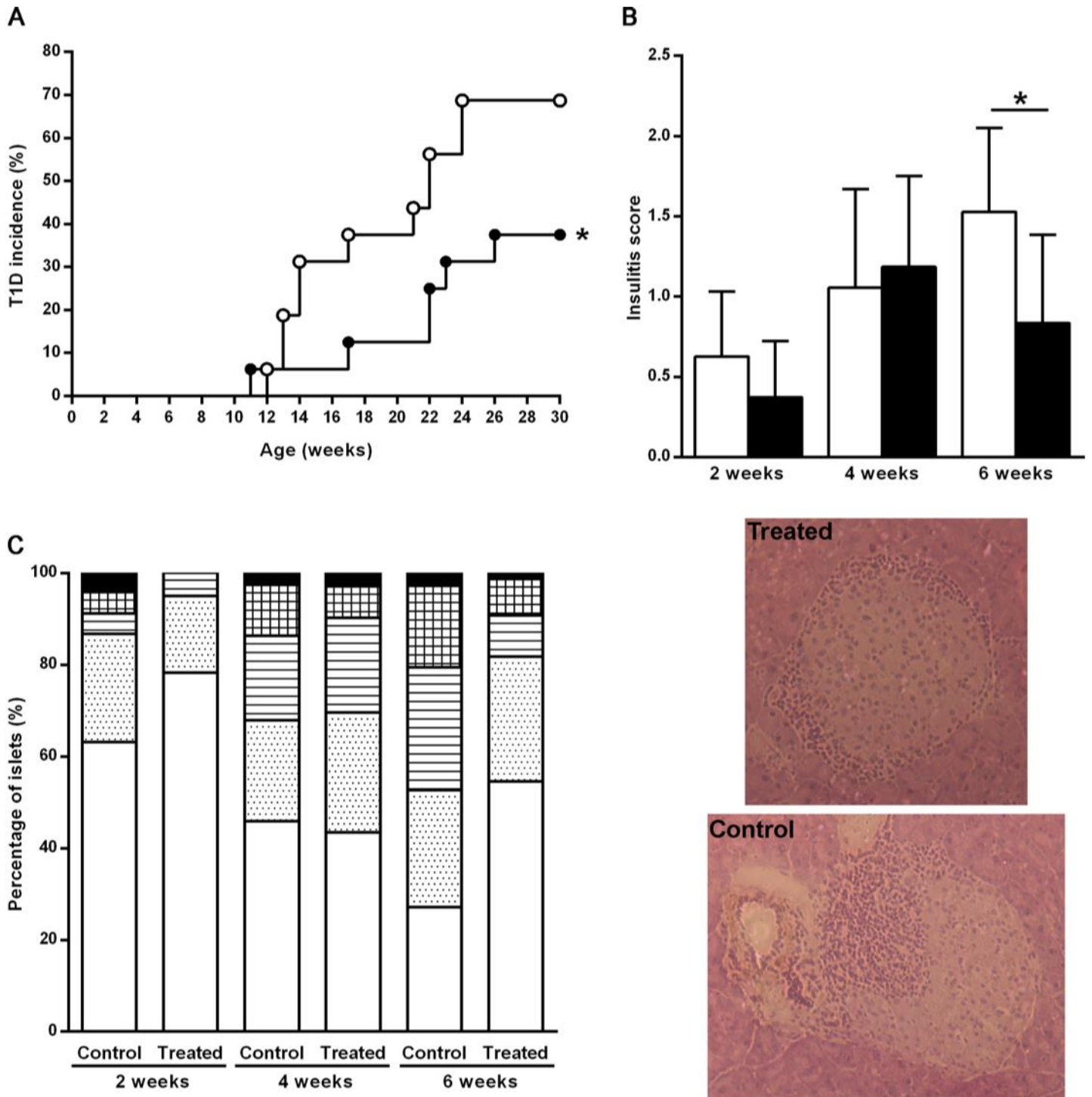


Fig 1. DPPIV inhibitor MK626 decreases T1D incidence and reduces the insulinitis score in NOD mice. A) Cumulative incidence (percentage) of diabetes in NOD mice treated with MK626 (black circles, $n = 15$) and in the control group (white circles, $n = 15$). Significant differences were found when compared MK626-treated mice versus control group ($*p \leq 0.05$, Kaplan-Meier log-rank analysis). B) Insulinitis score from treated and untreated mice at each time-point. Pancreases from 4 mice/group were analyzed by two independent observers at 2, 4 and 6 weeks after treatment. Insulinitis score was significantly lower in treated mice than in controls after 6 weeks of treatment. Results are expressed as mean \pm SEM ($*p \leq 0.05$, Mann-Whitney test). Lower panel: sections of pancreas from haematoxylin and eosin illustrating islets taken from a treated and control mice at 6 weeks. c) Percentage of islets in each of the five infiltration categories in treated and control mice at 2, 4 and 6 weeks: White = 0, no insulinitis; Dotted = 1, peri-insular; Striped = 2, mild insulinitis (<25% of the infiltrated islet); Squared = 3, moderate insulinitis (25–75% of the islet infiltrated); Black = 4, severe insulinitis (>75% islet infiltration).

doi:10.1371/journal.pone.0142186.g001

control group most of the islets were scored with a severe degree of insulinitis (Fig 1C). Insulinitis-free islets were more than 50% in MK626-treated mice at 6 weeks.

These results strongly suggest that DPPIV/CD26 inhibition by MK626 prevent T1D through impairment of islet autoimmune attack.

MK626 treatment does not modify plasma TGF- β levels

The effect of MK626 on serum levels of TGF- β was evaluated at 4 and 6 weeks after treatment. Although plasma TGF- β levels displayed a biological increase in MK626-treated mice compared to control mice, the difference was not statistically significant at any of the study's time-points (Fig 2).

MK626 increases CD26 expression in CD8⁺ Effector memory T cells

To investigate the potential mechanisms by which the DPPIV inhibitor MK626 induced a reduction in T1D incidence and insulinitis score, we aimed to determine whether treatment with

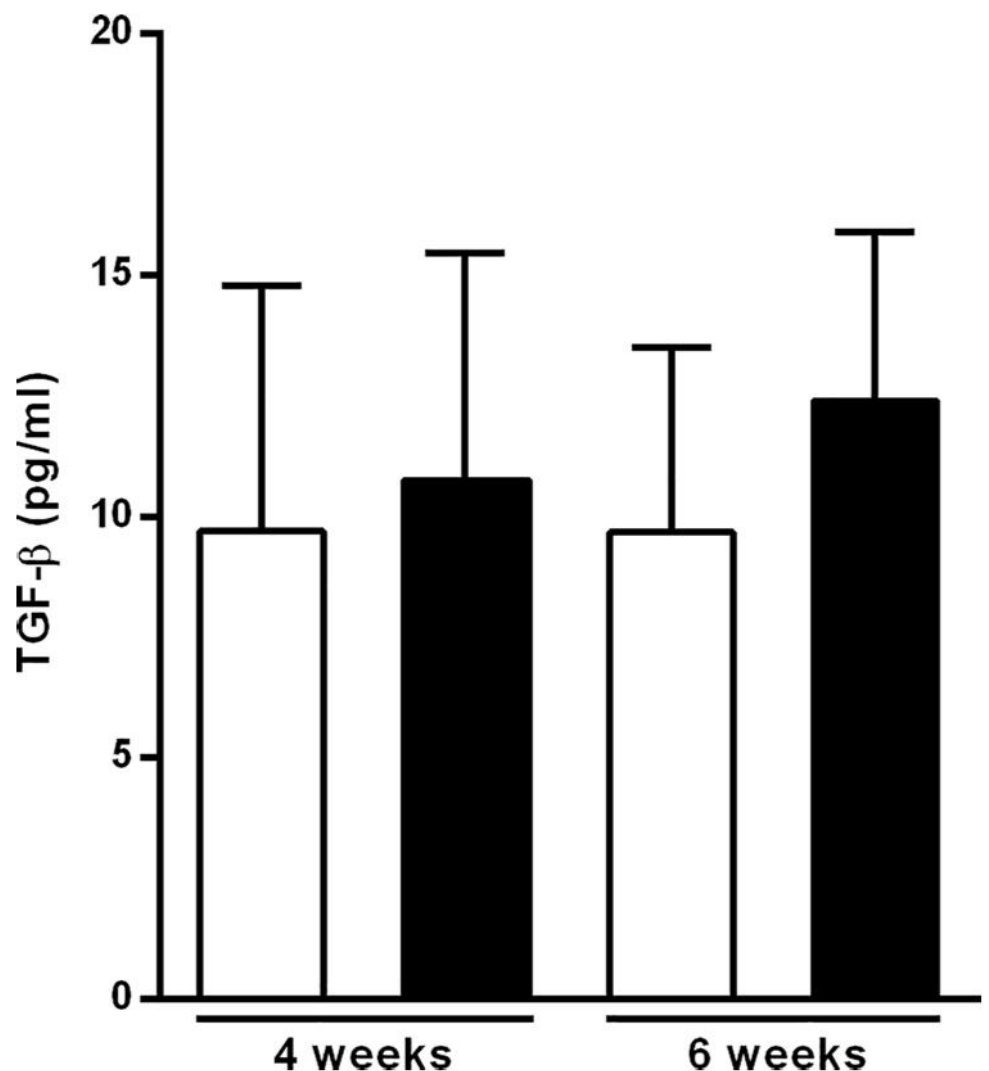


Fig 2. Serum TGF- β concentration from NOD mice after MK626 treatment. Serum level of TGF- β from control (white bars) and treated (black bars) after 4 and 6 weeks of treatment. Results are expressed as mean \pm SD from 10 mice/time-point. No statistical differences were observed between groups (Mann-Whitney test).

doi:10.1371/journal.pone.0142186.g002

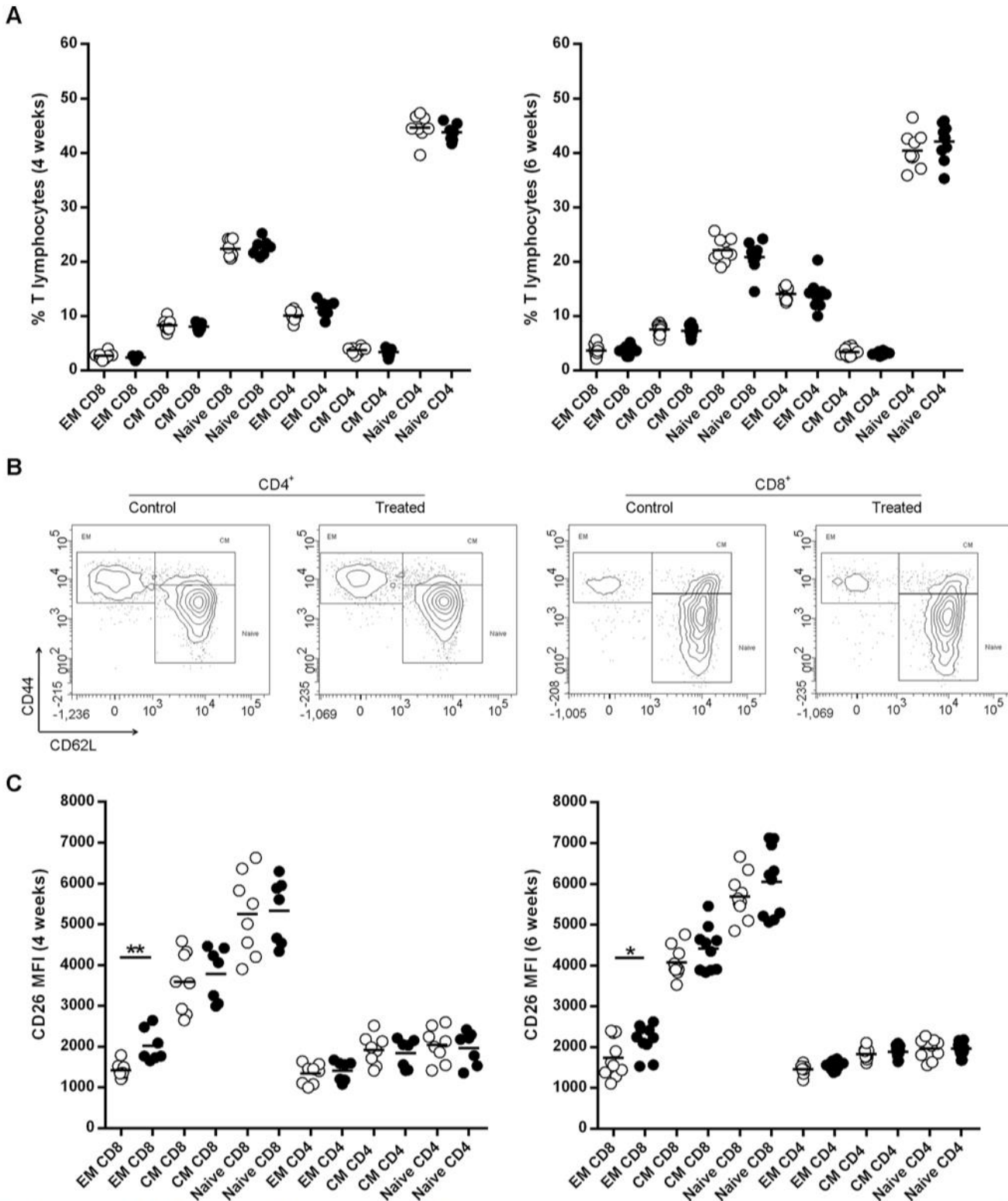


Fig 3. Effects of the DPP-IV inhibitor MK626 on splenic T-lymphocytes. Splenocytes were obtained at 4 and 6 weeks after treatment. A) Percentage of T effector memory (EM), T central memory (CM) and naïve T lymphocytes (CD8⁺ and CD4⁺) in control (white circles) and treated mice (black circles). B) Representative FACS plots of the naïve (CD3⁺CD4⁺/CD8⁺CD44^{low}CD62L⁺), T_{CM} (CD3⁺CD4⁺/CD8⁺CD44^{high}CD62L⁺) and T_{EM} (CD3⁺CD4⁺/CD8⁺CD44^{high}CD62L^{neg}) both for CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes from spleen in treated and control mice at 4 weeks of treatment. C) MFI for CD26 expression on T_{EM}, T_{CM} and naïve T lymphocytes (CD8⁺ and CD4⁺) in control (white circles) and treated mice (black circles). Lines represent the mean of

8–10 mice. Comparison between treated and untreated mice showed an increased expression of CD26 on CD8⁺ T_{EM} cells at any of the study's time-points. (*p<0.05, **p<0.01, three way Anova).

doi:10.1371/journal.pone.0142186.g003

Taken together, results obtained show that treatment with the DPPIV inhibitor MK626 increases the expression of CD26 in the CD8⁺ T_{EM} cell subset, both in spleen as well as in PLNs without affecting their percentage.

MK626 increases CD26 expression on CD8⁺ lymphocytes from pancreatic islet infiltrate

To assess the mechanism through which DPPIV inhibitor treatment reduces insulinitis and prevents T1D in NOD mice, the changes observed in T lymphocyte subsets obtained from the pancreatic islet infiltrate were analyzed. Firstly, we evaluated whether treatment with MK626 had any effect on the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes infiltrating pancreatic islets. There were no significant differences either in the percentage of CD4⁺ T cells or in CD8⁺ T cells between treated and control mice (Fig 5A). However, when CD26 expression on CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes was evaluated, the MFI of CD26 expression was significantly increased in the CD8⁺ subset, but not CD4 in MK626-treated mice compared to controls (p = 0.05) (Fig 5B). These data show that, similar to what occurs with CD8⁺ T_{EM} cells from spleen and PLNs, DPPIV inhibitor MK626 increases the expression of CD26 in CD8⁺ T cells from pancreatic islet infiltrate without affecting their percentage.

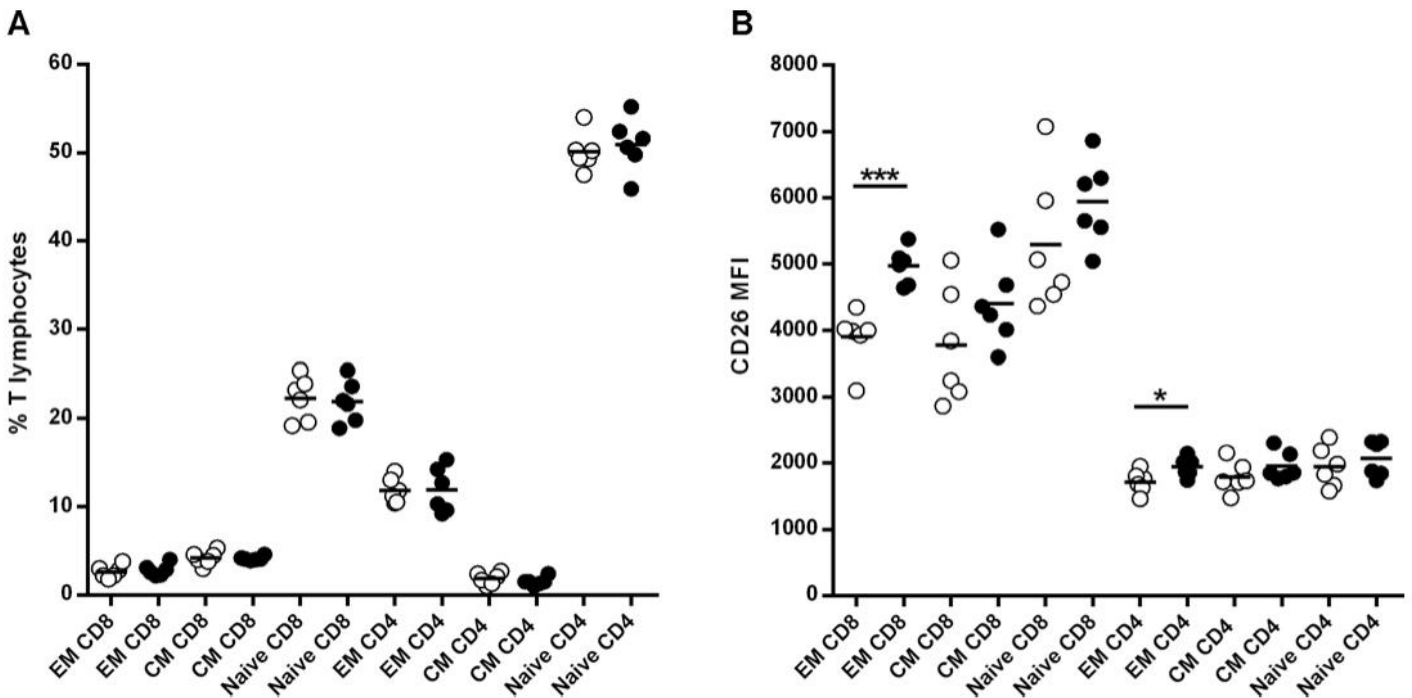


Fig 4. Effects of the DPPIV inhibitor MK626 on T lymphocytes from pancreatic lymph nodes (PLNs). T cells from PLNs were obtained from control (white circles) and treated (black circles) NOD mice at 4 weeks after treatment. A) Percentage of T effector memory (EM), T central memory (CM) and naïve T lymphocytes (CD8⁺ and CD4⁺). B) MFI for CD26 expression on T_{EM}, T_{CM} and naïve T lymphocytes (CD8⁺ and CD4⁺). The expression of CD26 was significantly increased on CD4⁺ T_{EM} and CD8⁺ T_{EM} cells in MK626-treated mice when compared to controls. Lines represent the mean of 6 mice (*p<0.05, ***p<0.001, three way Anova).

doi:10.1371/journal.pone.0142186.g004

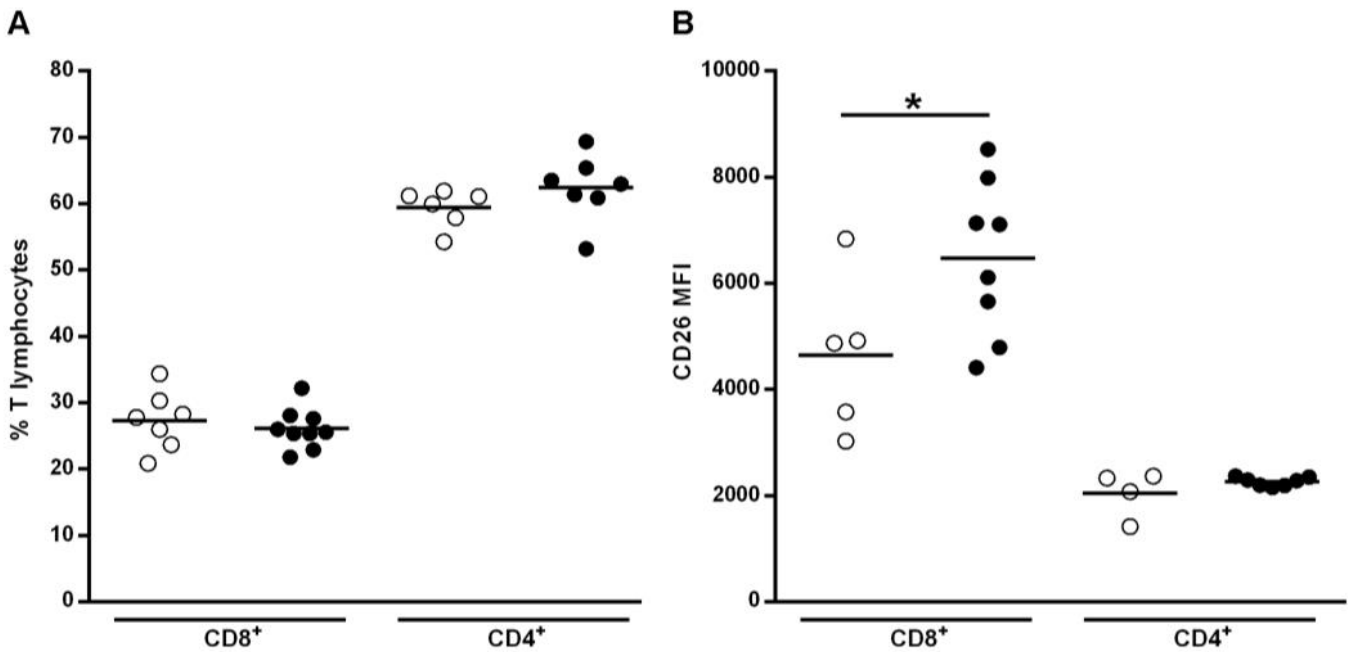


Fig 5. Percentage of T lymphocytes and CD26 membrane expression in the leukocytic infiltrate of mice treated 4 weeks with MK626. A) Percentage of CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes infiltrating pancreatic islets in untreated (white circles) and treated (black circles) mice assessed by flow cytometry. Lines represent the mean of 6–9 mice. No statistical differences were observed between groups (Mann-Whitney test). B) Expression of CD26 determined by flow cytometry (MFI) in CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes from control (white circles) and treated (black circles) mice. Lines represent the mean of 4–8 mice. (*p<0.05, Mann-Whitney test).

doi:10.1371/journal.pone.0142186.g005

Expression of genes encoding for β-cell autoantigens after MK626 treatment

The expression of genes encoding for *Ins2* (Insulin II) and *Iapp* (islet amyloid polypeptide) was evaluated as markers of β-cell regeneration. Specific gene expression of α-cell mass and infiltrating T lymphocytes was also determined. To that end, qRT-PCR was performed in the whole pancreases of treated mice obtained at 4 weeks after treatment. As shown in Fig 6, MK626-treatment in mice induces a tendency to increase expression of β-cell autoantigens

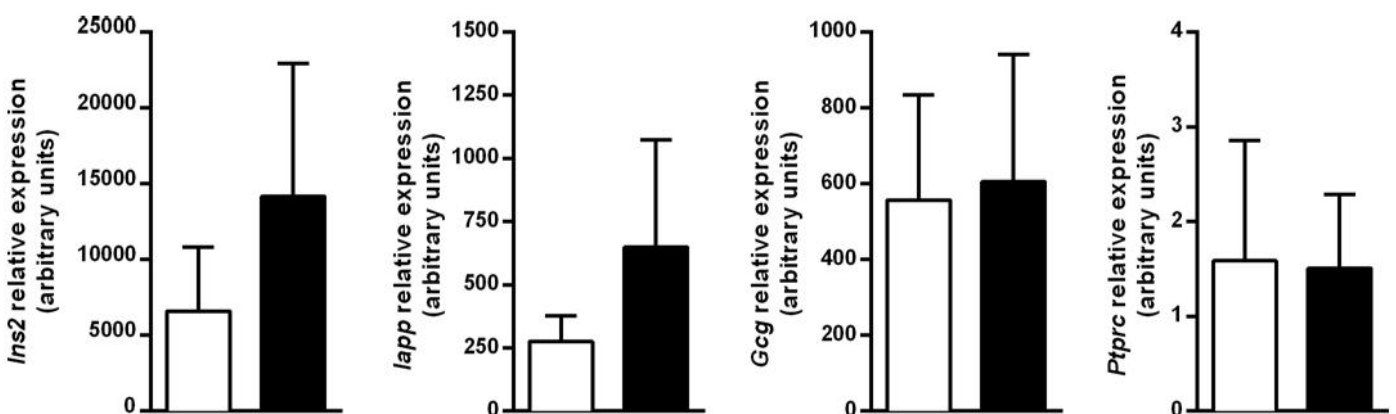


Fig 6. β-cell specific gene expression in the islets of MK626 NOD treated mice. Quantitative RT-PCR results for *Ins2*, *Iapp*, *Gcg* and *CD45* genes in control (white bars) and treated group (black bars) determined using Taqman assays. Gene expression signals were normalized to *Gadph*. All data are expressed as mean ± SD from 5 mice. Significance was tested using Mann-Whitney test.

doi:10.1371/journal.pone.0142186.g006

-*Ins2* and *Iapp*- without changes in *glucagon* gene expression when compared to untreated mice. Expression levels of CD45 were similar in both groups reflecting a similar insulinitis score.

Effector memory CD8⁺ T cells from MK626-treated mice show enhanced proliferative response and cytokine production *in vitro*

To investigate the T cell immune responsiveness of CD8⁺ T_{EM} cells, an *in vitro* proliferation assay was performed. Purified CD8⁺ T_{EM} cells were isolated from spleen after 4 weeks of treatment and were incubated with anti-CD3. Isolated CD8⁺ T_{EM} lymphocytes from MK626-treated mice showed an increased proliferative response in comparison to the control group ($p = 0.004$) (Fig 7A). This CD8⁺ T_{EM} cell expansion was accompanied by a significant increase in secretion of IL-2 ($p = 0.04$), IL-4 ($p = 0.02$), IL-6 ($p = 0.03$), IL-10 ($p = 0.01$), IFN- γ ($p = 0.008$) and TNF- α ($p = 0.005$) (Fig 7B). Remarkably, IL-4, IL-10, IFN- γ and TNF- α showed the highest concentrations after stimulation. Moreover, MK626-treated mice displayed a biological reduction of IL-17 and an increase of TGF- β secretion, although statistically non-significant, when compared to control mice.

Taken together, these findings suggest that CD8⁺ T_{EM} cells from MK626-treated mice, among which are included those with a high expression of CD26, show an increased capacity of proliferative response and cytokine secretion.

Combination of effector memory CD8⁺ T cells and MK626 treatment induces an immunosuppressive response *in vitro*

The suppressive effects of CD8⁺ T_{EM} cells on T cell proliferation was determined *in vitro*, in the presence or absence of the DPPIV inhibitor MK626. Initially, we proved that 10 μ M of MK626 did not alter the viability of splenocytes (data not shown). Then, CD8⁺ T_{EM} cells were isolated to investigate the immunosuppressive ability of CD8⁺ T_{EM} cells, firstly in the absence of MK626. Despite differences did not reach statistical significance, we observed a relevant biological effect. The percentage of proliferating T cells, stimulated with insulin-loaded mDCs, was reduced by the presence of CD8⁺ T_{EM} cells at different ratios (Fig 8A and 8B). Next, when MK626 was added to co-cultures, we also observed a slight reduction in T cell proliferation at any ratio. Interestingly, the percentage of T cell proliferation also tended to reduce only in the presence of the DPPIV inhibitor MK626. Altogether, these data suggest that CD8⁺ T_{EM} cells and the DPPIV inhibitor MK626 tend to suppress antigen-stimulated T cell proliferation by themselves, and support the immunosuppressive action of CD8⁺ T_{EM} cells in the diabetogenic autoimmune response of the NOD mouse model.

Discussion

Immunomodulation and strategies aimed at redirecting deregulated immune pathways are attractive lines of research in the field of T1D prevention. In the last decade several immune therapies have focused on limiting both islet-reactive T cell immunity and β -cell death [27–30]. The present study demonstrates that targeting CD26 with the DPPIV inhibitor MK626 reduces the incidence of T1D and insulinitis degree in the pre-diabetic NOD mouse model. The analysis of peripheral and thymic T cell subsets shows that CD8⁺ T_{EM} cells are the only T cell subset affected by this treatment. More specifically, MK626 increases the expression of CD26 in CD8⁺ T_{EM} lymphocytes as well as their proliferative capacity. Furthermore, our results suggest an immunosuppressive action of CD8⁺ T_{EM} cells that could be relevant in ameliorating autoimmune diabetes through DPPIV inhibitor treatment.

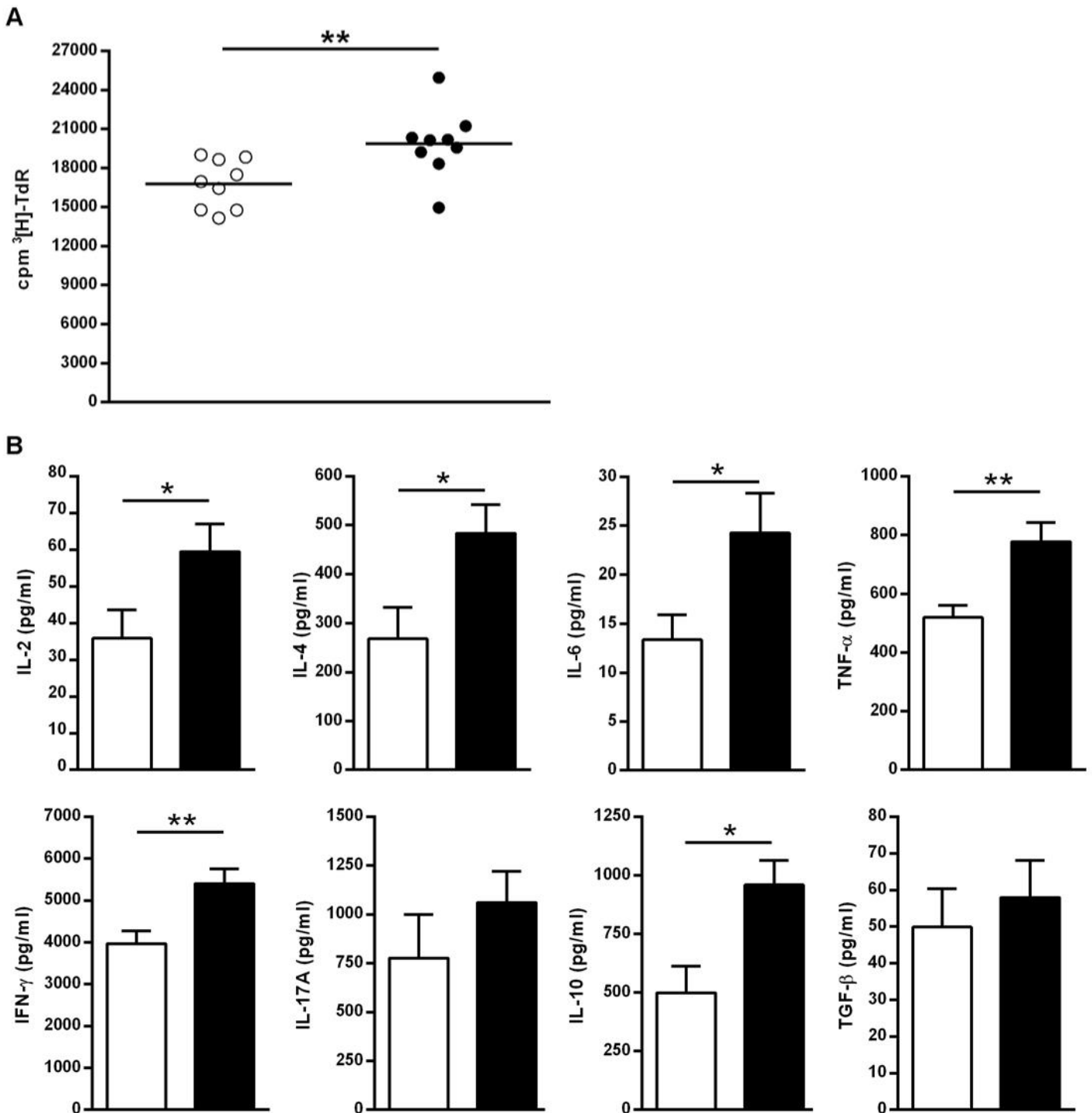


Fig 7. Analysis of CD8⁺ T_{EM} cell proliferation and cytokine production *in vitro* induced by MK626 treatment. CD8⁺ T_{EM} cell from control (n = 9) and treated (n = 9) mice obtained at 4 weeks of treatment were stimulated with anti-CD3 *in vitro*. A) Proliferative rate in CD8⁺ T_{EM} lymphocytes from MK626-treated mice (black circles) and in control group (white circles). T cell proliferation was expressed as counts per minute (c.p.m) using ³H-TdR. B) Cytokine concentration (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α and TGF- β) in supernatant from proliferation assays in treated mice (black bars) compared to control mice (white bars). Results are expressed as mean \pm SEM. Mann-Whitney test was used for the evaluation of statistical significance (*p<0.05;**p<0.01).

doi:10.1371/journal.pone.0142186.g007

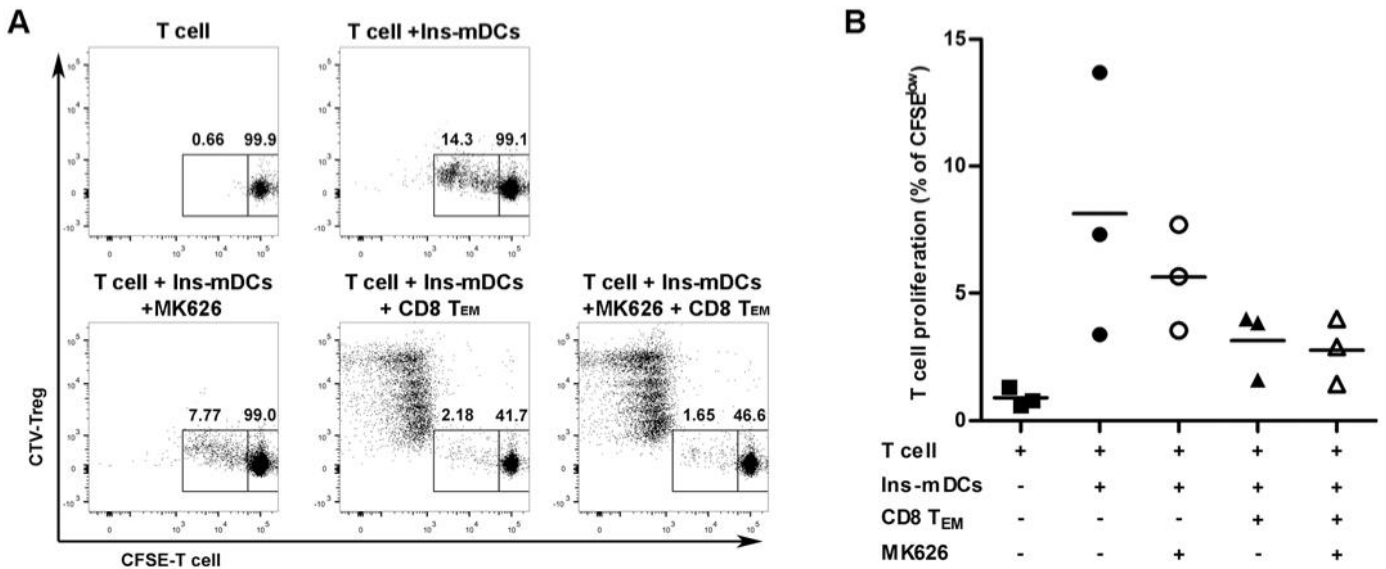


Fig 8. Suppressive effect of MK626 and CD8⁺ T_{EM} lymphocytes *in vitro*. A) Representative dot plots showing CFSE-T lymphocytes, stimulated with insulin-loaded mDCs, in the presence or absence of CTV-CD8⁺ T_{EM} lymphocytes (ratio 1:1) and MK626 (10 μM). B) Percentage of proliferating CFSE^{low} T lymphocytes versus all T lymphocytes, with insulin-loaded mDCs (circles and triangles), in the presence of CTV-CD8⁺ T_{EM} lymphocytes (triangles) and MK626 (open symbols) for 3 days. Plots show the mean (line) of three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0142186.g008

In our study, DPPIV inhibition by MK626 reduces the incidence of diabetes by 31%. Prevention of T1D by targeting CD26 with the DPPIV inhibitor linagliptin has recently been demonstrated in the NOD model, with a reduction in T1D incidence of almost 50% [20]. Additionally, another DPPIV inhibitor has even been able to return hyperglycemic NOD mice to a normoglycemic state [21]. More recently, the combined treatment of low-dose monoclonal anti-CD3 antibody and the same DPPIV inhibitor used in the present study, induces the remission of diabetes in new-onset diabetic NOD mice [31].

We found that insulinitis score was significantly lower in MK626-treated mice than in controls after 6 weeks of treatment. As expected, insulinitis-free islets were more frequent in MK626-treated than in control mice, showing the anti-diabetogenic effect of the DPPIV inhibitor in NOD mice. The reduction of insulinitis concurs with other studies conducted in NOD mice treated with DPPIV inhibitors [18,20,32]. No differences were observed in the insulinitis score at 4 weeks of treatment because it still corresponds to a relatively earlier phase of the pre-diabetic state (10–12 weeks of age), whereas differences in insulinitis observed at week 6 of treatment (12–14 weeks of age) may be precluding the final protective effect of DPPIV inhibitor in reducing the incidence of T1D. Potential modification of T lymphocyte migration has been proposed as an explanation for such a protective effect, and in this respect, sitagliptin has been shown to reduce T cell infiltration of grafted islets in the NOD mouse and is associated with a reduction in the *in vitro* migration of splenic and lymph node CD4⁺ T cells [19].

On the other hand, DPPIV inhibitor treatment demonstrated β-cell protective properties in different animal models of T1D [20, 33–37]. Long term administration of a DPPIV inhibitor increased the mass, replication and neogenesis of β-cells in streptozotocin-treated mice [35]. It remains unclear whether these protective effects of DPPIV inhibition on β-cell mass are mediated through incretins acting directly on β-cells increasing of endogenous GLP1 levels or through incretin-independent effects. Recently, linagliptin administered to non-diabetic NOD mice, similarly to us, reduced insulinitis, but no changes were observed in the Ki67 proliferation index of β-cells, suggesting that the increased β-cells mass observed is not an incretin-mediated

effect, but rather a specific anti-inflammatory effect of DPPIV inhibition [20]. We have conducted an approach based on transcriptomics, to determine the effect of DPPIV inhibitor MK626 on β -cell regeneration. DPPIV inhibitor treatment tends to increase gene expression of β -cell autoantigens (*Ins2* and *Iapp*), suggesting that DPPIV inhibitors may possess cytoprotective and regenerative properties. Due to the fact that no clearly significant differences in GLP-1 concentrations were obtained between MK626-treated and control mice, it may indicate that protective β -cell mass exerted by DPPIV inhibitor is based on immunomodulatory mechanisms rather than incretin effects. Similar to findings described by other authors [20], it appears that these immunoprotective effects are β -cell specific.

CD26 appears to play an important role in T cell development in the thymus. In fact, both CD26 expression and DPPIV enzymatic activity are increased during thymocyte maturation [38]. Thus, the administration of MK626 may indeed have effects on T cell development. In the present study, treatment with MK626 did not change the percentage of thymocyte subsets including SP CD4⁺, SP CD8⁺ DP and DN, nor CD26 expression between treated and control mice. However, this does not rule out that an effect of MK626 on thymocytes may eventually take place.

Regarding peripheral T cell subsets, the main finding of the present study is the increased expression of the CD26 molecule in CD8⁺ T_{EM} cell subset in treated mice. This effect was observed in the peripheral lymphocytes beginning at week 4 of treatment. In the clinical setting, the expression of CD26 has been analyzed in several peripheral blood T cell subsets in patients with T1D in which a decreased expression of CD26 in CD8⁺ [12,39] as well as in CD4⁺ T cells [39,40] have been described. These results suggest that decreased CD26 expression on several T cells subsets might represent a novel part of T lymphocyte regulatory dysfunction observed in T1D [39]. Few studies examined the effect of a DPPIV inhibitor treatment on CD26 expression in human T lymphocyte subsets. In T2D, sitagliptin administration has been associated with decreased expression of CD26 in mononuclear cells [41] and conversely, in T2D patients not on DPPIV inhibitor treatment, CD26 expression was higher in CD4⁺ and CD8⁺ T cells, although its expression was influenced by glycaemia [42]. In the present study, NOD mice were treated in a pre-diabetic stage showing normal blood glucose levels, thereby ruling out such a metabolic influence on CD26 expression.

In relation to CD8⁺ T_{EM} cells, Morimoto *et al* have recently described that human CD8⁺ T cells that express CD26 at high levels belong to the subset of early effector memory T cells [43] and studies conducted in virus infected patients suggest that these cells may be a marker of effective long-term memory T cell formation [44]. *In vitro* studies show that in humans, CD8⁺ T_{EM} cell-CD26-mediated co-stimulation has cytotoxic effects preferentially via granzyme B, TNF- α , IFN- γ and Fas ligand (FasL) and this cytotoxic function is higher than what is obtained with CD28-mediated co-stimulation.

In the present study, and in order to better characterize CD8⁺ T_{EM} subset, a cell proliferation assay was performed using an anti-CD3 antibody. We hypothesize that the increased expression of CD26 observed in this subset would account for a high proliferative rate of CD8⁺ T_{EM} cells. In this regard, it has been reported that mesothelioma cells expressing high CD26 levels display a higher proliferation activity than CD26 negative cells [45]. Results obtained in the present study show that proliferation rate was higher in CD8⁺T_{EM} cells from treated mice. Moreover, cytokine analysis from supernatant of stimulated cells with CD3-monoclonal antibody showed a higher secretion of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-4 as well as the pro-inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α in samples obtained from treated mice. Effector memory T cells have been described to produce higher amounts of the cytokines IL-4 and INF- γ than central memory T cells [46], in accordance with our findings. The increase in IFN- γ and TNF- α cytokines in the supernatant from CD8⁺ T_{EM} stimulated cells in the present

study may be explained by the presence of CD8⁺ T_{EM} cells that express high levels of CD26 which are included in the CD8⁺ T_{EM} cell pooling treated mice, given that these cells produce high amounts of these two cytokines [43]. Moreover, levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were also increased in the supernatant of stimulated CD8⁺ T_{EM} cells in treated mice, assuming that another population of non-cytotoxic T cell may be actively secreting such cytokine after MK626 plus anti-CD3. In this sense, in recent years several types of CD8⁺ T cell populations have been described as exerting a regulatory suppressive action by virtue of mainly three mechanisms: cell-to-cell contact mediated suppression, anti-inflammatory cytokine secretion and cytotoxicity to the target cells [47], some of them involving the secretion of the IL-10 [48] and some of them described as memory T cells [49,50]. In the present study, peripheral CD8 T cells were stained with the phenotypical markers CD122 and PD-1 in order to evaluate whether there were any differences in CD8⁺ Tregs between treated and control mice. No differences were observed, although results should be taken with caution given the low percentage observed of this T cell subset. Thus, this doesn't rule out the possibility that there may exist a subset within the pool of CD8⁺ T_{EM} cells in our experiments that has immuno-regulatory properties. In fact, there is a recognized barrier while investigating CD8⁺ T suppressor cells due to the lack of a recognized specific cell marker [46,49]. Nonetheless, and despite CD8⁺ Tregs heterogeneity, there are several lines of evidence supporting the hypothesis that many Tregs subsets share a memory-like phenotype suggestive of prior antigenic encounters [51,52]. On the other hand, concerning classical Tregs such as CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells, no increase was observed in the periphery in the present study, in agreement with Cabrera et al [32].

To further elucidate the immunoregulatory mechanism involved in the tolerance induction observed after MK626 treatment, the regulatory potential of CD8⁺ T_{EM} has been assessed in the autoimmunity context of T1D. On one hand, the *in vitro* assay shows a suppressive function of CD8⁺ T_{EM} on immune response and points to their possible anti-diabetogenic role in the NOD mouse model. On the other hand, the DPPIV inhibitor MK626 displays immunosuppressive effect by itself, according to other studies [18,53]. Due to the intrinsic suppressive potential of CD8⁺ T_{EM}, we believe that MK626 might not be able to strengthen the regulatory effect of these cells *in vitro*. And, because MK626 treatment increases CD8⁺ T_{EM} proliferative capacity in our study, it is reasonable to speculate that CD8⁺ T_{EM} cells have a role in tolerance reestablishment lost in autoimmune diabetes. One way these effector cells may act is through a cytotoxic action directed against cells that are involved in antigen presentation, thereby attenuating the immune response. Additionally, a mechanism that cannot be discarded could also be related to the presence of a T cell subset within the CD8⁺ T_{EM} cell subset with immunoregulatory features due to its capacity to secrete IL-10.

Taking into account our results, future research should focus on analyzing the possible mechanisms by which CD8⁺ T_{EM} cells suppress the autoimmune response in diabetes. Although the results of the present study suggest direct immunomodulatory effects of DPPIV inhibition on T1D, a contribution of incretin modification or other additional factors that were not evaluated cannot completely be ruled out.

In conclusion, treatment with the DPPIV inhibitor MK626 reduces insulinitis and decreases T1D incidence, concurring with a cytoprotective effect on β -cell mass. Furthermore, MK626 increases CD26 expression in the CD8⁺ T_{EM} subset in lymphocytes from peripheral blood, pancreatic lymph nodes and islet pancreatic infiltrate. Indeed, an immunosuppressive role for CD8⁺ T_{EM} cell subset in NOD mice may be involved in the protection against autoimmunity to β -cells. Our results provide more insights into the understanding of the mechanisms through which targeting DPPIV/CD26 reestablishes β -cell tolerance.

Supporting Information

S1 Fig. The effects of MK626 on plasma DPPIV activity and plasma active GLP-1 levels. A) Histogram of the percentage of DPPIV inhibition in control (white bars) and treated (black bars) mice after 2, 4 and 6 weeks of treatment. B) Levels of plasma active GLP-1 levels in control (white bars) and treated (black bars) mice after 2, 4 and 6 weeks of treatment; data represent mean \pm SEM from 8 mice; no significant differences were found (Mann Whitney test). (TIF)

S2 Fig. Effects of MK626 on thymocytes subsets. A) Percentage of SP CD4⁺, single positive (SP) CD8⁺, double positive (DP) and double negative (DN) in untreated (white circles) and treated (black circles) mice. B) Expression (MFI) of CD26 on SP CD4⁺, SP CD8⁺, DP and DN in control (white circles) and treated (black circles) after 4 and 6 weeks of treatment. C) Percentage (left) and MFI for CD26 expression (right) on natural Tregs (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) in control (white circles) and treated (black circles) mice at each checkpoint of the study. Lines represent the mean of 8 mice. Comparisons between groups did not show significant differences (three-way ANOVA). (TIF)

S3 Fig. Effects of MK626 treatment on splenic T-lymphocyte subsets from spleen after 4 and 6 weeks of treatment in control (white circles) and treated mice (black circles). A) Percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T cells after 4 and 6 weeks of treatment in control (white circles) and treated mice (black circles). B) MFI for CD26 expression on CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes after 4 and 6 weeks of treatment in control (white circles) and treated mice (black circles). C) Percentage (left) and MFI for CD26 expression (right) on Tregs (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) in control (white circles) and treated (black circles) mice at each time-point of the study. Lines represent the mean of 4–10 mice. Comparisons between groups did not show significant differences (three-way ANOVA). (TIF)

Acknowledgments

The authors thank MSD and in particular Richard Carr and Silvia Fernández, for providing the MK626 DPPIV inhibitor. We also thank Rosa M. Ampudia (Germans Trias I Pujol Research Institute) for her help with animal care and to Christine O'Hara for taking care of English style.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NA MTJ JC RC IPA SRF MVP MPD. Performed the experiments: JC RC IPA SRF. Analyzed the data: NA MTJ IPA SRF AT MAF AM MVP MCRV MPD. Contributed reagents/materials/analysis tools: NA MTJ JC RC IPA SRF MVP MPD. Wrote the paper: NA MTJ IPA SRF MVP MPD.

References

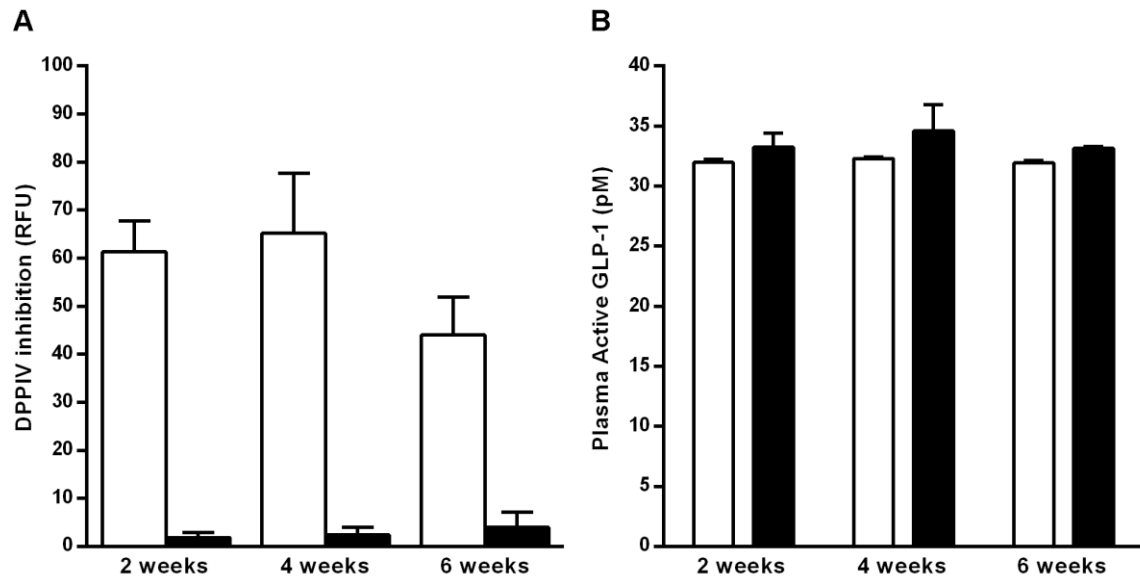
1. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1994; 331: 1428–1436. PMID: [7969282](#)
2. Atkinson MA, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets?. *Nat Med.* 1999; 5: 601–604. PMID: [10371488](#)
3. Tanaka T, Camerini D, Seed B, Torimoto Y, Dang NH, Kameoka J, et al. Cloning and functional expression of the T cell activation antigen CD26. *J Immunol.* 1992; 149: 481–6. PMID: [1352530](#)

4. Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol.* 2008; 29: 295–301. doi: [10.1016/j.it.2008.02.010](https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.010) PMID: [18456553](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18456553/)
5. Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPP4V. *Eur J Cell Biol.* 2003; 82: 53–73. PMID: [12647932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12647932/)
6. Boonacker EP, Wierenga EA, Smits HH, Van Noorden CJ. CD26/DPP4V signal transduction function, but not proteolytic activity, is directly related to its expression level on human Th1 and Th2 cell lines as detected with living cell cytochemistry. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50: 1169–1177. PMID: [12185194](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12185194/)
7. Reinhold D, Hemmer B, Gran B, Born I, Faust J, Neubert K, et al. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV/CD26 suppress activation of human MBP-specific CD4+ T cell clones. *Neuroimmunol.* 1998; 87: 203–209.
8. Tanaka T, Kameoka J, Yaron A, Scholssman SF, Morimoto C. The costimulatory activity of the CD26 antigen requires dipeptidyl peptidase IV enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 4586–4590. PMID: [7685106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7685106/)
9. Ohnuma K, Yamochi T, Uchiyama M, Nishibashi K, Yoshikawa N, Shimizu N, et al. CD26 up-regulates expression of CD86 antigen-presenting cells by means of caveolin-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 14186–14191. PMID: [15353589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15353589/)
10. Brezinschek RI, Lipsky PE, Galea P, Vita R, Oppenheimer-Marks N. Phenotypic characterization of CD4+ T cells that exhibit a transendothelial migratory capacity. *J Immunol.* 1995; 154: 3062–3077. PMID: [7534786](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7534786/)
11. Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Morimoto C. CD26-mediated costimulation in human CD8(+) T cells provokes effector function via pro-inflammatory cytokine production. *Immunology.* 2013; 138: 165–172. doi: [10.1111/imm.12028](https://doi.org/10.1111/imm.12028) PMID: [23113658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23113658/)
12. Matteucci E, Ghimenti M, Consani C, Di Beo S, Giampietro O. About CD26CD8 lymphocytes in type 1 diabetes mellitus. *Scand J Immunol.* 2010; 71: 123–124.
13. Klemann C, Schade J, Pabst R, Leitner S, Stiller J, von Hörsten S, et al. CD26/dipeptidyl peptidase 4-deficiency alters thymic emigration patterns and leukocyte subsets in F344-rats age-dependently. *Clin Exp Immunol.* 2009; 155: 357–365. doi: [10.1111/j.1365-2249.2008.03839.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03839.x) PMID: [19055685](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19055685/)
14. Simeoni L, Rufini A, Moretti T, Forte P, Aiuti A, Fantoni A. Human CD26 expression in transgenic mice affects murine T-cell populations and modifies their subset distribution. *Hum Immunol.* 2002; 63: 719–730. PMID: [12175726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12175726/)
15. Biton A, Ansorge S, Bank U, Täger M, Reinhold D, Brocke S. Divergent actions by inhibitors of DP IV and APN family enzymes on CD4+ T cell motility and functions. *Immunobiology.* 2011; 216: 1295–1301. doi: [10.1016/j.imbio.2011.07.001](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.001) PMID: [21802166](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21802166/)
16. Steinbrecher A, Reinhold D, Quigley L, Gado A, Tresser N, Izikson L, et al. Targeting dipeptidyl peptidase IV (CD26) suppresses autoimmune encephalomyelitis and up-regulates TGF-beta 1 secretion in vivo. *J Immunol.* 2001; 166: 2041–2048. PMID: [11160254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11160254/)
17. Kim SJ, Nian C, Doudet DJ, McIntosh CH. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV with sitagliptin (MK0431) prolongs islet graft survival in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes.* 2008; 57: 1331–1339. doi: [10.2337/db07-1639](https://doi.org/10.2337/db07-1639) PMID: [18299314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18299314/)
18. Kim SJ, Nian C, Doudet DJ, McIntosh CH. Dipeptidyl peptidase IV inhibition with MK0431 improves islet graft survival in diabetic NOD mice partially via T-cell modulation. *Diabetes.* 2009; 58: 641–651. doi: [10.2337/db08-1101](https://doi.org/10.2337/db08-1101) PMID: [19073764](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19073764/)
19. Kim SJ, Nian C, McIntosh CH. Sitagliptin (MK0431) inhibition of dipeptidyl peptidase IV decreases non-obese diabetic mouse CD4+ T-cell migration through incretin-dependent and -independent pathways. *Diabetes.* 2010; 59: 1739–1745. doi: [10.2337/db09-1618](https://doi.org/10.2337/db09-1618) PMID: [20368408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20368408/)
20. Jelsing J, Vrang N, van Witteloostuijn SB, Mark M, Klein T. The DPP4 inhibitor linagliptin delays the onset of diabetes and preserves β -cell mass in non-obese diabetic mice. *J Endocrinol.* 2012; 214: 381–387. doi: [10.1530/JOE-11-0479](https://doi.org/10.1530/JOE-11-0479) PMID: [22761275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22761275/)
21. Tian L, Gao J, Hao J, Zhang Y, Yi H, O'Brien TD, et al. Reversal of new-onset diabetes through modulating inflammation and stimulating beta-cell replication in nonobese diabetic mice by a dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Endocrinology.* 2010; 151: 3049–3060. doi: [10.1210/en.2010-0068](https://doi.org/10.1210/en.2010-0068) PMID: [20444936](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20444936/)
22. Zhao Y, Yang L, Xiang Y, Liu L, Huang G, Long Z, et al. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin maintains β -cell function in patients with recent-onset latent autoimmune diabetes in adults: one year prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99: 876–880.
23. Kim SC, Schneeweiss S, Glynn RJ, Doherty M, Goldfine AB, Solomon DH, et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes may reduce the risk of autoimmune diseases: a population-based cohort

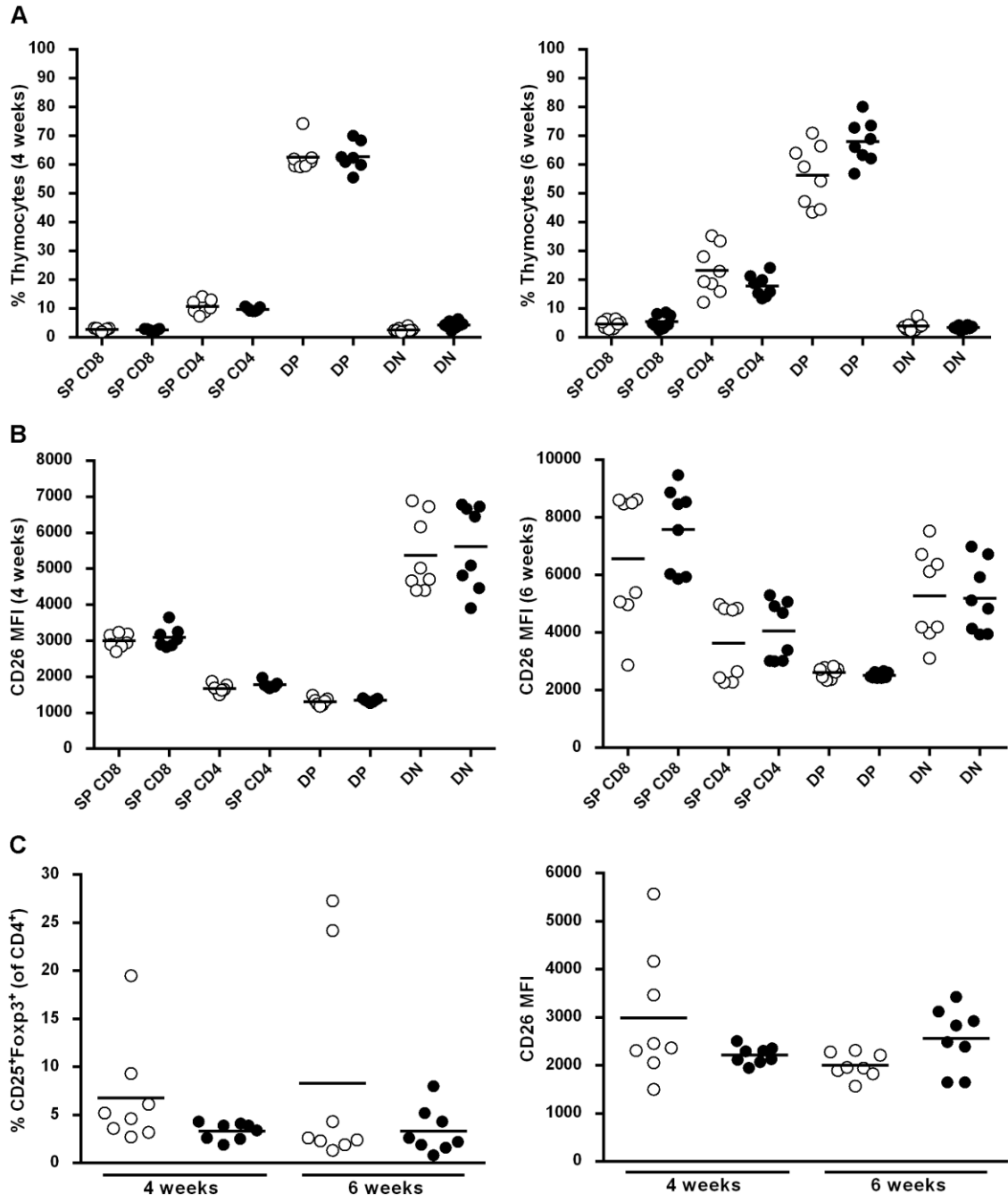
- study. *Ann Rheum Dis*. 2014. doi: [10.1136/annrheumdis-2014-205216](https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205216) [Epub ahead of print] PMID: [24919467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24919467/)
24. Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 1998; 161: 3912–3918. PMID: [9780157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9780157/)
 25. Li DS, Yuan YH, Tu HJ, Liang QL, Dai LJ. A protocol for islet isolation from mouse pancreas. *Nat Protoc*. 2009; 4: 1649–1652. doi: [10.1038/nprot.2009.150](https://doi.org/10.1038/nprot.2009.150) PMID: [19876025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19876025/)
 26. Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)}. *Method Methods*. 2001; 25: 402–408. PMID: [11846609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/)
 27. Pujol-Autonell I, Ampudia RM, Planas R, Marin-Gallen S, Carrascal J, Sanchez A, et al. Efferocytosis promotes suppressive effects on dendritic cells through prostaglandin E2 production in the context of autoimmunity. *Plos one*. 2013; 15: e63296.
 28. Guleria I, Gubbels Bupp M, Dada S, Fife B, Tanq Q, Ansari MJ, et al. Mechanisms of PDL1-mediated regulation of autoimmune diabetes. *Clin Immunol*. 2007; 125: 16–25. PMID: [17627890](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17627890/)
 29. Petreolli A, Carvello M, Vergani A, Lee KM, Tezza S, Du M, et al. IL21 is an antitolerogenic cytokine of the late-phase alloimmune response. *Diabetes*. 2011; 60: 3223–3234. doi: [10.2337/db11-0880](https://doi.org/10.2337/db11-0880) PMID: [22013017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22013017/)
 30. Vergania A, D'Addio F, Jurewicz M, Petrelli A, Watanabe T, Liu K, et al. A novel clinically relevant strategy to abrogate autoimmunity and regulate alloimmunity in NOD mice. *Diabetes*. 2010; 59: 2253–2264. doi: [10.2337/db09-1264](https://doi.org/10.2337/db09-1264) PMID: [20805386](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20805386/)
 31. Ding L, Gysemans CA, Stangé G, Heremans Y, Yuchi Y, Takiishi T, et al. Combining MK626, a novel DPP-4 inhibitor, and low-dose monoclonal CD3 antibody for stable remission of new-onset diabetes in mice. *PLoS One*. 2014; 9: e107935. doi: [10.1371/journal.pone.0107935](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107935) PMID: [25268801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25268801/)
 32. Cabrera SM, Colvin SC, Tersey SA, Maier B, Nadler JL, Mirmira RG. Effects of combination therapy with dipeptidyl peptidase-IV and histone deacetylase inhibitors in the non-obese diabetic mouse model of type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2013; 172: 375–382. doi: [10.1111/cei.12068](https://doi.org/10.1111/cei.12068) PMID: [23600825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23600825/)
 33. Pospisilik JA, Martin J, Doty T, Ehses JA, Pamir N, Lynn FC, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates beta-cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 2003; 52: 741–750. PMID: [12606516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12606516/)
 34. Zhang X, Wang Z, Huang Y, Wang J. Effects of chronic administration of alogliptin on the development of diabetes and β -cell function in high fat diet/streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Obes Metab*. 2011; 13: 337–347. doi: [10.1111/j.1463-1326.2010.01354.x](https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01354.x) PMID: [21205126](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21205126/)
 35. Cho JM, Jang HW, Cheon H, Jeong YT, Kim DH, Lim YM, et al. A novel dipeptidyl peptidase IV inhibitor DA-1229 ameliorates streptozotocin-induced diabetes by increasing β -cell replication and neogenesis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011; 91: 72–79. doi: [10.1016/j.diabres.2010.10.012](https://doi.org/10.1016/j.diabres.2010.10.012) PMID: [21093089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21093089/)
 36. Yin H, Park SY, Wang XJ, Misawa R, Grossman EJ, Tao J, et al. (2013) Enhancing pancreatic Beta-cell regeneration in vivo with pioglitazone and alogliptin. *PLoS One*. 2013; 8: e65777. doi: [10.1371/journal.pone.0065777](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065777) PMID: [23762423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23762423/)
 37. Jurczyk A, Diiorio P, Brostowin D, Leehy L, Yang C, Urano F et al. Improved function and proliferation of adult human beta cells engrafted in diabetic immunodeficient NOD-scid IL2ry(null) mice treated with alogliptin. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2013; 6: 493–499. doi: [10.2147/DMSO.S53154](https://doi.org/10.2147/DMSO.S53154) PMID: [24376359](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24376359/)
 38. Ruiz P, Nassiri M, Steele B, Viciano AL. Cytofluorographic evidence that Thymocyte dipeptidyl peptidase IV (CD26) activity is altered with stage of ontogeny and apoptotic status. *Cytometry*. 1996; 23: 322–329. PMID: [8900475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8900475/)
 39. Varga T, Somogyi A, Barna G, Wichmann B, Nagy G, Rácz K, et al. Higher serum DPP-4 enzyme activity and decreased lymphocyte CD26 expression in type 1 diabetes. *Pathol Oncol Res*. 2011; 17: 925–930. doi: [10.1007/s12253-011-9404-9](https://doi.org/10.1007/s12253-011-9404-9) PMID: [21785903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21785903/)
 40. Matteucci E, Ghimenti M, Di Beo S, Giampietro O. Altered proportions of naïve, central memory and terminally differentiated central memory subsets among CD4+ and CD8+ T cells expressing CD26 in patients with type 1 diabetes. *J Clin Immunol*. 2011; 31: 977–984. doi: [10.1007/s10875-011-9573-z](https://doi.org/10.1007/s10875-011-9573-z) PMID: [21887518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21887518/)
 41. Makdissi A, Ghanim H, Vora M, Green K, Abuaysheh S, Chaudhuri A, et al. Sitagliptin exerts an anti-inflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97: 3333–3341. doi: [10.1210/jc.2012-1544](https://doi.org/10.1210/jc.2012-1544) PMID: [22745245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22745245/)
 42. Lee SA, Kim YR, Yang EJ, Kwon EJ, Kim SH, Kang SH, et al. CD26/DPP4 levels in peripheral blood and T cells in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98: 2553–2561. doi: [10.1210/jc.2012-4288](https://doi.org/10.1210/jc.2012-4288) PMID: [23539735](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23539735/)

43. Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Morimoto C. CD26-mediated co-stimulation in human CD8(+) T cells provokes effector function via pro-inflammatory cytokine production. *Immunology*. 2013; 138: 165–172. doi: [10.1111/imm.12028](https://doi.org/10.1111/imm.12028) PMID: [23113658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23113658/)
44. Ibegbu CC, Xu YX, Fillos D, Radziejewicz H, Grakoui A, Kourtis AP. Differential expression of CD26 on virus-specific CD8(+) T cells during active, latent and resolved infection. *Immunology*. 2008; 126: 346–353. doi: [10.1111/j.1365-2567.2008.02899.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02899.x) PMID: [18657205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18657205/)
45. Yamazaki H, Naito M, Ghani FI, Dang NH, Iwata S, Morimoto C. Characterization of cancer stem cell properties of CD24 and CD26-positive human malignant mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 138: 165–172.
46. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*. 1999; 401: 708–712. PMID: [10537110](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10537110/)
47. Suzuki M, Konya C, Goronzy JJ, Weyand CM. Inhibitory CD8+ T cells in autoimmune disease. *Hum Immunol*. 2008; 69: 781–789. doi: [10.1016/j.humimm.2008.08.283](https://doi.org/10.1016/j.humimm.2008.08.283) PMID: [18812196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18812196/)
48. Endharti AT, Rifa'i M, Shi Z, Fukuoka Y, Nakahara Y, Kawamoto Y, et al. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol*. 2005; 175: 7093–7097. PMID: [16301610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16301610/)
49. Suzuki H, Shi Z, Okuno Y, Isobe K. Are CD8+CD122+ cells regulatory T cells or memory T cells?. *Hum Immunol*. 2008; 69: 751–754. doi: [10.1016/j.humimm.2008.08.285](https://doi.org/10.1016/j.humimm.2008.08.285) PMID: [18817826](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18817826/)
50. Li S, Xie Q, Zeng Y, Zou C, Liu X, Wu S, et al. A naturally occurring CD8(+)CD122(+) T-cell subset as a memory-like Treg family. *Cell Mol Immunol*. 2014; 11: 326–331. doi: [10.1038/cmi.2014.25](https://doi.org/10.1038/cmi.2014.25) PMID: [24793406](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24793406/)
51. Tsai S, Shameli A, Santamaria P. CD8+ T cells in type 1 diabetes. *Adv Immunol*. 2008; 100: 79–124. doi: [10.1016/S0065-2776\(08\)00804-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)00804-3) PMID: [19111164](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19111164/)
52. Shameli A, Clemente-Casares X, Wang J, Santamaria P. Development of memory-like autoregulatory CD8+ T cells is CD4+ T cell dependent. *J Immunol*. 2011; 187: 2859–2866. doi: [10.4049/jimmunol.1101117](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101117) PMID: [21824864](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21824864/)
53. Zhao Y, Yang L, Wang X, Zhou Z. The new insights from DPP-4 inhibitors: their potential immune modulatory function in autoimmune diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014; 30: 646–653. doi: [10.1002/dmrr.2530](https://doi.org/10.1002/dmrr.2530) PMID: [24446278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24446278/)

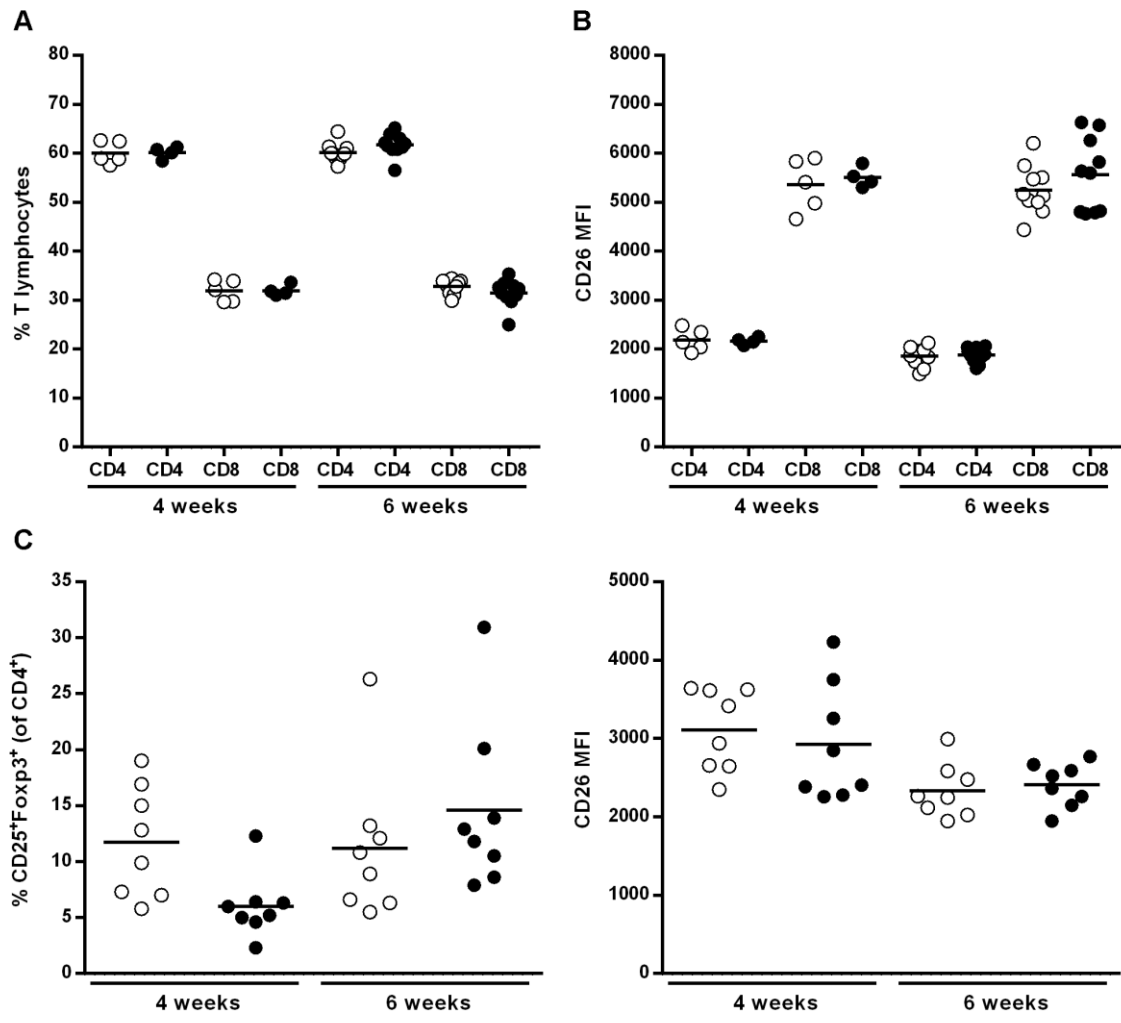
S1 Fig. The effects of MK626 on plasma DPPIV activity and plasma active GLP-1 levels



S2. Fig. Effects of MK626 on thymocytes subsets



S3. Fig. Effects of MK626 on splenic T-lymphocyte subsets from spleen after 4 and 6 weeks of treatment in control and treated mice.



5.2. ARTÍCULO NÚMERO 2

CD26/DPPIV inhibition alters the expression of immune response-related genes in the thymi of NOD mice.

La inhibición de C26/DPPIV altera la expresión de genes relacionados con la respuesta inmunitaria en el timo de los ratones NOD.

Julián MT, Alonso N, Colobran R, Sánchez A, Miñarro A, Pujol-Autonell I, Carrascal J, Rodríguez-Fernández S, Ampudia RM, Vives-Pi M, Puig-Domingo M.

Molecular and Cellular Endocrinology. 2016 May 5;426:101-12.

Factor de impacto 2016: 3.754



CD26/DPPIV inhibition alters the expression of immune response-related genes in the thymi of NOD mice



María Teresa Julián^{a, b, 1}, Núria Alonso^{a, b, g, 1}, Roger Colobran^c, Alex Sánchez^{e, f}, Antoni Miñarro^e, Irma Pujol-Autonell^d, Jorge Carrascal^d, Silvia Rodríguez-Fernández^d, Rosa María Ampudia^d, Marta Vives-Pi^{d, g}, Manel Puig-Domingo^{a, b, g, h, *}

^a Department of Endocrinology and Nutrition, Germans Trias i Pujol Health Sciences Research Institute and Hospital, 08916, Badalona, Spain

^b Department of Medicine, Autonomous University of Barcelona, 08193, Barcelona, Spain

^c Immunology Division, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Vall d'Hebron University Hospital, 08035, Barcelona, Spain

^d Immunology Department, Germans Trias i Pujol Health Sciences Research Institute, 08916, Badalona, Autonomous University of Barcelona, Spain

^e Statistics Department, Faculty of Biology, University of Barcelona, 08028, Barcelona, Spain

^f Statistics and Bioinformatics Unit, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), 08035, Barcelona, Spain

^g CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029, Madrid, Spain

^h CIBER of Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2015

Received in revised form

15 February 2016

Accepted 15 February 2016

Available online 18 February 2016

Keywords:

Type 1 diabetes prevention

DPPIV/CD26 inhibition

DNA microarray analysis

β -cell autoantigens expression

NOD mice

Gene expression

ABSTRACT

The transmembrane glycoprotein CD26 or dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) is a multifunctional protein. In immune system, CD26 plays a role in T-cell function and is also involved in thymic maturation and emigration patterns. In preclinical studies, treatment with DPPIV inhibitors reduces insulinitis and delays or even reverses the new-onset of type 1 diabetes (T1D) in *non-obese diabetic* (NOD) mice. However, the specific mechanisms involved in these effects remain unknown. The aim of the present study was to investigate how DPPIV inhibition modifies the expression of genes in the thymus of NOD mice by microarray analysis. Changes in the gene expression of β -cell autoantigens and *Aire* in thymic epithelial cells (TECs) were also evaluated by using qRT-PCR. A DPPIV inhibitor, MK626, was orally administered in the diet for 4 and 6 weeks starting at 6–8 weeks of age. Thymic glands from treated and control mice were obtained for each study checkpoint. Thymus transcriptome analysis revealed that 58 genes were significantly over-expressed in MK626-treated mice after 6 weeks of treatment. Changes in gene expression in the thymus were confined mainly to the immune system, including innate immunity, chemotaxis, antigen presentation and immunoregulation. Most of the genes are implicated in central tolerance mechanisms through several pathways. No differences were observed in the expression of *Aire* and β -cell autoantigens in TECs. In the current study, we demonstrate that treatment with the DPPIV inhibitor MK626 in NOD mice alters the expression of the immune response-related genes in the thymus, especially those related to immunological central tolerance, and may contribute to the prevention of T1D.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Type 1 diabetes (T1D) is a chronic autoimmune disease caused by the selective destruction of pancreatic β cells (Atkinson and Eisenbarth, 2001). The breakdown of immune self-tolerance homeostasis to pancreatic islet β cells is now recognized as the

essential cause for the development of the diabetogenic autoimmune response (Geenen, 2012). Therefore, the reestablishment of autoimmune tolerance state toward self-antigens (Ags) is one of the primary objectives for the prevention of autoimmune diseases, including T1D. During the last decade, immunotherapeutic innovative strategies have focused on maintaining and restoring self-tolerance to pancreatic β cells in T1D (Staeva et al., 2013).

CD26, also known as dipeptidyl peptidase IV (CD26/DPPIV), is a multifunctional cell surface glycoprotein expressed on a variety of cell types, including immune cells. This protein is a proteolytic enzyme, receptor and co-stimulatory protein and is involved in

* Corresponding author. Department of Endocrinology and Nutrition, Germans Trias i Pujol Health Sciences Research Institute and Hospital, 08916, Badalona, Spain.
E-mail address: mpuigd@igtp.cat (M. Puig-Domingo).

¹ M.T.J. and N.A. contributed equally to this work.

adhesion and apoptosis (Boonacker and Van Noorden, 2003). CD26/DPPIV's proteolytic activity is capable of cleaving N-terminal dipeptides from polypeptides with either proline or alanine residues in the penultimate position, modulating the activity of biologically relevant peptides such as cytokines, chemokines and incretins, among others. In addition, several studies have highlighted the important role of CD26/DPPIV in T cell activation and its involvement in immune responses (Morimoto and Schlossman, 1998). CD26/DPPIV interacts with molecules such as adenosin deaminase and CD45 and is able to modulate the co-stimulation and proliferation of activated T cells (Ohnuma et al., 2008).

Inhibition of CD26/DPPIV suppresses antigen-stimulated T cell proliferation and cytokine production, thus suggesting a potential application for DPPIV inhibitors as immunomodulatory drugs in autoimmune diseases (Biton et al., 2011). The effect of treatment with a CD26/DPPIV inhibitor on the immune system has been recently evaluated in several animal models of inflammatory human diseases (Steinbrecher et al., 2011). In relation to T1D, treatment with CD26/DPPIV inhibitors has been shown to delay the onset of the disease as well as even to reverse new-onset diabetes in *non-obese diabetic* (NOD) mice, in both cases with an associated reduction in the islet lymphocyte infiltration (Ding et al., 2014; Jelsing et al., 2012; Tian et al., 2010) although the exact mechanism is unknown. Treatment with a CD26/DPPIV inhibitor was also described to modify T lymphocyte subsets with an increase in the percentage of regulatory T cells (Tregs) in the peripheral and thymic compartments (Tian et al., 2010). Moreover, in the NOD model, treatment with the CD26/DPPIV inhibitor sitagliptin has been reported to preserve islet transplants through a pathway involving modulation of CD4⁺ T cell migration (Kim et al., 2009). We recently demonstrated that treatment with the CD26/DPPIV inhibitor MK626 decreases the incidence of type 1 diabetes (T1D) by 31% and reduces insulinitis in the pre-diabetic NOD mouse model. No differences were observed in the percentage of T cell subsets from peripheral and central compartments between treated and control mice. However, MK626 treatment significantly increased the expression of CD26 in CD8⁺ T effector memory (T_{EM}) T cells as well as their proliferative capacity and cytokine secretion. *In vitro* assays suggested an immunosuppressive role for CD8⁺ T_{EM} cell subset that may be involved in the protection against autoimmunity to β pancreatic islets associated to CD26/DPPIV inhibitor treatment (Alonso et al., 2015).

There is now evidence that a failure in thymus-dependent central tolerance to pancreatic β cells plays a primary role in T1D pathogenesis (Geenen, 2012). The thymus is the organ responsible for the establishment of immunological central tolerance by the deletion of self-reactive T cells through positive and negative selection mechanisms. Defects in the negative selection of self-reactive T cells in the NOD thymus have been reported (Kishimoto and Sprent, 2001). On the other hand, medullary thymic epithelial cells (mTEC) can express a broad range of tissue-restricted Ags (TRAs) (Derbinski et al., 2001; Fornari et al., 2010; Gillard and Farr, 2006; Kyewski et al., 2002; Oliveira et al., 2013; Sospedra et al., 1998; Tykocinski et al., 2010), also known as "promiscuous gene expression", that imposes T cell tolerance and protects from autoimmune disease (Sospedra et al., 1998).

In the thymus, CD26/DPPIV has been shown to play a role in the differentiation and maturation of thymocytes, whose impairment has remarkable effects on lymphocyte subsets and thymic architecture (Klemann et al., 2009). Moreover, CD26/DPPIV has been proposed as a mediator of intrathymic lymphocyte migration and may play a role in thymic deletion of emerging clones (Ruiz et al., 1996) thus implying a possible role for CD26/DPPIV in the establishment of central tolerance.

To our knowledge, this is the first report that describes the effect

of treatment with a CD26/DPPIV inhibitor on the thymus transcriptome in the NOD mice and hypothesizes its possible involvement in the modification of the expression of genes related to central tolerance mechanisms. Here, we investigated the impact of treatment with the CD26/DPPIV inhibitor MK626 on the thymic gene expression profile of pre-diabetic NOD mice by DNA microarray technique, with particular emphasis on those genes involved in the immune response. We also evaluated the effects of MK626 treatment on islet autoantigens and *Aire* gene expression in thymic epithelial cells by qRT-PCR.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Wild-type NOD mice were obtained from our colony established with mice from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Only females were used for this study. Mice were kept under specific pathogen-free conditions and monitored daily for diabetes onset. At the end of the study, mice were sacrificed by cervical dislocation. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Generalitat de Catalunya, Catalan Government. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Germans Trias i Pujol Research Institute (Permit number: DAAM 5928).

2.2. Treatment with MK626

Female NOD/Ltj mice were placed on either a normal chow diet (Research Diets, Inc, New Brunswick, NJ) or the same diet containing the CD26/DPPIV inhibitor MK626 (21 mg/kg of diet), kindly donated by Dr. James Mu (Merck Research Laboratories, New Jersey, USA), for 4 and 6 weeks starting at 6–8 weeks of age (pre-diabetic stage). The CD26/DPPIV inhibitor used in this study, MK626, was a des-fluoro-analog of sitagliptin (Kim et al., 2005). The treatment protocol is based on previous studies published in the literature using DPPIV inhibitors in experimental diabetes (Jelsing et al., 2012; Kim et al., 2005; Tian et al., 2010), and data reported by Merck Research Laboratories. Also, the chosen concentration of the drug was the one able to maximize plasma DPPIV inhibition in order to get full effect. Mice were monitored daily for urine glucose using Glucocard strips during the whole study (Menarini, Barcelona, Spain). Thymic glands from NOD mice were obtained after 4 weeks (at approximately 10–12 weeks of age, n = 5) and 6 weeks (at approximately 12–14 weeks of age, n = 5) of treatment with MK626. Thymic glands were also obtained from a NOD mouse control group for each time point (n = 10). Samples were snap-frozen in an isopentane/cold acetone bath and were kept at –80 °C until RNA extraction.

2.3. Microarray experiments

RNA was obtained from the thymi of pre-diabetic treated mice at 4 and 6 weeks of treatment, using RNeasy Micro (QIAGEN, Hilden, Germany). Thymic glands were also obtained from a NOD mouse control group for each time point. RNA quality (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) was optimal for microarray experiments (RIN between 6 and 8). cDNA was synthesized with 50–100 ng of total RNA using the WT expression kit (Ambion, Applied Biosystems, CA, USA), fragmented and labeled with the Terminal labeling kit (Affymetrix, Inc. Santa Clara, CA), purified (GeneChip® Sample Cleanup Module, Affymetrix), fragmented and checked to verify its integrity. Mouse Gene1.1 ST 16 array plates (28,853 genes) were hybridized and scanned by an Affymetrix G3000 Gene Array Scanner.

2.4. Statistical analyses of microarrays

Raw expression values obtained from CEL files were pre-processed using the Robust Multiarray Averaging method (Irizarry et al., 2003). These normalized values were used for all subsequent analyses. Experimental data have been uploaded into ArrayExpress for the European Bioinformatics Institute (EBI, www.ebi.ac.uk/aerep/login; E-MTAB-2082). Data were subjected to non-specific filtering to remove low signal and low variability genes. Conservative (low) thresholds were used to reduce possible false negative results. The selection of differentially expressed genes was based on a linear model analysis with empirical Bayes modification for the variance estimates, as previously described (Smyth, 2004). This method is similar to using a 't-test' with an improved estimate of the variance. To account for the multiple testing probability effects arising when many tests (one per gene) are performed simultaneously, p-values were adjusted to obtain strong control over the false discovery rate using the Benjamini-Hochberg method (Benjamini and Hochberg, 1995). Genes were considered differentially expressed based on the following criteria: genes with an adjusted p-value < 0.05 and a logarithmic fold change (\log_2FC) ≥ 0.8 were considered up-regulated, whereas genes with $\log_2FC \leq -0.8$ were considered down-regulated.

Genes were classified into functional categories on the basis of Gene Ontology (GO) nomenclature (www.geneontology.org) and other annotations provided by NCBI Entrez (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) database and data from general literature. The Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems®) (www.ingenuity.com) was used to identify the canonical pathways from the IPA library that were most significant to the data sets. Data from the IPA are expressed as a p-value < 0.05 calculated by using the right-tailed Fisher's Exact Test. The Fisher test is used to compare the number of user-specified molecules of interest that participate in a given function, relative to the total number of occurrences of these molecules in all functional annotations in Ingenuity's knowledge base.

2.5. Quantitative RT-PCR

Total RNA from each sample was reverse-transcribed with a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). cDNA synthesis reactions were carried out using random hexamers (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, BioTools, Valle de Tobalina, Madrid, Spain) and reverse transcriptase Moloney-murine-Leukaemia-virus (M-MLV) (200 U/ μl , Promega, Madison, WI). qRT-PCR assays were performed under Taqman universal assay on a LightCycler® 480 (Roche, Mannheim, Germany) using the following TaqMan assays: *Plunc* (Mm00465064_m1), *Ear1* (Mm03059811_g1), *Reg3g* (Mm01181783_g1), *Ccl11* (Mm00441238_m1), *Nov* (Mm00456855_m1), *Muc1* (Mm00449604_m1), *Ccl6* (Mm01302419_m1), *Sprra1* (Mm00845122_s1), *Gfra2* (Mm00433584_m1), *Clec7a* (Mm01183349_m1), *C3ar1* (Mm01184110_m1), *Lgmn* (Mm01325250_m1), *Ccl21* (Mm03646971_gH), *Ccl3* (Mm00441259_g1), *Ccl9* (Mm00441260_m1), *Cd4* (Mm00442754_m1), *Epcam* (Mm00493214_m1), *Rag2* (Mm01270938_m1), *Dpp4* (Mm00494549_m1) and *Cd3d* (Mm00442746_m1). Relative quantification was performed by normalizing the expression for each gene of interest to that of the housekeeping gene *Gapdh* (Mm99999915_g1), as described in the $2^{-\Delta\text{Ct}}$ method (Livak and Schmittgen, 2001), and was referred as arbitrary units.

2.6. Enzyme-linked immunosorbent assays

Protein lysates were obtained from the thymi of pre-diabetic mice at 6 weeks of treatment with MK626. Frozen tissues were

crushed with a mortar and pestle in liquid nitrogen and homogenized in phosphate buffered saline with protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific, MA, USA) using a 21G needle and syringe at 4 °C. Homogenates were centrifuged at 5000 \times g for 5 min, and supernatants were collected and stored at -80 °C until use. Protein concentration of the lysates was determined using the Bicinchoninic acid (BCA) assay (Thermo Scientific) and the assessment of PLUNC, CCL21 (Abxexa Ltd., Cambridge, UK) and REG3G (Cusabio, Hubei, China) was performed by the corresponding ELISAs. The amount of protein of interest was normalized to the amount of total protein for each sample, and results were expressed as pg of protein of interest/mg of total protein.

2.7. Isolation of thymic epithelial cells (TECs) and gene expression analysis by qRT-PCR

For the analysis of expression of β -cell autoantigens and *Aire* in TECs, 5 treated under the aforementioned MK626 administration for 6 weeks and 5 control female NOD/LtJ mice were used. Thymic glands of NOD mice, with or without MK626 treatment, were obtained. Extraction and digestion of the individual thymus were performed according to Seach N. et al. (Seach et al., 2012). Thymic cellular suspension was passed through 70- μm nylon mesh filter before staining and sorting. The staining was performed using anti-EpCAM-PE (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BD Bioscience) and anti-CD45-APC (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, BD Bioscience) and then the cellular suspension was sorted selecting CD45 negative cells and EpCAM positive cells. Collected cells from the sorting were washed twice with a phosphate buffer and then the pelleted cells were snap frozen in liquid nitrogen. RNA extraction was performed using the RNAeasyKit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. cDNA was obtained by retrotranscription with the enzyme MMLV according to manufacturer's instructions (Promega) and using Oligo-dT primers. qRT-PCR assays were performed using TaqMan universal assay conditions and using the following TaqMan assays: *Gad1* (Mm04207432_g1), *Gad2* (Mm00484623_m1), *Ins1* (Mm01950294_s1), *Ins2* (Mm00731595_gH), and *Aire* (Mm00477461_m1). Relative quantification was performed by normalizing the expression for each gene of interest to that of the housekeeping gene *Gapdh* (Mm99999915_g1), as described in the $2^{-\Delta\text{Ct}}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.8. Statistical analysis

The analyses of the array data were described in the corresponding subsection. Statistics was performed using the Prism 5.0 software (Graph-Pad software Inc., San Diego, CA). Median values between treated and control group were compared using a non-parametric Mann-Whitney test. A p-value < 0.05 was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Effects of CD26/DPPIV inhibition in thymic gene expression profile

A microarray analysis was performed on the thymi of 5 treated and 5 control NOD mice for each checkpoint (4 and 6 weeks of treatment). One of the samples from treated group was discarded because quality control post-hybridization was not optimal for microarray experiments. A total of 58 genes out of the 28,853 mouse genes represented on the gene chip were differentially expressed in treated mice after 6 weeks of treatment with MK626 using an adjusted p-value < 0.05. Strikingly, all of these 58 differentially expressed genes were up-regulated. In contrast, after 4

weeks of treatment, no significant differences in thymic gene expression were found between groups. The heatmap analysis is represented in Fig. 1.

3.2. Validation of the microarray results by qRT-PCR and ELISA

Validation by qRT-PCR of the most selected targets confirmed the microarray findings (Fig. 2). Only minor discrepancies were found: The difference observed in two over-expressed genes in MK626-treated mice, *Sprr1a* and *Gfra2*, do not reach statistical significance and *Ear1* gene showed an inverse tendency with respect the microarray results, although without significant differences.

As a control, we also validated the expression of some alternative thymus-related genes such as *Rag2*, *Cd4*, *Cd3d*, *Epcam* and *Dpp4* by qRT-PCR. Although microarray data did not show statistical difference between treated and controls for the expression of the aforementioned genes, qRT-PCR technique showed a significant increased expression of *Epcam* ($p < 0.01$), *Dpp4* ($p < 0.01$) and *Cd3d* ($p < 0.05$) in MK626-treated mice (Fig. 2). Moreover, *Cd4* and *Rag2* gene expression tended to increase in the treated mice, although the difference was not statistically significant.

Additionally, the validation of gene expression microarray results was also achieved at protein level. Quantification of the protein levels of some over-expressed genes (*Plunc*, *Reg3g* and *Ccl21*) was performed in the thymi of MK626-treated mice by ELISA technique. Results showed that PLUNC, REG3G and CCL21 protein levels tend to be increased in treated mice compared to control

mice, although the difference was not statistically significant (Fig. 3).

3.3. Analysis of differentially expressed genes

The differentially expressed genes mainly belonged to categories linked to the immune system, inflammation and other biological cellular processes according to gene ontology (GO) categories and data provided by NCBI Entrez database and by the literature. Genes selected by functional categories are displayed in Table 1. Within the immune system, the most over-represented categories included innate immunity, chemotaxis, immunoregulation and antigen presentation.

The Ingenuity Pathway analysis (IPA) identified 5 canonical pathways (Table 2). Altered pathways in the thymi from treated mice were primarily related to the immune system. Moreover, IPA analysis also indicated that the most over-expressed genes encode molecules belonging to inflammatory and immune responses, including those linked to immune cell trafficking (Table 3). Gene interactions involved in immune and inflammation responses (Fig. 4) are represented by the interaction network analysis.

Remarkably, a number of genes that were differentially affected by CD26/DPPIV inhibition are involved in processes related to differentiation or the activation of T cells and/or are implicated in the maintenance of immune tolerance. The discussion section of the present study will focus on those genes implicated in immunological central tolerance.

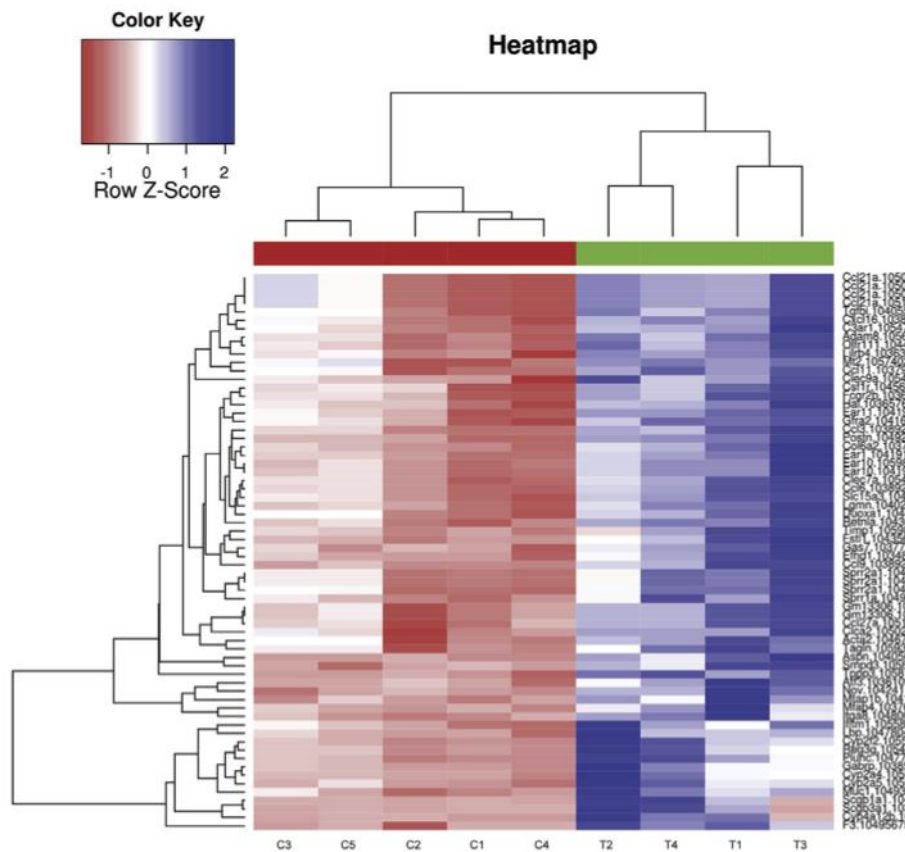


Fig. 1. Heatmap of thymic gene expression profile from NOD mice. Rows correspond to differentially expressed genes, and columns represent each thymus sample from control (red columns) and treated (blue columns) NOD mice. Data were row-centered by subtracting the row-mean from each value so that under- and overexpression are indicated by negative (red) and positive (blue) values. C: Control group; T: Treated group. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

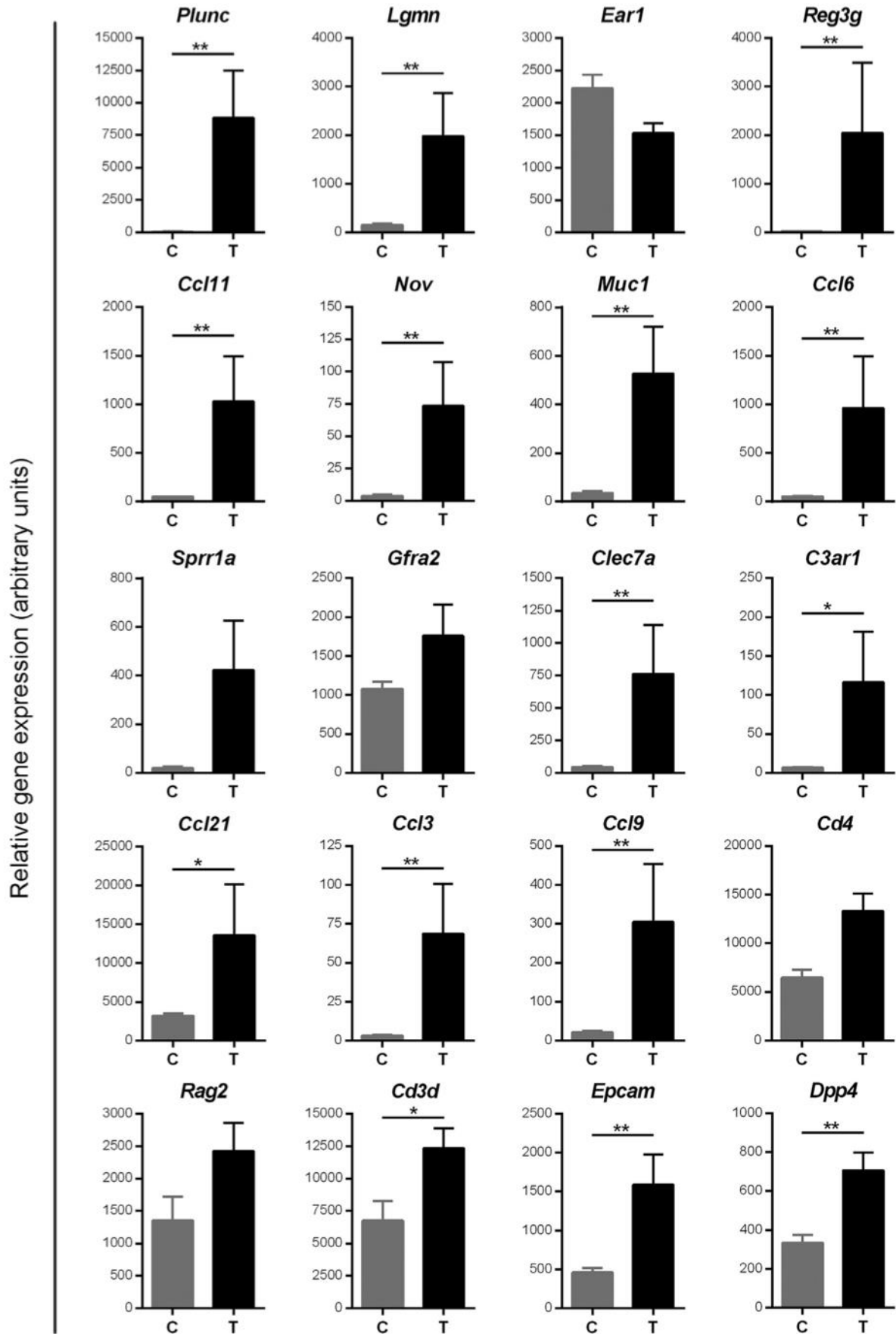


Fig. 2. Validation of the gene expression profile. Relative expression levels measured by qRT-PCR of selected genes in control (C, n = 5) and treated (T, n = 5) groups. Results are expressed as mean + SEM. Non parametric Mann–Whitney test was used for the evaluation of statistical significance. Significance levels, *p < 0.05, **p < 0.01.

3.3.1. CD26/DPPIV inhibition increases the expression of innate immunity genes in the thymus of NOD mice

Treatment with the CD26/DPPIV inhibitor MK626 was associated with higher expression of genes involved in the innate immunity, such as pattern recognition receptors (*Clec7a*, *Clec9a*, *Reg3g*) and other anti-bacterial genes (*Muc1*, *Plunc*, *Lbp*, *Csf1r*, *EARs*). *Plunc* was the most induced gene in our microarray analysis, and although the exact biological function of this gene is not clearly defined, it may play a role in innate immunity in the upper respiratory tract (Bartlett et al., 2011). In the murine thymus, the expression of *Plunc* gene in the medullary compartment has been reported (LeClair et al., 2001).

The role of innate immunity in preventing autoimmunity against pancreatic β cells in T1D is gaining importance. It has been described that a combination of toll-like receptor 2 (TLR2) tolerization and CD26/DPPIV inhibition can reverse early-onset diabetes in NOD mice (Kim et al., 2012). In addition, recent studies have reported a key role of CLEC7a (Dectin-1) protein, which belongs to the C-type lectin-domain superfamily of pattern recognition receptors, in the establishment of immune tolerance and in preventing autoimmune diseases, such as T1D. It has been recently demonstrated that treatment with zymosan, a fungal wall cell component, protects NOD from T1D. Zymosan interacts with TLR2 and CLEC7a to induce suppressor cytokines (IL-10, TGF- β) by antigen presenting cells (APCs), thus promoting the activation and expansion of Tregs (Dillon et al., 2006; Karumuthil-Melethil et al., 2008). It is noteworthy that in the present study, *Clec7a* gene was found to be over-expressed in the thymi of treated mice.

Another up-regulated gene expression in MK626-treated mice was *Muc1*. This gene encodes a transmembrane glycoprotein expressed on the surface of most types of epithelial cells that plays an essential role in the protection of mucosal barriers (Mockensturm-Gardner and Gendler, 1996). In the immune system, MUC1 protein (or mucin) is expressed on the surface of dendritic cells (DCs), monocytes and activated T cells. MUC1 was shown to inhibit T cell proliferative response inducing an anergy-like state. MUC1 also acts in lymphocyte trafficking due to its adhesion and/or anti-adhesion properties (Agrawal and Longenecker, 2005). In addition, the promiscuous expression of MUC1 by mTECs has been described to confer a state of immune tolerance (Acres et al., 2000; Cloosen et al., 2007). More recently, there has been a report of increased expression of MUC1 on Tregs after CD3 stimulation and that CD3/MUC1 co-stimulation leads to Treg expansion (Konowalchuk and Agrawal, 2001). Hence, MUC1 may have implications for immune tolerance through its involvement in the modulation of T cell responses and Tregs proliferation.

Data obtained in the present study suggest a possible role of CD26/DPPIV inhibition in the innate immune response and support the hypothesis that innate immunity has a protective role in T1D. The targeting of CD26/DPPIV by MK626 increases transcripts of genes related to innate immunity and may improve immunological central tolerance through the impairment of T cell responses and the enhancement of Tregs expansion.

3.3.2. Chemotaxis genes were over-expressed in the thymus by MK626 treatment

The microarray data revealed elevated expression of genes encoding some chemokines in treated NOD mice (Table 1). This group represented one of most over-expressed categories affected by CD26/DPPIV inhibition. Several chemokines expressed in the thymus have been described as substrates of the peptidase activity of CD26/DPPIV, which either inactivates or alters the chemotactic activity of these chemokines. In the microarray analysis, the expression levels of genes encoding several DPPIV-processed chemokines, such as CCL11 and CCL3, were increased in MK626-

treated mice. However, genes that encode other chemokines not targeted by CD26/DPPIV activity, such as CCL21, CCL9, CCL6 and CXCL16, were also over-expressed, suggesting that these differential effects in gene expression of these chemokines may be independent of CD26/DPPIV enzymatic activity.

The migration of developing thymocytes within the thymus is crucial for T cell repertoire selection and requires complex interactions between thymocytes and the surrounding microenvironment (Ruiz et al., 1996). It is well known that chemokines are key elements in intrathymic organization and the migration of thymocytes during their maturation, thus contributing to the sorting of positively and negatively selected thymocytes (Annunziato et al., 2001). Therefore, the up-regulation of the *Ccl21* gene expression represents one of the most important differential effects caused by CD26/DPPIV inhibition in this category due to its effects on thymocyte migration processes. The chemokine CCL21 is chemotactic agent for thymocytes and naïve T cells and binds to chemokine receptor 7 (CCR7). CCR7 and its ligands, CCL21 and CCL19, play an important role in lymphoid cell trafficking and the structural organization of lymphoid tissues, and they contribute to both immunity and tolerance (Förster et al., 2008). Several studies have demonstrated the role of the CCR7 axis in thymic compartmentalization by coordinating migratory events during T cell development (Ueno et al., 2004). In the thymus, the chemotactic interaction between CCR7 expressed by positively selected CD4⁺ and CD8⁺ thymocytes and CCL21 produced by mTECs is essential for the migration of these thymocytes from the cortex to the medulla. This thymocyte migration process mediated by the CCR7 axis contributes to the negative selection of self-reactive thymocytes and is crucial in the establishment of a self-tolerant T cell repertoire (Nitta et al., 2009). A deficiency of CCR7 or its ligands increases the risk for the development of autoimmune diseases, including T1D (Misslitz et al., 2007). The present microarray analysis revealed that gene expression levels of *Ccr7* and *Ccl19* were also up-regulated in treated NOD mice, but the differences were not statistically significant.

The *Ccl11* gene was also significantly over-expressed in treated NOD mice. This chemokine, also known as eotaxin, is constitutively expressed in the thymus (Rothenberg et al., 1995) and is cleaved by CD26/DPPIV proteolytic enzyme (Struyf et al., 1999) affecting its biological activity. CCL11 displays a chemotactic selective activity for eosinophils, and it has been reported that the inhibition of CD26/DPPIV induces an *in vivo* recruitment of human eosinophils (Forssmann et al., 2008). Moreover, a recent report described an increase in the secretion of eosinophil-associated RNAases (EARs) from mouse eosinophils due to eotaxin (Shamri et al., 2012). EARs from intracellular granules are eosinophil ribonucleases and represent the major source of eosinophilic secretory effector protein participating in allergic diseases and host immunity (Rosenberg and Domachowske, 2001). It is of note that the gene expression levels of several EAR genes (*Ear1*, *Ear10*, *Ear11*) were increased in the present microarray study. Therefore, the elevated expression of *Ccl11* and *Ear* genes in the thymus may reflect an increased number of eosinophils due to CD26/DPPIV inhibition. Notably, eosinophils have been shown to be recruited in the thymus during MHC class I-restricted T cell selection, implying an immunomodulatory role for these cells (Throsby et al., 2000). In addition, it is known that self-reactive T cells are depleted by apoptosis during intrathymic selection. The clearance of millions of these apoptotic thymocytes is important for thymic development and is achieved by thymus resident macrophages and DCs (Esashi et al., 2003). However, recent data suggest a direct contribution of eosinophils and neutrophils, which are recruited to the sites of extensive apoptosis to maximize the efficiency of apoptotic cell removal (Kim et al., 2010). Moreover, it has been demonstrated that

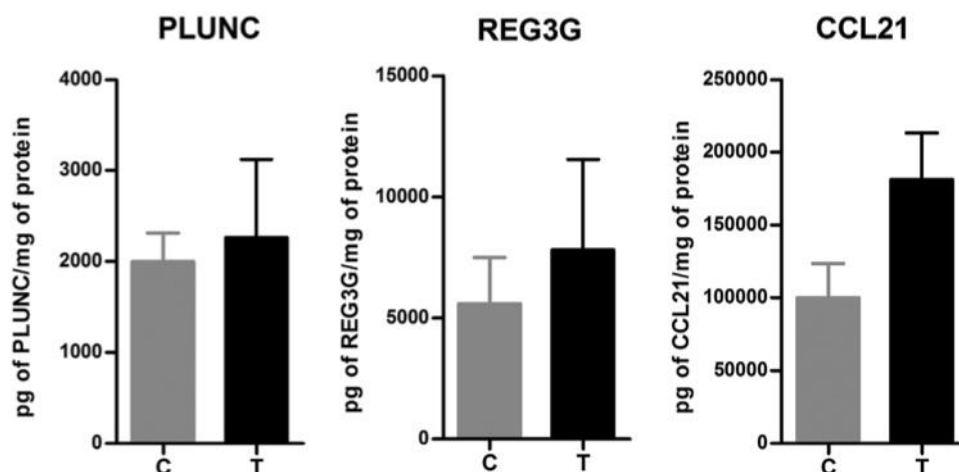


Fig. 3. Analysis of the gene expression profile at protein level. Levels of PLUNC, CCL21 and REG3G measured by ELISAs in control (C, n = 5) and treated (T, n = 5) groups. Results are expressed as pg of protein of interest/mg of total protein (mean + SEM). Non parametric Mann–Whitney test was used for the evaluation of statistical significance.

the rapid removal of apoptotic cells is crucial for preventing inflammatory and autoimmune responses (Sarang et al., 2013).

Expression levels of other genes encoding chemokines were also significantly increased in our treated mice. These chemokines included CCL3 (MIP-1 α), CCL6 (C10/MRP-1) and CCL9 (MIP-1 γ /MRP-2), which have also been shown to have chemotactic activity, primarily for monocyte-macrophages (CCL3, CCL6, CCL19), as well as for eosinophils (CCL3, CCL6) and neutrophils (CCL3, CCL9) (Coelho et al., 2007; Maurer and von Stebut, 2004). Thus, these chemokines may also be involved in apoptotic cell clearance.

Taken together, our data suggest that CD26/DPPIV inhibition by MK626 treatment may have a key role in thymocyte trafficking through the modification of the expression profile of thymic microenvironmental chemokines contributing to the enhancement of negative selection. These data support the results obtained in the IPA analysis in which 20 molecules were found to be involved in immune cell trafficking (Table 3). Alternately, MK626 treatment may enhance the clearance of apoptotic cells generated during thymocyte selection through the recruitment of eosinophils.

3.3.3. Targeting CD26/DPPIV induces the expression of antigen presentation- and immunoregulation-related genes in the thymus of treated mice

As shown in Table 1, treated NOD mice showed a higher expression of genes involved in antigen presentation and the regulation of immune responses, notably *Fcgr2b* and *Lilrb4* genes.

The protein encoded by *Fcgr2b* (Fc receptor, IgG, low affinity IIb) gene belongs to the family of low affinity receptors for the Fc portion of immunoglobulin gamma complex. These receptors are involved in a variety of effector and regulatory functions such as the phagocytosis of immune-complexes from the circulation and the modulation of antibody production by B cells. In contrast to other members of this family, Fc γ RIIB acts as a negative regulator of the immune response, limiting T cell activation by inhibiting both antigen processing and DC activation (Desai et al., 2007) as well as by suppressing the activation of autoreactive B cells (Nimmerjahn and Ravetch, 2007). A deficiency in the inhibitory Fc γ RIIB leads to imbalanced immune responses that result in the development of autoimmune diseases (Nimmerjahn and Ravetch, 2006). Therefore, Fc γ RIIB potentially may contribute to the maintenance of tolerance and protection from autoimmune diseases.

Another significantly over-expressed gene was *Lilrb4*. The encoded protein, also known as immunoglobulin-like transcript 3 (ILT-3), is a member of the leukocyte Ig-like receptor family (LIR),

which is selectively expressed by APCs such as DCs, where it binds to MHC class I molecules and transduces a negative signal that inhibits stimulation of the immune response (Kim-Chulze et al., 2006). It is known that inhibitory activity of Tregs is determinant in the prevention of autoimmune disorders. A distinct population of these lymphocytes with a CD8⁺ CD28⁻ phenotype has been characterized and is referred to as T suppressor cells (Chang et al., 2002). These lymphocytes are FOXP3⁺ and MHC class I-restricted, and they tolerize APCs by inducing the up-regulation of inhibitory receptors, such as LILRB4/ILT-3 and LILRB/ILT-4, as well as by inhibiting CD40 signaling in APCs. These tolerogenic LILRB4/ILT-3 DCs induce an anergic state in CD4⁺ T cells, resulting in the loss of their proliferative and differentiation capacity and the transformation of these cells into Tregs, which continue the cascade of suppression by tolerizing other DCs (Kim-Chulze et al., 2006; Manavalan et al., 2003). Therefore, the up-regulation of LILRB4/ILT-3 appears to be a general characteristic of tolerogenic DCs and may be important for induction of antigen-specific tolerance.

Notably, the IPA analysis identified an altered pathway implicated in immunoregulation: IL-10 signaling. IL-10 is an anti-inflammatory and immunoregulatory cytokine. It is expressed by many immune cell types of both the adaptive and innate immune systems, supporting its crucial role as a regulator of immune responses. The main producers of IL-10 are Tregs, and this cytokine enhances the differentiation of these IL-10-secreting Tregs cells, thus providing a positive regulatory feedback (Saraiva and O'Garra, 2010). In addition, IL-10 can be induced by CLEC7a (dectin-1) stimuli. Remarkably, the *Clec7a* gene expression was up-regulated in the present microarray analysis. A potent effect for IL-10 in preventing autoimmunity has been described, although its role in the development of diabetes is controversial. In NOD mice, some studies have demonstrated that IL-10 is important in establishing immune tolerance, whereas others have demonstrated accelerated diabetogenic autoimmune responses (Saraiva and O'Garra, 2010; Tai et al., 2011). In our present study, the lack of IL-10 gene over-expression in the thymi of treated mice can be attributed to the low sensitivity of the arrays used to detect cytokines (Park and Stegall, 2007).

Thus, CD26/DPPIV inhibition may exert a potent immunosuppressive activity on T cells by inducing tolerogenic DCs through the over-expression of inhibitory receptors, such as Fc γ RIIB and LILRB4/ILT-3. Remarkably, these encoded proteins are not cleaved by CD26/DPPIV, and these results support the hypothesis that the proteolytic activity of DPPIV is not essential for its co-stimulatory function in T cell response (Boonacker et al., 2002).

Table 1
Functional categorization of transcripts that were differentially expressed in treated NOD mice.

Function	Gene	Locus ID	Protein name	Log2 FC	adj p-value	Al/prol ^a	Other functions	
Innate immunity	<i>Plunc</i>	18843	BPI fold containing family A, member 1	4.8334	0.0108	No ^a	Inflammatory response	
	<i>Reg3g</i>	19695	Regenerating islet derived protein 3γ	2.8724	0.0174	No	Inflammatory response	
	<i>Ear11</i>	93726	Eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 11	1.9618	0.0298	No	Inflammatory response; Chemotaxis	
	<i>Ear10</i>	93725	Eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 10	1.5329	0.0174	No	Inflammatory response	
	<i>Ear1</i>	13586	Eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 1/Eosinophil cationic protein 1	1.4553	0.0159	No	Inflammatory response	
	<i>Clec7a</i>	56644	C-type lectin domain family 7, member A/Dectin-1	1.3757	0.0298	No	Inflammatory response; Immunoregulation; Phagocytosis; Cell adhesion; Signaling	
	<i>Muc1</i>	17829	Mucin -1	1.2602	0.0174	No	Inflammatory response; Cell adhesion; Cell growth; Signaling; Apoptosis	
	<i>Lbp</i>	16803	Lipopolysaccharide binding protein	1.2689	0.0478	No	Inflammatory response; Phagocytosis; Chemotaxis; Cell motility; Cell migration; Signaling	
	<i>Ifitm1</i>	68713	Interferon-induced transmembrane protein 1	1.1397	0.049	Yes	Cell adhesion; Cell migration; Cell proliferation	
	<i>Clec9a</i>	232414	C-type lectin domain family 9 member A	0.8924	0.0439	No	Antigen presentation; Immunoregulation	
Chemotaxis	<i>Csf1r</i>	12978	Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor	0.864	0.0437	Yes	Inflammatory response; Cell proliferation; Cell migration; Cell motility; Cell adhesion; Signaling	
	<i>Ccl11</i>	20292	Chemokine (C-C motif) ligand 11/Eotaxin	1.6042	0.0174	Yes	Cytokine activity; Inflammatory response; Cell migration; Cell motility; Cell growth; Cell proliferation; Signaling	
	<i>Ccl6</i>	20305	C-C motif chemokine 6	1.4969	0.0177	No	Cytokine activity; Inflammatory response; Cell migration; Cell motility	
	<i>Ccl27</i>	20301	Chemokine ligand 27	1.618	0.0177	Yes	Cytokine activity	
	<i>C3ar1</i>	12267	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	1.559	0.0298	No	Inflammatory response; Antigen presentation; Phagocytosis; Cell migration; Cell motility; Signaling	
	<i>Ccl21</i>	18829	Chemokine ligand 21a	1.1009	0.0298	No	Cytokine activity; Inflammatory response; Immunoregulation; Cell migration;	
	<i>Ccl3</i>	20302	C-C motif chemokine 3, MIP1α	1.1966	0.0298	Yes	Cytokine activity; Inflammatory response; Cell migration; Cell motility; Signaling; Apoptosis	
	<i>Ccl9</i>	20308	C-C motif chemokine 9, MIP1γ	1.1829	0.0311	No	Cytokine activity; Inflammatory response	
	<i>Cxcl16</i>	66102	C-X-C motif chemokine 16	0.9195	0.0437	No	Cytokine activity; Innate immunity; Antigen presentation; Cell migration; Cell motility; Cell growth	
	Immuno regulation	<i>Fcgr2b</i>	14130	Low affinity Ig gamma Fc region receptor IIB	0.9484	0.0339	No	Inflammatory response; Antigen presentation; Phagocytosis; Cell proliferation; Signaling; Apoptosis
<i>Lilrb4</i>		14728	Leukocyte Ig-like receptor subfamily B member 4	0.9461	0.0341	No	Antigen presentation; Signaling	
Antigen presentation Inflammation	<i>Lgmn</i>	19141	Legumin	0.9826	0.0298	Yes	Cell growth; Apoptosis	
	<i>Scgb3a1</i>	68662	Secretoglobin family 3A member 1	4.4231	0.0241	No	Cytokine activity; Cell proliferation	
	<i>Sgb1a1</i>	22287	Uteroglobin	4.2748	0.0241	No	Cytokine activity; Immunoregulation; Cell proliferation; Signaling	
	<i>Retnla</i>	57262	Resistin-like alpha	2.2577	0.0341	No		
Cell adhesion	<i>Fstl1</i>	14314	Follistatin related protein	1.1499	0.0298	No	Innate immunity; Autoantigen; Cell proliferation	
	<i>Itga8</i>	241226	Integrin alpha 8	1.7714	0.0177	Yes	Metanephric and Nervous system development, Extracellular matrix organization; Signaling	
	<i>Postn</i>	50706	Periostin	1.3371	0.0174	No	Inflammatory response; Extracellular matrix organization	
	<i>Mfap4</i>	76293	Microfibril-associated glycoprotein 4	1.1654	0.0311	Yes	Extracellular matrix organization; Signaling	
	<i>Adam8</i>	11501	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8	1.1554	0.033	No	Inflammatory response; Innate immunity; Chemotaxis; Cell migration; Cell motility; Signaling; Apoptosis; Extracellular matrix organization	
	<i>Col6a2</i>	12834	Collagen alpha-2 (IV) chain	1.1455	0.0298	No	Extracellular matrix organization	
	<i>Tgfb1</i>	21810	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	1.0326	0.0341	Yes	Signaling; Extracellular matrix organization	
	Cell proliferation/Growth	<i>Nov</i>	18133	Nephroblastoma overexpressed gene/Protein NOV homolog	1.6978	0.0174	No	Cell growth
		<i>Tppp3</i>	67971	Tubulin polymerization promoting protein family member 3	1.42	0.0298	Yes	
		<i>Smpd3</i>	58994	sphingomyelinphosphodiesterase 3	1.1967	0.0174	No	Signaling; Apoptosis
Apoptotic process	<i>Atf3</i>	11910	Activating transcription factor 3/Cyclic AMP-dependent transcription factor 3	0.8808	0.0298	No	Inflammatory response; Transcription factor; Apoptosis	
	<i>Timp1</i>	21857	Metalloproteinase inhibitor 1	1.4433	0.0341	No	Erythrocyte maturation; Cell proliferation	

Table 1 (continued)

Function	Gene	Locus ID	Protein name	Log2 FC	adj p-value	Al/prol ^a	Other functions
Nervous system	<i>Clca2</i>	80797	Chloride channel calcium activated 2	1.324	0.0413	No	
	<i>Gabrp</i>	216643	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi	1.9095	0.0298	No	
	<i>Efh1</i>	98363	EF-hand domain-containing protein D1	1.3264	0.0341	No	
	<i>Gas7</i>	14457	Growth arrest specific protein 7	1.1794	0.0435	Yes	Cytoskeleton
	<i>Duoxa 1</i>	213696	Dual oxidase maturation factor 1	1.12	0.0298	Yes	Cell adhesion
	<i>Gfra2</i>	14589	Glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha2	1.0545	0.0298	No	Signal transduction
Miscellaneous Ion binding	<i>Mtap1b</i>	17755	Microtubule-associated protein 1B	0.9402	0.0413	No	Cytoskeleton
	<i>Cyp2f2</i>	13107	Cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2	4.07	0.0311	No	
	<i>Cyp4a12b</i>	13118	Cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12	3.0037	0.0298	No	
	<i>Cyp2a5</i>	13087	Cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 5	2.3177	0.0159	No	
	<i>Cyp2a4</i>	13086	Cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 4	1.9005	0.0298	No	
Olfaction	<i>Mt2</i>	17750	Metallothionein 2	1.4602	0.0405	No	
Keratinization	<i>Olf111</i>	545205	Olfactory receptor 111	1.5254	0.0298	No	Signal transduction
	<i>Spr2a1</i>	20755	Small proline-rich protein 2A1	1.5064	0.0298	No	
Protein transport	<i>Spr1a</i>	20753	Small proline-rich protein 1A/Cornifin-A	1.1202	0.0298	No	
	<i>Slc15a3</i>	65221	Solute carrier family 15	0.89	0.0298	No	
Bio mineralization	<i>Aspn</i>	66695	Asporin	1.1079	0.0298	Yes	
Blood coagulation	<i>F3</i>	14066	Coagulation factor III/Tissue factor	1.1209	0.0477	No	
Cytoskeleton	<i>Acta2</i>	11475	Actin, aortic smooth muscle	1.3261	0.0413	No	
	<i>Tagln</i>	21345	Transgelin	0.9713	0.0311	No	
Histidine metabolism	<i>Hal</i>	15109	Histidine ammonia lyase	1.11209	0.0298	Yes	

Genes significantly up-regulated by targeting CD26/DPPIV are listed, with the mean difference between the groups (Fold Change; FC) and the false discovery rate estimated by the Benjamini-Hochberg method (adjusted *p*-value: < 0.05).

^a Al/prol is referenced to the presence in peptide of alanine and proline in the penultimate position.

3.3.4. MK626 treatment increases the expression of genes related to other cell functions

Several genes regulating biological processes, such as cell adhesion, cell migration and cell proliferation, were more highly expressed in treated mice.

The interactions between thymocytes and the microenvironment are essential for the intrathymic migration of thymocytes. Interestingly, the impairment of thymocyte migration through the thymic microenvironment has been reported in NOD mice (Cotta-de-Almeida et al., 2004). The enzymatic activities of metalloproteinases are involved in thymocyte–stroma interactions by remodeling of the extracellular matrix (ECM). A role for metalloproteinases in thymic T cell development has been recently demonstrated using Adam8-deficient mice (Gossens et al., 2010). ADAM8 is a member of the Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) family of proteins. A variety of biological processes involving cell–cell and cell–matrix interactions have been implicated. In the thymus, ADAM8 is expressed by TECs, principally by

mTECs, and is involved in intrathymic T cell migration through the aforementioned remodeling of the ECM. Interestingly, data from the present microarray experiments revealed increased transcripts of *Adam8* gene in treated mice and strongly support the contention that CD26/DPPIV inhibition may enhance the migration of positively selected thymocytes to the medulla, which is essential for the establishment of central tolerance.

Table 3

Top biological functions identified in treated NOD mice by Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

Name	P-value	Molecules
Disease and disorders		
Inflammatory response	3.49E-09 – 1.83E-02	27
Immunological disease	7.32E-08 – 1.73E-02	21
Gastrointestinal disease	9.48E-08 – 1.83E-02	21
Ophthalmic disease	9.48E-08 – 7.38E-03	11
Respiratory disease	5.27E-06 – 1.47E-02	18
Molecular and cellular functions		
Cellular movement	5.31E-10 – 1.83E-02	31
Cell-to-cell signaling and interaction	2.98E-08 – 1.83E-02	24
Cellular function and maintenance	2.19E-06 – 1.47E-02	22
Cellular assembly and organization	2.85E-05 – 1.83E-02	17
Cellular development	6.68E-05 – 1.83E-02	24
Physiological system development and function		
Immune cell trafficking	6.08E-10 – 1.83E-02	20
Hematological system development and function	1.67E-08 – 1.83E-02	28
Tissue morphology	1.67E-08 – 1.47E-02	27
Tissue development	2.85E-05 – 1.83E-02	25

Numbers of molecules involved in each biological function are shown. Data are expressed as a *p*-value < 0.05.

Table 2

Top over-represented pathways identified in treated NOD mice by Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

Top IPA canonical pathways (<i>p</i> -value)
Agranulocyte adhesion and diapedesis (1.29E-07)
Granulocyte adhesion and diapedesis (1.23E-06)
Hepatic fibrosis/Hepatic stellate cell activation (1.58E-03)
Communication between innate and adaptive immune cells (2.07E-02)
IL- 10 signaling (2.4E-02)

Immune Canonical Pathways among the "Top 20" biological canonical pathways resulting from IPA analysis. *p*-value calculated by the Ingenuity algorithm is given.

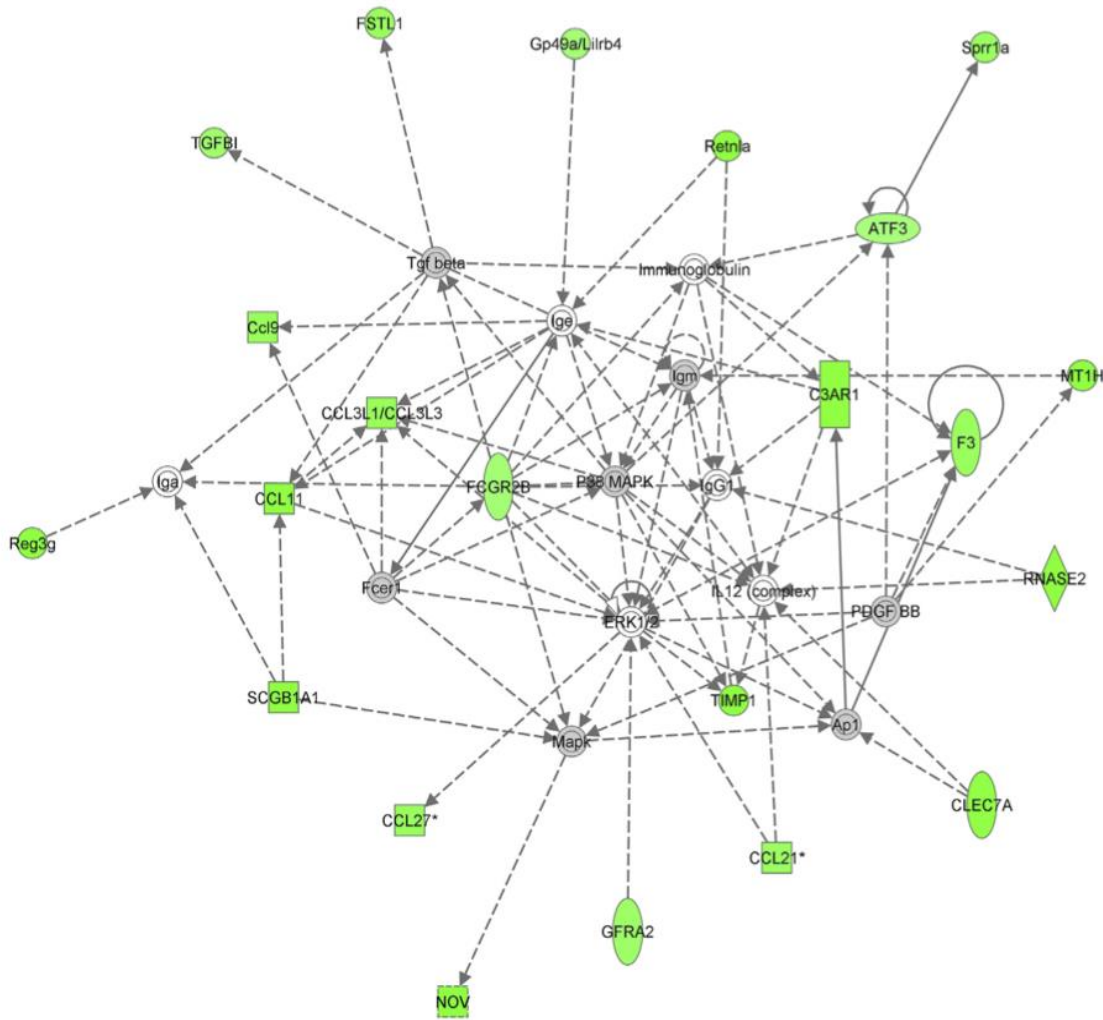


Fig. 4. Gene network generated by Ingenuity Pathway Analysis (IPA). IPA was applied to create an inter-related gene network. Gene interactions linked to the immune and inflammatory responses are represented. Interacting nodes are defined by either direct relationships (solid arrows) or indirect relationships (dashed arrows). The direction of the arrows shows the direction of the interaction. Green molecules indicate higher expression in treated NOD mice than in control mice at the gene level. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.4. Role of MK626 treatment in altering the expression of β -cell autoantigens and *Aire* in the thymi of NOD mice

To determine the potential mechanisms by which the CD26/DPPIV inhibition is involved in T1D prevention, we next investigated whether MK626 treatment alters the expression of genes encoding islet autoantigens, such as *Gad1*, *Gad2*, *Ins1* and *Ins2* as well as the autoimmune regulator *Aire*, in purified TECs obtained at 6 weeks using qRT-PCR.

3.4.1. MK626 treatment does not alter β -cell autoantigens and *Aire* expression in TECs

As shown in Fig. 5, no differences were observed in the gene expression of *Gad1* (glutamic acid decarboxylase), *Ins2* (proinsulin) and *Aire* (transcription factor autoimmune regulator) in TECs between MK626-treated and control mice. *Gad2* and *Ins1* showed a very low expression in either treated and control animal. These findings are consistent with data reported in the literature. *INS2* is the major isoform recognized by T cells in NOD mouse and is expressed in both β cells and the thymus, while the expression of *Ins1* in the thymi has been debated (Thébault-Baumont et al., 2003).

The thymus is involved in the establishment of tolerance to peripheral Ags. The expression of a broad repertoire of TRAs

within the thymus has been termed promiscuous gene expression (Sospedra et al., 1998). Data suggests that this expression of TRAs by TECs, mainly mTECs, play a role in thymic central tolerance through clonal deletion of self-reactive thymocytes (Derbinski et al., 2001; Kyewski et al., 2002). In T1D, insulin represents one of the principal targets in the development of diabetogenic autoimmunity and their presentation in the thymus promotes the deletion of self-reactive thymocytes (Kent et al., 2005; Nakayama et al., 2005). *Aire* is responsible for mediating central tolerance of peripheral self-Ags because it induces the expression of many of these TRAs by TECs, which are processed and then presented on surface to MHC/HLA (Danso-Abeam et al., 2013; Mathis and Benoist, 2009; Metzger and Anderson, 2011; Rizzi et al., 2006). It has been reported that the expression of *Aire* and TRAs by TECs in NOD model is much lower than normal (Balb/c) TECs (Chen et al., 2008) and its expression varies with age and with the onset of T1D (Fornari et al., 2010; Oliveira et al., 2013). So, recent data suggest that thymic down-regulation of *Aire* in young NOD mice (pre-diabetic checkpoint) precedes the onset of T1D (Fornari et al., 2010), whereas *Aire* expression during the perinatal period is important to prevent autoimmunity in this model (Guerau-de-Arellano et al., 2009).

Taken together, we found that gene expression of islet

autoantigens and the autoimmune regulator *Aire* is not influenced by CD26/DPP4V inhibitor treatment, unless in the late preclinical stage of the disease in NOD mice. Although further studies with more amount of thymic tissue analyzed are required to confirm our findings, it may be also needed to investigate whether MK626 affects the expression of these genes in a much earlier phase of the pre-diabetic state, including the perinatal period.

4. Conclusion

In a previous study, our group found that the CD26/DPP4V inhibitor MK626 decreased the incidence of T1D and reduced islet lymphocyte infiltration in pre-diabetic NOD mice. Moreover, in peripheral compartment, MK626 increases CD26 expression in the CD8⁺ T_{EM} T cells. Indeed, *in vitro* assays revealed an immunosuppressive role for CD8⁺ T_{EM} cell subset that may be involved in the protection against autoimmunity to β -cells. In the current study, we demonstrate for the first time that the expression of immune-related genes, especially those potentially involved in central tolerance, is modified in the thymus of MK626-treated mice. Our data from microarray analysis suggest that targeting CD26/DPP4V may affect immunological central tolerance mechanisms through several possible pathways, including the following: 1) contributing to the migration of thymocytes to the thymic medulla, thus enhancing negative selection; 2) increasing the efficiency of clearance of apoptotic cell generated during positive and negative thymic selection; 3) limiting T cell activation and responses; 4) inducing tolerogenic DCs; and 5) enhancing natural Tregs generation and function. Altogether, the inhibition of CD26/DPP4V may enhance the efficiency of deleting self-reactive thymocytes and modulate T cell responses and, consequently, may reduce the diabetogenic autoimmune response. However, the effects of DPP4V inhibition regarding T1D prevention do not seem to involve modifications of *Aire* and β -cell autoantigens expression.

Our results provide more insight into the understanding of the mechanisms through which targeting CD26/DPP4V prevents and even reverses T1D in NOD mice. However, further functional studies are needed to confirm the present findings.

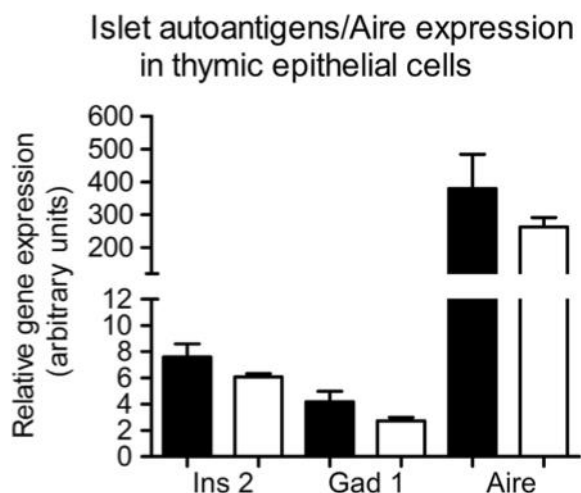


Fig. 5. Gene expression levels of islet autoantigens and *Aire* in thymic epithelial cells (TECs) from MK626-treated and control mice. TECs obtained from treated and control group (\approx 12 weeks old) were purified after 6 weeks of treatment. Quantitative qRT-PCR results for *Gad1*, *Ins2* and *Aire* genes in treated (black bars) and in control mice (white bars). Gene expression signals were normalized to *Gapdh*. Data are presented as the mean \pm SEM. Non parametric Mann–Whitney test was used for the evaluation of statistical significance.

Acknowledgments

The authors thank MSD and in particular Silvia Fernández, for providing the MK626 DPP4V inhibitor.

This work was supported by a European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD) grant 2010 and by Instituto de Salud Carlos III grant (PI 1102621) as well as a Spanish Society of Endocrinology 2010 grant.

References

- Acres, B., Apostolopoulos, C., Balloul, J.M., Wreschner, D., Xing, P.X., Ali-Hadji, D., et al., 2000. MUC1-specific immune responses in human MUC1 transgenic mice immunized with various human MUC1 vaccines. *Cancer Immunol. Immunother.* 48, 588–594.
- Agrawal, B., Longenecker, B.M., 2005. MUC1 mucin-mediated regulation of human T cells. *Int. Immunol.* 17, 391–399.
- Alonso, N., Julián, M.T., Carrascal, J., Colobran, R., Pujol-Autonell, I., Rodríguez-Fernández, S., et al., 2015. Type 1 diabetes prevention in NOD mice by targeting DPP4V/CD26 is associated with changes in CD8⁺ effector memory subset. *PLoS One* 10, e0142186.
- Annunziato, F., Romagnani, P., Cosmi, L., Lazzeri, E., Romagnani, S., 2001. Chemokines and lymphopoiesis in human thymus. *Trends Immunol.* 22, 277–281.
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.D., 2001. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358, 221–229.
- Bartlett, J.A., Gakhar, L., Penterman, J., Singh, P.K., Mallampalli, R.K., Porter, E., et al., 2011. PLUNC: a multifunctional surfactant of the airways. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1012–1016.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57, 289–300.
- Biton, A., Ansong, S., Bank, U., Täger, M., Reinhold, D., Brocke, S., 2011. Divergent actions by inhibitors of DP IV and APN family enzymes on CD4⁺ T cell motility and functions. *Immunobiology* 216, 1295–1301.
- Boonacker, E., Van Noorden, C.J., 2003. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPP4V. *Eur. J. Cell Biol.* 82, 53–73.
- Boonacker, E., Wierenga, E., Smits, H., Van Noorden, C.J., 2002. CD26/DPP4V signal transduction function, but not proteolytic activity, is directly related to its expression level on human Th1 and Th2 cell lines as detected with living cell cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 1169–1177.
- Chang, C., Ciubotariu, R., Manavalan, J., Yuan, J., Colovai, A., Piazza, F., et al., 2002. Tolerization of dendritic cells by T_s cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol.* 3, 237–243.
- Chen, J., Yang, W., Yu, C., Li, Y., et al., 2008. Autoimmune regulator initiates the expression of promiscuous genes in thymic epithelial cells. *Immunol. Investig.* 37, 203–214.
- Cloosen, S., Arnold, J., Thio, M., Bos, G., Kyewski, B., Germeraad, W.T., 2007. Expression of tumor-associated differentiation antigens, MUC1 glycoforms and CEA, in human thymic epithelial cells: implications for self-tolerance and tumor therapy. *Cancer Res.* 67, 3919–3926.
- Coelho, A., Schaller, M., Benjamin, C., Orlofsky, A., Hofaboam, C., Kunkel, S.L., 2007. The chemokine CCL6 promotes innate immunity via immune cell activation and recruitment. *J. Immunol.* 179, 5474–5482.
- Cotta-de-Almeida, V., Villa-Verde, D.M., Lepault, F., Pléau, J.M., Dardenne, M., Savino, W., 2004. Impaired migration of NOD mouse thymocytes: a fibronectin receptor-related defect. *Eur. J. Immunol.* 34, 1578–1587.
- Danso-Abeam, D., Staats, K.A., Franckaert, D., Van Den Bosch, L., Liston, A., Gray, D.H., et al., 2013. Aire mediates thymic expression and tolerance of pancreatic antigens via an unconventional transcriptional mechanism. *Eur. J. Immunol.* 43, 75–84.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., Klein, L., 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* 2, 1032–1039.
- Desai, D., Harbers, S., Flores, M., Colonna, L., Downie, M., Bergtold, A., et al., 2007. Fc γ receptor 1b on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses. *J. Immunol.* 178, 6217–6226.
- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T., Oswald-Richter, K., et al., 2006. Yeast Zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J. Clin. Investig.* 116, 916–928.
- Ding, L., Gysemans, C.A., Stangé, G., Heremans, Y., Yuchi, Y., Takishi, T., et al., 2014. Combining MK626, a novel DPP-4 inhibitor, and low-dose monoclonal CD3 antibody for stable remission of new-onset diabetes in mice. *PLoS One* 9, e107935.
- Esashi, E., Sekiguchi, T., Ito, H., Koyasu, S., Miyajima, A., 2003. Cutting Edge: a possible role for CD4⁺ thymic macrophages as professional scavengers of apoptotic thymocytes. *J. Immunol.* 171, 2773–2777.
- Fornari, T.A., Donate, P.B., Macedo, C., Marques, M.M., Magalhães, D.A., Passos, G.A., 2010. Age-related deregulation of Aire and peripheral tissue antigen genes in the thymic stroma of non-obese diabetic (NOD) mice is associated with autoimmune type 1 diabetes mellitus (DM-1). *Mol. Cell. Biochem.* 342, 21–28.
- Förster, R., Davalos-Misslitz, A.C., Rot, A., 2008. CCR7 and its ligands: balancing

- immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 362–371.
- Forssmann, U., Stoetzer, C., Stephan, M., Kruschinski, C., Skripuletz, T., Shade, J., et al., 2008. Inhibition of CD26/dipeptidyl peptidase IV enhances CCL11/eotaxin-mediated recruitment of eosinophils in vivo. *J. Immunol.* 181, 1120–1127.
- Geenen, V., 2012. Thymus and type 1 diabetes: an update. *Diabetes. Res. Clin. Pract.* 98, 26–32.
- Gillard, G.O., Farr, A.G., 2006. Features of medullary thymic epithelium implicate postnatal development in maintaining epithelial heterogeneity and tissue-restricted antigen expression. *J. Immunol.* 176, 5815–5824.
- Gossens, K., Naus, S., Holländer, G., Ziltener, H., 2010. Deficiency of the Metalloproteinase-Disintegrin ADAM8 is associated with thymic hypercellularity. *PLoS One* 5, e12766.
- Guerau-de-Arellano, M., Martinic, M., Benoist, C., Mathis, D., 2009. Neonatal tolerance revisited: a perinatal window for Aire control of autoimmunity. *J. Exp. Med.* 201, 1245–1252.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., et al., 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249–264.
- Jelsing, J., Vrang, N., van Witteloostuijn, S.B., Mark, M., Klein, T., 2012. The DPP4 inhibitor linagliptin delays the onset of diabetes and preserves β -cell mass in non-obese diabetic mice. *J. Endocrinol.* 214, 381–387.
- Karumuthil-Melethil, S., Pérez, N., Li, R., Vasu, C., 2008. Induction of innate immune response through TLR2 and dectin-1 prevents type 1 diabetes. *J. Immunol.* 181, 8323–8334.
- Kent, S.C., Chen, Y., Bregoli, L., Clemmings, S.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., et al., 2005. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature* 435, 224–228.
- Kim, S.J., Nian, C., Doudet, D.J., McIntosh, C.H., 2009. Dipeptidyl peptidase IV inhibition with K0431 improves islet graft survival in diabetic NOD mice partially via T-cell modulation. *Diabetes* 58, 641–651.
- Kim, D., Wang, L., Beconi, M., Eiermann, G.J., Fisher, M.H., He, H., et al., 2005. (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl) butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J. Med. Chem.* 48, 141–151.
- Kim, D.H., Lee, J.C., Lee, M.K., Kim, K.W., Lee, M.S., 2012. Treatment of autoimmune diabetes in NOD mice by Toll-like receptor 2 tolerance in conjunction with dipeptidyl peptidase 4 inhibition. *Diabetologia* 55, 3308–3317.
- Kim, H.J., Alonzo, E.S., Dorothee, G., Pollard, J.W., Sant'Angelo, D.B., 2010. Selective depletion of eosinophils or neutrophils in mice impacts the efficiency of apoptotic cell clearance in the thymus. *PLoS One* 5, e11439.
- Kim-Chulze, S., Scotto, L., Vlad, G., Piazza, F., Lin, H., Liu, Z., et al., 2006. Recombinant IgG-like transcript 3-Fc modulates T cell responses via induction of the Th1 and differentiation of CD8⁺ suppressor cells. *J. Immunol.* 176, 2790–2798.
- Kishimoto, H., Sprent, J., 2001. A defect in central tolerance in NOD mice. *Nat. Immunol.* 2, 1025–1031.
- Klemann, C., Schade, J., Pabst, R., Leitner, S., Stiller, J., von Hörsten, S., et al., 2009. CD26/dipeptidyl peptidase 4-deficiency alters thymic emigration patterns and leukocyte subsets in F344-rats age-dependently. *Clin. Exp. Immunol.* 155, 357–365.
- Konowalchuk, J., Agrawal, B., 2001. MUC1 mucin is expressed on human T regulatory cells: function in both co-stimulation and co-inhibition. *Cell. Immunol.* 222, 193–199.
- Kyewski, B., Derbinski, J., Gotter, J., Klein, L., 2002. Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. *Trends Immunol.* 23, 364–371.
- LeClair, E., Nguyen, L., Bingle, L., MacGowan, A., Singleton, V., Ward, S.J., et al., 2001. Genomic organization of the mouse *plunc* gene and expression in the developing airways and thymus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 792–797.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25, 402–408.
- Manavalan, J.S., Rossi, P.C., Vlad, G., Piazza, F., Yafilina, A., Cortisini, R., et al., 2003. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl. Immunol.* 11, 245–258.
- Mathis, D., Benoist, C., 2009. Aire. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 287–312.
- Maurer, M., von Stebut, E., 2004. Molecules in focus. Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36, 1882–1886.
- Metzger, T.C., Anderson, M.S., 2011. Control of central and peripheral tolerance by Aire. *Immunol. Rev.* 241, 89–103.
- Misslitz, A., Rieckenberg, H., Willenzon, S., Worbs, T., Kremmer, E., Bernhardt, G., et al., 2007. Generalized multi-organ autoimmunity in CCR7-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 37, 613–622.
- Mockensturm-Gardner, M., Gendler, S.J., 1996. The role of MUC1 at the membrane may involve transduction of a signal. *Mol. Biol. Cell.* 7, 434a.
- Morimoto, C., Schlossman, S.F., 1998. The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. *Immunol. Rev.* 161, 55–70.
- Nakayama, M., Abiru, N., Moriyama, H., Babaya, N., Liu, E., Mao, D., et al., 2005. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 435, 220–223.
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2007. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv. Immunol.* 2007 (96), 179–204.
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2006. Fc γ receptors: old friends and New family members. *Immunity* 24, 19–28.
- Nitta, T., Nitta, S., Lipp, M., Takahama, Y., 2009. CCR7-mediated migration of developing thymocytes to the medulla is essential for negative selection to tissue-restricted antigens. *PNAS* 106, 17129–17133, 2009.
- Ohnuma, K., Dang, N.H., Morimoto, C., 2008. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol.* 29, 295–301.
- Oliveira, E.H., Macedo, C., Donate, P.B., Almeida, R.S., Pezzi, N., Nguyen, C., et al., 2013. Expression profile of peripheral tissue antigen genes in medullary thymic epithelial cells (mTECs) is dependent on mRNA levels of autoimmune regulator (Aire). *Immunobiology* 218, 96–104.
- Park, W.D., Stegall, M.D., 2007. A meta-analysis of kidney microarray datasets: investigation of cytokine gene detection and correlation with rt-PCR and detection thresholds. *BMC. Genom.* 8, 88.
- Rizzi, M., Ferrera, F., Filaci, G., Indiveri, F., 2006. Disruption of immunological tolerance: role of Aire gene in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 5, 145–147.
- Rosenberg, H.F., Domachowski, J.B., 2001. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J. Leukoc. Biol.* 70, 691–698.
- Rothenberg, M.E., Luster, A.D., Leder, P., 1995. Murine eotaxin: an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8960–8964.
- Ruiz, P., Nassiri, M., Steele, B., Viciano, A.L., 1996. Cytofluorographic evidence that thymocyte dipeptidyl peptidase IV (CD26) activity is altered with stage of ontogeny and apoptotic status. *Cytometry* 23, 322–329.
- Saraiva, M., O'Garra, A., 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 170–181.
- Sarang, Z., Garabuczi, E., Joós, G., Kiss, B., Tóth, K., Rühl, R., et al., 2013. Macrophages engulfing apoptotic thymocytes produce retinoids to promote selection, differentiation, removal and replacement of double positive thymocytes. *Immunobiology* 218, 1354–1360.
- Seach, N., Wong, K., Hammett, M., Boyd, R.L., Chidgey, A.P., 2012. Purified enzymes improve isolation and characterization of the adult thymic epithelium. *J. Immunol. Methods* 385, 23.
- Shamri, R., Melo, R., Young, K., Bicas-Benita, M., Xenalis, J., Spencer, L.A., et al., 2012. CCL11 elicits secretion of RNases from mouse eosinophils and their cell-free granules. *FASEB. J.* 26, 2084–2093.
- Smyth, G.K., 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3, Article3.
- Sospedra, M., Ferrer-Francesch, X., Domínguez, O., Juan, M., Foz-Sala, M., Pujol-Borrell, R., 1998. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J. Immunol.* 161, 5918–5929.
- Staeva, T., Chatenoud, L., Insel, R., Atkinson, M., 2013. Recent lessons learned from prevention and recent-onset type 1 diabetes immunotherapy trials. *Diabetes* 62, 9–17.
- Steinbrecher, A., Reinhold, D., Quigley, L., Gado, A., Tresser, N., Izikson, L., et al., 2011. Targeting dipeptidyl peptidase IV (CD26) suppresses autoimmune encephalomyelitis and up-regulates TGF- β 1 secretion in vivo. *J. Immunol.* 186, 2041–2048.
- Struyf, S., Proost, P., Schols, D., De Clercq, E., Opdenakker, G., Lenaerts, J.P., et al., 1999. CD26/dipeptidyl-peptidase IV down-regulates the eosinophil chemotactic potency, but not the anti-HIV activity of human eotaxin by affecting its interaction with CC chemokine receptor 3. *J. Immunol.* 162, 4903–4909.
- Tai, N., Yasuda, H., Xiang, Y., Zhang, L., Rodriguez-Pinto, D., Yokono, K., et al., 2011. IL-10-conditioned dendritic cells prevent autoimmune diabetes in NOD and humanized HLA-DQ8/RIP-B7.1 mice. *Clin. Immunol.* 139, 336–349.
- Throsby, M., Herbelin, A., Pléau, J.M., Dardenne, M., 2000. CD11c⁺ eosinophils in the murine thymus: developmental regulation and recruitment upon MHC class I-restricted thymocyte deletion. *J. Immunol.* 165, 1965–1975.
- Thébault-Baumont, K., Dubois-Laforgue, D., Krief, P., Briand, J.P., Halbout, P., Vallon-Geoffroy, K., 2003. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient mice. *J. Clin. Investig.* 111, 851–857.
- Tian, L., Gao, J., Hao, J., Zhang, Y., Yi, H., O'Brien, T.D., et al., 2010. Reversal of new-onset diabetes through modulating inflammation and stimulating beta-cell replication in non obese diabetic mice by a dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Endocrinology* 151, 3049–3060.
- Tykocinski, L.O., Sinemus, A., Rezavandy, E., Weiland, Y., Baddeley, D., Cremer, C., et al., 2010. Epigenetic regulation of promiscuous gene expression in thymic medullary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 19426–19431.
- Ueno, T., Saito, F., Gray, D., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., et al., 2004. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J. Exp. Med.* 200, 493–505.

6. RESUMEM GLOBAL DE LOS RESULTADOS

6.1. ARTÍCULO NÚMERO 1

Los resultados principales de este artículo son:

- El tratamiento con el iDPPIV MK626 redujo la incidencia de diabetes en el ratón NOD. Al final del período de seguimiento (30 semanas), la incidencia de DM1 en el grupo de tratamiento fue del 37% frente a un 68% en el grupo control no tratado. Por tanto, la inhibición de la molécula CD26/DPPIV obtuvo una disminución de la incidencia de DM1 del 31% en nuestra colonia de ratones NOD.
- El grado de infiltrado linfocitario pancreático, evaluado a través de la insulitis score, fue significativamente menor en el grupo tratado a las 6 semanas de tratamiento. No se encontraron diferencias en el grado de insulitis a las semanas 2 y 4 de tratamiento entre ambos grupos de ratones.
- No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de ratones NOD en el porcentaje de las diferentes subpoblaciones evaluadas tanto periféricas como centrales a la semana 4 y 6 de tratamiento.
- El tratamiento con el iDPPIV MK626 se asoció a un aumento de la expresión de CD26 en la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ memoria efectora (CD8⁺_{EM}) del bazo a semana 4 y 6 de tratamiento y ganglio pancreático en semana 4. Estudios de proliferación *in vitro*, mostraron que los linfocitos T CD8⁺_{EM} de los ratones tratados tenían una mayor capacidad proliferativa y de producción de citoquinas tras ser estimuladas con anti-CD3. Asimismo, los linfocitos T CD8⁺_{EM} por ellos mismos y en presencia del MK626, inducían una respuesta inmunosupresora sobre la activación de la célula T en el ensayo de supresión *in vitro*.
- A nivel del infiltrado linfocitario del islote pancreático, no se encontraron diferencias en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ entre ratones tratados y controles, pero sí se observó un aumento de la expresión de CD26 en los linfocitos T CD8⁺ al inhibir la molécula CD26/DPPIV.

- El tratamiento con MK626 aumentó la expresión de genes de regeneración de la célula β pancreática por qRT-PCR, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

6.2. ARTÍCULO NÚMERO 2

Los resultados principales de este artículo son:

- El tratamiento con el iDPPIV MK626 se asoció a cambios en la expresión génica global en el timo. Mediante tecnología de microarrays, 58 genes presentaban una mayor expresión en el timo en los ratones tratados a la semana 6 de tratamiento comparado con los ratones no tratados. La mayoría de estos genes están relacionados con el sistema inmunitario, participando en la inmunidad innata, quimiotaxis, presentación antigénica e inmunoregulación. Asimismo, varios de estos genes sobre-expresados participan en los mecanismos de tolerancia inmunológica central.
- Se observó una tendencia biológica a una mayor expresión tanto de autoantígenos pancreáticos como del gen *Aire* en las células epiteliales tímicas de ratones tratados con el inhibidor MK626 respecto al control, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa.

7. DISCUSIÓN

En la última década, numerosas estrategias de base inmunológica se han aplicado como terapias experimentales en modelos animales de DM1, con el objetivo de restablecer la tolerancia, detener el ataque autoinmune y frenar la destrucción de las células β pancreáticas productoras de insulina. Sin embargo, estas estrategias inmunomoduladoras no han obtenido resultados positivos ni en la prevención ni en el tratamiento de la DM1 en ensayos clínicos realizados en humanos, acompañándose en muchos casos de importantes efectos secundarios.

La molécula CD26, también conocida como DPPIV, representa un marcador de activación de la célula T, y participa en la co-estimulación de la célula T, así como en los procesos de migración y producción de citoquinas (90). El potencial papel de la molécula CD26/DPPIV en la modulación de la respuesta inmune y su efecto ante un iDPPIV, se ha puesto de manifiesto en estudios en los que se han utilizado modelos animales con enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano (100-104). En relación a la DM1, los datos obtenidos en estudios experimentales, han demostrado que el tratamiento con iDPPIV ejerce efectos inmunomoduladores, y puede prevenir e incluso revertir la diabetes autoinmune de reciente diagnóstico en el ratón NOD (65, 105-114). Por esta razón, uno de los objetivos iniciales del presente trabajo de tesis fue analizar el efecto del tratamiento con el iDPPIV MK626 sobre el desarrollo de diabetes en un grupo de ratones NOD pre-diabéticos seguidos durante 30 semanas, y se comparó con un grupo control NOD no tratado. El tratamiento con el iDPPIV disminuyó la incidencia de diabetes en el ratón NOD en un 31%, resultados que concuerdan con datos publicados en la literatura (106-108). Este efecto en la prevención de la diabetes, se acompañó de una reducción del infiltrado linfocitario alrededor de los islotes pancreáticos, tal y como se ha descrito en estudios anteriores (65, 105-109). El grado de insulitis fue significativamente menor en el NOD tratado a las 6 semanas respecto al grupo control. De tal manera que, a las 6 semanas de tratamiento, un elevado porcentaje de los islotes permanecía intacto o con perinsulitis, mientras que en el grupo control no tratado, un elevado porcentaje de los islotes presentaba una insulitis score ≥ 2 . No se encontraron diferencias en el infiltrado linfocitario a semana 2 ni 4 de tratamiento entre los dos grupos. Es posible que se precise de un mayor tiempo de exposición al iDPPIV MK626 para observar cambios en el infiltrado linfocitario, así como optimizar las condiciones del ensayo. Y, tal vez la administración del fármaco en una fase precoz de la pre-diabetes, incluso ya en el periodo perinatal, hubiera dado lugar a cambios en la insulitis en los diferentes momentos del tratamiento evaluados.

Nuestros resultados confirman el efecto anti-diabetogénico de los iDPPIV y su papel en la prevención de la diabetes debido a la mejoría de los parámetros de inflamación autoinmune de las células β pancreática. No obstante, los mecanismos exactos por los cuáles la modulación inhibitoria de CD26/DPPIV reduce la respuesta autoinmunitaria contra la célula β se desconocen. Se sabe que existen unos mecanismos de tolerancia inmunológica central y periférica que tienen la función de asegurar la autotolerancia a antígenos propios. Los datos publicados en la literatura se han centrado fundamentalmente en evaluar los efectos de los iDPPIV sobre los mecanismos de tolerancia inmunológica periférica. Es por ello, que los trabajos realizados en esta tesis, se han centrado en analizar tanto los mecanismos de tolerancia inmunológica periférica como central que podrían estar implicados en el efecto preventivo que la inhibición de CD26/DPPIV ejerce sobre el desarrollo de diabetes autoinmune en el ratón NOD en una fase pre-clínica de la enfermedad.

A continuación, se discuten los resultados más relevantes.

1. Efecto del tratamiento con el iDPPIV MK626 sobre los mecanismos de tolerancia inmunológica periférica

Existen escasos datos sobre el efecto que la inhibición de CD26/DPPIV ejerce sobre las subpoblaciones linfocitarias en el ratón NOD, y en general, los resultados son heterogéneos entre los diferentes estudios (65, 105, 107-109). Los resultados de nuestro estudio en relación a las subpoblaciones linfocitarias periféricas evaluadas (bazo, ganglio linfático y tejido pancreático), mostraron que el tratamiento con el iDPPIV MK626 no modificó el porcentaje de ninguna de ellas. En la literatura se ha descrito que el tratamiento con iDPPIV induce un aumento en el porcentaje de las células Tregs con fenotipo $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, principalmente a nivel de los ganglios pancreáticos junto con un incremento de los niveles plasmáticos de la citocina TGF- β (65, 105, 109). Nuestros datos discrepan con estos hallazgos previos, ya que no se encontraron diferencias en el porcentaje de las células Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ni en las Tregs con fenotipo $CD8^+CD122^+PD-1^+$, hasta ahora no evaluadas. Y aunque existió una tendencia biológica al aumento de los niveles plasmáticos de TGF- β , la diferencia no fue estadísticamente significativa entre ambos grupos de ratones. Hay que remarcar que en la mayoría de los

estudios previos con iDPPIV, la evaluación se ha realizado en ratones NOD con diabetes de reciente diagnóstico, y no en una fase pre-clínica (65, 105, 109) como es nuestro caso. Asimismo, son varios los estudios que utilizan terapias combinadas por lo que es difícil concluir si el efecto observado sobre las Tregs se debe propiamente al iDPPIV (105, 109). Por tanto, a la vista de nuestros resultados, no podemos concluir *a priori* que la prevención de la diabetes observada al inhibir la molécula CD26/DPPIV con el iDPPIV MK626 se deba a una expansión de las células Tregs ni a cambios en el porcentaje del resto de subpoblaciones linfocitarias periféricas.

Respecto a la caracterización fenotípica de las subpoblaciones linfocitarias, evaluamos si el iDPPIV inducía cambios en la expresión de CD26. El principal hallazgo de este estudio fue el aumento de la expresión de la molécula CD26 en la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ memoria efectora (CD8⁺_{EM}; del inglés *effector memory*) a nivel del bazo y ganglio pancreático en los ratones tratados, así como en la subpoblación de linfocitos T CD8⁺ del infiltrado linfocitario pancreático. Existen pocos datos que hayan evaluado la expresión de CD26 en las subpoblaciones linfocitarias, con resultados no del todo consistentes (130-132). Concretamente se ha observado una disminución de la expresión de CD26 en los linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica en pacientes afectados de DM1 (132) y un descenso en el porcentaje de linfocitos T memoria central y memoria efectora, tanto CD4⁺ como CD8⁺, que expresan CD26 (131). Recientemente, se ha sugerido que una elevada expresión de CD26 en los linfocitos T CD8⁺ representaría un marcador de eficacia a largo plazo de la formación de células T memoria (133).

Tras estos hallazgos se procedió a realizar varios ensayos *in vitro* con el objetivo de caracterizar funcionalmente a esta subpoblación de linfocitos T CD8⁺_{EM} que presentaban una mayor expresión de CD26 al administrar el iDPPIV, y conocer su posible implicación en la prevención de la DM1 observada en el ratón NOD. *In vitro*, los linfocitos T CD8⁺_{EM} de los ratones tratados con MK626 mostraron una mayor capacidad proliferativa y de secreción de citoquinas. Por tanto, los datos obtenidos muestran que el tratamiento con MK626 induce en los linfocitos T CD8⁺_{EM} una mayor expresión de CD26 *in vivo* y una mayor tasa de proliferación *in vitro* de dicha subpoblación. Se sabe que la molécula CD26/DPPIV es un marcador de activación de la célula T (90), y en tumores como el mesotelioma, las células con mayor expresión de CD26 presentan una actividad proliferativa elevada comparado con las células que no expresan CD26. Así pues, podemos hipotetizar, que el aumento observado de la expresión de CD26 en esta subpoblación de linfocitos T CD8⁺_{EM}, les podría conferir un mayor estado de activación, incrementando su capacidad proliferativa y de secreción de citoquinas.

En el ensayo de supresión realizado, los linfocitos T CD8⁺_{EM} de ratones NOD tratados exhibieron por ellos mismos un efecto inmunosupresor sobre la proliferación de las células T estimuladas de manera antígeno-específica. Pese a observar una tendencia biológica relevante, el efecto no alcanzó la significación estadística probablemente por el número limitado de experimentos. Al añadir el iDPPIV MK626 al medio de cultivo, se observó una discreta supresión adicional sobre la célula T. Cabe destacar que la sola presencia del iDPPIV MK626 mostró una capacidad supresora sobre la proliferación de la célula T, tal y como apuntan datos previos (51, 92, 134).

Si analizamos detalladamente el perfil de citoquinas secretadas por los linfocitos T CD8⁺_{EM} de los ratones tratados tras la estimulación *in vitro*, destaca una secreción variable que incluye tanto citoquinas anti-inflamatorias como pro-inflamatorias, lo que podría sugerir la posible diferenciación tras su activación de varias subpoblaciones dentro del *pool* de linfocitos T CD8⁺_{EM} con un efecto supresor-regulador. Por un lado, el aumento observado de la producción de la citoquina IL-10 por parte de los linfocitos T CD8⁺_{EM} de los ratones tratados, podría sugerir la diferenciación de una subpoblación de células con fenotipo CD8⁺CD122⁺. Se ha descrito en modelos murinos que las células T CD8⁺CD122⁺ exhiben un fenotipo memoria pero con funciones reguladoras, y ejercen un efecto supresor de la respuesta de la célula T principalmente a través de la producción de IL-10 (43-46, 135). Datos recientes en modelos animales, sugieren que esta subpoblación de células T pueden ser Tregs o memoria en función de su expresión de PD-1 (*programmed death-1*). PD-1 es una molécula co-estimuladora que actúa como regulador negativo de la respuesta inmunitaria, y es crucial en la supresión de la autoinmunidad y la inducción de tolerancia. Recientes estudios *in vitro* han demostrado que las células T murinas CD8⁺CD122⁺PD-1⁺ son Tregs, y su supresión depende de la IL-10 (43, 44). Por este motivo, se evaluó en nuestro estudio si el tratamiento con iDPPIV inducía cambios en el porcentaje de la subpoblación periférica (bazo y ganglio pancreático) de linfocitos Tregs con fenotipo CD8⁺CD122⁺PD-1⁺, y no se encontraron diferencias entre ambos grupos de ratones. No obstante, estos resultados han de ser interpretados con cautela debido al bajo porcentaje observado de esta subpoblación en el NOD y que únicamente se pudo evaluar esta subpoblación en la semana 4 de tratamiento.

Por otro lado, el aumento de las citoquinas TNF- α e IFN- γ podría sugerir la presencia de una subpoblación de células T CD8⁺ dentro de las CD8⁺_{EM} con capacidad citotóxica directa sobre las APCs y/o los linfocitos T autorreactivos, atenuando el ataque autoinmunitario sobre la célula β (40, 42). Estas células T CD8⁺ podrían corresponder a Tregs con fenotipo CD8⁺CD28⁻ productoras de citoquinas como IL-10, TGF- β , IFN γ o,

más específicamente, a la subpoblación descrita recientemente por el grupo de Santamaria. P *et al* en el ratón NOD como “*low avidity memory-like autoregulatory CD8⁺ T-cells*” con marcadores fenotípicos de memoria similares a los linfocitos T CD8⁺_{EM} (CD44^{hi}, CD62L^{low}, CCR7⁻). Estas células Tregs CD8⁺ *memory-like* se generarían de la diferenciación de clones de células T autoreactivas *low avidity* tras una exposición crónica a autoantígenos. La expansión de estas células Tregs CD8⁺ mediante el uso de terapias inmunológicas con nanopartículas recubiertas de complejos MHC-autoantígenos pancreáticos, ha demostrado prevenir la diabetes en el ratón NOD en fase pre-clínica y producir la remisión en ratones NOD diabéticos de reciente diagnóstico (40, 83). Su efecto antidiabetogénico se basa en suprimir la presentación antigénica a través de su citotoxicidad directa sobre las APCs, mediada por IFN- γ , perforinas, granzyma B e IDO (Indolamina 2,3-dioxigenasa) (40, 83). Recientemente, se ha descrito *in vitro*, que los linfocitos T CD8⁺ (de adultos sanos) con elevada expresión de CD26 pertenecen a una subpoblación de memoria efectora temprana, y que la co-estimulación mediada por CD26 tiene efectos citotóxicos directos preferentemente a través de granzyma B, TNF- α , IFN- γ y Fas ligando (134). Por tanto, CD26 parece ejercer un papel en el desarrollo de las funciones efectoras de los linfocitos T CD8⁺.

Dentro del proyecto de investigación se llevó a cabo un ensayo preliminar de citotoxicidad *in vitro* con el objetivo de evaluar la posible hipótesis de la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺_{EM} contra las CDs cargadas con insulina y, valorar asimismo si dicha capacidad se potenciaba en presencia del iDPPIV MK626 en el cultivo (Anexo 1). Aunque no se pudo confirmar un efecto citotóxico de los linfocitos T CD8⁺_{EM} sobre las CDs *in vitro*, sí parece existir un efecto dosis-respuesta, con un descenso del porcentaje de viabilidad de las CDs a mayor presencia de linfocitos T CD8⁺_{EM} en el cultivo. Sin embargo, observamos una tendencia biológica relevante a una disminución de la viabilidad de las CDs cuando se añadía el iDPPIV MK626 al cultivo, con un efecto dosis-respuesta, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. A destacar de nuevo que la sola presencia del fármaco MK626 ejerce una posible citotoxicidad sobre las APCs sin alcanzar la significación estadística. No obstante, estos resultados han de ser analizados con prudencia, dado que el número de experimentos fue bajo y no se puede descartar la posibilidad de una acción citotóxica directa de los linfocitos T CD8⁺_{EM} tratados con el MK626 sobre las APCs que explique la reducción de la respuesta autoinmunitaria contra la célula β y la prevención de la diabetes observada en el ratón NOD. Así pues, se precisaría de la realización de un mayor número de experimentos, la

optimización de las condiciones del ensayo, así como otros estudios funcionales, que confirmen esta hipótesis.

En conclusión, los ratones NOD tratados con el iDPPIV MK626 presentan un aumento de la expresión de CD26 en la subpoblación de linfocitos T CD8⁺_{EM}. Los estudios *in vitro* efectuados sugieren que esta subpoblación ejerce un papel inmunoregulador/ inmunosupresor que podría explicar, al menos en parte, la protección de la célula β pancreática contra la respuesta autoinmunitaria que se asocia al inhibir la molécula CD26/DPPIV. Dicho efecto se vería potenciado por la presencia del MK626.

7.1. Efectos del tratamiento con el iDPPIV MK626 sobre los mecanismos de tolerancia inmunológica central

Se ha descrito que la molécula CD26/DPPIV está implicada en los procesos de diferenciación, maduración y activación de los linfocitos T en el timo, así como en la migración intratímica (97-99). Estudios en modelos murinos deficientes en la molécula CD26, han descrito efectos en la composición y migración de los timocitos, así como modificaciones en la citoarquitectura del timo (98). Estos hallazgos podrían sugerir una posible participación de la molécula CD26/DPPIV en el establecimiento de la tolerancia central. Hasta la actualidad, no existían datos que evaluaran el impacto que la modulación inhibitoria de CD26/DPPIV mediante el uso de iDPPIV podría tener en el desarrollo y maduración de los timocitos así como en los mecanismos de tolerancia inmunológica central.

En primer lugar se evaluó si el tratamiento con el iDPPIV MK626 inducía cambios en las diferentes subpoblaciones linfocitarias del timo de ratones NOD (artículo número 1). Nuestros resultados no encontraron diferencias ni el porcentaje ni en la expresión de CD26 en las diferentes subpoblaciones evaluadas entre ratones tratados y controles. Asimismo, en concordancia con lo hallado a nivel periférico, no se encontraron cambios en las Tregs naturales CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, a diferencia de lo publicado por Tian *et al.* (86). Ahora bien, en ese estudio, el iDPPIV se administró en ratones NOD diabéticos de reciente diagnóstico y la dosis utilizada del fármaco fue tres veces más a las de nuestro estudio. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el efecto anti-diabetogénico observado, no se debería en principio a cambios en el porcentaje ni en la expresión de CD26 de las distintas subpoblaciones tímicas, incluyendo las Tregs. No obstante, no se

puede descartar un efecto del iDPPIV MK626 en la composición tímica ya que finalmente no se han evaluado cambios en la citoarquitectura del timo.

En un segundo lugar, se investigó por primera vez en la literatura el efecto de la modulación inhibitoria de CD26 sobre la expresión génica del timo mediante tecnología de microarrays (artículo número 2). En nuestros resultados, el tratamiento con el iDPPIV MK626 en el ratón NOD administrado en fase pre-clínica, se asoció a un aumento de la expresión génica global a la semana 6, afectando principalmente a genes relacionados con el sistema inmunitario, inflamación y otros procesos celulares. Dentro del sistema inmunitario, las categorías funcionales más representadas fueron las de la inmunidad innata, quimiotaxis, inmunoregulación y presentación antigénica. En este artículo se ha realizado una descripción detallada de la función que ejercen los genes sobre-expresados más relevantes. Cabe destacar que muchos de ellos están implicados en procesos relacionados con la modulación de la activación o respuesta de la célula T y/o en el mantenimiento de la inmunotolerancia, y por tanto, con un posible papel en la prevención de la diabetes asociada al iDPPIV MK626. Concretamente, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con el iDPPIV aumenta la expresión de genes que participan en el establecimiento de la tolerancia inmunológica central a través de diferentes mecanismos: 1) Contribuir al proceso de selección negativa de los linfocitos T autoreactivos, al facilitar la migración de los timocitos del córtex a la médula (ej; genes *Muc1*, *Ccl21*). La migración intratímica de los timocitos es crucial en la selección de un repertorio de células T tolerogénicas (136, 137); 2) Facilitar al aclaramiento de las células apoptóticas generadas durante la selección positiva y negativa de los timocitos (ej; *Ccl11*, *Ccl3*, *Ccl6* y *Ccl9*). La rápida eliminación de estas células apoptóticas en el timo es crucial en la prevención de la autoinmunidad (138); 3) Limitar la activación y respuesta de la célula T a través de la sobre-expresión de reguladores negativos de la respuesta inmunitaria (ej; *Muc1*, *Fcgr2b*, *Lilrb4*); 4) Contribuir a la tolerización de las DCs, principalmente a través de la sobre-expresión del receptor inhibitorio LILRB4/ILT-3 (*leukocyte immunoglobulin like receptor B4/Immunoglobulin-like transcript-3*), uno de los mecanismos de supresión de los linfocitos Tregs con fenotipo CD8⁺CD28⁻; y finalmente 5) Promover la expansión y función de las Tregs naturales (ej; *Clec7a*, *Muc1*). Asimismo, datos procedentes del análisis de microarrays revelaron que una de las vías biológicas más sobre-expresadas en los ratones tratados fue la que afectaba a la citoquina inmunoreguladora IL-10, producida principalmente por Tregs. Este dato podría sugerir que el tratamiento con el iDPPIV también podría inducir cambios en la subpoblación de Tregs naturales con fenotipo CD8⁺CD122⁺, que tal y como se ha descrito con anterioridad

suprimen la autoinmunidad principalmente a través de la producción de IL-10 (43, 45, 46). No obstante, se precisan de más estudios que evalúen estos hallazgos ya que en el presente trabajo esta subpoblación CD8⁺CD122⁺ no fue analizada en el timo.

Finalmente, se evaluó si el tratamiento con el iDPPIV MK626 afectaba a la expresión génica de *Aire* y de varios autoantígenos del islote pancreático (*Gad1*, *Gad2*, *Ins1* e *Ins2*) en las TECs obtenidas a las 6 semanas de tratamiento. Las TECs tienen capacidad para presentar de manera promiscua un gran repertorio de antígenos periféricos, en principio, restringidos a otros tejidos. El factor de transcripción AIRE induce la expresión de muchos de estos autoantígenos en las mTECs. Existen datos que sugieren que esta expresión de autoantígenos por las TECs, principalmente por las mTECs, es clave en la delección clonal de linfocitos T autorreactivos, y por tanto, en el establecimiento de la tolerancia central (24, 25, 139-142). En nuestros resultados se observó una tendencia a una mayor expresión de autoantígenos pancreáticos y de gen *Aire* en las TECs de los ratones tratados, pero la diferencia no alcanzó una significación estadística. No obstante, se ha de tener en cuenta que la expresión de *Aire* y de autoantígenos varía con la edad y el inicio de la diabetes. Se ha descrito que la expresión de *Aire* es importante para prevenir la autoinmunidad durante la etapa perinatal, sin embargo, la disminución de su expresión precede al inicio de la enfermedad (143, 144). Tal vez por este motivo no hallamos diferencias en nuestro estudio, ya que la evaluación tuvo lugar en una fase tardía de la etapa pre-clínica correspondiente a la semana 12-14 de edad del ratón NOD. Por tanto, se necesitan más estudios que investiguen si la iDPPIV afecta a la expresión génica del gen *Aire* y de autoantígenos en una fase más precoz de la etapa pre-clínica, incluso ya en el periodo perinatal.

Así pues, el tratamiento con el iDPPIV MK626 ejercería un efecto a nivel central induciendo una mayor eficiencia en la eliminación de linfocitos T autorreactivos y modulando la respuesta de la célula T. Este efecto se traduciría a nivel periférico en una reducción de la respuesta autoinmunitaria contra la célula β pancreática contribuyendo a la prevención de la diabetes en el ratón NOD. No obstante, son necesarios más estudios, incluyendo ensayos funcionales, que confirmen los presentes resultados.

7.2. Efecto en la supervivencia y regeneración de la célula beta pancreática x

Aunque el objetivo principal de nuestro estudio no fue valorar el efecto del tratamiento con el iDPPIV MK626 sobre la preservación y regeneración de la masa de β pancreática, se evaluó la existencia de cambios en la expresión de genes que codifican para autoantígenos secretados por la célula β , como la insulina II (*Ins II*) y el polipéptido amiloide de los islotes (*Iapp*) como biomarcadores de regeneración β pancreática. El análisis se llevó a cabo mediante la técnica de qRT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) en tejido pancreático de ratones NOD obtenido a las 4 semanas de tratamiento comparado con un grupo control NOD no tratado. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con el iDPPIV MK626 indujo una clara tendencia biológica a una mayor expresión de los genes que codifican para los autoantígenos *Ins II* e *Iapp*, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa al comparar con el grupo control. Así pues, el hallazgo de la tendencia a una mayor expresión de autoantígenos en el tejido pancreático del ratón tratado, sugiere la presencia de una mayor masa o un incremento relativo de la masa de célula β pancreática. Este hecho podría deberse simplemente a que el tratamiento con el iDPPIV reduce el infiltrado leucocitario con un efecto citoprotector o a la existencia de un fenómeno de regeneración o a ambos procesos. No obstante, el hecho de que a la semana 4 de tratamiento no se encontraran diferencias en el grado de infiltración linfocitaria entre los ratones NOD tratados y los controles, y que tampoco existieran diferencias en la expresión de CD45 (antígeno común leucocitario) ni de glucagón por qRT-PCR en el islote pancreático, podría sugerir un papel directo de los iDPPIV sobre la regeneración de la masa de célula β . Una de las limitaciones de nuestros resultados fue que no se pudo evaluar estos biomarcadores de regeneración β pancreática a la semana 6 de tratamiento donde sí existen diferencias en el grado de insulitis, al no disponer de tejido pancreático viable para ser analizado.

Los iDPPIV ya han demostrado preservar y promover la regeneración de la célula β pancreática en diferentes modelos animales de diabetes, incluyendo el NOD, principalmente cuando se administran de manera prolongada (> 7 semanas de tratamiento en general) (106, 110, 111, 113, 114, 145, 146). Es por ello, que el hecho de no encontrar una significación estadística en nuestro estudio podría deberse a la evaluación temprana (semana 4) de estos biomarcadores durante el período de tratamiento, o al hecho de no estar empleando técnicas cuantitativas de proliferación celular. Además, otros autores apuntan a la necesidad de uso de dosis más elevadas de

iDPPIV a la utilizada en nuestro estudio para demostrar regeneración de la célula β (105). Todo ello sería objeto de estudios posteriores.

Por otro lado, tal y como se ha comentado con anterioridad en el apartado de introducción, aún no existe suficiente evidencia que determine si estos efectos de citoprotección y aumento de la masa de célula β observados con los iDPPIV en diferentes estudios, están mediados por el aumento endógeno del péptido incretínico GLP-1 u otros de su familia, y/o por mecanismos independientes no incretínicos, y atribuidos directamente a la modulación inhibitoria de CD26 (106). En nuestro estudio, y a diferencia de otros estudios previos (65, 106, 108, 109, 121, 122), el tratamiento con MK626, no se acompañó de una elevación significativa de los niveles circulantes de GLP-1. Estos resultados pueden sugerir un efecto directo de los iDPPIV sobre la célula β pancreática. No obstante, no podemos descartar la existencia de un efecto protector sobre la masa de célula β mediado por una elevación endógena de GLP-1, tal y como apuntan estudios previos (111, 115-118), ya que una de las limitaciones de nuestro trabajo fue que la determinación de los niveles de GLP-1 no se realizó en el período postprandial al administrarse el fármaco MK626 a través de la dieta, y siendo ésta de libre consumo por el NOD, ello no pudo substanciarse. Por otro lado, existen suficientes evidencias en modelos animales de diabetes autoinmune, incluyendo el nuestro, que demuestran que los iDPPIV tienen un efecto citoprotector al prevenir la destrucción autoinmunitaria y reducir el infiltrado linfocitario alrededor de los islotes pancreáticos. Por tanto, preservan la masa de célula β pancreática a través de la modulación de la función inmunitaria de la célula T, aunque el mecanismo exacto se desconoce (81, 120, 121, 123, 124).

Así pues, a pesar de las limitaciones de nuestros resultados y en concordancia con datos previos, nuestros resultados parecen apuntar hacia un posible efecto en la supervivencia y regeneración de la célula β pancreática del tratamiento con el iDPPIV MK626. No obstante, se precisa de técnicas cuantitativas de proliferación celular para confirmar estos hallazgos.

En base a todos nuestros resultados podemos concluir que el tratamiento con el iDPPIV MK626 ejerce efectos beneficiosos sobre mecanismos inmunológicos de tolerancia tanto a nivel central como periférico que podrían explicar la reducción del ataque autoinmunitario contra la célula β pancreática y la disminución en la incidencia de diabetes autoinmune en el ratón NOD. Estos datos hacen pensar que la modulación inhibitoria de CD26/DPPIV puede ser una diana terapéutica interesante, y la administración de un iDPPIV podría resultar de utilidad en pacientes con DM1 de reciente

diagnóstico con reserva pancreática residual o, principalmente, en aquellos afectados de diabetes tipo LADA, en donde la destrucción autoinmunitaria es progresiva y se mantiene un porcentaje de células β funcionantes en los estadios iniciales. En este grupo de pacientes, el tratamiento con un iDPPIV podría contribuir a preservar la masa residual de células β pancreáticas y mantener una secreción de insulina endógena. Y, aunque se requieren de más datos en modelos experimentales antes de valorar su potencial en la clínica, la translación al campo de la DM1 en humanos se produciría de forma más facilitada, ya que la familia de los iDPPIV ya están a disposición del clínico para el tratamiento de la DM2 con una amplia experiencia de uso en pacientes y un perfil de seguridad conocido. De hecho, el efecto del tratamiento con iDPPIV ya ha sido evaluado en ensayos clínicos con pequeñas cohortes o casos aislados en individuos afectos de DM tipo 1, observando una mejoría del control glucémico reduciendo las necesidades de insulina (119, 120), así como en diabetes tipo LADA, donde la administración de un iDPPIV parece preservar la función de la célula β , incluso a largo plazo (125-129). Cabe destacar, que a diferencia de otras estrategias terapéuticas aplicadas en diabetes autoinmune, estos resultados se obtuvieron con una baja incidencia de efectos adversos y de hipoglucemias.

8. CONCLUSIONES

1. La administración del iDPPIV MK626 en una fase pre-clínica previene de forma significativa la aparición de diabetes autoinmune en el ratón NOD y disminuye el grado de infiltración linfocitaria (insulinitis) en el páncreas del ratón NOD.
2. El tratamiento con el iDPPIV MK626 no induce modificaciones porcentuales de las diferentes subpoblaciones linfocitarias del compartimento periférico y central.
3. El tratamiento con el iDPPIV MK626 aumenta la expresión de CD26 en la subpoblación de linfocitos T CD8⁺_{EM} procedentes del bazo y del ganglio linfático pancreático, que muestran una mayor capacidad proliferativa y de secreción de citoquinas, y ejercen un efecto supresor sobre la célula T en ensayos *in vitro*. Los datos obtenidos sugieren que esta subpoblación podría estar involucrada en la prevención de la diabetes clínica asociada a la inhibición de la molécula CD26/DPPIV en el ratón NOD.
4. La administración del iDPPIV MK626 aumenta la expresión de genes que participan en la respuesta inmunitaria, entre ellos genes implicados directamente en el establecimiento de la tolerancia inmunológica central. Este efecto observado podría contribuir, al menos en parte, al restablecimiento de la inmunotolerancia a los autoantígenos pancreáticos y a la prevención de la diabetes en el ratón NOD.
5. El tratamiento con el iDPPIV MK626 no modifica la expresión génica de autoantígenos del islote pancreático ni del gen *Aire* en las células epiteliales tímicas, al menos en una fase tardía de la etapa de pre-diabetes.

9. LÍNEAS DE FUTURO

Los resultados obtenidos en los trabajos que forman parte de esta tesis, abren la posibilidad de plantearse la opción de tratamiento con un iDPPIV en diferentes situaciones clínicas. Una de sus posibles aplicaciones clínicas serían los pacientes con una DM1 de reciente diagnóstico en los cuales existe una cierta reserva de células β pancreáticas productoras de insulina. El tratamiento con el iDPPIV podría contribuir a reducir o enlentecer su destrucción autoinmunitaria, y tal vez, a promover o estimular la regeneración de masa de célula β . Asimismo, los iDPPIV podrían ser un tratamiento de utilidad en los pacientes con diabetes tipo LADA, la cual se caracteriza por una destrucción autoinmunitaria lenta y progresiva. En este grupo de pacientes, el tratamiento con un iDPPIV podría contribuir a preservar la masa residual de células β pancreáticas y mantener una secreción de insulina endógena más persistente en el tiempo. Se sabe que el mantenimiento de esta masa de célula β residual y, en consecuencia la secreción persistente de péptico C, se asocia a una disminución en el desarrollo de complicaciones crónicas de la diabetes como la retinopatía y la nefropatía, y la hipoglucemia. Finalmente la inhibición de la molécula CD26/DPPIV, por su efecto inmunomodulador, podría ser una opción terapéutica para pacientes con otro tipo de enfermedades autoinmunitarias específicas de órgano, como las enfermedades autoinmunitarias tiroideas o la esclerosis múltiple. Todo ello está pendiente de explorar, y no me cabe duda de la dificultad logística para organizar este tipo de estudios que sin ninguna duda, requerirá de proyectos colaborativos.

Asimismo, los resultados obtenidos muestran la posibilidad de estudiar en profundidad la posible aplicabilidad terapéutica de los linfocitos T $CD8^{+}_{EM}$ en el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias dada su capacidad de atenuar la respuesta de la célula T. No obstante, se precisa de una mayor caracterización tanto fenotípica como funcional de esta subpoblación. Por un lado, se han de incluir marcadores fenotípicos característicos de linfocitos T $CD8^{+}$ con funciones reguladoras como CD28, CD122 o PD-1 y, por otro lado, realizar estudios funcionales *in vitro* que contribuyan a conocer el mecanismo exacto por el cual los linfocitos T $CD8^{+}_{EM}$ ejercen su efecto en suprimir la respuesta autoinmunitaria en el ratón NOD.

A pesar de que el conocimiento científico en relación a la DM1 se ha incrementado notablemente en los últimos 25 años, es indudable que aún existen grandes lagunas de información, sobre todo, en lo referente a aspectos terapéuticos que están pendientes de profundizar y desentrañar. Pero cualquier cosa en DM1 es todo menos sencillo; de hecho cuanto más sabemos de la enfermedad y de su génesis, más complicado y sorprendente se va tornando el escenario operativo biológico en el que se desarrolla la misma, de forma perversa, silente y con escasa

capacidad de maniobra al detectarse mayoritariamente en fases muy avanzadas de pérdida de masa β celular. De hecho, a pesar de este incremento del conocimiento, y en particular en su patogenia, no ha sido posible conseguir una hipótesis unificadora que permita explicarnos de forma sólida cómo se gesta la enfermedad. En realidad, la DM1 es más de una enfermedad, y es muy posible que los mecanismos autoinmunes, al igual que los fenómenos medio-ambientales disparadores, sean heterogéneos y muchos pacientes llegan a autodestruir su contingente de células β , siguiendo diferentes caminos patogénicos. Ello dificulta, en su caso, la posibilidad de llevar a cabo programas de prevención primaria. El papel del microbioma, por ejemplo, en esta enfermedad o conjunto de enfermedades que llamamos DM1, está pendiente de aclarar, pero indudablemente tendrá también un papel, y que no será menor.

Los retos y su complejidad científica y metodológica son extraordinarios; a pesar de ello, todas las cuestiones que he abordado en mi trabajo doctoral me parecen muy relevantes y me apasionan; y en la medida de lo posible intentaré poder abordar todos -o algunos- de los retos aún pendientes y que he explicitado en los últimos párrafos en un futuro inmediato, sobre todo, si puedo seguir vinculada a un grupo de investigación como el que me ha acogido en este trabajo.

10. BIBLIOGRAFÍA

Referencias bibliográficas

1. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 2001;358(9277):221-9.
2. Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*. 1965;14(10):619-33.
3. Couper J, Donaghue KC. Phases of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2009;10 Suppl 12:13-6.
4. Leslie RD, Williams R, Pozzilli P. Clinical review: Type 1 diabetes and latent autoimmune diabetes in adults: one end of the rainbow. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(5):1654-9.
5. Naik RG, Brooks-Worrell BM, Palmer JP. Latent autoimmune diabetes in adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(12):4635-44.
6. Pozzilli P, Peralice S. Latent Autoimmune Diabetes in Adults: Current Status and New Horizons. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2018;33(2):147-59.
7. Buzzetti R, Zampetti S, Maddaloni E. Adult-onset autoimmune diabetes: current knowledge and implications for management. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(11):674-86.
8. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 2010;464(7293):1293-300.
9. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*. 1996;85(3):291-7.
10. Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, et al. Genetics of type 1 diabetes: what's next? *Diabetes*. 2010;59(7):1561-71.
11. Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med*. 2009;360(16):1646-54.
12. Sepe V, Loviselli A, Bottazzo GF. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med*. 2009;361(2):211.
13. Redondo MJ, Fain PR, Eisenbarth GS. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:69-89.
14. Melanitou E, Fain P, Eisenbarth GS. Genetics of type 1A (immune mediated) diabetes. *J Autoimmun*. 2003;21(2):93-8.
15. Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, Walker NM, Smyth DJ, Bailey R, et al. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007;39(9):1074-82.
16. Kristiansen OP, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases--a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes Immun*. 2000;1(3):170-84.

17. Erlich H, Valdes AM, Noble J, Carlson JA, Varney M, Concannon P, et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes*. 2008;57(4):1084-92.
18. Rodriguez-Calvo T, Sabouri S, Anquetil F, von Herrath MG. The viral paradigm in type 1 diabetes: Who are the main suspects? *Autoimmun Rev*. 2016;15(10):964-9.
19. Rewers M, Ludvigsson J. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet*. 2016;387(10035):2340-8.
20. Goodnow CC. Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell*. 2007;130(1):25-35.
21. Andre I, Gonzalez A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D. Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(6):2260-3.
22. Geenen V. Thymus and type 1 diabetes: an update. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012;98(1):26-32.
23. Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med*. 2006;354(11):1166-76.
24. Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Dominguez O, Juan M, Foz-Sala M, Pujol-Borrell R. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J Immunol*. 1998;161(11):5918-29.
25. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol*. 2001;2(11):1032-9.
26. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol*. 2010;11(1):21-7.
27. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol*. 2010;11(1):7-13.
28. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
29. Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, et al. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol*. 2007;8(4):359-68.
30. Roncarolo MG, Gregori S. Is FOXP3 a bona fide marker for human regulatory T cells? *Eur J Immunol*. 2008;38(4):925-7.
31. Limon-Camacho L, Solleiro-Villavicencio H, Pupko-Sissa I, Lascurain R, Vargas-Rojas MI. [Regulatory T cells in chronic obstructive pulmonary disease]. *Arch Cardiol Mex*. 2013;83(1):45-54.

32. Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, Schatz R, Viener HL, Schatz D, et al. No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2007;56(3):604-12.
33. Haas J, Hug A, Viehover A, Fritzsching B, Falk CS, Filser A, et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2005;35(11):3343-52.
34. Mikulkova Z, Praksova P, Stourac P, Bednarik J, Strajtova L, Pacasova R, et al. Numerical defects in CD8+CD28- T-suppressor lymphocyte population in patients with type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis. *Cell Immunol*. 2010;262(2):75-9.
35. Brusko TM, Wasserfall CH, Clare-Salzler MJ, Schatz DA, Atkinson MA. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4+ CD25+ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(5):1407-14.
36. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2004;199(7):971-9.
37. Tsai S, Shameli A, Santamaria P. CD8+ T cells in type 1 diabetes. *Adv Immunol*. 2008;100:79-124.
38. Walter U, Santamaria P. CD8+ T cells in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(6):624-31.
39. Filaci G, Fenoglio D, Indiveri F. CD8(+) T regulatory/suppressor cells and their relationships with autoreactivity and autoimmunity. *Autoimmunity*. 2011;44(1):51-7.
40. Tsai S, Clemente-Casares X, Santamaria P. CD8(+) Tregs in autoimmunity: learning "self"-control from experience. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(23):3781-95.
41. Filaci G, Bacilieri S, Fravega M, Monetti M, Contini P, Ghio M, et al. Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2001;166(10):6452-7.
42. Suzuki M, Konya C, Goronzy JJ, Weyand CM. Inhibitory CD8+ T cells in autoimmune disease. *Hum Immunol*. 2008;69(11):781-9.
43. Dai H, Wan N, Zhang S, Moore Y, Wan F, Dai Z. Cutting edge: programmed death-1 defines CD8+CD122+ T cells as regulatory versus memory T cells. *J Immunol*. 2010;185(2):803-7.
44. Li S, Xie Q, Zeng Y, Zou C, Liu X, Wu S, et al. A naturally occurring CD8(+)CD122(+) T-cell subset as a memory-like Treg family. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(4):326-31.

45. Endharti AT, Rifa IM, Shi Z, Fukuoka Y, Nakahara Y, Kawamoto Y, et al. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol.* 2005;175(11):7093-7.
46. Rifa'i M, Shi Z, Zhang SY, Lee YH, Shiku H, Isobe K, et al. CD8+CD122+ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I-alpha/beta-TCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells. *Int Immunol.* 2008;20(7):937-47.
47. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet.* 2018;391(10138):2449-62.
48. Knip M, Siljander H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmun Rev.* 2008;7(7):550-7.
49. Santamaria P. The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes. *Immunity.* 2010;32(4):437-45.
50. Jayasimhan A, Mansour KP, Slattery RM. Advances in our understanding of the pathophysiology of Type 1 diabetes: lessons from the NOD mouse. *Clin Sci (Lond).* 2014;126(1):1-18.
51. Zhao Y, Yang L, Wang X, Zhou Z. The new insights from DPP-4 inhibitors: their potential immune modulatory function in autoimmune diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2014;30(8):646-53.
52. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2005;54(1):92-9.
53. Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszyk A, Grabowska M, Techmanska I, Juscinska J, et al. Administration of CD4+CD25highCD127- regulatory T cells preserves beta-cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care.* 2012;35(9):1817-20.
54. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(4):219-26.
55. Vives-Pi M, Rodriguez-Fernandez S, Pujol-Autonell I. How apoptotic beta-cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review. *Apoptosis.* 2015;20(3):263-72.
56. Noorchashm H, Lieu YK, Noorchashm N, Rostami SY, Greeley SA, Schlachterman A, et al. I-Ag7-mediated antigen presentation by B lymphocytes is critical in overcoming a checkpoint in T cell tolerance to islet beta cells of nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 1999;163(2):743-50.

57. Greeley SA, Moore DJ, Noorchashm H, Noto LE, Rostami SY, Schlachterman A, et al. Impaired activation of islet-reactive CD4 T cells in pancreatic lymph nodes of B cell-deficient nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2001;167(8):4351-7.
58. Bloem SJ, Roep BO. The elusive role of B lymphocytes and islet autoantibodies in (human) type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2017.
59. Atkinson MA, Bluestone JA, Eisenbarth GS, Hebrok M, Herold KC, Accili D, et al. How does type 1 diabetes develop?: the notion of homicide or beta-cell suicide revisited. *Diabetes*. 2011;60(5):1370-9.
60. Saunders D, Powers AC. Replicative capacity of beta-cells and type 1 diabetes. *J Autoimmun*. 2016;71:59-68.
61. Wu J, Yang X, Chen B, Xu X. Pancreas beta cell regeneration and type 1 diabetes (Review). *Exp Ther Med*. 2015;9(3):653-7.
62. Reed JC, Herold KC. Thinking bedside at the bench: the NOD mouse model of T1DM. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(5):308-14.
63. Chaparro RJ, Dilorenzo TP. An update on the use of NOD mice to study autoimmune (Type 1) diabetes. *Expert Rev Clin Immunol*. 2010;6(6):939-55.
64. Pozzilli P, Signore A, Williams AJ, Beales PE. NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures. *Immunol Today*. 1993;14(5):193-6.
65. Tian L, Gao J, Hao J, Zhang Y, Yi H, O'Brien TD, et al. Reversal of new-onset diabetes through modulating inflammation and stimulating beta-cell replication in nonobese diabetic mice by a dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Endocrinology*. 2010;151(7):3049-60.
66. Driver JP, Serreze DV, Chen YG. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin Immunopathol*. 2011;33(1):67-87.
67. Berzins SP, Venanzi ES, Benoist C, Mathis D. T-cell compartments of prediabetic NOD mice. *Diabetes*. 2003;52(2):327-34.
68. Kishimoto H, Sprent J. A defect in central tolerance in NOD mice. *Nat Immunol*. 2001;2(11):1025-31.
69. Zuklys S, Balciunaite G, Agarwal A, Fasler-Kan E, Palmer E, Hollander GA. Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *J Immunol*. 2000;165(4):1976-83.
70. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000;12(4):431-40.

71. Cardell SL. The natural killer T lymphocyte: a player in the complex regulation of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin Exp Immunol.* 2006;143(2):194-202.
72. Jansen A, van Hagen M, Drexhage HA. Defective maturation and function of antigen-presenting cells in type 1 diabetes. *Lancet.* 1995;345(8948):491-2.
73. Boudaly S, Morin J, Berthier R, Marche P, Boitard C. Altered dendritic cells (DC) might be responsible for regulatory T cell imbalance and autoimmunity in nonobese diabetic (NOD) mice. *Eur Cytokine Netw.* 2002;13(1):29-37.
74. O'Brien BA, Geng X, Orteu CH, Huang Y, Ghoreishi M, Zhang Y, et al. A deficiency in the in vivo clearance of apoptotic cells is a feature of the NOD mouse. *J Autoimmun.* 2006;26(2):104-15.
75. In't Veld P. Insulinitis in human type 1 diabetes: a comparison between patients and animal models. *Semin Immunopathol.* 2014;36(5):569-79.
76. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 2004;172(5):2731-8.
77. Vives-Pi M, Pujol-Autonell I. Innovative immunological strategies for type 1 diabetes. *Endocrinol Nutr.* 2015;62(9):419-21.
78. Daifotis AG, Koenig S, Chatenoud L, Herold KC. Anti-CD3 clinical trials in type 1 diabetes mellitus. *Clin Immunol.* 2013;149(3):268-78.
79. Pujol-Autonell I, Ampudia RM, Planas R, Marin-Gallen S, Carrascal J, Sanchez A, et al. Efferocytosis promotes suppressive effects on dendritic cells through prostaglandin E2 production in the context of autoimmunity. *PLoS One.* 2013;8(5):e63296.
80. Machen J, Harnaha J, Lakomy R, Styche A, Trucco M, Giannoukakis N. Antisense oligonucleotides down-regulating costimulation confer diabetes-preventive properties to nonobese diabetic mouse dendritic cells. *J Immunol.* 2004;173(7):4331-41.
81. Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszek A, Grabowska M, Derkowska I, Juscinska J, et al. Therapy of type 1 diabetes with CD4(+)CD25(high)CD127-regulatory T cells prolongs survival of pancreatic islets - results of one year follow-up. *Clin Immunol.* 2014;153(1):23-30.
82. Gharagozloo M, Majewski S, Foldvari M. Therapeutic applications of nanomedicine in autoimmune diseases: from immunosuppression to tolerance induction. *Nanomedicine.* 2015;11(4):1003-18.
83. Tsai S, Shameli A, Yamanouchi J, Clemente-Casares X, Wang J, Serra P, et al. Reversal of autoimmunity by boosting memory-like autoregulatory T cells. *Immunity.* 2010;32(4):568-80.

84. Shoda LK, Young DL, Ramanujan S, Whiting CC, Atkinson MA, Bluestone JA, et al. A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity*. 2005;23(2):115-26.
85. Herold KC, Vignali DA, Cooke A, Bluestone JA. Type 1 diabetes: translating mechanistic observations into effective clinical outcomes. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(4):243-56.
86. Ohnuma K, Dang NH, Morimoto C. Revisiting an old acquaintance: CD26 and its molecular mechanisms in T cell function. *Trends Immunol*. 2008;29(6):295-301.
87. Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol*. 2003;82(2):53-73.
88. De Meester I, Korom S, Van Damme J, Scharpe S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today*. 1999;20(8):367-75.
89. Yu DM, Slaitini L, Gysbers V, Riekhoff AG, Kahne T, Knott HM, et al. Soluble CD26 / dipeptidyl peptidase IV enhances human lymphocyte proliferation in vitro independent of dipeptidyl peptidase enzyme activity and adenosine deaminase binding. *Scand J Immunol*. 2011;73(2):102-11.
90. Ohnuma K, Hosono O, Dang NH, Morimoto C. Dipeptidyl peptidase in autoimmune pathophysiology. *Adv Clin Chem*. 2011;53:51-84.
91. Munoz E, Blazquez MV, Madueno JA, Rubio G, Pena J. CD26 induces T-cell proliferation by tyrosine protein phosphorylation. *Immunology*. 1992;77(1):43-50.
92. Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2001;54(3):249-64.
93. Boonacker EP, Wierenga EA, Smits HH, Van Noorden CJ. CD26/DPPIV signal transduction function, but not proteolytic activity, is directly related to its expression level on human Th1 and Th2 cell lines as detected with living cell cytochemistry. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(9):1169-77.
94. von Bonin A, Huhn J, Fleischer B. Dipeptidyl-peptidase IV/CD26 on T cells: analysis of an alternative T-cell activation pathway. *Immunol Rev*. 1998;161:43-53.
95. Ohnuma K, Uchiyama M, Yamochi T, Nishibashi K, Hosono O, Takahashi N, et al. Caveolin-1 triggers T-cell activation via CD26 in association with CARMA1. *J Biol Chem*. 2007;282(13):10117-31.
96. Yang L, Yuan J, Zhou Z. Emerging roles of dipeptidyl peptidase 4 inhibitors: anti-inflammatory and immunomodulatory effect and its application in diabetes mellitus. *Can J Diabetes*. 2014;38(6):473-9.

97. Ruiz P, Nassiri M, Steele B, Viciano AL. Cytofluorographic evidence that thymocyte dipeptidyl peptidase IV (CD26) activity is altered with stage of ontogeny and apoptotic status. *Cytometry*. 1996;23(4):322-9.
98. Klemann C, Schade J, Pabst R, Leitner S, Stiller J, von Horsten S, et al. CD26/dipeptidyl peptidase 4-deficiency alters thymic emigration patterns and leukocyte subsets in F344-rats age-dependently. *Clin Exp Immunol*. 2009;155(2):357-65.
99. Ruiz P, Zacharievich N, Hao L, Viciano AL, Shenkin M. Human thymocyte dipeptidyl peptidase IV (CD26) activity is altered with stage of ontogeny. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998;88(2):156-68.
100. Steinbrecher A, Reinhold D, Quigley L, Gado A, Tresser N, Izikson L, et al. Targeting dipeptidyl peptidase IV (CD26) suppresses autoimmune encephalomyelitis and up-regulates TGF-beta 1 secretion in vivo. *J Immunol*. 2001;166(3):2041-8.
101. Reinhold D, Bank U, Tager M, Ansorge S, Wrenger S, Thielitz A, et al. DP IV/CD26, APN/CD13 and related enzymes as regulators of T cell immunity: implications for experimental encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Front Biosci*. 2008;13:2356-63.
102. Preller V, Gerber A, Wrenger S, Togni M, Marguet D, Tadge J, et al. TGF-beta1-mediated control of central nervous system inflammation and autoimmunity through the inhibitory receptor CD26. *J Immunol*. 2007;178(7):4632-40.
103. Tanaka S, Murakami T, Nonaka N, Ohnuki T, Yamada M, Sugita T. Anti-arthritic effects of the novel dipeptidyl peptidase IV inhibitors TMC-2A and TSL-225. *Immunopharmacology*. 1998;40(1):21-6.
104. Tanaka S, Murakami T, Horikawa H, Sugiura M, Kawashima K, Sugita T. Suppression of arthritis by the inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Int J Immunopharmacol*. 1997;19(1):15-24.
105. Ding L, Gysemans CA, Stange G, Heremans Y, Yuchi Y, Takiishi T, et al. Combining MK626, a novel DPP-4 inhibitor, and low-dose monoclonal CD3 antibody for stable remission of new-onset diabetes in mice. *PLoS One*. 2014;9(9):e107935.
106. Jelsing J, Vrang N, van Witteloostuijn SB, Mark M, Klein T. The DPP4 inhibitor linagliptin delays the onset of diabetes and preserves beta-cell mass in non-obese diabetic mice. *J Endocrinol*. 2012;214(3):381-7.
107. Kim SJ, Nian C, McIntosh CH. Sitagliptin (MK0431) inhibition of dipeptidyl peptidase IV decreases nonobese diabetic mouse CD4+ T-cell migration through incretin-dependent and -independent pathways. *Diabetes*. 2010;59(7):1739-50.

108. Kim SJ, Nian C, Doudet DJ, McIntosh CH. Dipeptidyl peptidase IV inhibition with MK0431 improves islet graft survival in diabetic NOD mice partially via T-cell modulation. *Diabetes*. 2009;58(3):641-51.
109. Cabrera SM, Colvin SC, Tersey SA, Maier B, Nadler JL, Mirmira RG. Effects of combination therapy with dipeptidyl peptidase-IV and histone deacetylase inhibitors in the non-obese diabetic mouse model of type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2013;172(3):375-82.
110. Yin H, Park SY, Wang XJ, Misawa R, Grossman EJ, Tao J, et al. Enhancing pancreatic Beta-cell regeneration in vivo with pioglitazone and alogliptin. *PLoS One*. 2013;8(6):e65777.
111. Pospisilik JA, Martin J, Doty T, Ehses JA, Pamir N, Lynn FC, et al. Dipeptidyl peptidase IV inhibitor treatment stimulates beta-cell survival and islet neogenesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 2003;52(3):741-50.
112. Kim SJ, Nian C, Doudet DJ, McIntosh CH. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV with sitagliptin (MK0431) prolongs islet graft survival in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes*. 2008;57(5):1331-9.
113. Cho JM, Jang HW, Cheon H, Jeong YT, Kim DH, Lim YM, et al. A novel dipeptidyl peptidase IV inhibitor DA-1229 ameliorates streptozotocin-induced diabetes by increasing beta-cell replication and neogenesis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;91(1):72-9.
114. Ansarullah, Lu Y, Holstein M, DeRuyter B, Rabinovitch A, Guo Z. Stimulating beta-cell regeneration by combining a GPR119 agonist with a DPP-IV inhibitor. *PLoS One*. 2013;8(1):e53345.
115. Xu G, Stoffers DA, Habener JF, Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*. 1999;48(12):2270-6.
116. Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J Biol Chem*. 2003;278(1):471-8.
117. Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M. Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia*. 1999;42(7):856-64.
118. Li Y, Cao X, Li LX, Brubaker PL, Edlund H, Drucker DJ. beta-Cell Pdx1 expression is essential for the gluco-regulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes*. 2005;54(2):482-91.

119. Ellis SL, Moser EG, Snell-Bergeon JK, Rodionova AS, Hazenfield RM, Garg SK. Effect of sitagliptin on glucose control in adult patients with Type 1 diabetes: a pilot, double-blind, randomized, crossover trial. *Diabet Med.* 2011;28(10):1176-81.
120. Giampietro O, Giampietro C, Bartola LD, Masoni MC, Matteucci E. Sitagliptin as add-on therapy in insulin deficiency: biomarkers of therapeutic efficacy respond differently in type 1 and type 2 diabetes. *Drug Des Devel Ther.* 2013;7:99-104.
121. Suarez-Pinzon WL, Cembrowski GS, Rabinovitch A. Combination therapy with a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor and a proton pump inhibitor restores normoglycaemia in non-obese diabetic mice. *Diabetologia.* 2009;52(8):1680-2.
122. Suarez-Pinzon WL, Rabinovitch A. Combination therapy with a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor and a proton pump inhibitor induces beta-cell neogenesis from adult human pancreatic duct cells implanted in immunodeficient mice. *Cell Transplant.* 2011;20(9):1343-9.
123. Griffin KJ, Thompson PA, Gottschalk M, Kylo JH, Rabinovitch A. Combination therapy with sitagliptin and lansoprazole in patients with recent-onset type 1 diabetes (REPAIR-T1D): 12-month results of a multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2(9):710-8.
124. Garg SK, Moser EG, Bode BW, Klaff LJ, Hiatt WR, Beatson C, et al. Effect of sitagliptin on post-prandial glucagon and GLP-1 levels in patients with type 1 diabetes: investigator-initiated, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Endocr Pract.* 2013;19(1):19-28.
125. Zhao Y, Yang L, Xiang Y, Liu L, Huang G, Long Z, et al. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin maintains beta-cell function in patients with recent-onset latent autoimmune diabetes in adults: one year prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(5):E876-80.
126. Johansen OE, Boehm BO, Grill V, Torjesen PA, Bhattacharya S, Patel S, et al. C-peptide levels in latent autoimmune diabetes in adults treated with linagliptin versus glimepiride: exploratory results from a 2-year double-blind, randomized, controlled study. *Diabetes Care.* 2014;37(1):e11-2.
127. Rapti E, Karras S, Grammatiki M, Mousiolis A, Tsekmekidou X, Potolidis E, et al. Combined treatment with sitagliptin and vitamin D in a patient with latent autoimmune diabetes in adults. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep.* 2016;2016:150136.
128. Awata T, Shimada A, Maruyama T, Oikawa Y, Yasukawa N, Kurihara S, et al. Possible Long-Term Efficacy of Sitagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, for Slowly Progressive Type 1 Diabetes (SPIDDM) in the Stage of Non-Insulin-Dependency: An

Open-Label Randomized Controlled Pilot Trial (SPAN-S). *Diabetes Ther.* 2017;8(5):1123-34.

129. Buzzetti R, Pozzilli P, Frederich R, Iqbal N, Hirshberg B. Saxagliptin improves glycaemic control and C-peptide secretion in latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Diabetes Metab Res Rev.* 2016;32(3):289-96.

130. Varga T, Somogyi A, Barna G, Wichmann B, Nagy G, Racz K, et al. Higher serum DPP-4 enzyme activity and decreased lymphocyte CD26 expression in type 1 diabetes. *Pathol Oncol Res.* 2011;17(4):925-30.

131. Matteucci E, Ghimenti M, Di Beo S, Giampietro O. Altered proportions of naive, central memory and terminally differentiated central memory subsets among CD4+ and CD8 + T cells expressing CD26 in patients with type 1 diabetes. *J Clin Immunol.* 2011;31(6):977-84.

132. Matteucci E, Ghimenti M, Consani C, Di Beo S, Giampietro O. About CD26 CD8 lymphocytes in type 1 diabetes mellitus. *Scand J Immunol.* 2010;71(2):123-4.

133. Ibegbu CC, Xu YX, Fillos D, Radziejewicz H, Grakoui A, Kourtis AP. Differential expression of CD26 on virus-specific CD8(+) T cells during active, latent and resolved infection. *Immunology.* 2009;126(3):346-53.

134. Hatano R, Ohnuma K, Yamamoto J, Dang NH, Morimoto C. CD26-mediated co-stimulation in human CD8(+) T cells provokes effector function via pro-inflammatory cytokine production. *Immunology.* 2013;138(2):165-72.

135. Suzuki H, Shi Z, Okuno Y, Isobe K. Are CD8+CD122+ cells regulatory T cells or memory T cells? *Hum Immunol.* 2008;69(11):751-4.

136. Nitta T, Nitta S, Lei Y, Lipp M, Takahama Y. CCR7-mediated migration of developing thymocytes to the medulla is essential for negative selection to tissue-restricted antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(40):17129-33.

137. Ueno T, Saito F, Gray DH, Kuse S, Hieshima K, Nakano H, et al. CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med.* 2004;200(4):493-505.

138. Sarang Z, Garabuczi E, Joos G, Kiss B, Toth K, Ruhl R, et al. Macrophages engulfing apoptotic thymocytes produce retinoids to promote selection, differentiation, removal and replacement of double positive thymocytes. *Immunobiology.* 2013;218(11):1354-60.

139. Rizzi M, Ferrera F, Filaci G, Indiveri F. Disruption of immunological tolerance: role of AIRE gene in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2006;5(2):145-7.

140. Kyewski B, Derbinski J, Gotter J, Klein L. Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. *Trends Immunol.* 2002;23(7):364-71.

141. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Pillars Article: Promiscuous Gene Expression in Medullary Thymic Epithelial Cells Mirrors the Peripheral Self. *Nat. Immunol.* 2001. 2: 1032-1039. *J Immunol.* 2016;196(7):2915-22.
142. Passos GA, Speck-Hernandez CA, Assis AF, Mendes-da-Cruz DA. Update on Aire and thymic negative selection. *Immunology.* 2018;153(1):10-20.
143. Fornari TA, Donate PB, Macedo C, Marques MM, Magalhaes DA, Passos GA. Age-related deregulation of Aire and peripheral tissue antigen genes in the thymic stroma of non-obese diabetic (NOD) mice is associated with autoimmune type 1 diabetes mellitus (DM-1). *Mol Cell Biochem.* 2010;342(1-2):21-8.
144. Oliveira EH, Macedo C, Donate PB, Almeida RS, Pezzi N, Nguyen C, et al. Expression profile of peripheral tissue antigen genes in medullary thymic epithelial cells (mTECs) is dependent on mRNA levels of autoimmune regulator (Aire). *Immunobiology.* 2013;218(1):96-104.
145. Akarte AS, Srinivasan BP, Gandhi S. A novel long acting DPP-IV inhibitor PKF-275-055 stimulates beta-cell proliferation resulting in improved glucose homeostasis in diabetic rats. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(2):241-52.
146. Mu J, Woods J, Zhou YP, Roy RS, Li Z, Zychband E, et al. Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2006;55(6):1695-704.

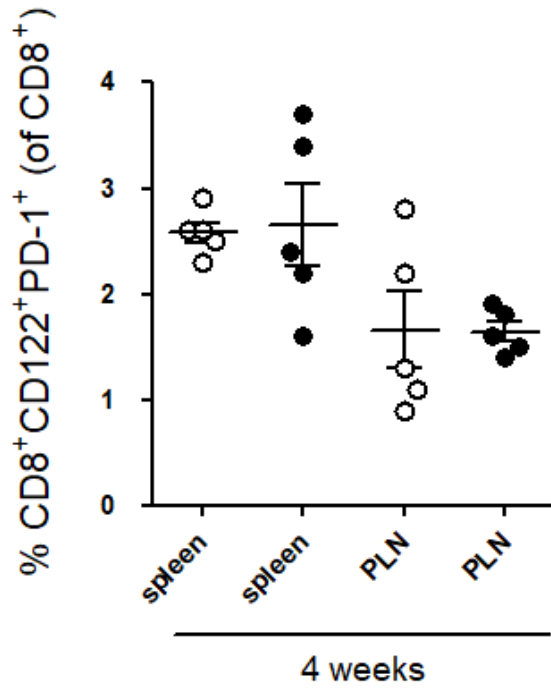
Bibliografía general

- Kuby Inmunology (2007). Edited by Thomas J. Kindt, Barbara A. Osborne, Richard A. Goldsby. 6th Edition. W. H. Freeman & Company.
- Francisca Salas P, José Luis Santos M, Francisco Pérez B. Genética de la Diabetes Mellitus tipo 1. *Rev. chil. endocrinol. diabetes* 2013; 6 (1): 15-22.

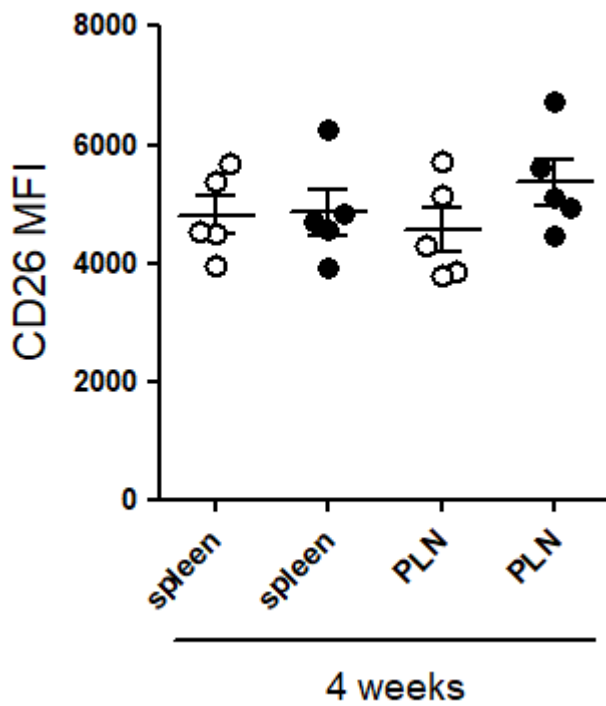
11. ANEXO 1

Figure. Effects of MK626 treatment on CD8⁺ Tregs (CD122⁺PD-1⁺) lymphocytes from spleen and PLN after 4 weeks of treatment in control (white circles) and treated mice (black circles). A) Percentage B) MFI for CD26 expression

A)



B)



12. ANEXO 2

Toxicity assay of effector memory CD8⁺ T cells

To investigate the cytotoxic capacity of CD8⁺_{EM} T cells on insulin-loaded mDCs in the presence or absence of the DPPIV inhibitor MK626, a preliminary toxicity assay was performed. To that end, CD8⁺_{EM} T lymphocytes obtained from NOD at 10-12 weeks of age were purified as previously described [Alonso N, 2015, Plos One] and co-cultured with autologous antigen presenting cells (APCs) obtained from NOD mice in presence or absence of MK626 (10µM). APCs were cultured at different ratios (1:0.5, 1:1 and 1:2, being APCs: CD8⁺_{EM} T cells). As source of APCs, dendritic cells were differentiated (1000 U/ml; Prospec, Rehovot, Israel) and matured (LPS, 100 ng/ml; Sigma) from bone marrow precursors cells, as previously described [Alonso N, 2015, Plos One]. DCs were labelled with the intracellular fluorescent dye CellTrace Violet (CTV, Molecular Probes, Molecular Probes, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc) to track them after the coculture. DCs were loaded with insulin (20µg/ml, Sigma) previously to maturation stimulus. After 3 days of co-culture, cells were harvested and stained with annexin V-PE (Immunotools) and 7aad (BD Pharmingen) in Ca²⁺ containing buffer (BD Pharmingen) for 20min at R.T. Data were acquired by flow cytometry (FACSCanto II) and analysed using the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR). Two independent experiments were carried out.

Results

The percentage of viability of insulin-loaded mDCs was not significantly reduced in the presence of CD8⁺_{EM} T lymphocytes at different ratios (see Figure below). However, we observed a slight reduction in the viability of mDCs at ratio 1:2 being mDCs: CD8⁺_{EM} T cells, suggesting an potential effect dose-response. Next, when MK626 was added to co-cultures, the percentage of viability of insulin-loaded mDCs displayed a biological decreased, mainly at ratio 1:2, although the difference was not statistically significant. Notably, the percentage of viability of mDCs also tended to reduce only in the presence of the DPPIV inhibitor MK626, similarly to that occurred in suppression assays.

Taking into account our results, we cannot clearly confirm a cytotoxic direct effect of CD8⁺_{EM} T cells *in vitro* against mDCs by itself but we observed a relevant biological effect on viability of DCs when DPPIV inhibitor MK626 was present, despite differences

did not reach statistical significance. However, these results should be taken with caution given the low number of experiments carried out. Therefore, this doesn't rule out the possibility that CD8⁺ T_{EM} T cells may act through a cytotoxic action directed against cells that are involved in antigen presentation contributing to the prevention of diabetes. Additional and optimized experiments are needed to investigate it.

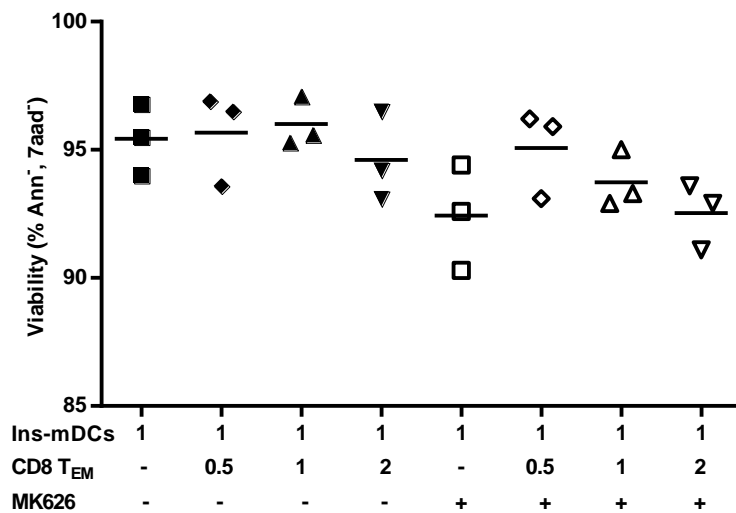


Figure. **Cytotoxic capacity of CD8⁺ T_{EM} lymphocytes *in vitro*.** Viability of CTV labelled insulin-loaded mDCs in the presence of CD8⁺ T_{EM} lymphocytes at different ratios (1:0.5, 1:1 and 1:2, being mDCs : CD8 T_{EM}) with / without MK626 for 3 days. Plots show the mean (line) of three experimental duplicates. Graph is representative of two independent experiments.

