

Expresión disminuida de caspasa 3 asociada al polimorfismo del gen del antígeno-4 asociado a linfocito T-citotóxico (CTLA4) en pacientes chilenos con diabetes tipo 1

BÁRBARA ANGEL B.^{1,a}, ETHEL CODNER², MIGUEL ARREDONDO O.^{3,b}, FRANCISCA SALAS P.^{4,c}, CAROLINA PIZARRO A.^{4,d}, FRANCISCO PÉREZ B.^{4,b}

Decreased caspase 3 expression and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 polymorphism in Chilean patients with type 1 diabetes

Background: Several polymorphisms of the CTLA4 gene have been associated with autoimmune diseases. The activation of induced cell death is the major event and caspase 3 represents the main protein for the apoptotic machinery, especially in lymphocytes. **Aim:** To correlate CTLA4 polymorphisms with caspase 3 expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) simulating in vitro the glucose effect. **Material and Methods:** CTLA4 polymorphisms were determined by restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). PBMC from 21 patients with type 1 diabetes aged 8.5 ± 4.3 years and 21 healthy subjects aged 18.3 ± 1.8 years, were stimulated under normal (5 mM) and toxic (14 mM) glucose conditions to assess its effect on the expression and activity of caspase 3. Relative abundance of caspase 3 mRNA was measured by semi quantitative RT-PCR and its activity, by a colorimetric assay. **Results:** When stimulated with 14mM glucose, PBMC of G allele carriers with type 1 diabetes had significantly lower relative mRNA abundance of caspase 3 (median value = 0.12, range 0.01-0.70 AU) compared with non-carriers (median value = 0.81, range 0.06-1.09 AU). When the incubation was carried out with the lower glucose concentration, a similar profile of caspase 3 activity was observed in diabetic patients carrying G allele (median value = 0.57, range 0.13-1.20 AU) as compared with non-carriers (median value = 0.89, range 0.14-5.50 AU). No significant changes after stimulating with glucose, were observed in PBMCs of the control group. **Conclusions:** PBMC of recently diagnosed patients with T1D, carrying the G allele in + 49A/G polymorphisms of CTLA4, have a decreased expression and activity of caspase 3.

(Rev Med Chile 2012; 140: 1109-1115).

Key words: Apoptosis; Caspase 3; Diabetes Mellitus, type 1.

La incidencia de la diabetes tipo 1 (DM1) en Santiago, Chile se ha incrementado en los últimos años, lo que es concordante con lo observado en América Latina como a nivel mundial^{1,2}.

La DM1 es una enfermedad autoinmune

donde células T destruyen selectivamente a las células β pancreáticas productoras de insulina³⁻⁵. Las células T activadas invaden los islotes, produciendo un fenómeno denominado "insulinitis". La destrucción de los islotes está mediada por una compleja interacción entre los linfocitos activados,

¹Departamento de Nutrición, Salud Pública y Epidemiología Genética. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) Universidad de Chile, Chile.

²Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI). Hospital San Borja Arriarán. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

³Laboratorio de Micronutrientes. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) Universidad de Chile, Chile.

⁴Laboratorio de Genómica Nutricional. Departamento de Nutrición. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago, Chile.

^aDoctor en Nutrición y Alimentos.

^bDoctor en Ciencias.

^cBioquímico.

^dBiotecnólogo.

Trabajo financiado por proyecto FONDECYT 1100075.

Recibido el 5 de diciembre de 2011, aceptado el 15 de mayo de 2012.

Correspondencia a:
Dr. Francisco Pérez-Bravo
Laboratorio de Genómica Nutricional
Departamento de Nutrición.
Facultad de Medicina.
Universidad de Chile.
Av. Independencia 1027,
3° Piso
Santiago, Chile.
Teléfono: 56 2 978 62 42
E-mail: fperez@med.uchile.cl

citoquinas y macrófagos⁵⁻⁷. La apoptosis es un proceso fundamental que está involucrado en la viabilidad y en la destrucción tanto de las células T como de las células β . Se ha observado que la apoptosis es un fenómeno crucial para activar a las células T específicas, que agreden al páncreas y que dan cuenta de la aparición de la enfermedad⁵. La disfunción de la apoptosis se ha relacionado con la aparición de diversas enfermedades autoinmunes. Diversos estudios han propuesto que el bloqueo de la apoptosis estaría involucrado en la patogénesis de estas enfermedades^{5,8}.

El gen *CTLA4* contiene 4 exones y se han descrito varios polimorfismos en la región promotora⁹⁻¹². La sustitución de una G por una A en la posición 49 del exón 1 (+49 A/G), causa un cambio de una treonina por una alanina en el codón 17 del péptido señal (A17T), la presencia de este alelo ha sido asociada a la predisposición a desarrollar enfermedades autoinmunes¹³⁻¹⁵. Diversos autores han explicado que esta asociación se relaciona con bajos niveles de ARNm de la forma soluble de la proteína CTLA4, teniendo un papel funcional en la susceptibilidad para desarrollar enfermedades autoinmunes.

Las caspasas son cisteína-aspartil proteasas específicas conservadas evolutivamente que juegan un papel clave en la apoptosis¹⁶. La apoptosis cursa a través de dos vías principales: la vía extrínseca o la vía del receptor de muerte celular que involucra la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (dependiente de la proteína CD95 o Fas) y la vía intrínseca o mitocondrial. La caspasa 8 y 9 son proteínas que están involucradas tanto en la vía extrínseca como intrínseca, mientras que las caspasas 3, 6, y 7 son proteínas efectoras¹⁷. Se ha reportado la existencia de alteraciones en la apoptosis en células T periféricas en sujetos afectados por enfermedades autoinmunes¹⁸.

En ratones deficientes en la proteína Fas, se ha observado una activación de la muerte celular inducida, evento que contribuye al desarrollo de autoinmunidad¹⁹. En el ratón diabético no-obeso (NOD), modelo de diabetes autoinmune, se ha demostrado una resistencia a las señales apoptóticas en los linfocitos T periféricos²⁰⁻²². Además, estudios recientes describen una expresión alterada de Fas y su ligando (FasL), y una expresión reducida de las caspasas 8 y 3 en los linfocitos T periféricos, tanto en los modelos animales como en pacientes con DM1^{6,7}. Considerando que hasta la fecha no hay

estudios que relacionen la expresión diferencial de caspasa 3 con genotipos específicos de *CTLA4* en la DM1, el propósito de este estudio fue caracterizar la expresión y la actividad de caspasa 3 en un modelo de CMPs provenientes de pacientes con DM1 y controles sometiendo a estas células a dos estímulos de glucosa (normal y tóxica) y evaluando su efecto sobre la expresión y la actividad de caspasa 3.

Materiales y Métodos

Sujetos

El estudio celular se realizó con 21 pacientes con DM1 (14 mujeres, 7 hombres; edad promedio $8,5 \pm 4,3$ años) menores de 15 años con diagnóstico reciente de DM1 debutantes en el IDIMI y provenientes de comunas de nivel socioeconómico medio-bajo. La muestra fue tomada en un período no mayor a los quince días a partir del diagnóstico (según criterio Asociación Americana de Diabetes, ADA). El grupo control correspondió a 21 individuos sanos (12 mujeres, 8 hombres; edad promedio $18,3 \pm 1,8$ años), sin antecedentes familiares de diabetes, ni enfermedades autoinmunes provenientes de dos comunas de nivel socioeconómico medio-bajo. Se escogieron jóvenes mayores a los pacientes con DM1 para descartar la posibilidad de DM1 en este grupo. Este protocolo fue aprobado por los comités de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile e IDIMI respectivamente. Todos los participantes y/o sus padres firmaron el correspondiente consentimiento informado.

Estudio experimental

El ADN genómico fue extraído de sangre periférica utilizando un protocolo estándar (Winkler, Santiago, Chile). Los genotipos para el gen *CTLA4* fueron obtenidos mediante la amplificación del ADN con PCR convencional y análisis de fragmentos de restricción. Se amplificó una región de 162 pb localizado en el exón 1 del gen *CTLA4* con los partidores: sentido 5'-GCTCTACTTCCT-GAAGACCT-3'; antisentido 5'-AGTCTCACT-CACCTTTGCAG-3. La reacción de PCR fue realizada en 20 μ L de reacción con 5 pmoles de cada partidor, 50 ng de DNA genómico, 200 μ M de cada dNTP y 0,5 U de Taq-Polimerasa. La reacción se estandarizó en un período de 7 min a 95°C para la activación de la enzima y 40 ciclos

que consistieron en denaturación del ADN a 95°C por 30 s, unión de los partidores a 56°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s, en un período de extensión final a 72°C durante 15 min. El análisis de fragmentos de restricción se realizó en 5 µL de producto incubado a 37°C durante toda la noche con 0,5 U de la enzima BvBI. El producto de digestión (162 pb, 90 pb y 74 pb) fue visualizado en geles de agarosa al 2,5% con bromuro de etidio²³.

Separación y cultivo celular

Las CMPs fueron aisladas a partir de sangre heparinizada mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hystopaque (densidad: 1,119; Sigma Diagnostic, St. Louis, MO), lavadas dos veces con el medio RPMI 1640 sin glucosa (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA). Las células fueron incubadas con glucosa (5 y 14 mM) o sin glucosa por 20 h, a 37°, 5% CO₂ y 80% de humedad, en placas Petri de 6 pocillos con medio RPMI 1.640 sin glucosa, suplementado con suero fetal bovino al 10% fetal y antibióticos en duplicado (a una concentración de 1 x 10⁶ células en 1ml de medio de cultivo). La recuperación de las células fue llevada a cabo mediante una centrifugación a baja velocidad (3.000 rpm x 5 min) y un tratamiento suave con tripsina-EDTA a 37° C por 5 min. Las células fueron lavadas con PBS y la viabilidad celular fue determinada utilizando una tinción de azul Tripán en una cámara de Neubauer. Una alícuota fue removida para la extracción de proteínas y otra para la extracción de ARNm. Estas alícuotas fueron almacenadas y congeladas a -80° C en DMSO al 10%.

Expresión de ARNm para Fas y caspasa 3

La abundancia relativa del ARNm de Fas y caspasa 3 fue semicuantificada mediante RT-PCR utilizando partidores múltiples. El ARNm total fue extraído con Trizol (Gibco-BRL) y la síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando 2 µg de cada muestra de ARNm con hexámeros al azar (Random Partidores) con 200 U de enzima Superscript II (Gibco-BRL); posteriormente 200 ng de la alícuota de ADNc fue amplificada en un volumen de reacción de 100 µL con 20 pmol de los partidores, 2,5 U Taq ADN polimerasa (Gibco-BRL), 200 mmol/l de cada deoxinucleósido trifosfato y 1,5 mmol/l MgCl₂. Las secuencias de los partidores para caspasa 3 fueron: sentido 5'-ATG GAG AAC ACT GAA AAC TCA GTG-3', anti-sentido 5'-

TAG TGA TAA AAA TAG AGT TCT TTT G-3' y para Fas fueron: 5' GCCCAAGTGACTGACATCA 3' y anti-sentido: 5' ACTGTGCAGTCCCTAGCTT 3'. La expresión de β-actina se utilizó como un control de ARNm empleando los siguientes partidores que generaron un producto de 354 pb: sentido 5'-ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG-3', anti-sentido 5'-CGT GAG GAT CTT CAT GAG GTA GTC-3. Se utilizaron 30 ciclos para caspasa-3-Fas y 25 ciclos para β-actina. Todos los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% mediante un escaneo densitométrico del gel utilizando el *software* Bio-Capt versión 11.01 y los resultados han sido expresados en una razón caspasa-3/β-actina o Fas/β-actina. Para la determinación de proteínas, las muestras fueron procesadas usando un buffer de lisis celular contenido en el *kit* (ApoTarget™ Casp 3, Biosurce International, Inc. California, USA) y cuantificadas por método de Lowry.

La actividad de caspasa 3 (200 mg de proteína) medida con un *kit* colorimétrico (ApoTarget™ Casp-3, Biosurce International, Inc. California, USA) con DEVD-pNA (p-Nitroaniline) como sustrato. Este enfoque nos permite determinar la actividad *in vitro* a través de la medición proteolítica de caspasa3 inducida en nuestro experimento por glucosa, midiendo la absorbancia a 405 nm. El incremento en la actividad de caspasa 3 fue determinado por comparación directa con las lecturas en cada condición (5 mM y 14 mM de estímulo de glucosa) y con las lecturas de los controles (células sin estímulos de glucosa).

Análisis estadístico

Se utilizó test de Kruskal-Wallis para estimar la expresión relativa de Fas entre DM1 y controles. El test de Friedman y Wilcoxon para comparar la expresión y actividad de caspasa 3 y de acuerdo con los genotipos +49 A/G del gen *CTLA4* en los diferentes estímulos de glucosa.

Resultados

Expresión de Fas

Para evaluar la presencia de un patrón diferencial de apoptosis en CMPs se realizó una determinación de la expresión de Fas bajo la influencia de la hemaglutinina que induce apoptosis vía Fas-Fas-ligando. El efecto de apoptosis inducida

en las CMPs con hemaglutinina, mostró que los DM1 presentaron una expresión diferencial de Fas (Figura 1), en ambas condiciones de glucosa (5 mM y 14 mM).

Expresión de caspasa 3 en función del genotipo CTLA4

Se analizó la expresión del ARNm de caspasa 3 y los datos se dividieron en genotipo AA y en portadores del alelo G (AG+GG) según el polimorfismo +49 A/G del gen *CTLA4*. Los resultados obtenidos en pacientes y controles, mostraron que la expresión relativa del ARNm de caspasa 3 aumentó en relación a β -actina cuando la concentración de glucosa se incrementó ($p = 0,06$) para el genotipo AA. En cambio, los pacientes con DM1 portadores del alelo G (AG+GG) mostraron una disminución significativa en la relación ARNm caspasa 3/ARNm β -actina ($p = 0,02$) (Figura 2). Los niveles de expresión del ARNm de caspasa 3 se mantuvieron sin cambios en los controles.

Al comparar la abundancia relativa del ARNm de caspasa 3 en cada punto de exposición a glucosa, entre portadores y no portadores del alelo G en el grupo DM1 se observó que en la condición de glucosa 14 mM, los portadores del alelo G mostraron una menor abundancia relativa (mediana de los valores de expresión = 0,12 dentro del rango [0,01-0,70]), en comparación con los no portadores (mediana de los valores de expresión =

0,81 dentro del rango [0,06-1,09]); con $p = 0,031$. El mismo análisis para el grupo control no mostró diferencias en la abundancia relativa del ARNm de caspasa 3 entre los genotipos o en las distintas condiciones de glucosa.

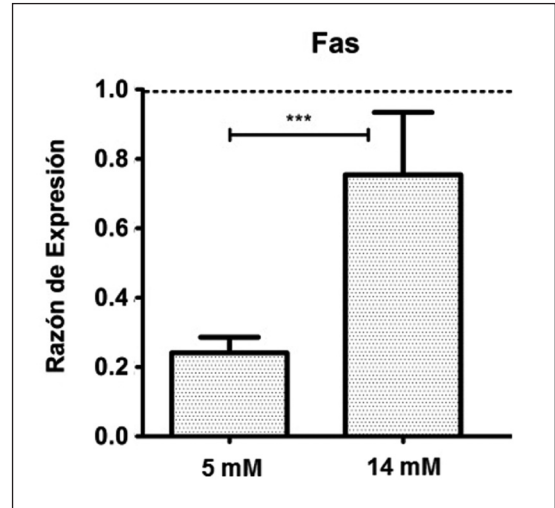


Figura 1. Efecto de glucosa sobre la expresión génica de Fas. Razones de expresión del gen Fas en el grupo de pacientes con DM1 ($n = 21$) en relación a los controles ($n = 21$). Valores mayores a 1 indican aumento de la expresión. Significancia estadística según test de Kruskal-Wallis. *** $p < 0,001$.

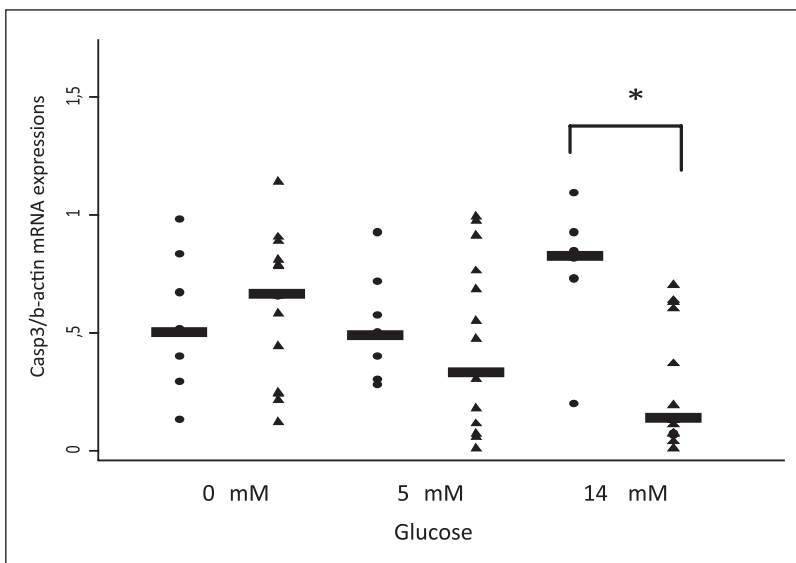


Figura 2. Expresión del ARNm de caspasa 3/ β -actina en CPMs. Se muestran los no portadores (círculos) y portadores (triángulos) del alelo G según el estímulo de glucosa. Se observa una disminución significativa en los portadores de este alelo en la condición de 14 mM de glucosa ($p = 0,03$).

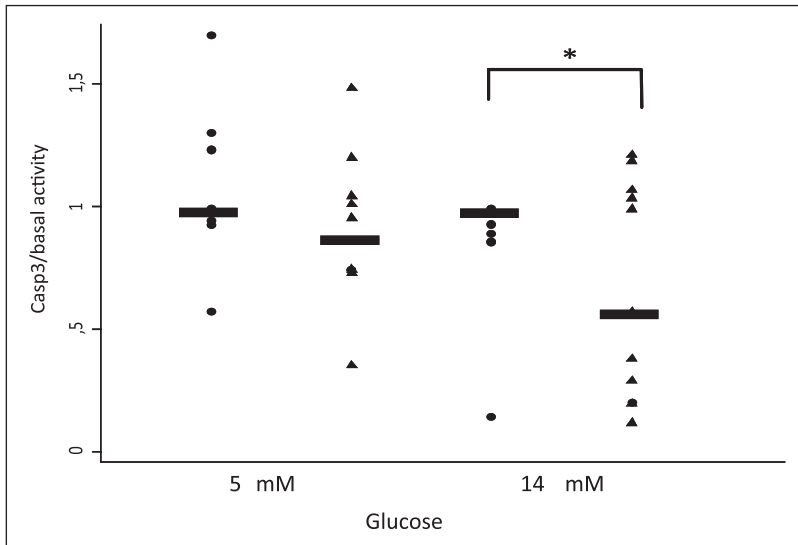


Figura 3. Actividad caspasa 3/basal en las CMPs, los no portadores (círculos) y portadores (triángulos) del alelo G de acuerdo con el estímulo de glucosa. Se observó una disminución significativa en los portadores de este alelo en la condición de 14 mM de glucosa ($p = 0,03$).

Actividad de caspasa 3 en función del genotipo CTLA4

Este análisis se realizó con 200 mg de proteína de CMPs en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa. Los resultados fueron divididos por genotipo como AA y portadores del alelo G (AG+GG) según polimorfismo *CTLA4* (Figura 3). Nuestros datos mostraron que esta actividad no tuvo variación con el incremento en la concentración de glucosa ($p = 0,25$). En los portadores del alelo G (AG+GG) con DM1, la actividad caspasa 3 mostró una tendencia decreciente con el aumento de la concentración de glucosa. Se observó de forma similar que en el perfil de expresión de caspasa 3 en la condición de 14 mM de glucosa, que los pacientes portadores del alelo G mostraron una menor actividad (mediana de los valores de expresión (unidad arbitraria) = 0,57 dentro del rango [0,13-1,2]) en comparación con los DM1 no portadores (mediana de los valores de expresión = 0,887 dentro del rango [0,14-5,5]), con una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,03$). En el grupo control, la actividad de la caspasa 3 no varió entre portadores y no portadores en relación a las concentraciones de glucosa.

Discusión

La confirmación de los roles de los genes *CTLA4* y el receptor de la proteína fosfatasa lin-

foide (*PTPN2*) como reguladores de la inmunomodulación negativa de las células T a través de las células T regulatorias, revela la complejidad de la respuesta inmune observada en la DM1²⁴.

Las moléculas *CTLA4* y *PTPN22*, controlan la activación de células T y a diferencia de *CD28*, *CTLA4* entrega señales negativas a las células T²⁵. Varios polimorfismos del gen *CTLA4* han sido relacionados a una función inhibitoria reducida sugiriendo que estos podrían jugar un papel importante en varias etapas regulatorias de las células T^{9,26-28}. Estudios previos de nuestro grupo en polimorfismos de *CTLA4* mostraron una potencial reducción de la proteína circulante *CTLA4* en pacientes con DM1 portadores del alelo G²⁹, fenómeno que Purohit y cols³⁰, no habían detectado en sus estudios previos.

Los datos presentados en este trabajo muestran una posible relación entre el polimorfismo +49 A/G del gen *CTLA4* y un marcador de apoptosis como caspasa 3. La apoptosis parece jugar un rol central en los mecanismos moleculares que conducen a la autoinmunidad^{31,32}. Aunque las células T colaboradoras representan el principal componente en la insulinitis autoinmune, la respuesta humoral y de células policlonales encontradas en pacientes con DM1 sugieren la participación de otros múltiples eventos dirigidos hacia células β pancreáticas, entre los cuales la apoptosis parece jugar un papel fundamental^{33,34}.

Vendrame y cols³⁵ reportaron una expresión alterada de caspasa 3 en pacientes con DM1. Sus resultados mostraron una resistencia a la apoptosis mediada por el receptor de membrana Fas debido, al menos en un grupo de pacientes, a un defecto en la expresión de caspasa 3 (principal ejecutor de la muerte celular por apoptosis dependiente de Fas). Ellos propusieron que la expresión y función defectuosa de caspasa 3 en linfocitos periféricos de pacientes con DM1 u otras enfermedades autoinmunes como tiroiditis, puede cumplir una función importante en la resistencia a la muerte celular y así contribuir al desarrollo de autoinmunidad en individuos susceptibles genéticamente^{35,36}.

Nuestros resultados indican que las CPMs provenientes de pacientes portadores del alelo G del polimorfismo + 49 A/G de *CTLA4* mostraron una expresión reducida de caspasa 3 después de la exposición a altos niveles de glucosa. Este resultado es concordante con lo observado por Vendrame y cols³⁵ y podría indicar una resistencia a la muerte celular por parte del linfocito T.

Un aspecto importante a considerar en la interpretación de nuestros resultados tiene relación con la posible influencia de la edad sobre los marcadores de apoptosis, en particular sobre caspasa 3. En nuestro estudio, los pacientes con DM1 son más jóvenes que los controles, esto debido a que la búsqueda de controles mayores es necesaria para descartar la presencia de DM1. Sin embargo, esta diferencia de edad podría estar afectando la actividad de caspasa 3. En otros modelos celulares (cardiomiocitos en cultivo, células progenitoras endoteliales y músculo) se ha observado que la concentración de caspasa 3 está aumentada y que su actividad tiende a ser mayor con la edad³⁷⁻³⁹. Este antecedente es relevante y a pesar de que no hay antecedentes en CMPs y que los controles también son jóvenes, debiera interpretarse con cautela.

Nuestros datos apoyarían el papel esencial del gen *CTLA4* en la inmuno-modulación de las células T. En particular, este es el primer reporte sobre la relación entre el polimorfismo +49 A/G del gen *CTLA4* y la activación de caspasa 3. Recientemente, se ha mostrado la importancia de la activación de las caspasas en patologías mediadas por inmunidad²⁰. Además, nuestros resultados muestran que la presencia del alelo G del polimorfismo + 49 A/G de *CTLA4* en CMPs de niños con DM1 podría estar relacionada a una relativa baja en la expresión y actividad de caspasa 3 en condiciones de estrés

por glucosa. Esto sugiere una resistencia a la apoptosis por parte de las CMPs, produciéndose dos efectos conjuntos: una mayor sobrevida celular y por lo tanto, mayor probabilidad de infiltración y un efecto de masa celular lo que condicionaría una mayor producción de citoquinas. En ambos casos el escenario se corresponde con una mayor agresividad de las células T circulantes.

Referencias

1. Carrasco E, Pérez-Bravo F, Santos JL, López G, Calvillán M, Wolff C, et al. One of the lowest validated incidence rates of insulin dependent diabetes mellitus in the Americas: Santiago, Chile. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 34: S153-7.
2. Carrasco E, Pérez-Bravo F, Dorman J, Mondragón A, Santos JL. Increasing incidence of type 1 diabetes in population from Santiago of Chile: trends in a period of 18 years (1986-2003). *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 34-7.
3. Alizadeh BZ, Koeleman BP. Genetic polymorphisms in susceptibility to Type 1 Diabetes. *Clin Chim Acta* 2008; 387: 9-17.
4. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 447-85.
5. Pirot P, Cardozo AK, Eizirik DL. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008; 52: 156-65.
6. Gregersen PK, Behrens TW. Genetics of autoimmune diseases-disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 917-28.
7. 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: 1370-9.
8. Pearl-Yafe M, Yolcu ES, Yaniv I, Stein J, Shirwan H, Askenasy N. The dual role of Fas-ligand as an injury effector and defense strategy in diabetes and islet transplantation. *Bioessays* 2006; 28: 211-22.
9. Kouki T, Gardine CA, Yanagawa T, Degroot LJ. Relation of three polymorphisms of the CTLA-4 gene in patients with Graves' disease. *J Endocrinol Invest* 2002; 25: 208-13.
10. Lee YJ, Lo FS, Shu SG, Wang CH, Huang CY, Liu HF, et al. The promoter region of the CTLA4 gene is associated with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001; 14: 383-8.
11. Van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strate-

- gies. *Physiol Rev* 2011; 91: 79-118.
12. Turpeinen H, Laine AP, Hermann R, Simell O, Veijola R, Knip M, et al. A linkage analysis of the CTLA4 gene region in Finnish patients with type 1 diabetes. *Eur J Immunogenet* 2003; 30: 289-93.
 13. Teft WA, Kirchof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 65-97.
 14. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003; 423: 506-11.
 15. Vaidya B, Pearce S. The emerging role of the CTLA-4 gene in autoimmune endocrinopathies. *Eur J Endocrinol* 2004; 150: 619-26.
 16. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1415-30.
 17. Siegel RM. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 308-17.
 18. Opferman JT. Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ* 2008; 15: 234-42.
 19. Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 1995; 16: 39-43.
 20. Augstein P, Bahr J, Wachlin G, Heinke P, Berg S, Salzsieder E, et al. Cytokines activate caspase-3 in insulinoma cells of diabetes-prone NOD mice directly and via upregulation of Fas. *J Autoimmun* 2004; 23: 301-9.
 21. Reddy S, Bradley J, Ginn S, Pathipati P, Ross JM. Immunohistochemical study of caspase-3-expressing cells within the pancreas of non-obese diabetic mice during cyclophosphamide-accelerated diabetes. *Histochem Cell Biol* 2003; 119: 451-61.
 22. Yamada K, Ichikawa F, Ishiyama-Shigemoto S, Yuan X, Nonaka K. Essential role of caspase-3 in apoptosis of mouse beta-cells transfected with human Fas. *Diabetes* 1999; 48: 478-83.
 23. Balic I, Angel B, Codner E, Carrasco E, Pérez-Bravo F. Association of CTLA-4 polymorphisms and clinical-immunologic characteristics at onset of type 1 diabetes mellitus in children. *Hum Immunol* 2009; 70: 116-20.
 24. Duffy DL. Genetic determinants of diabetes are similarly associated with other immune-mediated diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007; 7: 468-74.
 25. Liadis N, Murakami K, Eweida M, Elford AR, Sheu L, Gaisano H, et al. Caspase-3-dependent beta-cell apoptosis in the initiation of autoimmune diabetes mellitus. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 3620-9.
 26. Ligers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun* 2001; 2: 145-52.
 27. Maurer M, Loserth S, Kolb-Maurer A, Ponath A, Wiese S, Kruse N, et al. A polymorphism in the human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) gene (exon 1 +49) alters T-cell activation. *Immunogenetics* 2002; 54: 1-8.
 28. van der Merwe PA, Davis SJ. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 659-84.
 29. Momin S, Flores S, Angel BB, Codner DE, Carrasco PE, Pérez-Bravo F. Interactions between programmed death 1 (PD-1) and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) gene polymorphisms in type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2009; 83: 289-94.
 30. Purohit S, Podolsky R, Collins C, Zheng W, Schatz D, Muir A, et al. Lack of correlation between the levels of soluble cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4) and the CT-60 genotypes. *J Autoimmune Dis* 2005; 2: 8.
 31. Ou D, Wang X, Metzger DL, James RF, Pozzilli P, Plesner A, et al. Synergistic inhibition of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human pancreatic beta cells by Bcl-2 and X-linked inhibitor of apoptosis. *Hum Immunol* 2005; 66: 274-84.
 32. Pearce SH, Merriman TR. Genetic progress towards the molecular basis of autoimmunity. *Trends Mol Med* 2006; 12: 90-8.
 33. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 354-9.
 34. Purohit S, She JX. Biomarkers for type 1 diabetes. *Int J Clin Exp Med* 2008; 1: 98-116.
 35. Vendrame F, Santangelo C, Misasi R, Dionisi S, Gizzi C, Realacci M, et al. Defective lymphocyte caspase-3 expression in type 1 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 119-25.
 36. Vendrame F, Segni M, Grassetto D, Tellone V, Augello G, Trischitta V, et al. Impaired caspase-3 expression by peripheral T cells in chronic autoimmune thyroiditis and in autoimmune polyendocrine syndrome-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 5064-8.
 37. Kakarla SK, Rice KM, Katta A, Paturi S, Wu M, Kolli M, et al. Possible molecular mechanism underlying age-related cardiomyocyte apoptosis in the F344BN rat heart. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010; 65: 147-55.
 38. Leeuwenburgh C, Gurley CM, Strotman BA, Dupont-Versteegden EE. Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: 1288-96.
 39. Kushner EJ, MacEaney OJ, Weil BR, Greiner JJ, Stauffer BL, DeSouza CA. Aging is associated with a proapoptotic endothelial progenitor cell phenotype. *J Vasc Res* 2011; 48: 408-14.