

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra buněčné biologie**



**Stanovenie expresných markerov génov HLA II. triedy**

**Marta Zajacová**

**Diplomová práca**

**Vedúca práce: Doc. MUDr. Marie Černá, CSc.**

**3. lékařská fakulta UK**

Ústav obecné biologie a genetiky

**Praha, 2010**

## **Vyhlásenie**

Vyhlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a všetky informačné zdroje som uviedla v zozname literatúry.

V Prahe dňa 1.9.2010

.....

Marta Zajacová

Práca bola vypracovaná v rokoch 2009 – 2010 na Ústavu obecné biológie a genetiky 3.  
lékařské fakulty Univerzity Karlovy v rámci VZ MŠM: 0021620814.

## **PodĎakovanie**

Tato práca bola vypracovaná na Ústavu obecné biologie a genetiky 3. lekárskej fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Na tomto mieste by som veľmi rada chcela poďakovať svojej školiteľke, Doc. MUDr. Marii Černej, CSc. za teoretické vedenie, nápady, podporu a dôveru.

Veľmi rada by som poďakovala aj Ing. Anne Kotrbovej-Kozak, PhD, za metodické vedenie, ochotu kedykoľvek pomôcť a poradiť, cenné rady a pomoc so spracovaním výsledkov.

Rovnako chcem veľmi poďakovať aj Mgr. Anne Cibulovej za ochotu kedykoľvek pomôcť a poradiť, za pomoc so spracovaním výsledkov i za všestrannú pomoc pri písaní tejto práce.

Ďakujem aj ostatným zamestnancom Ústavu obecné biologie a genetiky za ústretový prístup a príjemné pracovné prostredie, ktoré vytvárali.

V neposlednom rade chcem poďakovať svojej rodine, ktorá ma podporovala nielen pri písaní diplomovej práce, ale počas celého štúdia.

## Abstrakt

ÚVOD: Molekuly HLA hrajú centrálnu úlohu v imunitnej odpovedi. HLA II. triedy sa zúčastňujú selekcie T bunčného repertoáru v týmuse a prezentácie antigénnych peptidov CD4-pozitívnym T lymfocytom. HLA II. triedy fungujú ako reštrikčné prvky v prezentácii antigénov T lymfocytom a ich expresia na povrchu buniek je nutná pre spustenie imunitných odpovedí. Regulácia transkripcie génov HLA II. triedy predstavuje komplexný systém zahŕňajúci "cis-acting" DNA sekvenciu a "trans-acting" proteinové faktory. Bol publikovaný alelový polymorfizmus regulačných oblastí génov HLA II. triedy, DQA1, DQB1 a DRB1. Väčšina polymorfizmov je uchovávaná súhlasne s haplotypom. Hierarchia sekvenčnej homológie, ktorá existuje medzi štrukturálnymi génmi, nie je však obdobná medzi ich promótorovými sekvenciami. Zaujalo nás, že najviac prekvapujúci rozpor bol nalený pre alely viazané k DR4, DQB1\*0301 a DQB1\*0302, ktoré boli popísané ako časté rizikové faktory pre niektoré autoimunitné choroby. Štrukturálne gény týchto dvoch aliel sú najviac príbuzné, ale ich regulačné sekvencie sú najviac odlišné v porovnaní s ostatnými DQB1 alelami. Tieto sekvenčné rozdiely zodpovedajú funkčnej variabilite: promótorová sila DQB1\*0301 alely je trikrát až štyrikrát väčšia než promótorová sila DQB1\*0302 alely. Funkčná rozdielnosť medzi alelami HLA II. triedy môže byť spôsobená aj rozdielnym stupňom metylácie tejto oblasti.

CIELE: Naším cieľom bolo zistiť koreláciu medzi metyláciou CpG dinukleotidov v promótoe génu HLA-DQA1 a genotypom jednotlivých aliel.

METÓDY: Do pilotnej štúdie bolo zaradených 89 zdravých darcov vo veku 25-45 rokov. U nich bola vykonaná genotypizácia aliel HLA II. triedy, DRB1, HLA-DQB1 a HLA-DQA1, pomocou metódy PCR so sekvenčne špecifickými primermi. Genomická DNA darcov bola konvertovaná bisulfitom a cieľový úsek v promótoe génu HLA-DQA1 bol následne amplifikovaný pomocou metódy nested PCR. Produkt bol rozklonovaný do baktérií *Escherichia coli*, kmeň XL-1 Blue. Selekcija úspešných transformantov prebiehala na médiu s ampicilínom, IPTG a X-Gal. Výsledky selekcie boli overené metódou colony PCR. Jednotlivé klony baktérií boli následne osekvenované.

VÝSLEDKY: Bola zistená rozdielna metylácia niektorých CpG miest v skúmanej oblasti: v mieste -639 bola alela QAP 4.1 metylovaná viac než alely QAP 1.1 a 1.3; v mieste -540 bola alela QAP 3.1 metylovaná menej než alely QAP 1.1 a 1.3; v mieste -374 bola alela QAP 1.3 metylovaná menej než ostatné alely; v mieste -139 bola alela QAP 1.2 metylovaná menej než alela QAP 1.4. Rozdiel v celkovom množstve metylovaných CpG miest bol pozorovaný medzi alelou QAP 1.1, v porovnaní s alelami QAP 1.4 a 4.1.

ZHRNUTIE: Bola nájdená korelácia medzi genotypom a epigenotypom promótorových aliel génu HLA-DQA1. Zistené boli rozdiely v celkovej metylácii aliel, i v metylácii jednotlivých CpG dinukleotidov. Ďalej boli popísané nové polymorfne miesta v tejto oblasti.

**Kľúčové slová:** DNA metylácia, polymorfizmus, protomor, HLA-DQA1

## Abstract

**BACKGROUND:** HLA molecules play a central role in the immune response. HLA class II are involved in the selection of the T-cell repertoire in the thymus, and in presentation of antigenic peptides to antigen reactive CD4-positive T cells. The HLA class II act as restriction determinants in the presentation of antigens to T lymphocytes and their expression on the cell surface is necessary for triggering the immune responses. Regulated transcription of HLA class II genes is a complex system involving *cis*-acting sequence elements and *trans*-acting protein factors. It has been reported that allelic polymorphism exists in the regulatory regions of HLA class II DQA1, DQB1 and DRB1 genes. Most of the polymorphisms appear to be conserved within a haplotype. The hierarchy of sequence homology which exists among the structural genes is not paralleled among their promoter sequences. It is of interest that the most striking discrepancy was found for the DR4 linked alleles, DQB1\*0301 and DQB1\*0302, which were described as frequent risk factors for a variety of autoimmune diseases. The structural genes of these two alleles are the most closely related, but their regulatory sequences are the most heterogeneous among DQB1 variants. These sequence differences correspond to functional variation: The promoter strength of the DQB1\*0301 allele is three- to four- fold greater than the comparable one of DQB1\*0302. Another cause of the functional differences between HLA class II alleles might be a different level of methylation of this region.

**AIMS:** We aimed to determine the correlation between methylation of CpG dinucleotides in HLA-DQA1 gene promoter and their genotype.

**METHODS:** 89 healthy donors, age 25-45 years, were included to the pilot study. The genotyping of HLA-DRB1, HLA-DQB1 and HLA-DQA1 was performed using PCR with sequence specific primers. The genomic DNA was converted by bisulfite treatment and the target segment in the promoter of HLA-DQA1 gene was amplified using nested PCR. The PCR product was cloned into *Escherichia coli* (XL-1 Blue). Successful transformants were selected on medium with ampicillin, IPTG and X-Gal. Successful transformation was confirmed by colony PCR. Then sequencing of individual clones was performed.

**RESULTS:** We found differential methylation of some CpG sites in the region studied: at site -639, QAP 4.1 allele was methylated to greater extent than QAP 1.1 and 1.3 alleles; at site -540 QAP 3.1 allele was methylated less than QAP 1.1 and 1.3 alleles; at site -374 QAP 1.3 allele was methylated less than any other allele; at site -139 allele QAP 1.2 was methylated less than QAP 1.4 allele. We observed difference in total count of methylated CpG sites in QAP 1.1 allele compared to QAP 1.4 and 4.1 alleles.

**CONCLUSION:** We found correlation between genotype and epigenotype of promoter alleles of HLA-DQA1 gene. Differences in average methylation of alleles, and also differences in methylation state of individual CpG sites were observed. We also described new polymorphic sites in this region.

**Keywords:** DNA methylation, polymorphism, promoter, HLA-DQA1

# Obsah

<b>Zoznam skratiek</b>	<b>9</b>
<b>1. Literárny úvod</b>	<b>10</b>
1.1. Ľudské leukocytárne antigény (HLA)	10
1.1.1. História	10
1.1.2. Génový komplex HLA	10
1.1.3. Nomenklatúra HLA	14
1.1.4. Štruktúra a funkcia HLA	15
1.1.5. Regulácia HLA	17
1.2. Epigenetická regulácia	19
1.2.1 Metylácia DNA	19
1.2.1.1 DNA-metyltransferázy	19
1.2.1.2 Význam metylácie DNA	20
1.2.1.3 Metyl-CpG viažuce proteíny	21
1.2.1.4 Metylácia DNA a modifikácie histónov	22
1.2.1.5 Vplyv prostredia na metyláciu DNA	23
1.2.1.6 Špecifická metylácia rôznych aliel génu	24
<b>2. Hypotézy a ciele diplomovej práce</b>	<b>25</b>
<b>3. Použitý materiál, bakteriálny kmeň, prístroje a počítačové programy</b>	<b>26</b>
3.1 Chemikálie používané pre jednotlivé metódy	26
3.1.1 Izolácia DNA	26
3.1.2 Genotypizácia HLA	26
3.1.3 Elektroforéza	27
3.1.4 Konverzia DNA bisulfitom	27
3.1.5 Amplifikácia cieľového úseku v bisulfitom oštrenej DNA	27
3.1.6 Izolácia z agarózy a prečistenie produktu	28
3.2 Použitý bakteriálny kmeň, vektor a médium	28
3.2.1 Príprava kompetentných baktérií	29
3.2.2 Príprava kultivačných misiek	29
3.2.3 Ligácia produktu s vektorom a transformácia kompetentných buniek	29
3.3 Všeobecne využívané chemikálie	29
3.4 Použité prístroje	29
3.5 Použité počítačové programy	30
<b>4. Metódy</b>	<b>31</b>

4.1	Subjekt	31
4.2	Izolácia DNA	31
4.3	Genotypizácia HLA molekúl	32
4.4	Analýza metylácie promotorovej oblasti génu DQA1	36
4.4.1	Konverzia DNA bisulfitom	36
4.4.2	Amplifikácia cieľového úseku v bisulfitom ošetrenej DNA	37
4.4.3	Izolácia z agarózy a prečistenie produktu	39
4.4.4	Klonovanie	39
4.4.4.1	Kultivácia baktérií	40
4.4.4.2	Príprava kultivačných misiek	40
4.4.4.3	Príprava kompetentných baktérií	41
4.4.4.4	Ligácia produktu s vektorom a transformácia kompetentných buniek	41
4.4.4.5	Vyhodnotenie kolónií	42
4.4.4.6	Sekvenácia	43
<b>5.</b>	<b>Výsledky</b>	<b>44</b>
5.1	Genotypizácia HLA molekúl	44
5.2	Analýza metylačného stavu promotora génu HLA-DQA1	45
5.2.1	Určenie alely promotora	45
5.2.2	Určenie metylačného stavu jednotlivých aliel	46
5.3	Polymorfizmus promotorovej oblasti	53
<b>6.</b>	<b>Diskusia</b>	<b>57</b>
	<b>Záver</b>	<b>59</b>
	<b>Zoznam použitých obrázkov</b>	<b>60</b>
	<b>Zoznam literatúry</b>	<b>61</b>
	<b>Príloha</b>	<b>67</b>



## Zoznam skratiek

APC	Antigén prezentujúca bunka ( <u>a</u> ntigen- <u>p</u> resenting <u>c</u> ell)
Ap	Ampicilín
bp	Pár báz ( <u>b</u> ase <u>p</u> air)
CIITA	Class II transactivator
CLIP	class II-associated invariant chain peptide
Cm	Chloramfenikol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA-metyltransferáza ( <u>D</u> NA <u>n</u> ucleotid <u>m</u> ethyl <u>t</u> ransferase)
dNTPs	Ekvimolárna zmes štyroch (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 2'-deoxynukleotidov
EDTA	Etyléndiamínotetraoctová kyselina
HLA	Hlavný ľudský histokompatibilný antigén ( <u>h</u> uman <u>l</u> eukocyte <u>a</u> ntigen)
HDAC	Histón-deacetyláza
HAT	Histón-acetyltransferáza
IPTG	Izopropyl $\beta$ -D-1-tiogalaktopyranozid
MBD	Methyl-CpG viažuca doména ( <u>m</u> ethyl-CpG <u>b</u> inding <u>d</u> omain)
MBP	Metyl-CpG viažuca proteína ( <u>m</u> ethyl-CpG <u>b</u> inding <u>p</u> rotein)
MHC	Hlavný histokompatibilný komplex ( <u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex)
NK	Prirodzený zabíjač ( <u>n</u> atural <u>k</u> iller)
OD <sub>590</sub>	Optická denzita meraná pri vlnovej dĺžke $\lambda = 590$
PCR	Polymerázová reťazová reakcia ( <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PCR-SSP	Polymerázová reťazová reakcia so sekvenčne špecifickými primermi
RCLB	Pufer lyzujúci červené krvinky ( <u>r</u> ed <u>c</u> ell <u>l</u> ysis <u>b</u> uffer)
RNA	Ribonukleová kyselina
SDS	Sodium dodecyl sulfát
5'URR	5' upstream regulačná oblasť (5' <u>u</u> pstream <u>r</u> egulatory <u>r</u> egion)
WCLB	Pufer lyzujúci biele krvinky ( <u>w</u> hite <u>c</u> ell <u>l</u> ysis <u>b</u> uffer)
X-Gal	Bromo-chloro-indolyl-galaktopyranozid

## 1. Literárny úvod

### 1.1 Ľudské leukocytárne antigény (HLA)

#### 1.1.1 História

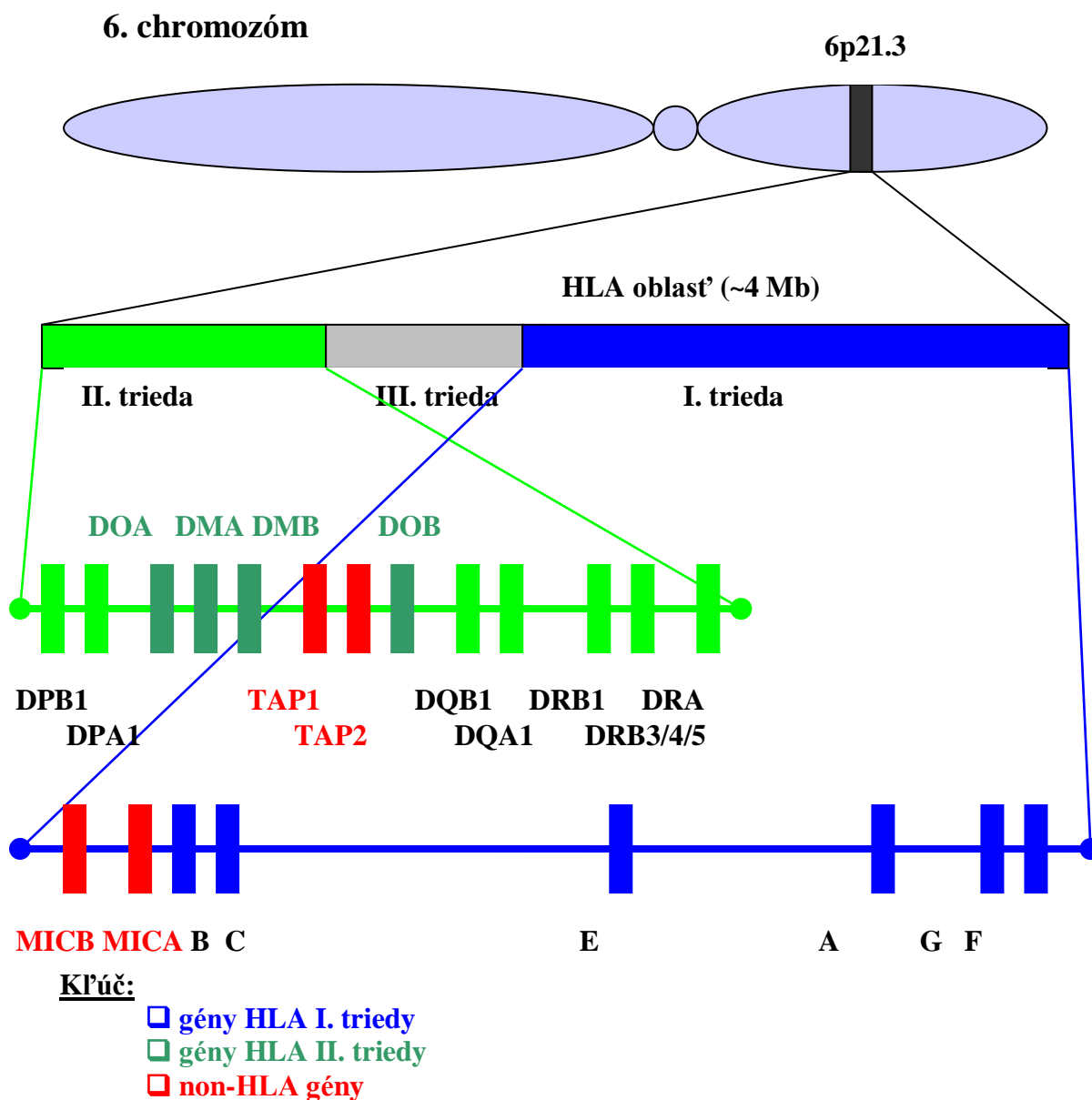
V roku 1956 Jean Dausset po prvýkrát popísal na ľudských leukocytoch histokompatibilné antigény, ktoré boli preto nazvané ľudské leukocytárne antigény (human leukocyte antigens, HLA). Za tento objav získal neskôr Nobelovu cenu. V 60. a 70. rokoch nastáva mohutný rozvoj typizácie HLA systému, a to najmä pre potreby orgánových transplantácií. Zhoda HLA antigénov medzi darcom a príjemcom je nevyhnutnou podmienkou úspešného prijatia orgánového štepu hostiteľom. V 80. a 90. rokoch je postupne sérologická a bunková typizácia nahradzovaná DNA typizáciou (Černá *et al.*, 2002).

Okrem problematiky zhody HLA antigénov pri transplantáciách sa ukázalo, že polymorfizmus týchto molekúl súvisí aj s rôznymi ochoreniami. Prvé správy o asociácii HLA antigénov s chorobami sa objavujú už v 70. rokoch. Spočiatku sú popisované asociácie HLA antigénov I. triedy, neskôr, s rozvojom metodológie, asociácie HLA antigénov II. triedy. Ukazuje sa, že antigény II. triedy predstavujú významne väčší rizikový faktor choroby než antigény I. triedy. Výnimkou je HLA-B27, ktorý má v reumatológii aj diagnostický význam. Mechanizmus, ktorým molekuly HLA II. triedy prispievajú k predispozícii k ochoreniu, má pravdepodobne vzťah k funkcii HLA v imunitnej odpovedi. Molekuly II. triedy sa zúčastňujú selekcie repertoáru T lymfocytov v týmuse a prezentácie antigénnych (patogénnych) peptidov CD4<sup>+</sup> T lymfocytom. Molekuly HLA II. triedy fungujú ako reštrikčný prvok prezentácie antigénov T lymfocytom a ich expresia na povrchu buniek je nevyhnutná pre spustenie imunitných odpovedí (Černá *et al.*, 2002; Babbitt *et al.* 1985; Kappler *et al.* 1987).

#### 1.1.2 Génový komplex HLA

Celý génový komplex HLA sa nachádza na krátkom ramienku chromozómu 6 a patrí k najpolymorfnejším oblastiam ľudského genómu (obr. 1-1). Tento segment DNA je dlhý približne 3,6 Mb a predpokladá sa tu prítomnosť 224 génov. HLA antigény patria do imunoglobulínovej super-rodiny a približne 39,8% génov exprimovaných v rámci tohoto lokusu je nepostrádateľných pre funkciu imunitného systému. Z historického hľadiska bola oblasť HLA rozdelená do troch oblastí: HLA II. triedy (centromerická oblasť), HLA I. a HLA III. triedy (telomerická oblasť). HLA gény kódujú niekoľko izotypov, najdôležitejšími sú HLA molekuly I. triedy (HLA-A, HLA-B, HLA-C) a HLA molekuly II. triedy (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP). Ide o transmembránové molekuly, ktoré viažu a prezentujú antigénne peptidové fragmenty, ktoré sú rozpoznávané imunitným systémom. HLA antigény sú samy osebe antigénne len v prípade, keď sú vystavené cudziemu imunitnému systému, k čomu

dochádza u nehistokompatibilných transplantácií, alebo keď dochádza k autológnym reakciám T lymfocytov, ako sa deje u autoimunitných porúch. Okrem génov HLA I. a II. triedy sa tu nachádzajú gény označované ako HLA molekuly III. triedy, kódujúce molekulárne chaperony (heat-shock proteíny, Hsp 70, HLA-DM), cytokíny (tumor necrosis factor  $\alpha$  a  $\beta$  – TNFA a TNFB), zložky komplementu (C2, C4A, C4B, properdín, faktor B) a enzým 21-hydroxyláza (21A, 21B) (Černá *et al.*, 2000; Kološtová *et al.*, 2002; Černá *et al.*, 2008).

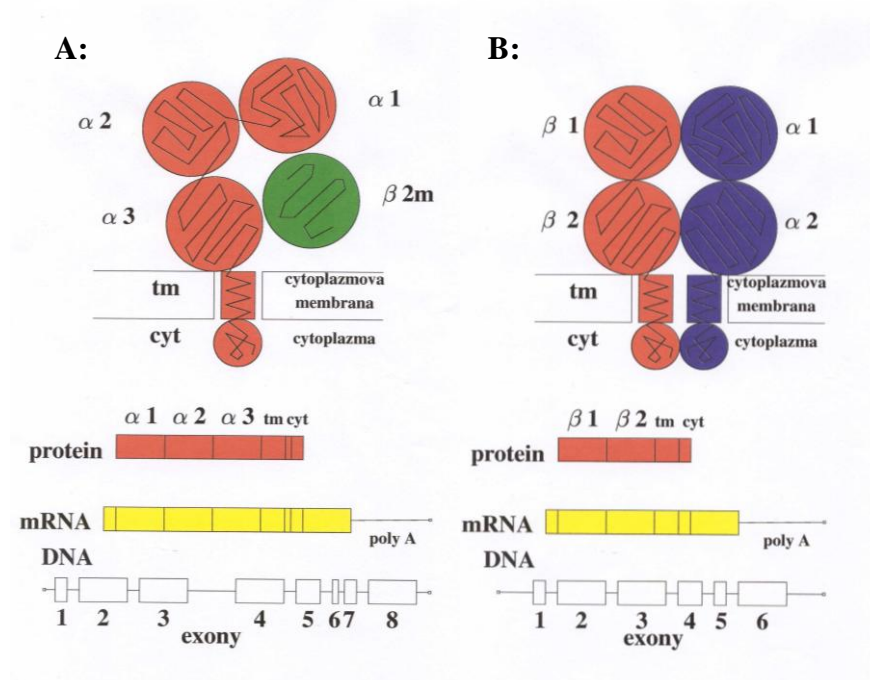


**Obr. 1-1 – Génový komplex HLA.** Komplex HLA sa nachádza na krátkom ramienku 6. chromozómu. Poradie jednotlivých tried HLA je farebne znázornené a popísané v kľúči pod obrázkom.

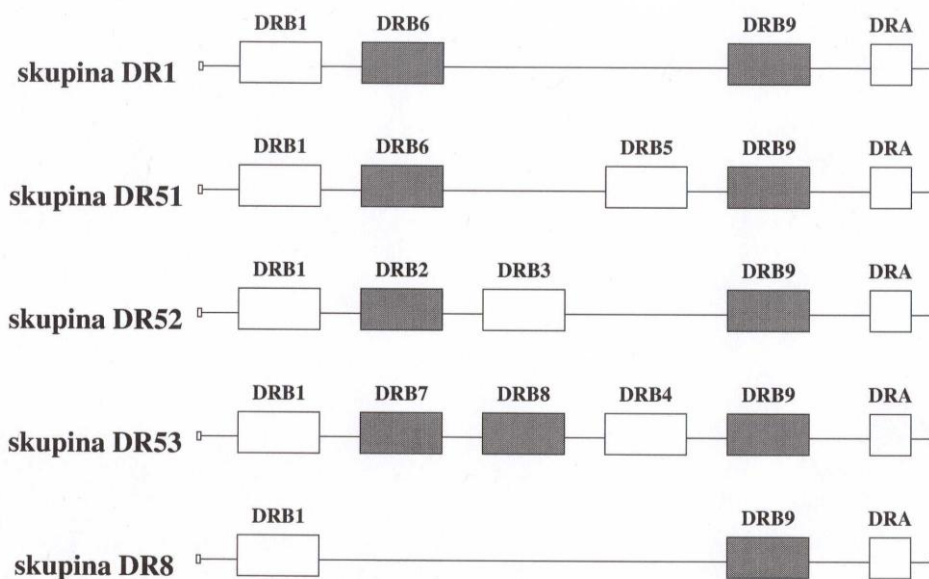
Oblasť HLA I. triedy zahŕňa klasické lokusy A, B, C a neklasické lokusy E, F, G. Každý lokus kóduje jeden polypeptid ( $\alpha$  reťazec) a obsahuje sériu intrónov a exónov, ktoré zodpovedajú doménam transmembránovej molekuly (obr. 1-2a). Lokus je z 25% tvorený

variabilnou časťou (domény  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  = exóny 2 a 3) a zo 75% konštantnou časťou (doména  $\alpha 3$  = exón 4, v transmembránovom a cytoplazmatickom exóne). Klasické lokusy sú podstatne polymorfnejšie než lokusy neklasické: gén B - 1800 aliel, gén A - 1193 aliel, gén C - 829 aliel, gén E - 9 aliel, gén F - 21 aliel, gén G - 46 aliel. V tejto oblasti sa nachádzajú aj ďalšie monomorfne gény nazývané H, J, K, L, ale ich proteínový produkt nebol doposiaľ detegovaný (pseudogény) (Černá *et al.*, 2002).

Oblasť HLA II. triedy zahŕňa lokusy DR, DQ a DP. Každý lokus kóduje dva samostatné peptidy (jeden  $\alpha$  a jeden  $\beta$  reťazec) a každý gén pre polypeptid obsahuje sériu exónov a intrónov, ktoré zodpovedajú doménam transmembránovej molekuly (obr. 1-2b). Najväčší lokus DR je tvorený komplexom 10 génov (obr. 1-3). Hlavný gén DRB1 je najpolymorfnejší, nachádza sa na ňom 809 aliel a je prítomný vo všetkých haplotypoch. Naproti tomu ďalšie gény ako je DRB3 s 52, DRB4 s 14 a DRB5 s 19 alelami sú prítomné len v niektorých haplotypoch. Beta-reťazcový polypeptid týchto génov DRB sa kombinuje s  $\alpha$ -reťazcovým polypeptidom génu DRA (3 alely) a vytvára komplexnú molekulu na povrchu bunky. Ostatné gény (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 a DRB9) sú pseudogény. Polymorfný exón 2 (doména  $\alpha 1$ ) génu DRB1 zahŕňa tri hypervariabilné oblasti, ktoré kódujú aminokyseliny vytvárajúce väzbové miesto pre peptid (1. hypervariabilná oblasť) a T bunkový receptor (2. a 3. hypervariabilná oblasť). Alely génov DQA1 (35 aliel) a DQB1 (112 aliel) sú v silnej väzbovej nerovnováhe s alelami DRB1. Gén DPB1, napriek tomu, že sa na ňom nachádza 141 aliel, je najmenej polymorfný, pretože tieto alely sa líšia len niekoľkými aminokyselinami. Na jeho partnerskom géne DPA1 sa nachádza 28 aliel. Gény, DQB2, DQB3, podobne ako gény DPA2 a DPB2 sú pseudogény príbuzné svojim expresným partnerom (Černá *et al.*, 2002). Gén HLA-DQA2, na rozdiel od génu HLA-DQB2, exprimovaný je (Rudy a Lew, 1997).



**Obr. 1-2** - Všeobecná štruktúra HLA glykoproteínov. **A:** HLA molekula I. triedy; **B:** HLA molekula II. triedy.



**Obr 1.3** – Lokus DR.

Medzi lokusmi DQ a DP sa nachádzajú dva gény kódujúce transmembránové peptidové transportéry TAP1 (7 aliel) a TAP2 (4 alely) a dva proteazómové gény LMP2 a LMP7. Všetky štyri gény sa podieľajú na spracovaní peptidu, ktorý sa viaže na molekulu HLA I. triedy. Enzymové produkty génov LMP2 a LMP7 rozdeľujú antigén na malé peptidy. Produkty génov TAP1 a TAP2 transportujú tieto peptidy do endoplazmatického retikula, kde sa viažu na molekuly HLA I. triedy a spoločne sú potom dopravené cez Golgiho aparát na povrch bunky. Oblasť HLA II. triedy tiež zahŕňa ďalšie gény nazývané DOA (12 aliel), DOB

(9 aliel) a DMA (4 alely), DMB (7 aliel), ktoré kódujú  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcové polypeptidy. Molekuly HLA-DM a HLA-DO sa zúčastňujú v endozomálne-lyzozomálnych kompartmentoch väzby peptidov na molekuly HLA II. triedy (Černá *et al.*, 2002).

### 1.1.3 Nomenklatúra HLA

Nomenklatúra HLA je pomerne zložitá. To je spôsobené tým, že k detekcii antigénov boli počas posledných päťdesiatich rokov používané rôzne techniky a podľa nich dostávali antigény rôzne názvy (tab. 1-1).

V 60. rokoch sa začala používať sérologia. Pomocou nej boli identifikované antigény HLA I. i II. triedy. Antigény sa značili číslom, ktoré bolo dané poradím, v ktorom boli detegované. Mnoho v tej dobe používaných protilátok bolo nešpecifických, a tak rozpoznávali antigénne determinanty (epitopy) niekoľkých rôznych druhov molekúl. Následne sa ukázalo, že je možné sérologicky lepšie rozlíšiť jednotlivé epitopy a to viedlo k prvej korekcii nomenklatúry. Molekuly, ktoré boli predtým rozpoznávané ako zhodné, sa začali rozdeľovať do dvoch a viacerých skupín (napr. DR5 sa rozdelila na DR11 a DR12). Antigény HLA II. triedy boli objavené pomocou zmiešaných lymfocytárnych kultúr (MLR) a spočiatku boli považované za produkt jedného génu „D“. S príchodom nových, modernejších techník, ako je 1D izoelektrická fokusácia proteínov a DNA analýza dĺžkového polymorfizmu restričných fragmentov (restriction fragment length polymorphism) či pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (polymerase chain reaction – PCR), sa výrazne zlepšila schopnosť rozlišovania epitopov, ale opäť sa zvýšila celková komplexnosť názvoslovnia. V posledných rokoch bola tradičná HLA typizácia nahradená DNA sekvenáciou príslušných génov (Novota *et al.*, 2002).

Názvy najmodernejšej nomenklatúry obsahujú meno génu a štyri až osem číslic dlhý kód (v dvoch až štyroch sadách). Každá alela získa štvormiestny kód, ďalšie číslice sú pridané len ak je to potrebné. Prvé dvojčíslicie určuje typ alely, ktorý korešponduje so sérologickou špecifitou antigénu. Ďalšie dvojčíslice určujú podtyp alely. Alely, ktoré sa líšia v prvých štyroch číslach, obsahujú jednu či viac nukleotidových substitúcií meniacich sekvenciu aminokyselín v kódovanom proteíne. Ak ide o synonymnú nukleotidovú substitúciu bez zmeny sekvencie aminokyselín, doplní sa tretia sada dvojčíslic. Štvrtá a posledná sada dvojčíslic dopĺňa číselný kód v prípade, že sú alely polymorfne len v nekódujúcich oblastiach (Robinson *et al.*, 2009, <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>).

**Tab. 1-1** – Nomenklatura HLA-DR. Vytvorená na základe typizačných techník.

HLA-DR alely definované DNA analýzou	HLA-DR antigény definované protilátkou		HLA-D špecifity definované T lymfocytmi
	pôvodné	nové	
DRB1*0101	DR1	DR1	Dw1
DRB1*0102	DR1	DR1	Dw20
DRB1*0103	DR1	DR'BR'	Dw'BON'
DRB1*1501	DR2	DR15	Dw2
DRB1*1502	DR2	DR15	Dw12
DRB1*1601	DR2	DR16	Dw21
DRB1*1602	DR2	DR16	Dw22
DRB1*0301	DR3	DR17	Dw3
DRB1*0302	DR3	DR18	Dw'RSH'
DRB1*0401	DR4	DR4	Dw4
DRB1*0402	DR4	DR4	Dw10
DRB1*0403	DR4	DR4	Dw13
DRB1*0404	DR4	DR4	Dw14
DRB1*0405	DR4	DR4	Dw15
DRB1*0406	DR4	DR4	Dw'KT2'
DRB1*0407	DR4	DR4	Dw13
DRB1*0408	DR4	DR4	Dw14
DRB1*1101	DR5	DR11	Dw5
DRB1*1102	DR5	DR11	Dw'JVM'
DRB1*1103	DR5	DR11	-
DRB1*1104	DR5	DR11	Dw'FS'
DRB1*1201	DR5	DR12	Dw'DB6'
DRB1*1301	DRw6	DR13	Dw18
DRB1*1302	DRw6	DR13	Dw19
DRB1*1303	DRw6	DR13	Dw'HAG'
DRB1*1401	DRw6	DR14	Dw9
DRB1*1402	DRw6	DR14	Dw16
DRB1*0701	DR7	DR7	Dw17
DRB1*0702	DR7	DR7	Dw'DBI'
DRB1*0801	DRw8	DR8	Dw8.1
DRB1*0802	DRw8	DR8	Dw8.2
DRB1*0803	DRw8	DR8	Dw8.3
DRB1*0901	DR9	DR9	Dw23
DRB1*1001	DRw10	DR10	-

#### 1.1.4 Štruktúra a funkcia HLA molekúl

Molekula HLA I. a II. triedy je po chemickej stránke charakterizovaná ako transmembránový glykoproteín (obr. 1-2), pričom štruktúra antigénu I. triedy sa líši od štruktúry antigénu II. triedy.

Molekula HLA I. triedy je heterodimér, ktorý sa skladá z glykozylovaného ťažkého peptidového  $\alpha$  reťazca (45 kDa) nekovalentne asociovaného s  $\beta_2$ -mikroglobulínom (12 kDa). Na  $\alpha$  reťazci sa rozlišujú tri globulárne domény:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ . Distálne domény  $\alpha_1$  a  $\alpha_2$  tvoria platformu 8 antiparalelných  $\beta$ -listov a 2  $\alpha$ -helixov (vzdialených približne 10-18 Å), ktoré ohraničujú žliabok – väzbové miesto pre peptid. Pretože má väzbové miesto pevné hranice, môžu naň nasadať len peptidy, ktoré zodpovedajú jeho veľkosti, to znamená peptidy obsahujúce 8 – 10 aminokyselín (Černá, 2002; Kološtová *et al.*, 2002; Hořejší a Bartůňková, 2009;).

Molekula HLA II. triedy je heterodimér, ktorý sa skladá z ťažkého ( $\alpha$ ) a ľahkého ( $\beta$ ) glykoproteínového reťazca, spojených navzájom nekovalentnou väzbou. Molekulová hmotnosť  $\alpha$ -reťazca je 30-34 kDa,  $\beta$ -reťazca 26-29 kDa, čo závisí od konkrétneho lokusu.

Početné dôkazy svedčia o podobnosti, respektíve zhode  $\alpha$  a  $\beta$  reťazcov po stránke štrukturálnej, rozdiel v molekulovej hmotnosti medzi  $\alpha$  a  $\beta$ -reťazcami je dôsledkom rozdielnej glykozylácie. Na oboch reťazcoch sa rozlišujú dve globulárne domény:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  a  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ . Distálne domény  $\alpha 1$  a  $\beta 1$  tvoria opäť platformu 8 antiparalelných  $\beta$ -istov a 2  $\alpha$ -helixov ohraničujúcich žliabok – väzbové miesto pre peptid. Žliabok je blokovaný invariantným reťazcom, ktorý pomáha smerovať molekulu HLA II. triedy najskôr do Golgiho aparátu a následne na endozomálnu/lyzozomálnu cestu. Tam je proteolyticky štiepený, kým z neho nezostane len CLIP – class II-associated invariant chain peptide. Špeciálny lyzozomálny chaperon HLA-DM potom katalyzuje výmenu CLIPu za stabilne sa viažuci antigénny peptid. Väzbové miesto nie je ohraničené ako u HLA I. triedy, preto sa doň môžu viazať peptidy rôznych dĺžok, najčastejšie však ide o peptidy dlhé 15-35 aminokyselín. Ak je peptid dlhší než väzbové miesto, jeho konce prečnievajú, alebo sa do väzbového miesta priložia konce peptidu a stred je vypuklý (Hořejší a Bartůňková, 2009; Černá, 2002).

Kryštalická štruktúra antigénu potvrdila prítomnosť difúznej hustoty práve v mieste žliabku, na čom sa zakladá tvrdenie o prítomnosti väzbového miesta pre spracované antigény a antigénový receptor T lymfocytu (TCR). Toto tvrdenie je založené aj na zistení najväčšieho počtu polymorfných miest práve v oblasti žliabku. Zámena aminokyselín práve v týchto polymorfných miestach vedie k dramatickej zmene tvaru celého žliabku a viažuceho sa peptidu. Žliabok nie je hladkou štruktúrou, pretože postranné reťazce aminokyselín navzájom interagujú a môžu vytvárať vrecká (pockets). Zámeny aminokyselín na týchto pozíciách tiež značne ovplyvnia afinitu k spracovávanému peptidu. Antigénový receptor T lymfocytu rozpoznáva ako peptid, tak aj molekulu HLA (Černá, 2002; Kološtová *et al.*, 2002; Hořejší a Bartůňková, 2009;).

Molekuly HLA sa zúčastňujú prezentácie peptidových antigénov na bunkovom povrchu. Táto väzba umožňuje T lymfocytom, aby peptid rozpoznali pomocou svojich receptorov (TCR) a prípadne zahájili imunitnú reakciu proti bunke.  $CD4^+$  T lymfocyty reagujú s HLA II. triedy, ktoré na svojom povrchu prezentujú extracelulárne peptidy (bakteriálne peptidy či autoantigény). Peptidy asociujú s HLA až v endozómoch tým, že nahradia invariantný reťazec.  $CD8^+$  T lymfocyty reagujú s HLA I. triedy. Tie na svojom povrchu viažu intracelulárne peptidy (vírusové či nádorové). K asociácii HLA I. triedy s peptidmi dochádza už v endoplazmatickom retikule (Hořejší a Bartůňková, 2009).

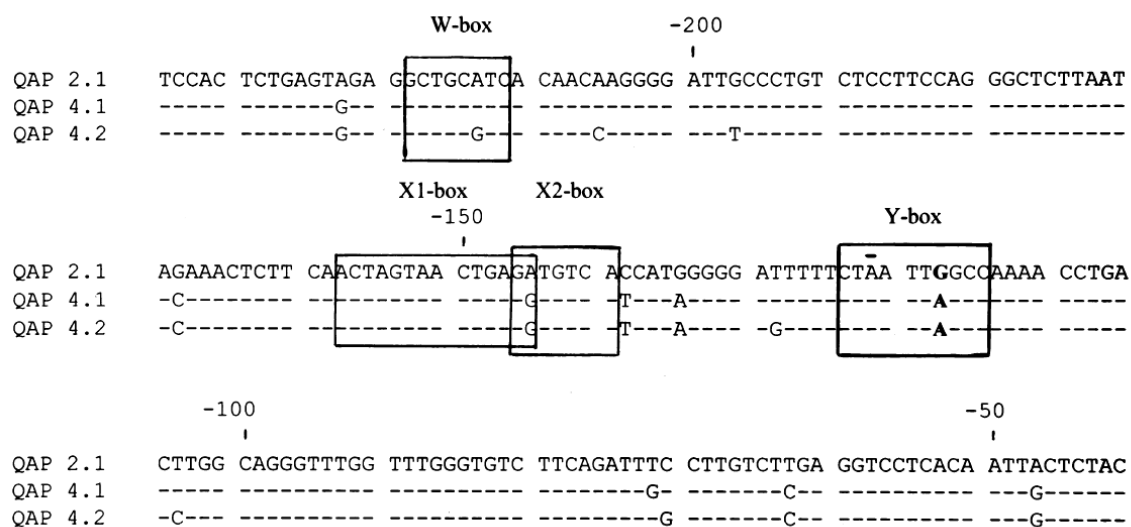


Molekuly HLA I. triedy sú exprimované na všetkých jadrových bunkách s výnimkou neurónov. Molekuly HLA II. triedy sú exprimované len na antigén prezentujúcich bunkách (APC) – ako sú dendritické bunky, makrofágy, monocyty, B lymfocyty a aktivované T lymfocyty. Ďalej sa môžu objaviť na všetkých ostatných bunkách organizmu, okrem trofoblastu, po stimulácii cytokínmi, hlavne interferénom- $\gamma$ . Zvláštny výskyt, ktorý je daný ich špeciálnou funkciou – navodením imunitnej tolerancie, majú neklasické molekuly HLA I. triedy. HLA-G antigény boli detegované na extravilóznom cytotrofoblaste, kde chránia bunky plodu pred NK-bunkami (natural killer cells) matky (Kološtová *et al.*, 2002; Ting a Trowsdale, 2002; Hořejší a Bartůňková, 2009).

### 1.1.5 Regulácia expzie HLA molekúl

Regulácia expzie molekúl, teda kedy a na akej bunke sa objavia molekuly HLA, je riadená na niekoľkých úrovniach: na úrovni transkripčnej, translačnej a posttranslačnej. Regulácia transkripcie génov HLA predstavuje komplexný systém, v ktorom sa na *cis*-pôsobiacej DNA promótorovej regulačnej oblasti, nachádzajúcej sa na začiatku každého génu, viažu *trans*-pôsobiacie regulačné proteíny (Sullivan a Peterlin, 1987; Benoist a Mathis, 1990; Glimcher a Kara, 1992). *Cis*-pôsobiacie DNA promótorové regulačné oblasti v sebe zahŕňajú nasledujúce boxy: všeobecné TATA, CCAAT a špecifické Y, X, W, Z (obr. 1-4).

Zaujímavé je, že alelický polymorfizmus existuje nielen u génov HLA II. triedy, ale aj u ich promótorových oblastí. Bol zistený polymorfizmus u URR génov DRA (Sherman *et al.*, 1987), DRB1 (Singal *et al.*, 1993; Perfetto *et al.*, 1993), DQA1 (Del Pozzo *et al.*, 1992; Morzycka *et al.*, 1993; Haas *et al.*, 1994) a DQB1 (Andersen *et al.*, 1991; Reichstetter *et al.*, 1994). Väčšina polymorfizmov je uchovávaná súhlasne s haplotypom.



**Obr. 1-4** – Regulačné sekvencie v promótore génu HLA-DQA1. Porovnanie regulačných sekvencií u vybraných typov promótorov tohto génu. Oblasti W, X1, X2 a Y sú zvýraznené pomocou rámečka.

Hierarchia sekvenčnej homológie, ktorá existuje medzi DQB1 štruktúrnymi génmi, nemá obdobu medzi ich promótorovými sekvenciami. Najviac prekvapujúci rozpor bol nájdený pre alely viazané k DR4, DQB1\*0301 a DQB1\*0302. Sekvencie týchto dvoch aliel sú najviac príbuzné, ale ich regulačné sekvencie sú najviac odlišné v porovnaní s ostatnými DQB1 variantami. Tieto sekvenčné rozdiely zodpovedajú funkčnej variabilite: promótorová sila DQB1\*0301 alely je trikrát až štyrikrát väčšia než DQB1\*0302 alely (Andersen *et al.*, 1991; Shewey *et al.*, 1992).

Polymorfizmus v oblasti promótorovej sekvencie (nazývanej QAP) bol popísaný aj u aliel DQA1. Je zaujímavé, že istá skupina promótorov týchto aliel je voči určitým alelám génu DQA1 "promiskuitná", to znamená, že jedna alela génu môže byť vo väzbe s rôznymi promótorami a naopak rôzne alely génu môžu byť vo väzbe s rovnakým promótorom. (Brünnler *et al.*, 1997). V súvislosti s polymorfizmom v promótorovej oblasti bola popísaná asociácia s ochoreniami autoimunitného charakteru (Haas *et al.*, 1995). Je pravdepodobné, že tieto polymorfizmy sa môžu podieľať na miere expresie HLA molekúl (Morzycka *et al.*, 1997).

Funkčná rozdielnosť medzi URR rôznych aliel jednotlivých HLA molekúl môže byť spôsobená aj rozdielnym stupňom metylácie DNA v tejto oblasti. Bolo preukázané, že metylácia spôsobuje nižšiu expresiu génov (Razin a Riggs, 1980; Holliday, 1987; Scholl *et al.*, 1992). Nižší stupeň metylácie promótorovej DNA bol popísaný u aliel DQB1\*0201 (v haplotype s alelou DRB1\*0301), DQB1\*0301 (v haplotype s DR5), DQB1\*0301 (v haplotype s niektorými DR4) a u DQB1\*0302 a DQB1\*0303 (vo všetkých haplotypoch) oproti ostatným alelám (Toyoda *et al.*, 1992).

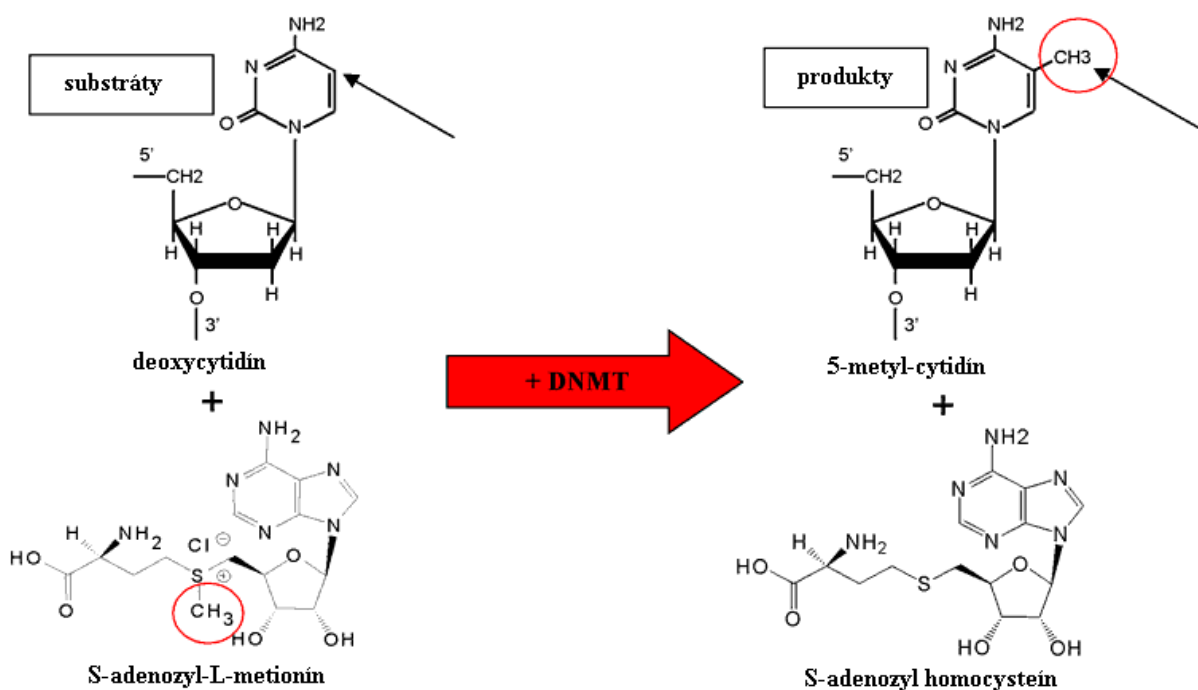
Alelová variabilita regulačných oblastí pravdepodobne ovplyvňuje formovanie  $\alpha\beta$  heterodimérov a ich úrove expresie na povrchu bunky. Je možné, že rozdielna expresia HLA molekúl následne vedie ku kvalitatívnym rozdielom v ich schopnosti viazať a prezentovať peptidy. Konečným dôsledkom regulačného alelového polymorfizmu teda môže byť predispozícia k autoimunitnému ochoreniu daná expresiou určitých HLA  $\alpha\beta$  reťazcov v určitom množstve.

## 1.2 Epigenetická regulácia

Epigenetika zahŕňa dedičné zmeny v génovej expresii a chromatine bez zmien v sekvencii DNA. Hlavnými epigenetickými mechanizmami sú metylácia DNA, kovalentné posttranslačné modifikácie histónov a umlčanie génov sprostredkované pomocou RNA. Rôzne modifikácie chromatinu sú navzájom späté a ovplyvňujú sa. Dôležitý je najmä vzťah medzi DNA metyláciou a acetyláciou a metyláciou histónov (Vaissière *et al.*, 2008).

### 1.2.1 Metylácia DNA

Jednou z epigenetických modifikácií u eukaryot je metylácia DNA. Ide o kovalentné pripojenie metylovej skupiny na piaty uhlík cytozínu v sekvencii CpG (obr. 1-5). Táto sekvencia je palindromická – tj. na oboch párujúcich reťazcoch je sekvencia CpG a metylované bývajú oba párujúce CpG dinukleotidy (Klose a Bird, 2006).



Obr. 1-5 – Reakčná schéma metylácie DNA. DNA-metylačná reakcia je katalyzovaná DNA-metyltransferázou. Metylová skupina S-adenozyl-L-metionínu je prenesená na piaty uhlík cytozínu.

#### 1.2.1.1 DNA-metyltransferázy

Prenos metylovej skupiny z donora S-adenozyl metionínu (SAM) na DNA vykonávajú enzýmy DNA-metyltransferázy (DNA nucleotid methyltransferase, DNMT).

DNMT1 je “udržiavacia“ metyltransferáza, pridáva metyl na cytozín v hemimetylovaných CpG dinukleotidoch pri replikácii, kedy je asociovaná s replikačnou vidličkou, a pri opravách DNA. DNMT3a a DNMT3b sú *de novo* metyltransferázy, rozoznávajú a metylujú sekvencie,

v ktorých žiadny z párujúcich CpG dinukleotidov metylovaný nie je. Štruktúrne podobný im je proteín DNMT3L, ktorému ale chýbajú konzervované zvyšky potrebné pre katalytickú aktivitu aj DNA-väzbová doména. Namiesto toho funguje ako regulačný proteín – prostredníctvom svojej C-terminálnej domény asociuje s C-terminálnou (katalytickou) doménou DNMT3a a DNMT3b a zvyšuje ich metylačnú aktivitu. U DNMT3a to dosahuje stabilizáciou konformácie aktívneho miesta. Rozdelenie DNMTs na *de novo* a “udržiavacie“ metyltransferázy však zrejme nie je úplne striktné – preferencia hemimetylovaných miest voči miestam nemetylovaným DNA-metyltransferázou-1 nie je výrazná (preto spolupracuje s pomocnými proteínmi ktoré ju smerujú na miesto určenia) a je možné, že DNMT3a a 3b sa podieľajú aj na “udržiavacej“ metylácii DNA (Cheng a Blumenthal, 2008; Vaissière *et al.*, 2008; Cheng a Blumenthal, 2010).

DNMT3a a 3b sú do istej miery redundantné, nie však úplne – každá z nich má aj svoje jedinečné metylačné ciele. To môže mať pôvod aj v preferencii rôzneho substrátu – DNMT3a preferuje sekvenciu RCGY (kde R = A alebo G a Y = C alebo T) a metyluje CpG miesta v DNA spájajúcej nukleozómy v neprítomnosti histónu H1, kým DNMT3b uprednostňuje sekvenciu YCGR a metyluje DNA navinutú na históny (Lan *et al.*, 2010).

DNMT3a tvorí diméry s DNMT3L a tie môžu ďalej dimerizovať a vytvoriť tetraméry DNMT3L-3a-3a-3L, čím sa dve aktívne miesta DNMT3a dostanú do pozície, v ktorej sa obe môžu viazať do veľkého žliabku DNA vo vzájomnej vzdialenosti 8-10 párov báz (bp). Podľa tohto modelu by takéto komplexy preferenčne metylovali CpG miesta vzdialené 8-10 párov báz a táto periodicita v metylácii bola skutočne pozorovaná. (Cheng a Blumenthal, 2010)

### 1.2.1.2 Význam metylácie DNA

Metylácia DNA spolu s modifikáciami histónov hrá dôležitú úlohu v modulácii štruktúry chromatinu, kontrole génovej expresie a mnohých ďalších procesoch závislých na chromatíne. Väčšina CpG dinukleotidov v genóme cicavcov je metylovaná. Pre reguláciu expresie génu má význam metylácia v regulačných oblastiach i v tele génu.

Metylácia v tele génu znižuje schopnosť RNA polymerázy II prepisovať daný gén na úrovni nasadania RNA polymerázy, iniciácie transkripcie, ktorá vyžaduje lokálnu deacetyláciu histónov, ako aj elongácie.

Pre reguláciu iniciácie transkripcie je však dôležitý najmä metylačný stav regulačných oblastí (v promótoch či 1.intróne) daného génu, pričom metylácia promótoch je asociovaná s umlčaním génu. Existujú 2 základné modely, popisujúce mechanizmus tejto asociácie: DNA metylácia môže priamo fyzicky blokovať prístup transkripčných koaktivátorov na nimi

rozpoznávané sekvencie, alebo je táto modifikácia rozpoznávaná metyl-CpG-viažucimi proteínmi, ktoré navodia represívny stav chromatinu.

K umlčaniu expresie prispievajú aj samotné DNA-metyltransferázy, ktoré interagujú s histón-acetyltransferázami a histón-metyltransferázami. DNA metylácia je ďalej zodpovedná za genomický imprinting, potlačenie transponovateľných a retrovírusových elementov v genóme cicavcov a uplatňuje sa pri inaktivácii X chromozómu. Umožňuje taktiež vytvorenie a udržanie rozdielnych vzorov génovej expresie v rôznych bunkových typoch (Klose a Bird, 2006; Cheng a Blumenthal, 2008; Vaissière *et al.*, 2008).

### 1.2.1.3 Metyl-CpG viažuce proteíny

Na interpretácii DNA metylácie sa podieľajú metyl-CpG viažuce proteíny (methyl-CpG binding proteins, MBP) identifikované na prelome 80. a 90. rokov, ktoré špecificky rozpoznávajú metylované CpG dinukleotidy pomocou methyl-CpG binding domény (MBD). Výnimkami sú proteín Kaiso, ktorý rozpoznáva metylovanú DNA pomocou domén s motívom zinkového prsta (zinc finger) a proteíny, ktoré na rozpoznanie využívajú SRA doménu (SET- and RING-associated, SRA).

Všetky MBP asociujú s korepresorovými komplexami, ktoré modifikujú chromatin a tým sprostredkujú umlčanie génovej expresie.

Strata metylácie DNA vedie k smrti v embryonálnom období, kým knock-out génov pre MBP má oveľa miernejšie fenotypické prejavy, MBP sú teda do veľkej miery redundantné.

Medzi proteíny s MBD doménou patria MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 a MeCP2.

MBD2 je spolu s chromatin-remodelujúcim komplexom NuRD/Mi2 (nucleosome remodelling and histone deacetylation – obsahuje napríklad históndeacetylázy 1 a 2) súčasťou komplexu MeCP1 (methyl-CpG binding protein 1), ktorý sa účinne viaže na husto metylované CpG miesta a transkripciu potláča v závislosti na hustote DNA metylácie. Podieľa sa napríklad na umlčaní génu pre IL-4 v neindukovanom stave.

MeCP2 sa skladá z MBD a z domény potlačujúcej transkripciu. Jeho aktivita je závislá na asociácii s históndeacetylázami. Rozpoznáva metylované CpG miesta lemované sekvenciou štyroch nukleotidov A alebo T. Tvorí komplex s DNMT1 a zúčastňuje sa tak aj “udržiavacej“ metylácie DNA, a je možné, že funguje aj ako regulátor alternatívneho zostrihu pre-mRNA. Jeho mutácie sú príčinou Rettovho syndrómu.

MBD3 obsahuje aminokyselinové zámény, vďaka ktorým sa nedokáže viazať na mCpG, napriek tomu je zložkou korepresorového komplexu NuRD. Tento komplex môže byť privolaný k DNA rôznymi represorovými proteínmi, a úloha MBD3 v ňom je nejasná.

MBD4 je jediný z rodiny MBD proteínov, ktorý zrejme nemá funkciu v represii transkripcie, ale miesto toho sa zúčastňuje opravy chýb sekvencie DNA, spôsobených spontánnou deamináciou 5-metylcytozínu na tymín. MBD4 sa síce viaže na symetricky metylované CpG miesta, ale väčšiu afinitu má pre nesprávne párujúci pár báz 5mCpG/TpG, z ktorého pomocou glykozylázovej domény odstraňuje tymín. T/G páry sú teda preferenčne opravované na páry C/G, ale tento proces je nedokonalý a tranzície C→T či G→A tvoria viac než 20% všetkých substitúcií, ktoré sú príčinou genetických chorôb u človeka.

Kaiso sa preferenčne viaže na metylovanú sekvenciu CGCG, ale rozpoznáva i špecifickú sekvenciu , ktorá neobsahuje CpG. Asociuje s N-CoR korepresorovým komplexom, ktorého súčasťou sú i histón-deacetylázy.

UHRF1 sa viaže na hemimetylovanú DNA prostredníctvom SRA domény a privádza k nej DNMT1. (Hendrich a Tweedie, 2003; Klose a Bird, 2006; Cheng a Blumenthal, 2008; Lan *et al.*, 2010).

#### 1.2.1.4 Metylácia DNA a modifikácie histónov

Históny sú posttranslačne modifikované na špecifických aminokyselinových zvyškoch v N-koncovej časti histónov.

Acetylácia histónov je reverzibilná modifikácia lyzínov kontrolovaná histón-acetyltransferázami (HAT) a histón-deacetylázami (HDAC), ktoré typicky fungujú ako transkripčné koaktivátory (HAT) a korepresory (HDAC). Deregulácia acetylácie histónov, podobne ako deregulácia metylácie DNA, môže viesť k aberantnej génovej expresii a tumorigenéze.

Acetyláciu histónov nájdeme v nízkej miere vo väčšine genómu, ako výsledok rovnováhy medzi činnosťou HAT a HDAC. Pri kontrole aktivity génu sa uplatňuje acetylácia histónov v jeho promótoch. S aktívnou transkripciou génu je spojená zvýšená acetylácia histónov H3 a H4. Odstránenie acetylovej skupiny spôsobí stlačenie chromatinu a represiu transkripcie génu. Nízka úroveň acetylácie môže indukovať ďalšie epigenetické modifikácie, vrátane metylácie DNA. Zároveň acetylácia histónov chráni DNA pred metyláciou, a naopak, metylácia DNA bráni acetylácii histónov. Ktorá z týchto modifikácií nastáva ako prvá, je neznáme, a existujú dôkazy podporujúce obe tvrdenia.

Ďalším druhom modifikácie je metylácia histónov. Lyzíny a arginíny môžu byť upravené pridaním jednej až troch metylových skupín. Metylácia DNA je silne asociovaná s metylačným stavom lyzínu 4 a lyzínu 9 na históne H3 (H3K4 a H3K9) – konkrétne, prítomnosť metylácie DNA je spojená s neprítomnosťou metylácie H3K4 a prítomnosťou

metylácie H3K9. Aj spustenie expresie génu je spojené so zvýšením množstva trimetylovaného H3K4 (H3K4me3) a znížením H3K9me3 v promótorovej oblasti.

Hlavným spojením metylácie histónov s metyláciou DNA sú DNMT proteíny. DNMTL prostredníctvom svojej ADD domény špecificky interaguje s aminokoncom H3, ale len v prípade, že je tento nemetylovaný. Funguje teda ako senzor metylácie H3K4 – a v prípade neprítomnosti metylácie tohto histónu indukuje *de novo* metyláciu DNA. Otázkou však je, do akej miery sa tento mechanizmus uplatňuje v somatických bunkách, pretože DNMT3L je v nich exprimovaná veľmi slabo, ak vôbec. V tomto prípade by sa mohla uplatniť DNMT3a, ktorá dokáže rozpoznávať nemetylovaný H3K4 (opäť prostredníctvom ADD domény) aj nezávisle na DNMTL.

Spojenie metylácie H3K9 s metyláciou DNA sprostredkuje vyššie zmienený proteín UHRF, ktorý okrem DNMT1 (a dokonca aj DNMT3a a 3b) a hemimetylovaných miest viaže aj metylovaný H3K9.

Zaujímavé je, že distribúcia niektorých modifikácií na géne nie je rovnomerná, napríklad vysoké hladiny H3K36me3 spojené s expresiou génu sa nachádzajú len v niektorých jeho exónoch (Chou a Tomasi, 1998; Cheng a Blumenthal, 2010).

Ako spojka medzi modifikáciami histónov a expresiou HLA II. triedy funguje transkripčný koaktivátor CIITA. Ten nielenže asociuje s histón-acetyltransferázami, ale aj sám ako HAT funguje. Dôležitosť tejto funkcie podčiarkuje skutočnosť, že MHC II gény môžu byť indukované inhibítorom HDAC Trichostatínom A (TSA) aj v neprítomnosti CIITA (Chou a Tomasi, 1998; Reith *et al.*, 2005; Vaissière *et al.*, 2008).

#### **1.2.1.5 Vplyv prostredia na metyláciu DNA**

Vzor metylácie DNA sa ustanovuje v ranom štádiu ontogenézy. V ryhujúcom sa vajíčku je metylačný vzor z veľkej časti vymazaný a opätovne sa ustanovuje po implantácii. Rozsah *de novo* metylácie postupne počas diferenciácie klesá, a v postgastrulačnom období je zriedkavá, nie však neprítomná. Už samotné starnutie organizmu je spojené s hypometyláciou repetitívnych sekvencií a hypermetyláciou CpG ostrovov asociovaných s niektorými génmi.

Ďalej sa uplatňuje expozícia rôznym faktorom prostredia. Zmeny v metylácii DNA spôsobujú napríklad kovy ako nikel, arzén alebo kadmium – kadmium je inhibítor rôznych enzýmov, vrátane DNA-metyltransferáz, arzén zase spôsobuje nedostatok SAM, ktorý je potrebný pre jeho metabolizmus. Globálnu hypometyláciu DNA spôsobuje aj dlhodobé vystavenie UV žiareniu, ako bolo pozorované na myšiach. Je možné, že metyláciu DNA ovplyvňujú aj zložky stravy, ktoré môžu poslúžiť ako donor metylovej skupiny, napríklad folát. Tomu nasvedčuje aj zistenie, že v potomstve myších samičiek kŕmených v tehotenstve

stravou bohatou na donory metylu, je vyššie zastúpenie jedincov, schopných metylovať IAP retrovírusový element, než v potomstve samičiek kŕmených štandardnou stravou. Zvýšená metylácia tohto elementu bola dokonca pozorovaná aj u vnúchat pôvodných samičiek (Wolff *et al.*, 1998; Jaenisch a Bird, 2003; Vaissière *et al.*, 2008).

#### **1.2.1.6 Špecifická metylácia rôznych aliel génu**

Rozdielna expresia dvoch aliel jedného génu, pohybujúca sa v rozmedzí miernej nadexpresie až výhradnej expresie jednej alely, bola popísaná viacerými autormi aj u neimprintovaných génov (Lo *et al.*, 2003; Britten *et al.*, 2009; Ghotbi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Keďže bola skúmaná relatívna expresia dvoch aliel vo vzorkách od jedného jedinca, vplyv *trans* pôsobiacich faktorov je minimalizovaný a zistené rozdiely sú zrejme dôsledkom faktorov pôsobiacich v *cis*, ako sú napríklad polymorfizmy v promótorovej oblasti. Ďalšou reálnou možnosťou je, že sa tieto polymorfizmy premietnu do rozdielnej metylácie jednotlivých aliel. Bola pozorovaná rozdielna metylácia dvoch aliel jedného génu korelujúca so sekvenciou danej alely, aj asociácia tejto rozdielnej metylácie s expresiou danej alely (Kerker *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Ghotbi *et al.*, 2009). Tento jav sa môže týkať až 10% génov genómu človeka (Zhang *et al.*, 2009). Rozdielna metylácia aj relatívna expresia jednotlivých aliel bola pozorovaná aj pre gény HLA II. triedy (Toyoda *et al.*, 1992; Britten *et al.*, 2009).



## **2. Hypotézy a ciele diplomovej práce**

Cieľom diplomovej práce, ktorý vychádza z hypotézy, že medzi alelami HLA II. triedy existuje epigenetická variabilita, je stanoviť charakter metylácie DNA jednotlivých aliel génov HLA-DQA1 v leukocytoch periférnej krvi u skupiny zdravých darcov.

Tento cieľ som dosiahla pomocou dvoch základných metodologických postupov:

- 1) Genotypizácia aliel HLA II. triedy pomocou PCR so sekvenčne špecifickými primermi.
- 2) Analýza metylácie promótorov aliel DQA1 génu bisulfitovou metódou s následnou sekvenáciou.

### 3. Použitý materiál, bakteriálny kmeň, prístroje a počítačové programy

#### 3.1 Chemikálie používané pre jednotlivé metódy

##### 3.1.1 Izolácia DNA

###### QIAmp DNA Blood mini kit (QIAGEN):

Qiagen Protease a Protease solvent zmiešané podľa návodu výrobcu

Pufer AL

Pufry AW1 a AW2 zmiešané s predpísaným množstvom etanolu (96%)

Pufer AE (10 mM Tris·Cl; 0,5 mM EDTA; pH 9,0)

Izolácia DNA vysol'ovacou metódou:

###### RCLB (Red Cell Lysis Buffer):

320 mM sacharóza (Sigma Aldrich)

1% (v/v) Triton X-100 (Sigma Aldrich)

12 mM Tris-HCl pH=7,5 (Sigma Aldrich)

5 mM MgCl<sub>2</sub> (SERVA)

skladovať pri 4°C

###### WCLB (White Cell Lysis Buffer):

120 mM EDTA pH=8 (lekáreň FNKV)

375 mM NaCl (SERVA)

skladovať pri 4°C

Proteinase K from *Tritirachium album* 30 units/mg (Sigma Aldrich)

10% SDS alebo 20% SDS (Sigma Aldrich)

6M NaCl (SERVA)

100% etanol

70% etanol

dH<sub>2</sub>O

##### 3.1.2 Genotypizácia HLA

Olerup SSP<sup>TM</sup> DR low resolution (GenoVision)

Olerup SSP<sup>TM</sup> DQ low resolution (GenoVision)

Olerup SSP<sup>TM</sup> DQB1\*02 (GenoVision)

Olerup SSP<sup>TM</sup> DQB1\*03 (GenoVision)

*Olerup* SSP™ DQB1\*04 (GenoVision)

*Olerup* SSP™ DQB1\*05 (GenoVision)

*Olerup* SSP™ DQB1\*06 (GenoVision)

*Olerup* SSP® DQA1 (GenoVision)

100 µl Taq DNA polymerase (rekombinantná) 500U, 5U/µl (Fermentas)

### 3.1.3 Elektroforéza

#### **TBE pufer:**

890 mM Tris base (Roth)

890 mM kyselina boritá (Amresco)

20 mM EDTA pH=8 (lekárne FNKV)

Destilovaná voda (Ardeapharma)

Agaróza (Invitrogen)

PCR Etídium bromidTB (Top-Bio)

Bromophenol Blue Loading Solution (Promega)

Marker pUC19 DNA/MspI (Fermentas)

### 3.1.4 Konverzia DNA bisulfitom

#### **Epitect® Bisulfite kit (QIAGEN):**

RNA-se free voda

Bisulfite Mix – alikvóty riedené RNA-se free vodou podľa návodu výrobcu

DNA protect buffer

Pufry BW a BD zmiešané s etanolom (96-100%) podľa návodu výrobcu

Pufer BL

### 3.1.5 Amplifikácia cieľového úseku v bisulfitom ošetrenej DNA

primery (Metabion International AG):

Forward 1 5' GGTTGTAAGTTAGAATATTTTGAAGGATG 3'

Reverse 1 5' CAAACCAAACCCTACCAAATCA 3'

Forward 2 5' AGGTTGTTTAGAAATGTTTATTTTGG 3'

Reverse 2 5' AAAATCCCCTATAATAACATCTCAATTAC 3'

Koncentrácia primerov podľa návodu výrobcu riedená najskôr na 100mM a potom na pracovnú koncentráciu 50 mM.

**dNTPs** – dATP, dCTP, dTTP, dGTP (100 mM) (Fermentas) – riedené vodou na pracovnú koncentráciu 10 mM

PCR ultra H<sub>2</sub>O (Top-Bio)

**PCR reakčný kit (Fermentas):**

Taq DNA polymerase (rekombinantná) 500U, 5U/μl

10x Taq Buffer s KCl

25 mM MgCl<sub>2</sub>

**3.1.6 Izolácia z agarózy a prečistenie produktu**

**TAE pufer:**

Koncentrovaný zásobný roztok (50x) – 1000 ml:

242 g Tris base (Sigma Aldrich)

100 ml 0,5 M EDTA pH=8,0 (lekárne FNKV)

57,1 ml čistej kyseliny octovej (Lach-Ner)

Pracovný roztok (1x):

0,04 M Tris-acetát

0,001 M EDTA

Low gelling temperature agarose (Sigma Aldrich)

PCR Etídium bromidTB (Top-Bio)

6x Loading Dye Solution (Fermentas)

QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN):

Pufer QG

Pufer PE zmiešaný s etanolom (96-100%) podľa návodu výrobcu

izopropanol (Sigma Aldrich)

PCR ultra H<sub>2</sub>O (Top-Bio)

**3.2 Použitý bakteriálny kmeň, vektor a médium**

XL1-Blue *E.coli* (genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]) (Stratagene)

pGEM-T Easy Vector (Genotyp: (Apr),oriVColE1 *lacZ*, 3015pb) (Promega)

### **3.2.1 Príprava kompetentných baktérií**

LB Broth base (Invitrogen)

0,1 M CaCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich)

glycerol (Sigma Aldrich)

etanol

### **3.2.2 Príprava kultivačných misiek**

Bacto Agar (DIFCO)

LB Broth base (Invitrogen)

Ampicillin sodium salt (Sigma Aldrich)

X-Gal (Sigma Aldrich)

IPTG (Sigma Aldrich)

DMSO (Sigma Aldrich)

### **3.2.3 Ligácia produktu s vektorom a transformácia kompetentných buniek**

**pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector system** (Promega):

T4 DNA Ligase (3 Weiss units/μl)

2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase

pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (50ng/μl)

LB Broth base (Invitrogen)

### **3.3 Všeobecne využívané chemikálie**

destilovaná voda

etanol 96% (lekáreň FNKV)

### **3.4 Použité prístroje**

Autokláv Systec DE-23 (Systec)

Automatické pipety jednokanálové (0,1 – 2, 2 – 20, 20 – 200, 100 – 1000) Discovery+ (HTL)

Biologický termostat BT 120M (LABO-MS)

Centrifúga chladená Z 300 (Hermle)

Centrifúga MPW-51 (Mechanika Precyzyjna)

Elektroforetické vane (Sigma Aldrich)

Hlbokomraziaci box U410 (New Brunswick)

Chladnička ARC (Whirpool)

Laminárny box Auramini (Bioair) a HERAsafe (Heraeus)

Mikrovlánná rúra (Zanussi)

Minicentrifúga Z 100 M (Hermle)

Mraznička zásuvková (Whirlpool)

Plynový kahan Schuett phoenix (Schuett-biotec.de)

Stolový vortex (Scientific industries)

Termocyklery C1000<sup>TM</sup> (Bio-Rad) a LabCycler gradient (SensoQuest)

Trepačka T-40-I (Lověna)

UV Transiluminátor MUVB20 (UltraLum)

Váhy digitálne 40SM-200A (Precisa)

Zdroj napätia pre elektroforézu PowerPac (Bio-Rad)

### **3.5 Použité počítačové programy**

BioEdit

GeneSnap

GraphPad Prism 5

Vector NTI Advance<sup>TM</sup> 11

## 4. Metódy

Alely génov hlavného histokompatibilného komplexu II. triedy boli genotypizované pomocou metódy PCR-SSP. Genomická DNA darcov bola konvertovaná bisulfitom a cieľový úsek v promótoře génu HLA-DQA1 bol následne amplifikovaný pomocou nested PCR. Produkt bol vložený do pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektora, a ním boli transformované baktérie *Escherichia coli*, kmeň XL-1 Blue. Selekcia úspešných transformantov bola vykonaná na základe farby kolónií – modrá/biela – na médiu s Amp/IPTG/X-Gal. Sekvenované boli jednotlivé klony baktérií.

### 4.1 Subjekt

Subjektom štúdie bolo 89 zdravých dobrovoľníkov z radov študentov a zamestnancov 3. lekárskej fakulty UK. Ich priemerný vek bol 34 rokov (rozpätie 21 – 61). Zastúpenie pohlaví bolo 16 mužov a 73 žien (18% a 82%).

### 4.2 Izolácia DNA

DNA bola izolovaná z krvi odobratej do EDTA skúmaviek. Izolácia najskôr prebiehala pomocou QIAamp DNA blood mini kitu (QIAGEN) podľa návodu dodaného výrobcom:

1. K 200µl plnej krvi pridáme 20 µl QIAGEN Protease a 200 µl pufru AL.
2. Obsah skúmavky zvertexujeme, inkubujeme 10 minút pri 56°C a potom krátko centrifugujeme, aby sme odstránili kvapky z viečka skúmavky.
3. Pridáme 200 µl etanolu (96-100%), zvertexujeme a opäť krátko centrifugujeme.
4. Zmes preniesieme do QIAamp kolónky a centrifugujeme 1 minútu pri 6000g.
5. Kolónku umiestnime do čistej zbernej skúmavky, pridáme 500 µl pufru AW1 a opäť centrifugujeme 1 minútu pri 6000g.
6. Kolónku opäť umiestnime do čistej zbernej skúmavky, pridáme 500 µl pufru AW2 a centrifugujeme 3 min pri 20000g.
7. Kolónku preniesieme do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky, pridáme 200 µl pufru AE alebo destilovanej vody<sup>1</sup> a inkubujeme 1 minútu pri izbovej teplote.
8. Centrifugujeme 1 minútu pri 6000g, kolónku odstránime a skúmavku s 200 µl izolovanej DNA uskladníme pri -20°C.

<sup>1</sup> Pri izolácii DNA bola použitá voda.

Neskôr bola na zvýšenie čistoty a koncentrácie DNA izolovaná pomocou vysol'ovacej metódy, podľa protokolu Millera *et al.* (1988).

1. K 0,5 ml plnej krvi pridáme 1 ml RCLB (red cell lysis buffer, 320 mM sacharóza, 1% (v/v) Triton X-100, 12 mM Tris-HCl pH=7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) a 30 sekúnd premiešavame prevracaním.
2. Obsah skúmavky stočíme centrifugáciou po dobu 3 minút pri 16000g a zlejeme supernatant. Do skúmavky pridáme 1 ml destilovanej vody a opäť 30 sekúnd premiešavame a následne centrifugujeme. Supernatant zlejeme a premytie vodou zopakujeme.
3. K sedimentu pridáme 235 µl destilovanej vody, 80 µl WCLB (white cell lysis buffer, 120 mM EDTA pH=8, 375 mM NaCl) a sediment resuspendujeme. Potom pridáme 40 µl 10% SDS a 15 µl proteinázy K (Sigma Aldrich) a inkubujeme kolotoči<sup>2</sup> 30 minút pri 55°C.
4. Po vychladnutí zmesi na izbovú teplotu k nej pridáme 100 µl 6 M NaCl a silne trepeme 15 sekúnd. Stočíme na centrifúge po dobu 6 minút pri 16000g a supernatant pipetou preniesieme do novej skúmavky.
5. Opäť centrifugujeme pri 16000g, tentokrát po dobu 3 minút. Supernatant potom pomocou pipety preniesieme do novej skúmavky a pridáme k nemu 1 ml 96% etanolu vychladeného na -20 °C. Prevracaním skúmavky vyzrážame DNA a skúmavku uložíme na 20 minút do mrazničky pri teplote -20°C.
6. Obsah skúmavky stočíme 3 minúty na centrifúge a zlejeme etanol. K vyzrážanej DNA pridáme 1 ml 70% etanolu aby sa DNA hydratovala a premývame 3 minúty na kolotoči<sup>2</sup>.
7. Obsah skúmavky stočíme 3 minúty na centrifúge, zlejeme etanol a gázou odsajeme kvapky. DNA sušíme 5 minút vo vákuovej sušiarňi<sup>3</sup>, suchá DNA je priesvitná.
8. Pridáme 200 µl destilovanej vody. Vyizolovaná DNA sa vo vode rozpustí pri 4°C za približne 1 deň.

2 Použitie kolotoča bolo nahradené pravidelným premiešavaním obsahu skúmavky.

3 DNA bola sušená 20 minút v biologickom termostate pri 55°C

### 4.3 Genotypizácia HLA molekúl

Genotypizácia HLA molekúl bola vykonaná metódou PCR-SSP so setmi od firmy GenoVision (Olerup SSP<sup>TM</sup> AB). Alely HLA-DRB1 boli testované na typ sérologickej skupiny pomocou setu DR low resolution SSP typing. Alely HLA-DQB1 boli najskôr testované na typ sérologickej skupiny pomocou setu DQ low resolution SSP typing, potom bol pomocou setov Olerup SSP<sup>TM</sup> DQB1 high resolution určený špecifický podtyp jednotlivých aliel DQB1\*02, DQB1\*03, DQB1\*04, DQB1\*05 a DQB1\*06. Podtyp aliel HLA-DQA1 bol určený pomocou setu *Olerup SSP*<sup>®</sup> DQA1. Práca bola vykonaná podľa protokolu dodaného výrobcom.



Najprv bola pripravená PCR reakčná zmes podľa návodu v tabuľke 4-1. Skutočný objem zmesi závisí od počtu skúmaviek s primermi v konkrétnom použitom sete. Zmes bola rozpipetovaná po 10 µl do jednotlivých skúmaviek setu so sekvenčne špecifickými primermi a potom amplifikovaná v cycleri podľa protokolu v tabuľke 4-2.

**Tab. 4-1** – Zloženie PCR reakčnej zmesi na genotypizáciu HLA pre jednu skúmavku setu.

<b>zložka</b>	<b>objem (µl)</b>
voda	4,92
PCR Master Mix	3
DNA (konc. okolo 30 ng/µl)	2
Taq	0,08
<b>spolu</b>	<b>10</b>

**Tab. 4-2** – Teplotný program v cycleri na PCR reakciu na genotypizáciu HLA.

<b>krok</b>	<b>teplota</b>	<b>čas</b>	<b>opakovanie</b>
1. úvodná denaturácia	94°C	2 min	
2. denaturácia	94°C	10 s	
3. hybridizácia a elongácia	65°C	60 s	
4.			(2→3) 9x
5. denaturácia	94°C	10 s	
6. hybridizácia	61°C	50 s	
7. elongácia	72°C	30 s	
8.			(5→7) 19x

Produkty boli rozdelené elektroforézou na 2% agarózovom gele s etídiom bromidom a zviditeľnené pod UV kamerou (Sambrook *et al.*, 1989). Na základe prítomnosti či neprítomnosti produktov bolo podľa interpretačnej tabuľky dodanej výrobcom ku každému setu určené o akú alelu ide.

Súhrnná tabuľka 4-3 znázorňuje kombinácie PCR produktov, slúžiace na určenie sérologických typov aliel HLA-DRB1, HLA-DQB1 a špecifických podtypov aliel HLA-DQA1. Na obrázku 4-1 sú na ilustráciu znázornené konkrétne výsledky genotypizácie týchto molekúl.

**Tab. 4-3** – Kombinácie PCR produktov určujúce sérologický typ aliel HLA-DQB1 (A), HLA-DRB1 (B) a špecifický podtyp aliel HLA-DQA1 (C). V tabuľkách B a C sú pre prehľadnosť ukázané len tie skupiny aliel, ktorých prítomnosť bola preukázaná v našej skupine darcov. Sety na typizáciu HLA-DRB1 obsahujú v jamkách 21, 22 a 23 dvojice primerov na amplifikáciu génov DRB3, DRB4 a DRB5 (v tomto poradí). Tieto gény sa vyskytujú len na niektorých haplotyloch, a ich určenie slúži ako kontrola správnosti odčítania výsledku.

**A:**

sérol. typ	jamka							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5	+							
6		+						
6		+		+				
2			+	+		+		
2			+			+		
3,7,8					+		+	
3,8				+		+	+	
3,9						+	+	
3,8				+			+	
4								+
4						+		+

**B:**

sérol. typ	jamka																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
DRB1*01	+																								
DRB1*03					+	+											+								
					+		+										+								
					+												+								
					+	+						+	+							+		+			
DRB1*04								+																	
DRB1*07								+											+						
DRB1*08									+																
DRB1*10													+												
DRB1*11													+			+	+								
						+							+		+	+									
													+		+	+				+					
													+		+										
DRB1*12													+			+									
DRB1*13														+		+	+	+							
						+									+	+	+								
															+	+	+								
																+	+	+							
DRB1*14																			+	+	+				
																				+	+				
DRB1*15			+															+		+					
DRB1*16			+																						
DRB3																								+	
DRB4																									+
DRB5																									+



#### **4.4 Analýza metylácie promótorovej oblasti génu DQA1**

Analýza promótorovej oblasti génu HLA-DQA1 bola vykonaná pomocou bisulfitového sekvenovania. Bisulfit sodný deaminuje nemetylované cytozíny v DNA na uracil. Metylované cytozíny zanecháva nezmenené. To umožňuje zistiť metylačný stav CpG miest v skúmanom úseku, ktorého sekvenciu poznáme – úsek je amplifikovaný pomocou PCR (uracil je nahradený tymínom) a sekvenovaný – pôvodne metylované CpG miesta v sekvencii zostanú nezmenené, nemetylované miesta sa ukážu ako dinukleotid CpA alebo TpG. Pretože DNA bola izolovaná z plnej krvi a metylácia sa môže v jednotlivých bunkových typoch líšiť, pred sekvenáciou boli produktom transformované baktérie a sekvenované boli jednotlivé klony.

##### **4.4.1 Konverzia DNA bisulfitom**

Konverzia DNA bisulfitom aj následné prečistenie konvertovanej DNA boli vykonané pomocou Epiect<sup>®</sup> Bisulfite kitu (QIAGEN). Postupovali sme podľa návodu výrobcu:

1. Do 200µl PCR skúmaviek pripravíme reakčnú zmes na bisulfitovú konverziu podľa tabuľky 4-4. Zmes premiešame a v cycleri necháme prebehnúť program pre konverziu DNA bisulfitom uvedený v tabuľke 4-5.

##### **Prečistenie konvertovanej DNA**

2. Celú bisulfitovú reakciu preniesieme do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky a pridáme 560 µl pufru BL. Zmes potom preniesieme do Epiect spin kolóniek a centrifugujeme 1 minútu pri maximálnej rýchlosti.
3. Vylejeme obsah zbernej skúmavky, pridáme 500 µl pufru BW a centrifugujeme pri maximálnej rýchlosti 1 minútu.
4. Obsah zbernej skúmavky opäť vylejeme, pridáme 500µl pufru BD a inkubujeme 15 minút pri izbovej teplote. Potom centrifugujeme 1 minútu pri maximálnej rýchlosti.
5. Vylejeme obsah zbernej skúmavky, pridáme 500 µl pufru BD a centrifugujeme pri maximálnej rýchlosti 1 minútu. Obsah zbernej skúmavky vylejeme a tento krok ešte raz zopakujeme.
6. Kolónku vložíme do novej zbernej skúmavky a 1-minútovou centrifugáciou pri maximálnej rýchlosti odstránime zvyšky kvapaliny. Potom kolónku s otvoreným viečkom vložíme do čistej 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky a inkubujeme 5 minút pri 56°C.

7. Nakoniec na stred kolónky nakvapkáme 20  $\mu$ l pufru EB alebo vody<sup>4</sup> a DNA vymyjeme 1-minútovou centrifugáciou pri približne 15000g. Konvertovanú DNA na dobu dlhšiu než 24 h skladujeme pri -20°C.

4 Na vymytie DNA bola použitá voda.

**Tab. 4-4** – Zloženie reakčnej zmesi na bisulfitovú konverziu. Objem reakcie pre jednu vzorku.

<b>zložka</b>	<b>objem (<math>\mu</math>l)</b>
roztok DNA	max. 20 $\mu$ l*
RNase-free voda	*
Bisulfite Mix	85
DNA Protect buffer	35
<b>Spolu</b>	<b>140</b>

\*celkový objem roztoku DNA a vody je 20 $\mu$ l. Do reakcie ide 1 ng – 2 $\mu$ g DNA. My sme do reakcie dávali minimálne 300 ng DNA

**Tab. 4-5** – Teplotný program v cycleri na bisulfitovú konverziu DNA.

	<b>teplota</b>	<b>čas</b>
1. denaturácia	95°C	5 min
2. inkubácia	60°C	25 min
3. denaturácia	95°C	5 min
4. inkubácia	60°C	85 min
5. denaturácia	95°C	5 min
6. inkubácia	60°C	175 min

#### 4.4.2 Amplifikácia cieľového úseku v bisulfitom ošetrenej DNA

Pretože sekvencie génov HLA-DQA1 a HLA-DQA2 sú si veľmi podobné a konverzia bisulfitom znižuje komplexitu sekvencie DNA, na zvýšenie špecifity bol cieľový úsek amplifikovaný pomocou nested PCR.

Najprv bola z [www.pubmed.org](http://www.pubmed.org) získaná referenčná sekvencia promótorovej oblasti génu HLA-DQA1 (NCBI reference sequence: NC\_000006.11, ďalej referenčná sekvencia). Potom boli navrhnuté primery (tab. 4-6; Príloha) k cieľovému úseku v promótoru génu. Vonkajšie primery nasadajú na promótor v oblasti -729 až -701 a -109 až -86 od štart kodónu, vnútorné primery nasadajú v promótorovej oblasti -670 až -644 a -154 až -126 .

**Tab. 4-6** sekvencia primerov na metylačnú analýzu

primery	sekvencia	T <sub>m</sub> (°C)	produkt (bp)
metF1-DQA1	5' GGTTGTAAGTTAGAATATTTTGAAGGATG 3'	63,0	643
metR1-DQA1	5' CAAACCAAACCCTACCAAATCA 3'	58,0	
metF2-DQA1	5' AGGTTGTTTAGAAATGTTTATTTTGG 3'	59,0	545
metR2-DQA1	5'AAAATCCCCTATAATAACATCTCAATTAC 3'	62,0	

Potom bola pre každú vzorku pripravená reakčná zmes na PCR podľa tabuľky 4-7 a skúmavky so zmesou boli vložené do cycleru na ktorom prebehol program uvedený v tabuľke 4-8.

**Tab. 4-7** – Reakčná zmes na PCR na amplifikáciu cieľového úseku v promótoře génu HLA-DQA1. Objem zmesi pre jednu vzorku.

zložka	PCR1 objem (μl)	PCR2 objem (μl)
voda	13,25	14,75
10x Taq Buffer s KCl	2,5	2,5
Mg <sup>2+</sup> (25mM MgCl <sub>2</sub> )	6	4
dNTPs (10mM)	1,25	1,25
forward primer (0,1mM)	0,4	0,4
reverse primer (0,1mM)	0,4	0,4
Taq	0,2	0,2
DNA	1	1,5
<b>spolu</b>	<b>25</b>	<b>25</b>

**Tab. 4-8** – Teplotný program v cycleri na amplifikáciu cieľového úseku v promótoře génu HLA-DQA1.

	PCR1			PCR2		
	teplota	čas	opakovanie	teplota	čas	opakovanie
1. úvodná denaturácia	95°C	5 min		95°C	5 min	
2. denaturácia	95°C	1 min		95°C	1 min	
3. hybridizácia	56°C	1,5 min		65°C	1,5 min	
4. elongácia	72°C	1 min		72°C	1 min	
5.			(2→4) 39x			(2→4) 49x
6. záverečná inkubácia	72°C	10 min		72°C		

Prítomnosť produktu bola overená elektroforézou na 2% agarózovom gele s etídiom bromidom. Do gelu bolo nanosených 5 μl vzorky zmiešanej s 2,5 μl Bromophenol Blue

Loading Solution (Promega). Veľkosť fragmentu bola určená pomocou markeru pUC19 DNA/MspI (Fermentas), ktorý bol nanesený do gelu vedľa sledovaných vzoriek.

#### 4.4.3 Izolácia z agarózy a prečistenie produktu

Na extrakciu produktu z gelu bol použitý QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN).

Produkty z 2 – 3 nezávislých PCR reakcií pre každú vzorku boli zmiešané, rozdelené elektroforézou na 1% gele z low-melting agarózy v TAE pufri (Sambrook *et al.*, 1989) a zviditeľnené pod UV transluminátorom. Ďalší postup sa riadil návodom výrobcu:

1. Pásik zodpovedajúci produktu skalpelom vyrežeme z gelu a vložíme do zväženej skúmavky. Skúmavku s gelom opäť zväžíme.
2. Pridáme 3 objemové jednotky pufru QG na 1 objemovú jednotku gelu (100 mg gelu má objem približne 100  $\mu$ l) a inkubujeme pri 50°C 10 minút, prípadne dlhšie až do úplného rozpustenia gelu. Aby sa gel lepšie rozpúšťal, každé 2-3 minúty vortexujeme.
3. Pridáme 1 objemovú jednotku izopropanolu na 1 objemovú jednotku gelu a premiešame. Vzorku nanesieme do QIAquick kolónky a 1 minútu cetrifugujeme pri 17900g. Vylejeme obsah zbernej skúmavky.
4. Pre odstránenie stôp agarózy môžeme pridať 0,5 ml pufru QG a 1 minútu centrifugovať pri 17900g, po centrifugácii vylejeme obsah zbernej skúmavky.
5. DNA premyjeme pridaním 0,75 ml pufru PE a minútovou centrifugáciou pri 17900g. Potom vylejeme obsah zbernej skúmavky a centrifugujeme ďalšiu minútu, aby sme odstránili zvyšky kvapaliny.
6. Nakoniec kolónku vložíme do čistej 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky. Na stred kolónky pridáme 50  $\mu$ l pufru EB alebo destilovanej vody<sup>5</sup> a inkubujeme minútu pri izbovej teplote. DNA vymyjeme minútovou centrifugáciou pri 17900g.

<sup>5</sup> Na vymytie DNA bola použitá voda.

#### 4.4.4 Klonovanie

Vyizolovaný PCR produkt bol zligovaný s pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektorom, ktorým boli následne transformované baktérie *E. coli*, kmeň XL-1 Blue. Tento kmeň má deléciu v géne pre  $\alpha$ -peptid  $\beta$ -galaktozidázy. Gén kódujúci tento peptid sa nachádza na použítom vektore, ale je prerušený klonovacím miestom. To umožňuje selekciu na médiu s IPTG (induktor  $\beta$ -galaktozidázy) a X-Gal (substrát  $\beta$ -galaktozidázy, po jeho rozštiepení enzýmom vzniká modrý produkt) – kolónie, ktoré obsahujú vektor s insertom, sú biele, kolónie, ktoré obsahujú vektor bez insertu sú modré. Médium na selekciu musí obsahovať aj ampicilín – vektor obsahuje

enzým zodpovedný za rezistenciu voči tomuto antibiotiku, takže netransformované baktérie vôbec nevytvoria kolónie.

#### 4.4.4.1 Kultivácia baktérií

*E. coli* boli kultivované v kvapalnom alebo na tuhom LB médiu pri 37°C. Rast kultúr v kvapalnom médiu za aerobných podmienok v orbitálnej trepačke pri 220-280 r.p.m. bol monitorovaný sledovaním optickej hustoty kultúr pri 590 nm (OD<sub>590</sub>).

#### 4.4.4.2 Príprava kultivačných misiek

Na kultiváciu *E.coli* bolo rutinne používané komplexné Lauria-Bertrani (LB) médium (pH=7,0-7,2). Kultivačné misky boli pripravené podľa upraveného protokolu od Sambrooka *et al.* (1989):

1. Do fľašky navážime agar a LB médium podľa tabuľky 4-9. Dnu vložíme magnetické miešadlo a zautoklávujeme 15 minút pri 121°C.

**Tab. 4-9** – Zloženie média na kultiváciu transformovaných baktérií. Dávkovanie zásobných roztokov je 1 ml zásobného roztoku na 1 liter média.

zložka	hmotnosť (na 1 liter média)	zásobný roztok
agar	15-18 g	
LB médium	20 g	
ampicilín	0,1 g	0,5g v 5ml vody
X-Gal	30 mg	0,15g v 5 ml DMSO (3% X-Gal)
IPTG	24 mg	0,12g v 5ml vody (100mM)

2. Medzitým si pripravíme zásobné roztoky podľa tabuľky 3-7.

3. Médium vyberieme z autoklávu a pri chladnutí priebežne miešame na magnetickej miešačke. Po vychladnutí média na približne 65°C (tesne pred stuhnutím) pridáme ampicilín, alebo ampicilín, X-Gal a IPTG.

4. Roztok nalejeme na Petriho misky (na misky o priemere 9 cm nalejeme asi 25 ml média). Necháme tuhnúť asi 20 minút a prikryjeme viečkom.



#### 4.4.4.3 Príprava kompetentných baktérií

Na prípravu kompetentných baktérií bol použitý upravený protokol podľa Sambrooka *et al.* (1989):

1. Množstvo baktérií, ktoré zaplní približne pol očka očkovacej kľučky, preniesieme z Petriho misky s LB médiom do skúmavky s 3 ml LB média. Inkubujeme na trepačke asi 18 – 20 hodín pri izbovej teplote, alebo 16 – 18 h pri 37°C.
2. Do sterilnej 500 ml banky nalejeme 100 ml LB média zohriateho na 37°C, pridáme 1 ml kultúry z bodu 1 a inkubujeme na trepačke pri 37°C, až kým OD meraná pri 590 alebo 600 nm nedosiahne 0,5 – 0,6. OD začíname merať asi po 80 minútach a pokračujeme v intervaloch približne 15 minút.
3. Banku s bakteriálnou kultúrou položíme na ľad, aby sme zastavili rast baktérií.
4. Potom kultúru asepticky preniesieme do sterilných, na ľade vychladených 50 ml polypropylénových skúmaviek a zozbierame bunky 5-minútovou centrifugáciou pri 3500g.
5. Médium zlejeme a usadené baktérie premyjeme tým, že ich resuspendujeme v 25 ml ľadového sterilného 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Opäť centrifugujeme 5 minút pri 3500g.
6. Tekutinu zlejeme, baktérie resuspendujeme v 25 ml ľadového sterilného 0,1 M CaCl<sub>2</sub> a suspenziu inkubujeme 30 minút na ľade.
7. Bunky zozbierame 5-minútovou centrifugáciou pri 3500g a resuspendujeme ich v 3 ml sterilného 0,1 M CaCl<sub>2</sub> s 20%-ným obsahom glycerolu.
8. Suspenziu za použitia sterilných špičiek preniesieme po 100 µl do 1,5 ml sterilných na ľade vychladených skúmaviek. Bunky zamrazíme vložением skúmaviek do etanolu schladeného na -70°C a ďalej skladujeme v mrazničke pri tejto teplote.

#### 4.4.4.4 Ligácia produktu s vektorom a transformácia kompetentných buniek

Na ligáciu produktu s vektorom bol použitý pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector system (Promega). Kompetentné baktérie *E. coli* XL-1 Blue boli transformované pomocou teplotného šoku. Kolónie úspešne transformovaných baktérií sme selektovali podľa farby – modrá/biela na médiu s IPTG a X-Gal. Postupovali sme podľa návodu výrobcu (Promega):

1. Vypočítame množstvo PCR produktu, ktoré vstupuje do reakcie<sup>6</sup> a pripravíme ligačnú reakciu podľa tabuľky 4-10<sup>7</sup>. Reakciu premiešame pipetovaním a inkubujeme 1 hodinu na ľade alebo, pre účinnejšiu ligáciu, pri 4°C cez noc<sup>8</sup>.
2. Na ľade rozmrazíme kompetentné bunky *E. coli*. Zmiešame 50 µl kompetentných buniek s 1,5 µl ligačnej zmesi<sup>9</sup> v 1,5 ml skúmavke a inkubujeme 20 minút na ľade.

**Tab. 4-10** – Zloženie ligačnej reakcie. Objem polovičnej reakcie pre jednu vzorku

<b>zložka</b>	<b>objem (μl)</b>
2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	2,5
vektor (50ng/μl)	0,5
PCR produkt	*
T4 DNA ligáza	0,5
deionizovaná voda	*
<b>spolu</b>	<b>5</b>

\*množstvo PCR produktu závisí od jeho koncentrácie. Doplníme vodou na konečný objem.

3. Baktérie transformujeme pomocou teplotného šoku – skúmavku s baktériami vložíme na 45 sekúnd do vody o teplote 42°C. Hneď po vybratí baktérie umiestnime na ľad a inkubujeme po dobu minimálne 2 min.

4. Do skúmavky s baktériami pridáme 950 μl LB média izbovej teploty a inkubujeme na trepačke po dobu 1,5 h pri teplote 37°C, 150 rpm.

5. Na kultivačné misky s LB/Amp/IPTG/X-Gal nanesieme 100 μl a 200 μl suspenznej kultúry transformovaných bakteriálnych buniek. Zvyšok kultúry skoncentrujeme centrifugáciou po dobu 2 min pri 5000g. Odpipetujeme väčšinu supernatantu (asi 650 μl), sediment resuspendujeme v zvyšku média pipetovaním a rozotrieme na tretiu misku.

6. Baktérie inkubujeme pri 37°C cez noc v inkubátore, pričom sú misky obrátené dnom hore. Nasledujúci deň vyhodnotíme kolónie.

6 Veľkosť vektora je 3015 bp a pomer vektora k insertu má byť 3:1. Produkt, ktorý bol vložený do reakcie má 545 bp, jeho hmotnosť teda tvorí 54% hmotnosti vektora v reakcii, čo je 14 ng pre polovičnú reakciu.

7 Použitý bol polovičný objem reakcie z objemu odporúčaného výrobcom.

8 Inkubovali sme pri 4°C cez noc.

9 Použili sme celý objem ligačnej zmesi.

#### **4.4.4.5 Vyhodnotenie kolónií**

Baktérie z bielych kolónií boli pomocou sterilného špáradla presadené na nové misky s ampicilínom, a to tak, že špáradlom, ktorým sa dotkneme kolónie párkrát prejdeme po novej miske. To, že sú baktérie skutočne transformované, bolo overené pomocou colony PCR. Práca bola vykonaná podľa upraveného protokolu od Sambrooka *et al.* (1989):

1. Naberieme baktérie špáradlom a vložíme ich do PCR skúmavky.

2. Pripravíme reakčnú zmes podľa tabuľky 4-6 (časť PCR2 – s vnútornými primermi), s tou obmenou, že nepridáme DNA, pretože substrátová DNA je v baktériách. Zmes pridáme

k baktériám v skúmavke, vložíme do cycleru a necháme prebehnúť program uvedený v tabuľke 4-7 (časť PCR2).

PCR produkt bol rozdelený elektroforézou na 2% agarózovom gele. Prítomnosť produktu očakávanej veľkosti (545 bp) znamená, že baktérie boli úspešne transformované.

Pre istotu boli ešte baktérie presadené na Amp/IPTG/X-Gal misky (tento krok bol vykonaný zároveň s prípravou colony PCR, špáradlom, ktorým sme odoberali baktérie v kroku 1 sme párkrát prešli po novej miske).

#### 4.4.4.6 Sekvenácia

Na sekvenovanie bolo zaslaných 3 až 5 klonov od jedného človeka (spolu 96 vzoriek), vybrané boli klony, pre ktoré bola úspešná colony PCR. V prípade, že sa colony PCR nepodarila, boli použité kolónie, ktoré boli na Amp/IPTG/X-Gal médiu biele.

Produkt bol na sekvenáciu zasielaný v transformovaných baktériách. Baktérie sme pripravili pomocou protokolu podľa Sambrooka *et al.* (1989):

1. Pripravíme roztok 1% agaru s LB médiom a ampicilínom podľa postupu uvedeného v časti 2.2.5. Roztok tesne pred stuhnutím rozpipetujeme po 100  $\mu$ l do jednotlivých jamiek 96-jamkovej doštičky na real-time PCR.
2. Baktérie z vybranej kolónie naberieme na pipetovú špičku, a tú potom zapichneme do jamky s agarom.

Baktérie potom boli inkubované cez noc pri izbovej teplote. Následne boli vložené do chladničky, kde boli skladované až do odoslania.

Vzorky boli sekvenované vo firme Macrogen v Kórei prostredníctvom Laboratoře sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty UK. Sekvenácia prebiehala s využitím univerzálnych primerov SP6 a T7, ktorých sekvencie zo vzdialenosti niekoľko desiatok bp lemujú inserčné miesto pGEM<sup>®</sup>-T Easy vektora.

## 5. Výsledky

### 5.1 Genotypizácia HLA molekúl

U 89 zdravých darcov boli určené alely génov HLA-DRB1, HLA-DQA1 a HLA-DQB1. Zastúpenie jednotlivých haplotypov v skupine darcov znázorňuje tabuľka 5-1.

Boli pozorované bežné haplotypy (Klitz *et al.*, 2003). Na rozdiel od Klitz *et al.* boli namiesto haplotypov DRB1\*10-DQA1\*0104-DQB1\*0501, 11-0501-0301, 12-0501-0301 a 13-0501-0301 nájdené haplotypy 10-0105-0501 (počet nájdených očakávaných/nových haplotypov – 0/2), 11-0505-0301 (0/29), 12-0505-0301 (0/5) a 13-0505-0301 (1/3). Zmena alely DQA1\*0501 na alelu \*0505 je ľahko vysvetliteľná tým, že alela HLA-DQA1\*0505 bola

**Tab. 5-1** – Zastúpenie jednotlivých haplotypov v našej skupine darcov. Haplotypy označené 100 – neklasické haplotypy; haplotypy označené 0303 nesú alelu DQA1\*0303 s alelou DRB1\*04 a rôznymi alelami DQB1\*03, \*02

genotyp			haplotyp		
DRB1*	DQA1*	DQB1*	č.	počet ľudí	frekvencia
11	0505	0301	1	29	16,3
15	0102	0602	2	21	11,8
01	0101	0501	3	23	12,9
03	0501	0201	4	17	9,6
07	0201	0202	5	16	9,0
04	0301	0302	6	11	6,2
13	0103	0603	7	13	7,3
13	0505	0301	8	3	1,7
16	0102	0502	9	6	3,4
07	0201	0303	10	4	2,2
12	0505	0301	11	5	2,8
14	0104	0503	12	5	2,8
04	0301	0301	13	1	0,6
13	0102	0604	14	4	2,2
08	0401	0402	15	4	2,2
10	0105	0501	16	2	1,1
13	0102	0609	17	2	1,1
13	0501	0301	18	1	0,6
03	0505	0201	19	1	0,6
11	0103	0603	20	1	0,6
04	0303	rôzne	0303	6	3,4
			100	3	1,7

pôvodne identifikovaná ako HLA-DQA1\*050103. Alela HLA-DQA1\*0303 sa nevyskytovala v konkrétnom haplotype, ale vždy bola v asociácii s DRB1\*04 a DQB1\*03 a \*02 (konkrétne DQB1\*0202 – 1x, \*0301 – 2x, \*0302 – 2x a 0304 – 1x).

Pretože sme sa zaujímali o promótor génu HLA-DQA1, ktorý je vo väzbovej nerovnováhe so svojím génom, darcovia na metylačnú analýzu boli vybraní na základe genotypu v tomto géne. Neklasické haplotypy boli vyradené, pretože nemôžeme vylúčiť rekombináciu v promótorovej oblasti. Vyberali sme tak, aby bola každá alela zastúpená pokiaľ možno aspoň päťkrát, a aby boli zastúpení heterozygoti pre následné expresné štúdie. Z tejto skupiny neskôr niekoľko ľudí vypadlo, pretože nevyšiel niektorý z ďalších krokov práce. Haplotypy darcov, ktorých sekvencie boli získané, sú uvedené v tabuľke 5-2A.

**Tab 5-2** – Genotypy osekvenovaných darcov. **A:** zoznam haplotypov DRB1-DQA1-DQB1. **B:** zoznam haplotypov QAP-DQA1. Čísla oddelené bodkočiarkou (;) značia, že dané alely promótoru nemožno k alelám DQA1 jednoznačne priradiť. Spojovník (-) znamená, že sa nám alelu promótoru asociovanú s daným DQA1 génom nepodarilo zachytiť.

\* - nedokážeme určiť, či ide o alelu QAP 1.1 alebo 1.5, predpokladáme však, že ide o alelu 1.1.

darca č.	genotyp			haplotyp č.
	DRB1*	DQA1*	DQB1*	
4	03 / 14	0501 / 0104	0201 / 0503	4 / 12
9	01 / 04	0101 / 0301	0501 / 0302	3 / 6
12	04 / 16	0301 / 0102	0302 / 0502	6 / 9
20	15 / 15	0102 / 0102	0602 / 0602	2 / 2
25	01 / 04	0101 / 0303	0501 / 0202	3 / 0303
27	13 / 16	0102 / 0102	0604 / 0502	14 / 9
31	12 / 13	0505 / 0505	0301 / 0301	11 / 8
32	04 / 13	0303 / 0103	0301 / 0603	0303 / 7
37	03 / 03	0501 / 0501	0201 / 0201	4 / 4
45	08 / 11	0401 / 0505	0402 / 0301	15 / 1
46	14 / 15	0104 / 0102	0503 / 0602	12 / 2
49	08 / 13	0401 / 0103	0402 / 0603	15 / 7
52	11 / 11	0505 / 0505	0301 / 0301	1 / 1
65	01 / 04	0101 / 0303	0501 / 0302	3 / 0303
73	07 / 13	0201 / 0103	0202 / 0603	5 / 7
79	14 / 01	0104 / 0101	0503 / 0501	3 / 12
80	11 / 11	0505 / 0505	0301 / 0301	1 / 1
81	08 / 11	0401 / 0505	0402 / 0301	15 / 1
82	08 / 11	0401 / 0505	0402 / 0301	15 / 1
86	13 / 15	0102 / 0102	0609 / 0602	17 / 2
89	10 / 16	0105 / 0102	0501 / 0502	16 / 9

darca č.	genotyp	
	QAP	DQA1*
4	4.1 / -	0501 / 0104
9	1.1* / 3.1	0101 / 0301
12	- / 1.2	0301 / 0102
20	1.2; 1.2	0102 / 0102
25	1.1* / -	0101 / 0303
27	1.4 / -	0102 / 0102
31	4.1 / 4.1	0505 / 0505
32	3.1 / 1.3	0303 / 0103
37	4.1 / 4.1	0501 / 0501
45	4.1 / 4.1	0401 / 0505
46	1.2; 1,2	0104 / 0102
49	- / 1.3	0401 / 0103
52	4.1 / 4.1	0505 / 0505
65	1.1* / 3.1	0101 / 0303
73	2.1 / 1.3	0201 / 0103
79	1,1*; 1,3	0104 / 0101
80	4.1 / 4.1	0505 / 0505
81	1.2	0401 / 0505
82	- / 4.1	0401 / 0505
86	1.2; 1,2	0102 / 0102
89	1.2	0105 / 0102

## 5.2 Analýza metylačného stavu promótoru génu HLA-DQA1

Genomická DNA darcov bola konvertovaná bisulfitom. Potom bola amplifikovaná a osekvenovaná 545 bp dlhá oblasť promótoru génu HLA-DQA1 vo vzdialenosti -670 až -126 nukleotidov od štart kodónu. Na polohy -670 až -644 a -154 až -126 nasadajú primery, preto je, čo sa metylácie a polymorfizmu týka, informatívna až 489 bp dlhá oblasť v polohe -643 až -155. Spolu bolo získaných 80 sekvencií od 21 darcov.

### 5.2.1 Určenie alely promótoru

O ktorú alelu promótoru (QAP) ide bolo určené na základe známych polymorfizmov v promótorovej oblasti -299 až -1 (tabuľka 5-3). Pretože ošetrenie bisulfitom zmazalo rozdiely medzi miestami, ktoré sa líšili zámenou C za T alebo naopak, nebolo možné rozlíšiť alely QAP 1.1 a QAP 1.5. Frekvencia alely QAP 1.1 je (v zmesi vzoriek z rôznych populácií) niekoľkonásobne vyššia než frekvencia alely 1.5 (Brünnler *et al.*) a medzi 9 sekvenciami od 4

darco, ktorí spadajú do tejto skupiny, neboli v celej sekvenovanej oblasti žiadne rozdiely. Preto veľmi pravdepodobne ide o alelu QAP 1.1 a takto bude ďalej značená.

Získané genotypy QAP sú spolu s DQA1 genotypmi uvedené v tabuľke 5-2B. U darco, ktorí majú v QAP lokuse len alelu/y 1.x a zároveň v DQA1 lokuse 2 alely \*01, nemožno alelám DQA1 promótorové alely jednoznačne priradiť, pretože rozdelenie aliel QAP 1.x medzi alely DQA1\*01 je promiskuitné. U darcu č. 81 vidieť nečakaný haplotyp QAP 1.2-DQA1\*0401/0505, v tomto prípade zrejme ide o zámenu vzorky.

**Tab 5-3** – Polymorfne miesta v promótoe génu HLA-DQA1 na základe ktorých sme určovali, o ktorú alelu promótoru ide. Znázornené sú polymorfizmy zachované v bisulfitom oštrenej DNA; cytozíny, ktoré sú súčasťou CpG miest aspoň jednej alely sú znázornené ako nezmenené. Tabuľka znázorňuje prekryv známej oblasti (-299 až -1) a nami sekvenovanej oblasti. Referenčná sekvencia predstavuje alelu QAP 1.2. Tabuľka podľa Brännler *et al.* (1997).

	-277	-276	-272	-271	-270	-263	-257	-245	-223	-215	-214	-207	-206	-205	-197	-193	-192	-169	-158
konsenzus	C	A	T	A	G	T	A	A	A	C	A	-	-	-	G	C	G	T	A
QAP 1.1			G																
QAP 1.2					A														
QAP 1.3																			
QAP 1.4					C														
QAP 1.5			G																
QAP 2.1							T					T	A	A		T		G	
QAP 3.1							G					T	A	A		T			G
QAP 3.2						G	G					T	A	A		T			
QAP 4.1		G		C				T	G			T	A	A		T			
QAP 4.2								T	G		G	T	T	A		T	T		

Ďalej boli analyzované len sekvencie, u ktorých bola konverzia bisulfitom úspešná aspoň z 95%. Z tohto dôvodu bola vylúčená sekvencia 81-1. Vylúčené boli aj sekvencie 32-5, 73-7 a 81-8, ktoré nebolo možné zaradiť (pozri poznámku na konci časti 5).

### 5.2.2 Určenie metylačného stavu jednotlivých aliel

V oblasti promótoru -600 až -270 bolo u niektorých sekvencií pozorovaných niekoľko nových metylačných miest. Naopak, niektoré očakávané metylačné miesta nájdené neboli. Pretože nie sú známe sekvencie jednotlivých aliel, nebolo v niektorých prípadoch možné určiť, či ide v danom mieste o CpG miesto nemetylované (sekvencia TG), alebo o zámenu CG→TG. V prípade, že sa v danom mieste vo všetkých sekvenciách konkrétnej alely nachádzalo vždy TG, bolo u tejto alely považované za pôvodné TG miesto. Zoznam všetkých metylačných miest a ich stavu v jednotlivých sekvenciách je uvedený v tabuľke 5-5. Pozície CpG dinukleotidov v sekvenciách jednotlivých aliel v skratke udáva tabuľka 5-6.

**Tab 5-5** – Zoznam všetkých metylačných miest a ich stavu u jednotlivých sekvencií. Pozície nových metylačných miest sú vyznačené tmavým pozadím. Potenciálne nemetylované miesta sú označené TG.

X – nebolo možné určiť. Sekvencie vyznačené kurzívou sme ďalej neanalyzovali.

refseq	CG	CG	CG	TG	TA	CG	CG	TG	CG	TG	CA	TG	CG	CG	CG	CG		CG	TA	AA	CG
pozícia	-641	-639	-596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-468	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193
<b>QAP 1.1</b>																					
9-1	TA	●	○	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	○	●	●	●		●	TA	AG	○
25-2	TA	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		○	TA	AG	○
25-3	TA	○	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		○	TA	AG	○
25-4	TA	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		○	TA	AG	○
25-7	TA	○	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	○		○	TA	AG	○
25-8	TA	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		○	CA	AG	○
65-2	TA	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	○	●	●		○	TA	AG	○
65-6	TA	●	●	TG	TA	○	○	TG	○	TG	TG	TG	○	○	○	○		○	TA	AG	○
79-3	TA	○	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	AG	●
<b>QAP 1.2</b>																					
	-641	-639	-596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-468	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193
12-5	●	●	●	TG	TA	●	TT	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	○		○	TA	AA	○
12-6	●	●	●	TG	TA	●	TT	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		○	TA	AA	○
20-2	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	○	TG	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	AA	●
20-3	●	●	●	TG	TA	○	○	TG	○	TG	TG	TG	●	●	●	●		○	TA	AA	○
20-4	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	AA	○
20-5	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	AA	○
20-7	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	AA	○
46-1	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		○	TA	AA	○
46-2	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	○	●	●		○	TA	AA	○
46-3	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		○	TA	AA	○
81-1	●	●	○	<i>TG</i>	<i>TA</i>	○	●	<i>TG</i>	○	<i>TG</i>	<i>TG</i>	<i>TG</i>	●	●	●	●		<i>CC</i>	<i>TA</i>	<i>AA</i>	<i>X</i>
81-5	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	AA	○
81-7	○	○	○	TG	TA	○	○	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		○	TA	AA	○
86-2	●	○	●	TG	TA	●	●	TG	○	TG	TG	TG	●	TA	●	●		●	TA	TT	○
86-4	●	○	○	TG	TA	●	○	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	○		●	TA	TT	○
86-5	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	●	○
86-8	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	AA	●
89-2	●	●	●	TG	TA	●	TT	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	AA	○

<b>QAP 1.3</b>																					
	-641	-639	-596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-468	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193
32-1	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	○		●	TA	AG	●
49-2	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	○		○	TA	AG	○
49-3	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	○		○	TA	AG	○
49-4	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	○		●	TA	AG	○
49-5	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	○	●	●	○		○	TA	AG	○
49-6	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	○		●	TA	AG	●
73-3	●	●	●	TG	TA	○	●	TG	●	TG	TG	TG	○	○	●	○		○	TA	AG	○
73-6	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	○		○	TA	AG	○
73-8	●	●	○	TG	TA	●	○	TG	○	TG	TG	TG	○	○	○	○		○	TA	AG	○
79-2	TA	●	○	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	AG	○
79-4	TA	○	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	○		○	TA	AG	○
<b>QAP 1.4</b>																					
	-641	-639	-596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-468	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193
27-2	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		○	TA	TG	○
27-5	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	TG	●
27-6	●	●	○	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		○	TA	TG	○
27-7	●	●	●	TG	TA	●	●	TG	●	TG	TG	TG	●	●	●	●		●	TA	TG	●
86-7	●	○	●	TG	TA	●	●	TG	○	TG	TG	TG	●	○	●	●		○	TA	TG	●
<b>QAP 2.1</b>																					
	-641	-639	-596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-468	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193
73-5	●	●	TA	●	TA	●	○	●	TA	TA	TG	TG	●	●	●	●	●	●	TA	AG	TG
<b>QAP 3.1</b>																					
	-641	-639	-596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-468	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193
9-3	TA	●	TA	TG	TA	●	○	●	TA	●	●	TG	○	TG	●	●	●	●	TA	AG	TG
32-2	●	●	TA	TG	TA	○	○	●	TA	●	●	TG	●	TG	●	●	●	●	TA	AG	TG
32-3	TA	○	TA	TG	TA	●	○	●	CA	●	●	TG	●	TG	●	●	●	○	TA	AG	TG
32-4	●	●	●	TG	TA	●	●	●	TA	●	●	TG	X	TG	●	○	○	●	TA	AG	TG
65-4	TA	○	●	TG	TA	●	●	AG	●	○	○	TG	●	TG	CA	●	●	●	TA	AG	TG
<b>QAP 4.1</b>																					
	-641	-639	-596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-468	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193
4-2	-G	●	TG	○	●	TC	TG	●	●	○	TG	TG	TA	●	CA	TA		TT	●	●	TG
4-7	-G	●	TG	●	●	TT	TG	●	●	○	TG	TG	TA	●	●	TA		TT	●	●	TG



31-2	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
31-3	-G	•	TG	•	•	AT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
31-4	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
31-5	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
31-8	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
37-1	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	○	TG	TG	TA	•	•	TA		TG	•	•	TG
37-2	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	○	TG	•	TA	•	•	TA		TC	•	•	TG
37-5	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	○	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
37-6	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	○	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
45-1	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	○	TG
45-2	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	○	TG
45-3	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
45-4	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
45-5	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TC	•	•	TG
52-1	-G	•	TG	CA	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
52-3	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
52-5	-G	•	TG	○	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	•	•	•	X		TC	•	•	TG
52-6	-G	•	TA	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
52-8	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	○	○	TA		TT	○	○	TG
80-1	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	○	○	TG
80-2	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	○	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
80-3	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	○	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
80-4	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
80-8	-G	○	TG	○	○	TT	TG	○	○	○	TG	TG	TA	○	○	TA		TT	•	•	TG
82-4	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	○	TG
82-6	-G	•	TG	•	•	TT	TG	•	•	•	TG	TG	TA	•	•	TA		TT	•	•	TG
<b>nezaradené</b>																					
	-641	-639	-596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-468	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193
32-5	TA	○	TA	TG	TA	•	○	•	TA	•	•	TG	•	○	•	•	•	○	TA	AG	○
73-7	•	•	•	TG	TA	•	•	TG	•	TG	TG	•	TG	•	•	TG		•	TA	AG	TG
81-8	TA	TT	•	•	•	TT	○	TG	•	TG	TG	TG	○	○	○	○		•	TA	AA	•

**Tab 5-6** – Pozície CpG dinukleotidov v sekvenciách jednotlivých aliel (\*).

	-641	-639	-596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193
QAP 1.1		*	*			*	*		*			*	*	*	*		*			*
QAP 1.2	*	*	*			*			*			*	*	*	*		*			*
QAP 1.3	*	*	*			*	*		*			*	*	*	*		*			*
QAP 1.4	*	*	*			*	*		*			*	*	*	*		*			*
QAP 3.1		*				*	*	*		*	*	*		*	*	*	*			
QAP 4.1		*		*	*			*	*	*			*	*				*	*	

Výsledky pre jednotlivé metylačné miesta boli štatisticky spracované pomocou kontingenčných tabuliek s dvojstranným Fisherovým exaktným testom s hladinou významnosti 0,05. Od alely QAP 2.1 bola získaná jediná sekvencia, preto bola z analýzy vyradená. Spracované boli miesta, ktoré sa nachádzajú v sekvencii aspoň 2 aliel (tabuľka 5-6).

Štatisticky významné rozdiely v metylácii boli nájdené v mieste -639 medzi alelou QAP 4.1 a alelami QAP 1.1 a 3.1 (graf 5-1A).

V mieste -540 sa metylácia alely QAP 3.1 líši od metylácie aliel QAP 1.1 a 1.3. Blízko štatistickej významnosti je aj rozdiel medzi alelou QAP 3.1 a QAP 1.2 ( $p=0,0555$ ,  $CI=1,147 - 73,28$ ). Testovanie rozdielu medzi alelami QAP 3.1 a 1.4 síce poskytlo  $p$ -hodnotu rovnú 0,0278, ale konfidenčný interval ( $CI=0,9298 - 629,8$ ) zahŕňal číslo 1, takže na hladine významnosti 0,05 nemožno zamietnuť hypotézu, že nález asociácie je náhodný (graf 5-1B).

V mieste -374 sa od všetkých ostatných aliel líši metylácia alely QAP 1.3 (graf 5-1C), v mieste -193 boli pozorované rozdiely medzi alelami QAP 1.2 a 1.4 (graf 5-1D). Štatisticky významné výsledky udáva tabuľka 5-7.

Ďalej boli vyhodnotené rozdiely v celkovej metylácii jednotlivých aliel. Pomocou neparametrického Mann-Whitneyho testu s hladinou významnosti 0,05 bol porovnaný absolútny počet metylovaných CpG miest v skúmanej oblasti. Štatisticky významné rozdiely boli nájdené len pre alelu QAP 1.1, ktorá bola metylovaná do menšej miery než alely QAP 1.4 a 4.1. Významnosti sa blížil aj rozdiel v metylácii aliel QAP 1.1 a QAP 1.2 ( $p=0,0673$ ). Štatisticky významné výsledky udáva tabuľka 5-8. Priemerný počet metylovaných CpG miest u jednotlivých aliel udáva tabuľka 5-9.

**Tab 5-7** – Štatisticky významné rozdiely v metylácii jednotlivých CpG miest jednotlivých aliel promótoru génu DQA1. Alely, v ktorých je dané miesto metylované viac, sú zvýraznené tučným písmom.

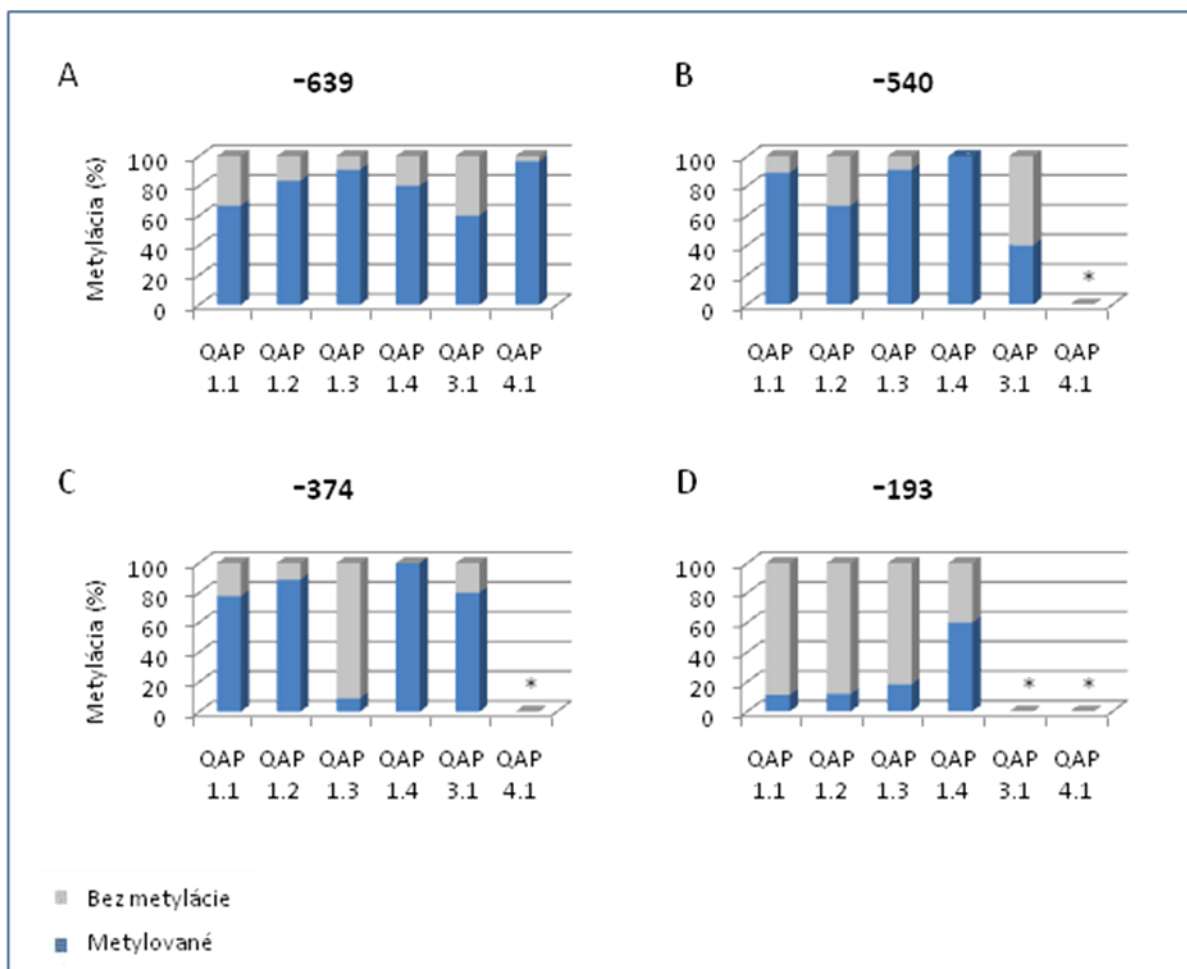
miesto	porovnávané alely	p	95%CI
<b>-639</b>	1.1; <b>4.1</b>	0,0375	0,0065 – 0,8418
	3.1; <b>4.1</b>	0,007	0,0017 – 0,3605
<b>-540</b>	<b>1.1</b> ; 3.1	0,035	1,415 – 282,6
	<b>1.3</b> ; 3.1	0,0128	1,802 – 346,9
	3.1; <b>ostatné alely</b>	0,0035	0,0091 – 0,4015
<b>-374</b>	<b>1.1</b> ; 1.3	0,0045	2,631 – 465,7
	<b>1.2</b> ; 1.3	<0,0001	5,969 – 942,4
	1.3; <b>1.4</b>	0,0014	0,0004 – 0,3752
	1.3; <b>3.1</b>	0,0128	0,0012 – 0,5048
	1.3; <b>ostatné alely</b>	<0,0001	0,0017 – 0,1550
<b>-193</b>	1.2; <b>1.4</b>	0,0239	0,0028– 0,6196

**Tab. 5-8** – Rozdiely v celkovej metylácii CpG miest jednotlivých aliel. Do väčšej miery metylované alely sú zvýraznené tučným písmom.

porovnávané alely QAP	p
1.1; <b>1.4</b>	0,0452
1.1; <b>4.1</b>	0,0044

**Tab. 5-9** – Celková metylácia CpG miest jednotlivých aliel.

alela	priemerný počet metylovaných CpG dinukleotidov danej alely
QAP 1.1	7,7
QAP 1.2	9,3
QAP 1.3	8,4
QAP 1.4	10,2
QAP 3.1	9,0
QAP 4.1	9,0



**Graf 5-1** – Porovnanie miery metylácie DNA jednotlivých aliel QAP vo vybraných metylačných miestach. Jednotlivé stĺpce predstavujú percentuálne zastúpenie metylovaných miest vo vybraných pozíciách v sekvencii jednotlivých promótorových aliel. Pozície sú vyznačené vždy nad príslušným grafom. Pokiaľ je uvedená „\*“, znamená to, že konkrétna alela vďaka polymorfizmu v danom mieste neobsahovala metylačné miesto CpG.

### **Polymorfizmus v rámci promótoru QAP 4.1**

Sekvencie darcov č. 4 a 37 sa od sekvencií ostatných darcov s alelou QAP 4.1 líšia na 2 miestach (obr. 5-1A). Keďže ide o 2 zámény, prítomné vo všetkých sekvenciách od 2 darcov, nepôjde zrejme o chybu sekvenovania ani o náhodnú chybu polymerázy, ale o doposiaľ neznámy polymorfizmus v tejto oblasti. S touto možnosťou súhlasí skutočnosť, že u darcov 4 a 37 je alela promótoru QAP 4.1 asociovaná s alelou DQA1\*0501 (v haplotype DRB1\*03-DQA1\*0501-DQB1\*0201), zatiaľ čo u ostatných s alelou DQA1\*0505 (v haplotypoch DRB1\*11/12/13-DQA1\*0505-DQB1\*0301). Preto boli sekvencie alely QAP 4.1 rozdelené na dve skupiny – QAP 4.1a (darcovia 4 a 37) a QAP 4.1b (ostatní) a porovnané navzájom. Jediný štatisticky významný rozdiel medzi nimi bol zistený v mieste -496, ale keďže sekvencie alely QAP 4.1a v tomto mieste majú len nemetylované cytozíny, môže u nich ísť aj o pôvodnú sekvenciu TpG namiesto CpG.

### **5.3 Polymorfizmus promótorovej oblasti**

V promótorovej oblasti -643 až -300 boli pozorované doteraz nepopísané polymorfne miesta. Sekvenciu jednotlivých promótorových aliel udáva tabuľka 5-10.

Podobne ako sekvencie zaradené podľa blízkej promótorovej oblasti medzi alely QAP 4.1, bolo možné aj skupinu sekvencií QAP 1.2 na základe rozdielov v 2 miestach (obr. 5-1B) rozdeliť na 2 časti – QAP 1.2a (sekvencie darcov 12 a 89) a QAP 1.2b (ostatní). Niektoré sekvencie skupiny QAP 1.2 sa nedajú jednoznačne zaradiť do haplotypov, pretože darcovia sú heterozygoti pre alely QAP 1.x. Obaja darcovia zo skupiny QAP 1.2a však nesú haplotyp DRB1\*16-DQA1\*0102-DQB1\*0502 a všetci traja darcovia zo skupiny QAP 1.2b nesú haplotyp DRB1\*15-DQA1\*0102-DQB1\*0602, čo sú zároveň najčastejšie haplotypy asociované s touto promótorovou alelou. U darcu č. 80 je, zrejme zámenou vzorky spôsobená, veľmi neštandardná kombinácia haplotypu DR-DQA1-DQB1 s genotypom QAP, preto zaradenie jeho QAP 1.2 alely do niektorého haplotypu nemožno uvažovať. Podľa sekvencie promótoru patrí do skupiny QAP 1.2b.

**Tab. 5-10** – Sekvencie jednotlivých aliel promótoru génu HLA-DQA1. Polymorfizmy sú uvedené pre sekvenovanú oblasť -643 – -300. Sekvenácia prebehla po bisulfitovej konverzii, preto v niektorých miestach nemožno rozlíšiť, či ide o zámenu za T alebo C – tieto miesta sú v sekvencii značené ako T. T=T alebo C; Δ=delécia. V mieste medzi nukleotidom -369 a -368 referenčnej sekvencie bola u alely QAP 3.1 pozorovaná inzercia jedného nukleotidu, toto miesto nie je do číslovania sekvencie zahrnuté. Nukleotidové zámény, ktoré rozlišujú sekvencie QAP 4.1a a QAP 4.1b, nebolo možné zaradiť na konkrétne miesto, preto v tabuľke nie sú uvedené (pozri obr. 5-1). Rovnako nebolo u týchto aliel možné určiť presnú polohu polymorfnych miest v oblasti -330 – -368, preto v tabuľke uvedené nie sú (obr. 5-1).

	-650	-640	-630	-620	-610	-590	-580	-570						
ref. sekv.	CTGGCC	CAGGC	GCGGTGGCTC	ATGCC	TGTA	TCTGA	GTACT	TTGGG	AGGCT	GATCATGAGG	TCAGG	AGT	TC	AAGACCAGCG
QAP 1.1	-----	A-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.2 A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.2 B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 3.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 4.1 A	-----	Δ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	AT	-----	G	-----
QAP 4.1 B	-----	Δ	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	AT	-----	G	-----

	-560	-550	-540	-530	-520	-510	-500	-490					
ref. sekv.	TGGCC	AACAT	ATGTA	AACCC	CGTCT	CTACT	AAAAA	TACAA	AAAT	TAGCTG	GGCGTGGTGG	CAGGTGCTG	CAGTCCAGC
QAP 1.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.2 A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.2 B	-----	-----	T	-----	T	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 3.1	-----	-----	-----	-----	-----	C	-----	C	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 4.1 A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 4.1 B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	-480	-470	-460	-450	-440	-430	-420	-410						
ref. sekv.	TACT	TGGGAG	GGTGAGGGAG	GAGAATCGCT	TGAA	TCGGG	AGGCAAAGGT	TGCAG	TGAGC	CGAGA	CCTTG	CCAT	TGT	ACC
QAP 1.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.2 A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.2 B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 3.1	-----	C	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	-----
QAP 4.1 A	-----	-----	AT	-----	A	-----	T	-----	T	-----	-----	-----	A	-----
QAP 4.1 B	-----	-----	AT	-----	A	-----	T	-----	T	-----	-----	-----	A	-----

	-400	-390	-380	-370	-360	-350	-340						
ref. sekv.	TCAGC	CTGGG	TGACA	GAGTG	AGACT	ACGTC	T C- AAAAA	AAA	AGAAAA	AAGAA	AAAGG	AAAAA	AAAGA
QAP 1.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G	-----	-----	A	-----
QAP 1.2 A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.2 B	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	-----
QAP 1.4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	-----
QAP 3.1	A	-----	-----	-----	G	-----	G	-----	-----	-----	-----	A	-----
QAP 4.1 A	-----	-----	-----	A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 4.1 B	-----	-----	-----	A	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

	-330	-320	-310			
ref. sekv.	AAAAC	ACCCA	TCCTCT	TGC	GACTG	GCAGAT
QAP 1.1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.2 A	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.2 B	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 1.4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
QAP 3.1	-----	G	-----	-----	-----	-----
QAP 4.1 A	-----	G	-----	-----	-----	-----
QAP 4.1 B	-----	G	-----	-----	-----	-----

**A:**

	-320	-330	-340	-350	-360	-370
refseq	ATAAAATTTT	CTCTTTTTTT	TCCCTTTTCT	TTCTTTTTTC	TTTTTTTTTA	AAACGTAATC
4-2	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTT~CTTTCT	TTCTTTTTTT	TTTTTT~A	AAATATAATC
4-7	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTT~CTTTCT	TTCTTTTTTT	TTTTTT~A	AAATATAATC
37-1	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTT~CTTTCT	TTCTTTTTTT	TTTTTT~A	AAATATAATC
37-2	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTT~CTTTCT	TTCTTTTTTT	TTTTTTTTTA	AAATATAATC
37-5	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTT~CTTTCT	TTCTTTTTTT	TTTTTTTT~A	AAATATAATC
37-6	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTT~CTTTCT	TTCTTTTTTT	TTTTTTTT~A	AAATATAATC
31-2	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTT~A	AAATATAATC
31-3	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTT~A	AAATATAATC
31-4	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTT~A	AAATATAATC
31-5	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTT~A	AAATATAATC
31-8	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTT~A	AAATATAATC
45-1	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	CTTTTTTTTT	TTTTTT~A	AAATATAATC
45-2	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	CTTTTTTTTT	TTTTTT~A	AAATATAATC
45-3	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTT~A	AAATATAATC
45-4	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTCTTTTT	TTTTTTTT~A	AAATATAATC
45-5	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTCTTT~A	AAATATAATC
52-1	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTT	TTTTTTTTTT	TTTT~A	AAATATAATC
52-3	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTCTTTT~A	AAATATAATC
52-5	ATAAACATTT	CTTTTCTTCT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTT~A	GAATGTAATC
52-6	ATAAGCATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTT~A	AAATATAATC
52-8	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTT~A	AAATATAATC
80-1	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTT~A	AAATATAATC
80-2	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTT~A	AAATATAATC
80-3	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTT~A	AAATATAATC
80-4	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTT~A	AAATATAATC
80-8	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTT~A	AAATATAATC
82-4	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTTCT	TTTTTTTTTT	TTTTTT~A	AAATATAATC
82-6	ATAAACATTT	CTTTTCTTTT	TTTTCTTCT	TTATTTTTTT	TTTTTT~G	AAATATAATC

**B:**

	-520	-530	-540
refseq	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	GAAATTTCAC
12-5	TTTATATTTT	TAATAAAAAA	AAAAATCCAC
12-6	TTTATATTTT	TAATAAAAAA	AAAAATTCAC
89-2	TTTATATTTT	TAATAAAAAA	AAAAATTCAC
20-2	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	GAAATTTCAC
20-3	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	AAAAATTCAC
20-4	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	GAAATTTCAC
20-5	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	GAAATTTCAC
20-7	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	GAAATTTCAC
46-1	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	GAAATTTCAC
46-2	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	GATATTTCAC
46-3	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	GAAATTTCAC
81-5	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	GAAATTTCAC
81-7	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	AAAACTTCAC
86-2	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	GAA~TTTCAC
86-4	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	AAAAATTCAC
86-5	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	GAAATTTCAC
86-8	TTTATATTTT	TAATAAAAAAC	GAAGTTTCAC

**Obr. 5-1** – Polymorfne miesta, na základe ktorých boli sekvencie náležiacie do skupiny aliel QAP 1.4 (A) a QAP 1.2 (B) rozdelené do dvoch podskupín. Uvedené sú sekvencie negatívneho reťazca po konverzii bisulfidom. **A:** celou čiarou sú vyznačené miesta, ktorými sa sekvencie od darcov 4 a 37 líšia od ostatných sekvencií. Je možné, že alela QAP 4.1 sa od ostatných aliel líši aj deléciou/deléciami umiestnenou v oblasti -330 – -368, preto presnú polohu ďalších polymorfnych miest (vyznačené len na referenčnej sekvencii tmavým pozadím) nebolo možné určiť. **B:** sekvencie od darcov 12 a 89 (QAP1.2A) sa od ostatných (QAP 1.2B) sekvencií QAP 1.2 líšia jednonukleotidovou zámienou v pozícií -526 a -539.

### Poznámka k nezaradeným sekvenciám

Podľa určenia ostatných sekvencií darcu 32 vieme, že má v promótoe alely QAP 1.3 a 3.1. Sekvencia 32-5 je v oblasti približne -277 až -155 zhodná so sekvenciou alely QAP 1.3, v oblasti do -277 sa zase zhoduje so sekvenciou alely QAP 3.1. Darca 73 má v promótoe alely QAP 1.3 a 2.1. Sekvencia 73-7 vyzerá v oblasti -245 až -155 ako alela QAP 2.1, vo vzdialenejšej oblasti sa ale nepodobá žiadnej nami zistenej alele. Podobne je na tom sekvencia 81-8, ktorá bola na základe polymorfizmu v známej oblasti (tab. 5-3) zaradená medzi alely

QAP 1.2, vo vzdialenejšej oblasti sa však líši od všetkých ostatných aliel. Jej zvláštnosťou je aj prítomnosť 1-2 metylačných miest, ktoré sa nenachádzajú na ostatných alelách (v 1 prípade ide o zámenu TA→CG, v druhom prípade CA→CG, čo môže byť aj chyba v bisulfitovej konverzii alebo sekvenácii).

Prítomnosť týchto sekvencií nebolo možné vysvetliť chybou v niektorom kroku práce. Sekvencie 73-7 a 81-8 by mohli byť patriť novému typu alely. Darcom 73 je žena, ktorá bola v čase odberu krvi tehotná, takže je možné, že bola zachytená DNA jej dieťaťa (Hromadnikova *et al.*, 2005). Sekvencia 32-5 by mohla byť produktom crossing-overu medzi alelami QAP 1.3 a 3.1. Darcom 32 je žena, ktorá mala deti, ale v čase odberu mala okolo 50 rokov, čo možnosť prítomnosti buniek dieťaťa znižuje, ale nevylučuje (Evans *et al.*, 1999).



## 6. Diskusia

Gény HLA II. triedy obsahujú v blízkej promotorovej oblasti regulačné sekvencie, ktoré sú zásadné pre expresiu týchto molekúl. Viazu sa na ne špecifické transkripčné faktory, ktoré vytvoria platformu pre naviazanie koaktivátoru CIITA, a spoločne s ním kooperujú pri aktivácii transkripcie (Reith *et al.*, 2005).

Prítomnosť CpG miesta v týchto regulačných oblastiach (ako je X, Y, alebo S box), ktorého metylácia by bránila väzbe transkripčného faktora a zároveň by toto miesto bolo subjektom alelicky špecifickej metylácie by bola kontraproduktívna. Výhradná expresia jednej alely génu HLA namiesto dvoch by jedinca znevýhodnila a tým by sa znížila šanca na udržanie metylovanej alely v populácii. Táto situácia v promotore génu HLA-DQA1 nemôže nastať, pretože jeho promotorové alely QAP v neobsahujú kľúčových regulačných sekvenciách, s výnimkou alely QAP 4.2 (ktorú sa nám nepodarilo zachytiť), žiadne CpG dinukleotidy.

Ovplyvnenie expresie jednotlivých aliel tohto génu bude teda prebiehať skôr na jemnejšej úrovni. Prvou možnosťou je ovplyvnenie štruktúry chromatinu, kedy by rôzna hustota metylácie CpG miest nastavovala rôzne vysoký prah, ktorý musia transkripčné aktívatory prekonať. Vylúčiť sa nedá ani blokácia väzby transkripčných faktorov na vzdialenejšie regulačné sekvencie.

V tejto práci bol stanovený metylačný stav promotorových aliel génu HLA-DQA1 QAP 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 3.1 a 4.1.

Pozorovali sme rozdiel v metylácii CpG miesta -639 medzi alelou QAP 4.1 (viac metylovaná) a alelami QAP 1.1 a 3.1. Alela QAP 4.1 je asociovaná s génom DQA1\*0501 a alela QAP 3.1 je asociovaná s génom DQA1\*0301. Britten *et al.* (2009) pozorovali, že mRNA alely DQA1\*0501 je exprimovaná v menšej miere, než mRNA aliel DQA1\*0301 a \*0103 (pričom alela \*0301 bola voči ostatným alelám systematicky nadexprimovaná). Donner *et al.* (2002) zase zistili hierarchiu expresie mRNA DQA1\*03>\*01>\*0201>\*05. Tieto zistenia súhlasia so silou promotorov génu DQA1 – DQA1\*0301>\*0101>\*0501 (tj. QAP 3.1>1.x>4.1) (Morzycka *et al.*, 1997) a DQA1\*0301>\*0102, \*0501 (QAP 3.1>1.x, 4.1) (Britten *et al.*, 2009), ktorá bola určená v transfekčných pokusoch s reportérovým génom. Medzi celkovou metyláciou aliel QAP 4.1 a 3.1 neboli pozorované žiadne rozdiely. Možnosť, že by k ich odlišnej expresii prispievalo jediné rozdielne metylované CpG miesto v mieste promotora -639 je otázna, najmä keď uvážime veľký vplyv nukleotidových zámien v regulačných sekvenciách v blízkej promotorovej oblasti (Indovina *et al.*, 1998; Morzycka *et al.*, 1997). V prípade, že by sa pri regulácii týchto QAP aliel uplatňovala metylácia DNA,

nemúsi jej účinok spočívať v množstve, ale v rozmiestnení jednotlivých metylovaných CpG dinukleotidov (tab. 5-6).

Zistená bola nižšia celková metylácia alely QAP 1.1 v porovnaní s alelami QAP 1.4 a 4.1, blízko významnosti bol rozdiel medzi alelou QAP 1.1 a QAP 1.2. Ďalej bol pozorovaný rozdiel v metylácii v CpG mieste -193 medzi alelami QAP 1.2 a QAP 1.4, kde viac metylovaná je alela QAP 1.4. V mieste -374 je alela QAP 1.3 metylovaná menej než všetky ostatné alely. O rozdieloch v sile týchto promotorov však nie je známe nič. Britten *et al.* (2009) síce pozorovali určité rozdiely (u 4 osôb) v množstve mRNA aj v skupine aliel DQA1\*01, ale keďže promotory QAP 1.x sú voči alelám DQA1\*01 promiskuitné, nedá sa s istotou určiť, o ktoré promotory presne išlo.

Promiskuita aliel skupiny QAP 1.x však otvára zaujímavú možnosť zvýšenia rôznorodosti prezentácie antigénu kombináciou kvality (DQA1), aj kvantity (QAP), čo pevná asociácia ostatných promotorových aliel so svojimi génmi neumožňuje.

Pozorovali sme nižšiu metyláciu najsilnejšej z promotorových aliel, QAP 3.1, v mieste -540 promotorovej oblasti v porovnaní s alelami QAP 1.1 a 1.3. Rozdiel bol blízko významnosti aj pre zvyšné 2 alely s CpG dinukleotidom v tejto pozícii, QAP 1.2 a 1.4. Celková metylácia alely QAP 3.1 je priemerná (9 metylovaných CpG miest/alela, ostatné alely 7,7-10,2). V prípade, že by miesto -540 bolo podstatné pre rozdiely v sile promotorov, robilo by to zrejme blokáciou väzby nejakého faktora regulujúceho transkripciu. Na aktivite tohto promotora sa podieľajú aj polymorfne miesta v regulačných oblastiach v blízkom promotore (Morzycka *et al.*, 1997).

Je nutné dodať, že v jednej štúdií bola pozorovaná relatívne vyššia expresia alely DQA1\*04, kým rozdiel v relatívnej expresii ostatných aliel génu DQA1 pozorovaný nebol (Fernandez *et al.*, 2003). Hierarchia sily medzi jednotlivými promotormi teda zatiaľ nie je jasne určená.

Nie je možné porovnanie výsledkov s ďalšími prácami, pretože metyláciou génov HLA II. triedy sa doteraz zaoberala jedine práca Toyody *et al.* (1992), ktorí zistili pomocou restriktčných enzýmov rozdielnu metyláciu v jednom mieste 5'URR génov HLA-DQB1.

Obmedzením našich výsledkov je, že boli získané na malom počte vzoriek. Výsledky mohla skresliť aj skutočnosť, že nie sú známe všetky polymorfne miesta v promotorovej oblasti, takže u niektorých aliel nebolo možné určiť, či ide o nemetylované CpG miesto, alebo o pôvodnú sekvenciu TpG.

## Záver

Epigenetické javy sú dedičné zmeny v jadrovom chromatíne, ktoré sa týkajú najmä modifikácií v promótorových a regulačných sekvenciách DNA a môžu sa v priebehu života meniť. Táto štúdia sa zaoberá epigenetickou reguláciou molekúl HLA a jej úlohou v imunitnom systéme. Určité alely HLA predstavujú významné rizikové faktory mnohých autoimunitných chorôb. Vzhľadom k tomu, že sú známe variability v regulačných sekvenciách medzi alelami HLA II. triedy, predpokladali sme, že existujú aj variability na úrovni metylácie DNA medzi nimi. Túto hypotézu sa mi podarilo vo svojej diplomovej práci potvrdiť pre gén DQA1.

Bola zistená korelácia medzi genotypom a metyláciou DNA u aliel QAP 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 3.1 a 4.1 promotora génu DQA1. Celková metylácia alely QAP 1.1 bola nižšia než metylácia aliel QAP 1.4 a 4.1. Pozorované boli aj rozdiely v metylácii jednotlivých CpG dinukleotidov: v mieste -639 je alela QAP 4.1 metylovaná viac než alely QAP 1.1 a 3.1; v mieste -540 je alela QAP 3.1 metylovaná menej než alely QAP 1.1 a 1.3; v mieste -374 je alela QAP 1.3 metylovaná menej než všetky ostatné alely s CpG dinukleotidom na danom mieste; a na pozícii -193 je alela QAP 1.4 metylovaná viac než alela QAP 1.2. CpG dinukleotidy na konkrétnej pozícii nie sú prítomné u všetkých sekvenciách.

Spojenie medzi zisteným vzorom metylácie danej alely a silou promotora sa nepodarilo odhaliť. Ďalej boli zistené doteraz neznáme polymorfizmy v oblasti -643 – -300 promotora génu DQA1.

V rámci mojej PhD práce budú osekvenované alely promotora génu DQA1, aby boli zachytené všetky pozície, na ktorých sa nachádzajú CpG dinukleotidy. Práca bude rozšírená o ďalších nosičov jednotlivých aliel. Následne bude stanovená expresia mRNA a proteínového produktu jednotlivých aliel, ako aj acetylácia histónov. Rovnakej analýze ako gén DQA1 bude podrobený aj gén DQB1, ktorého produkt dimerizuje s produktom génu DQA1 a spolu vytvárajú molekulu HLA-DQ na povrchu bunky.

Alely HLA II. triedy predstavujú najdôležitejší a najsilnejší predispozičný genetický faktor chorôb spojených s imunitnou dysreguláciou, ako sú nielen autoimunitné, ale aj alergické ochorenia. Objasnenie ich epigenetickej regulácie je dôležitým predpokladom k porozumeniu etiopatogenézy týchto chorôb. Lepšie znalosti o mechanizmoch, ktoré aktivujú imunitný systém cez komplex HLA, by mohli prispieť ku zvýšeniu účinnosti prevencie a liečby autoimunitných, ako aj alergických ochorení.

## **Zoznam použitých obrázkov**

1-1: Černá M. (2008): Genetics of autoimmune diabetes mellitus. Wien Med Wochenschr.;158(1-2):2-12.

1-2: Černá M, Žďárský E, Anděl M. (2000): HLA systém a diabetes mellitus 1. typu. Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa 3 (2): 83-91.

1-3: Černá M, Žďárský E, Anděl M. (2000): HLA systém a diabetes mellitus 1. typu. Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa 3 (2): 83-91.

1-4: Indovina P, Megiorni F, Ferrante P, Apollonio I, Petronzelli F, Mazzilli MC. (1998): Different binding of NF-Y transcriptional factor to DQA1 promoter variants. Hum Immunol. Dec;59(12):758-67.

1-5: <http://www.med.ufl.edu/biochem/keithr/fig1pt1.html>

## Zoznam literatúry

Andersen LC, Beaty JS, Nettles JW, Seyfried CE, Nepom GT, Nepoom BS. (1991): Allelic polymorphism in transcriptional regulatory regions of HLA-DQB genes. *J Exp Med.* Jan 1;173(1):181-92.

Babbitt BP, Allen PM, Matsueda G, Haber E, Unanue ER.(1985): Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *J Immunol.* 2005 Oct 1;175(7):4163-5.

Benoist C, Mathis D. (1990): Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other letters of the alphabet. *Annu Rev Immunol.*;8:681-715.

Britten AC, Mijovic CH, Barnett AH, Kelly MA (2009): Differential expression of HLA-DQ alleles in peripheral blood mononuclear cells: alleles associated with susceptibility to and protection from autoimmune type 1 diabetes. *Int J Immunogenet.* 36(1):47-57.

Brünnler G, Haas JP, Fan LA, Petzl-Erler ML, Volgger A, Yao Z, Wassmuth R, Albert ED, Middleton D, Barboni F, Contu L, Alvarez LR, Ferrara GB, Adorno D, Gorodezky C, Alaez C, Cerna M, Mazzilli MC (1997): DQA1 promoter polymorphism: 12th International Histocompatibility Workshop study. In Charron D ed.: Genetic diversity of HLA. Functional and Medical Implication. EDK Paris 171-175.

Cordovado SK, Hancock LN, Simone AE, Hendrix M, Mueller PW. (2005): High-resolution genotyping of HLA-DQA1 in the GoKinD study and identification of novel alleles HLA-DQA1\*040102, HLA-DQA1\*0402 and HLA-DQA1\*0404. *Tissue Antigens.* May;65(5):448-58.

Černá M, Žďárský E, Anděl M. (2000): HLA systém a diabetes mellitus 1. typu. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa* 3 (2): 83-91.

Černá M. (2008): Genetics of autoimmune diabetes mellitus. *Wien Med Wochenschr.*;158(1-2):2-12.

Del Pozzo G, Perfetto C, Ombra MN, Ding GZ, Guardiola J, Maffei A. (1992): DNA polymorphisms in the 5'-flanking region of the HLA-DQA1 gene. *Immunogenetics*.;35(3):176-82.

Donner H, Seidl C, Rau H, Herwig J, Seifried E, Usadel KH, Badenhoop K. (2002): Unbalanced amounts of HLA-DQA1 allele mRNA: DQA1\*03 shows high and DQA1\*0501 low amounts of mRNA in heterozygous individuals. *Eur J Immunogenet*. Aug;29(4):321-30.

Evans PC, Lambert N, Maloney S, Furst DE, Moore JM, Nelson JL. (1999): Long-term fetal microchimerism in peripheral blood mononuclear cell subsets in healthy women and women with scleroderma. *Blood*. Mar 15;93(6):2033-7.

Fernandez S, Wassmuth R, Knerr I, Frank C, Haas JP. (2003): Relative quantification of HLA-DRA1 and -DQA1 expression by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Eur J Immunogenet*. Apr;30(2):141-8.

Ghotbi R, Gomez A, Milani L, Tybring G, Syvänen AC, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Aklillu E. (2009): Allele-specific expression and gene methylation in the control of CYP1A2 mRNA level in human livers. *Pharmacogenomics J*. Jun;9(3):208-17.

Glimcher LH, Kara CJ. (1992): Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription. *Annu Rev Immunol*.;10:13-49.

Haas JP, Kimura A, Andreas A, Hochberger M, Keller E, Brännler G, Bettinotti MP, Nevinny-Stickel C, Hildebrandt B, Sierp G, et al. (1991): Polymorphism in the upstream regulatory region of DQA1 genes and DRB1, QAP, DQA1, and DQB1 haplotypes in the German population. *Hum Immunol*. 1994 Jan;39(1):31-40.

Haas JP, Kimura A, Truckenbrodt H, Suschke J, Sasazuki T, Volgger A, Albert ED. (1995): Early-onset pauciarticular juvenile chronic arthritis is associated with a mutation in the Y-box of the HLA-DQA1 promoter. *Tissue Antigens*. May;45(5):317-21.

Hendrich B, Tweedie S. (2003): The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet*. 2003 May;19(5):269-77. Review.

- Hořejší V, Bartůňková J. (2009): *Základy imunologie*. 4. vydanie. Triton, Praha. ISBN 978-80-7387-280-9.
- Hromadnikova I, Vesela K, Benesova B, Nekovarova K, Duskova D, Vlk R, Spalova I, Gerychova R, Hakenova A, Rosenbaumova Z, Vlasin P, Vlachova A, Palasek V, Roznakova E, Calda P. (2005): Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping from maternal plasma in alloimmunized pregnancies. *Prenat Diagn.* Dec;25(12):1079-83.
- Cheng X, Blumenthal RM. (2010): Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry.* 2010 Apr 13;49(14):2999-3008.
- Chou SD, Tomasi TB. (2008): Spatial distribution of histone methylation during MHC class II expression. *Mol Immunol.* 2008 Feb;45(4):971-80.
- Indovina P, Megiorni F, Ferrante P, Apollonio I, Petronzelli F, Mazzilli MC. (1998): Different binding of NF-Y transcriptional factor to DQA1 promoter variants. *Hum Immunol.* Dec;59(12):758-67.
- Jaenisch R, Bird A. (2003): Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* Mar;33 Suppl:245-54.
- Kappler JW, Roehm N, Marrack P. (1987): T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell.* Apr 24;49(2):273-80.
- Kerkel K, Spadola A, Yuan E, Kosek J, Jiang L, Hod E, Li K, Murty VV, Schupf N, Vilain E, Morris M, Haghghi F, Tycko B. (2008): Genomic surveys by methylation-sensitive SNP analysis identify sequence-dependent allele-specific DNA methylation. *Nat Genet.* 2008 Jul;40(7):904-8.
- Klitz W, Maiers M, Spellman S, Baxter-Lowe LA, Schmeckpeper B, Williams TM, Fernandez-Viña M (2003): New HLA haplotype frequency reference standards: high-resolution and large sample typing of HLA DR-DQ haplotypes in a sample of European Americans. *Tissue Antigens.* Oct;62(4):296-307.

- Klose RJ, Bird AP. (2006): Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* Feb;31(2):89-97.
- Kološtová K, Černá M, Anděl M. (2002): Hypotézy asociácie HLA molekúl s ochoreniami autoimunitného charakteru. *Časopis lékařů českých* 141(24):755-762.
- Lan J, Hua S, He X, Zhang Y. (2010): DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* Apr;42(4):243-52.
- Lo HS, Wang Z, Hu Y, Yang HH, Gere S, Buetow KH, Lee MP. (2003): Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Res.* 2003 Aug;13(8):1855-62.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215–1215
- Morzycka-Wroblewska E, Harwood JI, Smith JR, Kagnoff MF. (1993): Structure and evolution of the promoter regions of the DQA genes. *Immunogenetics.*;37(5):364-72.
- Morzycka-Wroblewska E, Munshi A, Ostermayer M, Harwood JI, Kagnoff MF. (1997): Differential expression of HLA-DQA1 alleles associated with promoter polymorphism. *Immunogenetics* 45(3):163-70.
- Novota P, Černá M, Anděl M. (2002): Metódy na identifikáciu polymorfizmu HLA antigénov. *Cas Lek Cesk.* Mar 29;141(6):171-5.
- Perfetto C, Zacheis M, McDaid D, Meador JW 3rd, Schwartz BD. (1993): Polymorphism in the promoter region of HLA-DRB genes. *Hum Immunol.* Jan;36(1):27-33.
- Razin A, Riggs AD. (1980): DNA methylation and gene function. *Science.* Nov 7;210(4470):604-10.
- Reichstetter S, Krellner PH, Meenzen CM, Kalden JR, Wassmuth R. (1994): Comparative analysis of sequence variability in the upstream regulatory region of the HLA-DQB1 gene. *Immunogenetics.*;39(3):207-12.



- Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM. (2005): Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol.* 2005 Oct;5(10):793-806.
- Robinson J, Waller MJ, Fail SC, McWilliam H, Lopez R, Parham P, Marsh SG. (2009): The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res.* Jan;37(Database issue):D1013-7.
- SRudy GB, Lew AM. (1997): The nonpolymorphic MHC class II isotype, HLA-DQA2, is expressed on the surface of B lymphoblastoid cells. *J Immunol.* 1997 Mar 1;158(5):2116-25.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989): *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 2. vydanie, Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0879693091.
- Sherman PA, Basta PV, Ting JP. (1987): Upstream DNA sequences required for tissue-specific expression of the HLA-DR alpha gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun;84(12):4254-8.
- Shewey LM, Beaty JS, Andersen LC, Nepom GT. (1992): Differential expression of related HLA class II DQ beta genes caused by nucleotide variation in transcriptional regulatory elements. *J Immunol.* Feb 15;148(4):1265-73.
- Scholl T, Pitcock A, Jones B. (1992): Hypomethylation of MHC class II Eb gene is associated with expression. *Immunogenetics.*;36(4):255-63.
- Singal DP, Qiu X, D'Souza M, Sood SK. (1993): Polymorphism in the upstream regulatory regions of HLA-DRB genes. *Immunogenetics.*;37(2):143-7.
- Sullivan KE, Peterlin BM. (1987): Transcriptional enhancers in the HLA-DQ subregion. *Mol Cell Biol.* Sep;7(9):3315-9.
- Toyoda H, Redford A, Magalong D. (1992): Allele-specific methylation in the 5'-regulatory region of class II DQ beta genes in the human major histocompatibility complex (MHC): relationship to autoimmune disease susceptibility. *Dis Markers.* Jan-Feb;10(1):7-18.
- Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. (2008): Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res.* Jul-Aug;659(1-2):40-8.

Wolff GL, Kodell RL, Moore SR, Cooney CA.(1998): Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J.* Aug;12(11):949-57.

Zhang Y, Rohde C, Reinhardt R, Voelcker-Rehage C, Jeltsch A. (2009): Non-imprinted allele-specific DNA methylation on human autosomes. *Genome Biol.*;10(12):R138.

## Príloha

Skúmaná oblasť promótoru génu HLA-DQA1. Vonkajšie primery sú vyznačené modrou farbou, vnútorné primery červenou farbou.

CpG dinukleotidy sú vyznačené modrým pozadím. Známe polymorfné miesta v tejto oblasti (Brünnler *et al.*, 1997; Cordovado *et al.*, 2005) sú vyznačené sivým pozadím.

```
-850                                     -801
TTTTATACCGT ATTGTGGAAG TTAAAAGAAA AATAGTTAAT TTATATATAG
-800                                     -751
AAGTTAGAGA AAGGGTAGGG GATGGGGATT GTTAGGGAGG GAAATTAATT
-750                                     -701
TAGGGAAAAA TTTTGGAGG TTGTAAGTTA GAATATTTTG AAGGATGTCG
      metF1-DQA1 →
-700                                     -651
TATAATTGAT GATTTTATTT ATTTACGAGG TTGTTTAGAA ATGTTTATTT
      metF2-DQA1 →
-650                                     -601
TTGGTTAGGC GCGGTGGTTT ATGTTTGTA AATTGAGTATT TTGGGAGGTT
-600                                     -551
GAGACCGGGTA GATTATGAGG TTAGGAGTTT AAGATTAGCG TGGTTAATAT
-550                                     -501
AGTGAATTTT CGTTTTTATT AAAAATATAA AAATTAGTTG GGCGTGGTGG
-500                                     -451
TAGGTGTTTG TAGTTTTAGT TATTTGGGAG GGTGAGGGAG GAGAATCGTT
-450                                     -401
TGAATTCGGG AGGTAAAGGT TGTAGTGAGT CGAGATTTTG TTATTGTATT
-400                                     -351
TTAGTTTGGG TGATAGAGTG AGATTCGTT TTAAAAAAA AGAAAAAGAA
-350                                     -301
AAGAAAAAGG AAAAAAAGA AAAATATTTA TTTTTTTTGC GATTGGTAGA
-300                                     -251
TATGTATATA TTAGAGAAGA TTTTAATTTA ATGTTTTTTT TTTATTTATA
-250                                     -201
GAATAATTTT TTAAGTTTAT TTTGAGTAGA GGTTGTATTA TAA---GGGG
-200                                     -151
ATTGTTTCGT TTTTTTTTAG GGTTTTAAAT ATAAATTTT TAATTAGTAA
      ATTAATCATT
-150                                     -101
TTGAGATGTT ATTATAGGGG ATTTTTTTTAA TTGGTTAAAA TTTGATTTGG
AACTCTACAA TAATATCCCC TAAAA ← metR2-DQA1 ACTAAACC
-100                                     -51
TAGGGTTTGG TTTGGGTGTT TTTAGATTTT TTTGTTTTGA GGTTTTTATA
ATCCCAAACC AAAC ← metR1-DQA1
-50                                     -1
ATTATTTTAT AGTTTAGAAT ATTAATTGTT GAGGTTGTTT TGGGAAGAGG ATG
```