

## **Abstrakt**

**Úvod:** Diabetes mellitus 1. typu (T1D) je multifaktoriální autoimunitní onemocnění, jehož incidence v Evropě neustále roste. Největší genetické riziko T1D je spojováno s geny HLA (lidské leukocytární antigeny) II. třídy. HLA II. třídy hrají klíčovou úlohu při regulaci imunitní odpovědi. Podílejí se na selekci T buněčného repertoáru v thymu a na prezentaci antigenních peptidů CD4<sup>+</sup> T lymfocytům. Exprese genů HLA II. třídy je regulována pomocí regulačních sekvencí, které se nacházejí 150 – 300 párů bazí před místem iniciace transkripce. Polymorfismy v těchto regulačních sekvencích souvisí s rozvojem některých autoimunitních onemocnění. V oblasti promotorové sekvence genu *HLA DQA1* bylo identifikováno několik různých promotorů *HLA DQA1* (pojmenované jako alely QAP). Alely QAP jsou uchovávány souhlasně s haplotypem. Alely QAP mají různou promotorovou sílu a ovlivňují expresi dané alely genu *HLA DQA1*. Promotorová síla alel QAP může být ovlivněna methylací DNA.

**Cíle:** Naším cílem bylo určit methylační profil promotorů genu *HLA DQA1* a stanovit expresi jednotlivých alel genu *HLA DQA1* u pacientů s T1D.

**Metody:** Do studie bylo zahrnuto 30 diabetiků 1. typu (věkové rozmezí 21 - 76 let). Nejprve byl zjištěn jejich genotyp HLA II. třídy (*HLA DRB1*, *HLA DQA1* a *HLA DQB1*) pomocí sekvenčně specifických primerů. Genomická DNA byla ošetřena bisulfitem a amplifikovaný promotorový úsek genu *HLA DQA1* byl klonován do bakterií *E. coli*, kmen DH5 $\alpha$ . Selektce transformovaných bakterií proběhla na LB agarových miskách obsahujících ampicilin, X – Gal a IPTG. Pozitivně transformované bakteriální klony byly ověřeny pomocí colony PCR a sekvenovány. Určení hladiny exprese alel genu *HLA DQA1* v plné krvi na úrovni mRNA bylo stanoveno pomocí kvantitativního PCR.

**Výsledky:** Byly zjištěny statisticky významné rozdíly v celkové methylaci alel QAP a dále pak rozdíly na methylační pozici -311. Nejvýznamnější statisticky signifikantní rozdíl v celkové methylaci QAP alel byl nalezen mezi alelou 2.1 a 1.3 ( $P = 0,0280$ ). Zatímco alela 2.1 byla na pozici -311 kompletně methylována, alela 1.4 nebyla methylována vůbec ( $P = 0,0064$ , CI (95%) = 0,00009178 – 0,3116). Hladina exprese mRNA *HLA DQA1\*03* byla oproti hladinám ostatních alel vyšší.

**Klíčová slova:** Diabetes mellitus 1. typu, HLA II. třídy, HLA DQA1, promotor, polymorfismus, methylace DNA.