

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Dominika Gécová

Epigenetická regulácia génu *DQB1* u pacientov s *diabetes mellitus* 1. typu
Epigenetic regulation of *DQB1* gene in patients with type 1 *diabetes mellitus*

Diplomová práca

Školiteľ: Ing. Anna Kotrbová-Kozak, Ph.D.

Praha, 2014

Vyhlásenie

Vyhlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Praze, 13.8.2014

.....
Dominika Gécová

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala doc. MUDr. Marii Černej, CSc., za možnosť vypracovávať diplomovú prácu na Ústave obecné biologie a genetiky 3. LF UK v Praze. Ďalej by som sa chcela poďakovať mojej školiteľke Ing. Anne Kotrbovej-Kozak, Ph.D. za cenné rady a odborné vedenie v priebehu diplomovej práce.

Špeciálne poďakovanie patrí Mgr. Marte Zajacovej a ostatným kolegom z laboratória za pomoc, rady a priateľský pracovný kolektív.

V neposlednej rade patrí poďakovanie aj mojim rodičom, ktorí ma počas štúdia podporovali.

ABSTRAKT

Úvod: *Diabetes mellitus* 1. typu je multifaktoriálne autoimunitné ochorenie spôsobené postupnou deštrukciou beta buniek Langerhansových ostrovčekov pankreasu. Z genetického hľadiska tvoria podstatnú časť predispozície (40 – 50%) gény HLA II. triedy, ktorých molekuly prezentujú exogénne peptidy CD4+ T lymfocytom. Faktory prostredia hrajú taktiež dôležitú úlohu v etiopatogenéze T1DM. Jedným zo spôsobov komunikácie prostredia s genotypom je epigenetická regulácia vo forme metylácie DNA. Stupeň metylácie v regulačných oblastiach týchto génov môže výrazne ovplyvňovať úroveň expresie.

Cieľ: Cieľom diplomovej práce bolo určiť metylačný stav jednotlivých alel *HLA-DQB1* u pacientov s *diabetes mellitus* 1. typu a stanoviť ich expresiu.

Metódy: Pacientom bol určený genotyp HLA II. triedy (*HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*) pomocou sekvenčne špecifických primerov. DNA bola ošetrená bisulfitom a amplifikovaná regulačná oblasť génu *HLA-DQB1* a zaklonovaná do baktérií *E.coli* DH5 α /XL1-Blue. Po overení boli pozitívne klony zaslané na sekvenáciu a výsledky podrobené analýze. RNA bola prepísaná do cDNA pomocou reverznej transkripcie a úroveň expresie bola určená pomocou kvantitatívnej PCR.

Výsledky: Štatisticky významné rozdiely boli nájdené v celkovej metylácii alel *DQB1**0201 a *0302 v úseku B. V jednotlivých metylačných miestach bol preukázaný rozdiel medzi alelami *DQB1**0201 a *0302 v pozícii 1894, 2179, 2200, 2302 a 2304 v úseku exónu 2 – intrónu 2 (úsek B). V pozícii 2179, 2200, 2302 a 2304 bola viac metylovaná alela *DQB1**0302, zatiaľ čo v pozícii 1894 bola kompletne metylovaná alela *DQB1**0201. Štatisticky významný rozdiel v úrovni expresie bol nájdený medzi alelami *DQB1* *0202 a *0501(*0501 exprimovaná viac), *0301 a *0302 (*0301 exprimovaná viac), *DQB1**0302 a *0501(*0501 exprimovaná viac).

Kľúčové slová: *diabetes mellitus* 1. typu, epigenetický, HLA II. triedy, *HLA DQB1*

ABSTRACT

Background: Type 1 *diabetes mellitus* is a multifactorial disease caused by beta cell destruction of Langerhans pancreatic islets. From the genetic aspect the main predisposition lays on HLA class II genes (40 – 50%), molecules of which present exogenous peptides to CD4+ T lymphocytes. Environmental factors play a crucial role in the etiopathogenesis of T1DM. Through epigenetic regulation (e.g. DNA methylation) the genetic and environmental factors communicate. The level of methylation in the regulatory regions can significantly affect expression of these genes.

Aims: The aim of the master thesis was to define methylation profile of HLA *DQB1* alleles in type 1 *diabetes mellitus* patients and determine their expression.

Methods: The genotyping of HLA class II genes (*HLA-DRB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*) was performed using sequence specific primers. DNA was treated with sodium bisulfite, regulatory region of *HLA DQB1* was amplified and cloned into *E.coli*, strain DH5 α /XL1-Blue. Positive clones were sent for sequencing and results analyzed. RNA was transcribed to cDNA by reverse transcription and the level of expression was analyzed by quantitative PCR.

Results: Statistically significant differences were found in total methylation of *DQB1**0201 and *0302 alleles in the B section of *DQB1* gene. Difference in methylation at single methylation sites was found in *DQB1**0201 and *0302 alleles at position 1894, 2179, 2200, 2302 and 2304 in the exon 2 – intron 2 (B section). Allele *DQB1**0302 was methylated more at position 2179, 2200, 2302 and 2304, however allele *DQB1**0201 was completely methylated at position 1894. Statistically significant differences in expression levels were found between alleles *DQB1* *0202 and *0501 (higher *0501 expression), *0301 and *0302 (higher *0301 expression), *DQB1**0302 and *0501 (higher *0501 expression).

Keywords: type 1 *diabetes mellitus*, epigenetic, HLA class II, *HLA DQB1*

OBSAH

1. ÚVOD.....	10
2. PREHLAD LITERATÚRY.....	11
2.1 <i>Diabetes mellitus</i> 1. typu.....	11
2.1.1 Epidemiologická distribúcia	12
2.1.2 Klinické a imunologické znaky	12
2.1.3 Etiopatogenéza <i>diabetes mellitus</i> 1. typu.....	13
2.1.4 Externé spúšťače.....	15
2.2 Genetické pozadie <i>diabetes mellitus</i> 1. typu	17
2.2.1 HLA molekuly a <i>diabetes mellitus</i> 1. typu	18
2.2.2 Molekulárne mechanizmy T1DM predispozície	23
2.2.3 Non-HLA gény v predispozícii T1DM.....	25
2.3 Epigenetika.....	28
2.3.1 DNA metylácia a DNA metyltransferázy	29
3. CIELE PRÁCE	34
4. MATERIÁL.....	35
4.1 Pufry, roztoky a komerčné súpravy	35
4.2 Použité prístroje a zariadenia	41
4.3 Zoznam počítačových programov.....	42
5. METÓDY A POSTUP PRÁCE.....	43
5.1 DNA analýza.....	43
5.1.1 Izolácia DNA z plnej krvi.....	43
5.1.2 HLA genotypizácia	44
5.1.8 Izolácia a prečistenie PCR produktu.....	50
5.1.9 Klonovanie.....	51
5.1.10 Pridanie polyA koncov a prečistenie	51
5.1.11 Príprava kompetentných buniek	52
5.1.12 Transformácia kompetentných buniek.....	54
5.1.13 Overenie pozitívne transformovaných kolónií	54
5.1.14 Izolácia plazmidovej DNA	54
5.1.15 Izolácia plazmidovej DNA alkalickou lýzou.....	55

5.1.16	Izolácia plazmidu – QIAGEN Plasmid Mini Kit.....	56
5.1.17	Štiepenie plazmidovej DNA restriknými endonukleázami.....	57
5.1.18	Sekvenácia	58
5.2	RNA analýza	58
5.2.1	Izolácia RNA	58
5.2.2	Reverzná transkripcia	59
5.2.3	Kvantitatívna PCR.....	61
5.3	Štatistická analýza.....	62
6.	VÝSLEDKY	63
6.1	Genotypizácia HLA II. triedy	63
6.2	Analýza metylácie DNA v regulačnej oblasti génu <i>HLA DQB1</i>	63
6.2.1	Porovnanie celkovej metylácie alel v regulačnej oblasti génu <i>DQB1</i>	64
6.2.2	Porovnanie jednotlivých metylačných pozícií v regulačnej oblasti génu <i>DQB1</i>	66
6.3	Kvantitatívna PCR	68
6.3.1	Analýza úrovne expresie mRNA u alel <i>HLA DQB1</i>	68
6.3.2	Overenie špecifity primerov pre kvantitatívnu PCR.....	69
6.3.3	Porovnanie expresie jednotlivých alel génu <i>DQB1</i>	70
7.	DISKUSIA.....	73
8.	ZHRNUTIE	76
9.	PRÍLOHY	84

ZOZNAM SKRATIEK

21A, 21B	21-hydroxyláza
5mC	5-metylcytozín
A	adenín
APC	antigén prezentujúce bunky
BB	Biobreeding
B _f	properdin faktor B
C	cytozín
CIITA	transaktivátor génov HLA II. triedy
C2, C4A, C4B	komplementové proteíny C2, C4A, C4B
CD	cluster of differentiation
CLIP	invariantný peptidový reťazec asociovaný s HLA II. triedy
CpA	dinukleotid cytozín-fosfát-adenín
CpG	dinukleotid cytozín-fosfát-guanín
CpT	dinukleotid cytozín-fosfát-tymín
Csk	C-Src kináza
CTLA-4	antigén asociovaný s cytotoxickými T lymfocytami
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA metyltransferáza
dsDNA	dvojvláknová DNA
ER	receptor pre estrogén
EST	expressed sequence tag
FoxP3	Forkhead box P3
G	guanín
GAD	glutamát dekarboxyláza
GADA	protilátka glutamát dekarboxylázy
GITR	glukokortikoidmi indukovaný TNF receptor
HADC	histón deacetyláza
HLA	ľudské leukocytárne antigény

HMT	histón metyltransferáza
Hsp277	proteín teplotného šoku 277
IA-2	antigén ostrovčeku-2
IAA	inzulínové autoprotilátky
IAP	intracisternálna A-partikula
ICA	protiľátky ostrovčekov
ICF	syndróm zahŕňajúci Imunodeficiencie, Centromerickú instabilitu a Faciálne anomálie
IDDM	inzulín-dependentný <i>diabetes mellitus</i>
IFIH1	interferónom indukovaná helikáza
Ii	invariantný reťazec
IL	interleukíny
IL2RA	receptor pre interleukín-2
INS	gén kódujúci inzulín
LADA	latentný autoimunitný diabetes dospelých
MBP	metyl-CpG-viažuce proteíny
MHC	hlavný histokompatibilný komplex
MIC	reťazec MHC I. triedy
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NKT	prirodené zabíjačské T lymfocyty
NOD	neobézne diabetické
Obr.	obrázok
p69	proteín Langerhansových ostrovčekov
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PML	promyelocytárny leukemický gén
PTPN22	lymfatická tyrozín fosfatáza
RAR	receptor kyseliny retinovej
RER	drsne endoplazmatické retikulum
RNA	ribonukleová kyselina
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus

T	tymín
T1DM	<i>diabetes mellitus</i> 1. typu
T2DM	<i>diabetes mellitus</i> 2. typu
Tab.	tabuľka
TCR	T bunkový receptor
T _h	pomocné T lymfocyty
TNF	tumor nekrotizujúci faktor
VNTR	variabilný počet tandemových repetícií
VP	vírusový proteín
Znt8	zinkový transportér 8
β ₂ m	β ₂ -mikroglobulín
λ _s	populačná záťaž

1. ÚVOD

Diabetes mellitus 1. typu (T1DM) je orgánovo-špecifické autoimunitné ochorenie charakterizované deštrukciou beta buniek pankreatických ostrovčekov mediovanou T_h1 bunkami. Najčastejšie je zachytenené u detí a dospelých kaukazského pôvodu. V patogenéze autoimunitného ochorenia sú zahrnuté ako genetické tak aj environmentálne faktory, ktorých proces vedie k vzniku ochorenia. T1DM je multifaktoriálne ochorenie, v ktorom 40 – 50% dedičnej predispozície tvoria gény HLA II. triedy – HLA-DR-DQ (Harrison *et al.*, 2008). Asociácia jednotlivých protektívnych/ predispozičných alel génu HLA-*DQB1* závisí aj od etnického pozadia jednotlivých populácií. U kaukazskej populácie sú s T1DM pozitívne asociované alely *DQB1**0201 a *DQB1**0302, zatiaľ čo v japonskej populácii sú to alely *DQB1**0401 a *DQB1**0303 (Mosaad *et al.*, 2012). Avšak ani u jednotlivcov s predispozičnými alelami sa T1DM vyvinúť nemusí. Spúšťač autoimunity najčastejšie prichádza ako externý podnet z prostredia – vírusová infekcia, toxíny alebo antigény kravského mlieka.

Interakcia prostredia tvorí taktiež podstatnú časť podieľajúcu sa na etiopatogenéze T1DM. Dôkazom, že environmentálne faktory sú dôležitými modifikátormi v patogenéze T1DM je v diskordancii výskytu ochorenia medzi monozygotnými dvojčatami. Práve prostredníctvom epigenetických modifikácií máme možnosť študovať interakcie medzi prostredím a genotypom, ktorých výsledkom je variabilita fenotypu. Epigenetickými mechanizmami nazývame zmeny, ktoré nemenia nukleotidovú sekvenciu DNA, ale menia úroveň ich expzie do RNA a proteínov. Najviac popisovanými epigenetickými modifikáciami sú metylácia cytozínov v CpG dinukleotidoch, post-translačné kovalentné modifikácie histónových proteínov zahŕňajúce acetylácie, metylácie, fosforylácie, ubikvitinácie, sumoylácie a mnohé ďalšie. Tretím mechanizmom je expresia krátkych nekódujúcich RNA, ktoré po väzbe na transkribovanú RNA spôsobia jej represiu alebo degradáciu. V prípade epigenetickej dysregulácie, môže dochádzať k rôznym ochoreniam – najviac preskúmané sú nádorové ochorenia. Zmeny v expresii génov HLA II. triedy spôsobené epigenetickými modifikáciami sa môžu vo výraznej miere podieľať na etiopatogenéze tohto autoimunitného ochorenia. Preto medzi hlavnými cieľmi tejto diplomovej práce je skúmať metylačný stav rôznych alel HLA-*DQB1* a súvislosť s ich expresiou.

2. PREHLAD LITERATÚRY

2.1 *Diabetes mellitus* 1. typu

Primárnou úlohou imunitného systému je rozpoznanie a eliminácia infekčných a cudzorodých agensov s následnou reparáciou spôsobených poškodení. V určitých situáciách však môže imunitný systém zlyhať a navodiť v hostiteľskom organizme imunopatologické reakcie, ktoré poškadzujú telo hostiteľa. V prípade, že imunitný systém reaguje na telu vlastné antigény (autoantigény), vyvíja sa autoimunitné ochorenie. Častým markerom autoimunitných reakcií sú autoprotiľátky asociované s daným ochorením (Černá, 2008).

Medzi autoimunitné ochorenia patrí aj *diabetes mellitus* 1. typu (T1DM, z angl. *type 1 diabetes mellitus*), ktorý je vo väčšine prípadov spôsobený autoimunitnou deštrukciou inzulín produkujúcich beta buniek pankreasu. Chronická deštrukcia beta buniek Langerhansových ostrovčekov pankreasu má za dôsledok dysreguláciu anabolizmu a katabolizmu (Černá, 2008). Ochorenie má nástup u detí v relatívne rannom veku a charakteristickými príznakmi bývajú polyúria, polydipsia a strata hmotnosti. Avšak existuje podskupina ochorenia, ktorá nesie skratku LADA (z angl. *latent autoimmune diabetes of adults*). Z imunologického hľadiska sa jedná o rovnaké ochorenie ako T1DM, no postihuje vo väčšine prípadov dospelých ľudí a progresia ochorenia je pomalá. Pravdepodobne 10% pacientov diagnostikovaných s *diabetes mellitus* 2. typu (T2DM, z angl. *type 2 diabetes mellitus*) sú v skutočnosti pacienti s ochorením LADA (Furlanos *et al.*, 2005).

Diabetes mellitus 1. typu nesie charakteristické znaky autoimunitného ochorenia: 1. Ochorenie je asociované so špecifickými haplotypmi ľudského leukocytárneho antigénu II. triedy (HLA, z angl. human leukocyte antigen). 2. Sú detekovateľné autoprotiľátky voči autoantigénom beta buniek (GAD65, IA-2, ICA, IAA). 3. Histologicky je možné detekovať mononukleárnu infiltráciu na pankreatickom ostrovčeku (Černá, 2008).

Diabetes mellitus 1. typu môžeme definovať ako multifaktoriálne ochorenie. Ku komplexnej charakteristike T1DM prispieva z genetického hľadiska viacero lokusov, ale aj environmentálne faktory, ktoré hrajú dôležitú úlohu pri určovaní rizika ochorenia. Veľké množstvo dôkazov naznačuje, že dedičné genetické faktory ovplyvňujú citlivosť, ale aj odolnosť k ochoreniu (Pociot a McDermott, 2002).

2.1.1 Epidemiologická distribúcia

Špecifický znak T1DM je rôznorodá geografická ako aj etnická distribúcia. *Diabetes mellitus* 1. typu je ochorenie najviac rozšírené v populácií detí a dospievajúcich kaukazského pôvodu, kde sa vyskytuje približne u 0,4% populácie. Najvyššia miera prevalencie je u obyvateľov Fínska a Sardínie (36/100 000/za rok); naopak najnižšia prevalencia je u obyvateľov Japonska, Číny a Venezuely (0,1/100 000/za rok) (Rønningen *et al.*, 2001). Taktiež frekvencia T1DM varíruje u rôznych etnických skupín či rás žijúcich na určitom geografickom území. U belochov je vyššia prevalencia ochorenia ako u černochoch či miešancov (Mestici, Mulati, Zambovia) (Karvonen *et al.*, 1996).

Na základe výskumu EURODIAB ACE Study Group (2000) boli identifikované dva hlavné znaky, ktoré majú vplyv na frekvenciu a distribúciu T1DM u detí. Prvým znakom je stabilný ročný nárast incidencie ochorenia o 3% v severských európskych krajinách, ktorý bol pozorovaný počas jednej dekády. Druhým znakom je fakt, že v globálnom meradle má Európa najvyššie zastúpenie a pravdepodobnosť T1DM u pacientov, avšak s regionálnymi rozdielmi. *Diabetes mellitus* 1. typu je multifaktoriálne ochorenie, t.j. je ovplyvňované interakciou genetických a environmentálnych faktorov. Zvýšený výskyt T1DM nemožno vysvetliť iba na základe genetických mechanizmov. Geografické rozdiely vo výskyte T1DM pravdepodobne plynú z rôznej distribúcie environmentálnych faktorov alebo génov, alebo ich kombináciou (Rønningen *et al.*, 2001). Výskyt ochorenia celosvetovo narastá a pri pokračovaní tohto trendu sa odhaduje, že nové prípady T1DM u európskych detí mladších ako 5 rokov sa zdvojnásobia medzi rokmi 2005 a 2020 a prípady detí mladších ako 15 rokov vzrastú o 70% (Patterson *et al.*, 2009).

2.1.2 Klinické a imunologické znaky

Diabetes mellitus 1. typu (T1DM) je chronické ochorenie spôsobené úplnou absenciou sekretovaného inzulínu. Toto ochorenie je asociované s poškodením a dlhodobou dysfunkciou niekoľkých orgánov a tkanív. Chronická hyperglykémia pri T1DM poškodzuje najmä nervovú sústavu, oči, obličky, srdce a cievy (Report of the expert committee on the diagnosis and classification of *diabetes mellitus*, 2003). Primárne poškodenie vzniká bunkovo sprostredkovanou imunitnou odpoveďou, kde T_h1 bunky (CD4+) aktivujú špecifické cytotoxické T bunky (CD8+) a makrofágy namierené proti beta bunkám pankreasu. Zánik inzulín-produkujúcich buniek Langerhansových ostrovčekov je spôsobené cytokínom, tumor necrosis

factor alpha (TNF- α), ktorý na povrchu buniek vytvorí póry. Tomuto javu sa hovorí aj „bozk smrti“ (z angl. *kiss of death*). Strata β -buniek vedie k prevahe α -buniek sekretujúcich glukagón, ktorá má za príčinu úplnú absenciu inzulínu a sekundárnu hyperglukagonémiu (Gianani *et al.*, 2010).

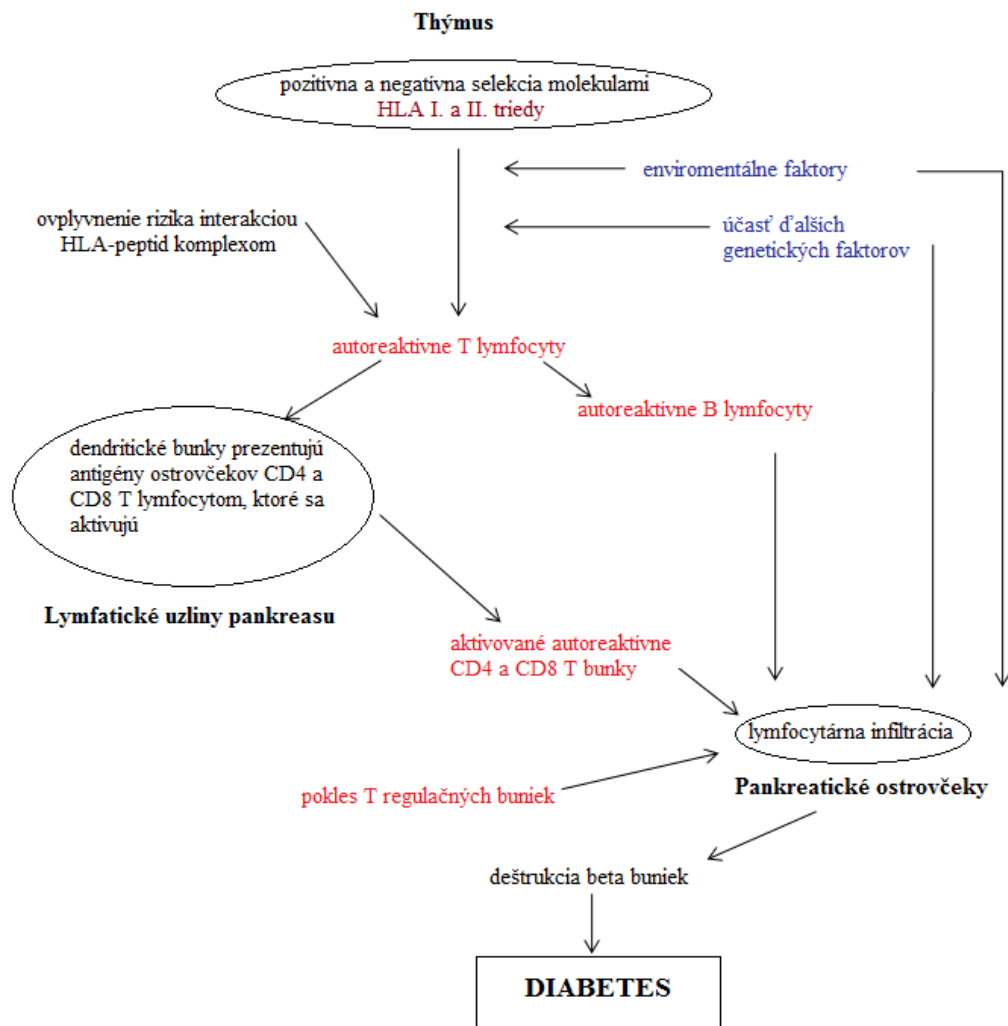
Kriticky dôležitými faktormi pri poruchách imunitnej odpovedi sú regulačné T lymfocyty. Regulačné T lymfocyty exprimujú vo veľkom množstve α -reťazec receptora pre IL-2 (CD25), molekulárne markery ako napríklad FoxP3 (Forkhead box P3), CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4), GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor) (Bluestone *et al.*, 2008). Regulačné T lymfocyty majú za úlohu chrániť organizmus pred autoimunitnými reakciami a navodzujú toleranciu voči telu vlastným tkanivám (tzv. self-tolerance). Regulačnú funkciu majú najmä CD4+, ale aj iné bunky ako napríklad prirodzené zabíjačské bunky (NKT) a CD8+ (Raz *et al.*, 2005). U pacientov s T1DM bola preukázaná znížená expresia CD4+ T buniek, ktorá má vplyv na kľúčové imunitné funkcie, bunkový cyklus, signálnu transdukciu viazanú na povrchový receptor a elektrónový transport. Taktiež je redukovaná génová expresia histón deacetylázy, ktorá je dôležitým regulátorom epigenetických modifikácií. CD4+ T bunky majú preukázateľne zhoršenú funkciu, vrátane abnormálnej imunitnej odpovede, ktorá by mohla byť kľúčovým faktorom pri strate tolerancie telu vlastných antigénov (Orban *et al.*, 2007).

Dôležitými markermi autoimunitnej deštrukcie beta buniek pankreasu sú ICA (islet cell antibodies), IAA (insulin autoantibodies), GADA (glutamic acid decarboxylase antibody) a protilátky IA-2, IA-2 β (insulinoma-associated protein tyrosine phosphatase antibody) (Report of the expert committee on the diagnosis and classification of *diabetes mellitus*, 2003). Tieto protilátky pravdepodobne nie sú spojené priamo s patogenézou ochorenia, ale sú nevyhnutné z klinického hľadiska. Na ich základe môžeme rozlišovať medzi T1DM a T2DM, sledovať vývoj ochorenia od predklinického štádia u zdravých príslušníkov v rodinách, kde sa pacient s *diabetes mellitus* 1. typu vyskytuje (Schatz a Bingley, 2001).

2.1.3 Etiopatogenéza *diabetes mellitus* 1. typu

Imunologická kaskáda v etiopatogenéze T1DM pozostáva zo 4 krokov (**Obr.1**) – kontrolných bodov: 1. Včasná *maturácia T buniek v týmuse* vytvára potenciál pre autoreaktívne T bunky. V tomto zmysle špecifické HLA molekuly, ktoré viažu peptidy počas maturácie T buniek prispievajú k autoimunitným sklonom. Štruktúrne vlastnosti *HLA DQ* molekúl asociovaných

s T1DM (*DQB1*0302*) prispievajú k slabej komunikácii behom rozpoznávania T bunkami a podporujú hypotézu, v ktorej *HLA DQ* asociácie s T1DM sú vysvetlené nevhodnou a skorou T bunkovou selekciou a maturáciou. 2. V druhom kroku, sa takto vnímavá osoba k autoimunitne mení v osobu náchylnú na základe *periférnej amplifikácie* potenciálne autoreaktívnych T buniek. Proces je pravdepodobne ovplyvnený prostredím a infekciami, ktorým musí imunitný systém čeliť. Množstvo T buniek rozoznávajúce konkrétne HLA-peptidové komplexy je znásobené. V prípade, že počet T buniek presiahne určitý prah, spúšťajú sa ďalšie patologické kroky. 3. V treťom kroku dochádza k rozpoznaniu antigénu na Langerhansovom ostrovčeku a k *aktivácii* autoreaktívnych T buniek. Každá HLA molekula viaže konkrétny antigénny peptid. Sila tejto väzby ako aj stabilita HLA-peptidového komplexu neskôr určuje silu interakcie tohto komplexu s receptorom T bunky. Osud takto aktivovaných T buniek je z časti určený prostredím. Zápalové procesy a poškodenie tkaniva zvyšujú expresiu antigénov v cieľovom tkanive a uvoľňovanie lokálnych prozápalových cytokínov výsledkom čoho je chemoatrakcia a migrácia T buniek. 4. Štvrtý krok je označovaný ako *zlyhanie regulačných mechanizmov*. Výsledkom je nástup klinického ochorenia, v ktorom hrajú rolu aj gény mimo HLA lokus asociované s *diabetes mellitus* 1. typu. Je preto potrebné spomenúť, že príbuzní osôb s T1DM, u ktorých boli potvrdené autoprotiľátky, nemusia nevyhnutne k *diabetes mellitus* 1. typu progredovať (Nepom a Kwok, 1998).



Obr.1: Etiopatogenéza *diabetes mellitus 1. typu* (upr. podľa: Černá, 2008).

2.1.4 Externé spúšťače

Beta bunky pankreatického ostrovčeka majú preukázateľne vyššiu expresiu MHC molekúl I. a II. triedy na základe biopsie vzoriek od pacientov s T1DM. Genetická asociácia s HLA molekulami je veľmi dobre známa, avšak ani u jednotlivcov s genetickou predispozíciou, u ktorých boli potvrdené protilátky ICA (islet cell antibodies) sa nemusí T1DM vyvinúť. Napriek tomu, že sa prejavuje už existujúca autoimunita voči pankreasu, je potrebný spúšťač, tzv. „trigger“, ktorý vyvolá deštrukciu beta buniek (Sanjeevi *et al.*, 2002). K externým spúšťačom môže patriť napríklad vírusová infekcia, toxíny alebo kravské mlieko. Existuje niekoľko

kandidátnych antigénov ako GADA, IA-2, Hsp277 (heat shock protein), GAD65, inzulín alebo/a proinzulín a nedávno popísaný zinkový transportér (Znt8), ktoré môžu iniciovať autoimunitnú reakciu (Gorodezky *et al.*, 2006).

Niektoré vírusy môžu vyvolávať T1DM indukciou autoimunity alebo je tento proces uľahčený vďaka javu, ktorý sa nazýva „molekulárne mimikry“. *Coxsackie* vírus B4, ktorý patrí do rodu Enterovírusov, využíva čiastočne homologické sekvencie medzi 2C vírusovou proteázou a autoantigénom pankreatického ostrovčeka GAD65. Molekulárne mimikry medzi infekčným agensom (vírus) a autoantigénom sú jedným zo spôsobov ako môže vírus indukovať alebo urýchliť napadnutie hostiteľských tkanív autoreaktívnymi T bunkami (Härkonen *et al.*, 2003). Ďalšie homologické sekvencie boli odhalené medzi kapsidovými proteínmi (VP1, VP0) enterovírusu a autoantigénom ostrovčeka – tyrozínfosfatázou IA2 a heat shock proteínom 60/65 (Härkonen *et al.*, 2002). Okrem toho sa Enterovírusy vyznačujú tropizmom k pankreatickým beta bunkám. *Coxsackie* vírus B ako aj iné sérotypy enterovírusov môžu infikovať ľudské pankreatické ostrovčeky, replikovať sa v beta bunkách *in vitro* a následne stimulovať produkciu cytokínov (Hober, 2010).

V prípade výživy detí sa názory na potenciálny efekt kravského mlieka na výskyt T1DM značne líšia. Podľa štúdie vo Fínsku v roku 1992, mali deti s recentne diagnostikovaným ochorením T1DM zvýšené hladiny imunoglobulínu G proti bovinnému sérum albumínu (srvátkový proteín) a β kazeínu. Väčšina protilátok bola namierená proti peptidu ABBOS, zloženého zo 17 aminokyselín. Spomínaný ABBOS peptid má príbuznú sekvenciu proteínu p69, ktorý je na povrchu buniek Langerhansových ostrovčekov. Autori predpokladali, že skorá expozícia kravskému mlieku môže spúšťať imunitnú odpoveď a viesť k autoimunitnej reakcii na beta bunkách mechanizmom molekulárnej mimikry (Karjalainen *et al.*, 1992). Avšak v neskoršej štúdií bola zistená negatívna T bunková proliferácia v odpovedi na antigény kravského mlieka, ktorá viedla k spochybneniu hypotézy molekulárnej mimikry. Výsledky podporovali fakt, že imunitná reakcia v prípade bovinného sérum albumínu nie je obmedzená len na T1DM pacientov (Atkinson *et al.*, 1993). Jedným z vysvetlení opisuje Pateraki *et al.*, ktorí merali protilátkovú odpoveď k niekoľkým autoantigénom alebo telu vlastným proteínom (napríklad dsDNA, aktín, tubulín, thyroglobulín, myozín, myoglobulín, transferín, interferon a bovinný sérum albumín) u pacientov so systémovým *lupus erythematoses* a zdravých kontrol. Vo väčšine prípadov pacienti s autoimunitným ochorením vytvárali protilátky s vyššou afinitou ku všetkým

antigénom. Protilátky voči bovinnému sérum albumínu u pacientov s T1DM môžu byť taktiež vysvetlené ako porucha imunologickej tolerancie (všeobecne vyššia afinita vlastných reaktívnych protilátok), ktorá súvisí s autoimunitou a nie selektívnou imunitou špecifickou pre beta bunky (Pateraki *et al.*, 1986).

U niektorých jedincov môže autoimunitnú reakciu proti beta bunkám vyvolať jediný spúšťač. Napriek tomu je veľmi nepravdepodobné, že existuje iba jeden exogénny determinant pre T1DM. Jedná sa o zložité interakcie medzi rôznymi environmentálnymi faktormi a medzi environmentálnymi faktormi a genetickou predispozíciou, ktoré vedú k progresii tohto ochorenia (Knip a Akerblom, 1999). Medzi ďalšie potenciálne exogénne spúšťače boli zaradené aj toxíny, glutén, deficiencia vitamínu D, stres a mnohé iné (Akerblom *et al.*, 2002).

2.2 Genetické pozadie *diabetes mellitus* 1. typu

Diabetes mellitus 1. typu je multifaktoriálne ochorenie s prevalenciou výskytu 0,4% v bežnej populácii. V rámci rodín s výskytom tohto ochorenia je možné pozorovať klastrovanie genetických faktorov s prevalenciou výskytu 6% u súrodencov (Karvonen *et al.*, 2000). Populačná záťaž (λ_s), ktorú môžeme vyrátať ako podiel rizika u súrodencov ku všeobecnému riziku v populácii (6,0/0,4), je u T1DM λ_s hodnota 15. Genetická predispozícia u rodinných členov závisí na stupni genetickej totožnosti s probandom, v ktorých počet alel zhodných s probandom koreluje nelineárne s rizikom T1DM. Najvyššie riziko bolo pozorované u monozygotných dvojčiat (zdieľajú 100% alel), nasledované prvostupňovými a druhostupňovými príbuznými (50% a 25%) (Risch, 1987).

Genetika T1DM má za sebou dlhú históriu štúdií hodnotiacich kandidátne gény, ktoré by mohli byť asociované s ochorením. Napriec štúdiami, dve chromozomálne oblasti boli objavené a asociované s T1DM. Konzistentné a signifikantné výsledky priniesla oblasť pre ľudské leukocytárne antigény (HLA, z angl. human leukocyte antigens) na chromozóme 6p21.3 a oblasť génu pre inzulín na chromozóme 11p15 (Pociot a McDermott, 2002).

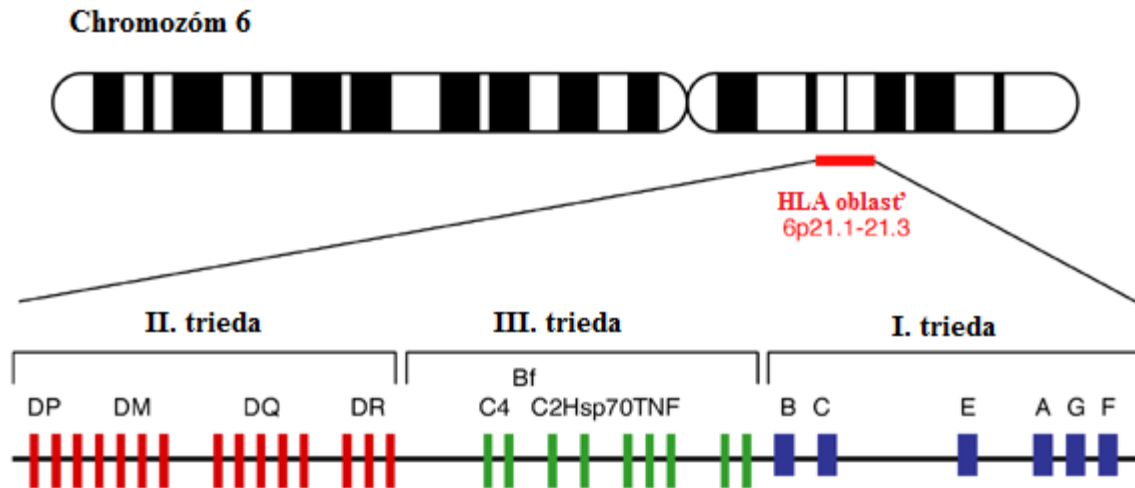
V 70.ých rokoch minulého storočia boli stanovené hlavné úlohy HLA génov v T1DM predispozícii (podiel lokusu HLA na ochorení sa označuje ako IDDM1). Variabilita v manifestácií ochorenia u súrodencov, ktorí zdieľajú dva, jeden alebo nula rodičovských HLA haplotypov, ako aj u monozygotných verzus dizygotných dvojčiat, v riziku u príbuzných

a všeobecné rozšírenie v populácií naznačuje existenciu genetických faktorov mimo HLA lokus (Pociot a McDermott, 2002).

Diabetes mellitus 1. typu je polygénne ochorenie a na jeho prejave sa podieľa takmer 40 doposiaľ známych lokusov. Dáta zo štúdie Type 1 Diabetes Genetics Consortium ukazujú, že gény HLA II. triedy ako aj ďalšie gény vrámci HLA lokusu sú zodpovedné za najvyššie riziko vzniku T1DM. Gény mimo HLA lokusu takisto prispievajú k všeobecnému riziku, avšak ich samotný príspevok je oveľa menší než u HLA (Concannon *et al.*, 2005). K štúdiu etiológie ochorenia prispievajú okrem pacientov aj zvieracie modely. Vo výskume T1DM sú najviac využívané hlodavce, medzi nimi najmä tzv. NOD myši (z angl. *nonobese diabetic*) a BB (Biobreeding) potkany (Biobreeding Laboratories, Ontario, Kanada). Tieto modely vykazujú významné podobnosti v genetických a environmentálnych vplyvoch, ako aj v patogenéze ochorenia s T1DM u ľudí (Acharjee *et al.*, 2013).

2.2.1 HLA molekuly a *diabetes mellitus* 1. typu

Najlepšie preštudovaným a dokázaným komponentom genetickej zložky T1DM sú HLA gény, ktoré boli a sú študované v populáciách, rodinách ako aj na zvieracích modeloch. Odhaduje sa, že HLA (IDDM 1) sa v 40-50% podieľajú na predispozícii tohto ochorenia v rodine (Risch, 1987). Oblasť hlavného histokompatibilného komplexu (MHC, z angl. major histocompatibility complex), u ľudí označovaného ako HLA, je lokalizovaná na krátkom ramene chromozómu 6 (6p21.3). Táto oblasť zahŕňa približne 3500 kb DNA a obsahuje najmenej 150 génov (Dorman a Bunker, 2000). Na základe funkcie je HLA komplex rozdelený na tri hlavné oblasti: HLA I. triedy, II. triedy a III. triedy (**Obr.2**). Oblasť HLA I. a II. triedy kóduje molekuly, ktoré sú dôležité v imunitnom rozpoznávaní (Černá, 2008). Štatisticky najsilnejšia genetická asociácia s T1DM je u HLA génov II. triedy.



Obr.2: Génová mapa HLA oblasti na chromozóme 6 (upr. podľa: Mehra a Kaur, 2003).

2.2.1.1 HLA I. triedy

Proteínový komplex HLA I. triedy je transmembránový dimér zostavený z dvoch odlišných polypeptidov: ťažšieho α reťazca a nekovalentne viazaného ľahšieho reťazca nazvaného β_2 -mikroglobulín (β_2m). V α reťazci možno rozlíšiť tri domény; dve N-terminálne, α_1 a α_2 , ktoré vytvárajú väzbové miesto pre peptidy. Tretia doména (α_3) a β_2m sú štruktúrne podobné imunoglobulínovým doménam (Hořejší a Bartůňková, 2009) (Obr.3). HLA I. triedy sú exprimované na povrchu takmer všetkých jadrových somatických buniek a ich funkciou je prezentácia antigénnych peptidov CD8⁺ cytotoxickým T bunkám. Obsahujú „klasické lokusy“ A, B, C a „neklasické“ lokusy E, F, G a pseudogény H, J, K, L. V tejto oblasti sú prítomné aj tzv. MIC gény (z angl. MHC class I chain-related genes). Rodina génov MIC zahŕňa tri pseudogény: MIC-C, MIC-D, MIC-E a dva funkčné gény: MIC-A a MIC-B. MIC-A molekuly sú transmembránové glykoproteíny indukované stresom. (Hardy *et al.*, 1986).

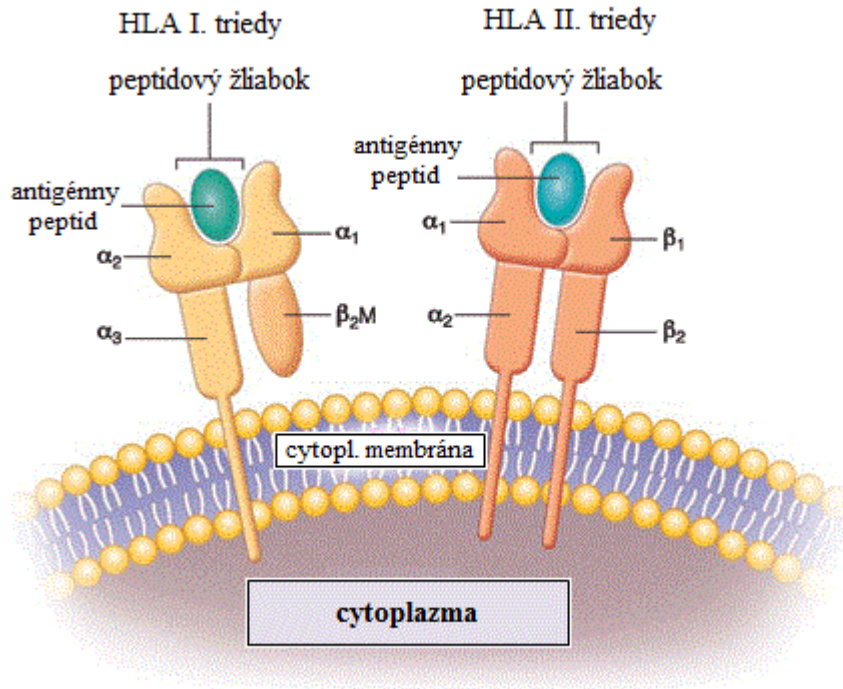
HLA molekuly I. triedy prezentujú endogénne antigény, derivované z vírusov a intracelulárnych baktérií, ktoré rozpoznáva imunitný systém. Tento proces zahŕňa ubikvitináciu endogénnych cytosolických proteínov a následnú degradáciu na peptidy veľkosti 8 – 16 aminokyselín, ktoré optimálne viažu glykoproteínové molekuly HLA I. triedy. Peptidy sú transportované do drsného endoplazmatického retikula, kde sa viažu na molekuly HLA I. triedy a sú transportované na povrch buniek. Prezentovaný antigén na povrchu buniek je rozoznávaný

CD8+ T bunkami a NK bunkami. Tieto aktivované bunky pôsobia v prvej línii vrodenej imunitnej odpovedi (Gough a Simmonds, 2007).

2.2.1.2 HLA II. triedy

Molekuly HLA II. triedy sú heterodiméry zložené z dvoch transmembránových proteínov - ťažký α reťazec a ľahký β reťazec. Oba polypeptidové reťazce sú glykozylované a vzájomne spojené nekovalentnou väzbou. Extracelulárna časť molekuly je tvorená dvoma doménami (α_1, α_2 a β_1, β_2), ktoré sú pripojené krátkou sekvenciou k transmembránovej časti zloženej z asi 39 aminokyselín (**Obr.3**). Funkcia molekúl HLA II. triedy spočíva v prezentácii peptidov derivovaných z extracelulárnych antigénov pomocným CD4+ T bunkám. Väzbové miesto pre peptid (tzv. peptidový žliabok) je vytvorené z dvoch domén – α_1 a β_1 . Na rozdiel od uzavretého žliabku I. triedy, majú molekuly HLA II. triedy peptidový žliabok na oboch koncoch otvorený (Kontsek a Kontseková, 2004). Oblasť HLA II. triedy zahŕňa tri lokusy DR, DQ a DP. Každý lokus obsahuje gény α , β a pseudogény.

Molekuly sú exprimované na povrchu antigén prezentujúcich buniek (monocyty, makrofágy, B lymfocyty, dendritické bunky a aktivované T lymfocyty) a sú syntetizované na drsnom endoplazmatickom retikule (RER) spolu s invariantným reťazcom (Ii), ktorý predchádza väzbe molekúl HLA II. triedy s endogénnym peptidom. Invariantný reťazec je neskôr degradovaný a je ponechaný iba krátky fragment - CLIP (z angl. class II-associated invariant chain peptide), ktorý sa zamení za peptid (Villadangos, 2001). HLA-peptidový komplex je potom transportovaný na povrch bunky a rozoznávaný CD4+ T_h bunkami.



Obr.3: Stavba molekúl HLA I. a II. triedy (upr. podľa: Wai a Foley - Transplant Immunology: Basic Immunology and Clinical Practice).

2.2.1.3 HLA III. triedy

Gény HLA III. triedy kódujú ostatné molekuly, ktoré sa podieľajú na imunitných reakciách: 21-hydroxyláza (21A, 21B), zložky komplementu (C2, C4A, C4B), properdin faktor B (B_f), heat shock proteín 70 (Hsp70) a tumor nekrotizujúci faktor (TNFA, TNFB) (Černá, 2008).

HLA gény sú významné vďaka ich obrovskej polymorfii v ľudskom genóme: A lokus – 489 alel, B lokus – 830 alel, C lokus – 266 alel, E lokus – 9 alel, F lokus – 21 alel, G lokus – 23 alel, DRB1 lokus – 463 alel, *DQB1* lokus – 78 alel, DPB1 lokus – 125 alel, DRA1 lokus – 3 alely, *DQA1* lokus – 34 alel, DPA1 lokus – 23 alel (Černá, 2008).

2.2.1.4 Asociácia T1DM s génmi HLA II. triedy

Asociácia medzi T1DM a HLA molekulami bola identifikovaná pred viac ako 20 rokmi. Prvé asociácie sérologicky definovaných alel B8 a B15 boli nájdené medzi HLA I. triedy. Postupom času bol definovaný lokus *HLA DR*, kde boli sérotypy DR4 a DR3 spájané s T1DM v oveľa väčšej miere než B8 a B15. Spomínaný DR4 je haplotyp obsahujúci rodinu odlišných *HLA DR* a *DQ* molekúl. To vedcov viedlo k záveru, že gén *DQB1* z lokusu *HLA DQ* je významne asociovaný s T1DM (Todd a Bain, 1992). Štatisticky najsilnejšia genetická asociácia s T1DM je medzi konkrétnymi alelami *HLA-DQA1*, *DQB1* a *DRB1* (**Tab. 1**). Avšak vďaka silnej väzbe génov medzi týmito lokusmi, je veľmi ťažké študovať individuálny efekt *HLA DQ* a *DR* génov (Pociot a McDermott, 2002).

Mnohé štúdie dokazujú predispozičný efekt alely *DQB1*0302* a zvýšenú pravdepodobnosť T1DM pri heterozygotickej kombinácii alel *DQA1*0301-DQB1*0302* v DR4 haplotype a *DQA1*0501-DQB1*0201* v DR3 haplotype. *DQA1*0301-DQB1*0302* je najčastejšie sa vyskytujúci predispozičný haplotyp v kaukazskej populácii s výskytom 74% u pacientov s T1DM, nasledovaný haplotypom *DQA1*0501-DQB1*0201* u 52% pacientov kaukazského pôvodu (Sanjeevi *et al.*, 2002). Naproti tomu, haplotyp *DQA1*0102-DQB1*0602* je asociovaný ako protektívny voči *diabetes mellitus* 1. typu aj v prípade prítomnosti T1DM špecifických autoprotiátok a predispozičných alel. Jediná kópia alely *DQB1*0602* postačuje pre negatívnu asociáciu s T1DM. Výskyt tejto alely u pacientov je menej ako 1% vo väčšine študovaných populácií (Pugliese *et al.*, 1995).

Asociácia jednotlivých *DQB1* alel s T1DM predispozíciou respektíve protektivitou závisí aj na etnickej a rasovej príbuznosti danej populácie. Zatiaľ čo kaukazská populácia je pozitívne asociovaná s *DQB1*0201* a *DQB1*0302*, v japonskej populácii sú to prevažne alely *DQB1*0401* a *DQB1*0303*. V nedávnej štúdií Mosaad *et al.* prvýkrát identifikovali pozitívnu asociáciu alely *DQB1*0202* s *diabetes mellitus* 1. typu v egyptskej populácii. Je známe, že Egypťania sú zmiešaného etnického pôvodu (Stredný východ, afrického a európskeho), čo prináša cenné dáta pre štúdium ďalších etnických skupín (Mosaad *et al.*, 2012).

Tab. 1: Alely a haplotypy HLA II. triedy asociované s diabetes mellitus 1. typu. Tabuľka zobrazuje predispozičné a protektívne haplotypy ako aj relatívne riziko výskytu T1DM u ľudí s týmto haplotypom. (upravené podľa: Pociot a McDermott, 2002).

<i>HLA-DQ alely</i>	<i>HLA-DR alely</i>	RR*
<i>Pozitívna asociácia s T1DM (predispozičné haplotypy)</i>		
A1*0301-B1*0302	DRB1*04	2.5 - 9.5
A1*0501-B1*0201	DRB1*301	2.5 - 5.0
A1*0501-B1*0302	DRB1*301/DRB1*04	12.0 - 32.0
A1*0301-B1*0201	DRB1*301/DRB1*04	
A1*0301-B1*0402	DRB1*04/DRB1*801	4.0 - 15.0
A1*0301-B1*0201	DRB1*701	8.0 - 13.0
A1*0301-B1*0201	DRB1*901	5.5
A1*0301-B1*0401	DRB1*04	3.5 - 4.5
A1*0301-B1*0303	DRB1*901	2.0 - 4.5
<i>Negatívna asociácia (protektívne haplotypy)</i>		
A1*0102-B1*0602	DRB1*1501	0.03 - 0.2
A1*0103-B1*0603	DRB1*1301	0.05 - 0.25
A1*0301-B1*0301	DRB1*04	0.2 - 0.5
A1*0501-B1*0301	DRB1*1101	0.05 - 0.5

*Relatívne riziko (RR) platí pre kombináciu DQ-DR haplotypu vo vysoko rizikových populáciách. Existujú významné rozdiely medzi rôznymi etnickými populáciami.

2.2.2 Molekulárne mechanizmy T1DM predispozície

Tak ako všetky molekuly HLA II. triedy aj DQ je $\alpha\beta$ heterodimér tvorený génmi *DQAI* a *DQBI*. Najväčšiu genetickú predispozíciu majú alely lokusu *DQBI*, konkrétne alela *DQBI*0302* je najviac asociovaná s T1DM v mnohých etnických populáciách. Molekulárna štruktúra HLA II. triedy (napríklad molekula DQ) obsahuje na svojom povrchu žliabok, do ktorého sa viažu antigénne peptidy.

Molekula DQ3.2, ktorá je kódovaná génmi *DQBI*0302* a *DQAI*0301* v DR4 haplotype, má charakteristický štruktúrny motív pre väzbu peptidov, v ktorom sa nachádzajú štyri kontaktné body rozlišujúce aminokyseliny bočných reťazcov na antigénnych peptidoch. Tieto štyri aminokyseliny na peptide sa nazývajú „kotviace zvyšky“ a sú dôležité z hľadiska určovania afinity medzi HLA molekulou a peptidom. Nachádzajú sa v pozícií 1, 4, 6 a 9 a sú priestorovo separované ostatnými aminokyselinami. Príslušné miesta na molekule HLA, ktoré interagujú

s kotviacimi zvyškami peptidov sa nazývajú „vrecká“ a sú taktiež očíslované 1, 4, 6 a 9. Polymorfizmy vo vreckách 4 a 9 boli identifikované ako rozhodujúce vzhľadom k T1DM predispozícii (Kwok *et al.*, 1996). Peptidy obsahujúce veľkú alifatickú aminokyselinu vo štvrtom zvyšku a negatívny náboj na deviatom zvyšku tvoria stabilné komplexy s molekulami DQ3.2. Ak má ten istý peptid substitúciu na deviatom zvyšku za alanín, vytvárajú sa s molekulami DQ3.2 nestabilné komplexy, ktoré sa rýchlo rozpadajú (Nepom *et al.*, 1996).

Tým pádom *HLA-DQβ* kodón 57, tvoriaci deviate vrecko, je dôležitý pre naviazanie peptidu a jeho rozpoznávanie. Substitúcia kyseliny aspartámovej za alanín v tejto pozícii (ako je to u DQ3.2) spôsobí nedostatočný náboj a tým nižšiu väzbovú stabilitu s peptidmi, ktoré majú neutrálny alebo pozitívny náboj v deviatom aminokyselinovom zvyšku. V prípade negatívne nabitého peptidu (napríklad kyselina glutamová na deviatom aminokyselinovom zvyšku) dôjde k interakciám kodónu 57 na molekule *DQβ* a vytvoreniu stabilnej iónovej väzby (tzv. soľný mostík) s pozitívne nabitým arginínom na pozícii 79 v príľahlom reťazci *DQα* (Nepom a Kwok, 1998).

Autoantigénne peptidy s negatívnym nábojom na deviatom zvyšku sa viažu s vysokou afinitou. Peptidy s podobnými motívmi, avšak so zmenou náboja na deviatom zvyšku (alanínová substitúcia) sa viažu s nízkou afinitou. Paradoxne, autoreaktívne peptidy, ktoré sú zodpovedné za pozitívnu selekciu potenciálne autoimunitných T buniek, neobsahujú motív pre väzbu s vysokou afinitou. Samotná molekula DQ3.2 je nestabilný dimér, ktorý môže prispievať k autoimunitnej neefektívnej negatívnej selekcii autoantigénov. Negatívna selekcia funguje ako bariéra pred maturáciou autoreaktívnych T buniek. T bunky, ktoré s vysokou afinitou interagujú s HLA-peptidovými komplexami v týmuse sú za normálnych podmienok deletované. Nestabilné HLA-peptidové komplexy (ako napríklad DQ3.2 komplex), ktoré viažu peptidy s nízkou afinitou sa rýchlejšie rozpadajú a pravdepodobne nemajú dostatok času k udržaniu interakcie potrebnej pre negatívnu selekciu (Nepom a Kwok, 1998).

V zmysle tejto hypotézy, niektoré HLA molekuly, konkrétne DQ6.2 daná HLA-DR2 haplotypom *DQB1*0602-DQA1*0102*, viažu rovnaké peptidy (kompetícia s molekulou DQ3.2) s oveľa vyššou afinitou a poskytujú tým ochranu pred T1DM. Molekula DQ6.2 má najvyššiu stabilitu spomedzi všetkých *HLA DQ* molekúl.

2.2.3 Non-HLA gény v predispozícii T1DM

HLA gény v T1DM predispozícii predstavujú menej ako 50% rizika v dedičnosti tohto ochorenia, a preto podstatnú rolu zohrávajú aj gény mimo HLA lokus, tzv. *non-HLA gény*. Pri hľadaní kandidátnych génov bola použitá celogenómová väzbová analýza. Napriek tomu, že táto väzbová analýza má limitovanú úspešnosť (je možné detekovať len lokusy s výrazným efektom na predispozíciu ochorenia u súrodencov), podarilo sa identifikovať niekoľko lokusov spojených s T1DM, čo poskytlo dôkaz, že *diabetes mellitus* 1. typu má polygénny charakter (Altmüller *et al.*, 2001).

2.2.3.1 IDDM2 - oblasť génu pre inzulín (INS)

Imunologicky sprostredkovaný proces, ktorý vedie k vzniku T1DM je špecifický vzhľadom k beta bunkám na Langerhansových ostrovčekoch pankreasu. Gén pre inzulín je možným kandidátnym lokusom, pretože samotný inzulín ako aj jeho prekursori môžu zohrávať úlohu autoantigénov. Poprípade môže hladina inzulínu meniť interakcie medzi imunitným systémom a beta bunkami (Pociot a McDermott, 2002).

V regulačnej oblasti na 5' konci v géne pre inzulín (*INS*) na chromozóme 11p15.5 sa nachádza unikátny minisatelit (VNTR) zložený z tandemovej repetície 14 - 15bp (5'-ACAGGGGTGTGGGG-3'). Počet tandemových repetícií sa líši (od 26 po 200) a VNTR alely sú rozdelené do troch tried: I. trieda (26 – 63 opakovaní), II. trieda (okolo 80 opakovaní) a III. trieda (141 – 209 opakovaní) (Rotwein *et al.*, 1986). Alely II. triedy sa u kaukazskej populácie takmer nenachádzajú, pričom alelové frekvencie I. a III. triedy sú 70% a 30% (Bell *et al.*, 1984). Homozygoti pre alely I. triedy sú všeobecne asociovaní s vyšším rizikom pre *diabetes mellitus* 1. typu, a naopak alely III. triedy sú považované za protektívne. Alely *INS* III. triedy v porovnaní s alelami I. triedy vykazujú nízke hladiny *INS* mRNA v pankrease a vyššie hladiny v týmuse. Tieto zistenia podporujú hypotézu, v ktorej geneticky určené rozdiely v expresii autoantigénov v týmuse môžu ovplyvňovať vznik autoimunity. Vysoké koncentrácie inzulínu v týmuse môžu viesť k negatívnej selekcii (delécii) autoreaktívnych T buniek namierených proti vlastným autoantigénom a k navodeniu tolerancie (Pugliese *et al.*, 1997).

2.2.3.2 Lymfatická tyrozín fostatáza (*PTPN22*)

PTPN22 je jedným z ďalších génov mimo HLA lokus asociovaných s T1DM a podieľa sa priamo na aktivácii T buniek. Nachádza sa na chromozóme 1p13 a kóduje lymfatickú tyrozín fostatázu označovanú aj ako “Lyp”. Lyp inhibuje signálnu transdukciu T bunkového receptora (TCR) defosforyláciou troch kináz, ktoré sú dôležité pre TCR signalizáciu (Hill *et al.*, 2002). Lyp taktiež negatívne reguluje aktiváciu T buniek interakciou so supresorom kináz, nazývaného C-terminálna Src tyrozín kináza (Csk). Jednonukleotidový polymorfizmus (SNP) asociovaný s T1DM je zmena z C na T, ktorá sa prejaví substitúciou z arginínu na tryptofán v pozícii 620 Lyp proteínu (R620W). V štúdií, kde boli použité lymfocyty od homozygotov pre 620W, bola preukázaná inhibícia TCR signalizácie proteínom Lyp. To vedie k zníženej aktivácii T buniek, pravdepodobne k poklesu deletovaných autoreaktívnych T buniek v týmuse a k autoimunitnej (Rieck *et al.*, 2007).

Keďže varianta *PTPN22* v predispozícii T1DM reprezentuje zvýšenú inhibíciu TCR signalizácie, možnosť navrhnutia špecifického inhibítora vo forme malej molekuly alebo interferujúcej RNA, by mohla prispieť k možným preventívnym zásahom (Ounissi-Benkhalha a Polychronakos, 2008).

2.2.3.3 IDDM12 - Antigén asociovaný s cytotoxickým T lymfocytom 4 (*CTLA4*)

Ďalším z kandidátnych génov asociovaných s T1DM bol identifikovaný *CTLA4* (z angl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) na chromozóme 2q33. CTLA-4 proteín negatívne reguluje aktiváciu T buniek. Gén pre *CTLA4* kóduje koreceptor na povrchu T lymfocytov. Intracelulárna časť CTLA-4 funguje ako fostatáza, ktorá utlmuje imunitnú odpoveď tým, že interaguje s intracelulárnou doménou CD3, ktorá prenáša signál fosforyláciou ďalších substrátov v kaskáde. Táto fosforylácia je nevyhnutná pre aktiváciu T buniek po väzbe antigén-HLA komplexu a preto fostatázová aktivita CTLA-4 tlmí imunitnú odpoveď (Nistico *et al.*, 1996). CTLA-4 má dôležitú úlohu v periférnej tolerancii a zabezpečuje vývoj a homeostázu regulačných T buniek. CTLA-4 deficientné myši zomierajú na masívnu lymfoproliferáciu, pripomínajúcu autoimunitné ochorenie (Salomon *et al.*, 2000).

2.2.3.4 Receptor pre interleukín-2 α (*IL2RA*)

Gén *IL2RA* je zložený z ôsmich exónov, ktoré kódujú α reťazec IL-2 receptoru (tiež známy ako CD25+) a nachádza sa na chromozóme 10p15. *IL2RA* je dôležitým modulátorom imunity – jeho expresia na regulačných T bunkách je nevyhnutná pre supresiu imunitnej odpovede a autoimunitných ochorení. Priamym dôkazom je prenos CD25+ T buniek do recipientných NOD myši, kde dokázali oddialiť nástup T1DM po dobu 10 týždňov, poprípade sa príznaky neobjavili vôbec (Salomon *et al.*, 2000). V géne *IL2RA* boli objavené dva jednonukleotidové polymorfizmy (rs706778 a rs3118470), ktoré sú asociované s T1DM a majú v patogenéze potenciálne dôležitú úlohu zahŕňajúcu T regulačné bunky (Qu *et al.*, 2007).

2.2.3.5 Interferónom indukovaná helikáza (*IFIH1*)

Interferónom indukovaná helikáza (*IFIH1*) kóduje RNA helikázu zapojenú do vrodenej imunitnej odpovede proti vírusovej infekcii a je mapovaná na chromozóm 2q24 (Kato *et al.*, 2006). *IFIH1* gén má dôležitú úlohu chrániť hostiteľský organizmus pred vírusovou infekciou tým, že rozpoznáva vírusovú nukleovú kyselinu v cytoplazme a spúšťa bunkovú imunitnú odpoveď. Mnohé štúdie popisujú ako možný spúšťač T1DM vírusovú infekciu, čo robí z *IFIH1* vhodný kandidátny gén. Najčastejšie asociovaným markerom je SNP rs1990760, ktorý kóduje substitúciu z alanínu na threonín v kodóne 946. Z epidemiologického hľadiska sú najdôležitejšie dsRNA vírusy - enterovírusy (Smyth *et al.*, 2006).

2.3 Epigenetika

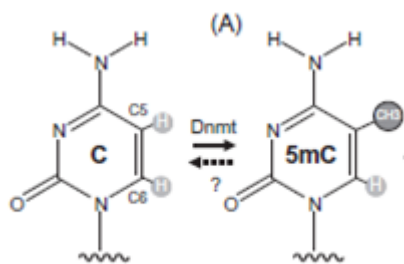
Epigenetika v širšom zmysle slova tvorí „premostenie“ medzi genotypom a fenotypom, ktoré však nezahŕňa zmeny v DNA sekvencii. Napriek tomu, že prevažná väčšina buniek v mnohobunkovom organizme zdieľa rovnaký genotyp, diferencujú sa rozmanité typy buniek s odlišnými funkciami a rôznymi profilmi génovej expresie (Goldberg *et al.*, 2007). Mnohé rozdiely v génovej expresii vznikajú pri vývoji organizmu a proliferácii buniek. Stabilné zmeny v génovej expresii nazývame termínom „epigenetické“ (doslova znamená „mimo konvenčnú genetiku“) a sú prenášané do ďalších generácií v mitóze a meióze, pričom nezahŕňajú zmeny sekvencie samotnej DNA (Jaenish a Bird, 2003). Epigenetické procesy sú dôležité pre vývoj a diferenciáciu, ale často sa vyskytujú u dospelých ľudí a myší (Issa, 2000). Hrajú dôležitú úlohu v ochrane pred vírusovými genómami, v kompenzácii génovej dávky pohlavných chromozómov u cicavcov (X inaktivácia), paternálnom a maternálnom imprintingu, etiopatogenéze nádorových ochorení, v starnutí, ale aj v odpovedi na vonkajšie podnety, ako je napríklad zloženie stravy (Jaenish a Bird, 2003).

Mnohé epigenetické štúdie sa zaoberajú kovalentnými a nekovalentnými modifikáciami DNA a histónových proteínov, a mechanizmami, ktorými tieto modifikácie ovplyvňujú chromatinovú štruktúru (Goldberg *et al.*, 2007). Základnými epigenetickými mechanizmami, ktoré kontrolujú fenotyp bunky pomocou regulácie génovej expresie sú: 1. DNA metylácie (najčastejšie v CpG ostrovoch promótorov génov počas embryonálneho vývoja, kde je potrebné umlčať gény špecificky potrebné len pre ranný vývoj organizmu) (Hanna *et al.*, 2008); 2. histónové modifikácie (modifikácie koncov histónov určujú funkčný status DNA regulačných oblastí, t.j. promótorov, v génoch) (Jenuwein a Allis, 2001); 3. RNA interferencia (vedie k represii translácie). Všeobecne prijímaný názor je, že hypermetylácia DNA a hypoacetylácia histónov smeruje k umlčaniu génov, t.j. represii génovej expresie, na druhej strane hypometylácia DNA a hyperacetylácia histónov umožňuje aktívnu transkripciu.

2.3.1 DNA metylácia a DNA metyltransferázy

DNA metylácia je najlepšie charakterizovanou chemickou modifikáciou chromatinu. U cicavcov sa DNA metylácia najčastejšie vyskytuje v CpG dinukleotidoch. Oblasti v genóme, ktoré sú bohaté na CpG dinukleotidy sú označované ako CpG ostrovy a metylácia v týchto oblastiach koreluje s represiou transkripcie (Goll a Bestor, 2005). Metylácia zahŕňa kovalentné pripojenie metylovej skupiny na 5. uhlík cytozínu (5mC), pričom donorom metylovej skupiny je S-adenozylmetionín (**Obr.4**). DNA metylácia sa môže vyskytovať aj mimo CpG ostrovov – napríklad v dinukleotidoch CpA a CpT boli objavené v embryonálnych kmeňových bunkách (Ramsahoye *et al.*, 2000). Metylové skupiny sú prenášané prostredníctvom DNA metyltransferáz (DNMTs). Špecifický metylačný vzor u cicavcov, daný či už *de novo* metyltransferázami alebo udržiavacími metyltransferázami, má dôležitú úlohu v regulácii génovej expície počas embryogenézy a gametogenézy (Goll a Bestor, 2005).

Existujú rôzne mechanizmy, ktorými môže DNA metylácia reprimovať transkripciu: 1. metylová skupina sa môže viazať v sekvenciách určených pre transkripčné faktory a blokovat' väzbu ďalších aktivátorov transkripcie. Týmto spôsobom blokuje DNA metylácia priamo transkripčnú aktiváciu. 2. Metyl-viažuce proteíny (MBPs, z angl. methyl-CpG-binding proteins) rozoznávajú metylovanú DNA a pomocou ďalších ko-represorov umlčujú transkripciu a remodelujú okolitý chromatin. 3. DNA metyltransferázy v spolupráci s histón deacetylázami (HADC) a histón metyltransferázami (HMT) umožňujú remodeláciu chromatinu a represiu transkripcie. 4. DNA metylácia sa môže vyskytovať za štartom transkripcie, pričom v spolupráci s MBP funguje ako represor elongácie transkripcie (Klose a Bird, 2006).



Obr.4: Metylácia 5. uhlíku cytozínu DNA metyltransferázou. Otáznik indikuje pravdepodobnú aktivitu DNA demetyláz (upr. podľa: Cheng *et al.*, 2011).

Mechanizmus vzniku metylačných vzorov ako aj úloha DNA metylácie vo vývoji jedinca bola porovnaná na základe fenotypových analýz rôznych mutácií v génoch DNA metyltransferáz (Bestor, 2000). DNA metyltransferázy môžeme rozdeliť do dvoch rodín, ktoré sú štruktúrne aj funkčne odlišné. Prvou DNA metyltransferázou objavenou u cicavcov bola Dnmt1 (skratka odvodená z DNA methyltransferase), ktorá patrí do rodiny tzv. „udržiavacích“ metyltransferáz, a je vysoko konzervovaná medzi eukaryotmi. Postupne boli objavené ďalšie Dnmt (Dnmt3a, Dnmt3b), ktoré iniciujú CpG metylačný vzor „*de novo*“ (Cheng *et al.*, 2011). Všetky známe DNA metyltransferázy u cicavcov majú rovnakú štruktúru katalytickej domény, ktorej motív pozostáva z 10 konzervovaných aminokyselín.

2.3.1.1 DNA metyltransferázy 1 (Dnmt1)

Dnmt1 obsahuje dlhú N-terminálnu doménu s regulačnou funkciou a kratšiu C-terminálnu doménu. N-terminálna doména zahŕňa rôzne motívy, ktorými interaguje s transkripčnými represormi, taktiež zahŕňa signál pre transport enzýmu do jadra, PCNA (z angl. proliferating cell nuclear antigen) interagujúcu doménu pre koordináciu metylácie počas replikácie v S-fáze a iné. Funkcia Dnmt1 je v udržiavaní metylačného vzoru podľa hemimetylovaných substrátov. Interakcia medzi Dnmt1 a PCNA a ich lokalizácia behom replikácie naznačuje, že Dnmt1 je pravdepodobne súčasťou replikačnej vidlice. Okrem toho sa však podieľa aj na metylácii DNA *de novo*. V jednom z modelov popisujúcich *de novo* DNA metyláciu je potrebné, aby Dnmt3 označili DNA v mieste, kde bude metylácie pomocou Dnmt1 prebiehať (Hermann *et al.*, 2004).

2.3.1.2 DNA metyltransferázy 3 (Dnmt3)

Dnmt3 rodina zahŕňa dva príbuzné enzýmy: Dnmt3a a Dnmt3b, ktoré sú kódované rôznymi génmi. Majú podobnú štruktúru ako Dnmt1, avšak všetky metyltransferázové motívy sa nachádzajú na C-terminálnej doméne. *De novo* metyltransferázy fungujú v určitom období gametogenézy a vo včasnom embryonálnom vývoji tak, aby metylačný vzor mohol byť počas bunkového delenia udržiavaný Dnmt1 metyltransferázami (Bestor, 2000). Dôležitosť *de novo* metyltransferáz dokazuje mutácia v C-terminálnej doméne *Dnmt3b*, ktorá je príčinou ICF syndrómu. Pacienti s ICF syndrómom trpia kombinovanou imunodeficienciou, anomáliami tváre

a cytogenetickými abnormalitami chromozómov 1, 9 a 16 v pericentrických oblastiach. Tieto oblasti sú bežne hypermetylované, avšak u pacientov s ICF syndrómom sú bez metylácií (Jeanpierre *et al.*, 1993). Tretím členom Dnmt3 rodiny je Dnmt3L metyltransferáza, ktorá samotná nemá katalytickú aktivitu. Spolu s ostatnými Dnmt3 enzýmami funguje ako stimulátor DNA metylácie (Chedin *et al.*, 2002).

2.3.1.3 Význam DNA metylácii

Rozsah DNA metylácie u cicavcov sa počas vývoja organizovane mení. Začínajúcou demetyláciou počas delenia buniek vo včasnom štádiu embrya a nasleduje celogenómovou *de novo* metyláciou počas gastrulácie (Jaenish, 1997). V období po gastrulácii je *de novo* metylácia veľmi zriedkavá, avšak veľmi častá v *in vitro* kultúrach a v nádorových bunkách (Jones *et al.*, 1990). Je zrejmé, že mnohé zmeny v nádorových bunkách vrátane chromozómovej nestability, aktivácie onkogénov, umlčanie tumor supresorových génov a inaktivácia DNA reparačných systémov sú spôsobené nielen genetickými, ale aj epigenetickými abnormalitami. Najdôležitejšou epigenetickou zmenou, ktorá vedie k zvýhodnenému rastu nádorových buniek, je umlčanie tumor supresorových génov pomocou hypermetylácie (Jones a Baylin, 2002). V nádorových bunkách napomáha umlčovaniu génov metylácia CpG ostrovou. Príkladom je *de novo* metylácia CpG v β -receptore pre kyselinu retinovú (RAR^{β}) a spôsobuje promyelocytárnu leukémiu u ľudí. Fúzny proteín PML-RAR sa viaže na RAR^{β} promótor, potláča transkripciu tým, že aktivuje DNA metyltransferázy (Croce *et al.*, 2002). DNA metylácia hrá úlohu v genómovom imprintingu a v X inaktivácií, ktorých charakteristickou črtou je monoalelická génová expresia. V úlohe udržovania imprintingu a X inaktivácie je dôležitá aktivita DNA metyltransferázy 1 (Dnmt1) a špecifickej izoformy Dnmt1 v oocytoch, ktoré udržujú metylačný vzor počas delenia buniek vo včasnom štádiu embrya (Howell *et al.*, 2001).

Už v roku 1983 Wilson a Jones experimentálne potvrdili, že hypometylácia ako aj hypermetylácia súvisia so starnutím, keď pozorovali progresívnu stratu 5mC v *in vitro* kultúrach myších fibroblastov. Postupnú stratu 5-metylcytozínu zaznamenali aj v repetitívnych sekvenciách DNA (transponovateľné elementy) (Wilson a Jones, 1985). Barbot *et al.* preukázali v hepatocytoch postupnú demetyláciu transponovateľného elementu IAP (z angl. intracisternal A-particle) u myší, ktoré mali od 1 do 24 mesiacov (Barbot *et al.*, 2002). Opačným príkladom

k hypometylácii repetitívnych sekvencií je metylácia CpG ostrovov asociovaných s rôznymi génmi, ako napríklad receptor pre estrogén (ER) v subpopulácii buniek, ktorých počet sa priamo úmerne zvyšuje s vekom. Výskum na ľudskej sliznici hrubého čreva preukázal zníženie expresiu estrogénového receptora prípadne jej vymiznutie. Existuje predpoklad, že práve hypermetylácia CpG ostrovov v tomto géne môže byť jedným z prvých znakov smerujúcich k predispozícii na sporadický kolorektálny karcinóm (Issa *et al.*, 1994). Zloženie stravy je taktiež dôležitým determinantom v manifestácii ochorení, ktoré majú neskorší nástup. Doplnky stravy, ako napríklad kyselina listová a niektoré vitamíny, ktoré ovplyvňujú aktivitu enzýmov zásobujúcich metylovými skupinami rôzne metylačné procesy v bunke môžu ovplyvniť prejav ochorenia (Giovannucci *et al.*, 1993).

2.3.1.4 DNA metylácia a *diabetes mellitus* 1. typu

Autoimunitné ochorenia sa vyvíjajú interakciou genetických a environmentálnych faktorov. Výskyt T1DM u jednovaječných dvojčiat rôzne varíruje od 35 do 75% prípadov. To je zapríčinené jednak variabilitou HLA alel asociovaných s T1DM ako aj rôznym metylačným vzorom. Bolo dokázané, že geneticky identické dvojčatá môžu mať rozdielny metylačný vzor a môžu sa líšiť v histónových modifikáciách. Rozdiely korelovali s vekom a časom, ktorý strávili dvojčatá spolu; mladšie dvojčatá mali metylačný vzor viac podobný ako dvojčatá staršie a tie, ktoré spolu strávili viac času boli podobnejšie ako dvojčatá, ktoré spolu nevyrastali. Mnohé miesta v génome (EST, single-copy gény) boli rôzne metylované a zmeny v expresii týchto génov zodpovedali miere CpG metylácii. Táto štúdia sa síce nezaoberala rozdielmi v predispozícii T1DM u monozygotných dvojčat, avšak demonštruje, že epigenóm geneticky identických jedincov sa môže líšiť a je modifikovaný environmentálnymi faktormi (Fraga *et al.*, 2005).

Vzťah monozygotných dvojčiat a metylačný profil génov asociovaných s T1DM sledovali Rakyán *et al.* na monocytoch (CD14+). Identifikovali 132 rôznych CpG oblastí, ktoré sú spojené s T1DM. Niektoré gény úzko asociované s T1DM (*GAD2*, *HLA DQB1*) boli popísané ako hypermetylované alebo hypometylované (Rakyán *et al.*, 2011). Výsledkom inej štúdie boli rozdiely v metylácii medzi T1DM pacientami a zdravými kontrolami. U T1DM pacientov bol identifikovaný CpG hypometylačný vzor. Tieto tri CpG oblasti sa nachádzajú proximálne od

štartu transkripcie v promótoře génu pre inzulín (Fradin *et al.*, 2012). Hypometyláciu génu pre inzulín ako metódu detekcie deštrukcie beta buniek Langerhansových ostrovčekov popísal Akirav *et al.* Detekcia hypometylácie neinvazívnou metódou z cirkulujúcej DNA bola testovaná na prediabetických NOD myšiach *in vivo* a na tkanivách a sére u ľudí. Táto metóda je výhodná pre monitorovanie začiatku deštrukcie beta buniek u pacientov s T1DM predispozíciou a monitorovanie progresie deštrukcie beta buniek u pacientov s T1DM (Akirav *et al.*, 2011).

Epigenóm je prostriedok, ktorým môžu faktory prostredia ovplyvňovať expresiu a následne fenotyp. Epigenetická regulácia môže ovplyvniť rozvoj T1DM rôznymi spôsobmi - regulácia vývoja, údržby, metabolizmu a regenerácie beta buniek, aktivácia a indukcia T_{reg} buniek, metabolizmus inzulínu a predovšetkým regulácia expresie alel HLA II. triedy, ktoré sú dôležité v predispozícii *diabetes mellitus* 1. typu (MacFarlane *et al.*, 2009).

3. CIELE PRÁCE

Táto diplomová práca je súčasťou rozsiahlejšej štúdie prebiehajúcej na Ústave obecné biologie a genetiky na 3. lekárskej fakulte Univerzity Karlovy, ktorá sa venuje epigenetickej regulácii génov HLA II. triedy. Určenie metylačného stavu rôznych alel *HLA DQB1* a ich súvislosť s hladinou expresie u pacientov s T1DM tvorí len časť tejto štúdie.

1. Genotypizácia génov *HLA DQA1*, *HLA DQB1* a *HLA DRB1* pomocou sekvenčne špecifických primerov.
2. Určiť rozdiely v metylácii medzi alelami génu *HLA DQB1*.
3. Pomocou kvantitatívnej PCR stanoviť expresiu jednotlivých alel génov *HLA DQB1* u pacientov s *diabetes mellitus* 1. typu.

4. MATERIÁL

4.1 Pufry, roztoky a komerčné súpravy

V tejto kapitole je uvedený pôvod chemikálií, enzýmov a ďalšieho špecifického materiálu (s výnimkou bežného spotrebného materiálu) použitého pri experimentoch popisovaných v tejto diplomovej práci. Prístroje a zariadenia boli používané podľa inštrukcií výrobcu a špecifické nastavenia sú popísané vtedy, ak sú nevyhnutné pre reprodukovateľnosť experimentu. Pokiaľ nie je uvedené inak, boli komerčné súpravy používané v súlade s inštrukciami výrobcu.

Izolácia DNA

RCLB (Red Cell Lysis Buffer)

5mM MgCl₂ (Serva)

320 mM sacharóza (Sigma Aldrich)

1% Triton X – 100 (Sigma Aldrich)

12 mM Tris-HCl pH 7.5 (Sigma Aldrich)

WCLB (White Cell Lysis Buffer)

120 mM EDTA pH 8.0 (Sigma Aldrich)

375 mM NaCl (Serva)

Proteinase K, 30 U/mg (Qiagen)

10% SDS alebo 20% SDS (Sigma Aldrich)

6M NaCl (SERVA)

99,8% etanol (Sigma Aldrich)

HLA genotypizačné kity

Olerup SSP™ DR low resolution kit (GenoVision)

Olerup SSP™ DQ low resolution kit (GenoVision)

Olerup SSP™ *DQB1* *02 (GenoVision)

Olerup SSP™ *DQB1* *03 (GenoVision)

Olerup SSP™ *DQB1**04 (GenoVision)

Olerup SSP™ *DQB1**05 (GenoVision)

Olerup SSP™ *DQB1**06 (GenoVision)

Olerup SSP™ *DQA1* (GenoVision)

Taq DNA polymeráza (5U/μl) (Fermentas)

Elektroforetická separácia DNA

TBE pufor

890 mM Tris báza (Sigma Aldrich)

890 mM kyselina boritá (Amresco)

20 mM EDTA pH 8.0 (Sigma Aldrich)

Agaróza (Invitrogen)

GelRed™ (Biotium)

Bromophenol Blue Loading Solution (Promega)

Marker 100bp DNA ladder (Biosystems)

Bisulfitová konverzia

Epitect® Bisulfite Kit (Qiagen)

Amplifikácia regulačnej oblasti *DQB1*

Syntetické jednoreťazcové oligonukleotidy slúžiace ako primery pre PCR alebo sekvenačné reakcie boli syntetizované, prečistené metódou HPLC a dodané firmou Metabion International. Lyofilizované primery boli podľa pokynov výrobcu nariedené na koncentráciu 100 μM a neskôr nariedené na pracovnú koncentráciu 50 μM.

F1-*DQBI*: 5' TAAATTGGTGATGTTATAGTTTAATTGGAATTTAGT 3'
R1-*DQBI*: 5' CTCAAAAATCTCCGCCATTAATAATAACCATT 3'
F2A-*DQBI*: 5' AGGGTAAATTTAGGTATGGGAAGGTAGGTAT 3'
R2A-*DQBI*: 5' CTCCAAAACCTCCTTCTAACTATTCCAATACT 3'
F2B-*DQBI*: 5' AGTATTGGAATAGTTAGAAGGAAGTTTTGGAG 3'
R2B-*DQBI*: 5' AATATCTTATTTTCGCAACTATAATTAATACTAAATACCCTA 3'

dNTPs – dATP, dCTP, dTTP, dGTP (100 mM) (Fermentas) – nariedené na koncentráciu 10 mM
PCR H₂O (Sigma Aldrich)

PCR reakčný kit (Kapa Biosystems)

KAPA HiFi HotStart Uracil+ ReadyMix (2x)

Izolácia a prečistenie PCR produktu

TAE pufor (50x konc, zásobný roztok)

2M Tris báza (Sigma Aldrich)

0,05M EDTA pH 8.0 (Sigma Aldrich)

1M kyselina octová (Sigma Aldrich)

Low melting temperature agaróza (Sigma Aldrich)

GelRed™ (Biotium)

6x Loading Dye Solution (Fermentas)

QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen)

99,5 % 2-propanol (Sigma Aldrich)

Pridávanie polyA koncov

dATP (100 mM) (Fermentas)

Taq DNA polymeráza (5U/μl) (Fermentas)

10x *Taq* pufor s KCl (Fermentas)

25 mM MgCl₂ (Fermentas)

Prečistenie PCR produktu

QIAquick[®] PCR purification kit (Qiagen)

Klonovanie

Použitý bakteriálne kmene, vektor a médiá

DH5α *Escherichia coli* (genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqΔM15 Tn10* (Tetr)]) (Stratagene)

XL1-Blue *Escherichia coli* (genotyp: F- *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-*) (Merck)

pGEM-T Easy Vector (Genotyp: (Apr), *oriV ColE1 lacZ* 3000bp) (Promega)

Kultivačné médiá

Kultivačné médiá a roztoky boli sterilizované v autokláve pri pretlaku 0,1 MPa a teplote 121°C po dobu 15 až 25 minút. Roztoky IPTG, X-gal a antibiotika boli sterilizované filtráciou cez 0,22 μm Millipore filter a pred pridaním bolo médium schladené na teplotu minimálne 55°C.

Príprava kultivačných misiek

Bacto Agar (DIFCO)

LB Broth base (Invitrogen)

LB agar (Sigma Aldrich)

Ampicilín – sodná soľ (Sigma Aldrich)

X-Gal (Sigma Aldrich)

IPTG (Sigma Aldrich)

DMSO (Sigma Aldrich)

Príprava kompetentných baktérií

SOC médium :

2,5mM KCl (Penta)

8,5mM NaCl (Penta)

20 g/L Tryptone (Sigma Aldrich)

5 g/L kvasničný extrakt (Sigma Aldrich)

2mM sterilná glukóza (Serva)

10mM MgCl₂ (Serva)

LB Broth base (Invitrogen)

0.1 M CaCl₂ (Sigma Aldrich)

glycerol (Sigma Aldrich)

99,8% etanol (Sigma Aldrich)

Ligácia produktu s vektorom a transformácia kompetentných buniek

pGEM[®]-T Vector system (Promega):

T4 DNA Ligase

2x Rapid Ligation Buffer

pGEM[®]-T Vector (50ng/μl)

LB Broth base (Invitrogen)

Izolácia plazmidovej DNA

QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen)

QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen)

Izolácia plazmidovej DNA alkalickou lýzou

Roztok 1

50 mM glukóza (Serva)

10 mM EDTA (Sigma Aldrich)

25 mM Tris HCl (Sigma Aldrich)

Roztok 2

200 mM NaOH (Penta)

1% SDS (Sigma Aldrich)

Roztok 3

60 ml 5 M octan draselný (Penta)

11,5 ml bezvodnej kyseliny octovej (Sigma Aldrich)

28,5 ml dH₂O

chloroform (Sigma Aldrich)

izopropanol (Sigma Aldrich)

etanol (Sigma Aldrich)

Štiepenie plazmidovej DNA

ApaI (Thermo Scientific)

10x pufor B (Thermo Scientific)

Izolácia RNA

QIAamp[®] RNA Blood Mini Kit (Qiagen)

70% etanol (Sigma Aldrich)

Reverzná transkripcia

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

Kvantitatívna PCR

Lyofilizované primery a sondy pre kvantitatívnu PCR boli dodané firmou Integrated DNA Technologies a podľa pokynov výrobcu nariadené na koncentráciu 100 μM, a neskôr nariadené na pracovnú koncentráciu 10 μM (primery) a 5 μM (sondy).

*DQBI*02* F: 5' CGTGCGTCTTGTGAGCAGAA 3'

*DQBI*02* R: 5' CCCGTTTCCTCTCCAGGAT 3'

*DQBI*0301* F: 5' GGGCGGTGACGCAGCT 3'

*DQBI*0301* R: 5' CTGCACACCATGTCCAACCTC 3'

*DQBI*0302* (*04) F: 5' GCCTTCGGGTAGCAACTGTG 3'

*DQBI*0302* (*04) R: 5' GCGTACTCCTCTCGGTTATAGATGTA 3'

*DQB1**05 F: 5' CGTCTCAATTATGTCTTGGAAGAAGT 3'
*DQB1**05 R: 5' CTCTGCCCTCAGCCAGTGA 3'
*DQB1**06 F: 5' CTTTCGTCTCAGTTATGTCTTGGAAG 3'
*DQB1**06 R: 5' GAGTCTCTGCCCTCAGCCTGTA 3'
DQB1 total F: 5' CAGGTACATCAGATCCATCAGGTC 3'
DQB1 total R: 5' GTCCCGTTGGTGAAGTAGCAC 3'
DQB1 intron F: 5' CTAGGATGATGCCCACTTTGTG 3'
DQB1 intron R: 5' ACAGAACTTCAGCTTGATGCAGAT 3'
DRA1 F: 5' GGACAAAGCCAACCTGGAAA 3'
DRA1 R: 5' AGGACGTTGGGCTCTCTCAG 3'

sondy:

DQB1 *0301,*02 5' TCCTTCTGGCTGTTCCAGTACTCGGC 3'
DQB1 *0302,*04, total 5' ATCCTCGGGAGAGTCTCTGCCCTCA 3'
DQB1 *05,*06 5' CTTTCGGGTAGCAACTGTCACCTTGATGCT 3'
DQB1 intron 5' CCACTAGCAGCCTCTTTCAGTCACTGGAA 3'
DRA1 5' CAACTATACTCCGATCACCAATGTACCTCCAGAG 3'

Taqman[®] Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems)

4.2 Použité prístroje a zariadenia

Autokláv Systec DE-23 (Systec)

Automatické pipety jednokanálové (0.1 – 2, 2 – 20, 20 – 200, 100 – 1000) (Nichiryo)

Shaker&Incubator NB-205 QF (N-BIOTEK)

Centrifúga chladená Z 300 (Hermle)

Centrifúga MPW-51 (Mechanika Precyzyjna)

Elektroforetické vane (Sigma Aldrich)

Hlbokomraziaci box U410 (New Brunswick)

Chladnička ARC (Whirlpool)

Kamera Gel logic 1500 (Kodak)

Laminárny box Auramini (Bioair) a HERAsafe (Heraeus)
Mikrovlnná rúra (Zanussi)
Minicentrifúga Z 100 (Hermle)
Mraznička (Whirlpool)
Plynový kahan Schuett phoenix (Schuett-biotec)
PowerPac zdroj napätia pre elektroforézu (Bio-Rad)
Stolový vortex (Scientific industries)
Termocycler C1000TM (Bio-Rad) a LabCycler gradient (SensoQuest)
UV Transluminátor MUVB20 (UltraLum)
Váhy digitálne 40SM-200A (Precisa)

4.3 Zoznam počítačových programov

BioEdit
GraphPad Prism 3.0
Kodak Molecular Imaging software verzia 5.0 (Kodak)
7000 Sequence Detection Software 1.2.3 (Applied Biosystems)

5. METÓDY A POSTUP PRÁCE

Skúmaný súbor tvorí 33 dospelých T1DM pacientov z II. internej kliniky FNKV. Od všetkých pacientov bolo odobraných približne 10 ml plnej periférnej krvi a následne izolovaná DNA a RNA. Vyizolovaná DNA bola najskôr použitá na stanovenie HLA genotypu (*HLA DRB1*, *HLA DQB1* a *HLA DQAI*). DNA bola následne bisulfitovaná a cieľový úsek *DQB1* bol amplifikovaný pomocou nested PCR. Úsek bol zaklonovaný do baktérií a úspešne transformované klony boli odoslané na sekvenáciu. Výsledky metylačného stavu boli štatisticky spracované. Kvantifikácia jednotlivých alel bola detegovaná pomocou real-time PCR.

5.1 DNA analýza

5.1.1 Izolácia DNA z plnej krvi

Plná periférna krv bola odobratá do skúmaviek s EDTA. Na izoláciu DNA bola použitá vysolovacia metóda. Jednotlivé centrifugačné kroky prebiehali pri 18 000 x g pri laboratórnej teplote.

1. K 0,5 ml krvi bol pridaný 1 ml RCLB (red cell lysis buffer) a obsah premiešavaný obracaním skúmavky po dobu 30s. Obsah skúmavky bol centrifugovaný po dobu 5 minút.
2. Supernatant bol opatrne vyliaty a peleta bola premytá 1 ml dH₂O a obsah zcentrifugovaný po dobu 5 minút. Premývanie bolo opakované podľa potreby, pokým nebola suspenzia číra.
3. K pelete bolo pridaných 235 µl dH₂O a 80 µl roztoku WCLB (white cell lysis buffer) obsah skúmavky dôkladne premiešaný.
4. Následne bolo pridaných 40 µl 10% SDS (dodecylsulfát sodný) a 15 µl proteinázy K (Sigma Aldrich).
5. Vzorky boli inkubované v inkubátore na otáčacom rotátore pri 55°C po dobu 30 minút.
6. Po inkubácii boli vzorky zchladené na laboratórnu teplotu a bolo pridaných 120 µl 5M NaCl. Skúmavky boli silno trepané 15s a stočené po dobu 6 minút.
7. Supernatant bol odpipetovaný do novej 1,5 ml skúmavky a opäť stočený po dobu 3 minút.

8. K supernatantu bol pridaný vychladený 99,9% etanol (-20°C) a DNA bola vyvrážaná ľahkým obracaním skúmavky. Skúmavky boli uložené po dobu 20 minút na -20°C, aby sa zvýšil výťažok DNA.
9. Vzorky boli stočené po dobu 3 minút, supernatant opatrne vyliaty a peleta premytá 1 ml 70% etanolu. Nasledovala opäť centrifugácia po dobu 3 minút a supernatant bol opatrne vyliaty. Okraje skúmavky boli vysušené pomocou gázy a prebytočný etanol bol odstránený vysušením DNA v laminárnom boxe.
10. DNA bola rozpustená v 100 – 200 µl dH₂O do druhého dňa pri 4°C. Koncentrácia bola zmeraná na nanofometri pri 260nm.

5.1.2 HLA genotypizácia

Genotypizácia HLA molekúl bola robená metódou PCR-SSP pomocou kitov Olerup SSPTM AB od firmy GenoVision. Sekvenčne špecifické primery amplifikujú alely HLA II. triedy – *HLA DRB1*, *HLA DQA1* a *HLA DQB1*. Najprv bola určená sérologická skupina pre *HLA DRB1* pomocou kitu DR low resolution SSP typing. Sérologická skupina bola určená aj pri *HLA DQB1* kitom DQ low resolution SSP typing a neskôr boli odlišené jednotlivé podtypy alel pomocou kitov *DQB1* high resolution *DQB1*02*, *DQB1*03*, *DQB1*03*, *DQB1*04*, *DQB1*05* a *DQB1*06*. Podtypy *HLA DQA1* boli určené kitom Olerup SSPTM *HLA DQA1*. Postupovalo sa podľa návodu výrobcu.

1. PCR reakčná zmes bola pripravená podľa **tabuľky 2**. Jednotlivé zložky boli rozmrazené na ľade a napipetované po 10 µl do mikroskúmaviek. Celkový objem reakčnej zmesi závisí na počte mikroskúmaviek s primermi pre jednotlivé alely.
2. PCR reakcia prebehla podľa nasledovného programu (**Tab. 3**)

Tab. 2: Zloženie reakčnej zmesi pre HLA genotypizáciu

Zložky reakcie	Objem [μ l]
Voda	4,92
PCR master mix	3,0
DNA (c = 30ng/ μ l)	2,0
<i>Taq</i> polymeráza	0,08
Celkový objem*	10

*Objem pre 1 reakciu

Tab. 3: Teplotný program pre HLA genotypizáciu

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

- Po ukončení PCR reakcie, boli vzorky nanosené na 2% TBE agarózový gél. Na gél bol nanosený celý objem reakcie (10 μ l). Po elektroforetickej separácii bol gél vizualizovaný pomocou UV (transiluminátor MUVB 20, UltraLum USA) a vyfotený kamerou Gel logic 1500 (Kodak).
- Výsledky naamplifikovaných HLA alel boli vyhodnotené pomocou interpretačnej tabuľky Olerup SSP[®] kitu.

5.1.3 TBE agarózová elektroforéza

Elektroforetická separácia DNA bola uskutočnená na 2% agarózovom géli v horizontálnych elektroforetických vaniach (Thermo Scientific).

1. 2% agarózový gél bol pripravený v pomere 2g agarózy na 100 ml TBE pufru.
2. Celá zmes v Erlenmayerovej banke prikrytá ochranným viečkom bola umiestnená do mikrovlnky a uvedená do varu.
3. Do gélu bola primiešaná interkalačná farbička GelRed[®] (2,5 μ l na 100 ml gélu).
4. Po ochladení na teplotu $\sim 60^{\circ}\text{C}$ bol gél naliaty do elektroforetickej vane a boli do neho umiestnené hrebene. Po stuhnutí gélu boli hrebene vytiahnuté a gél s vaňou zaliat TBE pufrom.
5. Vzorky boli nanášané do jamiek spolu s 6x koncentrovaným nanašacím pufrom (okrem vzoriek na genotypizáciu, ktoré nanašací pufor obsahujú) v pomere 5:1.
6. Elektroforéza prebiehala pri konštantnom napätí 280V približne 30 minút.

5.1.4 Bisulfitové sekvenovanie

Analýza metylácie časti génu *HLA DQB1* bola robená pomocou metódy bisulfitovej konverzie. Princípom bisulfitovej konverzie je deaminácia nemetylovaného cytozínu v DNA na uracil. Metylovaný cytozín je voči bisulfitu sodnému (NaHSO_3) rezistentný. Pôvodné metylované CpG miesta zostanú nezmenené a môžeme ich detekovať pomocou sekvenovania.

5.1.5 Bisulfitová konverzia DNA a jej prečistenie

Bisulfitová konverzia DNA a následné prečistenie bisulfitovanej DNA bolo uskutočnené pomocou Epiect[®] Bisulfite Kit (Qiagen). Postupovalo sa podľa návodu výrobcu:

1. Bisulfitový mix bol rozpustený v 800 μ l vody bez RNáz a podľa **tabuľky 4** bola pripravená reakčná zmes.
2. Reakcia bola vložená do termocykleru a spustený program podľa **tabuľky 5**.

5.1.6 Prečistenie bisulfitovanej DNA

Jednotlivé centrifugačné kroky prebiehali pri 18 000 x g.

- Po bisulfitovej konverzii bol celý objem reakcie zľahka stočený a prenesený do 1,5 ml mikrocentrifugačných skúmaviek.
- Ku vzorke bolo pridaných 560 µl BL pufru a celý roztok zvortexovaný a krátko stočený.
- Celý objem bol prenesený do Epiect spin kolóniek, ktoré boli umiestnené do zberných skúmaviek. Následne prebehla centrifugácia po dobu 1 minúty a obsah zbernej skúmavky bol vyliaty.
- Do kolónky bolo pridaných 500 µl BW pufru (zmiešaný pred použitím s etanolom podľa pokynov výrobcu). Kolonka bola centrifugovaná po dobu 1 minúty. Obsah zbernej skúmavky bol následne vyliaty.
- Do kolónky bolo pridaných 500 µl BD pufru (zmiešaný pred použitím s etanolom podľa pokynov výrobcu) a kolonka bola inkubovaná 15 minút pri laboratórnej teplote.
- Kolonka bola stočená a obsah zbernej skúmavky vyliaty.
- Bolo pridaných 500 µl BW pufru a kolonka opäť centrifugovaná 1 minútu. Krok 7 bol ešte raz zopakovaný.
- Kolonka bola umiestnená do novej skúmavky a 1-minútovou centrifugáciou zbavená reziduálnej kvapaliny.
- Opäť bola kolónka prenesená do novej 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky a s otvoreným viečkom bola inkubovaná v termobloku po dobu 5 minút pri 56°C.
- Na stred kolónky bolo napipetovaných 20 µl dH₂O. DNA bola vymytá 1-minútovou centrifugáciou a uložená do -20°C.

Tab. 4: Reakčné komponenty bisulfitovej konverzie. Objemy jednotlivých zložiek reakcie sú uvedené pre jednu bisulfitovú reakciu.

Zložky reakcie	Objem [µl]
DNA (1ng – 2µg)	max. 20*
RNase-free voda	*
Bisulfite mix	85
DNA Protect buffer	35
Celkový objem	140

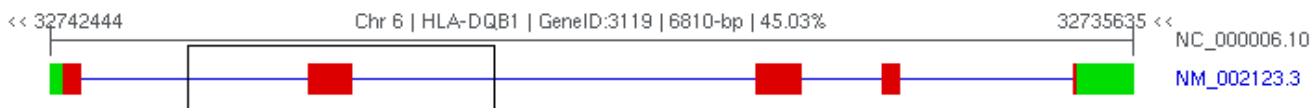
*celkový objem DNA a vody je 20µl. Do reakcie bolo použitých maximálne 2µg DNA.

Tab. 5: Teplotný program pre bisulfitovú konverziu

Reakčný krok	Čas [min]	Teplota [°C]
1. denaturácia	5	95
2. inkubácia	25	60
3. denaturácia	5	95
4. inkubácia	85	60
5. denaturácia	5	95
6. inkubácia	175	60
7. Záverečná inkubácia	∞	20

5.1.7 Amplifikácia produktu pomocou nested PCR

Z dôvodu zníženej komplexity DNA po bisulfitovej konverzií bola použitá nested PCR pre amplifikáciu jednotlivých alel HLA. V géne *HLA-DQB1* je vysoký výskyt CpG ostrovov v intróne 1, exóne 2 a časti intrónu 2 (**Obr.5**). Preto bol tento úsek zvolený pre amplifikáciu, a z dôvodu jeho dĺžky rozdelený na dve časti (úsek A a B). Vonkajšie primery sú spoločné a nasadajú v pozícii 911 a 2428, vnútorné primery prvého úseku (úsek A) nasadajú v pozícii 1057 a 1761, druhého úseku (úsek B) v pozícii 1730 a 2343. PCR reakcie pre všetky produkty boli pripravené podľa **tabuľky 6** a skúmavky boli vložené do termocyklieru, na ktorom bol nastavený program podľa **tabuľky 7**. Reakcie prebiehali v dupletoch, aby sa zvýšila pravdepodobnosť zachytenia oboch alel a bolo zahrnutých čo najviac bunkových línií. Výsledky PCR reakcie boli overené na 2% TBE agarózovom géli.



Obr.5: Schématické znázornenie génu HLA-DQB1. Zelená farba znázorňuje neprekladané oblasti (*UTR*, z *angl. untranslated regions*), červenou farbou sú označené exóny a modré úsečky predstavujú jednotlivé intróny. Nami študovaná regulačná oblasť génu *DQB1* sa nachádza v čiernom obdĺžniku a zahŕňa časť intrónu 1, exón 2 a začiatok intrónu 2 (prevzaté z: www.refgene.com).

Tab. 6: Zloženie reakčnej zmesi pre amplifikáciu cieľového úseku *DQB1*

Zložky reakcie	reakcia 1	reakcia 2
	objem [μ l]	objem [μ l]
2x KAPA HiFi HotStart Uracil+ ReadyMix	7,5	7,5
Forward primer	0,25	0,25
Reverse primer	0,25	0,25
DNA	1,5	1,5
dH ₂ O	5,5	5,5
Celkový objem	15	15

Tab. 7: Teplotný program pre amplifikáciu cieľového úseku *DQB1*

Reakčný krok	reakcia 1			reakcia 2A/2B		
	teplota	čas	počet opakovaní	teplota	čas	počet opakovaní
počiatočná denaturácia	95°C	5 min		95°C	5 min	
denaturácia	98°C	20s	40	98°C	20s	40
hybridizácia	60°C	30s	40	61°C	30s	40
elongácia	72°C	1 min	40	72°C	1 min	40
záverečná inkubácia	72°C	5 min		72°C	5 min	

5.1.8 Izolácia a prečistenie PCR produktu

Izolácia PCR produktu

1. Bol pripravený 1% TAE agarózový gél (s nízkou teplotou topenia) s GelRed[®] (2,5 µl na 100 ml gélu).
2. Dublety PCR produktov boli zmiešané a nanosené na gél spolu s 6x koncentrovaným nanášacím pufrom (v pomere 5:1).
3. Elektroforetická separácia prebiehala na zdroji Powerpac 3000 po dobu 30 minút pri konštantnom napätí 150V.
4. Po elektroforéze bol gél prenesený na UV transiluminátor a produkty správnej veľkosti boli vyrezané skalpelom a prenesené do predom zvážených skúmaviek. Medzi jednotlivými vzorkami bol skalpel očistený etanolom, aby nedošlo ku kontaminácii jednotlivých vzoriek.
5. Skúmavky s gélom boli opäť zvážené a vypočítaná samotná hmotnosť gélu.

Prečistenie PCR produktu

Vzorky boli následne prečistené pomocou QIAquick[®] Gel Extracion Kit (Qiagen). Jednotlivé centrifugačné kroky prebiehali pri 17 900 x g.

1. Gél bol rozpustený pridaním troch objemových jednotiek QG pufru (100 mg gélu ~ 100 µl) a inkubovaný 10 minút pri 50°C. Skúmavky boli počas inkubácie každé 2-3 minúty vortexované, aby sa gél lepšie rozpustil.
2. K vzorkám bola pridaná jedna objemová jednotka 100% izopropanolu a obsah skúmaviek bol premiešaný, napipetovaný na MinElute kolónku a zcentrifugovaný. Obsah zbernej skúmavky bol vyliaty.
3. Do kolónky bolo napipetových 750 µl PE pufru a následne bola zcentrifugovaná.
4. Obsah zbernej skúmavky bol vyliaty a skúmavka znovu zcentrifugovaná po dobu 1 minúty, aby sa odstránili zvyšky kvapaliny.
5. MinElute kolónka bola vložená do čistej 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky. Do stredu kolónky bolo napipetovaných 20 – 30 µl dH₂O a bola inkubovaná pri laboratórnej teplote po dobu 1 minúty. DNA bola eluovaná 1-minútovou centrifugáciou, zmeraná koncentrácia na nanofotometri a uložená na -20°C.

5.1.9 Klonovanie

Kvôli použitiu hot start polymerázy s 3'→5' exonukleázovou aktivitou boli k vyizolovanému a prečistenému PCR produktu následne pridané 3' polyA konce. PCR produkt s polyA koncami bol následne opäť prečistený pomocou QIAquick® PCR purification kitu (Qiagen) a ligovaný s pGEM – T vektorom, ktorým boli transformované chemikompetentné baktérie *E.coli* DH5α alebo *E.coli* XL1-Blue. Použitý kmeň, má deléciu v gène pre α-peptid β-galaktozidázy. Tento gén sa v použítom vektore nachádza v klonovacom mieste a môže byť prerušený inzertom. To umožňuje selekciu na médiu s IPTG (induktor β-galaktozidázy) a X-Gal (substrát pre β-galaktozidázu). V prípade úspešného vloženia inzertu do vektoru je prerušený čítací rámec pre β-galaktozidázu (neštiepi sa X-Gal) a kolónie sú biele. V prípade expresie β-galaktozidázy vznikajú modré kolónie. Selektčné médium obsahuje ampicilín, voči ktorému sú transformované baktérie s vektorom rezistentné a netransformované na médiu nenarastú.

5.1.10 Pridanie polyA koncov a prečistenie

Reakčná zmes na pridávanie polyA koncov bola pripravená podľa **tabuľky 8**. Celá zmes bola napipetovaná do PCR skúmaviek, ktoré boli vložené do termocykleru na 15 minút pri 72°C. Na prečistenie PCR produktov bol použitý QIAquick® PCR purification kit (Qiagen). Jednotlivé kroky centrifugácie prebiehali pri 17 900 x g.

1. K jednej objemovej jednotke PCR produktu bolo pridaných päť objemových jednotiek PB pufru a premiešané.
2. Celý objem zmesi bol prepipetovaný do QIAquick kolónky umiestnenej v 2 ml zbernej skúmavke a zcentrifugované po dobu 60s. Obsah zbernej skúmavky bol vyliaty.
3. Zachytená DNA na kolónke bola premytá 750 µl PE pufru (vopred pridaný 96 – 100% etanol podľa pokynov výrobcu) a zcentrifugovaná po dobu 60s.
4. Obsah zbernej skúmavky bol vyliaty a kolónka vložená naspäť. Pre odstránenie reziduálnej tekutiny bola kolónka so skúmavkou zcentrifugovaná po dobu 1 minúty.
5. QIAquick kolónka bola vložená do novej 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky.
6. Na stred kolónky bolo napipetovaných 30 µl EB pufru. Pre zvýšenie výťažku sa kolónka nehala postáť 1 minútu a DNA bola vyeluovaná 1-minútovou centrifugáciou. DNA bola použitá na ligáciu alebo zamrazená na -20°C pre neskoršie použitie.

Tab. 8: Zloženie reakčnej zmesi pre pridanie polyA koncov

Zložky reakcie	Objem [μ l]
PCR produkt	20
10x <i>Taq</i> pufor s KCl	3
Mg ²⁺ (25 mM MgCl ₂)	4,3
dATPs (10 mM)	1,5
<i>Taq</i> DNA polymeráza	1,2

5.1.11 Príprava kompetentných buniek

Pre prípravu kompetentných buniek boli použité kmene *E.coli* DH5 α alebo *E.coli* XL1-Blue podľa upraveného protokolu Sambrooka *et al.* (1989):

1. Do 3 ml LB/SOC média boli zaočkované pomocou sterilného bakteriologického očka bunky *E.coli* DH5 α /XL1-Blue. Inokulum bolo kultivované v inkubátore NB205-QF (N-Biotek, Korea) 16 – 18 hodín pri 37°C a 250 rpm.
2. Do sterilnej Erlenmayerovej banky so 100 ml LB/SOC média zohriateho na 37°C bol pridaný 1 ml inokula a banka vložená do inkubátora (37°C a 250 rpm).
3. Behom inkubácie bolo po približne 80 minútach zmeraná optická denzita pri 600 nm. Následné merania prebiehali po 15 minútach, až pokým nebola výsledná OD 0,5 – 0,6.
4. Rast baktérií bol zastavený inkubáciou na ľade po dobu 10 minút. Médium s bunkami bolo prenesené do vychladených sterilných 50 ml polypropylénových skúmaviek a bunky boli zozbierané 10-minútovou centrifugáciou pri 2000 x g.
5. Peleta bola rosuspendovaná v 12,5 ml vychladeného, sterilného 0,1 M CaCl₂ a skúmavky zcentrifugované 10 minút pri 2000 x g.
6. Peleta bola opäť rosuspendovaná v 12,5 ml vychladeného, sterilného 0,1 M CaCl₂ a inkubovaná 30 minút na ľade.
7. Bunky boli zozbierané 10-minútovou centrifugáciou pri 2000 x g a peleta rosuspendovaná v 3 ml vychladeného, sterilného 0,1 M CaCl₂ s 20%-ným obsahom glycerolu.

8. Kompetentné bunky boli rozpipetované po 100 µl do 1,5 ml sterilných vychladených skúmaviek a ihneď ponorené do etanolu vychladeného na -70°C. Bunky boli skladované pri -80°C.

5.1.11.1 Príprava kultivačných misiek

1. Do fľaše bolo navážených 14g LB agaru a doplnených do objemu 400 ml destilovanou vodou. Do vnútra bolo vložené magnetické miešadlo.
2. Roztok bol premiešaný a autoklavovaný 15 minút pri 121°C. Po vychladnutí bolo asepticky pridaných 400 µl ampicilínu (100 mg/ml), 400 µl IPTG (100 mM) a 400 µl X-Gal (3%).
3. Celý roztok bol premiešaný na magnetickom miešadle a následne naliaty na Petriho misky.
4. Po ztuhnutí agaru boli misky prikryté viečkom, popísané a uložené do chladničky na neskoršie použitie.

5.1.11.2 Ligačná reakcia

Pre ligáciu bol použitý pGEM[®]-T Vector (Promega). Pomer inzertu k vektoru počas ligácie bol 3:1. Množstvo DNA vstupujúcej do reakcie bolo vypočítané podľa vzorca:

$$\text{ngDNA} = \frac{\text{ng VEKTOR} \times \text{kb INZERT} \times 3}{\text{kb VEKTOR}}$$

Ligačná reakcia bola pripravená podľa **tabuľky 9**. Ligácia prebiehala cez noc pri 4°C.

Tab. 9: Zloženie reakčnej zmesi pre ligačnú reakciu

Zložka reakcie	Objem [µl]
2x Rapid Ligation Buffer	2,5
pGEM-T vector (50ng/µl)	0,5
PCR produkt	*
T4 DNA ligáza	0,5
dH ₂ O	*
celkový objem	5

*do reakcie bolo použitých množstvo PCR produktu, ktorý zodpovedá 17 ng (*DQBI* - A úsek) a 15 ng (*DQBI* -B úsek) DNA na 1 µl. Reakčná zmes bola doplnená dH₂O do objemu 5µl. Ligačná reakcia bola pripravená v polovičnom objeme než doporučuje výrobca.

5.1.12 Transformácia kompetentných buniek

1. Suspenzia kompetentných buniek *E. coli* DH5 α /XL1-Blue bola rozrazená na ľade a k 50 μ l týchto buniek bol pridaný celý objem ligačnej reakcie (5 μ l). Reakčná zmes bola premiešaná a inkubovaná na ľade po dobu 20 minút.
2. Baktérie boli transformované teplotným šokom v termobloku pri 42°C a následne umiestnené naspäť na ľad po dobu 2 minút.
3. Do 1,5 ml skúmavky s transformovanými baktériami bolo pridaných 950 μ l sterilného LB média a boli umiestnené do inkubátora na 37°C po dobu 90 minút 150 rpm.
4. Na misky s LB agarom (ampicilín, X-Gal, IPTG) bolo nanesených po 50 μ l, 200 μ l a 750 μ l suspenzie a rozotreté pomocou sterilnej hokejky.
5. Misky s rozotretými baktériami boli inkubované cez noc pri 37°C a nasledujúci deň vyhodnotené.

5.1.13 Overenie pozitívne transformovaných kolónií

Pre overenie prítomnosti vektoru s inzertom v kolónií bol plazmid izolovaný z baktérií *E. coli* a následne štiepený restriktívnymi endonukleázami. Poštiepený plazmid bol nanesený na TBE elektroforézu a veľkosť porovnaná s kontrolným prázdny plazmidom vyzolovaným z netransformovanej (modrej) kolónie. Baktérie vybrané na izoláciu boli pomocou sterilného špáradla preočkované na nové misky s ampicilínom.

5.1.14 Izolácia plazmidovej DNA

Izolácia plazmidovej DNA bola vykonaná pomocou QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen). Jednotlivé centrifugačné kroky, pokiaľ nebolo uvedené inak, prebiehali pri 17 900 x g.

1. Pomocou sterilnej bakteriálnej kľučky boli vybrané biele kolónie zaočkované do 2 ml LB/SOC média a kultivované cez noc v inkubátore pri 37°C a 250 rpm.
2. Médium s bunkami bolo prenesené do 1,5 ml centrifugačných skúmaviek a zozbierané 3-minútovou centrifugáciou pri 6 800 x g.
3. Peleta bola resuspendovaná v 250 μ l pufru P1.

4. K resuspendovanej pelete bolo pridaných 250 μ l lyzačného pufru P2 a zmes premiešaná pretočením skúmavky 4-6 krát. Inkubácia v lyzačnom pufru by nemala prebehať dlhšie ako 5 minút.
5. Pre zastavenie lyzačnej reakcie bolo pridaných 350 μ l pufru N3, zmes premiešaná a zcentrifugovaná po dobu 10 minút.
6. Supernatant bol prenesený do QIAprep kolónky umiestnenej do zbernej skúmavky a zcentrifugovaný po dobu 60s. Obsah zbernej skúmavky bol vyliaty.
7. Do kolónky bolo pridaných 500 μ l pufru PB, kolónka bola zcentrifugovaná po dobu 60s a obsah zbernej skúmavky bol vyliaty.
8. Do kolónky bolo pridaných 750 μ l pufru PE a zcentrifugovaná po dobu 60s.
9. Obsah zbernej skúmavky bol vyliaty, kolónka prenesená do novej zbernej skúmavky a zcentrifugovaná ďalšiu minútu, aby sa odstránil zvyšok kvapaliny.
10. Kolónka bola vložená do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky a pre elúciu plazmidovej DNA bolo na stred membrány napipetovaných 50 μ l EB pufru.
11. Kolónka bola zcentrifugovaná po dobu 1 minúty. DNA bola v prípade neskoršieho použitia uložená a skladovaná na -20°C .

5.1.15 Izolácia plazmidovej DNA alkalickou lýzou

Pre izoláciu plazmidovej DNA z baktérií *E.coli* bola použitá aj modifikovaná metóda štandardnej alkalickej lýzy.

1. Pomocou sterilnej bakteriálnej kľučky boli vybrané biele kolónie zaočkované do 2 ml LB/SOC média a kultivované cez noc v inkubátore pri 37°C a 250 rpm.
2. Bunky boli prenesené do 1,5 ml skúmaviek a zotbierané 1-minútovou centrifugáciou pri 12 000 x g.
3. Peleta buniek bola resuspendovaná v 100 μ l roztoku 1 (50 mM glukóza, 10mM EDTA, 25mM TrisHCl).
4. Následne bolo pridaných 200 μ l roztoku 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) a ihneď pridaných 200 μ l chloroformu.

5. Bunky boli lyzované 2 minúty a potom bolo pridaných 200 μ l roztoku 3 (5M octanu draselného, 11,5 ml bezvodnej kyseliny octovej, 28,5 mldH₂O).
6. Vzorky boli vortexované a zcentrifugované pri 12 000 x g po dobu 10 minút.
7. Horná fáza bola odobratá do nových 1,5 ml skúmaviek a DNA vyzrážaná s 500 μ l izopropanolu.
8. Skúmavky boli stočené pri 12 000 x g po dobu 10 minút a supernatant odpipetovaný.
9. Peleta bola premytá 200 μ l 70% etanolu a stočená po dobu 5 minút pri 12 000 x g.
10. Supernatant bol opatrne vyliaty a DNA bola zbavená zvyšného etanolu vysušením v laminárnom boxe.
11. Plazmidová DNA bola rozpustená v 20 μ l vody a skladovaná pri -20°C.

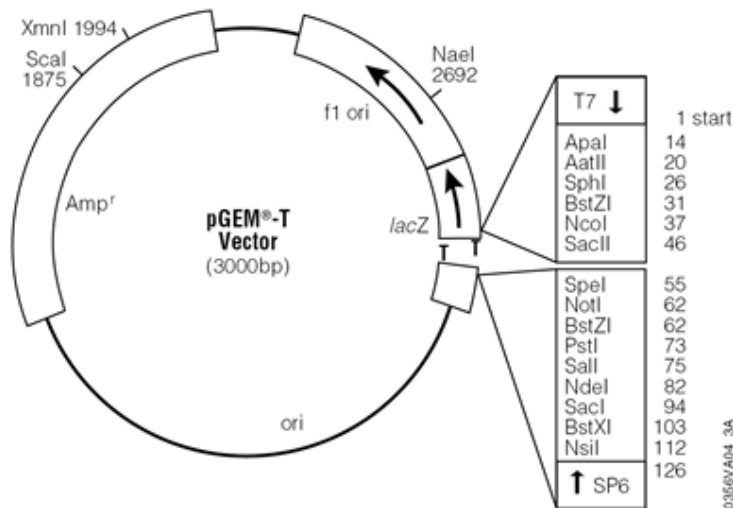
5.1.16 Izolácia plazmidu – QIAGEN Plasmid Mini Kit

1. Pomocou sterilnej bakteriálnej kľučky boli vybrané biele kolónie zaočkované do 3 ml LB/SOC média a kultivované cez noc v inkubátore pri 37°C a 250 rpm.
2. Bunky boli prepipetované do 2 ml mikrocentrifugačných skúmaviek a zozbierané 15-minútovou centrifugáciou pri 6000 x g a 4°C. Peleta bola resuspendovaná v 300 μ l P1 pufru.
3. Následne bolo pridaných 300 μ l P2 pufru, zmes premiešaná otáčaním skúmavky 4 – 6 krát a inkubovaná pri laboratórnej teplote po dobu 5 minút.
4. Bolo pridaných 300 μ l predchladeného P3 pufru, opäť premiešané otáčaním skúmavky 4 – 6 krát a inkubované na ľade po dobu 5 minút.
5. Skúmavku so zmesou centrifugujeme pri 17 900 x g po dobu 10 minút.
6. Vyváženie QIAGEN-tip 20 kolónky prebehlo pridaním 1 ml QBT pufru, ktorý sa nechal voľne pretiecť kolónkou.
7. Do kolónky bol pridaný supernatant z kroku 7 a nechal sa voľne pretiecť.
8. Kolónka bola následne dva krát premytá 2 ml QC pufru. Pufor sa nechal voľne pretiecť kolónkou.
9. DNA bola eluovaná do mikrocentrifugačnej skúmavky pridaním 800 μ l QF pufru. K eluátu bolo pridaných 560 μ l izopropanolu laboratórnej teploty, premiešané a zcentrifugované po dobu 30 minút pri 15 000 x g.

10. Supernatant bol opatrne vyliaty. K pelete bol pridaný 1 ml 70% etanolu a zcentrifugované 10 minút pri 15 000 x g.
11. Supernatant bol opatrne vyliaty a DNA zbavená zvyšného etanolu vysušením v laminárnom boxe.
12. Plazmidová DNA bola rozpustená v 20 µl vody a skladovaná pri -20°C.

5.1.17 Štiepenie plazmidovej DNA restriktívnymi endonukleázami

Pre overenie vektoru s inzerovaným úsekom správnej veľkosti bolo použité štiepenie plazmidu restriktívnou endonukleázou ApaI (Thermo Scientific). ApaI štiepi plazmidový pGEM-T vektor 14 bp od klonovacieho miesta a linearizuje ho (**Obr.6**). Reakčná zmes bola pripravená podľa **tabuľky 10** a štiepenie prebiehalo v termocykleri pri 37°C po dobu 90 minút. Lineárny vektor (3000bp) spolu s inzertom *DQBI-A* úsek tvoria 3704 bp veľkú lineárnu DNA, v prípade *DQBI-B* úseku je to 3613 bp. Overovanie veľkostí úsekov bolo robené pomocou TBE agarózovej elektroforézy, kde boli porovnávané s veľkosťou prázdneho vektora (3000 bp).



Obr. 6: pGEM[®]-T vektor (prevzaté z: www.promega.com)

Tab. 10: Zloženie reakčnej zmesi pre štiepenie plazmidovej DNA

Zložka reakcie	Objem [μ l]
plazmidová DNA	2
10 x pufor B	1
ApaI	0,5
dH ₂ O	6,5
celkový objem	10

5.1.18 Sekvenácia

Na sekvenáciu bolo odoslaných 6 až 8 klonov z jedného úseku (A aj B) (t.j. od jedného človeka 12 až 18 klonov). Odoslané boli iba tie kolónie, pri ktorých bola overená úspešná transformácia pomocou štiepenia restriktívnymi endonukleázami. Bakteriálne kolónie sme pripravili pomocou protokolu podľa Sambrooka *et al.* (1989):

1. Bol pripravený 1% LB agar a zautoklávovaný.
2. Po vychladnutí bol sterilne pridaný ampicilín a agar bol rozpipetovaný po 150 μ l do 96-jamkovej doštičky.
3. Pomocou sterilných špáradiel boli pozitívne transformované baktérie odobrané a zapichnuté do jednotlivých jamiek doštičky.
4. Doštička s bakteriálnymi kolóniami bola inkubovaná cez noc pri izbovej teplote, následne uložená do chladničky až do doby odoslania. Vzorky boli sekvenované firmou Macrogen v Kórei.

5.2 RNA analýza

5.2.1 Izolácia RNA

RNA bola izolovaná z plnej krvi pomocou kitu QIAamp[®] RNA Blood Mini Kit (Qiagen) podľa postupu doporučeným výrobcom. Všetky centrifugačné kroky prebiehali pri 4°C.

1. 1,5 ml plnej krvi bolo zmiešaných s 7,5 ml EL pufru a zmes inkubovaná 10-15 minút na ľade. Behom inkubácie boli skúmavky 2x zľahka zvertexované.
2. Bunky boli stočené po dobu 10 minút pri 500 x g a následne pipetou opatrne odstránený supernatant.

3. K pelete boli pridané 3 ml pufru EL, peleta bola resuspendovaná a znova stočená po dobu 10 minút pri 500 x g. Supernatant bol opatrne odstránený pipetou.
4. Peleta bola dôkladne resuspendovaná v 600 µl RLT pufru (vopred zmiešaným s β-merkaptoetanolom podľa pokynov výrobcu).
5. Lyzát bol napipetovaný do QIAshredder kolónky so zbernou skúmavkou a zcentrifugovaná 2 minúty pri 17 900 x g.
6. K filtrátu v zbernej skúmavke bolo pridaných 600 µl 70% etanolu a filtrát premiešaný pipetovaním.
7. Celý objem bol nanesený do QIAamp kolónky so zbernou skúmavkou a zcentrifugovaná 15s pri 12 000 x g.
8. QIAamp kolónka bola prenesená do novej zbernej skúmavky a premytá 700 µl pufru RW1 a znovu zcentrifugovaná 15s pri 12 000 x g.
9. Kolónka bola opäť prenesená do novej zbernej skúmavky a bolo pridaných 500 µl RPE pufru (vopred pridaný 96 – 100% etanol podľa pokynov výrobcu). Kolónka bola zcentrifugovaná 15s pri 12 000 x g.
10. Do kolónky bolo znova nanesených 500 µl RPE pufru a zcentrifugovaná 3 minúty pri 17 900 x g.
11. Kolónka bola prenesená do novej zbernej skúmavky a zcentrifugovaná pri 17 900 x g po dobu 1 minúty.
12. Kolónka bola umiestnená do novej 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky a na stred membrány bolo nanesených 30 µl RNase-free vody. RNA bola eluovaná 1-minútovou centrifugáciou pri 12 000 x g.
13. Vyizolovaná RNA bola vzápätí použitá na reverznú transkripciu alebo skladovaná pri -80°C.

5.2.2 Reverzná transkripcia

Vyizolovaná RNA bola prepísaná do cDNA reverznou transkripciou pomocou High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Postupovalo sa podľa doporučenia výrobcu.

1. Reakčná zmes pre reverznú transkripciu bola pripravená na ľade podľa **tabuľky 11**.

Tab. 11: Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu

Zložka reakcie	Objem [μ l]
10 x RT pufor	2
25 x dNTP mix (100 nM)	0,8
10 x RT náhodné primery	2
Multiscribe reverzná transkriptáza	1
RNase-free voda	4,2
celkový objem	10

2. Reakčná zmes bola zľahka premiešaná a napipetovaná do PCR skúmaviek. K zmesi bolo pridaných toľko RNA, aby jej výsledné množstvo v reakcii bolo 300 ng.
3. Reakčná zmes bola doplnená RNase-free vodou do 20 μ l a skúmavky boli premiešané a stočené.
4. Skúmavky boli vložené do termocykleru, na ktorom bol nastavený program pre reverznú transkripciu podľa **tabuľky 12**.

Tab. 12: Teplotný program pre reverznú transkripciu

Reakčný krok	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [min]
hybridizácia	25	10
reverzná transkripcia	37	120
inaktivácia enzýmu	85	5

5.2.3 Kvantitatívna PCR

Pre určenie miery expresie jednotlivých alel *HLA DQB1* bola použitá kvantitatívna PCR s fluorescenčnou sondou TaqMan™. Ako endogénna kontrola bol použitý gén *DRA*. Všetky uvedené kroky prebiehali na ľade.

1. Pred pipetovaním reakčnej zmesi bola cDNA 10x riedená na výsledný objem 30 ng/μl. Reakčná zmes bola pripravená podľa **tabuľky 13**.
2. Do každej jamky 96-jamkovej doštičky bolo napipetovaných 7,5 μl reakčnej zmesi a 5 μl nariadenej cDNA. Reakcie boli pripravené v tripletoch.
3. Doštička bola následne krátko stočená pri 2000 x g (cca 1 minútu). Amplifikácia prebehla v prístroji 7000 SDS ABI Prism podľa programu uvedeného v tabuľke **tabuľke 14**.

Tab. 13: Zloženie reakčnej zmesi pre kvantitatívnu PCR

Zložka reakcie	Objem [μl]
Gene expression master mix	6,25
Forward primer (10 μM)	0,375
Reverse primer (10 μM)	0,375
Sonda (5 μM)	0,5
Celkový objem	7,5

Tab. 14: Teplotný program pre kvantitatívnu PCR

Reakčný krok	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet opakovaní
aktivácia UNG	50	2	
aktivácia polymerázy	95	10	
denaturácia	95	00:15	50
hybridizácia a elongácia	60	1	50

5.3 Štatistická analýza

Štatistické spracovanie výsledkov prebiehalo pomocou programu GraphPad Prism 5.04. Pre porovnanie celkovej metylácie jednotlivých alel génu *DQB1* bol použitý neparametrický Mann-Whitneyho test na hladine významnosti 0,05. Analýza metylačného stavu jednotlivých CpG miest bola vypracovaná použitím Fisherovho dvojstranného exaktného testu na hladine významnosti $\alpha = 0,05$. Asociácia celkovej metylácie a relatívnej expresie jednotlivých alel génu *DQB1* bola spracovaná pomocou korelačného testu s Pearsonovým koeficientom.

6. VÝSLEDKY

6.1 Genotypizácia HLA II. triedy

Alely génov *HLA DRB1*, *DQA1* a *DQB1* boli určené pomocou sekvenčne špecifických primerov a spracované u 33 pacientov s T1DM. Na základe očakávaní, sú najviac zastúpené práve rizikové haplotypy *HLA DRB1*04 – DQA1*0301 – DQB1*0302*. Celkové zastúpenie jednotlivých haplotypov je uvedené v **tabuľke 15**.

Tab. 15: Frekvencia haplotypov u 33 pacientov s diabetes mellitus 1. typu. Najviac zastúpený je s 39,4% predispozičný haplotyp *DRB1*04 – DQA1*0301 – DQB1*0302*.

Genotyp			Haplotyp	
DR	DQA1	DQB1	počet haplotypov	zastúpenie (%)
01	0101	0501	7	10,6
03	0501	0201	12	18,2
04	0301	0302	26	39,4
04	0301	0305	1	1,5
04	0303	0301	1	1,5
04	0303	0302	1	1,5
07	0201	0202	8	12,1
08	0401	0402	1	1,5
10	0105	0501	1	1,5
11	0505	0301	2	3,1
13	0102	0604	3	4,6
13	0103	0603	1	1,5
15	0102	0602	1	1,5
16	0102	0502	1	1,5

6.2 Analýza metylácie DNA v regulačnej oblasti génu *HLA DQB1*

Analýza metylačného stavu regulačnej oblasti génu *HLA DQB1* bola vypracovaná na základe sekvenácií úseku dlhého 1286 bp (**Príloha 1**). Z dôvodu dĺžky bol úsek rozdelený na dve časti – úsek A dlhý 704 bp a úsek B dlhý 613 bp. V prvej oblasti (A) bol zisťovaný počet metylovaných CpG dinukleotidov od nukleotidu 1237 po nukleotid 1728 od začiatku štartu transkripcie. V druhej oblasti (B) boli analyzované pozície od 1768 po 2304 nukleotidov vzhľadom k štartu transkripcie. Celkovo bolo na sekvenáciu zaslaných 192 sekvencií. Po vyradení sekvencií

rekombinovaných pri PCR reakcii a sekvencií s úspešnosťou konverzie nižšou ako 95% zostalo 65 sekvencií (pre úsek A) a 33 sekvencií (pre úsek B). Na základe polymorfizmov, dostupných v online databázach, bolo určené, ktorej alele *HLA DQB1* daná sekvencia prislúcha (**Príloha 2**). Vo vyhodnotení sú zastúpené len alely *DQB1**0201 a *0302, pretože pomocou navrhnutých primerov sa podarilo amplifikovať iba tieto dve alely. Celkový počet CpG miest a priemerný počet metylovaných miest na 100 nukleotidov sekvencie génu *DQB1* je uvedený v **tabuľke 16**.

Tab. 16: Celkový počet CpG miest a priemerný počet metylácií na 100 nukleotidov.

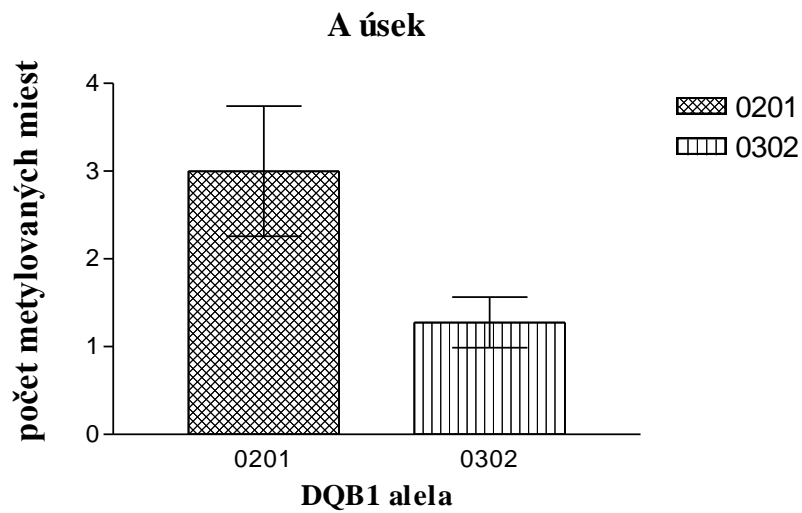
<i>DQB1</i> alela	pozícia v géne [bp]											
	1200	1300	1400	1500	1600	1700	1800	1900	2000	2100	2200	2300
celk. CpG	3	3	5	12	8	11	7	6	6	4	3	3
0302	2	2	1	3	0	1	1	2	0	0	0	1
celk. CpG	4	3	6	14	10	13	7	6	7	4	6	6
0201	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	4	4

6.2.1 Porovnanie celkovej metylácie alel v regulačnej oblasti génu *DQB1*

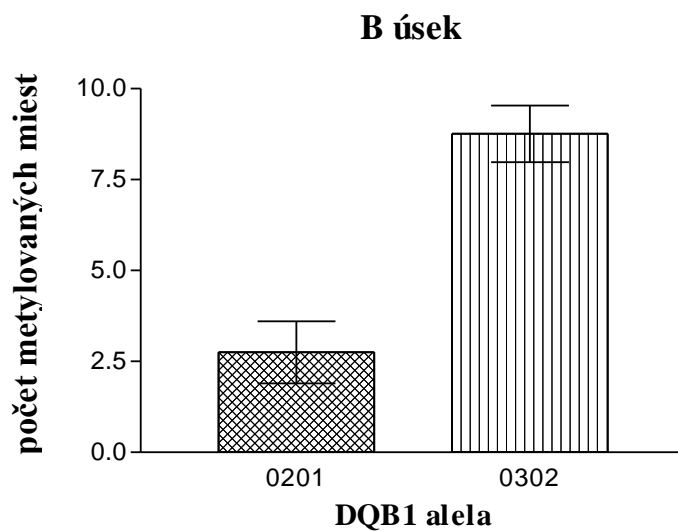
Na porovnanie celkovej metylácie alel *DQB1**0201 a *DQB1**0302 bol použitý neparametrický Mann-Whitneyho test na hladine významnosti 0,05. Štatisticky významné hodnoty boli korigované Bonferroniho korekciou (p hodnoty boli vynásobené počtom porovnávaných alel, t.j. 2). Jednotlivé dáta sú uvedené v **tabuľke 17**. Štatisticky významný rozdiel bol nájdený medzi alelami *DQB1**0201 a *DQB1**0302 v prípade úseku B, v ktorom je alela *DQB1**0302 viac metylovaná. V prípade úseku A nebol rozdiel v celkovej metylácii preukázaný (p = 0,252). Rozdiel medzi celkovou metyláciou *DQB1**0201 a *DQB1**0302 je znázornený na **obrázku 7** (úsek A) a **8** (úsek B).

Tab. 17: Porovnanie celkovej metylácie alel *DQB1*. Štatisticky významná hodnota p je zvýraznená tučne.

porovnávané <i>DQB1</i> alely	úsek <i>DQB1</i>	p hodnota po korekcii
0201x0302	A	0,252
0201x0302	B	0,022



Obr. 7: Porovnanie priemerného počtu metylovaných CpG miest alel *DQB1**0201 a *DQB1**0302 v úseku A.



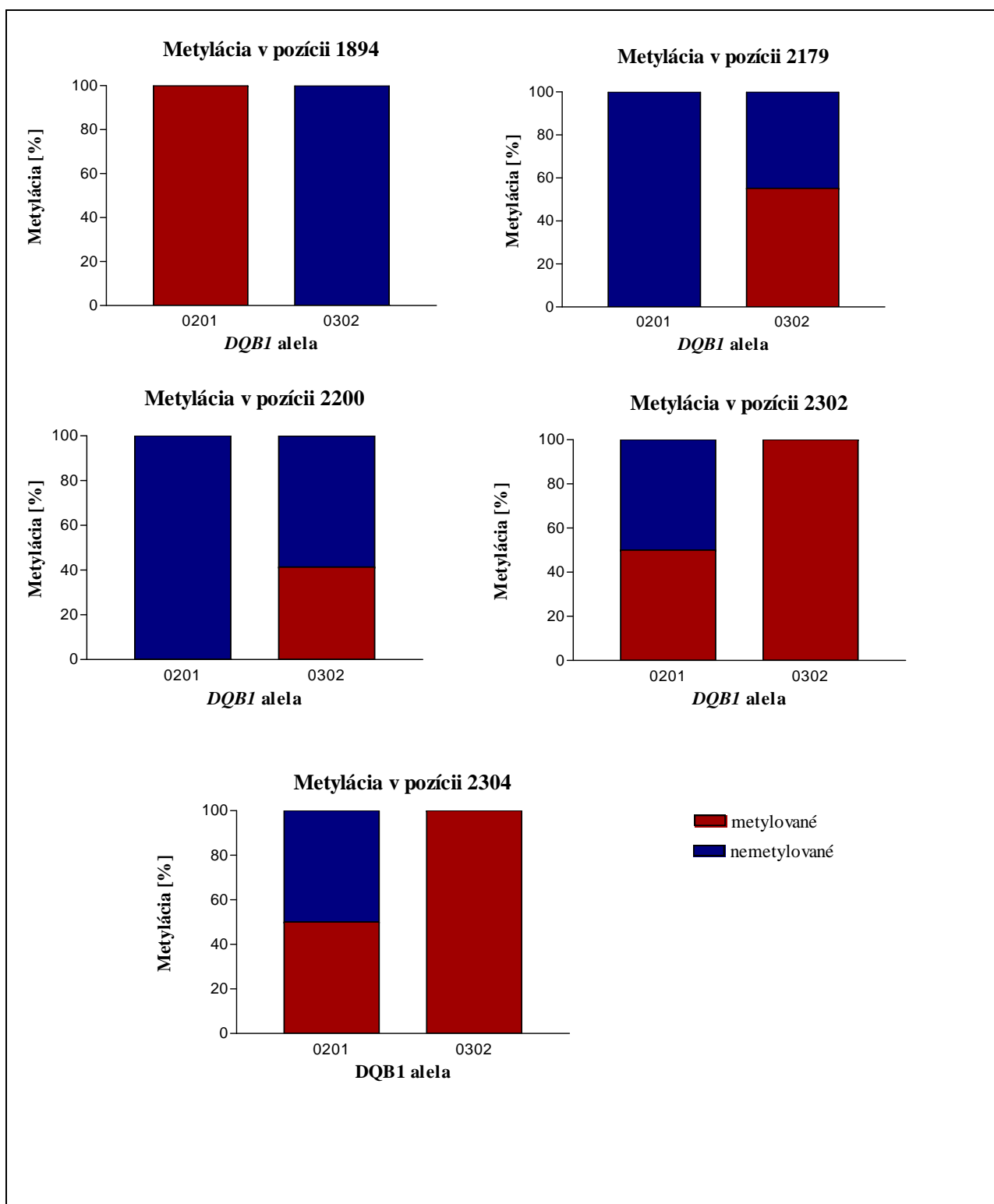
Obr. 8: Porovnanie priemerného počtu metylovaných CpG miest alel *DQB1**0201 a *DQB1**0302 v úseku B.

6.2.2 Porovnanie jednotlivých metylačných pozícií v regulačnej oblasti génu *DQBI*

V sekvenovanej oblasti génu *DQBI* bolo analyzovaných celkom 63 CpG pozícií, z toho 40 CpG miest sa nachádzalo v A úseku a 23 CpG miest v B úseku. Porovnanie jednotlivých metylačných pozícií u alel *DQBI**0201 a *DQBI**0302 bolo spracované pomocou kontingenčných tabuliek dvojstranným Fisherovým exaktným testom na hladine významnosti 0,05. Štatisticky významné rozdiely boli nájdené v oboch úsekoch, avšak po Bonferroniho korekcii (p hodnoty boli vynásobené číslom 4) sa ako štatisticky významné preukázali iba CpG pozície v úseku B. Signifikantné p hodnoty po korekcii v úseku B sú uvedené v **tabuľke 18**. Grafy s percentuálnym zastúpením jednotlivých metylovaných a nemetylovaných CpG miest v úseku B sú uvedené v **obrázku 9**.

Tab. 18: Štatisticky významné rozdiely v metylačných pozíciách u alel *DQBI**0201 a *DQBI**0302. Štatisticky významná hodnota p je zvýraznená tučne.

<i>DQBI</i> alely úsek B	CpG miesto	p po korekcii	95% CI
0201x0302	1894	0,001	6,779-23480
	2179	0,048	0,002-0,908
	2200	0,048	0,002-0,908
	2302	0,046	0,001-0,459
	2304	0,046	0,001-0,459



Obr. 9: Analýza metylácie alel *DQB1**0201 a *DQB1**0302 v úseku B. V grafe sú uvedené miesta, v ktorých boli rozdiely medzi alelami štatisticky významné. V pozíciách 2179, 2200, 2302 a 2304 je viac metylovaná alela *DQB1**0302. Zatiaľ čo alela *DQB1**0201 je v pozícii 1894 kompletne metylovaná, alela *DQB1**0302 nie je v tejto pozícii metylovaná vôbec.

6.3 Kvantitatívna PCR

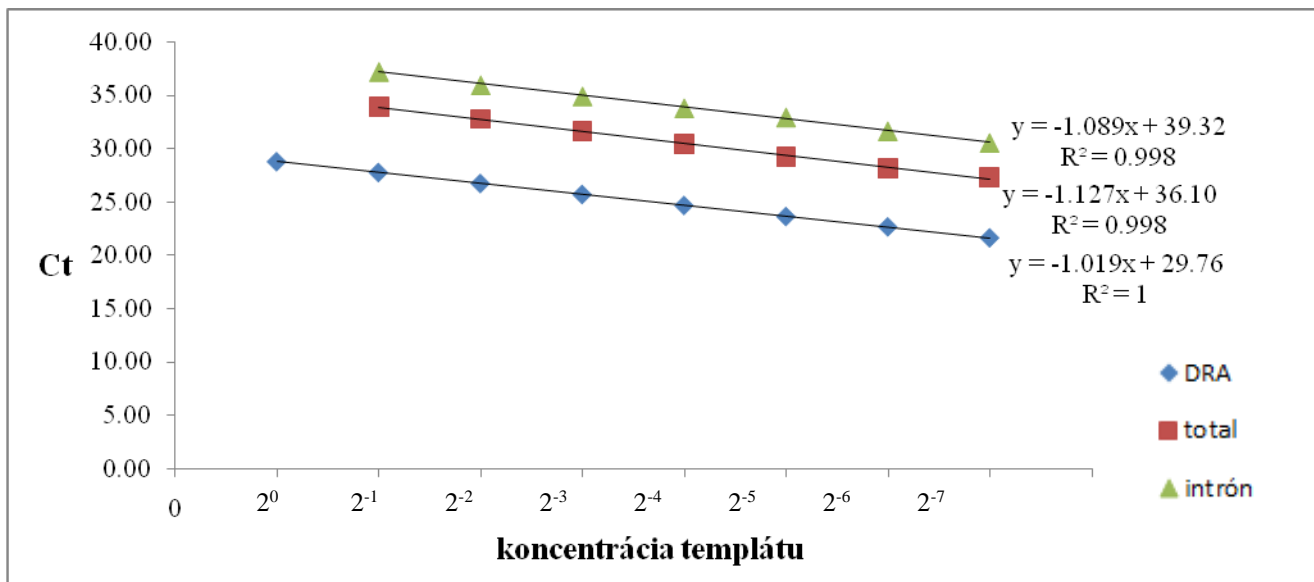
6.3.1 Analýza úrovne expsie mRNA u alel *HLA DQB1*

RNA vyizolovaná z leukocytov pacientov bola pomocou reverznej transkripcie prepísaná do cDNA a množstvo špecifickej mRNA bolo zmerané metódou real-time PCR. Všetky reakcie, t.j. reakcie kvantifikujúce jednotlivé alely *DQB1*, gén pre *DRA*, *DQB1* total aj intrón boli pripravené v tripletoch. Odľahlé hodnoty boli vyradené a zo zvyšných troch hodnôt C_t bola vypočítaná priemerná hodnota C_t pre danú vzorku. Hladina expsie jednotlivých alel génu *DQB1* bola počítaná vzhľadom k expresii génu *DRA*, ktorý bol vybraný ako endogénna kontrola. Keďže niektoré z použitých assayí amplifikujú aj DNA, získané hodnoty boli upravené tak, aby sa odstránil vplyv prípadnej kontaminácie vzoriek DNA. Jej obsah bol určený pomocou assaye umiestnenej do intrónu génu *DQB1* (*DQB1* intrón). Relatívna expresia jednotlivých alel bola vypočítaná podľa vzorca:

$$\frac{n_{DQB1}}{n_{DRA}} = \frac{(1 + U_{DRA})^{C_t}}{(1 + U_t)^{C_t DQB1}}$$

Písmeno n označuje množstvo génu či alely, ktoré vstupuje do real-time PCR reakcie a U označuje účinnosť assaye. Účinnosť assayí pre jednotlivé *DQB1* alely bola odvodená porovnaním hodnôt C_t získaných z assaye pre danú alelu a z assaye, ktorá amplifikuje všetky alely génu *DQB1* (*DQB1* total). U homozygotov je množstvo alely vstupujúce do reakcie rovné celkovému množstvu génu *DQB1*, a teda aj hodnoty C_t pre obe assaye by mali byť rovnaké. V prípade, že sa hodnoty C_t líšia, vypočíta sa z rozdielu medzi nimi rozdiel v účinnostiach oboch assayí. Účinnosť amplifikácie pre *DRA*, *DQB1* total a intrón bola získaná pomocou série dvojkových riedení (8 koncentrácií) templátu od 2^0 do 2^{-7} (**Obr. 10**). Vzhľadom k stanovenej účinnosti assaye pre *DRA* z predchádzajúcich pokusov (ktoré boli súčasťou iného projektu nášho laboratória) bola vypočítaná účinnosť pre *DQB1* total a intrón podľa vzorca:

$$E_{total} = E_{DRA} + \left(\frac{1}{2}\right)^{(1/k_{total})} - \left(\frac{1}{2}\right)^{(1/k_{DRA})}$$

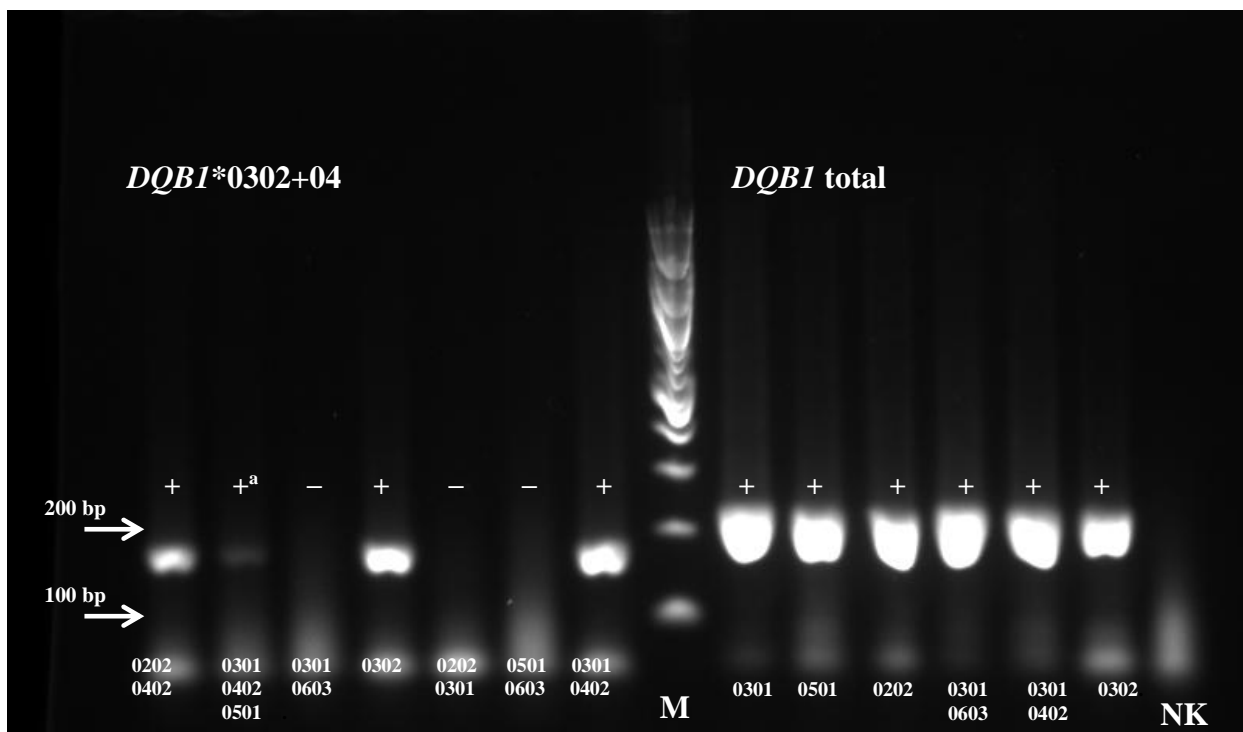


Obr. 10: Výpočet účinnosti pre *DQBI* total a intrón. Namerané hodnoty C_t dilučného radu boli vynesené do grafu. Na osi x je koncentrácia templátu v logaritmickej merítke. Na osi y je zodpovedajúca hodnota C_t . Bodmi v grafe bola preložená krivka a určená jej smernica k . Výpočtom zo smernice priamky závislosti priemernej hodnoty C_t na dvojkovom logaritme koncentrácie riedenej vzorky cDNA bola stanovená účinnosť pre *DQBI* total a intrón.

Súčet hodnôt relatívnej expácie oboch alel *DQBI* u daného človeka bol porovnávaný s hodnotami relatívnej expácie pre *DQBI* total (výsledný pomer by mal byť rovný 1). Pokiaľ sa hodnoty nachádzali mimo intervalu $\langle 0,70; 1,30 \rangle$, boli z ďalšieho štatistického spracovania vyradené.

6.3.2 Overenie špecifity primerov pre kvantitatívnu PCR

Pre kvantitatívnu PCR génu *DQBI* bolo potrebné overiť účinnosť a špecifitu navrhnutých primerov/assayí. Príklad overenia primerov pre alelu *DQBI** sa nachádza na **obrázku 11**.



Obr. 11: Overenie účinnosti a špecifity assayí na kvantifikáciu génu *DQB1*. Assay *DQB1*0302+04* amplifikuje alely *DQB1*0302*, **0303* a **04* (veľkosť produktu 175 bp). Assay *DQB1 total* amplifikuje všetky alely *DQB1* (veľkosť produktu 221 bp). Do amplifikačnej reakcie bez prítomnosti sondy bola ako templát pridaná cDNA jedincov s rôznymi *DQB1* genotypmi. PCR produkty boli rozdelené elektroforézou na gele z 1,5% agarózy. V spodnej časti gelu je pre každú reakciu vyznačený genotyp jedinca, ktorého cDNA vstupovala do reakcie. Znamienka “+” a “-“ značia, či sme v danej reakcii očakávali špecifický produkt.

NK – negatívna kontrola, M – 100 bp DNA ladder.

^ado reakcie bola cDNA omylom napipetovaná dvakrát

6.3.3 Porovnanie expresie jednotlivých alel génu *DQB1*

Hladina expresie mRNA u jednotlivých alel bola vzťahovaná k expresii génu *HLA DRA*. Príklad spracovania nameraných hodnôt je uvedený pre alelu *DQB1*05* v **tabuľke 19**. Miera expresie jednotlivých alel *DQB1* je znázornená na **obrázku 12**. Rozdiely v expresii medzi alelami boli vyhodnotené neparametrickým Mann-Whitneyho testom na hladine významnosti 0,05 a korigované na mnohopočetné porovnávanie pomocou Bonferroniho korekcie. Štatisticky významný rozdiel bol nájdený medzi expresiou *DQB1*0202* a **0501* ($p = 0,048$), **0301* a **0302* ($p = 0,049$), *DQB1*0302* a **0501* ($p = 0,028$). Relatívna expresia alel génu *DQB1* u heterozygotov je uvedená v **tabuľke 20**.

Tab. 19: Hodnoty použité pri meraní relatívnej expresie alely *DQBI0501.**

č. pacienta <i>DQBI</i> *0501	<i>DRA</i> $\bar{x}C_t$	<i>DQBI</i> total $\bar{x}C_t$	<i>DQBI</i> intrón $\bar{x}C_t$	<i>DQBI</i> *0501 $\bar{x}C_t$	alela*05/ <i>DRA</i> ^a
7	28,48	34,44	31,33	29,26	0,49
13	26,57	32,73	34,37	28,74	0,28
27	25,43	31,10	31,05	27,23	0,19
37	24,80	30,43	31,77	27,46	0,19
43	20,91	26,72	29,60	23,16	0,27
65	21,90	26,51	29,10	23,82	0,34
68	20,89	26,94	30,09	22,88	0,34
69	22,26	28,13	30,62	25,43	0,15
76	22,95	27,68	28,81	23,69	0,77
77	21,99	27,60	29,85	25,41	0,12
79	21,69	27,25	30,15	25,11	0,12

$$^{a}05/DRA = [(3/2)*DRA/^{a}05]- 1/2*(T/I)$$

$$^{a}DRA = (1+U_{DRA})^{Ct_{DRA}}$$

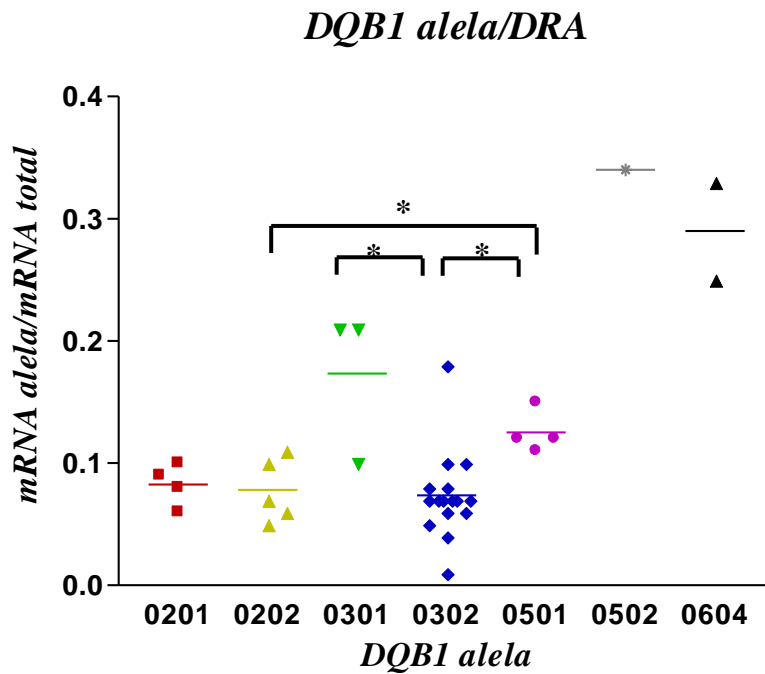
$$^{a}05 = (1+U_{02})^{Ct_{02}}$$

$$T = (1+U_{total})^{Ct_{total}}$$

$$I = (1+U_{intron})^{Ct_{intron}}$$

Tab. 20: Relatívna expresia alel génu *DQBI* u heterozygotov.

kombinácia alel <i>DQBI</i>	n	pomer alel (priemer)	rozsah	SD
0201, 0302	3	0,91	0,83 – 1,08	0,12
0202, 0302	3	0,99	0,78 – 1,28	0,21
0302, 0501	2	0,56	0,56 – 0,57	0,01
Genotypy prítomné len u jedného pacienta				
0202, 0301		0,52	–	–
0302, 0604		0,13	–	–



Obr. 12: Porovnanie úrovne expsie mRNA jednotlivých alel *DQB1*. Štatistickú významnosť dosiahol rozdiel medzi expresiou alel *DQB1**0202 a* 0501 ($p = 0,048$), *DQB1**0301 a *0302 ($p = 0,049$), *DQB1**0501 a *0302 ($p = 0,028$).

7. DISKUSIA

Diabetes mellitus 1. typu je autoimunitné, multifaktoriálne ochorenie, ktorého výskyt vo svete neustále narastá. Genetická predispozícia hrá v etiopatogenéze tohto ochorenia dôležitú úlohu; najmä lokus hlavného histokompatibilného komplexu. Avšak diskonkordancia výskytu T1DM u monozygotných dvojčiat, ktorá varíruje medzi 13 – 67,7%, je jedným z dôkazov vplyvu negenetických faktorov (Huber *et al.*, 2013). Tie môžu interagovať s predispozičnými génmi a spúšťať kaskádu vedúcu k T1DM. Prostredie s genotypom interaguje aj prostredníctvom epigenetických mechanizmov. Jedným z nich je metylácia DNA, ktorej sa venuje táto diplomová práca.

V súbore genotypizovaných pacientov bol podľa predpokladu najviac zastúpený predispozičný haplotyp *HLA DRB1*04 – DQA1*0301 – DQB1*0302*, ktorý je silno asociovaný s výskytom T1DM. Predpokladá sa, že ide o nestabilný dimér, ktorý s menšou efektivitou prezentuje antigénne peptidy. Táto nestabilita môže ovplyvniť negatívnu selekciu autoantigénov v týmuse a prispievať k autoimunitě (Ettinger *et al.*, 1998). Protektívny haplotyp *HLA DRB1*13 – DQA1*0102 – DQB1*0602* sa v súbore pacientov nachádza s 1% zastúpením. Už prítomnosť jedinej kópie alely *DQB1*0602* v genotype znižuje riziko ochorenia T1DM. Výskyt pacientov s T1DM, ktorí sú nositeľmi protektívnej alely je ďalším dôkazom, že súčasťou etiopatogenézy tohto ochorenia sú aj negenetické vplyvy.

V rámci analýzy genetických a epigenetických interakcií v etiológii T1DM bol zisťovaný metylačný stav jednotlivých alel génu *DQB1*. Metylačný profil rôznych lokusov predisponujúcich k tejto chorobe analyzovali u monozygotných dvojčat diskordantných pre T1DM Stefan *et al.*. Rozdiely v metylácii DNA našli u 6 génov, medziiným aj u *HLA-DQB1*, ktorý bol u pacientov hypermetylovaný (Stefan *et al.*, 2014). V našej štúdii bola analyzovaná metylácia DNA génu *HLA-DQB1* len v rámci skupiny pacientov s T1DM a zistili sme štatisticky významný rozdiel v úseku B (pozícia 1730 nt – 2343 nt), v ktorom je alela *DQB1*0302* metylovaná viac ako alela *DQB1*0201*. V našej štúdii sme však na rozdiel od Stefan *et al.* okrem celkovej metylácie študovali aj metylácie jednotlivých CpG miest. V prípade porovnania konkrétnych metylačných pozícií v géne *DQB1* boli nájdené štatisticky významné hodnoty opäť v úseku B v piatich nukleotidových pozíciách. Tak ako v prípade celkovej metylácie, bola aj teraz

alela *DQBI**0302 metylovaná viac v porovnaní s alelou *DQBI**0201 v pozícií 2179, 2200, 2302 a 2304. Iba v pozícií 1894 bola preukazne viac metylovaná alela *DQBI**0201.

Jedným z cieľov diplomovej práce bolo zamyslieť sa, či zistené rozdiely v metylácii alel *DQBI* ovplyvňujú ich expresiu a môžu tak prispieť k objasneniu etiológie T1DM. Úroveň expresie alely *DQBI**0302 bola výrazne znížená oproti alelám *DQBI**0501 a *0301. Znížená expresia alely *DQBI**0302 oproti *0201 koreluje s výsledkami Beaty *et al.*. Pomocou kvantitatívnej PCR zistili, že v bunkových líniiach fibroblastov je expresia alely *DQBI**0302 nižšia ako expresia alely *DQBI**0301. Zníženú expresiu alely *DQBI**0302 dali do súvislosti s funkčným polymorfizmom na úrovni DNA v regulačnej oblasti v promótoře. (Beaty *et al.*, 1995).

V tejto diplomovej práci bola zistená korelácia medzi zvýšenou metyláciou alely *DQBI**0302 a jej zníženou relatívnou expresiou. Zaujímavosťou je, že CpG ostrovy sa v prípade génu *DQBI* nenachádzajú v promótoře, ale v intróne 1, exóne 2 a intróne 2. Metylácia CpG dinukleotidov je všeobecne považovaná za negatívny regulátor transkripcie. Preto stojí za uváženie, či zvýšená metylácia v úseku B alely *DQBI**0302 (t.j. koniec exónu 2 a intrón 2) môže mať regulačnú funkciu, poprípade interagovať s promótorom a tým vplývať na úroveň expresie. Dôkaz, že aj vo vnútri intrónu sa môžu nachádzať regulačné miesta, na ktoré sa viažu transkripčné faktory popísali vo svojej štúdií pre gén pre IL-4 Tykocinski *et al.* (Tykocinski *et al.*, 2005). Ďalším spôsobom akým môže metylácia vo vnútri génu regulovať transkripciu je aktivácia chromátin remodelujúcich komplexov. Zvýšené množstvo metylovaných cytozínov pôsobí na deacetyláciu histónov a následne vyvoláva transkripčne inaktívny stav (Klose a Bird, 2006).

Bolo spomenuté, že dimér *DQAI**0301 – *DQBI**0302 je relatívne nestabilný a menej efektívne prezentuje exogénne peptidy T_h bunkám (Ettinger *et al.*, 1998). Otázkou je, či menej exprimovaná alela *DQBI**0302 môže tento účinok ešte zosilňovať a prispievať k rizikovosti pre vznik T1DM. Znížená expresia molekúl HLA II. triedy na antigén prezentujúcich bunkách môže mať negatívny vplyv na adaptívnu imunitnú odpoveď a prispievať k vzniku autoimunitných ochorení. Hanson *et al.* potvrdili názor, že množstvo exprimovaných molekúl HLA II. triedy na antigén prezentujúcich bunkách má vplyv na vývoj T1DM (Hanson *et al.*, 1996). Pri zníženej expresii *DQBI**0302 môže dochádzať k neefektívnej prezentácii autoantigénov protektívnym, regulačným T bunkám. Na zistenie ďalších štatisticky významných asociácií bude potrebné analyzovať a sekvenovať väčšie množstvo dát. Keďže pomocou navrhnutých primerov sa

podarilo z bisulfitovanej DNA amplifikovať iba alely *DQB1**0201 a *0302, nemôžeme porovnať úroveň expresie ostatných alel s ich metylačným profilom.

Jednoznačná odpoveď či hypermetylácia alebo hypometylácia predispozičných alel *DQB1* môže vplývať na rozvoj T1DM doposiaľ nie je. Avšak je dobré sa zamyslieť, či môžu byť epigenetické zmeny u autoimunitných ochorení pôvodcom abnormálnej imunitnej odpovede, ktorá vedie k vzniku ochorenia alebo sú tieto zmeny výsledkom samotného ochorenia.

8. ZHRNUTIE

Táto diplomová práca bola vypracovávaná ako súčasť rozsiahlejšej štúdie venujúcej sa epigenetickej regulácii génov HLA II. triedy. V spracovanom súbore sa preto nachádzali iba pacienti s *diabetes mellitus* 1. typu, pričom v našom laboratóriu sa kolegovia venovali aj zdravým kontrolám. Po spracovaní a analýze výsledkov boli odvodené nasledujúce závery:

- Pri porovnaní celkovej metylácie v regulačnej oblasti génu *DQBI* bol nájdený štatisticky významný rozdiel medzi alelami *DQBI**0201 a *0302 v úseku B. Viac metylovaná bola alela *DQBI**0302.
- Analýza jednotlivých metylačných miest preukázala signifikantný rozdiel medzi alelami *DQBI**0201 a *0302 v úseku B na piatich nukleotidových pozíciách. V pozíciách 2179, 2200, 2302 a 2304 bola viac metylovaná alela *DQBI**0302. Zatiaľ čo alela *DQBI**0201 bola v pozícii 1894 kompletne metylovaná, alela *DQBI**0302 nebola metylovaná vôbec.
- Štatisticky významný rozdiel bol nájdený medzi expresiou *DQBI* *0202 a *0501, *0301 a *0302, *DQBI**0302 a *0501. Alela *DQBI**0302 mala preukázateľne najnižšiu úroveň expsie. Možnou príčinou nízkej hladiny mRNA v antigén prezentujúcich bunkách je zvýšená úroveň metylácie v úseku B alely *DQBI**0302.

Analýza metylácie v regulačnej oblasti *DQBI* bola vypracovaná iba na alelách *DQBI**0201 a *0302, pretože navrhnuté primery amplifikovali len tieto alely. Je možné, že po rozšírení súboru, poprípade navrhnutí špecifických primerov budú nájdené ďalšie štatisticky významné hodnoty.

Existuje mnoho kaskád, ktorými sa môže u konkrétneho jedinca vyvinúť T1DM. Problémom ostáva genetická variabilita tohto ochorenia spojená s úlohou environmentálnych faktorov, ktoré vplyvajú na jedinca v rôznom veku a v rôznych dávkach. Nové poznatky a informácie o etiopatogenéze T1DM by mohli prispieť k lepšiemu pochopeniu tohto ochorenia, účinnejšej diagnostike, liečbe a možno budúcej prevencii.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Acharjee S., Ghosh B., Al-Dhubiab B.E., Nair A.B. (2013): Understanding type 1 diabetes: etiology and models. *Can J Diabetes* 37: 269 – 276.
- Akerblom H.K., Vaarala O., Hyöty H., Ilonen J., Knip M. (2002): Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am J Med Genet* 115: 18 - 29.
- Akirav E.M., Lebastchi J., Galvan E.M., Henegariu O., Akirav M., Ablamunits V., Lizardi P.M., Herold K.C. (2011): Detection of β cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 19018 – 19023.
- Altmüller J., Palmer L.J., Fischer G., Scherb H., Wjst M. (2001): Genomwide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find. *Am J Hum Genet* 69: 936 – 950.
- Atkinson M.A., Bowman M.A., Kao K.J., Campbell L., Dush P.J., Shah S.C., Simell O., Maclaren N.K. (1993): Lack of immune responsiveness to bovine serum albumin in insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 329: 1853 – 1858.
- Barbot W., Dupressoir A., Lazar V., Heidmann T. (2002): Epigenetic regulation of an IAP retrotransposon in the aging mouse: progressive demethylation and de-silencing of the element by its repetitive induction. *Nucleic Acids Res* 30: 2365 – 2373.
- Beatty J.S., West K.A., Nepom G.T. (1995): Functional effects of a natural polymorphism in the transcriptional regulatory sequence of HLA-*DQB1*. *Mol Cell Biol* 15: 4771 – 4782.
- Bell G.I., Horita S., Karam J.H. (1984): A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent *diabetes mellitus*. *Diabetes* 33: 176 – 183.
- Bestor T.H. (2000): The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9: 2395 – 2402.
- Bluestone J.A., Tang Q., Sedwick C.E. (2008): T regulatory cells in autoimmune diabetes: past challenges, future prospects. *J Clin Immunol* 28: 677 – 684.
- Černá M. (2008): Genetics of autoimmune *diabetes mellitus*. *Wien Med Wochenschr* 158: 2 – 12.
- Chedin F., Lieber M.R., Hsieh C.L. (2002): The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16916 – 16921.
- Cheng X., Riggs A.D. (2011): DNA Methylation and Demethylation in Mammals. *J Biol Chem* 286: 18347 – 18353.
- Concannon P., Erlich H.A., Julier C., Morahan G., Nerup J., Pociot F., Todd J.A., Rich S.S., Type 1 Diabetes Genetics Consortium (2005): Type 1 diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families. *Diabetes* 54: 2995 – 3001.

- Di Croce L., Raker V.A., Corsaro M., Fazi F., Fanelli M., Faretta M., Fuks F., Lo Coco F., Kouzarides T., Nervi C., Minucci S., Pelicci P.G. (2002): Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 295: 1079 – 1082.
- Dorman J.S., Bunker CH. (2000): HLA-DQ locus of the human leukocyte antigen complex and type 1 *diabetes mellitus*: a HuGE review. *Epidemiol Rev* 22: 218 – 227.
- Ettinger R.A., Liu A.W., Nepom G.T., Kwok W.W. (1998): Exceptional stability of the HLA-*DQA1*0102/DQB1*0602* alpha beta protein dimer, the class II MHC molecule associated with protection from insulin-dependent *diabetes mellitus*. *J Immunol* 161: 6439 – 6445.
- EURODIAB ACE Study Group. (2000): Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet* 335: 873 – 876.
- Fourlanos S., Dotta F., Greenbaum G.J., Palmer J.P., Rolandsson O., Colman P.G., Harrison L.C. (2005): Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent. 48: 2206 – 2212.
- Fradin D., Le Fur S., Mille C., Naoui N., Groves C., Zelenika D., McCarthy M.I., Lathrop M., Bougnères F. (2012): Association of the CpG methylation pattern of the proximal insulin gene promoter with type 1 diabetes. *PLoS One* 7: e36278.
- Fraga M.F., Ballestar E., Paz M.F., Ropero S., Setien F., Ballestar M.L., Heine-Suñer D., Cigudosa J.C., Urioste M., Benitez J., Boix-Chornet M., Sanchez-Aguilera A., Ling C., Carlsson E., Poulsen P., Vaag A., Stephan Z., Spector T.D., Wu Y.Z., Plass C., Esteller M. (2005): Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10604 – 10609.
- Gianani R., Campbell-Thompson M., Sarkar S.A., Wasserfall C., Pugliese A., Solis J.M., Kent S.C., Hering B.J., West E., Steck A., Bonner-Weir S., Atkinson M.A., Coppieters K., von Herrath M., Eisenbarth G.S. (2010): Dimorphic histopathology of long-standing childhood-onset diabetes. *Diabetologia* 53: 690 – 698.
- Giovannucci E., Stampfer M.J., Colditz G.A., Rimm E.B., Trichopoulos D., Rosner B.A., Speizer F.E., Willett W.C. (1993): Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J Natl Cancer Inst* 85: 875 – 884.
- Goldberg A.D., Allis C.D., Bernstein E. (2007): Epigenetics: a landscape take shape. *Cell* 128: 635 – 638.
- Goll M.G., Bestor T.H. (2005): Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74: 481 – 514.
- Gorodezky C., Alaez C., Murguía A., Rodríguez A., Balladares S., Vazquez M., Flores H., Robles C. (2006): HLA and autoimmune diseases: Type 1 diabetes (T1D) as an example. *Autoimmun Rev* 5: 187 – 194.
- Gough S.C., Simmonds M.J. (2007): The HLA Region and Autoimmune Disease: Associations and Mechanisms of Action. *Curr Genomics* 8: 453 – 465.

- Hanna J., Carey B.W., Jaenisch R. (2008): Reprogramming of somatic cell identity. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 73: 147 – 155.
- Hanson M.S., Cetkovic-Cvrlje M., Ramiya V.K., Atkinson M.A., Maclaren N.K., Singh B., Elliot J.F., Serreze D.V., Leiter E.H. (1996): Quantitative thresholds of MHC class II, I-E expressed on hemopoietically derived antigen-presenting cells in transgenic NOD/Lt mice determine level of diabetes resistance and indicate mechanism of protection. *The Journal of Immunology* 157: 1279 – 87.
- Hardy D.A., Bell J.I., Long E. O., Lindsten T., McDevitt H.O. (1986): Mapping of the class II region of the human major histocompatibility complex by pulsed-field gel electrophoresis. *Nature* 323: 453 – 455.
- Härkönen T., Lankinen H., Davydova B., Hovi T., Roivainen M. (2002): Enterovirus infection can induce immune responses that cross-react with beta-cell autoantigen tyrosine phosphatase IA-2/IAR. *J Med Virol* 66: 340 – 350.
- Härkönen T., Paananen A., Lankinen H., Hovi T., Vaarala O., Roivainen M. (2003): Enterovirus infection may induce humoral immune response reacting with islet cell autoantigens in humans. *J Med Virol* 69: 426 – 440.
- Hermann A., Gowher H., Jeltsch A. (2004): Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 61: 2571 – 2587.
- Hill R.J., Zozulya S., Lu Y.L., Ward K., Gishizky M., Jallal B. (2002): The lymphoid protein tyrosine phosphatase Lyp interacts with the adaptor molecule Grb2 and functions as a negative regulator of T-cell activation. *Exp Hematol* 30: 237 – 244.
- Hober D., Sane F. (2010): Enteroviral pathogenesis of type 1 diabetes. *Discov Med* 10: 151 – 160.
- Hořejší V., Bartůňková J. (2009): *Základy imunologie*. 4.vydanie. Triton, Praha. ISBN 978-80-7387-280-9.
- Howell C.Y., Bestor T.H., Ding F., Latham K.E., Mertineit C., Trasler J.M., Chaillet J.R. (2001): Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 104: 829 – 838.
- Huber A., Menconi F., Corathers S., Jacobson E.M., Tomer Y. (2008): Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. *Endocr Rev* 29: 697 – 725.
- Issa J.P. (2000): CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 249: 100 – 118.
- Issa J.P., Ottaviano Y.L., Celano P., Hamilton S.R., Davidson N.E., Baylin S.B. (1994): Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 7: 536 – 540.

- Jaenisch R. (1997): DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet* 13: 323 – 329.
- Jaenisch R., Bird A. (2003): Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33: 245 – 254.
- Jeanpierre M., Turleau C., Aurias A., Prieur M., Ledest F., Fischer A., Viegas-Pequignot E. (1993): An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. *Hum Mol Genet* 2: 731 – 735.
- Jenuwein T., Allis C.D. (2001): Translating the histone code. *Science* 293: 1074 – 1080.
- Jones P.A., Baylin S.B. (2002): The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415 – 428.
- Jones P.A., Wolkowicz M.J., Rideout W.M. 3rd, Gonzales F.A., Marziasz C.M., Coetzee G.A., Tapscott S.J. (1990): De novo methylation of the MyoD1 CpG island during the establishment of immortal cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6117 – 6121.
- Karjalainen J., Martin J.M., Knip M., Ilonen J., Robinson B.H., Savilahti E., Akerblom H.K., Dosch H.M. (1992): A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent *diabetes mellitus*. *N Engl J Med* 327: 302 – 307.
- Karvonen M., Tuomilehto J., Libman I., LaPorte R. (1993): A review of the recent epidemiological data on the worldwide incidence of type 1 (insulin-dependent) *diabetes mellitus*. World Health Organization DIAMOND Project Group. *Diabetologia* 36: 883 – 892.
- Karvonen M., Viik-Kajander M., Moltchanova E., Libman I., LaPorte R., Tuomilehto J. (2000): Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care* 23: 1516 – 1526.
- Kato H., Takeuchi O., Sato S., Yoneyama M., Yamamoto M., Matsui K., Uematsu S., Jung A., Kawai T., Ishii K.J., Yamaguchi O., Otsu K., Tsujimura T., Koh C.S., Reis E., Sousa C., Matsuura Y., Fujita T., Akira S. (2006): Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441: 101 – 105.
- Klose R.J., Bird A.P. (2006): Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31: 89 – 97.
- Knip M., Akerblom H.K. (1999): Environmental factors in the pathogenesis of type 1 *diabetes mellitus*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 3: S93 - 100.
- Kontseková E., Kontsek P. (2004): *Základy imunologie*. 1. vydanie. Univerzita Komenského vo Vydavateľstve UK, Bratislava. ISBN 80-223-1828-0.
- Kwok W.W., Domeier M.L., Raymond F.C., Byers P., Nepom G.T. (1996): Allele-specific motifs characterize HLA-DQ interactions with a diabetes-associated peptide derived from glutamic acid decarboxylase. *J Immunol* 156: 2171 – 2177.
- MacFarlane A.J., Strom A., Scott F.W. (2009): Epigenetics: deciphering how environmental factors may modify autoimmune type 1 diabetes. *Mamm Genome* 20: 624 – 632.

- Mehra N.K., Kaur G. (2003): MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives. *Expert Rev Mol Med* 5: 1 – 17.
- Mosaad Y.M., Auf F.A., Metwally S.S., Elsharkawy A.A., El-Hawary A.K., Hassan R.H., Tawhid Z.E., El-Chennawi F.A. (2012): HLA-*DQB1** alleles and genetic susceptibility to type 1 *diabetes mellitus*. *World J Diabetes* 3: 149 – 155.
- Nambam B., Aggarwal S., Jain A. (2010): Latent autoimmune diabetes in adults: A distinct but heterogeneous clinical entity. *World J Diabetes* 1: 111 – 115.
- Nepom B.S., Nepom G.T., Coleman M., Kwok W.W. (1996): Critical contribution of beta chain residue 57 in peptide binding ability of both HLA-DR and –DQ molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7202 – 7206.
- Nepom G.T., Kwok W.W. (1998): Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM. *Diabetes* 47: 1177-1184.
- Nepom G.T., Kwok W.W. (1998): Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM. *Diabetes* 47: 1177 – 1184.
- Nisticò L., Buzzetti R., Pritchard L.E., Van der Auwera B., Giovannini C., Bosi E., Larrad M.T., Rios M.S., Chow C.C., Cockram C.S., Jacobs K., Mijovic C., Bain S.C., Barnett A.H., Vanderwalle C.L., Schuit F., Gorus F.K., Tosi R., Pozzilli P., Todd J.A. (1996): The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet* 5: 1075 – 1080.
- Orban T., Kis J., Szereday L., Engelmann P., Farkas K., Jalahej H., Treszl A. (2007): Reduced CD4+ T-cell-specific gene expression in human type 1 *diabetes mellitus*. *J Autoimmun* 28: 177 – 187.
- Ounissi-Benkalha H., Polychronakos C. (2008): The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends Mol Med* 14: 268 – 275.
- Pateraki E., Kaklamani E., Kaklamanis P., Portocalas R., Aessopos A. (1986): Autoantibodies in systemic lupus erythematosus and normal subjects. *Clin Rheumatol* 5: 338 – 345.
- Patterson C.C., Dahlquist G.C., Gyürüs E., Green A., Soltész G., EURODIAB Study Group. (2009): Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 373: 2027 – 2033.
- Pociot F., McDermott M.F. (2002): Genetics of type 1 *diabetes mellitus*. *Genes Immun* 3: 235 – 249.
- Pugliese A., Gianani R., Moromisato R., Awdeh Z.L., Alper C.A., Erlich H.A., Jackson R.A., Eisenbarth G.S. (1995): HLA-*DQB1**0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first-degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes* 44: 608 – 613.

- Pugliese A., Zeller M., Fernandez A. Jr., Zalcborg L.J., Bartlett R.J., Ricordi C., Pietropaolo M., Eisenbarth G.S., Bennett S.T., Patel D.D. (1997): The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD3 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet* 15: 293 – 297.
- Qu H.Q., Montpetit A., Ge B., Hudson T.J., Polychonakos C. (2007): Toward further mapping of the association between the IL2RA locus and type 1 diabetes. *Diabetes* 56: 1174 – 1176.
- Rakyan V.K., Beyan H., Down T.A., Hawa M.I., Maslau S., Aden D., Daunay A., Busato F., Mein C.A., Manfras B., Dias K.R., Bell C.G., Tost J., Boehm B.O., Beck S., Leslie R.D. (2011): Identification of type 1 diabetes-associated DNA methylation variable positions that precede disease diagnosis. *PLoS Genet* 7: e1002300.
- Ramsahoye B.H., Biniszkiwicz D., Lyko F., Clark V., Bird A.P., Jaenisch R. (2000): Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5237 – 5242.
- Raz I., Eldor R., Naparstek Y. (2005): Immune modulation for prevention of type 1 *diabetes mellitus*. *Trends Biotechnol* 23: 128 – 134.
- Report of the expert committee on the diagnosis and classification of *diabetes mellitus*. (1997) *Diabetes Care* 20: 1183 – 1197.
- Rieck M., Arechiga A., Onengut-Gumuscu S., Greenbaum C., Concannon P., Buckner J.H. (2007): Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes. *J Immunol* 179: 4704 – 4710.
- Risch N. (1987): Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet* 40: 1 – 14.
- Rønningen K.S., Keiding N., Green A.; EURODIAB ACE Study Group. Europe and Diabetes. (2001): Correlations between the incidence of childhood-onset type I diabetes in Europe and HLA genotypes. *Diabetologia* 44: B51 – 59.
- Rotwein P., Yokoyama S., Didier D.K., Chirgwin J.M. (1986): Genetic analysis of the hypervariable region flanking the human insulin gene. *Am J Hum Genet* 39: 291 – 299.
- Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A., Bluestone J.A. (2000): B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12: 431 – 440.
- Sanjeevi C.B. (2002): Immunology of diabetes: autoimmune mechanisms and the prevention and cure of type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 958. NY7 GYAT/PCP.
- Sanjeevi C.B., Landin-Olsson M., Kockum I., Dahlquist G., Lermarck A. (2002): The combination of several polymorphic amino acid residues in the DQalpha and DQbeta chains forms a domain structure pattern and is associated with insulin-dependent *diabetes mellitus*. *Ann N Y Acad Sci* 958: 362 – 375.

Schatz D.A., Bingley P.J. (2001): Update on major trials for the prevention of type 1 *diabetes mellitus*: the American Diabetes Prevention Trial (DPT-1) and the European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT). *J Pediatr Endocrinol Metab* 14: 619 – 622.

Smyth D.J., Cooper J.D., Bailey R., Field S., Burren O., Smink L.J., Guja C., Ionescu-Tirgoviste C., Wilmer B., Dunger D.B., Savage D.A., Walker N.M., Clayton D.G., Todd J.A. (2006): A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet* 38: 617 – 619.

Stefan M., Zhang W., Concepcion E., Yi Z., Tomer Y. (2014): DNA methylation profiles in type 1 diabetes twins point to strong epigenetic effects on etiology. *J Autoimmun* 50: 33 – 37.

Todd J.A., Bain S.C. (1992): A practical approach to identification of susceptibility genes for IDDM. *Diabetes* 41: 1029 – 1034.

Tykocinski L.O, Hajkova P., Chang H.D., Stamm T., Sözeri O., Löhning M., Hu-Li J., Niesner U., Kreher S., Friedrich B., Pannetier C., Grütz G., Walter J., Paul W.E., Radbruch A. (2005): A critical control element for interleukin-4 memory expression in T helper lymphocytes. *J Biol Chem* 280: 28177 – 28185.

Villadangos J.A. (2001): Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol* 38: 329 – 346.

