

**Univerzita Karlova**

**3. lékařská fakulta**



Disertační práce

**Epigenetická regulace HLA genů II. třídy a jejich role u autoimunitních onemocnění**

**Epigenetic regulation of HLA class II genes and their role in autoimmune diseases**

Školitel: Doc. MUDr. Marie Černá, CSc.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně, a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému mezi univerzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 24. 5. 2017

Pavel Čepek

Podpis

**Identifikační záznam:**

ČEPEK, Pavel. Epigenetická regulace HLA genů II. třídy a jejich role u autoimunitních onemocnění [Epigenetic regulation of HLA class II genes and their role in autoimmune diseases]. Praha, 2017, počet stran 100, disertační práce. Univerzita Karlova, 3. Lékařská fakulta, Ústav lékařské genetiky 3. LF UK. Revmatologický ústav, oddělení molekulární biologie a imunogenetiky. Školitel: Doc. MUDr. Marie Černá, CSc.; školitel konzultant: Ing. et Mgr. Blanka Stibůrková, Ph.D.

Klíčová slova: autoimunita, HLA geny II. třídy, HLA-DQA1, epigenetika, methylace DNA

Key words: autoimmunity, HLA class II genes, HLA-DQA1, epigenetics, DNA methylation

**Poděkování:**

Tímto bych rád poděkoval své školitelce Doc. MUDr. Marii Černé, CSc. za její laskavé vedení, trpělivost a cenné rady, které mi v průběhu doktorského studia věnovala. Rád bych poděkoval kolegům z 3. LF UK Ing. Anně Kotrbové - Kozak, Ph.D. a Mgr. Martě Zajacové za cenné rady a připomínky, které mi poskytli během mého PhD studia. Dále bych rád poděkoval Ing. et Mgr. Blance Stibůrkové z Revmatologického ústavu za poskytnutí studijního volna, které mi umožnilo připravit se na státní doktorskou zkoušku. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat svým rodičům a celé rodině, bez jejichž pomoci a podpory bych své postgraduální studium nedokončil.

## Abstract (EN)

Type 1 diabetes (T1D) belongs among polygenic multifactorial autoimmune diseases. The highest risk is associated with HLA (human leukocyte antigen) class II genes, including *HLA-DQA1* gene. Our aim was to investigate DNA methylation of *HLA-DQA1* promoter alleles (QAP) and correlate methylation status with individual *HLA-DQA1* allele expression of T1D patients and healthy controls. DNA methylation is one of the epigenetic modifications, that regulate gene expression and is known to be shaped by the environment.

61 T1D patients and 39 healthy controls were involved in this study. Isolated DNA was treated with sodium bisulfite and *HLA-DQA1* promoter sequence was amplified using nested PCR. After sequencing, DNA methylation of *HLA-DQA1* promoter alleles was analyzed. Individual mRNA *HLA-DQA1* relative allele expression was assessed using two different endogenous controls (*PPIA*, *DRA*). We have found statistically significant differences in *HLA-DQA1* allele 02:01 expression (*PPIA* normalization,  $P_{\text{corr}}=0.041$ ; *DRA* normalization,  $P_{\text{corr}}=0.052$ ) between healthy controls and T1D patients. The complete methylation profile of the *HLA-DQA1* promoter was gained with the most methylated allele *DQA1\*02:01* and the least methylated *DQA1\*05:01* in both studied groups. Methylation profile observed in T1D patients and healthy controls was similar, and no correlation between *HLA-DQA1* allele expression and DNA methylation was found. Although we have not proved significant methylation differences between the two groups, detailed DNA methylation status and its correlation with expression of each *HLA-DQA1* allele in T1D patients have been described for the first time.

Key words: autoimmunity, HLA class II genes, *HLA-DQA1*, epigenetics, DNA methylation

## Abstrakt (CZ)

Diabetes mellitus 1. typu (T1D) patří mezi polygenní multifaktoriální autoimunitní onemocnění. S rozvojem diabetu je z genetického hlediska nejvíce asociována oblast HLA genů II. třídy, včetně genu *HLA-DQA1*, který je jeho součástí. Cílem této práce bylo identifikovat methylační profil promotorové části *HLA-DQA1* a methylační profil korelovat s expresí jednotlivých alel *HLA-DQA1*. DNA methylace patří mezi epigenetickou modifikaci, která reguluje expresi genů a je o ní známo, že se mění v závislosti na působení vnějšího prostředí.

Do této studie bylo celkem zahrnuto 61 diabetických pacientů a 39 zdravých kontrol. Od pacientů byla získána DNA, vystavena působení bisulfitu sodného a pomocí metody nested PCR byl amplifikován promotorový úsek *HLA-DQA1*. Amplifikovaný úsek byl sekvenován a poté byl analyzován methylační profil promotoru. Relativní exprese jednotlivých *HLA-DQA1* alel byla změřena za využití kvantitativního PCR a porovnána oproti dvěma endogenním kontrolám (*PPIA*, *HLA-DRA*). Alela *DQA1\*02:01* měla u zdravých kontrol signifikantně vyšší expresi než u T1D pacientů (normalizace oproti *PPIA*,  $P_{\text{kor.}}=0,041$ ; normalizace oproti *DRA*,  $P_{\text{kor.}}=0,052$ ). Methylační profil mezi oběma skupinami byl velice podobný jak na úrovni celkové methylace, tak i na úrovni jednotlivých CpG dinukleotidů. Mezi nejvíce methylované alely patřila alela *DQA1\*02:01* a mezi nejméně methylované pak alela *DQA1\*05:01*. Přestože jsme neprokázali statisticky významné rozdíly v methylaci mezi oběma skupinami, je to vůbec poprvé, kdy byl podrobně analyzován methylační profil *HLA-DQA1* genu a dán do souvislosti s expresí jednotlivých alel *HLA-DQA1*.

Klíčová slova: autoimunita, HLA geny II. třídy, *HLA-DQA1*, epigenetika, methylace DNA

## Obsah

1. Literární úvod .....	14
1.1. Epigenetika .....	14
1.1.1. Chromatin.....	14
1.1.2. Kovalentní modifikace histonů .....	15
1.1.3. DNA methylace .....	18
1.1.3.1. DNA methyltransferasy .....	19
1.1.3.2. Demethylace DNA .....	20
1.1.4. RNA interference .....	21
1.1.4.1. miRNA .....	22
1.2. Autoimunitní onemocnění .....	23
1.2.1. Diabetes mellitus 1. typu.....	24
1.2.2. Epidemiologie T1D .....	25
1.2.3. Genetika T1D .....	26
1.2.4. Epigenetika T1D .....	27
1.3. HLA komplex .....	28
1.3.1. HLA molekuly I. třídy.....	30
1.3.2. HLA molekuly II. třídy .....	31
1.3.3. Asociace HLA genů II. třídy s T1D .....	32
1.3.4. Role HLA molekul v etiopatogenezi T1D .....	34
1.3.5. Regulace exprese HLA genů II. třídy.....	34
2. Hypotéza a cíle práce.....	37
3. Materiál a metody.....	38
3.1. Seznam použitých roztoků a primerů .....	38
3.2. Bakteriální kmeny a plasmidy .....	40
3.3. Pracovní postupy.....	40
3.3.1. Sběr vzorků .....	40
3.3.2. Magnetická separace CD14+ monocytů .....	41
3.3.3. Izolace RNA.....	41
3.3.4. HLA genotypizace.....	41
3.3.5. Bisulfitové sekvenování .....	43
3.3.6. Relativní exprese <i>HLA-DQA1</i> .....	49
3.3.7. Statistické vyhodnocení.....	52
4. Výsledky.....	53

4.1.	Charakteristika souboru pacientů.....	53
4.2.	Charakterizace QAP alel.....	54
4.3.	HLA genotypizace .....	54
4.4.	Relativní exprese <i>HLA-DQA1</i> .....	56
4.4.1.	Normalizace exprese <i>HLA-DQA1</i> oproti 2 endogenním kontrolám .....	56
4.4.2.	Relativní exprese <i>HLA-DQA1/HLA-DRA</i> .....	57
4.4.3.	Relativní exprese <i>HLA-DQA1/PPIA</i> .....	58
4.4.4.	Expres alely <i>DQA1*0201</i> u heterozygotů <i>DQA1*0201/03</i> .....	58
4.5.	DNA methylace <i>HLA-DQA1</i> .....	60
4.5.1.	Celková methylace promotorového úseku <i>HLA-DQA1</i> .....	60
4.5.2.	Methylační profil jednotlivých CpG dinukleotidů.....	62
5.	Diskuze .....	64
5.1.	Kvantitativní PCR a bisulfitové sekvenování .....	64
5.2.	Relativní exprese <i>HLA-DQA1</i> .....	65
5.3.	Methylace <i>HLA-DQA1</i> .....	67
6.	Závěr.....	71
7.	Publikace .....	73
8.	Literatura .....	74
9.	Příloha.....	82



## Seznam zkratek

A	adenin
ADD doména	ATRX-DNMT3-DNMT3L doména
ADP	adenosindifosfát
anti IA-2	protilátky proti tyrosin fosfatase
anti GAD	protilátky proti dekarboxylase kyseliny glutamové
anti ZnT8	protilátky proti transportéru zinku
APC	antigen prezentující buňky
β2m	beta2 mikroglobulin
BER	base excision repair (reparační mechanismus DNA)
BSA	hovězí sérový albumin
CaCl <sub>2</sub>	chlorid vápenatý
CARM 1	coactivator-associated arginine methyltransferase 1
CIITA	transaktivátor pro hlavní histokompatibilní complex II. třídy
C	cytosin
C2, C4A, C4B	komplementové proteiny C2, C4A, C4B
CBP	CREB vazebný protein
CD	cluster of differentiation
CLIP	class II associated invariant chain peptide
CpG	dinukleotid cytosin-fosfát-guanin

CREB	The cAMP response element binding protein
CTLA 4	T lymphocyte associated antigen 4
dATP	2' - deoxyadenosin - 5' - trifosfát
dCTP	2' - deoxycytidin - 5' - trifosfát
dGTP	2' - deoxyguanosin - 5' - trifosfát
dNTP	2' - deoxyribonukleotid trifosfát
dTTP	2' - deoxythymidin - 5' - trifosfát
DNA	2' - deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA methyltransferasa
dsRNA	dvojitá šroubovice RNA
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplasmatické retikulum
G	guanin
GAD2	dekarboxylasa kyseliny glutamové
GADPH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa
H3, H4, H2A a H2B	histony H3, H4, H2A a H2B
HCl	kyselina chlorovodíková
HDACs	histondeacetylasy
HLA	lidské leukocytární antigeny
HOX	homeobox gen

huTBP	lidský gen, jehož produkt se váže na specifickou nukleotidovou sekvenci
TATA box	
HSP 70	protein teplotního šoku 70
HP-1	heterochromatinový protein 1
IL-4	interleukin 4
IL-8	interleukin 8
IL-22	interleukin 22
IFN $\gamma$	interferon gamma
Ii	invariantní řetězec
INS	insulin
IPTG	isopropyl-beta-D-thiogalaktopyranosid
JHDM1	histon demethylasa obsahující doménu JmjC
LADA	latentní forma autoimunitního diabetu dospělých
LSD	lysin demethylasa 1
miRNA	mikroRNA
MTPN	myotrophin
MBP	methyl vazebný protein
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenin dinukleotid
NaOH	hydroxid sodný
NF $\kappa$ B	jaderný faktor $\kappa$ B

NF Y	jaderný transkripční faktor Y
OD	optická densita
PBMC	mononukleární buňky periferní krve
PBS	fosfátový pufr se solí
pH	potenciál vodíku
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPIA	peptidylprolyl isomerasa A (cyklofilin)
PTPN22	protein tyrosin fosfatasa nereceptorového typu
pTEFb	positive transcription elongation factor
QAP	promotor genu DQA1
RFX	regulační faktor X
RFXAP	s regulačním proteinem X asociovaný protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RITC	RNA-induced transcriptional silencing
RNA	ribonukleová kyselina
RT PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RT	reverzní transkripce
sRNA	malé RNA molekuly
siRNA	malé interferující RNA
S fáze	syntetická fáze

SUMO	small ubiquitin-like modifier
SXY modul	DNA oblast obsahující specifické sekvence X1, X2, Y a W pro vazbu transkripčních faktorů HLA genů II. třídy
T	thymin
T1D	diabetes mellitus 1. typu
TAFII 32	TATA box binding protein associated factor
TAP	transporter asociovaný se zpracováním antigenů
TET	rodina enzymů souhrnně nazývaných Ten eleven translocation
TCR	receptor T buněk
TNF $\alpha$ a $\beta$	cytokiny (tumor nekrotizující faktor $\alpha$ a $\beta$ )
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
UNC13B	unc-13 homolog B
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranosid

## **1. Literární úvod**

### **1.1.Epigenetika**

Epigenetika se zabývá studiem vlastností, jež jsou předávány prostřednictvím meiózy nebo mitózy, ale nejsou závislé na primární struktuře DNA. Je známo, že epigenetika se podílí na regulaci exprese řady genů, které jsou důležité pro diferenciaci buněk, při kontrole buněčného cyklu, morfogenezi a dalších buněčných procesech. Epigenetika také dokáže vysvětlit, jak je možné, že buňky se stejnou genetickou výbavou jsou schopné se diferenciovat v různé buněčné typy. Důležité je, že epigenetický stav je reverzibilní a v průběhu života interaguje a mění se v důsledku působení vnějšího prostředí (1). Studie na myších modelech naznačují, že epigenetická informace může být ovlivněna nutričními faktory, stresem, věkem jedince a dalšími faktory. U člověka lze změnu dobře dokumentovat na studiích zkoumajících epigenetický profil u geneticky shodných monozygotních dvojčat. Ten se mění v závislosti na době, po kterou spolu dvojčata vyrůstala (2). Změny v epigenetické informaci lze často najít u řady onemocnění autoimunitního nebo nádorového původu. To je v některých případech využíváno nejen pro diagnostiku, ale i pro léčbu těchto onemocnění, podáváním látek schopných epigenetickou informaci modulovat. Zatímco o epigenetických změnách u nádorových onemocnění je toho známo poměrně hodně, epigenetika autoimunitních onemocnění není tak dobře prozkoumána. Zejména HLA (lidské leukocytární antigeny) genetická oblast (HLA komplex), která nejvíce přispívá ke vzniku autoimunitních onemocnění, je z epigenetického hlediska relativně neprobádanou oblastí.

#### **1.1.1. Chromatin**

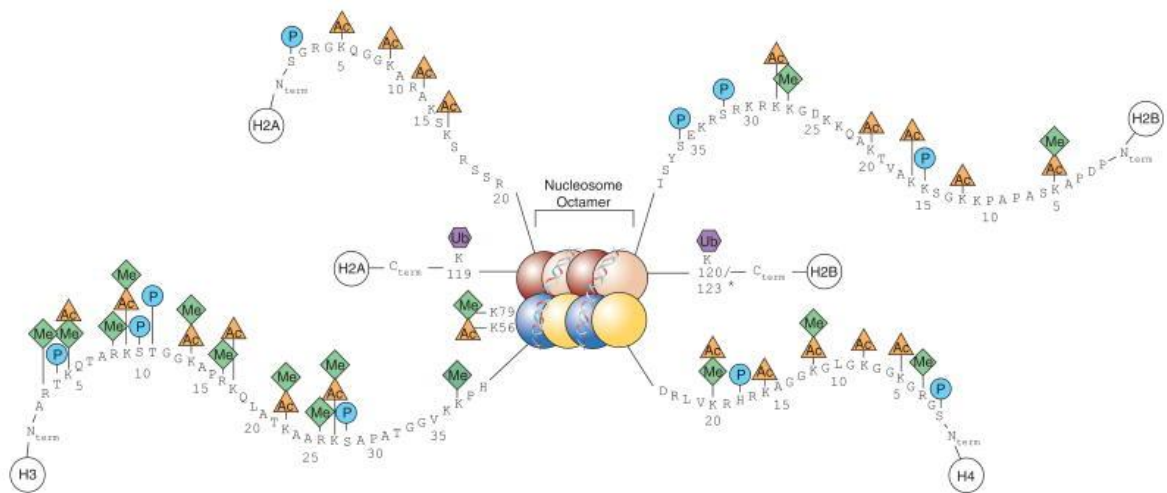
Chromatin je soubor makromolekul skládající se z DNA, proteinů a RNA. Chromatin se v eukaryotické buňce vyskytuje ve 2 základních stavech - euchromatinu a heterochromatinu. Heterochromatin je více kondenzovaný, obecně transkripčně inaktivní, zatímco euchromatin je méně kondenzovaný a lépe přístupný pro transkripční faktory a transkripci. Základní funkcí chromatinu je ochrana DNA před poškozením, ale také hlavně umožňuje, aby byla DNA dostatečně kondenzovaná a vešla se do jádra eukaryotické buňky. To je zajištěno tím, že je DNA ovinuta kolem nukleosomu, základní podjednotky chromatinu.

Krystalová struktura nukleosomu byla publikována v roce 1997 skupinou kolem Lugeru (3). Nukleosom se skládá ze 4 jaderných histonů H2A, H2B, H3 a H4, které vytvářejí histonový oktamer kolem něhož je obtočeno 147 párů bazí DNA. Histony jsou evolučně

vysoce konzervované proteiny bohaté na kladně nabitě aminokyseliny arginin a lysin, což umožňuje jejich interakci se záporně nabitou polyfosfátovou kostrou DNA a přispívá ke stabilitě nukleosomu. Nukleosomy jsou navzájem spojeny tzv. linkerovou DNA dlouhou obvykle 20-80 bazí a vytvářejí strukturu zvanou 30 nm vlákno. Na stabilitě 30 nm se podílí další jaderný histon H1(4). Kromě uvedených 5 typů histonů, existuje množství variant jaderných histonů jako například macroH2A, H2AX, H2AZ nebo H3.3. Histonové varianty mají v buňce nejrůznější funkce. Fosforylace H2AX je například spojena s reparací DNA zatímco varianta H3.3 se bohatě vyskytuje v transkripčně aktivních oblastech chromatinu (5, 6).

### 1.1.2. Kovalentní modifikace histonů

Z nukleosomu vystupují N a C koncové domény histonů (z angl. histone tails), které poskytují platformu pro nejrůznější kovalentní modifikace. Mezi kovalentní modifikace histonů řadíme metylaci, acetylaci, fosforylaci, ubikvitinilaci, SUMOylaci, prolinovou izomeraci a deiminaci (7). Modifikovány jsou nejčastěji N koncové domény všech 4 jaderných histonů, ale modifikovány mohou být i C koncové domény histonů (**obrázek 1**). Délka a aminokyselinové složení N a C koncových domén závisí na jednotlivých typech histonů.



**Obrázek 1.** Kovalentní modifikace histonů u savců. N a C terminální konce histonů jsou modifikovány kovalentními modifikacemi (8). Pro přehlednost jsou zobrazeny pouze nejčastější modifikace – Ac (acetylace), P (fosforylace), Me (methylace) a Ub (ubikvitinilace). Některé lysinové aminokyseliny jsou buď metylovány nebo acetylovány, obě modifikace se navzájem vylučují. C koncové domény histonů podléhají ubikvitinilaci a ta je například v případě ubikvitinilace lysinu 120 histonu H3 spojena s transkripční aktivací HOX (homeobox) genu (9). Kovalentní modifikace byly také nalezeny v globulární doméně jaderných histonů (H3K56, H3K79).

V roce 2005 byla vytvořena společná nomenklatura pro zápis histonových modifikací. Nejprve je uveden typ jaderného histonu, po kterém následuje zkratka modifikované aminokyseliny a její aminokyselinová pozice. Zápis může být ještě na konci doplněn typem kovalentní modifikace. Zápis histonové modifikace H3K4me<sub>2</sub>, tak vyjadřuje, že čtvrtá aminokyselina lysin histonu H3 je modifikována dvěma methylovými skupinami (10). Ke studiu jednotlivých kovalentních modifikací se obvykle používá semisyntetického přístupu, kdy je nejprve uměle syntetizován peptidový fragment obsahující konkrétní epigenetickou modifikaci, který je poté spojen s rekombinantně připraveným histonovým jádrem. Pomocí tohoto přístupu bylo například odhaleno, že acetylace H4K16 je asociována s narušením struktury 30 nm vlákna (11, 12).

Epigenetické modifikace regulují expresi genů, a to dvěma způsoby. Za prvé kovalentní modifikace histonů mohou ovlivnit kondenzaci chromatinu a regulovat tak přístupnost transkripčních faktorů a RNA polymerázy k cílovým genům. Za druhé kovalentní modifikace vytvářejí platformu pro chromatin vazebné proteiny a další proteinové komplexy, které se na ně váží prostřednictvím specifických proteinových domén. Takto navázané proteiny pak mohou měnit chromatinovou strukturu, podporovat transkripci či se například podílet na opravě DNA. Zajímavé je, že vazba proteinu na histonový konec může být ovlivněna sousední histonovou modifikací. Fosforylace H3S10 například negativně ovlivňuje vazbu proteinu HP-1 (heterochromatinový protein 1) na methylovaný H3K9 (13). Byl popsán i opačný případ, kdy kovalentní modifikace vede k efektivnější vazbě proteinu. Histon-acetyltransferasa (HAT) daleko efektivněji rozpoznává histon H3, pokud je modifikován fosforylací (H3S10)(14). Velké množství a variabilita epigenetických značek vedla k hypotéze tzv. „histonového kódu“. Tato hypotéza se snaží vystihnout skutečnost, že pro aktivaci funkce DNA je potřeba specifické uspořádání těchto modifikací (15). Nicméně, termín histonový kód se již v poslední době moc nevyužívá a v nových publikacích se již objevuje jen zřídka.

### **Acetylace histonů**

Acetylace histonů patří mezi nejvíce prozkoumané reverzibilní kovalentní modifikace histonů. Přidání acetylové skupiny na lysin jaderných histonů katalyzují enzymy histon-acetyltransferasy. Záporně nabitá acetylová skupina neutralizuje kladný náboj lysinu a oslabuje tak elektrostatické interakce mezi DNA a histony. To vede k rozvolnění chromatinové struktury a usnadňuje přístup transkripční mašinérie k promotorovým oblastem genu. Acetylace histonů je tak obecně asociována s transkripční aktivací. V rámci N



koncových domén mohou být u člověka acetylovány všechny 4 jaderné histony na následujících aminokyselinových pozicích: histon H2A je acetylován na aminokyselinových pozicích 5, 9, 13, 15 a 36; histon H2B na pozicích 5, 12, 15, 20 a 24; histon H3 na pozicích 9, 14, 18, 23, 27 a histon H4 na pozicích 5, 8, 12, 16, 20 (16, 17).

Histon-deacetylasy (HDACs) jsou naopak enzymy, které odstraňují acetylovou skupinu z lysinu. U člověka je známo celkem 18 HDACs, které jsou rozděleny do 4 tříd. HDACs I. a IV. třídy se převážně vyskytují v jádře, ale v reakci na určité buněčné signály jsou HDACs schopné přecházet do cytoplasmy a zpět do jádra. Na rozdíl od HDACs III. třídy vyžadují všechny ostatní HDACs pro svojí katalytickou aktivitu zinečnaté ionty. HDACs III. třídy jsou strukturně odlišné a pro svojí funkci vyžadují kofaktor NAD<sup>+</sup> (nikotinamidadenindinukleotid) (8). HDACs bývají často dysregulovány u nádorových onemocnění a jsou častým terapeutickým cílem, kdy jsou specificky cíleny inhibitory histon-deacetylasy. Změna v expresi HDACs umožňují nádorovým buňkám měnit expresi tumor supresorových genů a uniknout mechanismům regulující buněčný cyklus. Substrátem HDACs a HATs jsou kromě histonových proteinů i ostatní proteiny včetně CIITA (transaktivátor pro hlavní histokompatibilní komplex II. třídy), proteinu, který je klíčový pro expresi HLA genů (18).

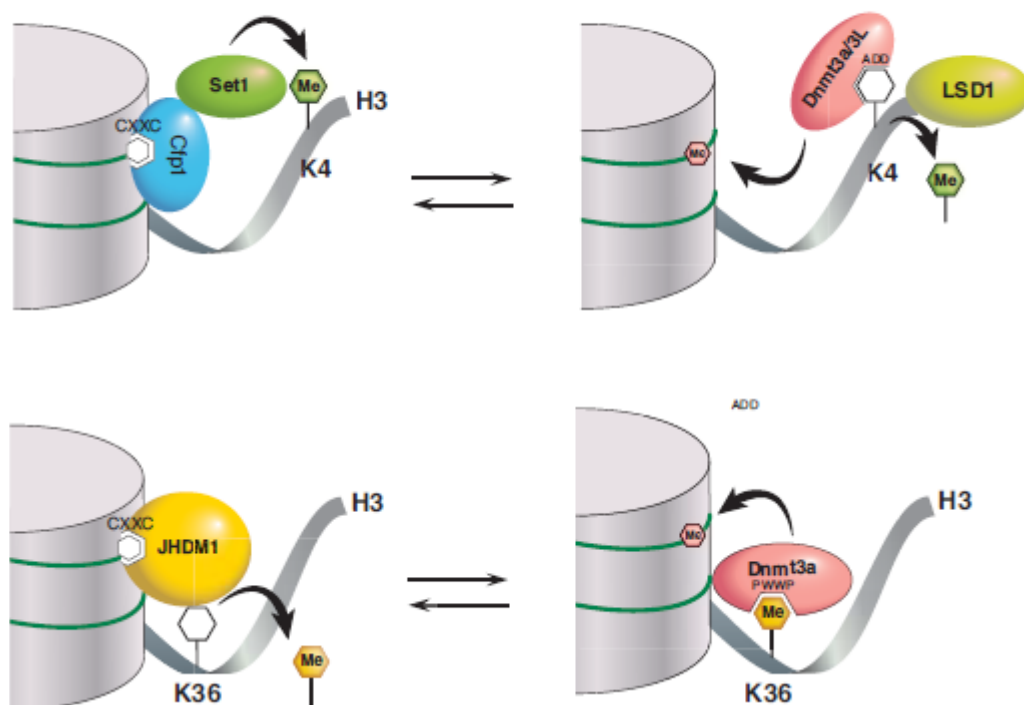
### **Methylace histonů**

Oproti acetylaci, methylace histonových proteinů je asociována jak s transkripční aktivací, tak transkripční represí. Transkripční stav závisí na konkrétní kovalentní modifikaci. Vliv methylace histonů na funkci genů je ovlivněna nejenom modifikací lysinových aminokyselin, ale také stupněm methylace. Lysin totiž může být modifikován až třemi methylovými skupinami. Oblast aktivních genů je obvykle obohacena methylací H3K4, H3K36 a H3K79. Naopak oblasti bohaté na methylaci H3K9, H3K20 a H4K27 je exprese genů utlumena. S utlumením exprese je pak dále asociována dimethylace a trimethylace methylace H3K9 a H3K27 (19). Ukázkovým příkladem je formování heterochromatinu, které je asociováno s methylací H3K9 (20). Epigenetická inaktivace X chromosomu je doprovázena methylací H3K9 a H3K27 (21). Methylován v histonech může být i arginin. Ten je methylován buď přidáním jedné (monomethylace) nebo dvou methylových skupin (dimethylace).

Podle substrátové specifity odlišujeme lysinové histon-methyltransferasy a argininové histon-methyltransferasy. Stejně jako v případě acetylace existují enzymy, které jsou schopny methylovou skupinu z lysinu či argininu odstranit (22, 23).

### 1.1.3. DNA methylace

DNA methylace je proces, při kterém dochází k přenesení methylové skupiny z S-adenosyl methioninu na 5'uhlík pyrimidinového kruhu cytosinu. Přidání methylové skupiny je katalyzováno enzymy, které se nazývají DNA methyltransferasy (DNMT). V lidském genomu je methylováno přibližně 4% všech cytosinů. Methylace je obvykle soustředěna do oblastí bohatých na CpG dinukleotidy (tzv. CpG ostrůvky), ale methylován může být i cytosin mimo CpG dinukleotid. Samotný cytosin mimo CpG dinukleotid je v somatických buňkách methylován na velice nízké úrovni (kromě mozku) (24). Oproti tomu je v lidském genomu methylováno 70-80% CpG dinukleotidů, které jsou často lokalizované v regulačních oblastech genu promotoru a enhanceru. Právě DNA methylace regulačních oblastí genu promotorových úseku je často spojována s represí transkripce. Existují 2 základní mechanismy, kterými DNA methylace potlačuje transkripci genů. DNA methylace může přímo blokovat přístup transkripčních faktorů nezbytných pro transkripci (25). Druhou možností je, že se na methylové skupiny váží methyl-vazebné proteiny, které dále interagují s histon-modifikujícími enzymy. Ty pak modifikují N a C konce histonů, což může výsledně vést k potlačení transkripce (26). DNA methylace bývá v některých případech doprovázena methylací histonů (**obrázek 2**) (27, 28).



**Obrázek 2.** Methylace histonů je často spřažena s methylací DNA. Na levé straně obrázku jsou znázorněny transkripčně aktivní stavy, na pravé straně pak represivní stavy transkripce. A) Methylace H3K4 histon-methyltransferasou Set1 zabraňuje interakci komplexu DNMT3a/3L s N terminální doménou histonu H3. Po odstranění methylové skupiny LSD1 (lysin demethylasa 1), DNMT3a/L komplex interaguje pomocí ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L) domény s histonem H3 a DNMT3a pak methyluje cílový úsek DNA. B) DNMT3a se váže na methylovaný H3K36me3 pomocí specifické PWWP domény a methyluje cílové úseky DNA. Odstranění methylové skupiny z H3K36me3 katalyzuje enzym JHDM 1 (histon demethylasa obsahující JmjC doménu), který se váže na nemethylovanou DNA pomocí CXXC domény. Převzato z (29).

Kromě 5-methylcytosinu existují další deriváty methylcytosinu jako 5-hydroxymethylcytosin, 5-formylcytosin a 5-carboxylcytosin. Nejvíce prozkoumán je 5-hydroxymethylcytosin, jehož výskyt je v savčí tkáni na velice nízké úrovni (0,1%). Nejvyšší hladiny hydroxymethylcytosinu byly nalezeny v mozku (1%), kde se hydroxymethylcytosin podílí na vývoji neuronů (30). Byl identifikován protein, který 5-hydroxymethylcytosin specificky rozpoznává a váže (31).

### 1.1.3.1. DNA methyltransferasy

U savců jsou známy celkem 4 DNA methyltransferasy (DNMT), DNMT3a, DNMT3b, DNMT1 a DNMT2, které se liší svou funkcí a preferencí k substrátu. DNA methyltransferasy DNMT3a a DNMT3b, preferují nemethylovanou DNA a jejich úkolem je ustanovit nové

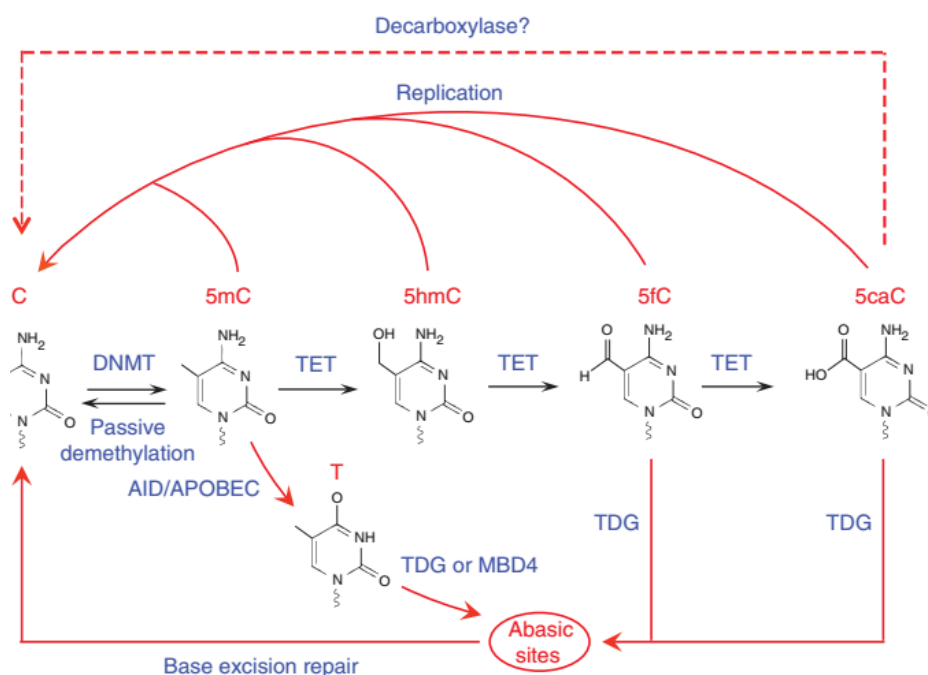
methylační vzory krátce po fertilizačním procesu, kdy nejprve dochází ke globální demethylaci cytosinů (kromě imprintovaných genů) a poté ve stádiu blastocysty k opětovnému ustanovení nových methylačních vzorů (19). DNMT3a a DNMT3b jsou proto také označovány de novo methyltransferasy. Cílené vyřazení genů pro DNMT3a a DNMT3b není slučitelné s vývojem plodu nebo vede k úmrtí jedince krátce po narození (32). Methylační aktivita obou enzymů je regulována enzymem DNMT3L, který ovšem postrádá vlastní enzymatickou aktivitu (33).

Druhým typem DNA methyltransferasy je DNMT1, která preferuje hemimethylovanou DNA, tedy DNA, kde je jedno vlákno DNA řetězce methylováno a druhé není. Na začátku S fáze buněčného cyklu je DNMT1 transportována do jádra, kde se zapojuje do proteinového komplexu, který se váže na hemimethylovaný řetězec. Během replikace předává již ustanovené methylační vzory na nově syntetizovaný řetězec DNA (z mateřského na dceřině DNA vlákno) a zajišťuje tak jejich předání do dalších buněčných generací. Expresi DNMT1 v průběhu rané embryogeneze je také nezbytná pro zachování methylace imprintovaných genů. Cílená inaktivace genu pro DNMT1 vede ke globální ztrátě methylace a k abnormální expresi imprintovaných genů (34).

Nejméně je toho známo o DNMT2, která je slabě exprimována ve většině tkání a má velice slabou methylační aktivitu (35).

### **1.1.3.2. Demethylace DNA**

Dlouho dobu se vedly diskuze o tom, jak dochází k odstranění methylové skupiny z cytosinu a zda existují enzymy, které mají tuto enzymatickou aktivitu. V současnosti je známo, že k demethylaci DNA může docházet buď pasivně, nebo aktivně. K pasivní demethylaci dochází v případě, kdy při DNA replikaci chybí nebo je inhibován enzym DNMT1. K aktivní demethylaci dochází následkem katalyticky aktivních enzymů z rodiny TET (z angl. Ten eleven translocation), které jsou schopny převést 5-methylcytosin na 5-hydroxymethylcytosin (36). Později se ukázalo, že enzymy z rodiny TET jsou schopny in vitro i in vivo přeměnit 5-hydroxymethylcytosin dále na 5-formylcytosin a 5-carboxylcytosin. Tyto deriváty methylcytosinu pak mohou být rozpoznány a opraveny reparačním mechanismem nazývaným BER (z angl. base excision repair) (37, 38), který je zodpovědný za odstranění nesprávně se párujících bází a jejich nahrazení za správnou bázi (**obrázek 3**).



**Obrázek 3.** K aktivní demethylaci DNA dochází vlivem enzymů z rodiny TET (19). TET enzymy katalyzují konverzi 5-methylcytosinu na 5 hydroxymethylcytosin a dále pak na 5-formylcytosin a 5-carboxylcytosin. 5-hydroxymethylcytosin může být přeměněn deaminací na thymin. Thymin a deriváty 5-methylcytosinu jsou rozpoznány a opraveny pomocí mechanismu BER (z angl. base excision repair). Existence enzymů, které by byly schopny odstranit karboxylovou skupinu z 5-carboxylcytosinu a převést ho na cytosin byla potvrzen v roce 2014 (39).

### 1.1.4. RNA interference

RNA interference je poslední známý epigenetický mechanismus, který dokáže regulovat expresi genů. Na rozdíl od DNA methylace a kovalentních modifikací histonů, které regulují expresi genů na transkripční úrovni, RNA interference reguluje expresi posttranskripčně.

RNA interference byla objevena v roce 1998 skupinou kolem Mella a Fira. Ti ukázali, že injekční podání dvojité šroubovice RNA (dsRNA) způsobuje u organismu *Caenorhabditis elegans* potlačení exprese svalové bílkoviny (40). Ukázalo se, že příčinou potlačení exprese genu jsou malé RNA (sRNA) molekuly. Tyto sRNA molekuly regulují translaci cílových mRNA tím, že se váží do 3' netranslatované oblasti mRNA a jejich vazba má za příčinu buď potlačení translace cílové mRNA anebo její degradaci. Mechanismus RNA interference poskytuje organismu možnost rychle reagovat na změny vnějšího prostředí, jako je stres, a hraje důležitou roli při regulaci vývojových procesů a při protivirové obraně. Mezi sRNA patří mikroRNA (miRNA) a malé interferující RNA (siRNA), které se od sebe odlišují způsobem vzniku. Zatímco miRNA vznikají z transkriptů, které mají strukturu vlásenky,

a jsou intracelulárního původu, siRNA vznikají z dvojité šroubovice RNA a jsou extracelulárního původu (41).

Velkému zájmu vědecké komunity se v poslední době těší miRNA, které dle odhadů regulují více než 30 % všech lidských mRNA (42). V současnosti je známo více než 3000 různých miRNA molekul, jejich dysregulace je známá u řady onemocnění včetně nádorových a autoimunitních onemocnění (43-45). Sledování exprese miRNA by mohlo být využito při diagnóze těchto chorob. Určité miRNA by se také mohly stát důležitým terapeutickým cílem. Vzhledem k pleiotropnímu efektu miRNA je vždy ovšem velice komplikované odhalit cílová mRNA, která jsou pomocí miRNA regulována, a objasnit přesné mechanismy, kterými miRNA přispívají k etiopatogenesi onemocnění. Důležité je také odhalit, zdali dané miRNA jsou opravdu asociována s daným autoimunitním onemocněním a zdali jejich dysregulace není až následkem této choroby.

#### **1.1.4.1. miRNA**

miRNA jsou malé 20-22 nukleotidů dlouhé nekódující RNA molekuly. miRNA vznikají z prekurzorové molekuly pri-miRNA, která je z DNA přepsána pomocí RNA polymerázy II. pri-miRNA obsahuje vlásenku, která je rozpoznána a rozštěpena enzymem Drosha za vzniku pre-miRNA, která je obecně dlouhá více než 100 párů bazí a obsahuje dsRNA oblast, kde je lokalizována miRNA. Pre-miRNA je transportována ven z jádra do cytoplasmy pomocí exportinu 5 (46). Oblast s dvojitou RNA šroubovicí je v cytoplasmě upravena enzymem zvaným Dicer, který již generuje maturovanou miRNA molekulu (miRNA duplex) (47). miRNA se pak váže na protein Ago2 a je inkorporována do proteinového komplexu RISC (z angl. RNA-induced silencing complex). RISC komplex ponechá vedoucí vlákno miRNA a druhé vlákno RNA degraduje. Po veškerých úpravách miRNA zbyde 20-22 dlouhá sekvence jednořetězové RNA molekuly. Na 5' konci RNA molekuly je lokalizováno 7 bazí, které jsou klíčové pro komplementární vazbu na cílovou mRNA (42). Komplementární sekvence k miRNA se obvykle nachází v 3' netranslatované oblasti mRNA, ale byly popsány i případy, kdy byla lokalizována v 5' netranslatované oblasti anebo dokonce v kódující oblasti. Míra komplementarity mezi miRNA a mRNA rozhoduje o výsledném osudu mRNA. V případě naprosté komplementarity je mRNA degradována, v opačném případě dochází pouze k dočasnému potlačení translace cílové mRNA (48). V **tabulce 1** je uveden přehled miRNA, které cílí na DNA methyltransferasy a histon-modifikující enzymy.

Existuje ještě jeden mechanismus, kterým jsou schopny sRNA ovlivňovat genovou expresi. sRNA mohou spolu s RISC komplexem a methyltransferasami vytvářet komplex RITC (z angl. RNA-induced transcriptional silencing), který se v buněčném jádře podílí na transkripční inaktivaci genů tím, že methyluje histonové proteiny a cytosiny v promotorových oblastech. Tento mechanismus zprostředkované represe byl pozorován u *Drosophily*, rostliny *Arabidopsis thaliana*, *C. Elegans* a v roce 2004 také poprvé u člověka (49).

**Tabulka 1.** Vybrané miRNA, jejichž cílem jsou proteiny modifikující DNA, chromatin, histony a transkripční faktory. Převzato a upraveno z (50).

miRNA	Cílový gen miRNA	Funkce cílového genu
<b>Enzymy modifikující DNA</b>		
miR-148	DNMT1	Methylace DNA
miR-152	DNMT1	Methylace DNA
miR-301	DNMT1	Methylace DNA
miR-126	DNMT1	Methylace DNA
miR-148	DNMT3B	Methylace DNA
rodina miR-29	DNMT3A/3B	Methylace DNA
miR-132	MeCP2	Vazba na metylovanou DNA, regulace genové exprese
<b>Transkripční faktory</b>		
miR-29b	Sp1	Reguluje expresi DNMT1
Klastr miR-290	Rb12	Represor transkripce DNMTs
<b>Proteiny remodelující chromatin</b>		
miR-29b/c	YY1	Pomáhá PCR2 a HDAC se vázat na specifický lokus v genomu
<b>Enzymy modifikující histony</b>		
miR-449a	HDAC1	Deacetylace histonů
miR-1, miR-203	HDAC4	Deacetylace histonů

## 1.2. Autoimunitní onemocnění

Autoimunitní onemocnění představují velkou skupinu chorob, pro kterou je typické selhání imunitních regulačních mechanismů, které vedou k napadení orgánů těla vlastním imunitním systémem. Autoimunitní reakce může postihovat jeden nebo více typů tkání a je obvykle doprovázena autoprotilátkami specifickými pro danou autoimunitní dysregulaci. Mezi autoimunitní onemocnění patří celá řada nejruznějších nemocí, jako například roztroušená skleróza, diabetes mellitus 1. typu, celiakie, ankylozující spondylitida, revmatoidní artritida, systémový lupus erythematoses, a další.

### **1.2.1. Diabetes mellitus 1. typu**

Diabetes mellitus 1. typu (T1D) je autoimunitní onemocnění, které vzniká následkem destrukce  $\beta$  buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu, což vede k nedostatečné či kompletní ztrátě produkce insulinu (51). T1D tvoří přibližně 5-10 % všech případů diabetu a nejčastěji se manifestuje u dětské populace, kde se incidence postupně zvyšuje s věkem a dosahuje svého vrcholu mezi 10-14 rokem života. Incidence T1D se pak postupně snižuje mezi 15-29 rokem života (52, 53). Zatímco u dětí je destrukce  $\beta$  buněk většinou rychlá a kompletní, u dospělých je progresse onemocnění daleko pomalejší a produkce insulinu může ještě několik let přetrvávat. Tato pomalu progradující forma diabetu je označována jako LADA (latentní autoimunitní diabetes dospělých). Diabetem jsou obecně postiženy obě pohlaví rovnoměrně, některé studie však ukazují vyšší incidenci T1D po pubertě u mužské populace evropského původu (54). T1D vzniká u geneticky predisponovaných jedinců a je modulován vnějším prostředím. Riziko vzniku T1D je tak kombinací environmentálních faktorů a genetické predispozice jedince. V případě působení silných environmentálních faktorů může dojít k rozvoji T1D i u méně geneticky predisponovaného jedince a naopak, jak o tom svědčí některé publikované vědecké výsledky u etnik s rostoucí incidencí T1D (55, 56).

Dosud stále není jasné, co spouští autoimunitní proces. Jedním z rizikových faktorů se zdá být virová infekce v průběhu těhotenství anebo v raném vývoji jedince. Asociace mezi T1D a virovou infekcí byla například nalezena pro rotavirus (57). Dalším rizikovým faktorem je příliš brzké vystavení dítěte antigenům obsaženým v kravském mléku. Má se za to, že antigeny obsažené v kravském mléku jsou strukturně podobné určitým antigenům  $\beta$  buněk a mohu tak u geneticky predisponovaných jedinců spouštět autoimunitní proces (58, 59). Zajímavá je také sezónní různorodost v incidenci, která poukazuje na vyšší incidenci T1D na jaře a menší incidenci u jedinců narozených na podzim. Variabilita je pravděpodobně ovlivněna nedostatkem vitamínu D v průběhu těhotenství (60, 61). Bylo pozorováno, že podávání vitamínu D při těhotenství je asociováno s nižším rizikem vzniku T1D (62).

#### **Diagnostika T1D**

Základní metodou pro stanovení diagnózy je měření hladiny cukru v krvi. V roce 2010 přijala Americká diabetická asociace upravená diagnostická kritéria pro diabetes. Jako diabetičtí pacienti 1. typu jsou označeni ti, kteří mají hladinu cukru v krvi vyšší než 11,1 mmol/l kdykoliv v průběhu dne, anebo na lačno více než 7,0 mmol/l, či po provedení orálního glukózového tolerančního testu vyšší než 11,1 mmol/l (63). Orální glukózový toleranční test probíhá tak, že je pacientovi podána tekutina obsahující 75 g sacharidů a po 2 hodinách je



změřena hladina cukru v krvi. Tento test se spíše provádí u nejasných stavů (případů) až na základě vyšetření glykémie na lačno.

Pro diagnózu diabetu je dále klíčové vyšetření na přítomnost autoprotilátek anti-GAD (protilátka proti dekarboxylase kyseliny glutamové), anti IA-2 (protilátka proti tyrosinové fosfatase), protilátka proti insulinu a anti ZnT8 (protilátka proti zinkovému transportéru). Jedna nebo více autoprotilátek je u pacienta detekovatelná v 85-90 % případech (52).

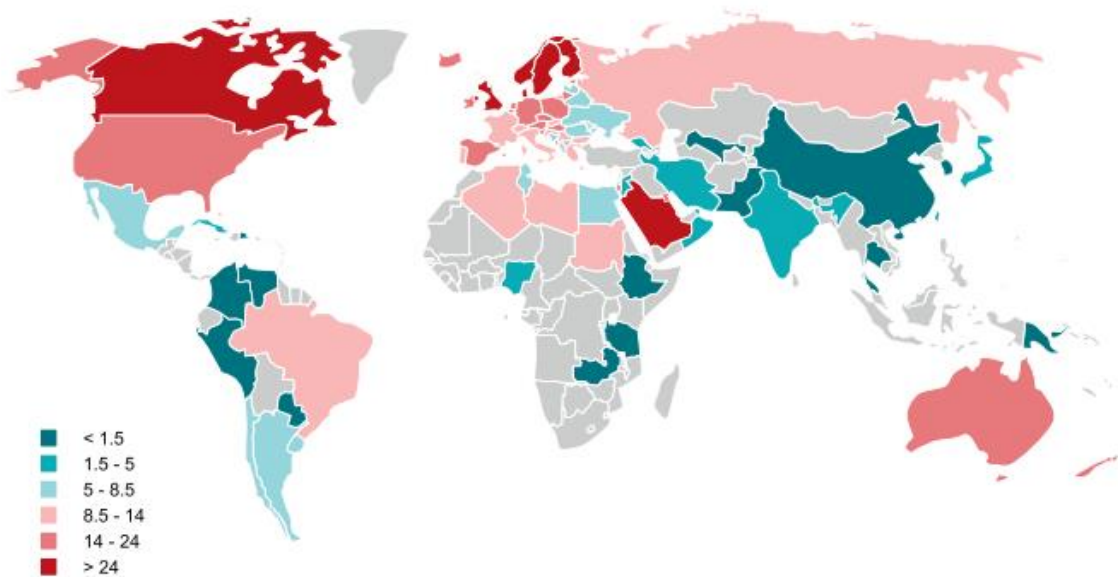
Další možností při diagnóze T1D je možnost využití detekce C-peptidu, meziprojektu syntézy insulinu, jehož hodnoty na lačno se u zdravých lidí pohybují mezi 0,2-0,6 nmol/l. U pacientů s T1D je obvykle hladina C-peptidu velice nízká (méně než 0,02 nmol). Princip této metody je založen na tom, že insulin a C-peptid jsou produkovány v ekvimolárním množství (64).

### 1.2.2. Epidemiologie T1D

Incidence T1D je celosvětově velice variabilní a liší se napříč kontinenty (**obrázek 4**). Příčinou této velké variability je pravděpodobně odlišná distribuce rizikových genů a různé silný vliv vnějších faktorů v jednotlivých zemích. Obecně se dá říci, že nejvyšší počet případů T1D je diagnostikován na Severní polokouli (Kanada, Severní Evropa). Výjimku tvoří státy jako Saudská Arábie a Kuvajt, kde je incidence T1D vysoká a pohybuje se kolem 31,4 na 100 000 obyvatel, respektive 22,3 na 100 000 obyvatel (53, 65). Naopak mezi země s nejnižší incidencí patří státy Jižní Ameriky a Čína. V afrických státech, zejména v subsaharské Africe, toho o incidenci diabetu není moc známo. Vysoká dětská mortalita v této oblasti má totiž za následek, že většina případů T1D není zachycena. Hlavním zdrojem epidemiologických dat jsou studie EURODIAB, SEARCH anebo projekt DIAMOND, které shromažďují data ohledně incidence a prevalence T1D z celého světa. Nejspolehlivější data ohledně incidence a prevalence diabetu jsou známy v Evropě, kde je incidence nejnižší ve východní Evropě (Ukrajina, Rumunsko) a naopak nejvyšší ve skandinávských zemích (Finsko, Švédsko a Norsko). Finsko obecně patří ke státům s celosvětově nejvyšší incidencí T1D, která se pohybuje kolem 60 případů na 100 000 obyvatel (66).

V České republice je incidence T1D na střední úrovni, kolem 20 případů na 100 000 obyvatel (65, 67). Dle ústavu zdravotnických informací a statistiky (ÚZIS) bylo v roce 2013 evidováno 58 901 jedinců s diabetem 1. typu, z toho 1123 diabetiků ve věku 0-14 let (68). Celosvětově incidence T1D neustále roste, nejvíce v ekonomicky rozvinutých zemích. Hygienická hypotéza předpokládá, že v důsledku nadstandartní hygieny a dezinfekce v těchto zemích došlo ke snížení antigenních stimulů během života (69). Další příčinou by mohla být

dostatečná zdravotnická péče, která potlačuje přírodní výběr a umožňuje tak šíření alel, které by za normálních podmínek předány nebyly (70).



**Obrázek 4.** Globální incidence T1D. Jednotlivé barevné odstíny modré a červené barvy znázorňují míru incidence této nemoci napříč všemi kontinenty (65). Nejspolehlivější epidemiologické data pochází z evropského kontinentu. Severské státy (Finsko, Kanada, Švédsko) patří do skupiny států s nejvyšší incidencí T1D. Na africkém kontinentě chybí spolehlivá data týkající se incidence T1D.

### 1.2.3. Genetika T1D

T1D patří mezi multifaktoriální polygenní onemocnění. Riziko pro jedince kavkazské populace se pohybuje kolem 0,3-0,4 %. V případě, že jeden z rodičů měl autoimunitní diabetes, riziko pro jejich potomka je kolem 5 % (71). Doposud bylo díky asociačním studiím nalezeno více než 50 různých genů a genových komplexů, které ovlivňují riziko vzniku T1D (72). Z genetického hlediska je nejdůležitější HLA genový komplex, který představuje přibližně 50 % genetického rizika. Důležitou roli pro rozvoj autoimunity mají zejména HLA geny II. třídy (*DQA1*, *DQB1* a *DRB1*), které kódují imunologicky důležité transmembránové glykoproteiny, podílející se na ustanovení centrální tolerance imunitního systému a regulující imunitní odpověď. Další geny přispívající k onemocnění, jsou tzv. non-HLA geny, tedy geny lokalizované mimo HLA lokus. Mezi nejdůležitější patří gen pro insulin (*INS*), geny *PTPN22* (tyrosin fosfatasa) a *CTLA-4* (T lymphocyte associated antigen 4) (73). Míru dědičnosti T1D dobře dokumentují hodnoty konkordance u geneticky shodných monozygotních dvojčat, které se, v závislosti na studii, pohybují mezi 25-65 % (74, 75).

## 1.2.4. Epigenetika T1D

### DNA methylace

Celogenomová analýza DNA methylace B lymfocytů odhalila 88 odlišně methylovaných CpG míst u dvojčat diskordantních pro T1D. Rozdíly v methylaci byly nalezeny zejména u genů, které se účastní imunitní odpovědi (76). Rakyan et al. detekovali 132 hypo a hyper methylovaných CpG dinukleotidů u monozygotních dvojčat diskordantních pro T1D. Rozdíly v DNA methylaci byly popsány v genech *HLA-DQB1*, *INS*, *GAD2* (dekarboxylasa kyseliny glutamové) a *RFXAP* (s regulačním proteinem X asociovaný protein). Rozdíl v methylaci koreloval s přítomností autoantilátok a byl dokonce detekován několik let před diagnózou (77). Významné rozdíly v methylaci byly pozorovány v genu pro insulin. V promotorové oblasti tohoto genu byly odhaleny 3 odlišně methylované CpG dinukleotidy (78) a byla objevena závislost mezi jedním methylovaným CpG místem a expresí insulinu (79). Bell et al. identifikovali u T1D pacientů 18 odlišně methylovaných CpG dinukleotidů, které korelovaly s rizikem chronické mikrovaskulární komplikace diabetu, diabetické nefropatie. Jedno z těchto CpG míst bylo lokalizováno v genu *UNC13B* (unc-13 homolog B), jehož jedna varianta je rizikovým faktorem pro vznik diabetické nefropatie (80). Také v promotoru genu *TNF $\alpha$*  byly popsány rozdíly v DNA methylaci (81).

### Histonové modifikace

I krátkodobě špatně kompenzovaná hyperglykémie je považována za rizikový faktor chronických (mikro- a makro- vaskulárních) komplikací diabetu. In vitro studie ukazují, že hyperglykémie způsobuje změny v histonových modifikacích, které mohou být zodpovědné za mikro- a makro- vaskulární diabetické komplikace. Nedávno publikovaná práce ukázala, že řada genů u T1D pacientů má, ve srovnání se zdravými kontrolami, zvýšenou acetylaci H3K9. Zvýšená acetylace histonů byla nalezena zejména u genů, které hrají v roli v zánětlivých procesech, a souvisela s hladinami glykosylovaného hemoglobinu (82). Kromě toho bylo zjištěno, že hyperglykémie ovlivňuje methylační stav histonů v promotorové oblasti genu *NF $\kappa$ B-p65* (podjednotka jaderného faktoru  $\kappa$ B) (83). Odlišná methylace H3K9me2 u T1D pacientů byla nalezena v genech *TNF $\beta$* , *NF $\kappa$ B* a *CTLA-4* (84).

### miRNA

U T1D bylo identifikováno několik miRNA, jejichž exprese byla snížena či zvýšena. Yang et al. našli u nově diagnostikovaných případů s T1D 26 odlišně exprimovaných miRNA

v mononukleárních buňkách periferní krve. Expres miRNA-146a byla u těchto pacientů snížena ve srovnání s pacienty, kteří měli insulinovou terapii a optimalizovanou hladinu glukózy (85). V mononukleárních buňkách periferní krve T1D pacientů byla rovněž nalezena snížená exprese miRNA-21a a miRNA-93, jejichž cílem jsou kaspázy 7, 8, MTPN (myotrophin), Fas ligand, IL-8 a IL-22 (86). Zkoumán byl miRNA profil u Treg (T regulačních) lymfocytů. Hezová et al. identifikovali zvýšenou expresi miRNA-510, a sníženou expresi miRNA-342 a miRNA-191 (87). Oproti tomu, miRNA-326 byla u T1D pacientů vysoce exprimována a korelovala se závažností onemocnění. Jedním z cílů miRNA-326 se zdá být receptor pro vitamín D (44).

Přestože bylo nalezeno velké množství miRNA asociovaných s T1D, jen u malé části z nich byl popsán jejich vztah k udržení imunologické tolerance. Bylo ukázáno, že během raného vývoje T lymfocytů miRNA-181a cílí na mRNA několika fosfatas, včetně tyrosin fosfatasy PTPN22 (88). Snížení hladin exprese fosfatas podporuje delecii autoreaktivních T lymfocytů tím, že zvyšuje účinnost TCR (T cell receptor) signalizační dráhy a brání autoreaktivním T lymfocytům vycestovat do periferie. V souladu s tímto faktem je, že ztráta exprese miRNA-181a vede k selekci T lymfocytů vykazujících vysokou reaktivitu vůči autoantigenům (89).

Pro vývoj imunitního systému jsou důležité miRNA-155 a miRNA-326, které podporují diferenciaci určitých typů Th (T helper = pomocných) lymfocytů, miRNA-326 – Th17 a miRNA-155 – Th1 (90, 91). Kromě toho je miRNA-155 také nezbytná pro přežití Treg lymfocytů a ovlivňuje produkci protilátek u zralých B lymfocytů (92).

### **1.3.HLA komplex**

HLA komplex je lokalizován na krátkém raménku 6. chromosomu a zahrnuje úsek DNA dlouhý přibližně 4 Mb. Původně byl HLA komplex zkoumán v souvislosti s histokompatibilitou, tedy schopností organismu přijmout cizí tkáň od dárce. HLA kompatibilita je nezbytným předpokladem při provedení transplantace a inkompatibilita vede k odmítnutí tkáně hostitelem. Později se ukázalo, že HLA lokus hraje primární roli při obraně proti patogenům. V této souvislosti je velice důležitý vysoký stupeň polymorfismu HLA genů, který zajišťuje imunitnímu systému variabilitu. HLA lokus je asociován s celou řadou autoimunitních onemocnění, které se dělí na orgánově specifické (T1D, celiakie, roztroušená skleróza) a systémové - revmatologické (ankylozující spondylitida, revmatoidní artritida, systémový lupus erythematoses) (93). Jejich shrnutí je uvedeno v **tabulce 2**.

HLA lokus můžeme rozdělit do 3 tříd. HLA geny I. třídy obsahují klasické geny *A*, *B*, *C*, které jsou například asociovány s rozvojem ankylozující spondylitidy či roztroušené sklerózy (93, 94). Dále pak obsahují neklasické geny *E*, *F*, *G* a pseudogeny *H*, *J*, *K*, *L*. HLA geny II. třídy obsahují 3 hlavní lokusy DR, DQ a DP, které představují hlavní rizikové faktory autoimunitních chorob. Rovněž zahrnují geny *TAP1* a *TAP2* (transportéry asociované se zpracováním antigenů), které se podílejí na transportu peptidových fragmentů do endoplazmatického retikula (ER). V současnosti je známo 2 311 alel pro gen *DRB*, 78 alel pro gen *DQA1* a 1079 alel pro gen *DQB1*(95). Oblast pro HLA geny III. třídy obsahuje více než 60 genů, které kódují řadu imunologicky důležitých molekul, jako jsou proteiny teplotního šoku HSP70, cytokiny TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  (tumor nekrotizující faktory  $\alpha$  a  $\beta$ ) a složky komplementu (C2, C4A, C4B).

**Tabulka 2.** Asociace autoimunitních onemocnění a HLA genů I. a II. třídy - adaptováno z (93). Tabulka dokumentuje, že s autoimunitou jsou nejčastěji asociovány haplotypy DR3 a DR4. Riziko vzniku autoimunitní choroby je v případě ankylozující spondylitidy primárně určeno HLA geny I. třídy. Asociace s HLA geny I. třídy byla také nalezena pro T1D, konkrétně pro HLA alely B\*39, B\*18 a A\*24, i když zde je hlavní asociace s HLA geny II. třídy.

HLA geny II. třídy		AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ	HLA geny I. třídy	
Predispoziční	Protektivní		Predispoziční	Protektivní
Δ	Δ	Ankylozující spondylitida	B*2701 B*2704 B*2705	B*2706 B*2709
DR3 DRB1*08	DR7	Graves-Basedova choroba	C*07 B*08	C*16 C*03 B*44
DR4 DR3	Δ	Hashimotova tyreoiditida	Δ	Δ
DR3	Δ	Myasthenia gravis	Δ	Δ
DR3	Δ	Addisonova choroba	Δ	Δ
Sdílený epitop= DRB1*0101 DRB1*0102 DRB1*0401 DRB1*0404 DRB1*0405 DRB1*0408 DRB1*1001 DRB1*1402	DRB1*0103 DRB1*07 DRB1*1201 DRB1*1301 DRB1*1501	Revmatoidní artritida	Δ	Δ
DQ2 DQ8	Δ	Celiakie	Δ	Δ
DR15	DR14	Roztroušená skleróza	C*05 C*15	C*01
DR3 DR4	DR15 DR14	Diabetes 1. typu	B*39 B*18 A*24	A*01 A*11 A*31
DR3 DR8 DR15	Δ	Systematický lupus erythematos	Δ	Δ

DR3 haplotyp = DRB1\*03-DQB1\*02-DQA1\*0501

DR4 haplotyp = DRB1\*04-DQB1\*0302-DQA1\*0301

DR7 haplotyp = DRB1\*07-DQB1\*02-DQA1\*02

DR14 haplotyp = DRB1\*14-DQB1\*06-DQA1\*0102

DR15 haplotyp = DRB1\*15-DQB1\*06-DQA1\*01

DQ8 antigen = DQB1\*0302 a DQ2 antigen = DQB1\*0201

Δ - K určení asociace je zapotřebí více studií.

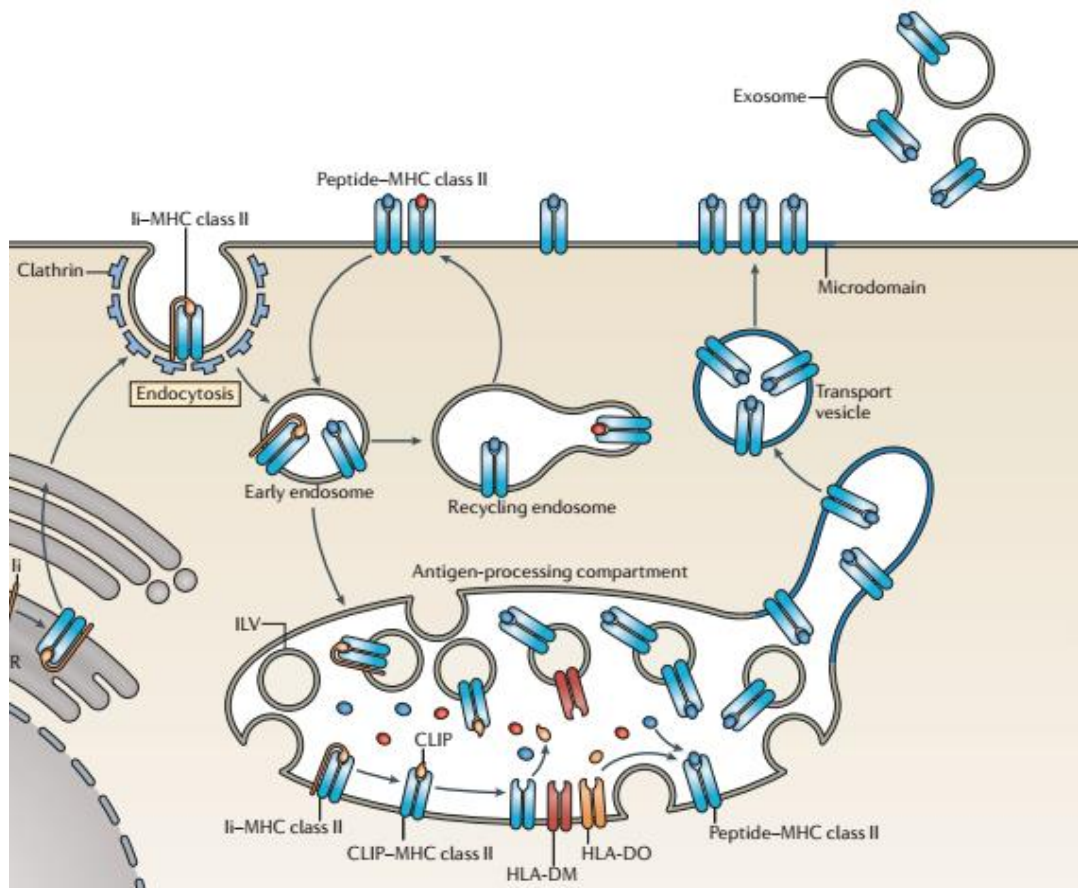
### 1.3.1. HLA molekuly I. třídy

HLA molekuly I. třídy jsou exprimovány na všech jaderných buňkách a prezentují peptidové fragmenty cytosolového a jaderného původu. Peptidové fragmenty vznikají v proteasomu následkem degradace buňce vlastních (endogenních) proteinů, či následkem virové infekce jako proteiny virového (exogenního) původu. Ty jsou poté ještě dále štěpeny na kratší peptidové fragmenty pomocí aminopeptidas v cytosolu. Vzniklé peptidové

fragmenty jsou pak přeneseny do endoplazmatického retikula (ER) pomocí transportéru TAP. V ER je pak složen heterodimer HLA molekul I. třídy, který se skládá z polymorfního těžkého řetězce alfa, vytvářející vazebný žlábek pro vazbu peptidového fragmentu, a z nekovalentně asociovaného lehkého řetězce beta2 mikroglobulinu ( $\beta_2m$ ). Vazebný žlábek obvykle váže peptidové fragmenty o délce 8 - 9 aminokyselin (96). HLA molekula I. třídy je v ER stabilizována několika chaperony (calretikulín, tapasin, Erp57) a teprve až po navázání peptidového fragmentu do vazebného žlábků jsou chaperonové proteiny uvolněny a HLA molekula I. třídy je transportována na buněčný povrch (97). Zde HLA molekuly I. třídy interagují s T buněčným receptorem (TCR) CD8+ T lymfocytů a stimulují jejich diferenciaci v cytotoxické CD8+ T lymfocyty. Na povrchu buněk je obvykle exprimováno 10,000 až 500 000 HLA molekul I. třídy, exprese závisí na jednotlivých buněčných typech (98).

### 1.3.2. HLA molekuly II. třídy

HLA molekula II. třídy je složena z řetězců alfa ( $\alpha$ ) a beta ( $\beta$ ), které jsou v každém lokusu kódovány 2 různými polymorfními geny: *DRA* kóduje  $\alpha$  řetězec a *DRB1* kóduje  $\beta$  řetězec HLA-DR molekuly, *DQA1* kóduje  $\alpha$  řetězec a *DQB1* kóduje  $\beta$  řetězec HLA-DQ molekuly, a *DPA1* kóduje  $\alpha$  řetězec a *DPB1* kóduje  $\beta$  řetězec HLA-DP molekuly. Jejich hlavním úkolem je prezentovat exogenní peptidy T buněčnému receptoru (TCR) CD4+ T lymfocytů. Exogenní peptidy se dostávají do buňky obvykle pomocí makropinocytózy, receptorem zprostředkované endocytózy nebo fagocytózou (99). Na rozdíl od HLA molekul I. třídy je exprese HLA molekul II. třídy omezena pouze na antigen-prezentující buňky (APC), tedy dendritické buňky, makrofágy a B lymfocyty. Expresi HLA molekul II. třídy lze však indukovat v ostatních buněčných typech  $IFN\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) a některými dalšími cytokiny (100, 101). Exprese HLA molekul II. třídy také závisí na vývojovém stádiu buňky. Zatímco v nezralých dendritických buňkách je více HLA molekul lokalizováno v endosomech a lysosomech, po jejich aktivaci dochází ke zvýšené expresi HLA molekul, k jejich transportu na povrch buněčné membrány a k větší stabilitě celého komplexu (102, 103). Exprese HLA molekul II. třídy na povrchu APC buněk není stálá, ale HLA molekuly II. třídy jsou neustále recyklovány a po jejich internalizaci dochází buď k jejich degradaci, nebo k jejich opětovnému vystavení na buněčném povrchu. Celý mechanismus prezentace antigenů je podrobněji popsán na **obrázku 5**.



**Obrázek 5.** Mechanismus prezentace peptidových fragmentů pomocí HLA molekul II. třídy (99). Nejprve se nově syntetizovaná HLA molekula II. třídy v ER naváže na protein označovaný jako invariantní řetězec a poté je tento komplex transportován do Golgiho komplexu. Invariantní řetězec obsahuje vazebný motiv, který je rozpoznán clathrinovými váčky, a celý komplex je pomocí endocytózy (endocytotické dráhy) dopraven do kompartmentu obsahující peptidové fragmenty (obvykle pozdní endosom, lysosom). V něm je invariantní řetězec proteolyticky rozštěpen na peptidy. V místě vazebného žlábků ovšem zůstává vázaná část invariantního řetězce, která se nazývá CLIP (class II associated invariant chain peptide). CLIP je enzymaticky odstraněn pomocí HLA DM, jehož aktivita je dosud neznámým mechanismem regulována pomocí HLA DO. Po odstranění CLIPu se do vazebného žlábků HLA molekuly II. třídy vážou peptidové fragmenty o délce 15 – 35 aminokyselin. Celý HLA komplex je pak transportován na buněčný povrch.

### 1.3.3. Asociace HLA genů II. třídy s T1D

U kavkazské populace jsou pro rozvoj T1D nejvíce rizikové haplotypy *DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01*, *DRB1\*04:01-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02*, které jsou sérologicky značeny jako DR3/DQ2 a DR4/DQ8. V obecné populaci je frekvence heterozygotů s DR3/DQ2, DR4/DQ8 haplotypem asi 3 %, avšak u diabetických pacientů je frekvence těchto heterozygotů až kolem 30 %. Být heterozygotem pro DR3/DQ2, DR4/DQ8 znamená pro jedince vyšší riziko rozvoje T1D než pro jedince, který je homozygotem pro jeden z uvedených haplotypů. To je pravděpodobně způsobeno tím, že jednotlivé  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce heterozygotů DQ2/DQ8 se mohou mezi sebou navzájem kombinovat a dávají vznik čtyřem



různým molekulám HLA DQ (*DQA1\*05:01-DQB1\*02:01*; *DQA1\*05:01-DQB1\*03:02*; *DQA1\*03:01-DQB1\*03:02*; *DQA1\*03:01-DQB1\*02:01*) (104). Riziko vzniku T1D je také ovlivněno tím, zda jsou geny kódující  $\alpha$  a  $\beta$  řetězec lokalizované v pozici trans či cis. Mezi T1D protektivní haplotyp patří haplotyp *DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02*, který se vyskytuje přibližně u 20 % obecné populace (105). Jediná kopie alely *DQB1\*06:02* tohoto haplotypu je dostatečná pro negativní asociaci s T1D, a to i v případě, kdy je na druhém chromosomu přítomen některý z rizikových haplotypů *DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01* nebo *DRB1\*04:01-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02*. Protektivní a rizikové haplotypy jsou shrnuty v **tabulce 3**. Rizikovost HLA alel je pravděpodobně způsobena menší afinitou HLA DQ, DR molekul k některým ostrůvkovým autoantigenům  $\beta$  buněk pankreatu. Následkem toho dochází k porušení centrální a periferní tolerance vůči autoantigenu a k selekci autoreaktivních T lymfocytů.

**Tabulka 3.** Vybrané rizikové a protektivní haplotypy u T1D - převzato a upraveno z (104, 106). Rizikovost jednotlivých haplotypů udává číslo OR= z angl. odds ratio. Čím je hodnota vyšší než 1, tím větší riziko daný haplotyp představuje pro rozvoj T1D. Nižší hodnoty než 1 naopak poukazují na protektivitu haplotypu. Riziko onemocnění T1D určuje vždy celý haplotyp, dobře to lze dokumentovat na haplotypu *DR4\*04:03-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02*, kdy přítomnost alely *DRB1\*04:03* má za následek protektivitu celého haplotypu, i když ostatní jeho alely jsou predispoziční. Frekvence haplotypu s *DRB1\*04:03* je v kavkazské populaci 0,6 %, v asijské populaci 3,5 % (107).

Haplotyp	DRB1	DQA1	DQB1	OR
<b>DR3</b>	03:01	05:01	02:01	3,64
<b>DR4</b>	04:05	03:01	03:02	11,37
<b>DR4</b>	04:01	03:01	03:02	8,39
<b>DR4</b>	04:02	03:01	03:02	3,63
<b>DR1</b>	01:01	01:01	05:01	0,71
<b>DR2</b>	15:01	01:02	06:02	0,03
<b>DR4</b>	04:03	03:01	03:02	0,27
<b>DR6</b>	14:01	01:01	05:03	0,02
<b>DR7</b>	07:01	02:01	03:03	0,02
<b>DR7</b>	07:01	02:01	02:01	0,32
<b>DR11</b>	11:01	05:01	03:01	0,18
<b>DR13</b>	13:01	01:03	06:03	0,13

### 1.3.4. Role HLA molekul v etiopatogenezi T1D

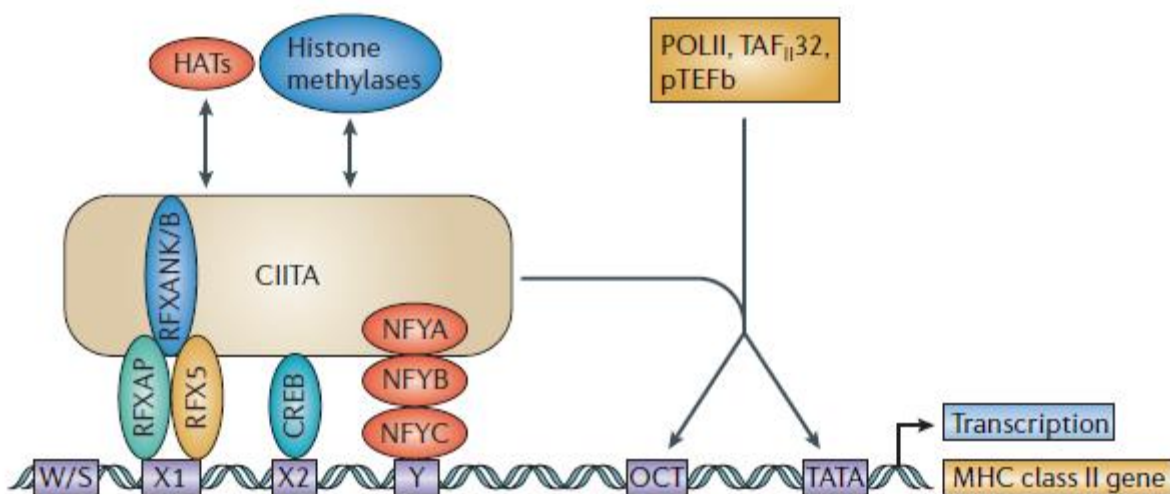
Celá etiopatogeneze T1D je velice složitý proces, který stále ještě není dostatečně znám. Proces, který ve výsledku může vést k autoimunitě, začíná v thymu, kde nejprve dochází k pozitivní selekci nezralých T lymfocytů, tedy těch lymfocytů, které exprimují TCR a jsou schopné rozpoznat komplex HLA - autoantigen. Tato selekce vede ke vzniku zralých T lymfocytů včetně autoreaktivních T lymfocytů. Předtím než T lymfocyty vycestují do periferie, procházejí ještě negativní selekcí. Autoreaktivní lymfocyty, které s vysokou afinitou reagují s komplexem HLA – autoantigen, jsou eliminovány, podléhají apoptóze a jsou odstraněny z imunitního systému (108). T1D protektivní HLA molekuly, které silně interagují s autoantigeny, pravděpodobně zvyšují účinnost delece autoreaktivních T lymfocytů. Naopak, T1D rizikové HLA molekuly umožňují uniknout do periferie většímu množství autoreaktivních T lymfocytů díky nižší vazebné afinitě (stabilitě) mezi autoantigenem a komplexem peptid-HLA molekula. V této souvislosti je důležité zmínit, že nejvíce rizikové haplotypy obsahují ve vazebném žlábků na aminokyselinové pozici 57 alanin místo aspartátu. Tato aminokyselinová záměna vede ke změně rozložení elektrického náboje v peptidovém žlábků a snižuje stabilitu komplexu HLA - autoantigen (109, 110). Tímto mechanismem dochází k porušení centrální tolerance a autoreaktivní T lymfocyty tak vycestovávají do periferie, kde může dojít k jejich aktivaci a expanzi. Při tomto procesu hrají důležitou roli Treg lymfocyty, které modulují imunitní odpověď, směrem k Th1 nebo Th2 odpovědi. Bylo ukázáno, že Th1 odpověď podporuje rozvoj diabetu (111). V této fázi se také nejvíce uplatňují environmentální faktory a infekční agens, které mohou ovlivnit imunitní odpověď (112). Poškozené tkáně či zánětlivé procesy mohou vést ke zvýšené prezentaci antigenů a uvolněné zánětlivé cytokiny přitáhnou další T lymfocyty a mohou způsobit progresy autoimunitního procesu.

### 1.3.5. Regulace exprese HLA genů II. třídy

Expres HLA genů II. třídy je regulována zejména na transkripční úrovni pomocí vysoce konzervovaných regulačních sekvencí nacházejících se 150-300 párů bází před místem pro iniciaci transkripce. Tato regulační oblast se nazývá SXY modul a skládá se ze 4 specifických oblastí W/S, X, X2 a Y, které jsou také označovány jako „boxy“. SXY modul se nachází u všech hlavních genů HLA genů II. třídy (*HLA DQ*, *HLA DR*, *HLA DP*) a také v promotorech genů pro invariantní řetězec a v promotorech genů *HLA DM* a *DO*, jejichž produkty umožňují vazbu peptidového fragmentu do žlábků HLA molekul II. třídy (113).

Další SXY moduly byly lokalizované napříč celým lokusem HLA genů II. třídy a fungují jako enhancery, kdy vzdáleně kontrolují expresi HLA genů II. třídy (114). Na SXY modul se váže celá řada transkripčních faktorů a jejich hlavním regulátorem je koaktivátor CIITA (class II transactivator), viz **obrázek 6**.

Promotor genu *HLA-DQA1* obsahuje hypervariabilní oblast, lokalizovanou 200-240 párů bazí před exonem 1. V této oblasti bylo identifikováno 10 různých variant promotoru, které jsou označovány jako QAP (DQA1 promotor). Tyto varianty jsou ve vazebné nerovnováze s jednotlivými *HLA-DQA1* alelami (115) a mohou ovlivnit jejich expresi (116).



**Obrázek 6.** Regulace exprese HLA genů pomocí transaktivátoru II. třídy CIITA. CIITA asociuje s proteiny vázanými na promotor HLA genu II. třídy. Mezi DNA vazebné proteiny, se kterými CIITA interaguje, patří proteiny NFY (jaderný faktor Y), RFX (regulační faktor X) a CREB (cAMP response element binding protein). CIITA je nezbytný pro expresi HLA genů II. třídy, ale také interaguje s obecnými transkripčními faktory, jako jsou TAFII 32 (TATA box binding protein associated factor) a pTEFb (positive transcription elongation factor) (117).

CIITA je klíčovým regulačním proteinem exprese HLA genů II. třídy. Bez CIITA je exprese HLA genů II. třídy velice slabá a jeho kompletní deficience vede k vážným imunitním defektům, jako je syndrom holých lymfocytů druhého typu. CIITA je konstitučně exprimován v APC buňkách, ale po stimulaci  $\text{IFN}\gamma$  lze jeho expresi indukovat i u většiny buněčných typů (101, 118). Jeho aktivita je dále modulována posttranslačními modifikacemi jako jsou acetylace, fosforylace a ubikvitinace (119). Transkripční komplex, kontrolující expresi HLA genů II. třídy, se skládá z několika důležitých proteinů, mezi které patří NF-Y a RFX a CREB. Tyto DNA vazebné proteiny se vážou do regulační oblasti modulu SXY a po interakci s CIITA dávají vznik transkripčně aktivnímu komplexu neboli enhanceosomu. Po vytvoření enhanceosomu, CIITA váže celou řadu chromatin-remodelujících proteinů, jako jsou histon-acetyltransferasy (p300, CBP) a methyltransferasa CARM 1 (coactivator

associated arginine methyltransferase 1). Histon-acetyltransferasy pak acetylují histonové proteiny v nukleosomu, což vede k rozvolnění chromatinové struktury a k přístupu dalších transkripčních faktorů. Naopak při inaktivaci se na CIITA vážou histon-deacetylasy (120), které odstraní acetylové skupiny a disociují CIITA, RFX a NF-Y z promotorů HLA genů (121).

## **2. Hypotéza a cíle práce**

**Naše hypotéza předpokládá, že epigenetické regulace hrají důležitou roli v etiopatogenezi autoimunitního diabetu.**

Předkládaná dizertační práce je zaměřena na epigenetický profil genu *HLA-DQA1* u diabetických pacientů a zdravých kontrol.

**Hlavní cíle disertační práce byly:**

1. HLA genotypizace diabetických pacientů a zdravých kontrol
2. Analýza mRNA exprese *HLA-DQA1* alel
3. Detekce DNA methylace promotorového úseku *HLA-DQA1* alel
4. Odhalit možnou závislost mezi DNA methylací promotoru *HLA-DQA1* a mRNA expresí *HLA-DQA1*

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Seznam použitých roztoků a primerů

##### Izolace DNA

RCLB (roztok pro lýzu erytrocytů):	5 mM MgCl <sub>2</sub> 320 mM sacharosa 1% Triton X – 100 12 mM Tris-HCl pH 7.5
WCLB (roztok pro lýzu leukocytů):	120 mM EDTA pH 8.0 375 mM NaCl

##### Magnetická separace CD14+ monocytů

Pufr 1	PBS pH 7.4 0,1% (w) BSA
Pufr 2	PBS (bez Mg <sup>2+</sup> nebo Ca <sup>2+</sup> ) 0,1% (w) BSA 2 mM EDTA

##### Elektroforetická separace DNA

TBE pufr	890 mM Tris baze 890 mM kyselina boritá 20 mM EDTA pH 8.0
TAE pufr (50x konc. zásobní roztok):	242 g Tris baze 100 ml 0,5 M EDTA pH 8.0 57, 1 ml kyseliny octové doplněno dH <sub>2</sub> O do 1 litru

##### Izolace plasmidové DNA

Roztok 1	50 mM glukosa 10 mM EDTA 25 mM Tris HCl
Roztok 2	200 mM NaOH 1% SDS
Roztok 3	60 ml KOAc 11,5 ml ledové kyseliny octové 28.5 ml dH <sub>2</sub> O

## Primery a sondy

Syntetické jednořetězcové oligonukleotidy sloužící jako primery pro PCR, kvantitativní PCR nebo sondy pro RT-PCR byly syntetizovány na zakázku přečištěné gelovou permeační chromatografií.

## Primery pro amplifikaci promotorového úseku *HLA-DQA1*

Označení	Primery	Sekvence (5'→3')	T <sub>m</sub> [°C]	délka ampliconu	
1	Vnější	přímý primer 1	GGTTGTAAGTTAGAATATTTTGAAGGATG	63	643 bp
2		zpětný primer 1	CAAACCAAACCCTACCAAATCA	58	
3	Vnitřní	přímý primer 2	AGGTTGTTTAGAAATGTTTATTTTGG	59	547 bp
4		zpětný primer 2	AAAATCCCCTATAATAACATCTCAATTAC	62	
5	Vnější	přímý primer 1	TTATTTATTTACGAGGTTGTTTAGAAATG*	53	572 bp
6		zpětný primer 1	AACTAATTAATAAACTCCCCTATAATAACAC	53	
7	Vnitřní	přímý primer 2	TTATTTATTTACGAGGTTGTTTAGAAATG*	53	501 bp
8		zpětný primer 2	TTAACAAAAAATCCCCTAATTATAAC	52	

1-4 primery pro amplifikaci bisulfítované DNA pro alely DQA1\*01, 02, 03, 05

4-8 primery pro amplifikaci bisulfítované DNA pro alelu DQA1\*04, pro amplifikaci DQA1\*04 byl použit v obou amplifikačních reakcích stejný přímý primer (označen \*)

## Univerzální primery pro ověření pozitivně transformovaných bakterií

SP6 primer 1 5'GATTTAGGTGACACTATAGA 3'

T7 primer 1 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

## Seznam primerů použitých pro při kvantitativním PCR

Označení primeru	Sekvence (5'→3')	Délka primeru	T <sub>m</sub> [°C]	Délka ampliconu [bp]
DQA1*01 F	GAAGGAGACTGCCTGGCG	18	53	106
DQA1*01 R	CATGATGTTCAAGTTGTGTTTTGC	24	54	
DQA1*02 F	TTACGGTCCCCTCTTGCCAGTT	21	55	124
DQA1*02 R	TTGCGGGTCAAATCTAAGTCTGT <sup>+</sup>	23	55	
DQA1*03 F	GGTCCCTCTGGGCAGTACAG	20	53	127
DQA1*03 R	CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT <sup>+</sup>	22	55	
DQA1*04 F	GTACACCCATGAATTTGATGGAGAC	25	55	154
DQA1*04 R	CAGGATGTTCAAGTTGTGTTTTGTC	25	55	
DQA1*05 F	GATGAGCAGTTCTACGTGGACCC	23	54	152
DQA1*05 R	GTAGAGTTGGAGCGTTAATCAGAC	25	53	
DQA1 total F	TACAGCTCAGAACAGCAACTGC	22	53	126
DQA1 total R	CCCACAATGTCTTCACCTCCA	21	55	
DQA1 intron F	GTTGCCCGTTTCTTCTCTCA <sup>+</sup>	21	54	80
DQA1 intron R	TGGACTCCTTACCCACTCCC <sup>+</sup>	21	55	
DRA F	GGACAAAGCCAACCTGGAAA <sup>+</sup>	20	54	120
DRA R	AGGACGTTGGGCTCTCTCAG <sup>+</sup>	20	53	

+ Sekvence primerů byla převzata od Fernandez (122)

Sekvence ostatních primerů byla částečně upravena dle dostupných sekvencí na stránkách (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/align.html>) a publikována naší skupinou (123).

## Seznam sond použitých při kvantitativním PCR

Sonda	Sekvence (5'→3')	délka sondy	Tm [°C]
DQA1*01	CCTGCGGGTCAAAACCTCCAAATTTG	26	66
DQA1*0203	CCACATAGAACTCCTCGTCTCCATCAAATTCAT	33	66
DQA1*0405	ACTGTCTGGTGTGTTGCCTGTTCTCAGACAA <sup>+</sup>	31	65
DQA1 total	CTTTGTTTAGGATCATCCTCTTCCCAAGGC	30	65
DQA1 intron	ACCTGTGCCAGTTCCCATGTGGAAAT	26	64
DRA1	CAACTATACTCCGATCACCAATGTACCTCCAGAG	34	65

+ Sekvence sond byla převzata od Fernandez (122).

Sekvence ostatních sond byla částečně upravena dle dostupných sekvencí na stránkách (<http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/align.html>) a publikovány naší skupinou (123).

## 3.2. Bakteriální kmeny a plasmidy

### Bakteriální kmeny

*E. coli* DH5 $\alpha$ , genotyp: *F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1*

### Plasmidy

pGEM-T® Easy vector, oriV ColE1 lacZ, 3015 pb, Promega

## 3.3. Pracovní postupy

### 3.3.1. Sběr vzorků

Studie byla schválena etickou komisí 3. LF UK a od každého jedince byl před odběrem získán informovaný souhlas. Od každého pacienta bylo odebráno 2 x 5 ml plné periferní krve do zkumavky s antikoagulační látkou EDTA. DNA byla izolována z 0,5 ml plné krve pomocí vysolovací metody (124). 1 ml krve byl použit pro izolaci RNA z plné krve za využití GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep kitu (Sigma Aldrich, USA) a 8,5 ml krve bylo využito pro magnetickou separaci monocytů, ze kterých byla následně vyizolována DNA a RNA. DNA z plné krve byla použita pro HLA genotypizaci a pro bisulfitové sekvenování. RNA z plné krve byla přepsána do cDNA a použita pro kvantitativní PCR.

Zatímco kolegyně Mgr. Marta Zajacová měla na starosti sběr a analýzu vzorků od zdravých jedinců, já měl na starosti sběr a analýzu vzorků od diabetických pacientů.



### 3.3.2. Magnetická separace CD14+ monocytů

Pro magnetickou separaci monocytů bylo použito magnetických partikulí Dynabeads® CD14 (Invitrogen, USA), které na svém povrchu nesou protilátky proti povrchovému antigenu monocytů CD14. Pro izolaci bylo použito přibližně 8,5 ml nesrážlivé krve s antikoagulantem EDTA. Magnetické partikule byly před použitím promyty v roztoku 0,1% PBS/BSA dle pokynů výrobce.

K plné periferní krvi byl přidán dvojnásobný objem pufru 2 a celá směs byla centrifugována při 600 g po dobu 10 minut. Supernatant byl odebrán a buňky resuspendovány v původním objemu krve. K buňkám byly přidány promyté magnetické partikule Dynabeads CD14, výrobce doporučuje 25 µl magnetických partikulí na 1 ml krve. V našem případě jsme přidávali  $\frac{3}{4}$  doporučeného objemu magnetických partikulí na 1 ml krve. Buňky byly inkubovány s magnetickými partikulemi na otáčecím rotátoru při 4°C po dobu 30 minut. Přiložením buněk k magnetu po dobu 2 minut byly CD14+ monocyty separovány od zbytku buněk. Monocyty byly resuspendovány v původním objemu krve v pufru 2 a opětovným přiložením k magnetu (2 minuty) byly separovány. Takto byly opakovaně 3x promyty v pufru 2. Poté byl pod mikroskopem v Bürgerově komůrce určen počet vyizolovaných monocytů. Část monocytů bylo použito pro izolaci DNA a část monocytů pro izolaci RNA.

### 3.3.3. Izolace RNA

RNA byla izolována z monocytů a plné krve. Pro izolaci RNA z monocytů byl použit kit QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA), RNA z plné krve byla pak získána pomocí GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kitu (Sigma Aldrich, USA). V obou případech bylo postupováno dle pokynů výrobce.

### 3.3.4. HLA genotypizace

Pro HLA genotypizaci byly použity kity HLA Olerup SSP® (Genovision, USA). HLA SSP kity obsahují sekvenčně specifické primery, které umožňují pomocí PCR rozlišit jednotlivé alely HLA genů *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* a *HLA-DRB1* (**tabulka 4 a 5**). Rozlišení jednotlivých HLA alel nám umožnilo cíleně vybrat diabetické pacienty (podle jejich HLA haplotypů), kteří byly zahrnuti do následné methylační studie. Rozlišení HLA alel nám také umožnilo provést následnou kvantifikaci jednotlivých *HLA-DQA1* alel pomocí kvantitativního PCR. Nejprve byly určeny sérologické skupiny HLA-DQB1 a HLA-DRB1 pomocí nízko-rozlišovacích kitů. Podtypy *HLA-DQB1* a *HLA-DQA1* alel byly poté určeny

použitím vysokorozlišovacích kitů HLA-DQB1\*02, 03, 04, 05, 06 a HLA-DQA1. Vysokorozlišovací kit pro gen HLA-DRB1 využit nebyl. Úspěšná PCR amplifikace byla ověřena na 2% TBE agarozovém gelu. Jednotlivé HLA alely byly identifikovány dle přiloženého manuálu výrobce.

**Tabulka 4.** Reakční mix pro genotypizaci HLA genů II. třídy

Složka reakce	Objem [μl]
dH <sub>2</sub> O	4,92
PCR master mix	3,0
DNA (c = 30 ng/μl)	2,0
<i>Taq</i> polymerasa	0,08
Celkový objem	10

Do reakce byla vložena DNA o koncentraci c = 30 ng/μl

**Tabulka 5.** Teplotní program pro HLA genotypizaci

Reakční krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet opakování
1 Počáteční denaturace	94	120	
2 Denaturace	94	10	9x
3 Hybridizace a elongace	65	60	
4 Denaturace	94	10	19x
5 Hybridizace	61	50	
6 Elongace	72	30	

### TBE agarózová elektroforéza

2 % gel byl připraven smícháním 3,6g agarózy se 180ml 1x konc. TBE pufru. Heterogenní směs byla přivedena k varu v mikrovlnné troubě a k homogennímu roztoku poté přidáno 5 μl interkalačního činidla GelRed. Roztok byl ponechán při pokojové teplotě, dokud se neochladil přibližně na 50°C a poté byl nalit do elektroforetické vany.. Na gel byly umístěny hřebeny a po ztuhnutí gelu byly hřebeny vyjmuty a gel zalit TBE pufrem. Do jamek gelu byl nanesen PCR produkt, který byl předem smíchán s 6x koncentrovaným nanášecím

pufrem v poměru 5:1. Elektroforetická separace probíhala za konstantního napětí 175 V po dobu 45 minut.

### 3.3.5. Bisulfitové sekvenování

#### Bisulfitová konverze

Principem bisulfitové konverze spočívá v konverzi nemetylovaného cytosinu na uracil v přítomnosti bisulfitu sodného (NaHSO<sub>3</sub>). Důležité je, že ke konverzi dochází pouze u nemetylovaného cytosinu, metylovaný cytosin je vůči bisulfitové konverzi rezistentní. Tímto způsobem tak lze po následné sekvenaci zjistit, které cytosiny byly před konverzí metylovány a zjistit methylační stav promotorového úseku *HLA-DQA1*. V důsledku snížení komplexity DNA (většina C převedena U), byla pro následnou amplifikaci bisulfitované DNA použita metoda Nested PCR.

Bisulfitová konverze byla provedena pomocí Epiect Bisulfite kitu (QIAGEN, USA). Bisulfitový mix byl připraven rozpuštěním v 800 µl dH<sub>2</sub>O a dle **tabulky 6** byla připravena reakční směs. Reakční směs byla umístěna do thermocykleru a bisulfitová konverze provedena dle uvedeného teplotního programu uvedeného v **tabulce 7**. Po provedení teplotního programu byla bisulfitová DNA přečištěna. K 1,5 ml zkumavkám obsahující bisulfitovanou DNA bylo přidáno 560 µl pufru BL a celý roztok zvortexován a krátce stočen. Celý obsah 1,5 ml zkumavky byl přenesen na Epiect kolonku a stočen (1 minuta, 18000 g). Supernatant byl vylit a ke kolonce přidáno 500 µl BW pufru (před použitím smíchán s ethanolem dle pokynů výrobce) a kolonka stočena. Bisulfitovaná DNA byla skladována při -20°C.

**Tabulka 6.** Reakční podmínky pro bisulfitovou konverzi DNA

Složka reakce	Objem [µl]
DNA (1ng - 2µg)	různorodý*
dH <sub>2</sub> O	různorodý*
Bisulfitový mix	85
Ochranný pufr DNA	35
Celkový objem	140

\*celkový objem DNA a dH<sub>2</sub>O byl 20 µl. Do reakce bylo vloženo 500 ng – 1µg DNA.

**Tabulka 7.** Teplotní program pro bisulfitovou konverzi DNA

Reakční krok	Čas [min]	Teplota [°C]
Denaturace	5	95
Inkubace	25	60
Denaturace	5	95
Inkubace	85	60
Denaturace	5	95
Inkubace	175	60
Závěrečná inkubace	∞	20

### Nested PCR

Nested PCR je metoda, která se využívá pro amplifikaci obtížně amplifikovatelných úseků DNA (**tabulka 8 a 9**). Při této metodě je využito 2 párů primerů, vnitřních a vnějších. Vnější primery nejprve amplifikují delší amplikon, který je snadněji amplifikován pomocí vnitřních primerů. Vnější primery nasedají na promotorový úsek *HLA-DQA1* v místě -729 až -87 od start kodonu, vnitřní primery amplifikují promotorový úsek *HLA-DQA1* dlouhý 547 páru bazí, v místě -673 až -126 od start kodonu. Pro amplifikaci alely *DQA1\*04* byl použit jiný pár vnitřních a vnějších primerů, které v první PCR reakci amplifikovali úsek dlouhý 572 páru bazí a ve druhé PCR reakci úsek dlouhý 501 páru bazí (-686 až -186). Abychom minimalizovali riziko pro náhodnou amplifikaci pouze 1 alely, byla amplifikace provedena ve 3 nezávislých reakcích, které byly po PCR smíchány dohromady. PCR amplifikace byla ověřena na 2 % TBE agarózovém gelu.

**Tabulka 8.** Reakční směs pro amplifikaci promotorové oblasti genu *HLA-DQA1*

Složka reakce	PCR reakce 1 [μl]	PCR reakce 2 [μl]
dH <sub>2</sub> O	13,25	14,75
10x <i>Taq</i> pufr s KCl	2,5	2,5
Mg <sup>2+</sup> (25 mM MgCl <sub>2</sub> )	6	4
dNTPs (10mM)	1,25	1,25
přímý primer (50 μM)	0,4	0,4
zpětný primer (50 μM)	0,4	0,4
<i>Taq</i> DNA polymerasa	0,2	0,2
DNA	1	1,5
Celkový objem	25 μl	25 μl

**Tabulka 9.** Teplotní program pro amplifikaci promotor oblasti genu *HLA-DQA1*

Reakční krok PCR reakce	PCR reakce 1			PCR reakce 2		
	Čas [min]	Teplota [°C]	Počet opakování	Čas [min]	Teplota [°C]	Počet opakování
1. Počáteční denaturace	5	95		5	95	
2. Denaturace	1	95	39x	1	95	49x
3. Hybridizace	1,5	56		1,5	65	
4. Elongace	1	72		1	72	
5. Závěrečná inkubace	10	72		10	72	

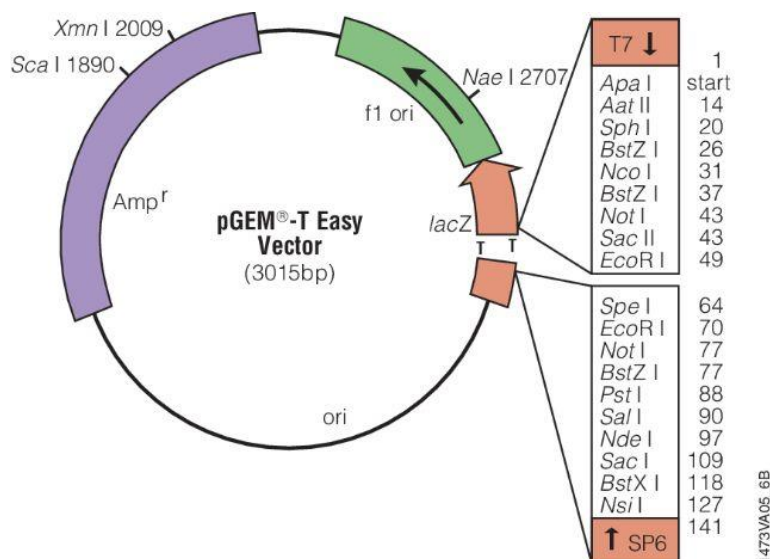
### Přečištění a izolace PCR produktu

Po úspěšném ověření amplifikace promotorového úseku *HLA-DQA1* bylo přikročeno k přečištění PCR produktu v 1 % agarozovém gelu (Sigma Aldrich, USA) s nízkou teplotou tání. Po elektroforetické separaci byl agarózový gel umístěn pod UV transluminátor a pomocí skalpelu vyříznuty proužky gelu obsahující specifické amplikony o velikosti 548 nebo 501 párů bazí. Z gelu byly poté získány PCR produkty (GenElute™ Gel Extraction Kit, Sigma

Aldrich, USA) a koncentrace DNA byla kvantifikována na nanofotometru (Implen, Německo).

## Klonování

Abychom od pacientů získali jednotlivé sekvence promotorového úseku *HLA-DQA1*, bylo nutné jednotlivé PCR produkty získané od každého pacienta klonovat. Proto byl připraven vektorový konstrukt obsahující amplifikovaný úsek *HLA-DQA1* (obrázek 7). pGEM-T Easy vektor byl ligován s námi připraveným PCR produktem a celý konstrukt byl teplotním šokem vložen do bakteriálního kmene *E. coli* DH5 $\alpha$ . Tento kmen má delecii v genu pro  $\alpha$ -peptid betagalaktosidasu, který je ale přítomný ve vektoru. V případě úspěšného vložení konstruktů do bakterií, je u vektoru přerušena čtecí roura betagalaktosidasu a bakterie tento enzym neprodukuje (kolonie jsou bílé). Naopak v případě, že se nepodaří PCR produkt správně zaligovat, může dojít k uzavření vektoru, čímž je obnovena exprese betagalaktosidasu (kolonie jsou modré). Betagalaktosidasa je enzym, který umožňuje bakteriím štěpit X-Gal, substrát obsažený v agarovém médiu, za vzniku zřetelné modré barvy. Z tohoto důvodu se nazývá tento způsob modro/bílá selekce. Vektor ještě obsahuje sekvenci pro indukci exprese betagalaktosidasu pomocí IPTG a enzym štěpící ampicilinové antibiotikum.



**Obrázek 7.** pGEM-T Easy vektor byl využit pro ligaci s *HLA-DQA1* ampikonem. Připraveným konstruktem byly pomocí teplotního šoku transformovány bakterie *E. coli* DH5 $\alpha$ . Převzato z (125).

## Příprava kompetentních bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$

3 ml LB média bylo pomocí očkovací kličky inokulováno bakteriemi a vše inkubováno přes noc při 37°C. Následující den byl přidán 1 ml této kultury k 100 ml LB média a bakterie kultivovány při 37°C. Optická denzita (OD590) kultury byla zkontrolována po 80 minutách a

poté pravidelně kontrolována v 15 minutových intervalech, dokud se hodnota OD590 nepohybovala mezi 0,5 až 0,6. Poté, co kultura dosáhla požadované hodnoty OD590 byla umístěna na led a asepticky byla přenesena do sterilních 50 ml zkumavek. 50 ml zkumavky byly stočeny při 3500 g po dobu 5 minut, LB médium bylo odebráno a peleta bakterií resuspendována ve 25 ml ledového sterilního 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Bakterie byly opět stočeny (5 minut při 3500 g), supernatant odstraněn a bakterie resuspendovány v 25 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Poté byly umístěny na led (30 minut), sklizeny centrifugací (5 minut při 3500 g), resuspendovány ve 3 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> s 20 % obsahem glycerolu. Do 1,5 ml vychlazených zkumavek byla pomocí Pasteurovy pipety přenesena suspenze připravených kompetentních bakterií. Zkumavky s kompetentními bakteriemi byly zmrazeny vložením do vychlazeného ethanolu při -70°C.

### **Příprava kultivačních misek**

Kultivační misky byly připraveny do 500 ml baňky smícháním 400 ml destilované vody a 14 g LB agaru. Heterogenní směs byla umístěna do autoklávu a sterilizována při tlaku 0,1 MPa teplotě 121°C po dobu 20 minut. Po ochlazení roztoku na teplotu 45-50°C bylo k němu asepticky přidáno 400 µl ampicilinu, 400 µl IPTG a 400 µl X-Gal. Celý roztok byl důkladně promíchán a nalit na Petriho misky. Petriho misky s agarem byly uskladněny ve 4°C pro pozdější použití.

### **Ligační reakce a transformace kompetentních buněk**

Přečištěný PCR produkt z nested PCR byl zaligován do pGEM-T easy vektoru. Nejprve byla připravena ligační reakce, která probíhala buď 1 hodinu při pokojové teplotě nebo přes noc při 4°C (**tabulka 10**). Připravené kompetentní buňky *E. Coli* DH5α byly umístěny na led a k nim přidán celý objem ligační reakce. Bakterie s ligační reakcí byly inkubovány 20 minut na ledě a následně transformovány teplotním šokem ve vodní lázni (42°C) po dobu 45 sekund. Okamžitě po teplotním šoku byly přemístěny na led, alespoň na 2 minuty. Bakterie byly poté inkubovány (37°C, 150 rpm) s přidáním LB médiem (950 µl) po dobu 1,5 hodiny. Buněčná suspenze byla poté nanášena na LB agarové misky obsahující X-Gal, IPTG a ampicilin po 50 µl a 200 µl a důkladně rozetřena po celém obsahu. Kultivační misky byly otočeny dnem vzhůru, přes noc umístěny do inkubátoru a následující den vyhodnoceny narostlé kolonie.

**Tabulka 10.** Reakční směs ligační reakce

Komponenta ligační reakce	Objem [ $\mu$ l]
2x ligační pufr	2,5
pGEM <sup>®</sup> -T Easy vector (50 ng/ $\mu$ l)	0,5
PCR produkt (14 ng/ $\mu$ l)	různorodý*
T4 DNA ligasa	0,5
dH <sub>2</sub> O	různorodý*
Celkový objem	5

\*Celkový objem PCR produktu a dH<sub>2</sub>O byl 1,5  $\mu$ l.

Do reakce bylo standardně vložen 1  $\mu$ l DNA o koncentraci 14 ng/ $\mu$ l.

### Ověření pozitivně transformovaných kolonií (PCR colony)

Z pozitivně transformovaných buněk byla izolována plasmidová DNA, která nám umožnila ověřit úspěšnou transformaci buněk a následně odeslat bakterie na sekvenační analýzu. Pro ověření bylo využito PCR reakce, kde jako templát byla použita plasmidová DNA s námi vloženým amplikonem *HLA-DQA1*. Pro amplifikaci bylo využito univerzálních sekvencí SP6 a T7, které ve vektoru ohraničují námi vložený PCR produkt *HLA-DQA1*.

### Izolace plasmidové DNA

Pozitivně transformované kolonie byly pomocí párátko odebrány a inkubovány přes noc v LB médiu obsahující ampicilin (37°C, 250 rpm). Následující den byly sklizeny centrifugací (12000 g) a peleta resuspendována v roztoku 1 (50 mM glukosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl). K peletě bylo dále přidáno 200  $\mu$ l roztoku 2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) a poté 200  $\mu$ l chloroformu. Bakterie byly lyzovány 2 minuty na ledě a lýze zastavena přidáním 200  $\mu$ l roztoku 3 (60 ml KOAc, 11,5 ml bezvodé kyseliny octové, 28,5 ml dH<sub>2</sub>O). Následovala centrifugace po dobu 10 minut (12000 g) a odebrání horní frakce obsahující nukleové kyseliny. DNA byla vysrážena přidáním 0,5 ml izopropanolu. DNA byla stočena (10 minut, 12000 g), peleta promyta 200  $\mu$ l 70 % ethanolu a opět stočena (5 minut, 12000 g). Supernatant byl vylit, DNA vysušena v laminárním boxu a rozpuštěna ve 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O.

### PCR z plasmidové DNA

Dle **tabulky 11** byla připravena reakční směs pro ověření vloženého insertu a dle **tabulky 12** byla podle teplotního programu provedena amplifikace.



**Tabulka 11.** Reakční směs pro ověření vloženého insertu (jedna PCR reakce)

Složka reakce	Objem [μl]
dH <sub>2</sub> O	15,25
10x <i>Taq</i> pufr s KCl	2,5
Mg <sup>2+</sup> (25 mM MgCl <sub>2</sub> )	4
dNTPs (10mM)	1,25
SP6 primer (50 μM)	0,4
T7 primer (50 μM)	0,4
<i>Taq</i> DNA polymerasa	0,2
Plazmidová DNA	1,0
Celkový objem	25 μl

**Tabulka 12.** Teplotní program pro ověření vloženého insertu

Reakční krok	Teplota [°C]	Čas	Počet opakování
1. Počáteční denaturace	94	5 min	
2. Denaturace	94	5 min	40x
3. Hybridizace	51	30 s	
4. Elongace	72	45 s	
5. Závěrečná inkubace	72	10 min	

Sekvenace probíhala ve firmě Macrogen (Korea). Od každého jedince bylo odesláno 4-10 klonů z monocytů a 4-11 klonů z plné krve. Bakterie byly v 96 jamkové destičce s 1% LB agarem. Získané sekvence byly zarovnány dle referenční sekvence *HLA-DQA1* ve volně dostupném programu Bioedit a vyhodnoceny.

### 3.3.6. Relativní exprese *HLA-DQA1*

Pro stanovení relativní exprese jednotlivých alel *HLA-DQA1* bylo využito fluorescenčních sond TaqMan<sup>TM</sup>. Vhodná endogenní kontrola byla vybrána ze čtyř kandidátních genů. Jako nejvhodnější endogenní kontrola byl vybrán gen *PPIA* (*PPIA*: Hs 99999904\_m1, Applied Biosystems, USA), který vykazoval nejmenší směrodatnou odchylku

při zkušebních měřeních exprese *HLA-DQA1*. Kromě endogenní kontroly PPIA, jsme se rozhodli dále zahrnout do studie i druhou endogenní kontrolu *HLA-DRA*. *HLA-DRA* stejně jako *HLA-DQA1* patří do HLA genů II. třídy a jejich exprese je tedy regulována stejnými transkripčními faktory (RFX, NF-Y a CIITA). Srovnání exprese oproti *HLA-DRA* nám umožnilo sledovat geneticky podmíněnou expresi *HLA-DQA1* bez ohledu na zdravotní stav pacienta v době odběru (jiné autoimunitní procesy, zánět, infekce a další faktory).

Vzhledem k tomu, že primery a sondy byly navrženy do promotorové oblasti genu *HLA-DQA1*, rozhodli jsme také amplifikovat intronovou oblast genu pro vyloučení kontaminace vzorků genomickou DNA. Výsledky relativní exprese *HLA-DQA1* byly korigovány množstvím amplifikované DNA intronové oblasti *HLA-DQA1*. Dále byla do studie zařazena assay HLA-DQA1 total, která byla použita pro kvantifikaci celkové mRNA *HLA-DQA1* bez ohledu na přítomné alely. Pro každou assay byla určena amplifikační účinnost, která se pohybovala mezi 95-102 %.

### **Reverzní transkripce**

cDNA byla získána přepsáním RNA pomocí high capacity cDNA reverse transcription kitu (Applied Biosystems, USA).

Mix pro přepsání RNA do cDNA by připraven dle **tabulky 13**. K 10  $\mu$ l reakční směsi pro reverzní transkripci bylo přidáno maximálně 10  $\mu$ l RNA a objem doplněn do 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Dle teplotního programu v **tabulce 14** byla provedena reverzní transkripce 200 ng RNA.

**Tabulka 13.** Příprava master mixu pro reverzní transkripci

Reakční komponenta	Objem [ $\mu$ l]
10 x RT pufr	2
25 x dNTP mix (100 mM)	0,8
10 x RT náhodné primery	2
Multiscribe reverzní transkriptasa	1
dH <sub>2</sub> O	4,2
Celkový objem	10 $\mu$ l

**Tabulka 14.** Teplotní program pro reverzní transkripci

Reakční krok	Teplota [°C]	Čas [min]
Krok 1	25	10 min
Krok 2	37	120 min
Krok 3	85	5 min
Krok 4	4	$\infty$

### Kvantitativní PCR

Jednotlivé alely *HLA-DQA1* byly amplifikovány dle následujícího postupu. Do 96 jamkové destičky bylo na dno jamky nanášeno 5  $\mu$ l cDNA a k ní přidáno 7,5 ml reakční směsi obsahující přímý a zpětný primery (10  $\mu$ M), gene expression master mix (Applied Biosystems, USA) a sondu (5  $\mu$ M) – **tabulka 15**. Destička byla přelepena fólií a krátce stočena. Kvantifikace jednotlivých alel *HLA-DQA1* probíhala na přístroji 7500 SDS ABI prism dle následujícího teplotního programu (**tabulka 16**): 50°C 1 minutu a 95°C 10 minut, následovalo 40 cyklů při 95°C 15 sekund a při 60°C 1 minutu. Každý vzorek byl měřen v tripletovém uspořádání.

**Tabulka 15.** Reakční směs pro jednu reakci kvantitativního PCR

Reakční komponenta	Objem [ $\mu$ l]
Gene expression master mix	6,25
Přímý primer (10 $\mu$ M)	0,375
Zpětný primer (10 $\mu$ M)	0,375
Sonda (5 $\mu$ M)	0,5
cDNA	5,0
Celkový objem	12,5

**Tabulka 16.** Teplotní program pro amplifikaci alel genu *HLA-DQA1*

Reakční krok	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas	Počet opakování
Krok 1	50	2 min	
Krok 2	95	10 min	
Krok 3	95	15 s	40x
Krok 4	60	1 min	

### 3.3.7. Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení byl použit Graphpad prism (verze 5.02). Pro porovnání relativní exprese mezi alelami byl využit neparametrický Mann-Whitney test ( $\alpha=0.05$ ) a výsledná hodnota  $p$  byla korigována počtem porovnání ( $p_{kor.}=p_{nekor.}*10$ ). Rozdíly v DNA methylaci mezi monocyty a leukocyty z plné krve byly porovnány pomocí testu Kruskal-Wallis (s Dunnovým post-testem) s hladinou významnosti  $\alpha=0.1$ . Rozdíly mezi jednotlivými methylačními místy byly počítány pomocí Fisherovo exaktního testu ( $\alpha=0.05$ ) a korigovány počtem porovnání ( $p_{kor.}=p_{nekor.}*10$ ). Pro porovnání frekvencí haplotypů mezi T1D pacienty a kontrolami byl použit test chí kvadrát s Bonferroniho korekcí ( $p_{kor.}=p_{nekor.}*10$ ).

## 4. Výsledky

### 4.1. Charakteristika souboru pacientů

Diabetičtí pacienti byli diagnostikováni na základě obecně přijímaných kritérií pro diagnózu diabetu (52). Autoimunitní stav byl potvrzen nízkou hladinou C-peptidu nebo přítomností pozitivních protilátek proti insulinu, dekarboxylase kyseliny glutamové či ostrůvkovému antigenu IA-2. Kontrolní skupina byla specificky vybrána z kohorty přibližně 150 zdravých jedinců tak, aby co nejvíce odpovídala svým věkovým složením a zastoupením HLA kohortě diabetických pacientů. Kontroly nebyly testovány na přítomnost autoproti látek. Byli vybráni pouze zdraví jedinci, kteří na základě vlastního prohlášení uvedli, že nemají v rodině autoimunitní onemocnění a netrpí žádnými příznaky diabetu či jinými autoimunitními chorobami. Celkem bylo do studie zahrnuto 61 diabetických pacientů (45 mužů, 16 žen) a 39 zdravých kontrol (17 mužů, 22 žen). Charakteristiky obou kohort jsou shrnuty v **tabulce 17**.

**Tabulka 17.** Charakteristika obou studovaných kohort.

Skupina	T1D pacienti <sup>1</sup> (n = 61)	Zdravé kontroly <sup>2</sup> (n = 39)
Počet mužů / žen	45 / 16	17 / 22
Věk rozsah (medián a průměr)	21 – 70 (32,5 a 39,8)	20 – 77 (34,5 a 39,1)
Věk mužů rozsah (medián a průměr; SO)	21 – 70 (36,0 a 41,5; 14,8)	20 – 77 (40,0 a 40,1; 15,5)
Věk žen rozsah (medián a průměr; SO)	21 – 68 (31,0 a 33,9; 19,1)	25 – 75 (28,0 a 38,3; 17,8)
Trvání diabetu v letech rozsah (medián a průměr)	5 – 42 (14,0 a 15,2)	-

<sup>1</sup>Jedinci s hyperglykémií anebo přítomností alespoň jedné specifické autoproti látky pro T1D

<sup>2</sup>Jedinci bez zřejmých příznaků T1D a bez rodinného výskytu autoimunitního onemocnění

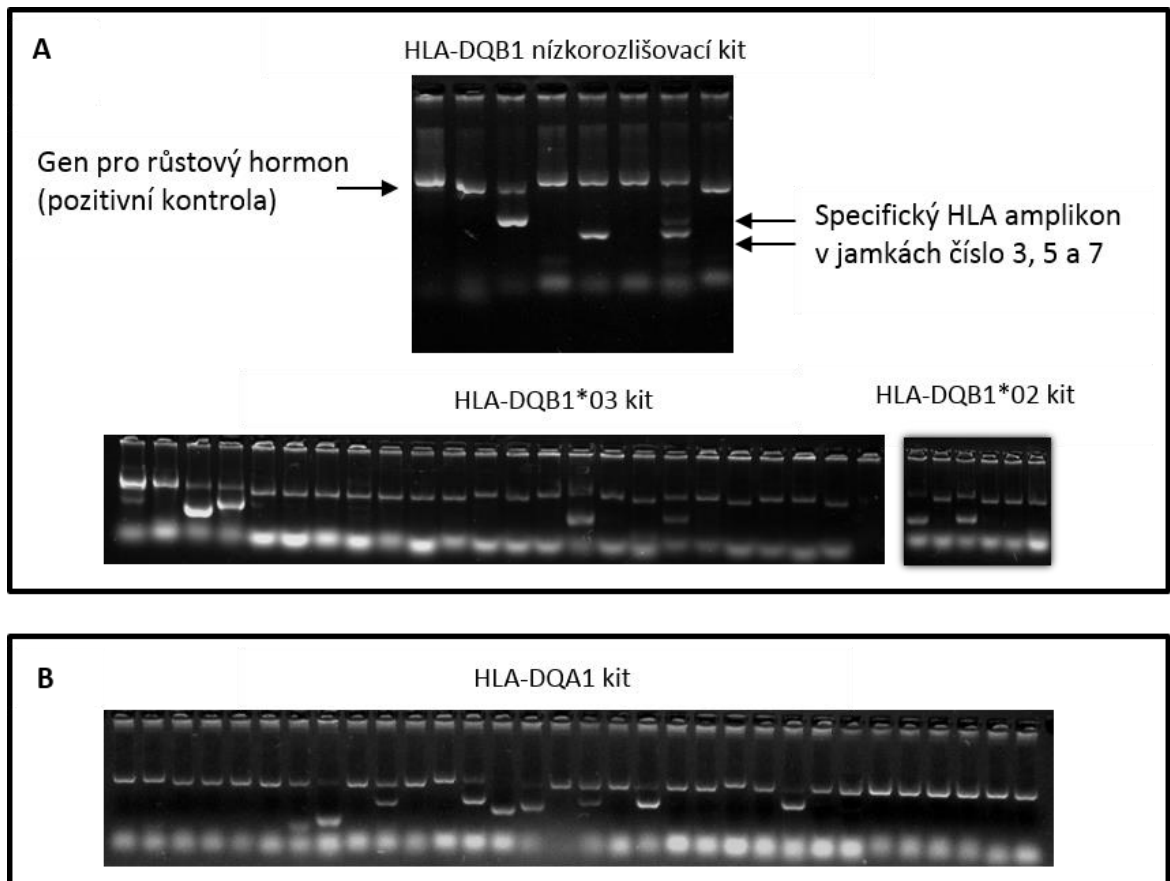
## 4.2. Charakterizace QAP alel

QAP alely byly identifikovány na základě sekvenčních rozdílů lokalizovaných v promotoru *HLA-DQA1*. Během studie se nám podařilo identifikovat celkem 11 QAP alel u zdravých kontrol a 10 QAP alel u diabetických pacientů, QAP alelu 1.3b (asociována s alelou *DQA1\*01:04*) jsme našli jen u zdravých kontrol. Alela *DQA1\*01:02* byla asociována s 3 různými QAP alelami 1.2K, 1.2L a 1.4, asociace závisela na konkrétním haplotypu. 1.2K byla asociována s haplotypem *DRB1\*16-DQA1\*01:02\*DQB1\*05:02*, QAP alela 1.2L s *DRB1\*15-DQA1\*01:02\*DQB1\*06:02* a QAP alela 1.4 s haplotypem *DRB1\*13-DQA1\*01:02\*DQB1\*06:04 (06:09)*.

## 4.3. HLA genotypizace

T1D pacienti a zdraví jedinci byli podrobeni nejprve HLA genotypizaci. *HLA-DQA1* a *HLA-DQB1* byly rozlišeny vysokorozlišovacími kity, zatímco *HLA-DRB1* byla analyzována pouze na úrovni nízkého rozlišení. **Obrázek 8** dokumentuje HLA genotypizaci u T1D pacienta, heterozygota s haplotypy *DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02* a *DRB1\*03-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01*. Rozlišení jednotlivých HLA alel nám dále umožnilo analyzovat mRNA expresi jednotlivých promotorů *HLA-DQA1* alel. Nejčastěji detekované haplotypy T1D pacientů, dle očekávání, byly haplotypy *DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02* a *DRB1\*03-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01*. U diabetických pacientů se nám podařilo zachytit 2 pacienty s T1D protektivním haplotypem *DRB1\*13-DQA1\*01:03-DQB1\*06:03*, u kterých se manifestoval diabetes až ve 40, respektive 41 letech.

Haplotypy zdravých kontrol byly vybrány tak, aby co nejvíce odpovídaly haplotypům diabetické kohorty. U zdravých kontrol se nám podařilo shromáždit hodně jedinců s haplotypem *DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02*, přesto byla frekvence tohoto haplotypu signifikantně vyšší než u zdravých kontrol ( $P_{\text{kor.}}=0.029$ ). Naopak haplotypy *DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02*, *DRB1\*11-DQA1\*05:05-DQB1\*03:01* byly zastoupeny ve větší míře u zdravých. **Tabulka 18** shrnuje jednotlivé zastoupení HLA haplotypů u obou kohort.



**Obrázek 8.** Elektroforetické záznamy genotypizace *HLA-DQA1* a *HLA-DQB1*, na jejichž základě byl určen HLA haplotyp pacienta. Amplikony v horních řadách jsou výsledkem amplifikace genu pro růstový hormon (pozitivní kontrola) a dávají vznik 2 PCR produktům o velikosti 430 a 515 párů bazí. Pod nimi jsou specifické HLA produkty různé velikosti. **A) Genotypizace *HLA-DQB1*.** Pomocí nízko-rozlišovacího kitu HLA-DQ low byly určeny alely *HLA-DQB1\*02* a *HLA-DQB1\*03*, pozitivní amplicony v jamkách č. 3, 5 a 7. Tyto *HLA-DQB1* alely byly následně podrobněji určeny s využitím vysokorozlišovacích HLA-DQB1 kitů, *HLA-DQB1\*03* a *HLA-DQB1\*02*. Na základě pozitivních ampliconů v jamkách č. 3, 4, 15 a 18 jsme identifikovali alelu *HLA-DQB1\*0302*. Alela *HLA-DQB1\*0201* byla identifikována pomocí specifických ampliconů v jamkách č. 1 a 3. **B) Genotypizace *HLA-DQA1*.** Specifické amplicony v jamkách č. 8, 10, 13, 14, 15, 17, 19 a 24 nám umožnily identifikovat u pacienta alely *HLA-DQA1\*03:01* a *HLA-DQA1\*05:01*.

**Tabulka 18.** *DRBI–QAP–DQAI–DQB1* haplotypy T1D pacientů a kontrol. Frekvence jednotlivých haplotypů diabetických pacientů a zdravých kontrol. Alela *DQAI\*01:02* byla asociována s 3 různými promotory 1.2K, 1.2L a 1.4, asociace závisela na konkrétním haplotypu. Haplotypy kontrol byly specificky vybrány z větší kohorty tak, aby co nejvíce odpovídaly haplotypům diabetiků. Celkově bylo do studie zařazeno 61 diabetických pacientů a 39 zdravých kontrol. Z toho od 18 diabetických pacientů se nám podařilo získat pouze methylační profil bez expresního profilu. Hodnota P byla vypočítána za využití testu chí kvadrát ( $\alpha=0.05$ ) s Bonferroniho korekcí ( $p_{kor.} = p_{nekor.} \cdot 10$ ).

<i>DRBI</i>	<i>QAP</i>	<i>DQAI</i>	<i>DQB1</i>	T1D pacienti f(%)	Zdravé kontroly f(%)	$P_{kor.}$
04	3.1	03:01, 03:03	03:02	37.70	17.95	0.029
03	4.1B	05:01	02:01	21.31	15.38	1.000
01	1.1	01:01	05:01	11.48	10.26	1.000
07	2.1	02:01	02:02	9.02	19.23	0.362
13	1.3	01:03	06:03	4.10	7.69	0.652
11	4.1A	05:05	03:01	4.10	10.26	0.849
16	1.2K	01:02	05:02	3.28	1.28	1.000
08	4.2	04:01	04:02	1.64	2.56	1.000
04	3.1	03:03	03:01	1.64	1.28	1.000
04	3.1	03:01	03:05	0.82	1.28	1.000
13	1.4	01:02	06:04	3.28	--	
10	1.3	01:05	05:01	1.64	--	
15	1.2L	01:02	06:02	--	5.13	
14	1.3b	01:04	05:03	--	5.13	
07	2.1	02:01	03:03	--	1.28	
13	1.4	01:02	06:09	--	1.28	

f = frekvence haplotypů

#### 4.4. Relativní exprese *HLA-DQAI*

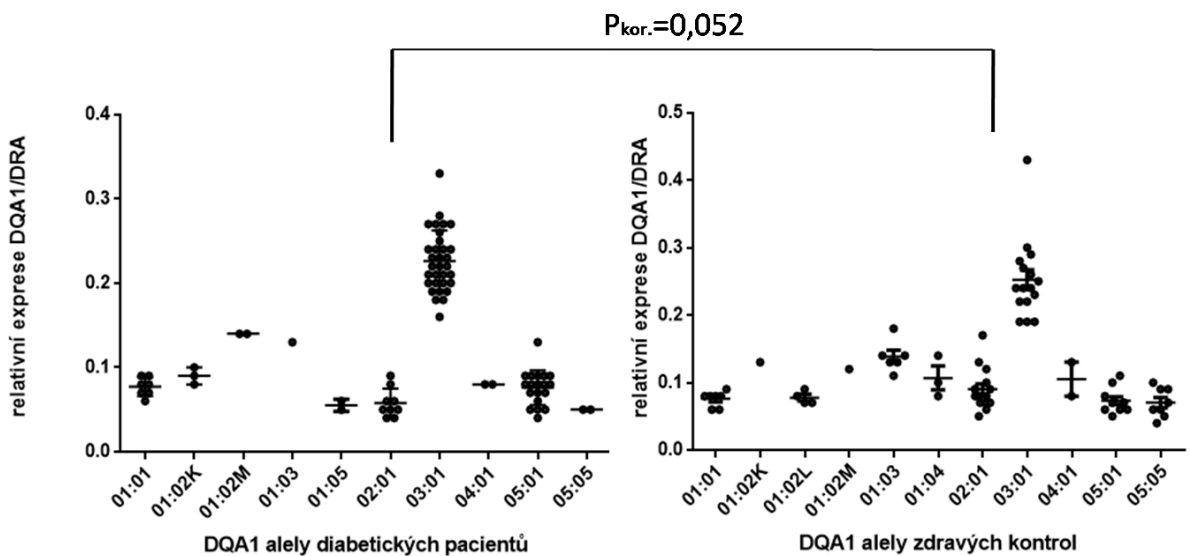
##### 4.4.1. Normalizace exprese *HLA-DQAI* oproti 2 endogenním kontrolám

Pro normalizaci relativní exprese *HLA-DQAI* alel jsme využili 2 endogenní kontroly *PPIA* (cyklofilin) a *HLA-DRA*. Gen *HLA-DRA* není polymorfní a je ve vazebné nerovnováze s ostatními HLA geny II. třídy. Navíc, jeho transkripce je kontrolována stejnými transkripčními faktory jako transkripce genu *HLA-DQAI*. Normalizace oproti *HLA-DRA* nám tedy umožňuje hodnotit geneticky determinovanou expresi *HLA-DQAI* bez ohledu na aktuální zdravotní stav jedince v době odběru (např. zánět, virová infekce, autoimunitní procesy). Druhá endogenní kontrola *PPIA* byla vybrána ze 4 endogenních kontrol a vykazovala nejstabilnější genovou expresi u zdravých a diabetiků.



#### 4.4.2. Relativní exprese *HLA-DQA1/HLA-DRA*

Analýza genové exprese na úrovni mRNA byla provedena u 43 diabetiků (36 heterozygotů, 6 homozygotů) a 39 kontrol (34 heterozygotů, 5 homozygotů). U obou studovaných kohort byla nejvíce exprimována alela *DQA1\*03* (graf 1) a naopak nejméně alela *DQA1\*05:05*. U diabetických pacientů byla alela *DQA1\*03* signifikantně více exprimována než alely *DQA1\*01:01*; *01:02K*; *02:01*; *03:01* a *05:01*. U zdravých kontrol byla alela *DQA1\*03* signifikantně více exprimována než alely *DQA1\*01:01*; *01:02L*; *01:03*; *01:04*; *02:01*; *03:01*; *05:01* a *05:05*. Vzhledem k tomu, že ke statistické analýze byl použit Mann-Whitneyho neparametrický test, který umožňuje statistické srovnání mezi 3 nebo více hodnotami, některé alely nemohly být mezi sebou vzájemně porovnány (T1D pacienti: *01:02M*, *01:03*, *01:05*, *04:01*, *05:05*; kontroly: *01:02K*, *01:02M*, *04:01*). Data dále ukazují relativně vysokou variabilitu v expresi alely *DQA1\*01*, kdy nejvíce se zdá být exprimována alela *01:02M* a *01:03* a nejméně pak alely *01:01* a *01:02L*. Ačkoliv statistická analýza neodhalila signifikantní rozdíl mezi expresí *DQA1* alel T1D pacientů a zdravých kontrol, rozdíl v expresi alely *DQA1\*0201* mezi pacienty a kontrolami byl na hraně statistické významnosti ( $P_{kor.}=0,052$ ).

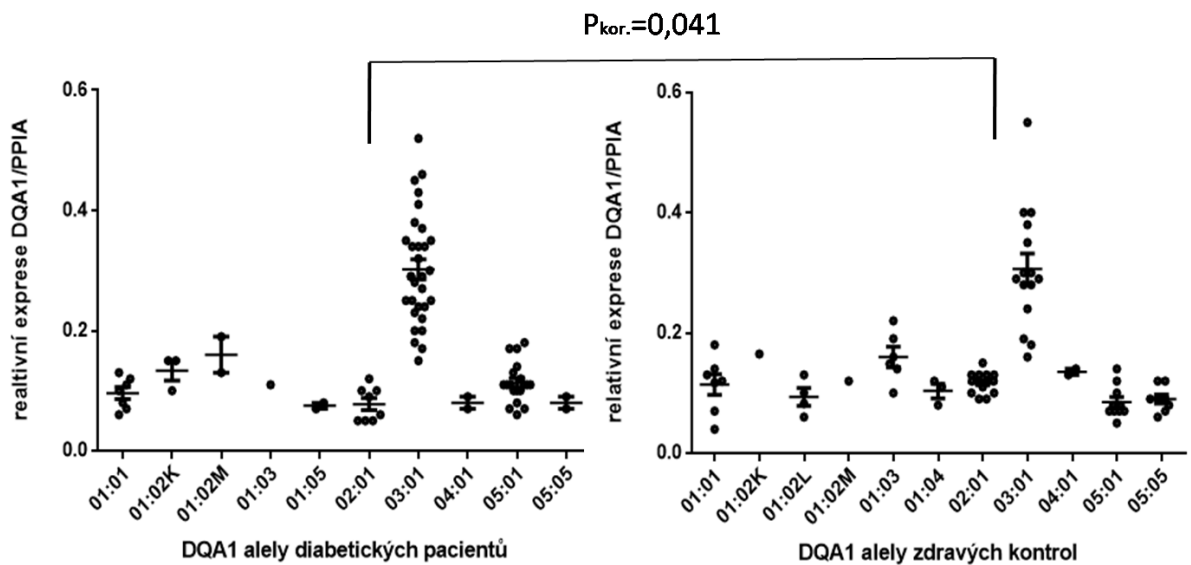


*01:02K*=*DQA1\*01:02* alela ve vazbě s QAP alelou 1.2K  
*01:02L*= *DQA1\*01:02* alela ve vazbě s QAP alelou 1.2L  
*01:02M*=*DQA1\*01:02* alela ve vazbě s QAP alelou 1.4

**Graf 1.** Relativní exprese *HLA-DQA1* alel vztažena k expresi *HLA-DRA*. Každý bod v grafu představuje normalizovanou hodnotu 1 alely od 1 jedince. V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty se směrodatnou chybou průměru.

#### 4.4.3. Relativní exprese *HLA-DQA1/PPIA*

Normalizace oproti druhé endogenní kontrole *PPIA* (**graf 2**) ukázala daleko větší variabilitu v expresi *HLA-DQA1* alel (zejména pro alely *DQA1\*03* a *DQA1\*01:01*) než normalizace oproti *HLA-DRA*. To hovoří ve prospěch naší hypotézy, že normalizace oproti *PPIA* může být ovlivněna aktuálním zdravotním stavem jedince. Statistická analýza odhalila signifikantně vyšší expresi alely *DQA1\*02:01* u zdravých kontrol ve srovnání s diabetickými pacienty ( $P_{\text{kor.}}=0,041$ ). Vyšší exprese alely *DQA1\*05:01* byla detekována u T1D pacientů, ale její signifikance byla ztracena po Bonferroniho korekci ( $P_{\text{kor.}}=0,34$ ).



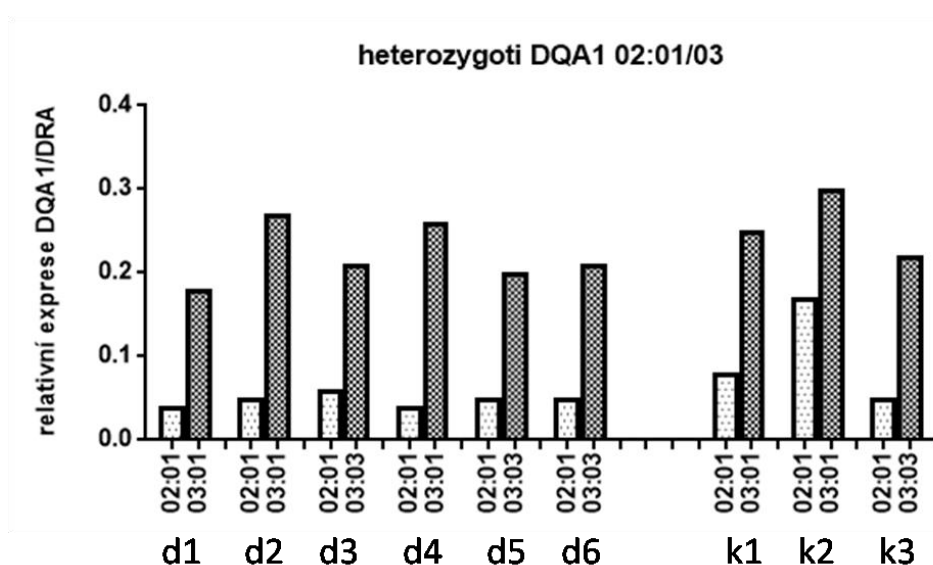
01:02K=*DQA1\*01:02* alela ve vazbě s *QAP* alelou 1.2K  
01:02L= *DQA1\*01:02* alela ve vazbě s *QAP* alelou 1.2L  
01:02M=*DQA1\*01:02* alela ve vazbě s *QAP* alelou 1.4

**Graf 2.** Relativní exprese *HLA-DQA1* alel vztažena k expresi *PPIA*. Každý bod v grafu představuje normalizovanou hodnotu 1 alely od 1 jedince. V grafu jsou znázorněny průměrné hodnoty se směrodatnou chybou průměru.

#### 4.4.4. Exprese alely *DQA1\*02:01* u heterozygotů *DQA1\*02:01/03*

Vzhledem k tomu, že jsme odhalili odlišnou míru exprese *DQA1\*02:01* mezi diabetickými pacienty a zdravými kontrolami, zajímalo nás, zda existují haplotypy, které by k tomuto rozdílu nejvíce přispívaly. Odhalili jsme, že vyšší expresi *DQA1\*02:01* alely můžeme najít zejména u heterozygotů *DQA1\*02:01/03*. **Graf 3** znázorňuje že, zatímco hladina mRNA alely *DQA1\*03* je u pacientů a kontrol stabilní, hladina mRNA *DQA1\*02:01* je u zdravých výrazně zvýšena (ne signifikantně  $p=0,190$ ). Dobře to dokumentují i hodnoty v **tabulce 19**, které ukazují poměr alel mezi stejnými haplotypy T1D pacientů a zdravých kontrol. V případě *DQA1\*02:01/03* heterozygotů byl u diabetických pacientů skoro

dvojnásobně vyšší poměr, tedy nižší exprese alely *DQA1\*02:01*, než u zdravých jedinců (4,87 pacienti; 2,96 kontroly).



**Graf 3.** Nerovnoměrná exprese alely *DQA1\*02:01*. Alela *DQA1\*02:01* je ve větší míře exprimována u zdravých jedinců, kteří mají jako druhou alelu *DQA1\*03*. Dva sloupce vedle sebe (jeden bílý a jeden šedivý) znázorňují relativní expresi jednoho jedince, buď T1D pacienta (d) nebo zdravé kontroly (k). Relativní exprese je normalizována oproti DRA.

**Tabulka 19.** V tabulce jsou uvedeny poměry mezi 2 alelami u *DQA1* heterozygotů a jejich srovnání mezi T1D pacienty a zdravými kontrolami. Uvedeny jsou pouze jedinci s nejméně s jedním společným haplotypem. P hodnoty byly počítány za pomoci Mann-Whitneyho neparametrického testu ( $\alpha=0.05$ ) s Bonferroniho korekcí ( $p_{kor.} = p_{nekor.} * 2$ ).

Kombinace DQA1 alel	Kombinace QAP alel	n	Průměr poměru alely 1/alely 2	Rozsah	SO
03:01, 01:01	3.1, 1.1	5d	3.01	2.51-3.71	0.47
03:01, 01:01	3.1, 1.1	3k	3.05	2.47-3.47	0.52
03:01, 01:02	3.1, 1.2K	1d	2.18	-	-
03:01, 01:02	3.1, 1.2K	4k	2.96	2.11-3.43	0.62
03:01, 05:05	3.1, 4.1A	1d	4.02	-	-
03:01, 05:05	3.1, 4.1A	3k	4.51	4.33-4.67	0.17
03:01, 01:03	3.1, 1.3	2d	2.02	1.90-2.13	0.16
03:01, 01:03	3.1, 1.3	2k	2.09	1.76-2.43	0.47
<b>03:01, 03:03; 02:01</b>	<b>3.1, 2.1</b>	<b>6d</b>	<b>4.87</b>	<b>3.45-6.68</b>	<b>1.19</b>
<b>03:01, 03:03; 02:01</b>	<b>3.1, 2.1</b>	<b>3k</b>	<b>2.96</b>	<b>1.72-4.16</b>	<b>1.22</b>
04:01, 02:01	4.2, 2.1	1d	1.06	-	-
04:01, 02:01	4.2, 2.1	2k	1.12	1.04-1.19	0.10

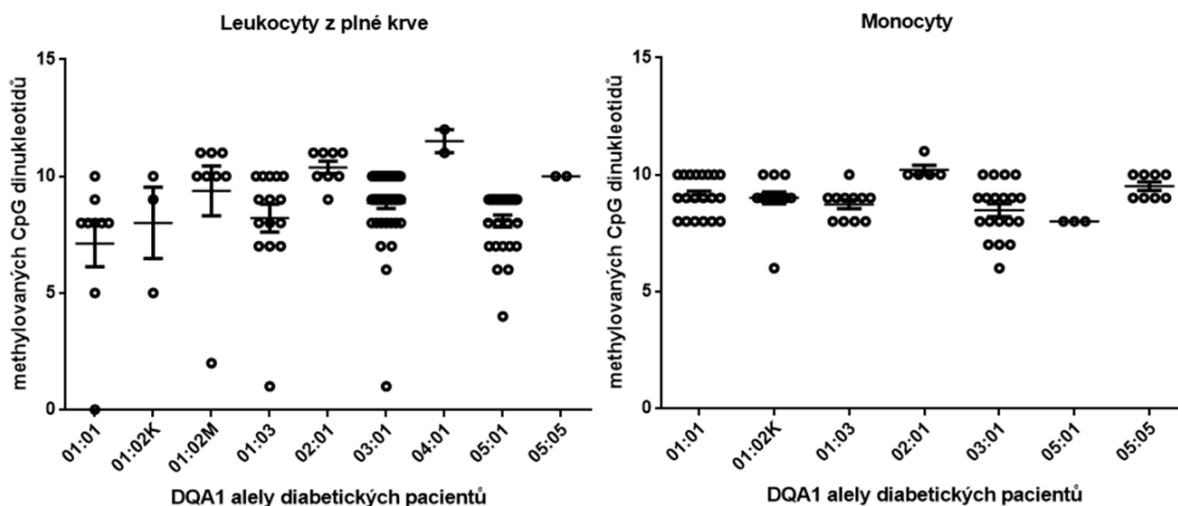
Kombinace DQA1 alel	Kombinace QAP alel	n	Průměr poměru alely 1/alely 2	Rozsah	SO
05:01, 01:02	4.1B, 1.4	2d	1.86	1.47-2.25	0.55
05:01, 01:02	4.1B, 1.4	1k	1.64	-	-
05:01, 02:01	4.1B, 2.1	2d	1.30	1.16-1.44	0.20
05:01, 02:01	4.1B, 2.1	3k	0.89	0.56-1.17	0.31

SO-směrodatná odchylka, d – diabetičtí pacienti, k – kontroly

## 4.5.DNA methylace *HLA-DQA1*

### 4.5.1. Celková methylace promotorového úseku *HLA-DQA1*

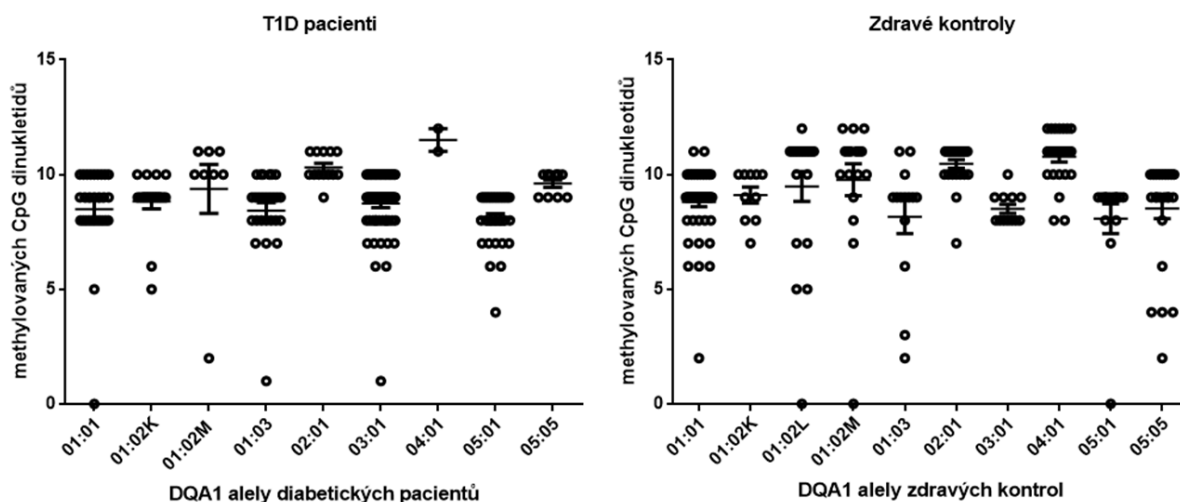
Vzhledem k tomu, že jsme našli statistický významný rozdíl v expresi alely *DQA1\*02:01*, zajímalo nás, zda rozdíl v expresi nemůže být způsoben odlišnou methylací *HLA-DQA1* alel. Po analýze exprese *HLA-DQA1* jsme se tedy zaměřili na DNA metylaci promotorového úseku tohoto genu. Zajímalo nás, zdali jednotlivá variabilita v expresi rizikových a protektivních alel souvisí s DNA methylací promotorového úseku *HLA-DQA1*. Z tohoto důvodu jsme provedli bisulfitové sekvenování, a to DNA z CD14+ monocytů a DNA z plné krve diabetiků a zdravých kontrol. Jelikož jsme po použití Kruskal-Wallis testu nenalezli statisticky významný rozdíl mezi DNA methylací CD14+ monocytů a plné krve (**graf 4**), rozhodli jsme se skupinu sekvencí z plné krve a z monocytů T1D pacientů spojit dohromady a porovnat je oproti methylačnímu profilu zdravých kontrol. Když jsme se zaměřili na jednotlivé methylační místa DNA z monocytů a z plné krve, našli jsme jedno methylační místo, které se v methylaci lišilo ( $P_{kor}=0,020$ ). Zatímco methylační pozice -311 alely *01:02M* nebyla u monocytů methylována, u leukocytů z plné krve bylo toto CpG místo methylováno ze 70 %. U monocytů ovšem pocházeli sekvence alely *01:02M* pouze od 1 člověka, rozhodli jsme se proto, tyto sekvence z další analýzy vyřadit.



01:02K=*DQA1*\*01:02 alela ve vazbě s *QAP* alelou 1.2K  
 01:02M=*DQA1*\*01:02 alela ve vazbě s *QAP* alelou 1.4

**Graf 4.** Porovnání methylačního profilu leukocytů a monocytů u diabetiků. Každý bod v grafu znázorňuje počet methylovaných míst získaných z jedné sekvence monocytů nebo leukocytů. V grafu jsou znázorněny hodnoty průměru se směrodatnou chybou průměru. Nejvíce methylované alely byly alely *DQA1*\*0201 a *DQA1*\*0401. Mezi methylací monocytů a leukocytů nebyl nalezen statisticky významný rozdíl (Kruskal-Wallis test s Dunnovým post testem s  $\alpha=0,1$ ), a proto byly sekvence obou buněčných typů spojeny dohromady.

Podařilo se nám celkově shromáždit a porovnat 202 sekvencí od diabetických pacientů a 216 sekvencí od zdravých kontrol. Celkem jsme zachytili 9 alelických *HLA-DQA1* variant od diabetických pacientů a 10 alelických *HLA-DQA1* variant od kontrol. Přestože jsme nasbírali velké množství diabetiků, nepodařilo se nám zachytit methylační profil T1D protektivní alely *DQA1*\*01:02 (ve vazbě s promotorem 01:02L). Respektive, jednoho T1D pacienta s protektivním haplotypem *DR*\*15-*DQA1*\*01:02-*DQB1*\*06:02 jsme detekovali, ale ten byl později ze studie vyřazen z důvodu výskytu nádorového onemocnění. I přesto byl jeho methylační profil podobný profilu zdravých. Mezi nejvíce methylované alely patřily alely *DQA1*\*04:01 a *DQA1*\*02:01. Naopak mezi nejméně methylované alely patřily alely *DQA1*\*05:01 a *DQA1*\*01:03. Bohužel rozdíl v celkové methylaci mezi T1D pacienty a kontrolami, který by vysvětlil rozdíl v expresi *DQA1*\*02:01, jsme nenalezli (**graf 5**). Ani methylační stav ostatních *HLA-DQA1* alel nekoreloval s výsledky relativní exprese. V některých případech se nám podařilo zachytit sekvence, které byly methylovány na velice nízké úrovni či vůbec. Proto jsme se dále soustředili na jednotlivé methylační CpG místa a na možnou spojitost mezi nimi a relativní expresí *HLA-DQA1*.



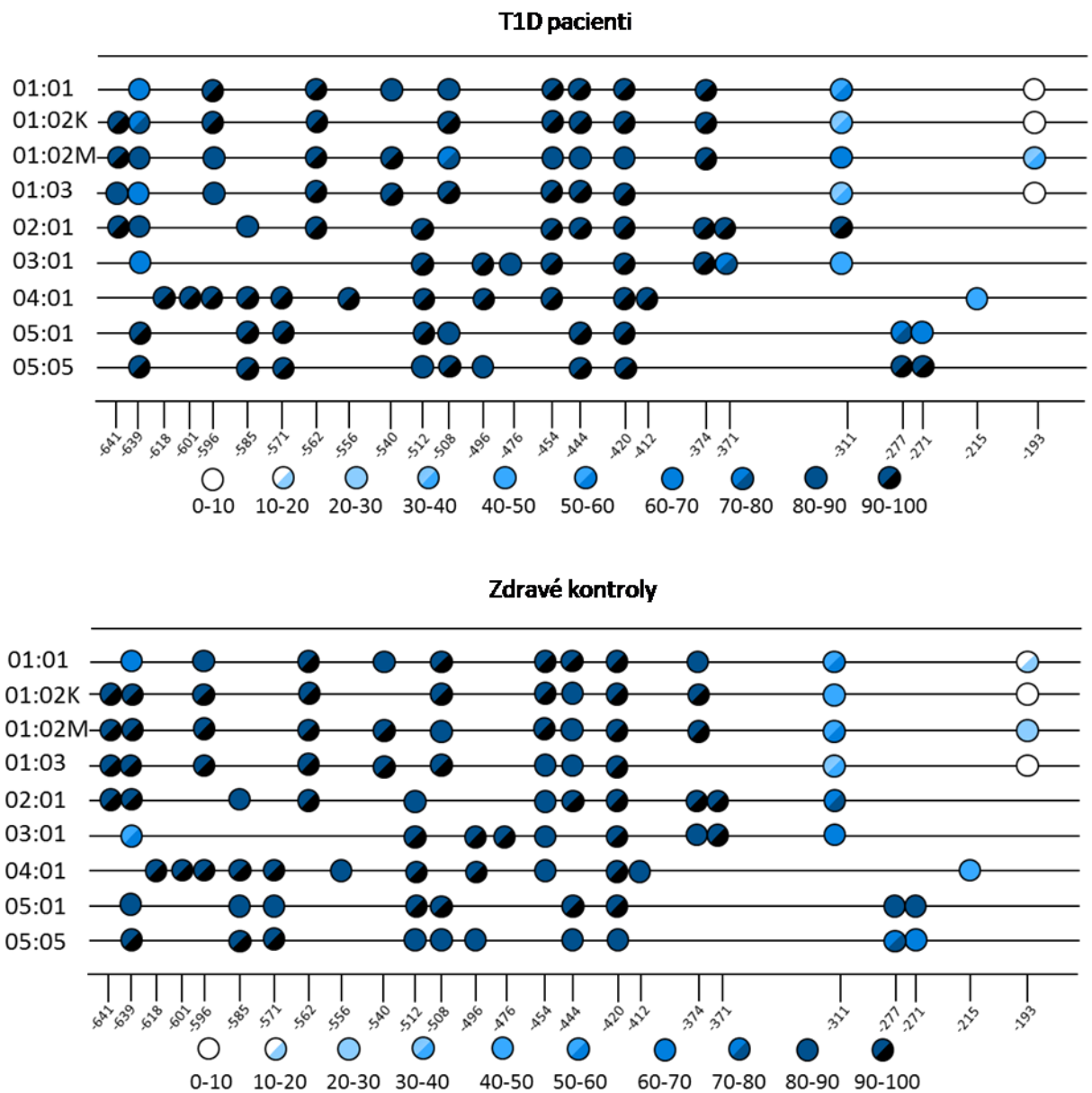
01:02K=*DQA1*\*01:02 alela ve vazbě s *QAP* alelou 1.2K  
 01:02L=*DQA1*\*01:02 alela ve vazbě s *QAP* alelou 1.2L  
 01:02M=*DQA1*\*01:02 alela ve vazbě s *QAP* alelou 1.4

**Graf 5.** Porovnání celkové methylace mezi diabetickými pacienty a zdravými kontrolami. Každý bod v grafu znázorňuje počet methylovaných míst odečtených z jedné sekvence diabetika nebo kontroly. V grafu jsou znázorněny hodnoty průměru se směrodatnou chybou průměru. Pro porovnání methylačních rozdílů byl využit Mann-Whitneyho neparametrický test, který neodhalil signifikantní rozdíly.

#### 4.5.2. Methylační profil jednotlivých CpG dinukleotidů

Protože jsme používali velice technicky náročnou metodiku klonování, byli jsme schopni odečíst i jednotlivá CpG methylační místa u každé sekvence. Počet methylačních míst se u jednotlivých alel lišil. Nejvíce methylačních míst bylo nalezeno u alely *DQA1*\*04:01, celkem 12. Ostatní *HLA-DQA1* alely obsahovaly mezi 9-11 methylačními místy (**graf 6**). Zatímco CpG dinukleotidy v oblasti -641 až -374 byly skoro kompletně methylovány, methylace se snižovala, čím více jsme se blížili k místu pro iniciaci transkripce. Na nukleotidové pozici -193 byla již hladina methylace velice nízká. Tento trend byl shodný jak u T1D pacientů, tak i zdravých kontrol. Největší rozdíly v methylaci mezi oběma kohortami jsme našli na pozicích -311, -277 a -271, ale nebyly signifikantní. Je zajímavé, že alela *DQA1*\*02:01 má místo -311 více methylováno (78 % u kontrol, 93 % u diabetiků) oproti ostatním alelám, kde se methylace pohybovala mezi 33-63 % (33-63 % u kontrol, 37-55 % u diabetiků). Je tedy možné, že methylace tohoto místa může souviset s nízkou hladinou exprese alely *DQA1*\*02:01. Pokud jsme se však pokusili najít vztah mezi relativní expresí alely *DQA1*\*02:01 a methylací na pozici -311 u jednotlivých sekvencí pacientů a kontrol, nenašli jsme jasnou souvislost. Zaměřili jsme se dále také na srovnání methylace T1D rizikových a protektivních alel. Nepozorovali jsme ale rozdíly v methylaci ani pro haplotypy

protektivní *DR\*13-DQA1\*01:03-DQB1\*06:03*, ani rizikové *DR\*04-DQA1\*03-DQB1\*03:02*,  
*DR\*03-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01*.



**Graf 6.** Methylační profil zdravých kontrol a diabetických pacientů. V grafu je zobrazen methylační profil promotorové oblasti genu *HLA-DQA1*. Počet methylačních míst se liší v závislosti na typu *HLA-DQA1* alely. Každé methylační místo je v grafu označeno číslicí, která uvádí pozici methylačního místa vzhledem k místu pro iniciaci transkripce. Jednotlivá kolečka dokumentují procentuální metylaci jednotlivých methylačních míst. Čím více je kolečko modré, tím více je dané místo metylováno (v %). Do studie byly zahrnuty pouze sekvence, u kterých byla úspěšnost bisulfitové konverze vyšší než 95 %.

## 5. Diskuze

### 5.1. Kvantitativní PCR a bisulfitové sekvenování

Kvantitativní PCR je běžná experimentální metoda pro stanovení hladiny transkriptu mRNA. My jsme v této práci využili metodiku publikovanou skupinou Fernandez et al., kteří kromě standardních kvantifikací *HLA-DQA1* alel, obohatili stanovení o 2 další assaye (*HLA-DQA1* intron, *HLA-DQA1* total) (122). Protože všechny primery a sondy použité pro kvantitativní PCR byly navrženy do promotorové oblasti *HLA-DQA1*, nebyla možnost rozlišit kvantifikaci DNA od cDNA. Z tohoto důvodu byla přidána do experimentu assay *HLA-DQA1* intron, která nám umožnila kvantifikovat genomickou kontaminaci. Přestože byla genomická kontaminace brána v úvahu při kvantifikaci relativní exprese, její vliv na výslednou expresi *HLA-DQA1* byl v naší práci minimální (pohybovala se kolem 3%). Další assay, která byla přidána, byla assay *HLA-DQA1* total, která měřila celkovou expresi *HLA-DQA1* (obou alel *HLA-DQA1* u každého pacienta). Zároveň jsme ovšem u každého pacienta změřili expresi každé alely zvlášť. Poté co jsme sečetli exprese jednotlivých alel u každého jedince, očekávali jsme teoretickou hodnotu blízkou se expresi *HLA-DQA1* total (tedy hodnotu blízkou 1). Bohužel to se nám v některých případech i při opakovaném měření nepodařilo, a proto byly brány v úvahu pouze hodnoty relativní exprese, které se vešly do intervalu 0,85-1,15. Problém byl pravděpodobně způsoben částečnou degradací RNA, protože ani opětovným přepsáním RNA do cDNA se nám kvantifikovat expresi u těchto pacientů nepodařilo. Přes pečlivé navržení primerů a sond nemůžeme u pacientů vyloučit určitou genetickou variabilitu, která by měla za následek nedokonalou vazbu primerů a sond a ovlivňovala by tím účinnost amplifikace.

Klíčovou metodou využitou v této práci bylo bisulfitové sekvenování, které nám umožnilo detekovat DNA metylaci promotorového úseku *HLA-DQA1*. Výhodou této techniky byla cenová nenáročnost a možnost detailního zmapování DNA methylace cílového úseku. Na druhou stranu byla její nevýhoda ve velké časové náročnosti, protože vyžadovala klonování amplikonu do bakterií a jejich následnou selekci. Metoda bisulfitového sekvenování nám také neumožňovala detekovat deriváty 5-methylcytosinu, které vznikají jako meziprodukty při demethylaci. Tyto deriváty 5-hydroxymethylcytosin, 5-formylcytosin a 5-carboxylcytosin, jsou však přítomny v tkáních na velice nízké úrovni (výjimku tvoří mozek, kde hydroxymethylcytosin tvoří 1 %) (19, 30). Protože je tato metoda závislá na úspěšnosti bisulfitové konverze DNA, museli jsme vzít v úvahu, že úspěšnost konverze



nemusí být 100%. Při bisulfitové konverzi jsou převedeny všechny nemetylované cytosiny na uracily, které jsou následně při PCR amplifikaci nahrazeny thyminem. Úspěšnost bisulfitové konverze jsme odhadli tak, že jsme spočítali v sekvenci počet bazí C, nacházejících se mimo CpG dinukleotidy. Do studie jsme zařadili pouze sekvence, u nichž byla účinnost bisulfitové konverze větší než 95 %. Tím jsme se vyvarovali riziku, že bychom odečetli falešně pozitivně metylovaný CpG dinukleotid.

## 5.2. Relativní exprese *HLA-DQA1*

Expres *HLA-DQA1* alel u zdravých jedinců a diabetických pacientů byla doposud podrobně charakterizována pouze v několika studiích. Prvotní studie před více než 15 lety ukázaly vyšší expresi alely *DQA1\*03* u heterozygotů *DQA1\*03/DQA1\*05:01* (126, 127). V roce 2003 byla publikována práce Fernandez et al., která oproti ostatním popsala nejvyšší expresi alely *DQA1\*04* (122). Odlišnosti mezi studiemi mohou být vysvětleny odlišným postupem při izolaci RNA, analýzou odlišných buněčných typů, anebo jiným metodickým přístupem. Doposud nejpodrobnější práce zabývající se expresí *HLA-DQA1* alel je od Britten et. al a byla zaměřena nejenom na expresi jednotlivých alel, ale také v ní byly provedeny luciferázové assaye, které detekovaly promotorovou aktivitu jednotlivých alel *HLA-DQA1*. Pro měření promotorové aktivity alel *DQA1\*01:02*, *DQA1\*03:01*, *DQA1\*05:01* autoři využili dvou fragmentů *HLA-DQA1*: kratší úsek, tzv. proximální promotor *HLA-DQA1* (260 bazí), a delší fragment, který obsahoval proximální promotor + polymorfní oblast lokalizovanou před promotorem (z angl. upstream region, délka 700 bází). Výsledky luciferázových assayí ukázaly, že *DQA1\*03:01* má silnější promotor, jak v případě krátkého fragmentu, tak i u delšího fragmentu, než je u *DQA1\*01:02* a *DQA1\*05:01* (128). V naší studii jsme našli, podobně jako v ostatních studiích, nejvyšší expresi u alely *DQA1\*03* a nejnižší expresi u alely *DQA1\*05:05* u obou zkoumaných skupin. Alela *DQA1\*03* měla až 5x vyšší expresi (oproti alele *DQA1\*05:05*) než ostatní alely. Nejvíce variabilní exprese byla nalezena pro skupinu alel *DQA1\*01*, kde exprese závisela na jednotlivých promotorech QAP. Je otázkou, jaký je genetický základ pro tak vysokou expresi rizikové alely a kterými faktory je ovlivněna variabilita exprese mezi jednotlivými skupinami alel. Před více než 20 lety ukázala práce od Morzycka-Wroblewska et al., že příčinou může být polymorfismus v promotorové oblasti (konkrétně boxy X a Y). Cílená mutace v této oblasti vedla ke změně exprese alel *DQA1\*03:01* a *DQA1\*05:01* (116). Další možností je lokalizace polymorfismů mimo promotorovou oblast *HLA-DQA1*. Swanberg et al. identifikovali polymorfismus v genu pro *MHC2TA* (168A→G), který je asociován s nízkou expresí HLA genů II. třídy a se

zvýšenou náchylností k autoimunitním chorobám, jako je revmatoidní artritida a roztroušená skleróza. V souvislosti s tímto pozorováním byla předložena hypotéza, že autoimunita by mohla být způsobena nízkou expresí HLA genů II. třídy, která by vedla k méně efektivní prezentaci autoantigenů regulačním T lymfocytům (129). Variabilita exprese by mohla být způsobena i odlišnou DNA methylací promotorového úseku nebo jiných regulačních oblastí kontrolujících expresi HLA genů II. třídy. Jak již bylo zmíněno v úvodu, SXY modul není přítomen jen v promotorové oblasti, ale je lokalizován napříč lokusem HLA genů II. třídy a funguje jako enhancer kontrolující expresi HLA genů II. třídy ze vzdálených pozic (114). Je možné, že za rozdíly v expresi mezi jednotlivými alelami jsou zodpovědné právě tyto vzdálené regulační oblasti. Kontrola exprese HLA genů se ale ještě více zkomplikovala, když v roce 2006 byla identifikována regulační oblast (tzv. izolátor), která reguluje interakci mezi enhancerem a promotorem (130), což dále rozvedu v kapitole DNA methylace.

Přestože jsme v naší studii nenalezli rozdíly v expresi u T1D protektivních a rizikových alel, zajímavý byl nálezný, že zdraví jedinci, oproti T1D pacientům, měli signifikantně zvýšenou expresi alely *DQA1\*02:01*. Tato alela je součástí haplotypu *HLA-DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02*, který není ani protektivní ani rizikový pro T1D. Je to vůbec poprvé, kdy byl detekován statisticky významný rozdíl v expresi této alely u diabetiků. Tyto rozdíly v expresi byly nejvíce patrné u heterozygotů *DQA1\*02:01/03*. Když jsme vypočítali poměr exprese mezi alelami *DQA1\*02:01* a *DQA1\*03*, u zdravých kontrol byl skoro 2x menší než u T1D pacientů. Velice podobné hodnoty byly pozorovány v práci Donnera, ale stejně jako v našem případě, rozdíly nebyly prokazatelně signifikantní kvůli malému množství jedinců (127). Vzhledem k tomu, že byla analýza exprese provedena z plné krve, bylo by dále zajímavé se podívat na relativní expresi u jednotlivých typů buněk (např. CD14+ monocyty) a analyzovat expresi ostatních alel, které jsou součástí haplotypu, alely *HLA-DRB1\*07* a *DQB1\*02:02*. Zůstává otázkou, zdali změny v expresi alely *DQA1\*02:01* ovlivňují riziko pro vznik onemocnění a nejsou jen sekundárním projevem některých polymorfismů nebo epigenetických regulací v jiných genech. Existují 2 možnosti, jak by mohla zvýšená exprese *DQA1\*02:01* u zdravých kontrol hrát roli v etiopatogenezi choroby: 1) Je možné, že vyšší exprese alely *DQA1\*02:01* by mohla mít u heterozygotů s druhou rizikovou alelou *DQA1\*03* protektivní účinek a ovlivnit ustanovení centrální a periferní tolerance. Zvyšovala by tak účinnost delece autoreaktivních T lymfocytů a bránila by jejich expanzi. Naopak její snížení by pak zvýšilo antigenicitu druhé rizikové alely *DQA1\*03* a umožnilo by rozvoj autoimunity. 2) Zvýšená exprese *DQA1\*02:01* by také mohla zasáhnout do spektra cytokinů produkovaných T lymfocyty a tak potenciálně modulovat odpověď

imunitního systému. Bylo ukázáno, že množství komplexu HLA-peptid na buněčném povrchu ovlivňuje produkci cytokinů IL-4 a IFN $\gamma$ , což následně může nasměrovat imunitní reakci ve prospěch Th1 nebo Th2 odpovědi (131). Je známo, že Th1 odpověď je spojována s rozvojem T1D (111).

Podařilo se nám také analyzovat expresi u dvou diabetických pacientů, kteří měli jeden protektivní *DRB1\*13-DQA1\*01:03-DQB1\*06:03* a jeden rizikový *DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02* haplotyp. Protektivita haplotypu *DRB1\*13-DQA1\*01:03-DQB1\*06:03* se ztrácí v případě, že je v kombinaci s rizikovým haplotypem *DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:02* (132). Ve shodě s tímto faktem se u obou T1D pacientů rozvinula autoimunita, ale až v relativně pozdním věku (kolem 40 roku života). Jinak jsme u těchto pacientů, ve srovnání se zdravými, nenalezli žádnou odlišnost, ani v metylaci, ani v expresi.

### 5.3.Methylace *HLA-DQA1*

DNA methylace je jedním z epigenetických mechanismů, který umožňuje buňce regulovat expresi genů. Doposud bylo popsáno několik procesů, které mohou ovlivňovat DNA metylaci. Mezi ně patří stres, strava, toxicita prostředí, či věk jedince(133-135). Jako základní experimentální model pro zkoumání transgeneračního přenosu DNA methylace se uvádí myší model Agouti. Gen Agouti odpovídá za tvorbu žlutého pigmentu pheomelaninu z černého pigmentu eumelaninu v myší srsti. Pokud se před tímto genem nachází na chromosomu nestabilní retrotransposon, je tento element nepravidelně metylován a exprese genu Agouti může být řízena ektopicky z promotoru retroelementu. Tmavý fenotyp se nazývá agouti a odpovídá přirozené expresi genu Agouti, tedy stejně jako s epigeneticky umlčeným retroelementem. Jelikož se methylační záznam vytváří v průběhu těhotenství matky, o barvě chloupků myší budoucí generace rozhoduje výživa matky. Pokud je strava dostatečně bohatá na potenciální zdroj metylových skupin, je účinnost nastavení methylační inaktivace vysoká, promotor retroelementu je vypnut a gen Agouti je exprimován výhradně ze svého přirozeného promotoru: výsledkem je tmavé zbarvení srsti. Důležité je, že změna v DNA metylaci byla trvalá a přenesena na další generace (136). Velice podobný efekt byl pozorován i u lidí, kde jedinci, kteří byli před narozením vystaveni nedostatku výživy v průběhu 2. světové války z důvodu německé blokády Holandska, měli méně metylovaný imprintovaný gen *IGF2* (z angl. insulin growth factor), zapojený do anabolických a růstových procesů, a nastavený tak „šetřící fenotyp“ (137).

U autoimunitního diabetu je riziko rozvoje T1D u potomka 2x větší, pokud je nemocný otec než, když je nemocná matka. Dalo by se tedy předpokládat, že zde bude hrát významnou

roli genomický imprinting z otcovy strany. Doposud však byly nalezeny imprintované oblasti převážně pro diabetes 2. typu, pro diabetes 1. typu byl popsán pouze 1 lokus (138). Není tak dosud úplně známo, čím je zvýšené riziko diabetu způsobeno. Je pravděpodobné, že s rozvojem nových technologií a s rostoucím počtem GWAS studií se podaří u diabetu další oblasti imprintingu odhalit. U autoimunitního diabetu se také uvažuje o možnosti, že strava, stres, životní styl a další vlivy prostředí mají vliv na matku v průběhu těhotenství a ovlivňují před narozením DNA metylaci u potomka. Obdobně bylo zjištěno, že kouření v průběhu těhotenství ovlivňuje methylační status některých genů jejich potomků (139, 140).

V této práci jsme se zaměřili na změny v epigenetických modifikacích u predispozičního genu *HLA-DQA1* a snažili se najít rozdíly v DNA metylaci promotorového úseku tohoto genu, které by nám pomohly vysvětlit rozdíly v expresi jednotlivých alel *HLA-DQA1*. Protože se úroveň DNA methylace ale i HLA exprese obecně mění s věkem jedince, vybrali jsme skupiny diabetiků a kontrol shodné věkovým složením (141-143). DNA methylace se také liší napříč různými buněčnými typy (144), a proto jsme se rozhodli u diabetických pacientů porovnat methylační profily leukocytů a monocytů. Nepodařilo se nám prokázat, že se DNA methylace výrazně liší mezi leukocyty z plné krve a CD14+ monocyty. Z toho důvodu jsme sekvence od obou buněčných typů spojili dohromady a porovnali je oproti kontrolám. Mezi oběma skupinami jsme neodhalili žádné statisticky významné rozdíly v celkové metylaci *HLA-DQA1* alel, nenašli jsme ani jasnou závislost mezi metylací a expresí alel. Vysoce methylované alely *DQA1\*05:05* a *DQA1\*02:01* vykazovaly nízkou expresí. To ale neplatilo pro nejvíce exprimovanou alelu *DQA1\*03*, jejíž exprese byla nepřímo úměrná jejímu methylačnímu stavu.

Exprese genu nemusí být závislá na celkové metylaci, ale může také souviset pouze s jediným methylačním místem (79). Zaměřili jsme se proto dále na jednotlivé CpG dinukleotidy promotoru. Jednotlivé alely se lišily nejenom v rozložení CpG dinukleotidů, ale také v jejich počtu. Nejvíce methylačních míst bylo nalezeno u alely *DQA1\*04:01* (celkem 12).

Zatímco oblast mezi -641 až -371 byla skoro úplně methylována u všech alel, čím více se blížilo místo iniciace transkripce (TSS), tím více klesala methylace jednotlivých CpG dinukleotidů. U obou studovaných skupin byl však methylační profil genu *HLA-DQA1* velice podobný. Nejvíce variabilní methylační místa byla detekována na pozici -311 (alely *DQA1\*01:01*, *01:02K*, *01:02M*, *01:03*, *02:01*, *03:01*) a na pozici -277, -271 (alely *DQA1\*05:01*, *05:05*). Zajímavé je, že alela *DQA1\*02:01* byla na pozici -311 methylována u zdravých kontrol pouze ze 78 %, ale u T1D pacientů až z 93 %. Všechna popsaná

methylační místa jsou lokalizovaná mimo SXY modul (X1, X2, Y, W boxy), až na alelu *DQA1\*04:01*, která má jedno methylační místo ve W boxu (-215 před TSS). Není tedy pravděpodobné, že by DNA methylace bránila přímo ve vazbě transkripčního faktoru, ale transkripční faktory mohou být ovlivněny nepřímo pomocí vazebného proteinu, který se váže mimo X1, X2, Y a W boxy. In vitro bylo ukázáno, že preference proteinů rozpoznávajících 5-methylcytosin nezávisí jen na methylačním stavu CpG dinukleotidu, ale závisí také na sekvenci, která methylační místo obklopuje. Ve výsledku by tak odlišná alelicky specifická promotorová sekvence genu *HLA-DQA1* mohla vést k odlišné afinitě CpG vazebných proteinů, a to i v případě, že jednotlivé alelicky specifické varianty promotoru jsou methylovány na stejné úrovni (145, 146). Naše pozorování je v souladu s ostatními pracemi, ve kterých nebyl doposud pozorován signifikantní rozdíl v DNA methylaci genu *HLA-DQA1*. Některé práce však u diabetu detekovaly změny v DNA methylaci u jiných HLA genů a pak zejména u genu pro insulin. Kuroda et al. popsali závislost mezi DNA methylací promotorového úseku genu pro insulin (*INS*) a jeho expresí (79). Změny v DNA methylaci pak byly potvrzeny několika dalšími studiemi. V promotoru genu *INS* byly objeveny 3 specifické CpG dinukleotidy, které u diabetiků byly, oproti zdravým kontrolám, methylovány ve snížené míře (78). Stefan et al. pozorovali mezi T1D diskordantními monozygotními dvojčaty nejen rozdíly v methylaci genu *INS*, ale detekovali rozdíly v methylaci HLA genů: *HLA-DO* a *HLA-DQA2* byly hypermethylované a *HLA-E* byl hypomethylován (76). Methylační změny v HLA genech II. třídy potvrdila práce od skupiny Rakyán et al., ve které bylo identifikováno 132 variabilních methylačních míst v různých genech, včetně genů *HLA-DQB1* a *RFXAP* (kóduje protein vázající se do boxu X1 a podílející se na regulaci exprese HLA genů II. třídy) (77).

Majumder et al. u nádorových buněk prokázali, že hypermethylace promotorové oblasti genů *HLA-DQA1* a *HLA-DQB1* utlumuje jejich expresi tím, že brání vazbě RFX a CIITA. Inhibice methyltransferas obnovila vazbu obou faktorů a zvýšila expresi obou genů (147). Ve shodě s tímto pozorováním naše výsledky naznačují, že klíčovým regulačním místem by mohla být relativně málo methylovaná oblast před TSS (pozice -311, -277 a -193).

Velice zajímavým nálezem je objev regulační sekvence XL-9d mezi oblastmi *HLA-DR* a *HLA-DQ* (geny *HLA-DRB1* a *HLA-DQA1*), která váže izolátorový protein CTCF (130). Funkce tohoto proteinu spočívá v blokaci interakcí mezi promotorem a enhancerem. Vazba proteinu CTCF byla popsána do oblastí imprintovaných genů, jako jsou geny *H19/IGF2*, kde reguluje jejich jednoalelickou expresi. Jeho vazba na cílovou sekvenci DNA je navíc ovlivněna methylačním stavem DNA. Nabízí se tedy otázka, zdali regulační oblast XL-9d v HLA lokusu není regulována podobným způsobem jako u imprintovaných genů.

Souhrnem, naše studie a řada dalších prací podtrhují důležitost detekce epigenetických modifikací u autoimunitních chorob a ukazují, že do budoucna tento výzkum skýtá možnosti pro jejich využití v prevenci, diagnostice a terapii.

## 6. Závěr

Za posledních 30 letech byl učiněn obrovský pokrok ve výzkumu autoimunitního diabetu. V poslední době se ukazuje, že pro rozvoj diabetu jsou kromě genetických faktorů důležité také epigenetické faktory. Ty mohou regulovat expresi genů a mohou být ovlivněny velkým množstvím faktorů, jako je stres, strava, věk a další. Pozornost se proto stále více zaměřuje na DNA metylaci, histonové modifikace a exprese miRNA u diabetických pacientů. Tato práce se podrobně zaměřila na jeden z predispozičních genů *HLA-DQA1*. Pokusili jsme se zjistit, zdali exprese jednotlivých alel *HLA-DQA1* souvisí s DNA metylací promotorového úseku. Nejdůležitější poznatky, kterých bylo v průběhu disertační práce dosaženo, jsou uvedeny níže:

- 1) Podařilo se nám shromáždit velké množství zdravých kontrol a pacientů s autoimunitním diabetem. U obou kohort byla nejprve provedena HLA genotypizace, abychom odlišili jednotlivé HLA alely, a z obou skupin byli do studie specificky vybráni jedinci na základě jejich věku a haplotypu HLA.
- 2) Pomocí kvantitativního PCR jsme analyzovali mRNA expresi *HLA-DQA1* alel a ukázali nutnost normalizovat expresi *HLA-DQA1* oproti 2 endogenním kontrolám (*PPIA* a *DRA*). Nejvyšší expresi jsme detekovali u alely *DQA1\*03* a naopak nejnižší u alely *DQA1\*05*. U zdravých kontrol se nám, oproti ostatním pracím, podařilo detekovat statisticky signifikantně vyšší expresi alely *DQA1\*02:01*, zejména u heterozygotů *DQA1\*02:01/03*. Vyšší exprese této alely by mohla u heterozygotů *DQA1\*0201/03* hrát důležitou roli v etiopatogenezi T1D a mohla by do určité míry potlačovat rozvoj diabetu.
- 3) V druhé části jsme se pak zaměřili na methylační stav promotoru *HLA-DQA1*. Pomocí bisulfitové sekvenace jsme analyzovali methylační profil monocytů a leukocytů z plné krve T1D pacientů. Detekovali jsme jak celkovou metylaci, tak i jednotlivé CpG dinukleotidy. Počet methylačních míst závisel na jednotlivých typech promotoru a obsahoval 9-12 CpG dinukleotidů. Nejvíce methylovaná alela byla *DQA1\*02:01* a nejméně alela *DQA1\*05:01*. Porovnání celkové methylace mezi T1D pacienty a zdravými kontrolami nám neukázalo žádné signifikantní rozdíly. Na úrovni jednotlivých CpG dinukleotidů se ukázalo, že oblast těsně před místem pro iniciaci transkripce je oproti zbytku promotoru methylována ve snížené míře. Právě v této oblasti jsme našli nejvyšší variabilitu v DNA metylaci mezi oběma skupinami, žádné CpG místo však nebylo statisticky signifikantně hypo nebo hypermethylováno.

- 4) Nepodařilo se nám prokázat jasnou souvislost mezi DNA methylací promotorového úseku a mRNA expresí jednotlivých alel. Přestože mRNA exprese *HLA-DQA1* nezávisí na jejím methylačním stavu, je to vůbec poprvé, kdy byl takto podrobně popsán methylační profil tohoto genu a zkoumána souvislost mezi mRNA expresí a DNA methylací.



## 7. Publikace

### **Publikace týkající se dizertační práce**

**Differences in promoter DNA methylation and mRNA expression of individual alleles of the HLA class II DQA1 gene** (viz příloha)

Marta Zajacova, Anna Kotrbova-Kozak, Pavel Cepek, Marie Cerna

Immunology letters 167 (2015), 147-154

IF = 2.483

**DNA methylation and mRNA expression of HLA-DQA1 alleles in type 1 diabetes mellitus** (viz příloha)

Pavel Cepek, Marta Zajacova, Anna Kotrbova-Kozak, Elena Silhova, Marie Cerna

Immunology 148 (2016), 150-159

IF= 4.078

### **Ostatní publikace**

#### **Prevalence of URAT1 allelic variants in the Roma population**

Stiburkova B, Gabrikova D, Čepek P, Šimek P, Kristian P, Cordoba-Lanus E, Claverie-Martin F.

Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 35 (2016), 529-535.

IF = 0.876

DOI: 10.1080/15257770.2016.1168839

**Microarray analysis of circulating micro RNAs in the serum of patients with polymyositis and dermatomyositis reveals a distinct disease expression profile and is associated with disease activity**

Misunova M, Salinas-Riester G, Luthin S, Pommerenke C, Husakova M, Zavada J, Klein M, Plestilova L, Svitalkova T, Cepek P, Novota P, Vencovsky J.

Clin Exp Rheumatol. 34 (2016), 17-24.

IF = 2.724

<http://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=9101>

## 8. Literatura

1. Steiger H, Thaler L. Eating disorders, gene-environment interactions and the epigenome: Roles of stress exposures and nutritional status. *Physiology & behavior*. 2016;162:181-5.
2. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(30):10604-9.
3. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997;389(6648):251-60.
4. Shen X, Yu L, Weir JW, Gorovsky MA. Linker histories are not essential and affect chromatin condensation in vivo. *Cell*. 1995;82(1):47-56.
5. McKittrick E, Gafken PR, Ahmad K, Henikoff S. Histone H3. 3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(6):1525-30.
6. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*. 2000;10(15):886-95.
7. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
8. Keppler BR, Archer TK. Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets—Part 1. Expert opinion on therapeutic targets. 2008;12(10):1301-12.
9. Zhu B, Zheng Y, Pham A-D, Mandal SS, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Molecular cell*. 2005;20(4):601-11.
10. Turner BM. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. *Nature structural & molecular biology*. 2005;12(2):110-2.
11. Allahverdi A, Yang R, Korolev N, Fan Y, Davey CA, Liu C-F, et al. The effects of histone H4 tail acetylations on cation-induced chromatin folding and self-association. *Nucleic acids research*. 2011;39(5):1680-91.
12. Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun J-M, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*. 2006;311(5762):844-7.
13. Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, et al. Regulation of HP1—chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*. 2005;438(7071):1116-22.
14. Clements A, Poux AN, Lo W-S, Pillus L, Berger SL, Marmorstein R. Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase. *Molecular cell*. 2003;12(2):461-73.
15. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001;293(5532):1074-80.
16. Verdone L, Caserta M, Di Mauro E. Histone acetylation in gene regulation. *Briefings in functional genomics & proteomics*. 2006;5(3):209-21.
17. Histone modification map (mapa histonových modifikací), <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=histonemap>.
18. Martínez-Iglesias O, Ruiz-Llorente L, Sánchez-Martínez R, García L, Zambrano A, Aranda A. Histone deacetylase inhibitors: mechanism of action and therapeutic use in cancer. *Clinical and Translational Oncology*. 2008;10(7):395-8.
19. Li E, Zhang Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;6(5):a019133.
20. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. 2001;410(6824):116-20.

21. Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*. 2004;303(5658):644-9.
22. Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK. JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science*. 2007;318(5849):444-7.
23. Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, et al. Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*. 2006;125(3):467-81.
24. Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, et al. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science*. 2013;341(6146):1237905.
25. Watt F, Molloy PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes & development*. 1988;2(9):1136-43.
26. Yoon H-G, Chan DW, Reynolds AB, Qin J, Wong J. N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Molecular cell*. 2003;12(3):723-34.
27. Blackledge NP, Zhou JC, Tolstorukov MY, Farcas AM, Park PJ, Klose RJ. CpG islands recruit a histone H3 lysine 36 demethylase. *Molecular cell*. 2010;38(2):179-90.
28. Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, et al. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*. 2007;448(7154):714-7.
29. Cheng X. Structural and functional coordination of DNA and histone methylation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2014;6(8).
30. Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*. 2009;324(5929):929-30.
31. Yildirim O, Li R, Hung J-H, Chen PB, Dong X, Ee L-S, et al. Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells. *Cell*. 2011;147(7):1498-510.
32. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-57.
33. Hata K, Okano M, Lei H, Li E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*. 2002;129(8):1983-93.
34. Milutinovic S, Zhuang Q, Niveleau A, Szyf M. Epigenomic stress response knockdown of DNA methyltransferase 1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(17):14985-95.
35. Okano M, Xie S, Li E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic acids research*. 1998;26(11):2536-40.
36. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930-5.
37. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010;466(7310):1129-33.
38. He Y-F, Li B-Z, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. 2011;333(6047):1303-7.
39. Liutkevičiūtė Z, Kriukienė E, Ličytė J, Rudytė M, Urbanavičiūtė G, Klimašauskas S.

- Direct decarboxylation of 5-carboxylcytosine by DNA C5-methyltransferases. *Journal of the American Chemical Society*. 2014;136(16):5884-7.
40. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*. 1998;391(6669):806-11.
  41. Castel SE, Martienssen RA. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 2013;14(2):100-12.
  42. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *cell*. 2005;120(1):15-20.
  43. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO molecular medicine*. 2012;4(3):143-59.
  44. Sebastiani G, Grieco FA, Spagnuolo I, Galleri L, Cataldo D, Dotta F. Increased expression of microRNA miR-326 in type 1 diabetic patients with ongoing islet autoimmunity. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2011;27(8):862-6.
  45. Londin E, Loher P, Telonis AG, Quann K, Clark P, Jing Y, et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(10):E1106-E15.
  46. Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*. 2013;14(7):447-59.
  47. Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*. 2009;457(7228):405-12.
  48. Chery J, Näär A. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoc journal: a journal of postdoctoral research and postdoctoral affairs*. 2016;4(7):35.
  49. Morris KV, Chan SW-L, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*. 2004;305(5688):1289-92.
  50. Sadakierska-Chudy A, Filip M. A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs. *Neurotoxicity research*. 2015;27(2):172-97.
  51. Eisenbarth GS. Banting Lecture 2009: An unfinished journey: molecular pathogenesis to prevention of type 1A diabetes. *Diabetes*. 2010 Apr;59(4):759-74.
  52. TA S. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2014;37:S81.
  53. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2010;39(3):481-97.
  54. Soltesz G, Patterson C, Dahlquist G. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence—what can we learn from epidemiology? *Pediatric diabetes*. 2007;8(s6):6-14.
  55. Gillespie KM, Bain SC, Barnett AH, Bingley PJ, Christie MR, Gill GV, et al. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. *Lancet*. 2004 Nov 6-12;364(9446):1699-700.
  56. Fourlanos S, Varney MD, Tait BD, Morahan G, Honeyman MC, Colman PG, et al. The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases with lower-risk human leukocyte antigen genotypes. *Diabetes Care*. 2008 Aug;31(8):1546-9.
  57. Mäkelä M, Öling V, Marttila J, Waris M, Knip M, Simell O, et al. Rotavirus-specific T cell responses and cytokine mRNA expression in children with diabetes-associated autoantibodies and type 1 diabetes. *Clinical & Experimental Immunology*. 2006;145(2):261-70.
  58. Virtanen S, Hyppönen E, Läärä E, Vähäsalo P, Kulmala P, Savola K, et al. Cow's milk consumption, disease-associated autoantibodies and Type 1 diabetes mellitus: a follow-up study in siblings of diabetic children. *Diabetic medicine*. 1998;15(9):730-8.
  59. Mayer EJ, Hamman RF, Gay EC, Lezotte DC, Savitz DA, Klingensmith GJ. Reduced

- risk of IDDM among breast-fed children: the Colorado IDDM Registry. *Diabetes*. 1988;37(12):1625-32.
60. Mohr S, Garland C, Gorham E, Garland F. The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide. *Diabetologia*. 2008;51(8):1391-8.
61. McKinney P. Seasonality of birth in patients with childhood Type I diabetes in 19 European regions. *Diabetologia*. 2001;44(3):B67-B74.
62. Stene L, Joner G. Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. *Alternative Medicine Review*. 2004;9(1):99-100.
63. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2010;33(Supplement 1):S62-S9.
64. Pelikánová T, Bartoš V, (2003). *Praktická diabetologie*, 3. vydání, Maxdorf, Praha.
65. Patterson C, Guariguata L, Dahlquist G, Soltesz G, Ogle G, Silink M. Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2014 Feb;103(2):161-75.
66. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyurus E, Green A, Soltesz G. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet*. 2009 Jun 13;373(9680):2027-33.
67. Cinek O, Kulich M, Sumnik Z. The incidence of type 1 diabetes in young Czech children stopped rising. *Pediatric diabetes*. 2012;13(7):559-63.
68. Ústav statistiky a zdravotnických informací: činnost oboru diabetologie, péče o diabetiky 2013, <http://www.uzis.cz/rychle-informace/cinnost-oboru-diabetologie-pece-diabetiky-roce-2013>.
69. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clinical & Experimental Immunology*. 2010;160(1):1-9.
70. You W-P, Henneberg M. Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth. *BMJ open diabetes research & care*. 2016;4(1):e000161.
71. Cerna M. Genetics of autoimmune diabetes mellitus. *Wien Med Wochenschr*. 2008;158(1-2):2-12.
72. Evangelou M, Smyth DJ, Fortune MD, Burren OS, Walker NM, Guo H, et al. A Method for Gene-Based Pathway Analysis Using Genomewide Association Study Summary Statistics Reveals Nine New Type 1 Diabetes Associations. *Genetic epidemiology*. 2014;38(8):661-70.
73. Barrett JC, Clayton DG, Concannon P, Akolkar B, Cooper JD, Erlich HA, et al. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2009 Jun;41(6):703-7.
74. Redondo MJ, Jeffrey J, Fain PR, Eisenbarth GS, Orban T. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med*. 2008 Dec 25;359(26):2849-50.
75. Hyttinen V, Kaprio J, Kinnunen L, Koskenvuo M, Tuomilehto J. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes*. 2003 Apr;52(4):1052-5.
76. Stefan M, Zhang W, Concepcion E, Yi Z, Tomer Y. DNA methylation profiles in type 1 diabetes twins point to strong epigenetic effects on etiology. *J Autoimmun*. 2014 May;50:33-7.
77. Rakyan VK, Beyan H, Down TA, Hawa MI, Maslau S, Aden D, et al. Identification of type 1 diabetes-associated DNA methylation variable positions that precede disease diagnosis. *PLoS Genet*. 2011 Sep;7(9):e1002300.
78. Fradin D, Le Fur S, Mille C, Naoui N, Groves C, Zelenika D, et al. Association of the

- CpG methylation pattern of the proximal insulin gene promoter with type 1 diabetes. *PLoS One*. 2012;7(5):e36278.
79. Kuroda A, Rauch TA, Todorov I, Ku HT, Al-Abdullah IH, Kandeel F, et al. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PloS one*. 2009;4(9):e6953.
  80. Bell CG, Teschendorff AE, Rakyan VK, Maxwell AP, Beck S, Savage DA. Genome-wide DNA methylation analysis for diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus. *BMC medical genomics*. 2010;3(1):1.
  81. Arroyo-Jousse V, Garcia-Diaz DF, Codner E, Pérez-Bravo F. Epigenetics in type 1 diabetes: TNF $\alpha$  gene promoter methylation status in Chilean patients with type 1 diabetes mellitus. *The British journal of nutrition*. 2016;116(11):1861.
  82. Miao F, Chen Z, Genuth S, Paterson A, Zhang L, Wu X, et al. Evaluating the Role of Epigenetic histone modifications in the Metabolic Memory of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2014:DB\_131251.
  83. Brasacchio D, Okabe J, Tikellis C, Balcerzyk A, George P, Baker EK, et al. Hyperglycemia Induces a Dynamic Cooperativity of Histone Methylase and Demethylase Enzymes Associated With Gene-Activating Epigenetic Marks That Coexist on the Lysine Tail. *Diabetes*. 2009;58(5):1229-36.
  84. Miao F, Smith DD, Zhang L, Min A, Feng W, Natarajan R. Lymphocytes From Patients With Type 1 Diabetes Display a Distinct Profile of Chromatin Histone H3 Lysine 9 Dimethylation. *An Epigenetic Study in Diabetes*. 2008;57(12):3189-98.
  85. Yang M, Ye L, Wang B, Gao J, Liu R, Hong J, et al. Decreased miR-146 expression in peripheral blood mononuclear cells is correlated with ongoing islet autoimmunity in type 1 diabetes patients 1 型糖尿病患者外周血单个核细胞 miR-146 表达下调与胰岛持续免疫失衡相关. *Journal of diabetes*. 2015;7(2):158-65.
  86. Salas-Pérez F, Codner E, Valencia E, Pizarro C, Carrasco E, Pérez-Bravo F. MicroRNAs miR-21a and miR-93 are down regulated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with type 1 diabetes. *Immunobiology*. 2013;218(5):733-7.
  87. Hezova R, Slaby O, Faltejskova P, Mikulkova Z, Buresova I, Raja KM, et al. microRNA-342, microRNA-191 and microRNA-510 are differentially expressed in T regulatory cells of type 1 diabetic patients. *Cellular immunology*. 2010;260(2):70-4.
  88. Li G, Yu M, Lee W-W, Tsang M, Krishnan E, Weyand CM, et al. Decline in miR-181a expression with age impairs T cell receptor sensitivity by increasing DUSP6 activity. *Nature medicine*. 2012;18(10):1518-24.
  89. Ebert PJ, Jiang S, Xie J, Li Q-J, Davis MM. An endogenous positively selecting peptide enhances mature T cell responses and becomes an autoantigen in the absence of microRNA miR-181a. *Nature immunology*. 2009;10(11):1162-9.
  90. Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S, et al. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nature immunology*. 2009;10(12):1252-9.
  91. Garo LP, Murugaiyan G. Contribution of MicroRNAs to autoimmune diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(10):2041-51.
  92. Vigorito E, Perks KL, Abreu-Goodger C, Bunting S, Xiang Z, Kohlhaas S, et al. microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*. 2007;27(6):847-59.
  93. Simmonds M, Gough S. The HLA region and autoimmune disease: associations and mechanisms of action. *Current genomics*. 2007;8(7):453-65.
  94. Trowsdale J, Knight JC. Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annual review of genomics and human genetics*. 2013;14:301.
  95. IMGT/HLA databáze, <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>, aktualizováno 21.4. 2017.

96. Hořejší V., Bartůňková (2009): *Základy imunologie*, 4 vydání, Triton, Praha. ISBN 978-80-7387-280-9.
97. Neefjes J, Jongma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*. 2011;11(12):823-36.
98. Princiotta MF, Finzi D, Qian S-B, Gibbs J, Schuchmann S, Buttgerit F, et al. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity*. 2003;18(3):343-54.
99. Roche PA, Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(4):203-16.
100. Geppert TD, Lipsky PE. Antigen presentation by interferon-gamma-treated endothelial cells and fibroblasts: differential ability to function as antigen-presenting cells despite comparable Ia expression. *The Journal of Immunology*. 1985;135(6):3750-62.
101. Romieu-Mourez R, François M, Boivin M-N, Stagg J, Galipeau J. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , and cell density. *The Journal of Immunology*. 2007;179(3):1549-58.
102. Chow A, Toomre D, Garrett W, Mellman I. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature*. 2002;418(6901):988-94.
103. Young LJ, Wilson NS, Schnorrer P, Proietto A, Ten Broeke T, Matsuki Y, et al. Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nature immunology*. 2008;9(11):1244-52.
104. Noble JA. Immunogenetics of type 1 diabetes: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity*. 2015;64:101-12.
105. Ettinger RA, Liu AW, Nepom GT, Kwok WW. 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. *The Journal of Immunology*. 1998;161(11):6439-45.
106. Noble JA, Erlich HA. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2(1):a007732.
107. Gragert L, Madbouly A, Freeman J, Maiers M. Six-locus high resolution HLA haplotype frequencies derived from mixed-resolution DNA typing for the entire US donor registry. *Human immunology*. 2013;74(10):1313-20.
108. Baldwin KK, Trenchak BP, Altman JD, Davis MM. Negative selection of T cells occurs throughout thymic development. *The Journal of Immunology*. 1999;163(2):689-98.
109. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 1986;329(6140):599-604.
110. Acha-Orbea H, McDevitt HO. The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II IA beta chain is unique. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(8):2435-9.
111. Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *Journal of autoimmunity*. 2008;31(3):252-6.
112. Pane J, Webster N, Graham K, Holloway G, Zufferey C, Coulson B. Rotavirus acceleration of murine type 1 diabetes is associated with a T helper 1-dependent specific serum antibody response and virus effects in regional lymph nodes. *Diabetologia*. 2013;56(3):573-82.
113. Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nature reviews Immunology*. 2005 Oct;5(10):793-806.

114. Krawczyk M, Peyraud N, Rybtsova N, Masternak K, Bucher P, Barras E, et al. Long distance control of MHC class II expression by multiple distal enhancers regulated by regulatory factor X complex and CIITA. *The Journal of Immunology*. 2004;173(10):6200-10.
115. Haas JP, Kimura A, Andreas A, Hochberger M, Keller E, Brännler G, et al. Polymorphism in the upstream regulatory region of DQA1 genes and DRB1, QAP, DQA1, and DQB1 haplotypes in the German population. *Human immunology*. 1994;39(1):31-40.
116. Morzycka-Wroblewska E, Munshi A, Ostermayer M, Harwood JI, Kagnoff MF. Differential expression of HLA-DQA1 alleles associated with promoter polymorphism. *Immunogenetics*. 1997;45(3):163-70.
117. Ting JP-Y, Kastner DL, Hoffman HM. CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6(3):183-95.
118. Steimle V, Siegrist C-A, Mottet A, Lisowska-Groszpiere B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon-g mediated by the transactivator gene CIITA. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition*. 1994;265(5168):106-8.
119. Wu X, Kong X, Luchsinger L, Smith BD, Xu Y. Regulating the activity of class II transactivator by posttranslational modifications: exploring the possibilities. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(21):5639-44.
120. Wright KL, Ting JP. Epigenetic regulation of MHC-II and CIITA genes. *Trends in immunology*. 2006;27(9):405-12.
121. Zika E, Greer SF, Zhu X-S, Ting JP-Y. Histone deacetylase 1/mSin3A disrupts gamma interferon-induced CIITA function and major histocompatibility complex class II enhanceosome formation. *Molecular and cellular biology*. 2003;23(9):3091-102.
122. Fernandez S, Wassmuth R, Knerr I, Frank C, Haas JP. Relative quantification of HLA-DRA1 and -DQA1 expression by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Eur J Immunogenet*. 2003 Apr;30(2):141-8.
123. Zajacova M, Kotrbova-Kozak A, Cepek P, Cerna M. Differences in promoter DNA methylation and mRNA expression of individual alleles of the HLA class II DQA1 gene. *Immunology letters*. 2015;167(2):147-54.
124. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215.
125. pGEM T-easy Vector, <https://www.fishersci.com/shop/products/promega-pgem-t-pgem-t-easy-vector-systems-4/p-127641#>.
126. Maffei A, Harris PE, Reed EF, Del Pozzo G, Ciullo M, Suciú-Foca N, et al. Differential expression of insulin-dependent diabetes mellitus-associated HLA-DQA1 alleles in vivo. *Eur J Immunol*. 1997 Jun;27(6):1549-56.
127. Donner H, Seidl C, Rau H, Herwig J, Seifried E, Usadel KH, et al. Unbalanced amounts of HLA-DQA1 allele mRNA: DQA1\*03 shows high and DQA1\*0501 low amounts of mRNA in heterozygous individuals. *Eur J Immunogenet*. 2002 Aug;29(4):321-30.
128. Britten AC, Mijovic CH, Barnett AH, Kelly MA. Differential expression of HLA-DQ alleles in peripheral blood mononuclear cells: alleles associated with susceptibility to and protection from autoimmune type 1 diabetes. *Int J Immunogenet*. 2009 Feb;36(1):47-57.
129. Swanberg M, Lidman O, Padyukov L, Eriksson P, Akesson E, Jagodic M, et al. MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat Genet*. 2005 May;37(5):486-94.
130. Majumder P, Gomez JA, Boss JM. The human major histocompatibility complex class II HLA-DRB1 and HLA-DQA1 genes are separated by a CTCF-binding enhancer-blocking element. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(27):18435-43.
131. DiMolfetto L, Neal HA, Wu A, Reilly C, Lo D. The density of the class II MHC T cell receptor ligand influences IFN-gamma/IL-4 ratios in immune responses in vivo. *Cell*



Immunol. 1998 Jan 10;183(1):70-9.

132. Hermann R, Turpeinen H, Laine AP, Veijola R, Knip M, Simell O, et al. HLA DR-DQ-encoded genetic determinants of childhood-onset type 1 diabetes in Finland: an analysis of 622 nuclear families. *Tissue Antigens*. 2003 Aug;62(2):162-9.

133. Peña CJ, Monk C, Champagne FA. Epigenetic effects of prenatal stress on 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-2 in the placenta and fetal brain. *PloS one*. 2012;7(6):e39791.

134. Cardenas A, Rifas-Shiman SL, Agha G, Hivert M-F, Litonjua AA, DeMeo DL, et al. Persistent DNA methylation changes associated with prenatal mercury exposure and cognitive performance during childhood. *Scientific Reports*. 2017;7.

135. Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, Irizarry RA, Aspelund T, Cui H, et al. Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *Jama*. 2008;299(24):2877-83.

136. Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *The Journal of nutrition*. 2002;132(8):2393S-400S.

137. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(44):17046-9.

138. Wallace C, Smyth DJ, Maisuria-Armer M, Walker NM, Todd JA, Clayton DG. The imprinted DLK1-MEG3 gene region on chromosome 14q32.2 alters susceptibility to type 1 diabetes. *Nature genetics*. 2010;42(1):68-71.

139. Novakovic B, Ryan J, Pereira N, Boughton B, Craig JM, Saffery R. Postnatal stability, tissue, and time specific effects of AHRR methylation change in response to maternal smoking in pregnancy. *Epigenetics*. 2014;9(3):377-86.

140. Murphy SK, Adigun A, Huang Z, Overcash F, Wang F, Jirtle RL, et al. Gender-specific methylation differences in relation to prenatal exposure to cigarette smoke. *Gene*. 2012;494(1):36-43.

141. Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto F, Modesti M, et al. Changes in the expression of surface receptors on lymphocyte subsets in the elderly: quantitative flow cytometric analysis. *American journal of hematology*. 2001;67(2):63-72.

142. Dozmorov MG, Coit P, Maksimowicz-McKinnon K, Sawalha AH. Age-associated DNA methylation changes in naive CD4<sup>+</sup> T cells suggest an evolving autoimmune epigenotype in aging T cells. *Epigenomics*. 2017(0).

143. Le Morvan C, Cogne M, Drouet M. HLA-A and HLA-B transcription decrease with ageing in peripheral blood leucocytes. *Clinical & Experimental Immunology*. 2001;125(2):245-50.

144. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*. 2008;454(7205):766-70.

145. Klose RJ, Sarraf SA, Schmiedeberg L, McDermott SM, Stancheva I, Bird AP. DNA binding selectivity of MeCP2 due to a requirement for A/T sequences adjacent to methyl-CpG. *Molecular cell*. 2005;19(5):667-78.

146. Clouaire T, de Las Heras JI, Merusi C, Stancheva I. Recruitment of MBD1 to target genes requires sequence-specific interaction of the MBD domain with methylated DNA. *Nucleic acids research*. 2010;38(14):4620-34.

147. Majumder P, Boss JM. DNA methylation dysregulates and silences the HLA-DQ locus by altering chromatin architecture. *Genes Immun*. 2011 Jun;12(4):291-9.

## **9. Příloha**