

Univerzita Karlova
3. lékařská fakulta



AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE

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

Mgr. Pavel Čepek
PRAHA 2017

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky
Oborová rada Molekulární a buněčná biologie, genetiky a virologie

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav lékařské genetiky, 3. lékařská fakulta UK

Autor: Mgr. Pavel Čepěk

Školitel: Doc. MUDr. Marie Černá, CSc.

Školitel konzultant: Ing. et Mgr. Blanka Stibůrková, Ph.D

Oponenti:

prof. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D.

RNDr. Milan Reiniš, Ph.D.

S dizertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty
Univerzity Karlovy

Obsah

1.	Literární úvod	6
1.1.	Epigenetika	6
1.1.1.	DNA methylace	7
1.2.	Diabetes mellitus 1. typu	7
1.2.1.	Genetika T1D	8
1.2.2.	Asociace HLA genů II. třídy s T1D	9
1.2.3.	Regulace exprese HLA genů II. třídy	10
2.	Hypotéza a cíle práce	12
3.	Materiál a metody	13
3.1.	HLA genotypizace	13
3.2.	Bisulfitové sekvenování	13
3.3.	Relativní exprese <i>HLA-DQA1</i>	15
3.4.	Statistické vyhodnocení	16
4.	Výsledky	17
4.1.	Charakteristika souboru pacientů	17
4.2.	Relativní exprese <i>HLA-DQA1/HLA-DRA</i>	17
4.3.	Relativní exprese <i>HLA-DQA1/PPIA</i>	19
4.4.	Celková methylace promotorového úseku <i>HLA-DQA1</i>	20
4.5.	Methylační profil jednotlivých CpG dinukleotidů	21
5.	Diskuze	24
5.1.	Relativní exprese <i>HLA-DQA1</i>	24
5.2.	Methylace <i>HLA-DQA1</i>	27
6.	Závěr	32
7.	Publikace	34
8.	Literatura	35

Souhrn

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*.

Do této studie bylo celkem zahrnuto 61 diabetických pacientů a 39 zdravých kontrol. Od všech jedinců byla získána DNA, která byla vystavena působení bisulfitu sodného. Pomocí metody nested PCR byl amplifikován promotorový úsek *HLA-DQA1* a za využití sekvenování byl získán methylační profil promotoru *HLA-DQA1*. 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*.

Summary

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 and correlate methylation status with individual *HLA-DQA1* allele expression of T1D patients and healthy controls.

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 profile of *HLA-DQA1* promoter was analyzed. Individual mRNA *HLA-DQA1* relative allele expression was assessed using two different endogenous controls (*PPIA*, *DRA*)

We have found higher *HLA-DQA1**02:01 allele expression in healthy controls (*PPIA* normalization, $P_{\text{corr}}=0.041$; *DRA* normalization, $P_{\text{corr}}=0.052$) compare to 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.

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). 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. 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 (3). 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 (4). Druhou možností je, že se na methylové skupiny váží methylvazebné proteiny, které dále interagují s histon-modifikujícími enzymy. Ty pak modifikují N a C konce histonů, což může výsledně vést k potlačení transkripce (5). DNA methylace bývá v některých případech doprovázena methylací histonů (6, 7).

1.2. Diabetes mellitus 1. typu

Diabetes mellitus 1. typu (T1D) je autoimunitní onemocnění, které vzniká následkem destrukce β buněk Langerhansových

ostrůvků pankreatu, což vede k nedostatečné či kompletní ztrátě produkce insulínu (8). 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 (9, 10). Zatímco u dětí je destrukce β buněk většinou rychlá a kompletní, u dospělých je progresse onemocnění daleko pomalejší a produkce insulínu 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 (11). T1D vzniká u geneticky predisponovaných jedinců a je modulován vnějším prostředím. Riziko vzniku T1D je tak kombinací environmentálních faktorů a genetické predispozice jedince. V případech 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 (12, 13).

1.2.1. 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 % (14). Doposud bylo díky asociačním studiím nalezeno více než 50 různých genů a genových

komplexů, které ovlivňují riziko vzniku T1D (15). 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, které přispívají 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) (16).

1.2.2. 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* (**tabulka 1**), 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 %. Rizikovost jednotlivých HLA alel je pravděpodobně způsobena menší afinitou HLA DQ, DR molekul k některým ostrůvkovým autoantigenům β buněk pankreatu. Následkem toho dochází k porušení centrální a periferní tolerance vůči autoantigenu a k selekci autoreaktivních T lymfocytů.

Oproti tomu haplotyp *DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02* patří mezi protektivní haplotypy a vyskytuje se

přibližně u 20 % obecné populace (17). 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.

Tabulka 1. Vybrané rizikové a protektivní haplotypy u T1D - převzato a upraveno z (18, 19). 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. Například přítomnost alely *DRB1*04:03* má za následek protektivitu celého haplotypu, i když ostatní alely haplotypu jsou predispoziční. Frekvence haplotypu s *DRB1*04:03* je v kavkazské populaci 0,6 %, v asijské populaci 3,5 % (20).

Haplotyp	DRB1	DQA1	DQB1	OR
DR3	03:01	05:01	02:01	3,64
DR4	04:05	03:01	03:02	11,37
DR4	04:01	03:01	03:02	8,39
DR4	04:02	03:01	03:02	3,63
DR2	15:01	01:02	06:02	0,03
DR4	04:03	03:01	03:02	0,27
DR11	11:01	05:01	03:01	0,18
DR13	13:01	01:03	06:03	0,13

1.2.3. 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 (21). Další SXY moduly byly lokalizované napříč celým lokusem HLA genů II. třídy a fungují jako enhancery, kdy vzdáleně kontrolují expresi HLA genů II. třídy (22). Na SXY modul se váže celá řada transkripčních faktorů a jejich hlavním regulátorem je koaktivátor CIITA (class II transactivator).

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 (23) a mohou ovlivnit jejich expresi (24).

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. 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*. 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 nízkorozlišovacích kitů. Podtypy *HLA-DQB1* a *HLA-DQA1* alel byly poté určeny použitím vysokorozlišovacích kitů HLA-DQB1*02, 03, 04, 05, 06 a HLA-DQA1.

3.2. Bisulfitové sekvenování

Bisulfitová konverze

Princip bisulfitové konverze spočívá v konverzi nemethylovaného cytosinu na uracil v přítomnosti bisulfitu sodného (NaHSO₃). Důležité je, že ke konverzi dochází pouze u nemethylovaného cytosinu, methylovaný cytosin je vůči bisulfitové konverzi rezistentní. Tímto způsobem tak lze po následné sekvenaci zjistit, které cytosiny byly před konverzí methylovány 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 Epitect Bisulfite kitu (QIAGEN, USA).

Nested PCR

Nested PCR je metoda, která se využívá pro amplifikaci obtížně amplifikovatelných úseků DNA. 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.

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*. pGEM-T Easy vektor byl ligován s námi připraveným PCR produktem a celý konstrukt byl teplotním šokem vložen do

bakteriálního kmene *E. coli* DH5 α . Tento kmen má delecii v genu pro α -peptid betagalaktosidasu, který je ale přítomný ve vektoru. V případě úspěšného vložení konstruktů do bakterií, je u vektoru přerušen čtecí rámec 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).

3.3. Relativní exprese *HLA-DQA1*

Pro stanovení relativní exprese jednotlivých alel *HLA-DQA1* bylo využito fluorescenčních sond TaqManTM. Jako nejvhodnější endogenní kontrola byl vybrán gen *PPIA* (*PPIA*: Hs 99999904_m1, Applied Biosystems, USA). 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,

kteřá byla pouřžita pro kvantifikaci celkové mRNA *HLA-DQA1* bez ohledu na přítomné alely. Pro kařždou assay byla určena amplifikační účinnost, kteřá se pohybovala mezi 95-102 %.

3.4. Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení byl pouřžit Graphpad prism (verze 5.02). Pro porovnání relativní exprese mezi alelami byl vyuřžit neparametrický Mann-Whitneyho test ($\alpha=0,05$) a výsledná hodnota p byla korigována počtem porovnání ($p_{kor.}=p_{nekor.}*10$). Rozdíly mezi jednotlivými methylačními místy byly počítány pomocí Fisherovo exaktního testu ($\alpha=0,05$) a korigovány počtem porovnání ($p_{kor.}=p_{nekor.}*10$).

4. Výsledky

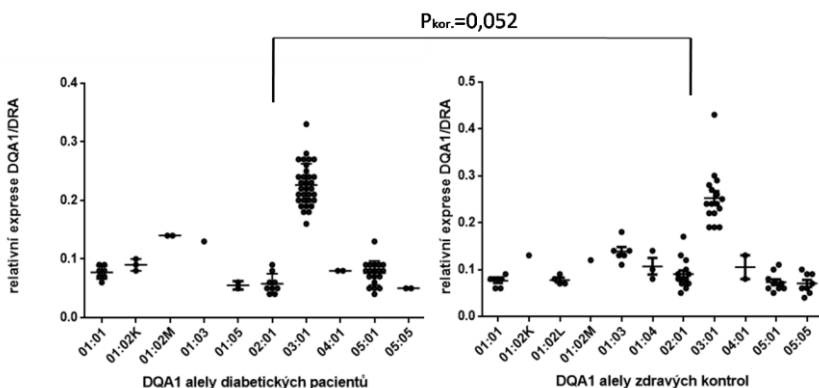
4.1. Charakteristika souboru pacientů

Diabetičtí pacienti byli diagnostikováni na základě obecně přijímaných kritérií pro diagnózu diabetu (9). 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).

4.2. Relativní exprese *HLA-DQA1/HLA-DRA*

U obou studovaných kohort byla nejvíce exprimována alela *DQA1*03* a naopak nejméně alela *DQA1*05:05* (**graf 1**). 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

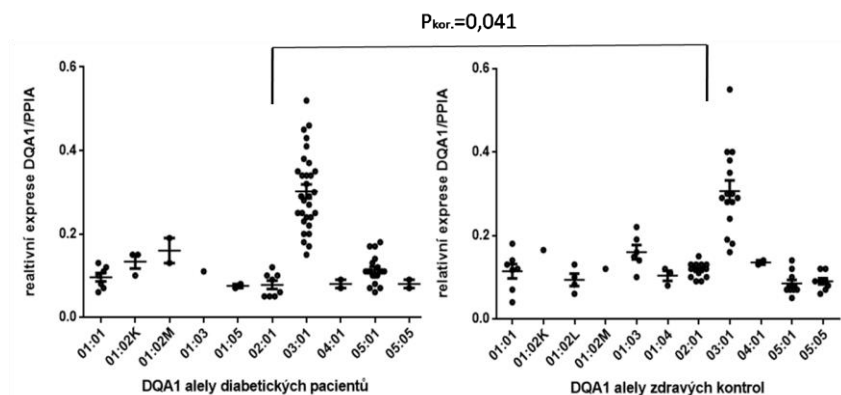
01:02L=*DQA1*01:02* alela ve vazbě s QAP alelou 1.2L

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

Graf 1. Relativní exprese *HLA-DQA1* alel vztahena 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.

4.3. 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

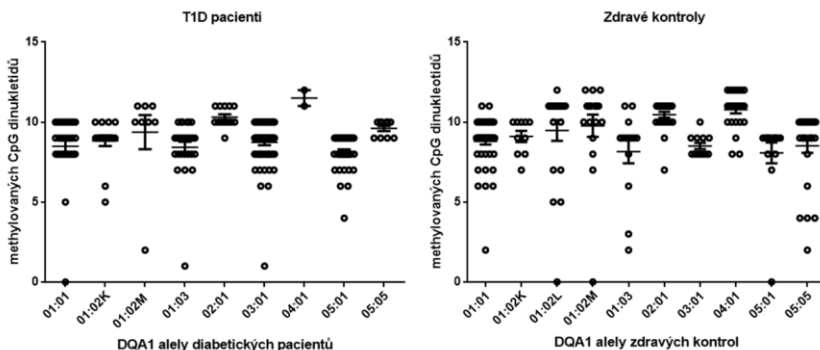
01:02M=*DQA1*01:02* alela ve vazbě s *QAP* alelou 1.4

Graf 2. Relativní exprese *HLA-DQA1* alel vztahována 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. Celková methylace promotorového úseku *HLA-DQA1*

Vzhledem k tomu, že jsme našli statistický významný rozdíl v expresi alely *DQA1*02:01*, zajímalo nás, zda exprese jednotlivých *HLA-DQA1* alel souvisí s methylací promotoru *HLA-DQA1*. Z tohoto důvodu jsme provedli bisulfitové sekvenování, a to DNA z plné krve diabetiků a 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*). 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 3**). Ani methylační stav ostatních *HLA-DQA1* alel nekoreloval s výsledky relativní exprese.



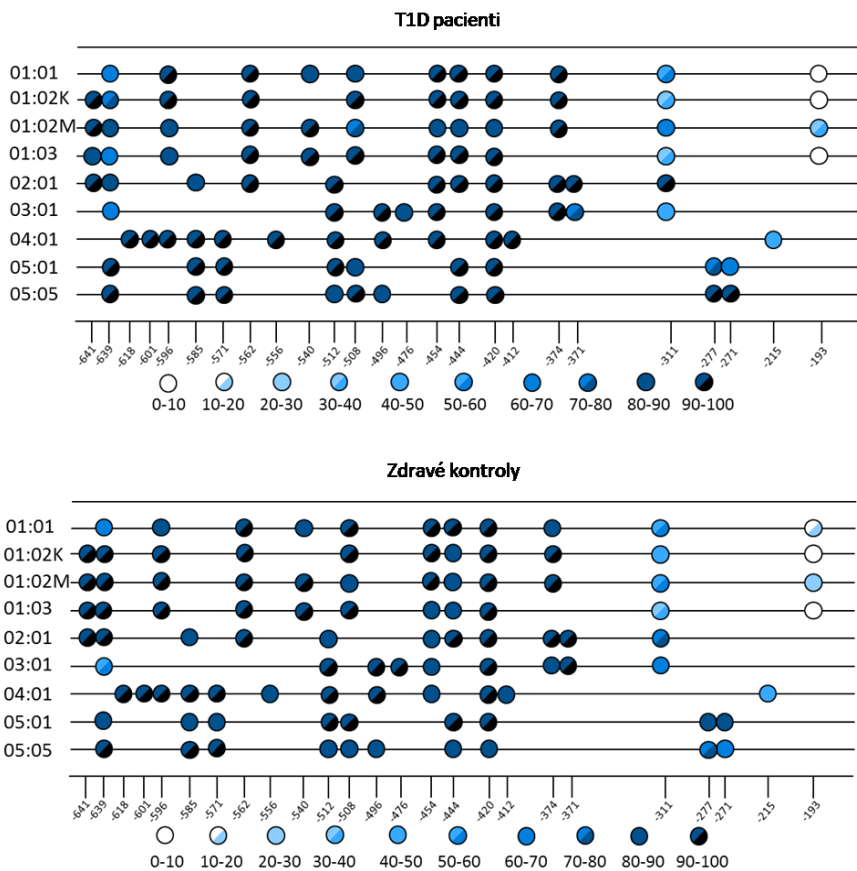
01:02K=*DQA1**01:02 alela ve vazbě s *QAP* alelou 1.2K
 01:02L=*DQA1**01:02 alela ve vazbě s *QAP* alelou 1.2L
 01:02M=*DQA1**01:02 alela ve vazbě s *QAP* alelou 1.4

Graf 3. 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. 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 4**). 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 4. 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 methylováno (v %). Do studie byly zahrnuty pouze sekvence, u kterých byla úspěšnost bisulfitové konverze vyšší než 95 %.

5. Diskuze

5.1. 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* (25, 26). V roce 2003 byla publikována práce Fernandez et al., která oproti ostatním popsala nejvyšší expresi alely *DQA1*04* (27). Odlišnosti mezi studii 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 bází), 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* (28). 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* (24). 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 (29). 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 (22). 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 (30), což dále rozvedu v kapitole DNA methylace.

Přestože jsme v naší studii nenalezli rozdíly v expresi u T1D protektivních a rizikových alel, zajímavý byl nález, 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. Rozdíly v expresi byly nejvíce patrné u heterozygotů *DQA1*02:01/03*. 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) 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 modulovat odpověď imunitního systému. Bylo ukázáno, že množství komplexu HLA-peptid na buněčném povrchu ovlivňuje produkci cytokinů IL-4 a IFN γ , což následně může nasměrovat imunitní reakci

ve prospěch Th1 nebo Th2 odpovědi (31). Je známo, že Th1 odpověď je spojována s rozvojem T1D (32).

5.2. 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(33-35). 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 (36). Velice podobný efekt byl pozorován i u lidí, kde jedinci, kteří byli před narozením vystaveni nedostatku výživy

v průběhu 2. světové války, měli méně methylovaný imprintovaný gen *IGF2* (z angl. insulin growth factor), zapojený do anabolických a růstových procesů, a nastavený tak „šetřící fenotyp“ (37).

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 (38). 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 u potomků (39, 40).

V této práci jsme se zaměřili na změny v epigenetických modifikacích u predispozičního genu *HLA-DQA1* a snažili se najít rozdíly v DNA methylaci promotorového úseku tohoto genu, které by nám pomohly vysvětlit rozdíly v expresi jednotlivých alel *HLA-DQA1*. Protože se úroveň DNA methylace alel i HLA exprese obecně mění s věkem jedince, vybrali jsme skupiny diabetiků a kontrol shodné věkovým složením (41-43). Mezi oběma skupinami jsme neodhalili žádné statisticky významné rozdíly v celkové methylaci *HLA-DQA1* alel, nenašli jsme ani jasnou závislost mezi methylací

a expresí alel. Vysoce methylované alely *DQAI*05:05* a *DQAI*02:01* vykazovaly nízkou expresi. To ale neplatilo pro nejvíce exprimovanou alelu *DQAI*03*, jejíž exprese byla nepřímo úměrná jejímu methylačnímu stavu.

Expese genu nemusí být závislá na celkové methylaci, ale může také souviset pouze s jediným methylačním místem (44). 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 *DQAI*04:01*.

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-DQAI* velice podobný. Nejvíce variabilní methylační místa byla detekována na pozici -311 (alely *DQAI*01:01*, *01:02K*, *01:02M*, *01:03*, *02:01*, *03:01*) a na pozici -277, -271 (alely *DQAI*05:01*, *05:05*). Zajímavé je, že alela *DQAI*0201* 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 *DQAI*04:01*, která má jedno methylační místo ve W boxu (-215 před TSS). Není tedy pravděpodobné, že by DNA methylace přímo bránila vazbě transkripčního faktoru do tohoto regulačního elementu. 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 (45, 46). 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 (44). Změny v DNA methylaci pak byly potvrzeny několika dalšími studii. V promotoru genu *INS* byly objeveny 3 specifické CpG dinukleotidy, které u diabetiků byly, oproti zdravým kontrolám, methylovány ve snížené míře (47). 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 (48). 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) (49).

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 (50). 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 (30). 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

*DQAI*02:01/03*. Vyšší exprese této alely by mohla u heterozygotů *DQAI*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-DQAI*. 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 *DQAI*02:01* a nejméně alela *DQAI*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 methylaci 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. Je to však vůbec poprvé, kdy byl takto podrobně popsán methylační profil *HLA-DQAI* promotoru, identifikovány jednotlivá methylační místa promotoru 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

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

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

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

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. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Eisenbarth GS. Banting Lecture 2009: An unfinished journey: molecular pathogenesis to prevention of type 1A diabetes. *Diabetes*. 2010 Apr;59(4):759-74.
9. TA S. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 2014;37:S81.
10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. Furlanos 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.

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

15. 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.

16. 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.

17. 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.

18. Noble JA. Immunogenetics of type 1 diabetes: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity*. 2015;64:101-12.

19. Noble JA, Erlich HA. Genetics of type 1 diabetes. *Cold*

Spring Harbor perspectives in medicine. 2012;2(1):a007732.

20. 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.

21. 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.

22. 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.

23. 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.

24. 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.

25. Maffei A, Harris PE, Reed EF, Del Pozzo G, Ciullo M, Suci-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.

26. 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.

27. 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.

28. 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.

29. 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.

30. 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.

31. 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.

32. 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.

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

34. 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.

35. 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.

36. 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.

37. 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.

38. 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.

39. 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.

40. 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.

41. 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.

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

43. 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.

44. 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.

45. 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.

46. 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.

47. 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.

48. 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.

49. 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.

50. 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.