

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně odcitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie, genetika a virologie



Bc. Pavel Čepek

Epigenetická regulace genů HLA II. třídy a jejich role u autoimunitních onemocnění
Epigenetic regulation of HLA class II genes and their role in autoimmune diseases

Diplomová práce

Školitel: Ing. Anna Kotrbova – Kozak, PhD.

Praha, 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 27. 8. 2012

.....

Pavel Čepek

Poděkování

Chtěl bych poděkovat Doc. MUDr. Marii Černé, CSc. za to, že mi umožnila vypracování diplomové práce na pracovišti Ústavu obecné biologie a genetiky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Dále bych chtěl poděkovat školitelce Ing. Anně Kotrbové – Kozak, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi poskytovala během vypracování mé diplomové práce. Poděkování také patří kolegům v laboratoři za vytvoření přátelského kolektivu.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat svým rodičům, kteří mne během studií podporovali.

Abstrakt

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

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

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

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

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

Abstract

Background: Type 1 diabetes (T1D) is a multifactorial autoimmune disease. Its incidence in Europe is continuously rising. The highest T1D risk is associated with HLA (human leukocyte antigen) class II genes. HLA class II molecules play a key role in regulation of immune response. They contribute to the selection of T cell repertoire by presenting antigenic peptides to the CD4⁺ T lymphocytes. HLA class II expression is controlled by regulatory module that is situated 150 - 300 base pairs upstream of the transcription-initiation site in all HLA class II genes. Polymorphisms in this region are linked to some autoimmune diseases. There were identified several promoter alleles (named QAP) in the *HLA DQA1* gene promoter region. Most of the polymorphisms appear to be conserved within haplotype. Individual QAP alleles may have a different promoter strength by which they influence expression of *HLA DQA1* gene alleles. Promoter strength can be modulated by DNA methylation.

Aims: Our aim was to define methylation profile of *HLA DQA1* promoters and determine the mRNA expression of individual alleles of *HLA DQA1* gene in T1D patients. The mRNA expression level of *HLA DQA1* gene alleles was determined using quantitative PCR.

Methods: 30 diabetic patients (age range 21 to 76 years), were included in this pilot study. The genotyping of *HLA DRB1*, *HLA DQA1* and *HLA DQB1* was performed using PCR with sequence specific primers. Genomic DNA was treated with sodium bisulfite, promoter region of *HLA DQA1* gene was amplified and cloned into the *E. coli*, strain DH5 α . Positive transformants were selected on agar plates containing ampicillin X-Gal, and IPTG. Positive transformation were confirmed by colony PCR. Sequencing of individual clones was performed.

Results: We found statistically significant differences in total QAP methylation and in methylation at nucleotide position -311. The most significant result in total QAP methylation was found between 2.1 and 1.3 alleles (P = 0.0280). While 2.1 QAP allele was completely methylated at position -311, 1.4 allele was not methylated at all (P = 0.0064, CI (95%) = 0.00009178 – 0.3116). The mRNA expression level of *HLA DQA1**03 was higher than the expression of other *HLA DQA1* alleles.

Key words: Type 1 diabetes mellitus, HLA class II, HLA DQA1, promoter, polymorphism, DNA methylation.

Obsah

1.	Úvod a přehled literatury	12
1.1.	Diabetes mellitus 1. typu	13
1.1.1.	Epidemiologie T1D.....	13
1.1.2.	Diagnostika T1D	14
1.1.3.	Genetika T1D	14
1.2.	HLA genový komplex.....	15
1.2.1.	Struktura a funkce HLA I. třídy.....	16
1.2.2.	Struktura a funkce HLA II. třídy.....	17
1.2.3.	Regulace exprese HLA genů.....	18
1.2.4.	Asociace T1D s HLA molekulami.....	19
1.2.5.	Asociace T1D s tzv. non HLA geny.....	21
1.2.5.1	Insulin	21
1.2.5.2	CTLA 4 (z angl. cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4)	21
1.3.	Epigenetika.....	22
1.3.1.	Chromatinová struktura.....	22
1.3.2.	Methylace DNA.....	22
1.3.2.1	Rozdělení a funkce DNMT.....	23
1.3.2.2	Význam DNA methylace	24
1.3.3.	Vliv prostředí na epigenetické modifikace.....	25
2.	Cíle diplomové práce.....	26
3.	Použitý materiál, chemikálie a přístroje.....	27
3.1.	Pufry a roztoky	27
3.2.	Enzymy	28
3.3.	Komerční soupravy a kity	28
3.4.	Primery a sondy	29
3.5.	Bakteriální kmeny, plasmidy a media.....	32
3.6.	Ostatní roztoky a chemikálie	32
3.7.	Přístroje a programy.....	33

3.8.	Soubor pacientů	34
4.	Metodika práce a postupy	35
4.1.	Izolace chromosomální DNA z plné krve.....	35
4.2.	Magnetická separace monocytů (CD14) a B lymfocytů (CD19)	36
4.2.1.	Příprava magnetických partikulí Dynabeads CD 14 a CD19	36
4.2.2.	Izolace monocytů (CD14) a B lymfocytů (CD19)	36
4.2.3.	Izolace DNA monocytů a B lymfocytů.....	37
4.3.	Izolace RNA	37
4.3.1.	Izolace RNA z monocytů a B lymfocytů	37
4.3.2.	Izolace RNA z plné krve.....	38
4.4.	Genotypizace HLA	39
4.5.	TBE agarózová elektroforéza	41
4.6.	Bisulfitové sekvenování.....	41
4.6.1.	Bisulfitová konverze DNA a její přečištění	41
4.6.2.	Amplifikace promotorového úseku genu HLA DQA1	43
4.6.3.	Přečištění a izolace PCR produktu	45
4.6.4.	Příprava a práce s rekombinantní DNA.....	46
4.6.4.1	Příprava kompetentních bakterií	47
4.6.4.2	Příprava kultivačních misek	47
4.6.4.3	Ligační reakce a transformace kompetentních buněk	48
4.6.5.	Ověření pozitivně transformovaných kolonií (PCR colony)	49
4.6.6.	Sekvenace	50
4.7.	Reverzní transkripce.....	51
4.8.	Kvantitativní PCR	52
4.8.1.	Kvantifikace exprese jednotlivých alel <i>HLA DQA1</i>	52
4.9.	Zpracování a statistické vyhodnocení výsledků	53
5.	Výsledky	54
5.1.	HLA genotypizace.....	54

5.2.	Analýza promotorového úseku genu <i>HLA DQA1</i>	55
5.2.1.	Určení alel QAP	55
5.2.2.	Určení methylačního stavu alel QAP.....	57
5.2.2.1	Rozdíly v methylaci alel QAP B lymfocytů a monocytů	57
5.2.2.2	Srovnání celkové methylace alel QAP.....	59
5.2.2.3	Srovnání jednotlivých methylačních pozic QAP.....	60
5.3.	Kvantitativní PCR	61
5.3.1.	Výběr endogenní kontroly	61
5.3.2.	Optimalizace podmínek pro hybridizaci primerů s alelami <i>HLA DQA1</i>	61
5.3.3.	Účinnost amplifikace jednotlivých genů HLA II. třídy	62
5.3.4.	Rozdíly v expresi alel <i>HLA DQA1</i>	63
6.	Diskuze	66
7.	Závěr.....	68
8.	Seznam literatury	69
9.	Přílohy	76

Seznam zkratek

A	adenin
ADP	adenosindifosfát
APC	buňky prezentující antigen
C	cytosin
C2, C4A, C4B	komplementové proteiny C2, C4A, C4B
CD	cluster of differentiation
CLIP	class II associated invariant chain peptide
CpG	dinukleotid cytosin-fosfát-guanin
CTLA 4	gen kódující protein CTLA 4
CTLA 4	T lymphocyte associated antigen 4
dATP	2'- deoxyadenosin- 5'- trifosfát
dCTP	2'- deoxycytidin- 5'- trifosfát
dGTP	2'- deoxyguanosin- 5'- trifosfát
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
dTTP	2'- deoxythymidin- 5'- trifosfát
DNA	2 - deoxyribonukleová kyselina
DNMT	DNA methyltransferasa
ER	endoplasmatické retikulum
G	guanin
GADA 65	protilátky proti dekarboxylase kyseliny glutamové
H3, H4, H2A a H2B	histony H3, H4, H2A a H2B
HDACs	histondeacetylasa
HLA	lidské leukocytární antigeny
<i>huTBP</i>	lidský gen jehož produkt se váže na specifickou nukleotidovou sekvenci TATA box
HSP 70	protein teplotního šoku 70
IA-2A	protilátky proti tyrosin fosfatasa
IAA	protilátky proti insulinu
ICA	protilátky proti cytoplasmatickým složkám β buněk
IDDM	insulin dependent diabetes mellitus
IFN γ	interferon gama
Ii	invariantní řetězec
<i>INS</i>	gen kódující proinsulin
MIIC	kompartment obsahující HLA II. třídy

MBP	metyl vazebný protein
MHC	hlavní histokompatibilní komplex
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MZ	monozygotní dvojčata
NLS	jaderný lokalizační signál
Obr. č.	obrázek číslo
pH	potenciál vodíku
PCR	polymerázová řetězová reakce
<i>PPIA</i>	gen kódující cyklofilin
<i>PTPN22</i>	gen kódující protein tyrosin fosfatasu
QAP	promotor genu <i>DQA1</i>
RFLP	restriction fragment length polymorphism
<i>RPS13</i>	gen kódující ribosomální protein S13
RT PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RT	reverzní transkripce
S fáze	syntetická fáze
SUMO	small ubiquitin-like modifier
T	thymin
T1D	diabetes mellitus 1. typu
Tab. č.	tabulka číslo
TAP	transporter associated with antigen processing
TCR	receptor T buněk
TNF α a β	cytokiny (tumor necrosis factor α a β)
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
VNTR	variabilní počet tandemových repetice
UV	Ultrafialové záření
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky

1. Úvod a přehled literatury

Diabetes mellitus 1. typu (T1D) je autoimunitní onemocnění, které vede k selektivní destrukci β buněk Langerhansových ostrůvků a k doživotní závislosti na příjmu exogenního zdroje insulinu. Destrukce β buněk je způsobena autoimunitním procesem, který probíhá u geneticky predisponovaných jedinců. Nejčastěji se projevuje v dětství a nebo ranné dospělosti, kdy bývá úbytek β buněk velmi rychlý. Prvotním impulsem, který spouští autoimunitní kaskádu může být virová infekce nebo také některé antigeny obsažené v kravském mléku.

Největší genetické riziko T1D určuje vysoce polymorfní genový komplex HLA (lidské leukocytární antigeny), který kóduje imunologicky důležité proteiny. Zejména důležité jsou polymorfismy v genech HLA II. třídy (*HLA DQ*, *DR*). Polymorfismy řetězců HLA DQ a DR mají vliv na ustavení centrální tolerance imunitního systému vůči autoantigenům. Účastní se také prezentace endogenních peptidových fragmentů a regulují tak imunitní odpověď.

Genetické predispozice tvoří přibližně jen polovinu rizika T1D. Neméně důležité jsou faktory vnějšího prostředí. Již bylo prokázáno, že prostředí, ve kterém žijeme a vyrůstáme, interaguje s epigenetickou informací člověka (FRAGA *et al.* 2005). Dokumentuje to i neustále stoupající incidence T1D. Interakce mezi epigenomem člověka a vnějším prostředím probíhá prostřednictvím epigenetických modifikací. Epigenetické modifikace tak mohou měnit expresi genů, aniž by měnily nukleotidovou sekvenci DNA. Díky epigenetickým modifikacím může docházet k modulaci diferenciaci a odpovědi buněk imunitního systému. Rozvoj některých autoimunitních a nádorových onemocnění souvisí s deregulací epigenetických modifikací.

Jednou z epigenetických modifikací je methylace DNA. Methylace DNA může ovlivnit expresi genů *HLA DQA1* a *HLA DQB1*, které jsou nejvíce predispoziční k T1D. Proteinové produkty těchto genů vytváří vazebný žlábek HLA DQ a váží peptidové fragmenty (autoantigeny).

Cílem této diplomové práce je analyzovat expresi jednotlivých alel genu *HLA DQA1* u pacientů s T1D. Součástí diplomové práce je stanovení metylačního stavu promotorových úseků jednotlivých alel genů *DQA1* a provedení expresní analýzy na úrovni mRNA. Stanovení exprese jednotlivých alel genu *HLA DQA1* může přispět k objasnění etiopatogeneze T1D.

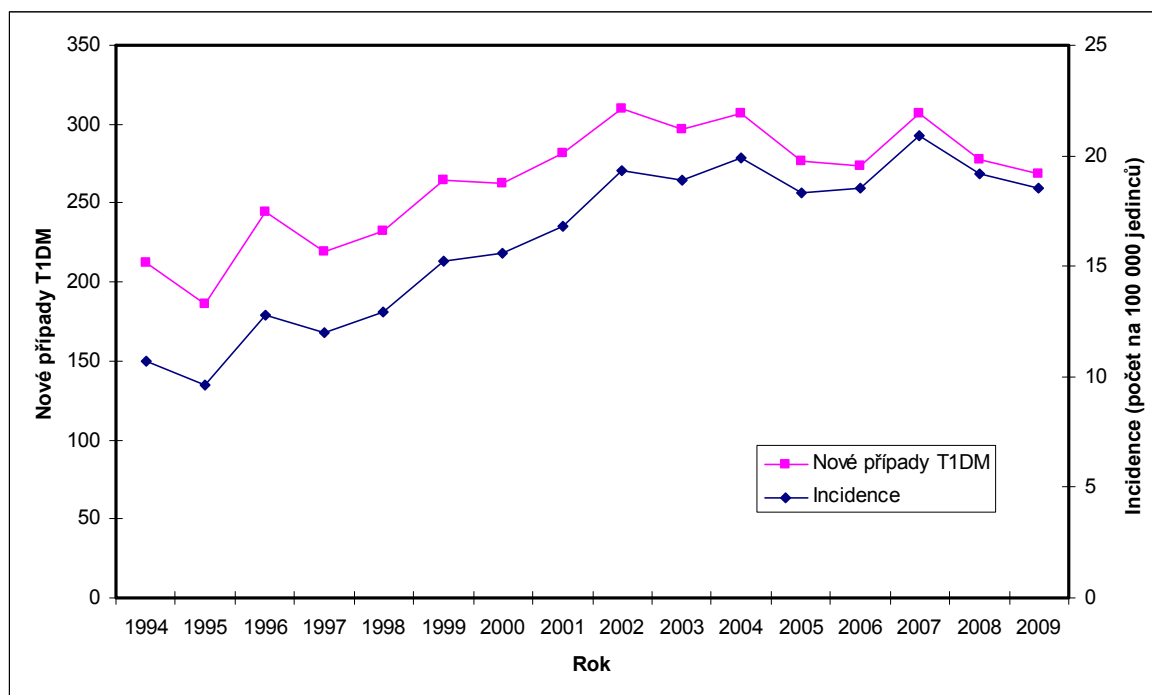
1.1. Diabetes mellitus 1. typu

1.1.1. Epidemiologie T1D

Vzhledem k neustále stoupající incidenci pacientů s diabetem 1. typu v Evropě byla založena skupina EURODIAB, která sdružuje lékaře a epidemiology z celého kontinentu. Cílem tohoto sdružení je podávat spolehlivé informace ohledně incidence T1D.

Průměrný roční přírůstek činí 4 %. Odhaduje se, že v roce 2020 se incidence T1D u dětí do 5 let zdvojnásobí. Narůst lze nejlépe ilustrovat na finské populaci, které patří celosvětově první příčka v incidenci T1D. Za poslední půl století zde u dětí stoupla incidence T1D z 12/100 000 na 63/100 000 (PATTERSON *et al.* 2009). Zvýšení incidence nebylo provázeno zvýšením frekvence hlavních rizikových genů T1D (*HLA II-DR, DQ; INS; PTPN22; CTLA 4*) (BARRET *et al.* 2009). Nejnižší incidence je pak ve východní Evropě – Rumunsko, Makedonie (PATTERSON *et al.* 2009).

Ve srovnání s Evropou je incidence T1D v České republice na střední úrovni. Dle ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS) bylo v České republice v roce 2011 evidováno 55 811 diabetiků 1. typu (ÚZIS ČR 2012). Vývoj incidence české dětské populace (0-14 let) je ilustrována na **obrázku č. 1** (CINEK 2010).



Obrázek číslo 1. Vývoj incidence diabetu 1. typu v české dětské populaci (0-14 let), (CINEK 2010).

Celosvětově jsou rozdíly v incidenci T1D velké. Největší incidence T1D je na severní polokouli (již zmíněné Finsko a také Švédsko) a naopak nejnižší incidence T1D na jižní polokouli (jižní Afrika, Jižní Amerika a Asie). Velké rozdíly v incidenci jsou pravděpodobně dány různou distribucí alel HLA u různých etnických skupin a nebo také různými životními podmínkami (RONINGEN *et al.* 2001). Některé studie připisují zvýšenou incidenci T1D stoupajícímu věku prvorodiček (SUMNIK *et al.* 2004). Diskutován je také vliv vitamínu D, který může mít protektivní efekt na rozvoj T1D (ZHANG *et al.* 2012).

1.1.2. Diagnostika T1D

Pro diagnostiku T1D je důležitá přítomnost autoprotilátek namířených proti složkám β buněk Langerhansových ostrůvků. Autoprotilátky lze u pacienta nalézt již v preklinické fázi choroby a to u 85 - 90 % pacientů. Autoprotilátky jsou tvořeny proti dekarboxylase kyseliny glutamové (izoforma GADA 65), tyrosin fosfatase (IA-2A), insulinu (IAA) a proti cytoplasmatickým složkám β buněk souhrně nazývaných ICA (islet cell antigens) (WINTER *et al.* 2002).

Mezi další vyšetření, které pomáhají diagnostikovat T1D patří metody testování sekrece imunoreaktivního insulinu a peptidu C. Peptid C vzniká štěpením proinsulinu a je sekretován v ekvimolárním poměru spolu s insulinem. Toho se také využívá při diagnostice. Hodnoty peptidu C na lačno jsou u zdravých lidí v rozmezí 0,2 – 0,6 nmol/l. U lidí nemocných T1D jsou β buňky ničeny autoimunitním procesem a nejsou schopny produkovat dostatek insulinu a tedy ani peptidu C. Odpovídají tomu i velmi nízké hodnoty peptidu C (méně než 0,02 nmol/l) na lačno a po stimulaci, které svědčí pro T1D (PELIKÁNOVÁ a BARTOŠ *et al.* 2003).

1.1.3. Genetika T1D

T1D patří mezi multifaktoriální a polygenní onemocnění. Polygenní je proto, že na míře rizika se podílí více než 40 genů a genových komplexů, které různou měrou přispívají k etiopatogenezi T1D (BARRET *et al.* 2009). Geny asociované s T1D jsou označovány jako lokusy IDDM (z angl. insulin dependent diabetes mellitus). K jejich identifikaci bylo zapotřebí analyzovat velké množství dat z etnicky různých populací. Jako hlavní predispoziční lokus T1D byl určen lokus IDDM 1 (genový komplex HLA), který představuje přibližně 50 % genetického rizika. Mezi významné lokusy, které dále přispívají k riziku T1D jsou lokusy IDDM 2 (*INS*), IDDM 12 (*CTLA-4*) a dále gen *PTPN22* (TODD 2010).

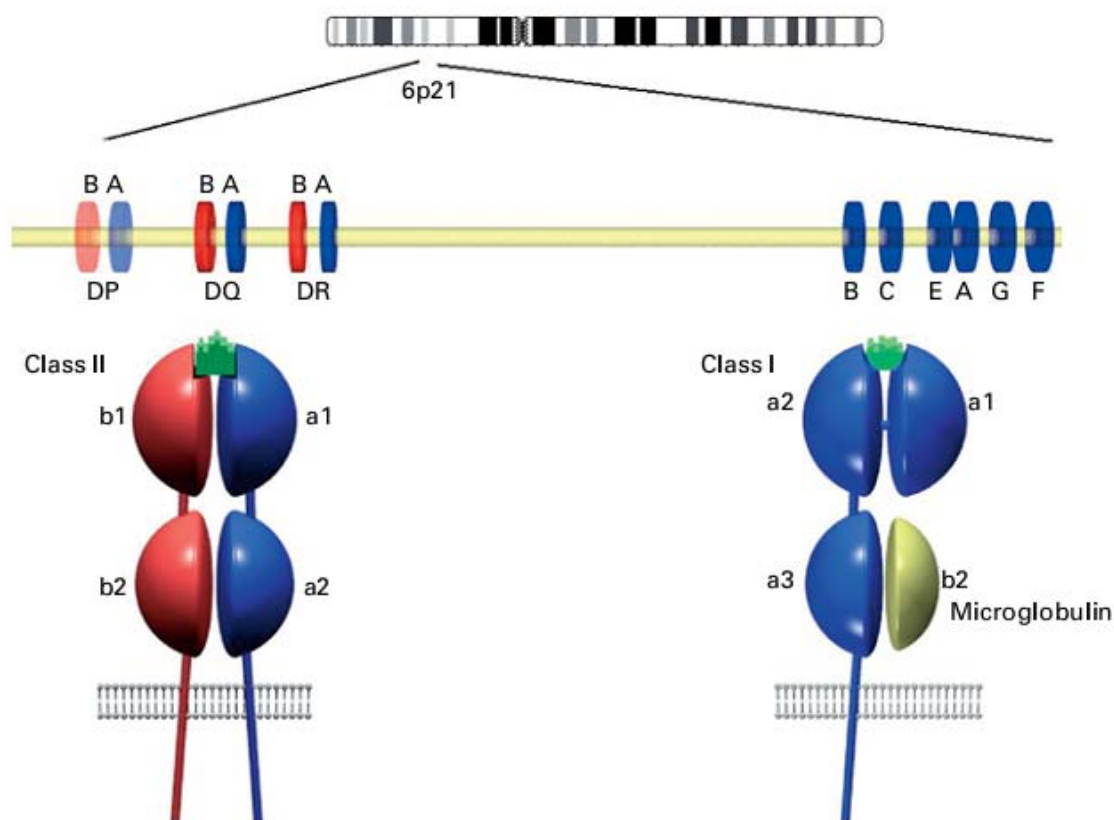
Pro jednotlivce obecné kavkazské populace je uváděno procentuální riziko onemocnění T1D 0,4 %. Pokud je matka nebo otec diabetik 1. typu zvyšuje se riziko potomka na > 1 % resp. > 3%. Riziko u sourozenců je 15x vyšší než u obecné populace. To tedy znamená, že onemocní-li jeden ze sourozenců T1D druhý sourozenec má 6 % riziko, že se u něho T1D také projeví (ČERNÁ 2008). Nejlépe lze dědičnost T1D ilustrovat na hodnotách konkordance u monozygotních dvojčat (MZ), sdílejících 100 % alel. Hodnoty konkordance se u MZ pohybují v rozmezí od 25 % do 65 % (REDONDO *et al.* 2008). Proto je T1D řazeno mezi multifaktoriální onemocnění, jelikož na riziku onemocnění se podílí i negenetické vlivy. Nestačí být pouze „geneticky náchylný“ k projevu T1D, ale vliv prostředí moduluje počátek vzniku nemoci u T1D vnímavých jedinců. Ukazuje se, že stále více lidí s menšími genetickými předpoklady pro vznik T1D, je vnímavých k rozvoji tohoto autoimunitního onemocnění (FOURLANOS *et al.* 2008).

1.2. HLA genový komplex

HLA genový komplex je hlavní histokompatibilní komplex (MHC) člověka. Sekvence kompletního genového komplexu byla stanovena teprve v roce 1999 (GERAGHTY *et al.* 1999). HLA genový komplex se nachází na krátkém raménku 6. chromozomu a patří k nejvíce polymorfní oblasti celého lidského genomu. Polymorfismus má funkční význam, jelikož umožňuje imunitnímu systému uchovávat si dostatečnou imunogenetickou variabilitu, která je třeba k obraně před patogenními organismy. Kromě velkého polymorfismu je pro genový komplex HLA typická tzv. vazebná nerovnováha. Tento termín vyjadřuje, že geny (alely) jsou preferenčně děděny jako konzervované bloky. Z tohoto důvodu je obtížné určit, které alely přímo ovlivňují predispozice ke vzniku nemoci, a které alely jsou s nimi asociovány pouze sekundárně (KIM a POLYCHRONAKOS 2005).

Genový komplex HLA je dlouhý přibližně 4 megabaze, což představuje 0,1 % lidského genomu, a je s ním asociováno velké množství autoimunitních onemocnění jako je např. celiakie, T1D, revmatoidní artritida a další. Celý genový komplex je rozdělen do tří tříd: třídu I HLA, třídu II HLA a třídu III HLA. Tyto třídy jsou dále rozděleny do hlavních lokusů. HLA I. třídy se skládají z klasických lokusů (HLA A, HLA B, HLA C), neklasických lokusů (HLA E, HLA F, HLA G). HLA II. třídy pak z lokusů HLA DR, HLA DQ, HLA DP (**obrázek č. 2**). Obě uvedené oblasti HLA kódují molekuly HLA, které se významnou měrou podílí na regulaci adaptivní imunity lidské imunitního systému. Jde o transmembránové glykoproteiny, které váží a prezentují imunitnímu systému endogenní a exogenní peptidové fragmenty. Oblast HLA III. třídy pak kóduje imunologicky důležité

molekuly jako např. proteiny komplementu (C2, C4A, C4B), protein teplotního šoku (HSP 70) a cytokiny (TNF α , TNF β). Je zde lokalizováno také velké množství pseudogenů a genů o jejichž funkci není nic známo (ČERNÁ *et al.* 2000; ČERNÁ 2008; KOLOŠTOVÁ *et al.* 2002).



Obrázek číslo 2. Zjednodušené schéma genového komplexu HLA (KIM a POLYCHRONAKOS 2005). Levá strana obrázku: každý jednotlivý lokus DP, DQ a DR kóduje jeden α a jeden β řetězec molekuly HLA II. třídy. Pravá strana obrázku: každý jednotlivý lokus B, C, E, A, G, F kóduje jeden α řetězec molekuly HLA I. třídy. Gen kódující $\beta 2$ mikroglobulin je lokalizován mimo HLA lokus na 15. chromosomu. Peptidový fragment je vázán řetězci $\alpha 1$ a $\beta 1$ HLA II. třídy a řetězci $\alpha 1$ a $\alpha 2$ HLA I. třídy.

1.2.1. Struktura a funkce HLA I. třídy

HLA I. třídy jsou glykoproteiny složené z transmembránového řetězce α a s ním nekovalentně asociovaného řetězce β ($\beta 2$ mikroglobulin). Řetězec α je složen z tří globulárních podjednotek $\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\alpha 3$. Zatímco gen pro α řetězec je umístěn v polymorfním genovém komplexu HLA, gen pro $\beta 2$ mikroglobulin se nachází na 15. chromosomu mimo lokus HLA. HLA I. třídy jsou produkovány na téměř všech typech jaderných buněk a jejich primární funkcí je prezentace peptidových fragmentů

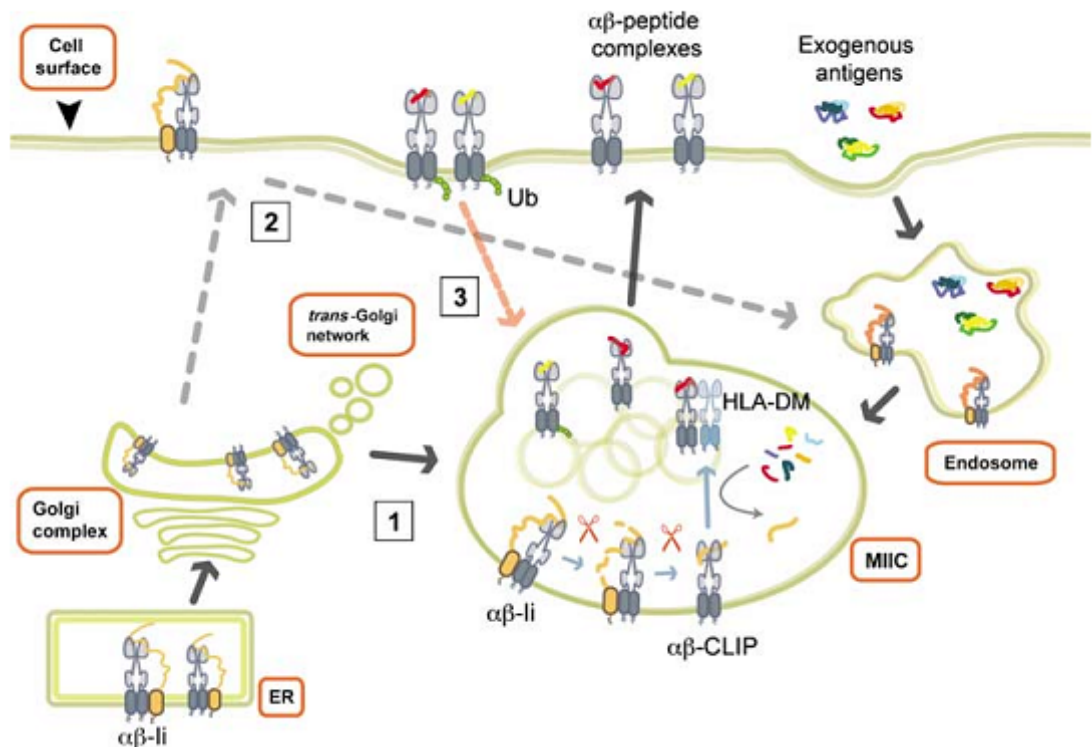
cytotoxickým CD 8+ T lymfocytům. Tyto peptidové fragmenty mají především endogenní původ, tedy jsou to peptidové fragmenty proteinů, které sama buňka produkuje (následkem infekce buňky to mohou být i virové proteiny). Samotné prezentaci peptidových fragmentů na povrchu buňky předchází několik kroků. Nejprve musí dojít k rozštěpení proteinu v proteasomu na peptidové fragmenty. Ty jsou poté transportovány do endoplasmatického retikula (ER), kde jsou podle afinity navázány do vazebného žlábků HLA I. třídy a dále transportovány na povrch buňky. Transport peptidových fragmentů do ER zajišťují peptidové transportéry TAP 1 a TAP 2 (z angl. transporter associated with antigen processing), které jsou součástí lokusu s geny pro HLA II. třídy.

Vazebný žlábek je u HLA I. třídy ohraničen a tudíž se do něj váží peptidové fragmenty o délce 8 – 10 aminokyselin. O vazbě peptidu na HLA I. třídy rozhodují strukturální rysy peptidu (tzv. vazebný motiv). Vazebný motiv peptidu obvykle určují 1 – 2 aminokyseliny poblíž konců peptidu (HOŘEJŠÍ a BARTŮŇKOVÁ 2009; NEEFJES *et al.* 2011).

1.2.2. Struktura a funkce HLA II. třídy

HLA II. třídy se skládají ze dvou glykosylovaných transmembránových řetězců α (těžký řetězec) a β (lehký řetězec), které jsou navzájem spojeny nekovalentní interakcí. Oba transmembránové řetězce α , β obsahují 2 globulární domény $\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\beta 1$, $\beta 2$. Vazebný žlábek je tvořen $\alpha 1$ a $\beta 1$ doménou heterodimeru, narozdíl od HLA I. třídy není ohraničen, a umožňuje vazbu peptidových fragmentů o délce 15 – 35 aminokyselin. Produkce HLA II. třídy je za fyziologických podmínek omezena pouze na buňky prezentující antigen (buňky dendritické, B lymfocyty, monocyty) (HOŘEJŠÍ a BARTŮŇKOVÁ 2009). Po stimulaci některými cytokiny (zejména IFN γ) může být indukována i v ostatních buněčných typech organismu kromě trofoblastů (TING a TROWSDALE 2002).

Primární funkcí HLA II. třídy je prezentace exogenních antigenů pomocným CD 4⁺ T lymfocytům. Často to bývají proteiny bakteriálního původu nebo autoantigeny. Zpracování antigenu je trochu odlišné než u HLA I. třídy, jelikož k vazbě peptidových fragmentů na HLA II. třídy dochází až ve specializovaném kompartmentu (**obrázek č. 3**) (ROCHA, NEEFJES 2008).



Obrázek číslo 3. Mechanismus prezentace antigenů pomocí HLA II. třídy (ROCHA, NEEFJES 2008). Do vazebného žlábků heterodimeru $\alpha\beta$ je připojen invariantní řetězec, který brání vazbě peptidových fragmentů lokalizovaných v ER. Ii (invariantní řetězec) obsahuje dileucinový motiv, který směřuje HLA komplex do endocytotické dráhy, buď přímo přes trans Golgiho aparát a nebo nepřímo přes internalizaci (ROCHE *et al.* 1993). Vazba peptidových fragmentů probíhá v kompartmentu nazývaném MIIC (kompartiment obsahující HLA II. třídy). Nejdříve je pomocí proteas odštěpena část Ii, zbyváající část zvaná CLIP (z angl. class II associated invariant chain peptide) zůstává nadále vázána na HLA II třídy. CLIP je poté v prostředí kyselého pH odštěpen proteolytickými enzymy odštěpen a pomocí chaperonového proteinu HLA DM je zprostředkována výměna CLIPu za peptidový fragment (MOSYAK *et al.* 1998). HLA DM tak v podstatě funguje jako rezervoár peptidových fragmentů, a jelikož je strukturně podobný HLA II. třídy, zajišťuje dostatečnou vazebnou afinitu peptidového fragmentu (KROPSHOFER *et al.* 1996). Po integraci celého komplexu HLA do plasmatické membrány může být β řetězec HLA II. třídy označen ubiquitinem. Ubikvitinace pak vede ke zvýšené internalizaci HLA II. třídy (SHIN *et al.* 2006).

1.2.3. Regulace exprese HLA genů

Expres HLA genů je regulována zejména na transkripční úrovni pomocí regulačních sekvencí. Kromě klasických regulačních sekvencí TATA, CCAAT obsahují HLA II. třídy specifické regulační sekvence, které jsou situovány 150 – 300 párů bazí před místem iniciace transkripce (TING a TROWSDALE 2002). Podle počátečních písmen čtyř regulačních sekvencí (S, X, X2, Y) se celá regulační oblast nazývá modul SXY. Moduly SXY lze nalézt v promotorových sekvencích všech genů HLA II. třídy včetně HLA DQ,

DR, DP a dále pak v promotorech genů kódujících Ii a chaperonový protein HLA DM (BOSS a JENSEN 2003). Ačkoliv sekvence regulačních oblastí je vysoce konzervována, u genů *DQA1*, *DQB1* a *DRB1* byly nalezena polymorfní místa (PERFETTO et al. 1992, DEL POZZO et al. 1993, ANDERSEN et al. 1991). Polymorfismy regulačních sekvencí mohou ovlivnit expresi genů HLA a podílet se na autoimunitních procesech (MORZYCKA et al. 1997, HAAS et al. 1995).

Promotor genu HLA DQA1 obsahuje hypervariabilní oblast 200 – 240 párů bazí před exonem 1. Na základě zjištěných polymorfních míst v hypervariabilní oblasti bylo definováno 10 různých alelických variant promotoru (QAP 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 2.1, 3.1, 3.2, 4.1, 4.2), které jsou označovány jako alely QAP (promotory DQA1). Alely QAP se chovají vůči genu DQA1 „promiskuitně“, to znamená, že 1 alela genu DQA1 může být ve vazbě s různými QAP alelami (HAAS et al. 1994).

Alelická variabilita regulačních sekvencí může mít na vliv na expresi genů HLA DQ a na produkci heterodimerů HLA DQ. Úroveň exprese HLA může být také ovlivněna vyšším stupněm methylace regulačních oblastí (MAJUMDER a BOSS 2011). Rozdíly v methylaci byly pozorovány například v promotorech alel *DQB1*0301*, *DQB1*0302* a *DQB1*0303* (TOYODA et al. 1992).

1.2.4. Asociace T1D s HLA molekulami

První poznatky o asociaci HLA s T1D byly publikovány v 70. letech 20. století. Tehdy bylo prokázáno, že T1D je asociován s alelami lokalizovanými v lokusu B HLA I. třídy (alely B8 a B15) (NERUP et al. 1974). Postupem času byly sérologicky určeny HLA II. třídy a odhalena jejich silná asociace s T1D. O několik let později byla pomocí RFLP (z angl. restriction fragment length polymorphism) analýzy určena asociace T1D s heterodimerem HLA DQ (SCHREUDER et al. 1986). Asociace mezi HLA DQ a T1D byla potvrzena u zvířecího modelu autoimunitního diabetu NOD (z angl. nonobese diabetes) myši. U myši byly nalazeny homology molekul DR a DQ, které se nazývají I-A a I-E. NOD myši, u kterých se spontánně rozvíjí T1D postrádají I-E (homolog DR) a naopak produkují jediný HLA II. třídy, kterým je molekula I-A (homolog HLA DQ). V roce 1987 byly sekvenovány geny pro α a β řetězec molekuly I-A diabetických a nediabetických myši a jejich sekvence porovnány. β řetězec molekuly I-A diabetických a nediabetických myši se lišil v kodonu 56 a 57. Molekula I-A NOD myši obsahuje na aminokyselinové pozici 57 serin a molekula I-A nediabetických myši obsahuje místo serinu aspartát (ACHA – ORBEA et al. 1987). Tato studie přispěla k závěru, že záporně nabitý aspartát umožňuje vazebnému žlábků HLA DQ silnější interakci s peptidovým

fragmentem a má protektivní efekt na vznik T1D. Podobné vazebné studie byly pozorovány i u dalších molekul HLA DQ 3.2, DQ 2.1 a DQ 6.2 (ČERNÁ 2007).

Ačkoliv mnoho studií potvrdilo asociaci T1D s molekulami HLA DR a DQ, stále není dostatečně známa jejich úloha v etiopatogenezi T1D. Jednou z hypotéz je, že rizikovost alel je způsobena menší afinitou DR a DQ molekul k některému ostrůvkovému autoantigenu. Následkem toho pravděpodobně dochází k porušení centrální a periferní tolerance vůči autoantigenu a vede k selekci odlišného buněčného repertoáru T lymfocytů (OUNISSI – BENKALHA, POLYCHRONAKOS 2008).

Dnes je obecně přijímaný fakt, že hlavní genetické markery T1D tvoří HLA II. třídy (konkrétně genotyp *HLA DQA1*, *DQB1* s přispěním subtypu *HLA DRB1*04*. Nejvíce predispoziční haplotyp tvoří *DQB1*0302 – DQA1*0301 – DRB1*0401* a dále pak *DQB1*0201 – DQA1*0501 – DRB1*0301*. Kombinace alel *DQB1*0302 – DQA1*0301* patří vůbec k nejrizikovějšímu haplotypu kavkazské populace. Naopak protektivní efekt má alela *DQB1*0602*. Přítomnost alely *DQB1*0602* je dominantní vůči rizikové kombinaci *DQB1*0302 – DQA1*0301*: jediná kopie této alely stačí pro negativní asociaci s T1D (ČERNÁ 2008, MOUSTAKAS a PAPADOPOULOS 2002). Protektivní a rizikové alely jsou shrnuty v **tabulce č. 1**. Hodnoty relativního rizika větší než 1 poukazují na stupeň rizikovosti jednotlivých alel. Hodnoty relativního rizika menší než 1 poukazují na stupeň protektivity jednotlivých alel.

Tabulka číslo 1: Kombinace *DQA1* a *DQB1* genů asociovaných s diabetem 1. typu u kavkazské populace (MOUSTAKAS a PAPADOPOULOS 2002).

DQA1, DQB1	pozice ^a	Asociovaný DR	Relativní riziko
Rizikovost			
<i>0301, 0302</i>	c	DR4	8 – 12
<i>0501, 0201</i>	c	DR3	3 – 5
<i>0301, 0201</i>	c/t		5 – 20
<i>0501, 0302</i>	c		8 – 35
<i>0301, 0303</i>	c	DR9	2
<i>0301, 0401</i>	c	DR4	4
<i>0301, 0402</i>	t		5 – 15
Protektivita			
<i>0102, 0602</i>	c	DR2	0.2

DQA1, DQB1	pozice ^a	Asociovaný DR	Relativní riziko
0103, 0603 ^b	c	DR6	0.2
0103, 0601	c	DR2, DR8	0.2
0501, 0301	c	DR5	0.2 – 0.4

^a t = trans nebo c = cis pozice DQA1 a DQB1 genů

^b asociace nebyla nalezena u řecké populace

1.2.5. Asociace T1D s tzv. non HLA geny

1.2.5.1 Insulin

Gen pro insulin (*INS*) je lokalizován na 11. chromosomu lidského genomu a patří mezi druhý geneticky nejvýznamnější lokus T1D (přibližně 10% rizika). Ve vzdálenosti 596 párů bazí před genem pro insulin se nachází variabilní počet tandemových repetitiv (VNTR), který výrazně ovlivňuje transkripci insulinového genu. Míra transkripce insulinového genu mění pravděpodobnost ustavení centrální tolerance vůči insulinu a zvyšuje nebo snižuje riziko diabetu. Homozygot, který obsahuje krátkou formu VNTR (26 – 63 tandemových repetitiv) má přibližně 3x větší riziko vzniku T1D než jedinec, který má alespoň jednu dlouhou formu VNTR (140 – 210 tandemových repetitiv). Dlouhá forma VNTR se tedy projevuje dominantně vůči krátké formě VNTR (BENNET *et al.* 1995, UNDLIEN *et al.* 1995).

1.2.5.2 CTLA 4 (z angl. cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4)

Dalším genem, který je asociován s T1D je *CTLA 4*. Gen *CTLA 4* kóduje povrchovou molekulu T lymfocytů, která reguluje imunitní odpověď T buněk. Molekula CTLA 4 je koreceptorem T lymfocytů, který je vysoce homologní s dalším koreceptorem CD28. Oba koreceptory se dokonce váží na stejný receptor CD80/86. Zatímco interakce mezi CD 28 a CD80/CD86 má pozitivní regulační efekt a vede k aktivaci T lymfocytů, interakce mezi CTLA 4 a CD80/86 má negativní regulační účinek a brání aktivaci a proliferaci T buněk. Za negativní regulační účinek je odpovědná intracelulární část CTLA 4, která obsahuje fosfatasovou aktivitu.

Zvýšené riziko T1D souvisí s mutacemi a polymorfismy v genu CTLA 4. Asociace T1D s genem CTLA 4 byla nalezena u polymorfismu +49A/G a dále pak u mikrosatelitu (AT)_n, který se nachází v 3' netranslatované oblasti genu (UEDA *et al.* 2003, KAVVOURA a IOANNIDIS 2005).

1.3. Epigenetika

Epigenetika se zabývá studiem vratných změn funkce genu, aniž by došlo ke změnám v sekvenci jaderné DNA. Epigenetické mechanismy umožňují buňkám s identickým genotypem vznik odlišných fenotypů a přenos informace do dceřiných buněk. Tyto děje se podílejí na buněčné diferenciaci, morfogenezi a adaptabilitě jedince.

1.3.1. Chromatinová struktura

Jaderná DNA se vyskytuje u vyšších eukaryot ve dvou základních morfologických stavech chromatinu – euchromatinu a heterochromatinu. Heterochromatin je kompaktnější a obecně transkripčně neaktivní, zatímco euchromatin je méně kompaktní a více transkripčně aktivní. Základní podjednotku chromatinu tvoří nukleosom, který je složen z histonového oktameru, (tetramer H3 a H4 a dva dimery H2A a H2B) kolem kterého je ovinuto 147 páru bazí DNA. Nukleosomy jsou dále spojeny spojníkem o 20 – 80 párech bazí a vytváří spolu strukturu 30 nm vlákna, které je stabilizováno dalším typem histonu, histonem H1 (LUGER *et al.* 1997).

Histony jsou bazické proteiny, které obsahují vyšší podíl kladně nabitých aminokyselin jako lysin a arginin. Elektrostatická interakce mezi kladně nabitými aminokyselinami a záporně nabitou cukr-fosfátovou kostrou DNA umožňuje (zesiluje) vzájemnou vazbu mezi DNA a histony. Všechny čtyři jaderné histony (H2A, H2B, H3 a H4) obsahují N a C koncovou doménu, která vystupuje z nukleosomu a poskytuje platformu pro posttranslační modifikace histonů (mono, di-, tri- methylace, acetylace, fosforylace, SUMOylace, ADP ribosylace, ubikvitinace, prolinová izomerace, deiminace). Tyto posttranslační modifikace histonů ovlivňují kondenzaci chromatinu, genovou transkripci a dále se podílí na buněčných procesech spojených s opravou a replikací DNA (KOUZARIDES 2007, NELSON *et al.* 2006, CUTHBERT *et al.* 2004). Mezi epigenetické modifikace patří také DNA methylace a RNA interference. Zatímco posttranslační modifikace histonů a DNA methylace regulují přepis genů na transkripční úrovni, RNA interference reguluje expresi posttranskripčně.

1.3.2. Methylace DNA

Methylace DNA patří mezi intenzivně studované epigenetické modifikace a je jedinou dosud známou epigenetickou modifikací DNA. V savčím genomu dochází k methylaci na pátém uhlíku cytosinu a to většinou v dinukleotidech CpG (cytosin-fosfát-guanin). V lidských somatických buňkách je takto methylováno 70 – 80 % všech dinukleotidů CpG (EHRlich *et al.* 1982). Dinukleotidy CpG nejsou v genomu rozděleny

rovnoměrně, ale jsou často koncentrovány v tzv. CpG ostrůvcích. Většinou se CpG ostrůvky nachází v promotorových částech genů a jejich hypermethylace je spojována s represí transkripce (SIGFRIED *et al.* 1999).

Přenos methylové skupiny na pátý uhlík cytosinu katalyzují enzymy nazývané DNA methyltransferasy (DNMT). Donorem methylové skupiny je S-adenozyl methionin.

1.3.2.1 Rozdělení a funkce DNMT

DNMT se rozdělují do dvou tříd podle funkce a preference k substrátu. První třídu DNMT tvoří methyltransferasy DNMT3a a DNMT3b, které preferují nemethylované řetězce DNA. Krátce po fertilizaci totiž dochází ke globální demethylaci genomu (kromě genomicky imprintovaných genů) a následně během ranného embryonálního vývoje dochází k opětovné DNA methylaci a k ustavení nových methylačních vzorů. Za ustavení nových methylačních vzorů jsou odpovědné právě DNMT3a a DNMT3b (označovány jako *de novo* methyltransferasy). Jakmile je methylační vzor ustaven, je s vysokou přesností dále předáván z jedné buněčné generace na druhou. Předání methylačních vzorů zajišťuje druhá třída DNMT, která je označována jako „udržovací“. Jediným zástupcem této třídy je DNMT1 (KLOSE a BIRD 2006). V časně S fázi buněčného cyklu je DNMT1 transportována do jádra a navázána na hemimethylovaný DNA řetězec. Po vazbě na DNA (během replikace DNA) kopíruje již ustavené methylační vzory na nově syntetizovaný řetězec DNA (FATEMI *et al.* 2001).

Cílené inaktivace DNMT ukázaly, že jsou pro vývoj organismu nepostradatelné a jejich absence vede k různým vývojovým defektům. Pokusy na myších ukázaly, že inaktivace DNMT3b není slučitelná s vývojem plodu. Inaktivace DNMT3a vedla k brzkému úmrtí jedince hned po narození (OKANO *et al.* 1999). V průběhu vývoje embrya dochází pravděpodobně k přepnutí mezi DNMT3a a DNMT3b. Důležitou úlohu při regulaci aktivit obou enzymů má DNMT3L. DNMT3L je protein příbuzný DNMT, který postrádá methylační aktivitu, ale reguluje methylační aktivitu *de novo* methyltransferas DNMT3a a DNMT3b (SUETAKE *et al.* 2006, CHENG a BLUMENTHAL 2008).

Mimo zmíněné dvě třídy byl vyčleněn enzym DNMT2. Nedávno bylo zjištěno, že lidská DNMT2 by mohla katalyzovat methylaci RNA (JURKOWSKI *et al.* 2008).

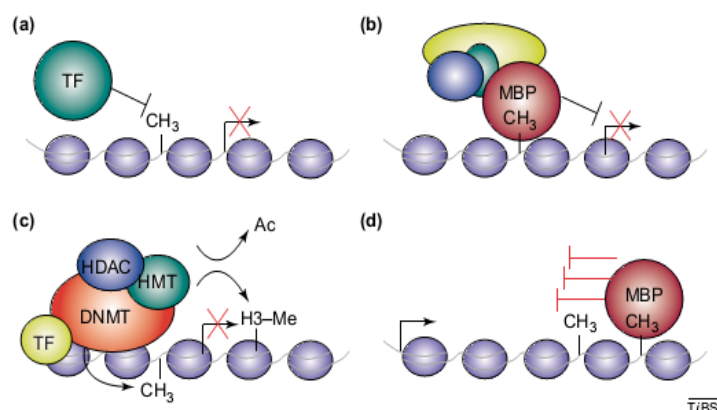
Dosud není známo, jak dochází k demethylaci řetězců DNA a zda existují enzymy, které demethylační aktivitu mají. K demethylaci DNA může docházet buď inhibicí nebo represí transkripce DNMT1, čímž by nedocházelo ke kopírování methylačních vzorů na nově syntetizované DNA řetězce. Druhou možností je, že demethylace DNA se účastní

DNA deaminasy, které katalyzují odstranění aminoskupiny z cytosinu. Odstranění aminoskupiny z cytosinu vede ke změně párování bazí z C:G na T:G. Nesprávné párování T:G je rozpoznáno reparačními enzymy DNA a může vést k opravě (MORGAN *et al.* 2004).

Nedávná studie ukázala, že DNMT mohou mít dvojí roli v methylaci CpG ostrůvků. U DNMT3a/DNMT3b byla pozorována deaminační aktivita, in vitro mohou deaminovat jak cytosin, tak i 5 methylcytosin (METIVIER *et al.* 2008).

1.3.2.2 Význam DNA methylace

Přidání methylové skupiny na cytosin má důležitou roli v regulaci genové exprese a kondenzaci chromatinové struktury. Pro regulaci genové exprese je důležitá methylace promotorového úseku a prvního intronu daného genu. Methylace zmíněných úseků buď blokuje přístup transkripčních faktorů nebo snižuje afinitu RNA polymerasy II vůči cílové sekvenci DNA. V konečném důsledku dochází k represí transkripce daného genu (SIGFRIED *et al.* 1999). Základní modely transkripční represe zprostředkované DNA methylací jsou shrnuty na **obrázku č. 4** (KLOSE a BIRD 2006).



Obrázek číslo 4. Modely genové represe způsobené methylací DNA (KLOSE a BIRD 2006).

a) DNA methylace brání vazbě transkripčního faktoru k cílové sekvenci a vede k transkripční represí. b) Methylová skupina cytosinu váže komplex methyl – vazebného proteinu (MBP) a korepresorů, které navozují transkripční represí. c) DNMT se na DNA váže v komplexu s ostatními chromatin modifikujícími enzymy jako například histondeacetylasy (HDAC). HDAC deacetyluje chromatin a vyvolávají kondenzaci chromatinu a represí transkripce. d) DNA methylace v těle genu může také vést k transkripční represí. V tomto případě brání methylová skupina elongaci RNA polymerasy II.

1.3.3. Vliv prostředí na epigenetické modifikace

Jedním z faktorů vnějšího prostředí může být strava jedince. Několik studií ukázalo, že složení stravy může ovlivnit biochemické dráhy methylačního procesu, dostupnost donorových skupin methyly (methionin a folát) a regulovat methyltransferasovou aktivitu (JAENISCH a BIRD 2003). První důkaz podala studie na myším modelu (myši *Agouti*), u kterého bylo zjištěno, že strava matky během těhotenství má zásadní vliv na epigenom potomka. Genom agoutů obsahuje genomicky imprintovaný gen, jehož produkt ovlivňuje tvorbu žlutého pigmentu. Během těhotenství samičky způsobuje strava bohatá na methyl hypermethylaci zmíněného genu, vede ke změně barvy srsti a k prodloužení života potomka. Důležité je, že změna v methylaci je trvalá a je dále předávána na další generace (WOLFF *et al.* 1998, COONEY *et al.* 2002). Další studie dokumentuje, že krmení těhotných potkanů stravou omezenou na proteiny, vede ke zvýšené hypomethylaci CpG dinukleotidů (LILLYCROP *et al.* 2008).

Nedávno byla publikována studie, která naznačuje, že u lidí dochází k podobným regulačním mechanismům jako u zvířecích modelů. Bylo ukázáno, že prenatální hladovění vede ke změně epigenetické informace člověka, která přetrvává po celý život jedince. Jedinci, které byly prenatálně vystaveny hladovění měli o 6 desetiletí později méně methylovaný imprintovaný gen IGF2 ve srovnání s neexponovanými sourozenci (HEIJMANS *et al.* 2008). Velice zajímavá je také epigenetická studie, která srovnává epigenom monozygotních dvojčat. Fraga a kol. ukázaly, že geneticky shodná monozygotní dvojčata se liší v DNA methylaci a histonových modifikacích. Zatímco 65 % monozygotních dvojčat mělo téměř shodný profil v methylaci genomové DNA a acetylaci histonů H3 a H4, u 35 % monozygotních dvojčat se profil v těchto ukazatelích lišil. Odlišnosti závisely jednak na věku dvojčat a dále pak na době, po kterou spolu dvojčata vyrůstala (FRAGA *et al.* 2005). Je pravděpodobné, že faktorů, které se podílejí na regulaci epigenomu jedince je daleko více a je potřeba jim dále věnovat pozornost.

2. Cíle diplomové práce

Tato diplomová práce je pilotní studií odvozené z probíhající studie realizované na Ústavu obecné biologie a genetiky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, která se zabývá významem epigenetické regulace genů HLA II. třídy u pacientů s autoimunitním diabetem a zdravých kontrol. Cílem této diplomové práce je získat první data o úrovni methylace promotorů genu *HLA DQA1* a stanovit expresi jednotlivých alel genu *HLA DQA1*. Vzhledem k tomu, že se jedná o dílčí studii, zabývali jsme se pouze pacienty T1D.

Cíle práce

- 1) Genotypizace genů *HLA DQA1*, *HLA DQB1* a *HLA DRB1* pomocí sekvenčně specifických primerů.
- 2) Určit rozdíly v methylaci mezi promotory genu *HLA DQA1*.
- 3) Pomocí kvantitativního PCR stanovit expresi jednotlivých alel genu *HLA DQA1* u pacientů s T1D.

3. Použitý materiál, chemikálie a přístroje

3.1. Pufry a roztoky

Izolace DNA

RCLB (roztok pro lýzu erytrocytů):	5 mM MgCl ₂ 320 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 monocytů a B lymfocytů

Pufř 1	PBS pH 7.4 0,1% (w) BSA
Pufř 2	PBS (bez Mg ²⁺ nebo Ca ²⁺) 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 ₂ O do 1 litru

Ověření pozitivně transformovaných kolonií (PCR colony)

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 dH₂O

3.2. Enzymy

Proteinasa K 30 U/mg (Sigma Aldrich, USA)
Taq DNA polymerasa 500U, 5U/μl (Fermentas, Kanada)

3.3. Komerční soupravy a kity

Magnetická separace monocytů a B lymfocytů (Invitrogen, USA)
Dynabeads CD14[®]
Dynabeads CD19[®] Pan B

HLA genotypizační kity (Genovision, USA)

Olerup SSP[™] DR low resolution kit

Olerup SSP[™] DQ low resolution kit

Olerup SSP[™] DQB1 * 02

Olerup SSP[™] DQB1 * 03

Olerup SSP[™] DQB1 * 04

Olerup SSP[™] DQB1 * 05

Olerup SSP[™] DQB1 * 06

Olerup SSP[™] DQA1

Bisulfitová konverze

Epitect[®] Bisulfite Kit (QIAGEN, USA)

Ochranný pufr DNA

Pufr BW a BD (dle pokynů výrobce smíchané s 96-100 % ethanolem)

Pufr BL

Přečištění PCR produktu

GenElute[™] Gel Extraction Kit (Sigma Aldrich, USA)

Solubilizační roztok

Roztok pro přípravu kolonky

Promývací roztok (dle pokynů výrobce smíchané s 96-100 % ethanolem)

PCR reakční kit (Fermentas, Kanada)
dNTPs - dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM)
Taq DNA polymerasa 500 U, 5U/ μ l,
10x *Taq* pufr s KCl
25 mM MgCl₂

Izolace RNA
GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich, USA)
Lyzační roztok (dle pokynů výrobce smíchán s 2-merkapt ethanol)
Promývací roztok 1
Promývací roztok 2 (dle pokynů výrobce smícháno s ethanol)
2-merkapt ethanol

QIAamp® RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, USA)
Pufr EL
Pufr RLT (předem smíchán s β -merkapt ethanol dle pokynů výrobce)
Pufr RW1
Pufr RPE (předem smíchán s 96-100% ethanol dle pokynů výrobce)

Reverzní transkripce
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA)
10 x RT pufr
25 x dNTP mix (100 mM)
10 x RT náhodné primery
Multiscribe reverzní transkriptasa

3.4. Primery a sondy

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

Primery pro amplifikaci promotorového úseku *HLA DQA1* (Metabion International AG, Německo)

Vnější primery

Přímý primer 1 5' GGTTGTAAGTTAGAATATTTTGAAGGATG 3'

Zpětný primer 1 5' CAAACCAAACCCTACCAAATCA 3'

Vnitřní primery

Přímý primer 2 5' AGGTTGTTTAGAAATGTTTATTTTTGG 3'

Zpětný primer 2 5' AAAATCCCCTATAATAACATCTCAATTAC 3'

Ověření pozitivně transformovaných bakterií

primery SP6 a T7 (Metabion International AG, Německo)

SP6 primer 1 5' GATTTAGGTGACACTATAGA 3'

T7 primer 1 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Obdržené primery byly ředěny na koncentraci 100 μ M. Takto naředěné primery byly dále 2x (1:1) ředěny na pracovní koncentraci 50 μ M.

Kvantitativní PCR

Amplifikace jednotlivých alel *HLA DQA1*

Dodavatel primerů a sond (IDT, USA)

Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, USA)

Seznam primerů použitých při kvantitativním PCR

Primer	Sekvence (5'→3')	délka primeru	T _m [°C]
DQA1*01 F	GAAGGAGACTGCCTGGCG	18	53
DQA1*01 R	CATGATGTTCAAGTTGTGTTTTGC	23	54
DQA1*02 F	TTACGGTCCCTCTTGCCAGTT	21	55
DQA1*02 R	TTGCGGGTCAAATCTAAGTCTGT	23	55
DQA1*03 F	GGTCCCTCTGGGCAGTACAG	20	53
DQA1*03 R	CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT	22	55
DQA1*04 F	GTACACCCATGAATTTGATGGAGAC	25	55
DQA1*04 R	CAGGATGTTCAAGTTGTGTTTTGTC	25	55
DQA1*05 F	GATGAGCAGTTCTACGTGGACCT	23	54
DQA1*05 R	GTAGAGTTGGAGCGTTTAATCAGAC	25	54
DQA1 total F	TACAGCTCAGAACAGCAACTGC	22	53
DQA1 total R	CCCACAATGTCTTCACCTCCA	21	55
DQA1 intron F	GTTGCCCGTTTCTTTCTCTCA	21	54
DQA1 intron R	TGGACTCCTTACCCACTCCC	21	55
DRA1 F	GGACAAAGCCAACCTGGAAA	20	55
DRA1 R	AGGACGTTGGGCTCTCTCAG	20	54

Sekvence primerů a sond byla převzata z literatury (FERNANDEZ 2003 et al.), některé sekvence primerů a sond byly částečně upraveny. Sekvence tučně označených primerů byla nově navržena.

Seznam sond použitých při kvantitativním PCR

Sonda	Sekvence (5'→3')	délka sondy	T _m [°C]
DQA1*01	CCTGCGGGTCAAAACCTCCAAATTTG	26	66
DQA1*0203	CCACATAGAACTCCTCGTCTCCATCAAATTCAT	33	66
DQA1*0405	ACTGTCTGGTGTTCCTGTTCTCAGACAA	31	65
DQA1 total	CTTTGTTTAGGATCATCTCTTCCCAAGGC	30	65
DQA1 intron	ACCTGTGCCAGTCCCATGTGGAAAT	26	64
DRA1	CAACTATACTCCGATCACCAATGTACCTCCAGAG	34	65

Výběr endogenní kontroly

Taq Man Gene Expression Assay:

hu TBP: Hs 00427620_m1, Applied Biosystems, USA

hu B-actin, Hs 99999903_m1, Applied Biosystems, USA

PPIA: Hs 99999904_m1, Applied Biosystems, USA

hu RPS13: Hs 01011488-g1, Applied Biosystems, USA

3.5. Bakteriální kmeny, plasmidy a media

Bakteriální kmeny

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

Plasmidy

pGEM-T[®] Easy Apr, oriV ColE1 lacZ, 3015 pb Promega

Kultivační média

Pokud to bylo možné byla kultivační média a roztoky sterilizovány autoklávováním při přetlaku 0,1 MPa a teplotě 121 °C po dobu 25 minut. Roztoky IPTG a antibiotika byly sterilizovány filtrací přes 0,22 μ m Millipore filtr a před jejich přidáním do media byla ochlazena na teplotu minimálně 55 °C. Pro přípravu pevných medií byl do medií před autoklávováním přidán agar do výsledné koncentrace 1,8 % (w/v).

Lauria-Bertrani (LB) medium (pH 7,0-7,2)	10 g tryptonu
	5 g kvasnicového autolyzátu
	5 g NaCl
	doplněno H ₂ O do objemu 1 l

3.6. Ostatní roztoky a chemikálie

Většina použitých chemikálií a rozpouštědel certifikovaných pro elektroforézu nebo molekulární biologii bylo čistoty p.a.

Agaróza	(Serva, Německo)
Agaróza s nízkou teplotou tání	(Sigma Aldrich, USA)
BSA (hovězí sérový albumin)	(Sigma Aldrich, USA)
CaCl ₂ (chlorid vápenatý)	(Sigma Aldrich, USA)
CH ₃ COOH (kyselina octová)	(Lach-Ner, Česká republika)
dH ₂ O (destilovaná voda)	(Ardeapharma, Česká republika)
DNA žebříček 100 bp	(Norgen Biotek, Kanada)
DMSO (dimethylsulfoxid)	(Sigma Aldrich, USA)
EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová)	(Sigma Aldrich, USA)
Ethanol (96%, 70%)	(FNKV, Česká republika)
Ethanol absolutní (100%)	(Sigma Aldrich, USA)
Etidium bromidTB	(Top-bio, Česká republika)
GelRed (interakalační činidlo)	(Biotium, USA)

Glukosa	(Sigma Aldrich, USA)
HCl (kyselina chlorovodíková)	(Sigma Aldrich, USA)
H ₃ BO ₃ (kyselina boritá)	(Amresco, USA)
Chloroform	(Penta, Česká republika)
IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid)	(Sigma Aldrich, USA)
Izopropanol	(Sigma Aldrich, USA)
LB (Luria Bertrani) agar	(Sigma Aldrich, USA)
LB (Luria Bertrani) médium	(Sigma Aldrich, USA)
Marker pUC19 DNA/ <i>Msp I</i>	(Fermentas, Kanada)
MgCl ₂ (chlorid hořečnatý)	(Serva, Německo)
NaCl (chlorid sodný)	(Serva, Německo)
NaOH (hydroxid sodný)	(Penta, Česká republika)
KOAc (octan draselný)	(Sigma Aldrich, USA)
Kyselina octová (bezvodá)	(Sigma Aldrich, USA)
PBS (fosfátový pufr se solí)	(Gibco, USA)
Nanášecí pufr (6x konc.)	(Takara, Japonsko)
Sacharosa	(Sigma Aldrich, USA)
SDS (dodecylsulfát sodný)	(Sigma Aldrich, USA)
Sodná sůl ampicilinu	(Sigma Aldrich, USA)
Triton X – 100	(Sigma Aldrich, USA)
Tris baze	(Carl Roth, Německo)
Voda bez RNase, DNase	(Sigma Aldrich, USA)
X-Gal	(Sigma Aldrich, USA)

3.7. Přístroje a programy

Použité přístroje

Autokláv Systec DE-23	(Systec, Německo)
Automatická pipeta jednokanálová Biopipette A (1000 – 5000)	(Labnet, Polsko)
Automatické pipety jednokanálové Discovery+ (HTL) (Lab Solution, Polsko) (0,1 – 2; 2 – 20; 20 – 200; 100 – 1000)	
Centrifuga Z 300	(Hermle, Německo)
Centrifuga MPW-51 Polsko)	(Mechanika Precyzyjna, Polsko)
Elektroforetické vany	(Thermo Scientific, USA)

Gel logic 1500 - focení agarózových gelů	(Kodak, USA)
Hlubokomrazící box U410	(New Brunswick, UK)
LabCycler gradient SensoQuest	(Scholler, Německo)
Laminární box Auramini	(Bioair, Itálie)
Laminární box HERAsafe	(Heraeus, Německo)
Laminární box CleanAir	(Scholler, Německo)
Lednička ARC	(Whirlpool, USA)
Mikrovlnná trouba	(Zanussi, Itálie)
Minicentrifuga Z100 M	(Hermle, Německo)
Mraznička zásuvková	(Whirlpool, USA)
Nanofotometr	(Implen, Německo)
Plynový kahan Schuett phoenix	(Schuett – biotec.de, Německo)
Stolový vortex	(Scientific industrie, USA)
Termocykler C1000TM	(Bio-Rad, USA)
Třepačka a inkubátor NB205-QF	(N-Biotek, Korea)
UV Transluminátor MUVB20	(UltraLum, USA)
Váhy digitální 40SM-200A	(Precisa, Švýcarsko)
Zdroj napětí pro elektrof. separaci PowerPac 3000	(Bio-Rad, USA)
Zdroj napětí pro elektrof. separaci MP-250V	(Major Science, USA)
7000 SDS ABI Prism	(Applied Biosystem, USA)
Počítačové programy	
Bioedit (volně dostupná verze 7.0.9.0)	
Genesnap	(Syngene, UK)
Graphpad prism 5.04	
Kodak Molecular Imaging software, verze 5.0.	(Kodak, USA)
7000 Sequence Detection Software 1.2.3.	(Applied Biosystems, USA)

3.8. Soubor pacientů

Soubor 30 pacientů T1D je evidován ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady. Zkoumaný soubor pacientů má věkový rozptyl 21 – 76 let (průměrný věk činí 40,8 let; medián 38 let). Z 30 pacientů T1D bylo 10 ženského a 20 mužského pohlaví.

4. Metodika práce a postupy

Od 30 pacientů T1D byla v ranních hodinách odebrána plná periferní krev (přibližně 10 ml). Z plné periferní krve byla izolována DNA, RNA a separovány monocyty a B lymfocyty, ze kterých byla provedena izolace jak DNA tak i RNA. U T1D pacientů byl nejprve určen HLA genotyp, (*HLA DQA1*, *HLA DQB1* a *HLA DRB1*). DNA z plné krve, monocytů a B lymfocytů byla ošetřena bisulfitem, osekvenovaná a detekována methylace promotorového úseku alel *HLA DQA1*. Následně byla provedena kvantifikace exprese jednotlivých alel *HLA DQA1*.

4.1. Izolace chromosomální DNA z plné krve

Plná periferní krev byla odebrána do zkumavky s antikoagulační látkou – EDTA. DNA byla izolována z 0,5 ml plné krve pomocí vysolovací metody (Miller *et al.* 1998). Při izolaci DNA byla veškerá centrifugace prováděna při 18, 000 x g.

1. Erythrocyty byly lyzovány 1ml RCLB (roztok pro lýzu erythrocytů) a vzniklá suspenze centrifugována 5 minut. Supernatant byl odpipetován a peleta promyta 1ml dH₂O. Peleta byla poté znova promyta 1 ml dH₂O.
2. K peletě bylo přidáno 235 μ l dH₂O, 80 μ l WCLB (roztok pro lýzu leukocytů) a peleta důkladně resuspendována.
3. Bylo přidáno 40 μ l 10 % SDS (dodecylsulfát sodný) a 15 μ l proteinasy K (20 mg/ml v dH₂O).
4. Vzorky byly umístěny do inkubátoru a inkubovány při 57 °C na otáčecím rotátoru po dobu minimálně 30 minut.
5. Po ukončení inkubace byly vzorky ochlazeny na pokojovou teplotu a přidáno 100 μ l 6 M NaCl. Vzorky byly ručně důkladně protřepány a centrifugovány po dobu 6 minut.
6. Do nové zkumavky byl pomocí pipety odebrán supernatant a stočen po dobu 3 minut. Tento krok byl ještě jednou zopakován.
7. K supernatantu byl přidán vychlazený (-18 °C) absolutní 100 % ethanol a DNA vysrážena lehkým obrácením zkumavky. Pro vyšší výtěžek DNA byly vzorky umístěny do -18 °C na dobu přibližně 15 minut.
8. Vzorky byly stočeny (3 minuty) a peleta promyta 1 ml 70 % ethanolu. Následovala opětovná centrifugace (3 minuty). Supernatant byl odstraněn.

9. DNA byla zbavena zbytkového ethanolu vysušením v laminárním boxu. Poté byla DNA rozpuštěna ve 100 – 200 μl dH_2O a její koncentrace změřena na nanofotometru.

4.2. Magnetická separace monocytů (CD14) a B lymfocytů (CD19)

K magnetické separaci byly použity magnetické partikule Dynabeads[®] CD14 a Dynabeads[®] CD 19 pan B (Invitrogen, USA), které na svém povrchu nesou protilátky proti povrchovým antigenům monocytů a B lymfocytů. K izolaci monocytů a B lymfocytů bylo použito minimálně 5 ml plné periferní krve s antikoagulační látkou (EDTA).

4.2.1. Příprava magnetických partikulí Dynabeads CD 14 a CD19

Před použitím byly magnetické partikule CD14 a CD19 promyty dle pokynů výrobce.

1. Magnetické partikule byly v zásobní lahvičce resuspendovány a požadovaný objem partikulí odebrán do nové zkumavky. K partikulím byl přidán 1ml pufru 1 a celý roztok dán na vortex.
2. Zkumavka s magnetickými partikulemi byla umístěna k magnetu na dobu 1 minuty. Poté co byly vychytány magnetické partikule, byl opatrně odstraněn supernatant.
3. Zkumavka byla odejmuta z magnetu a byl přidán stejný objem pufru 1 jako byl počáteční objem magnetických partikulí.

4.2.2. Izolace monocytů (CD14) a B lymfocytů (CD19)

Izolace monocytů

1. Plná periferní krev byla rozředěna v dvojnásobném objemu pufru 2 a stočena při 600 x g (pomalé brzdění centrifugy) po dobu 10 minut.
2. Horní frakce byla odpipetována a zbylé buňky resuspendovány v pufru 2 na původní objem krve. Od této chvíle byly buňky neustále inkubovány na ledu.
3. Ke vzorku byl přidán doporučený objem magnetických partikulí Dynabeads CD14 (max. 25 μl na 1ml krve)*.
4. Magnetické partikule s monocyty byly inkubovány na otáčecím rotoru po dobu 30 minut 4 °C.
5. Monocyty byly vychytány přiložením zkumavky k magnetu na dobu 2 minut. Do nové zkumavky byl přenesen supernatant, ze kterého byly později izolovány B lymfocyty.

6. Vychytané monocyty byly v pufru 2 resuspendovány do původního objemu krve a znovu umístěny k magnetu na 2 minuty. Promytí monocytů v pufru 2 bylo opakováno, dokud nebyl roztok čirý (standartně 3x).
7. Monocyty byly resuspendovány ve 3 ml PBS.

*Výrobce na izolaci doporučuje 25 μ l magnetických partikulí na 1ml krve. K izolaci bylo použito min. $\frac{3}{4}$ doporučeného objemu.

Izolace B lymfocytů

Postup pro izolaci B lymfocytů byl shodný s postupem pro izolaci monocytů se dvěma rozdíly. 1) Na separaci B lymfocytů byly použity magnetické partikule Dynabeads CD19. 2) Na promytí B lymfocytů byl použit pufr 1. V posledním kroku byly B lymfocyty resuspendovány ve 3 ml PBS.

Z vyizolovaných monocytů a B lymfocytů bylo odebráno na izolaci DNA 0,5 ml a na izolaci RNA taktéž 0,5 ml. K přibližnému určení počtu buněk bylo odebráno 20 μ l od každého buněčného typu a buňky spočítány v Bürgerově komůrce. Zbylé buňky (~2ml) byly dále připraveny na chromatinovou imunoprecipitaci.

4.2.3. Izolace DNA monocytů a B lymfocytů

Izolace DNA monocytů a B lymfocytů proběhla za použití modifikované vysolovací metody dle postupu 4.1. Z postupu vysolovací metody byla vynechána lýze erytrocytů a izolace byla zahájena 2. krokem - přidáním WCLB. Izolovaná DNA byla rozpuštěna ve 25 – 30 μ l dH₂O.

4.3. Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena z monocytů, B lymfocytů a z plné krve. Izolace byla provedena okamžitě po obdržení krve T1D pacientů. Pro izolaci RNA monocytů a B lymfocytů byl použit GenEluteTM Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma Aldrich, USA). Izolace RNA z plné krve byla provedena pomocí QIAamp[®] RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, USA).

4.3.1. Izolace RNA z monocytů a B lymfocytů

Příprava buněk pro izolaci RNA

1. Buňky byly stočeny při 300 x g (5 min) a poté odstraněn supernatant.
2. K buňkám bylo přidáno 250 μ l lyzačního roztoku (před použitím přidán 2-merkapt ethanol dle pokynů výrobce) a buňky důkladně lyzovány na vortexu.

3. Lyzáty buněk byly nanесeny na GenElute filtrační kolonku, která byla umístěna do sběrné zkumavky. Kolonka byla stočena při 15, 000 x g po dobu 2 minut.
4. K získanému filtrátu bylo přidáno 500 μ l 70% ethanolu. Filtrát byl promíchán vortexováním a nanесen na GenElute vazebnou kolonku.

Izolace RNA

Veškerá centrifugace byla provedena při 18, 000 x g.

1. Filtrát byl nanесen na GenElute vazebnou kolonku a centrifugován 1 minutu. Obsah sběrné zkumavky byl vylit.
2. Ke kolonce bylo přidáno 500 μ l promývacího roztoku 1 a kolonka stočena po dobu 1 minuty.
3. Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky, přidáno 500 μ l promývacího roztoku 2 (před použitím naředěn ethanolem dle pokynů výrobce) a kolonka centrifugována po dobu 1 minuty. Obsah sběrné zkumavky byl vylit.
4. Znovu bylo přidáno 500 μ l promývacího roztoku 2 a kolonka centrifugována po dobu 2 min. Po odstranění filtrátu byl z kolonky odstraněn zbytkový ethanol opětovnou centrifugací po dobu 1 minuty.
5. Kolonka byla umístěna do nové sběrné zkumavky a doprostřed kolonky nanесeno 50 μ l vody bez RNase. RNA byla získána 1 minutovou centrifugací.
6. RNA byla umístěna do -80 °C a později využita pro reverzní transkripci do cDNA.

4.3.2. Izolace RNA z plné krve

1. Nejprve byly lyzovány erytrocyty smícháním jednoho objemového dílu (1ml) krve s pěti objemovými díly (5ml) pufru EL.
2. Lýze probíhala 10-15 minut na ledu. Během inkubace byly buňky 2x lehce zvortexovány.
3. Buňky byly stočeny (400 x g, 4 °C) po dobu 10 minut a poté opatrně odstraněn veškerý supernatant.
4. K peletě byly přidány 2 objemové díly pufru EL (2ml EL pufru na 1ml krve) a peleta resuspendována.

5. Buňky byly opět stočeny při 400 x g (4 °C) po dobu 10 minut a pomocí pipety odstraněn supernatant.
6. Peleta byla důkladně resuspendována ve 600 µl RLT pufru (předem smíchan s β-merkptoethanolem dle pokynů výrobce).
7. Do sběrné zkumavky byla umístěna QIAshredder kolonka a na ní nanesen homogenizovaný lyzát buněk. Kolonka byla stočena 2 minuty (18, 000 x g, 4 °C).
8. Kolonka byla vyhozena a ponechán filtrát.
9. Bylo přidáno 600 µl 70% ethanolu a filtrát promíchán pipetováním.
10. Celý objem vzorku byl poté nanesen na QIAamp kolonku, která byla předem umístěna do sběrné zkumavky. Vzorek byl centrifugován při 12, 000 x g po dobu 15 sekund.
11. QIAamp kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky, promyta 700 µl pufru RW1 a znovu stočena (12, 000 x g, 15 sekund).
12. Kolonka byla opět přenesena do nové sběrné zkumavky a přidáno 500 µl pufru BPE (předem přidán 96 - 100% ethanol dle pokynů výrobce). Kolonka byla stočena při 12, 000 x g po dobu 15 sekund.
13. Ke kolonce bylo znovu přidáno 500 µl pufru BPE a kolonka stočena při 18,000 x g po dobu 3 minut.
14. Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky a centrifugována při 18,000 x g po dobu 1 minuty.
15. Kolonka byla umístěna do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a do středu membrány naneseo 30 µl vody bez RNase. RNA byla získána 1 minutovou centrifugací při 12, 000 x g.
16. Vyizolovaná RNA byla skladována při -80 °C a použita pro reverzní transkripci.

4.4. Genotypizace HLA

Genotypizace HLA byla provedena pomocí HLA Olerup SSP[®] kitů (Genovision, USA), které obsahují sekvenčně specifické primery pro amplifikaci alel HLA II. třídy. Genotypizace HLA byla provedena u alel *HLA DQA1*, *HLA DQB1* a *HLA DRB1*. Na základě kitu HLA DQ low resolution byly nejprve určeny sérologické skupiny *HLA DQB1*. Konkrétní podtypy jednotlivých alel *HLA DQB1* a *HLA DQA1* byly určeny za využití kitů high resolution HLA DQB1*02, 03, 04, 05, 06 a HLA DQA1. Genotypizace *HLA DRB1* byla určena pouze na úrovni sérologické skupiny a nebyla již dále rozlišena.

1. Na ledě byly rozmrazeny komponenty PCR reakce a celá reakční směs byla napipetována do mikrozkušavek po 10 μl . Reakční směs pro jednu PCR reakci byla připravena dle **tabulky č. 2**. Počet PCR reakcí se lišil podle genotypizačního kitu (min. 6 – max. 32 PCR reakcí).

Tabulka číslo 2: Reakční směs pro provedení genotypizace HLA II. třídy. Objemy reakčních komponent jsou uvedeny pro jednu reakci genotypizačního setu.

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

Objem DNA vložený do PCR reakce byl počítán na koncentraci DNA 30 ng/ μl .

2. Po proběhnutí PCR reakce dle teplotního programu (**tabulka č. 3**) byly PCR produkt(y) ověřeny na 2% TBE agarózovém gelu. Na agarózový gel byl nanesen celý reakční objem 10 μl . Po elektroforetické separaci byly DNA fragmenty vizualizovány pomocí UV a gel vyfocen.
3. Amplifikované HLA alely byly určeny dle interpretační tabulky daného HLA Olerup SSP[®] kitu.

Tabulka číslo 3: Teplotní program pro HLA genotypizaci.

Reakční krok	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas [s]	Počet opakování
1 Počáteční denaturace	94	120	
2 Denaturace	94	10	
3 Hybridizace a elongace	65	60	
4 Opakování kroku 2→3			9x
5 Denaturace	94	10	
6 Hybridizace	61	50	
7 Elongace	72	30	
8 Opakování kroku 5→7			19x

4.5. TBE agarózová elektroforéza

Elektroforetická separace DNA byla provedena na 2% TBE agarózovém gelu v elektroforetických vanách od firmy Thermo Scientific v horizontálním uspořádání.

1. Byl připraven 2% agarózový gel (3,6 g agarózy smícháno s 180 ml TBE pufrem).
2. Celá heterogenní směs byla umístěna do mikrovlnné trouby a uvedena do bodu varu.
3. Poté co směs prošla varem, bylo ke kapalině přidáno 5 μ l GelRed (2,5 μ l na 100 ml TBE).
4. Po ochlazení roztoku na ~ 60 °C byl gel nalit do elektroforetické vany a na gel umístěny hřebeny.
5. Po ztuhnutí gelu byly hřebeny vyjmuty, vana naplněna TBE pufrem a do vzniklých jamek nanášeny vzorky. Vzorky byly před nanášením na agarózový gel (kromě vzorků pro HLA genotypizaci) smíchány s 6 x koncentrovaným nanášecím pufrem v poměru 5:1.
6. Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí při 175 V přibližně 45 minut.

4.6. Bisulfitové sekvenování

Bisulfitová konverze DNA je metoda, která umožňuje detekovat metylaci DNA. Její princip spočívá v odlišné reakci bisulfitu sodného (NaHSO_3) s nemetylovaným a metylovaným cytosinem. Zatímco nemetylované cytosiny jsou při bisulfitové konverzi převedeny na uracily, metylované cytosiny jsou vůči bisulfitové konverzi rezistentní. Po bisulfitové konverzi tedy zůstanou pouze metylované cytosiny, které lze detekovat pomocí sekvenování.

4.6.1. Bisulfitová konverze DNA a její přečištění

Bisulfitová konverze DNA a následné přečištění bisulfitované DNA bylo provedeno pomocí Epiect[®] Bisulfite Kit (QIAGEN, USA).

1. Bisulfitový mix byl rozpuštěn v 800 μ l vody bez RNase a dle **tabulky č. 4** byla připravena reakční směs.
2. Celá reakce byla umístěna do thermocykleru a spuštěn teplotní program dle **tabulky č. 5**.
3. Bisulfitovaná DNA byla přečištěna dle pokynů výrobce.

Tabulka číslo 4: Reakční komponenty bisulfitové konverze. Objemy reakčních komponent jsou uvedeny pro jednu bisulfitovou reakci.

Složka reakce	Objem [μ l]
DNA (1ng - 2 μ g)	různorodý*
voda bez RNase	různorodý*
Bisulfitový mix	85
Ochranný pufr DNA	35
Celkový objem	140

*celkový objem DNA a vody bez RNase byl 20 μ l. Maximální množství DNA vložené do reakce bylo 2 μ g.

Tabulka číslo 5: Reakční podmínky 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

Přečištění bisulfitované DNA

Veškerá centrifugace byla provedena při 18,000 x g.

- Po ukončení bisulfitové konverze byly zkumavky obsahující bisulfitovou reakci lehce stočeny a celá reakce byla přenesena do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek.
- Ke vzorku (celé reakci) bylo přidáno 560 μ l pufru BL a celý roztok byl lehce zvortexován a krátce stočen.
- Všechny objemy byly poté přeneseny do Epiect kolonek, které byly umístěny do sběrných zkumavek. Epiect kolony byly stočeny po dobu 1 min a poté vylit obsah sběrné zkumavky.

4. Ke kolonce bylo přidáno 500 μ l BW pufru (před použitím smíchán s ethanolem dle pokynů výrobce) a kolonka centrifugována po dobu 1 minuty. Obsah sběrné zkumavky byl vylit.
5. Ke kolonce bylo přidáno 500 μ l BD pufru (před použitím smíchán s ethanolem dle pokynů výrobce) a kolonka byla se zavřeným víčkem inkubována 15 minut za pokojové teploty (18 °C – 25 °C).
6. Kolonka byla stočena po dobu 1 minuty a znovu odstraněn obsah sběrné zkumavky.
7. Bylo přidáno 500 μ l BW pufru a kolonka byla centrifugována po dobu 1 minuty. obsah sběrné zkumavky byl vylit a celý krok 7 ještě jednou zopakován.
8. Kolonka byla umístěna do nové sběrné zkumavky a centrifugována po dobu 1 minuty.
9. Kolonka byla přenesena do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a s otevřenými víčky inkubována na termobloku po dobu 5 minut při 56 °C.
10. Nakonec byla kolonka umístěna do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a do jejího středu nanášeno 20 μ l dH₂O.
11. Z kolonky byla bisulfitovaná DNA vymyta 1 minutovou centrifugací a poté uložena do -20 °C.

4.6.2. Amplifikace promotorového úseku genu HLA DQA1

Z důvodu snížené komplexity bisulfitované DNA byla použita k amplifikaci cílového promotorového úseku genu *HLA DQA1* metoda Nested PCR. Dle referenční sekvence *HLA DQA1* (zdroj: NCBI reference sequence: NC_000006.11, viz příloha) byly navrženy primery pro amplifikaci promotorového úseku *HLA DQA1* (**tabulka č. 6**). Nejprve byl amplifikován delší amplicon pomocí vnějších primerů, které nasedají na promotor *HLA DQA1* v místě -729 až -701 a -109 až -86 od start kodonu. Amplifikovaný úsek byl dále použit jako templát pro amplifikaci kratšího ampliconu za využití vnitřních primerů. Vnitřní primery nasedají v promotorové oblasti *HLA DQA1* -670 až -644 a -154 až -126. PCR reakce probíhala ve třech nezávislých reakcích (tripletech), aby bylo minimalizováno riziko amplifikace promotorového úseku pouze jedné alely.

Tabulka číslo 6: Nukleotidová sekvence a teplota tání (T_m) primerů použitých pro amplifikaci promotorového úseku *HLA DQA1*.

Vnější primery	T _m [°C]
Přímý primer 1 5' GGTTGTAAGTTAGAATATTTTGAAGGATG 3'	63
Zpětný primer 1 5' CAAACCAAACCCTACCAAATCA 3'	58
Vnitřní primery	
Přímý primer 2 5' AGGTTGTTTAGAAATGTTTATTTTGG 3'	59
Zpětný primer 2 5' AAAATCCCCTATAATAACATCTCAATTAC 3'	62

1. Byly připraveny reakční směsi (**tabulka č. 7**) pro amplifikaci cílového úseku genu *HLA DQA1*.
2. Amplifikace probíhala dle teplotního programu uvedeného v **tabulce č. 8**.
3. PCR produkt byl ověřen na 2% TBE agarózovém gelu. Pro určení velikosti PCR produktu byl spolu se vzorky nanesen na gel i PCR žebříček 100 bp. Velikost PCR produktu byla ~ 545 párů bazí.
4. Po ověření přítomnosti PCR produktu byla provedena jeho izolace z 1% TAE agarózového gelu.

Tabulka číslo 7: Reakční směs pro amplifikaci cílového úseku promotorové oblasti genu *HLA DQA1*.

Složka reakce	PCR reakce 1 [μl]	PCR reakce 2 [μl]
Voda bez DNase	13,25	14,75
10x <i>Taq</i> pufr s KCl	2,5	2,5
Mg ²⁺ (25 mM MgCl ₂)	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 číslo 8: Teplotní program pro amplifikaci cílového úseku v promotoru 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		1	95	
3. Hybridizace	1,5	56		1,5	65	
4. Elongace	1	72		1	72	
5. Opakování kroku 2→4			39x			49x
6. Závěrečná inkubace	10	72		10	72	

4.6.3. Přečištění a izolace PCR produktu

1. Nejprve byl připraven 1% TAE agarózový gel (s nízkou teplotou tání) s etidium bromidem (2,0 µl EtBr na 200 ml gelu).
2. Triplet PCR produktů byly smíchány a nanášeny na gel spolu s 6 x koncentrovaným nanášecím pufrem (v poměru 5:1).
3. Elektroforetická separace probíhala na zdroji Powerpac 3000 po dobu přibližně 40 minut při konstantním napětí 120 V.
4. Po elektroforetické separaci byl umístěn 1 % TAE agarózový gel na UV transluminátor a DNA „bendy“ byly vyřezány z gelu pomocí skalpelu do předem zvážených zkumavek. Mezi jednotlivým řezáním vzorků byl skalpel ošetřen ethanolem, aby nedocházelo ke kontaminaci jednotlivých vzorků.
5. Zkumavky s gelem byly poté znovu zváženy a vypočítána samotná hmotnost gelu. Dle pokynů výrobce byla provedena izolace PCR produktu z gelu.

Izolace PCR produktu z 1% TAE gelu

Veškerá centrifugace byla provedena při 16,000 x g.

1. Gel byl rozpuštěn přidáním tří objemových dílů solubilizačního roztoku. Pro kompletní rozpuštění gelu byly zkumavky inkubovány na thermobloku při 50 °C po dobu 10 minut.
2. Mezitím byla připravena kolonka pro vazbu DNA. Kolonka byla umístěna do sběrné zkumavky a do středu kolonky bylo nanášeno 500 µl roztoku pro

- přípravu kolonky. Následně byla kolonka stočena po dobu 1 minuty a vylit obsah sběrné zkumavky .
3. K rozpuštěnému gelu byl přidán 1 objemový díl izopropanolu (100 %) a celá heterogenní směs důkladně promíchána.
 4. Na připravenou kolonku byl nanesen celý objem rozpuštěného gelu a kolonka stočena po dobu 1 minuty. Obsah sběrné zkumavky byl vylit.
 5. Bylo přidáno 700 μ l promývacího roztoku a znovu byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty. Obsah sběrné zkumavky byl vylit. Zbýlý promývací roztok, který obsahuje ethanol, byl odstraněn opětovnou centrifugací (1 min).
 6. Kolonka byla umístěna do nové sběrné zkumavky a doprostřed kolonky naneseo 25 – 35 μ l dH₂O.
 7. DNA byla vymyta krátkou centrifugací (1 min) a její koncentrace změřena na nanofotometru. DNA byla uložena do -20 °C.

4.6.4. Příprava a práce s rekombinantní DNA

Vyizolovaný PCR produkt byl následně klonován. PCR produkt byl ligován s pGEM - T Easy vektorem, kterým byly transformovány bakterie E.coli DH5 α . Ke klonování bylo využito bakteriálního kmene, který má delecii v genu pro α peptid betagalaktosidasu a umožňuje použít systém modro/bílé selekce bakterií. Deletovaný gen pro α peptid betagalaktosidasu lze do bakterií vnést pomocí vektoru, který obsahuje klonovací místo. Pokud dojde k úspěšnému vložení DNA do vektoru je přerušen čtecí rámec genu pro enzym betagalaktosidasu a kolonie tento enzym neprodukují (jsou bílé). Naopak v případě neúspěšného vložení DNA do vektoru může dojít k uzavření vektoru a k obnově exprese betagalaktosidasu (kolonie jsou modré). Důsledkem exprese betagalaktosidasu je schopnost bakterií štěpit X-Gal za vzniku zřetelné modré barvy. Spolu s X-Gal se do agarového média přidává i IPTG, který slouží jako induktor exprese betagalaktosidasu. Vektor, kterým byly bakterie transformovány, dále kóduje enzym štěpící ampicilinové antibiotikum a umožňuje tak selekci transformované x netransformované bakterie.

4.6.4.1 Příprava kompetentních bakterií

Kompetentní bakterie byly připraveny dle modifikovaného protokolu Sambrooka (SAMBROOK *et. al* 1989).

1. Množství bakterií, které zaplní přibližně půl očkovací kličky, bylo přeneseno do zkumavky obsahující 3 ml LB média. Bakterie byly inkubovány přes noc (16 – 18 hodin) při 37 °C.
2. Do sterilní 500 ml baňky bylo nalito 100 ml LB média (37 °C) a přidán 1ml kultury z bodu 1. Bakteriální kultura byla inkubována při 37 °C, dokud hodnota OD₅₉₀ (optická densita při vlnové délce 590 nm) nedosáhla hodnoty 0,5 – 0,6. Hodnota OD₅₉₀ byla změřena asi po 80 minutách a pak v 15 minutových intervalech.
3. Banka s bakteriální kulturou byla položena na led, aby se zastavil růst bakterií.
4. Kultura byla asepticky přenesena do sterilních, na ledě vychlazených 50 ml zkumavek a stočena při 3,500 x g po dobu 5 minut.
5. Médium bylo odstraněno a usazené bakterie resuspendovány v 25 ml ledového sterilního 0,1M CaCl₂. Bakterie byly opět stočeny při 3,500 x g po dobu 5 minut.
6. Médium bylo vylito a bakterie resuspendovány v 25 ml 0,1 M CaCl₂ a inkubovány 30 minut na ledě.
7. Buňky byly sklizeny 5 minutovou centrifugací při 3,500 x g a resuspendovány v 3 ml sterilního 0,1 M CaCl₂ s 20 %- ním obsahem glycerolu.
8. Pomocí sterilních pipetových špiček byla buněčná suspenze přenesena do 1,5 ml vychlazených zkumavek.
9. Buňky byly zmrazeny vložení zkumavek do předem vychlazeného ethanolu (- 70 °C) a dále skladovány při této teplotě.

4.6.4.2 Příprava kultivačních misek

1. Bylo naváženo 14 g LB agaru a objem doplněn do 400 ml destilovanou vodou.
2. Celý roztok byl zautoklávován a po vychladnutí (~ 45 °C) k němu bylo asepticky přidáno 400 µl ampicilinu (100 mg/ml), 400 µl IPTG (100 mM), 400 µl X-Gal (3%).

3. Celý roztok byl promíchán na magnetické míchačce a následně nalit na Petriho misky (okolo 20 ml agarů na 1 Petriho misku).
4. Po ztuhnutí agarů byly misky ihned použity a nebo umístěny do ledničky pro pozdější použití.

4.6.4.3 Ligační reakce a transformace kompetentních buněk

1. Dle **tabulky č. 9** byla připravena ligační reakce. Ligace probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě nebo přes noc při 4 °C.
2. Suspenze kompetentních buněk *E. coli* DH5α byla rozmrazena a k 50 μl těchto buněk byl přidán celý objem ligační reakce (5 μl)*. Celá reakční směs byla lehce promíchána a inkubována na ledu po dobu 20 minut.
3. Bakterie byly transformovány teplotním šokem ve vodní lázni při 42 °C a následně umístěny na led po dobu nejméně 2 minut.
4. Do 1,5 ml zkumavky s transformovanými bakteriemi bylo přidáno 950 μl LB média a bakterie umístěny do inkubátoru (37 °C) na dobu 90 minut a třepány při 150 rpm.
5. Na LB agarové misky (ampicilin, X-Gal, IPTG) bylo nanášeno a rozhojkováno 50 a 200 μl buněčné suspenze.
6. LB agarové misky s bakteriemi byly inkubovány přes noc při 37°C a následující den vyhodnoceny narostlé kolonie.
7. Zbýlá buněčná suspenze (700 μl) byla uschována do ledničky a v případě potřeby rozhojkována následující den.

* Ligační reakce byla připravena v polovičním objemu než je doporučeno výrobcem. K bakteriím byl přidán celý objem ligační reakce (výrobce doporučuje 1,5 μl). Poměr vektoru k insertu byl 1:3.

Tabulka číslo 9: Reakční směs ligační reakce.

Komponenta ligační reakce	Objem [μl]
2x ligační pufr	2,5
pGEM [®] -T Easy vector (50 ng/μl)	0,5
PCR produkt (14 ng/μl)	různorodý*
T4 DNA ligasa	0,5
Voda bez DNase	různorodý*
Celkový objem	5

*Celkový objem PCR produktu a vody byl 1,5 μl.

Do reakce byl standartně vložen 1μl DNA o koncentraci 14 ng/μl.

4.6.5. Ověření pozitivně transformovaných kolonií (PCR colony)

Pro ověření pozitivně transformovaných bakterií byla z buněk *E. coli* izolována plasmidová DNA pomocí modifikované metody standardní alkalické lýze. Vyizolovaný plasmid sloužil jako templát (využity SP6 a T7 primery) pro ověření vloženého insertu *HLA DQA1*.

Izolace plasmidové DNA *E. coli* DH5a

1. Bílé kolonie byly odebrány a pomocí pipetové špičky přeneseny do LB média obsahující ampicilinové antibiotikum. Inkubace bakteriálních kolonií probíhala přes noc (37 °C, 250 rpm).
2. Buňky byly sklizeny 1 minutovou centrifugací (12, 000 x g) v 1,5 ml zkumavkách.
3. Vzniklá peleta byla resuspendována ve 100 µl roztoku 1 (200 mM NaOH, 1% SDS)
4. Bylo přidáno 200 µl roztoku 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) a poté ihned 200 µl chloroformu.
5. Buňky byly lyzovány 2 minuty a poté bylo přidáno 200 µl roztoku 3 (60 ml KOAc, 11,5 ml bezvodé kyseliny octové, 28.5 ml dH₂O).
6. Vzorky byly zvortexovány a stočeny při 12, 000 x g po dobu 10 minut.
7. Horní vodní fáze byla odebrána do nových 1,5 ml zkumavek a DNA vysrážena 0,5 ml izopropanolu.
8. DNA byla stočena při 12, 000 x g po dobu 10 minut a supernatant odpipetován.
9. Vzniklá peleta byla promyta 200 µl 70% ethanolu a stočena po dobu 5 minut (12, 000 x g)
10. Supernatant byl opatrně odstraněn a DNA byla zbavena zbytkového ethanolu vysušením v laminárním boxu.
11. Plasmidová DNA byla rozpuštěna ve 20 µl vody a skladována při -20 °C.

PCR z plasmidové DNA

1. Byla připravena PCR reakční směs dle **tabulky č. 10**.
2. Následně byl v thermocykleru spuštěn teplotní program (**tabulka č. 11**). PCR produkt o velikosti přibližně ~ 700 bp byl ověřen na 2 % TBE agarózovém gelu.

Tabulka číslo 10: Reakční směs pro jednu PCR reakci.

Složka reakce	Objem [μ l]
Voda bez DNase	15,25
10x <i>Taq</i> pufr s KCl	2,5
Mg ²⁺ (25 mM MgCl ₂)	4
dNTPs (10mM)	1,25
SP6 primer (50 μ M)	0,4
T7 primer (50 μ M)	0,4
<i>Taq</i> DNA polymerasa	0,2
Plazmidová DNA	1,0
Celkový objem	25 μ l

Tabulka číslo 11: Teplotní program pro ověření vloženého insertu.

Reakční krok	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Počet opakování
1. Počáteční denaturace	94	5 min	
2. Denaturace	94	5min	
3. Hybridizace	51	30 s	
4. Elongace	72	45 s	
5. Opakování kroku 2→4			40x
6. Závěrečná inkubace	72	10 min	

4.6.6. Sekvence

Za účelem stanovení sekvence byla firmou Macrogen (Korea) provedena sekvence jednotlivých plasmidů. Na sekvenování bylo od jednoho pacienta odesláno 4 až 8 klonů z monocytů, B lymfocytů a 4 až 11 klonů z plné krve. Na sekvenaci byly odeslány pouze ty kolonie, u kterých byla ověřena úspěšná transformace. Odeslání bakterií na sekvenaci bylo provedeno dle následujícího protokolu.

1. Byl připraven 1 % LB agar a roztok zautoklávován.
2. Po vychladnutí (~45 $^{\circ}$ C) byl přidán ampicilin a 1 % LB Agar rozpipetován po 100 μ l do 96 jamkové destičky.

3. Pomocí pipetovacích špiček byly odebrány pozitivně transformované bakterie a zapíchnuty do jednotlivých jamek destičky.
4. Destička s jednotlivými bakteriálními koloniemi byla inkubována přes noc při pokojové teplotě a následně uložena do ledničky, kde byla skladována až do doby odeslání.

DNA sekvence byly následně analyzovány pomocí programu Bioedit

4.7. Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA).

1. Na ledě byla rozmrazena RNA a dle **tabulky č. 12** připraven 2x RT (reverzní transkripce) master mix. Celá reakce pro reverzní transkripci byla připravena na ledu.

Tabulka číslo 12: Příprava 2x RT master mixu.

Reakční komponenta	Objem [μl]
10 x RT pufr	2
25 x dNTP mix (100 mM)	0,8
10 x RT náhodné primery	2
Multiscribe reverzní transkriptasa	1
Voda bez DNase	4,2
Celkový objem	10 μl

2. Připravený 2x RT master mix byl lehce promíchán a podle počtu reakcí rozpipetován po 10 μl do PCR zkumavek.
3. K 2x RT master mixu bylo přidáno tolik μl RNA, aby její celkové množství v reakci bylo 50 ng.
4. Reakční směs byla doplněna vodou do 20 μl a zkumavky lehce stočeny, aby byly eliminovány vzduchové bubliny, které se mohly vytvořit v průběhu pipetování.
5. Zkumavky byly umístěny do thermocykleru a spuštěn program pro reverzní transkripci (**tabulka č. 13**).

Tabulka číslo 13: 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	∞

4.8. Kvantitativní PCR

4.8.1. Kvantifikace exprese jednotlivých alel *HLA DQA1*

K expresi jednotlivých alel *HLA DQA1* bylo použito fluoresenčních sond TaqManTM. Nejprve byla vybrána endogenní kontrola ze 4 kandidátních genů *hu RPS13*, *huTBP*, *PPIA* a *B-aktin*. K tomu byla použita souprava TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, USA). Poté byly optimalizovány podmínky pro hybridizaci primerů s jednotlivými alelami HLA.

Aby byla vyloučena amplifikace genomické DNA byla spolu s alelami *HLA DQA1* amplifikován intron *HLA DQA1* (FERNANDES *et al.* 2003). Alely *HLA DQA1*01*, *02*, *03*, *04* a dále pak *HLA DQA1 intron*, *HLA DQA1 total*, *HLA DRA1* byly amplifikovány při 60 °C. Alela *HLA DQA1*05* byla amplifikována při 62 °C. Každá PCR amplifikace byla provedena v tripletech.

1. cDNA byla rozmrazena, 25x naředěna vodou a rozpipetována po 5 µl do 96 jamkové destičky.
2. Dle **tabulky č. 14** byl připraven amplifikační mix pro kvantitativní PCR. K 5 µl cDNA byl přidáno 7,5 µl reakční směsi.
3. Destička byla přelepena fólií a stočena při 2, 000 x g (2 minuty). Amplifikace proběhla v přístroji 7000 SDS ABI Prism dle teplotního programu uvedeného v **tabulce č. 15**.

Tabulka číslo 14: Reakční směs pro jednu reakci kvantitativního PCR.

Reakční komponenta	Objem [μ l]
Gene expression master mix	6,25
Přímý primer (10 μ M)	0,375
Zpětný primer (10 μ M)	0,375
Sonda (5 μ M)	0,5
Celkový objem	7,5

Tabulka číslo 15: 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	
Krok 4	60*	1 min	
Opakování 3→4			50x

*Alela *HLA DQA1**05 byla amplifikována při 62 $^{\circ}$ C.

4.9. Zpracování a statistické vyhodnocení výsledků

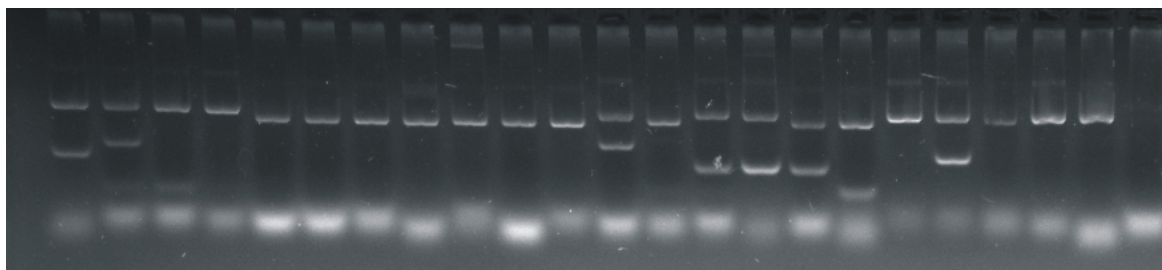
Výsledky sekvenace byly zpracovány v programu Bioedit. Nejdříve byly sekvence zarovnány dle referenční sekvence *HLA DQA1* a určeny jednotlivé QAP alely (viz výsledky). Poté byly odečteny methylační stavy promotorů a výsledky statisticky zpracovány pomocí programu Graphpad prism verze 5.0.4. Rozdíly v celkové methylaci QAP alel byly vyhodnoceny pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu na 5% hladině významnosti ($p < 0,05$). Rozdíly u jednotlivých methylačních míst QAP alel byly vyhodnoceny pomocí Fisherovo exaktního testu na 5 % hladině významnosti. K potvrzení významných rozdílů středních hodnot delta Ct (analýza RNA) studovaných genů, jsme použili párový t-test.

5. Výsledky

5.1. HLA genotypizace

U 30 pacientů s T1D byly určeny alely genů *HLA DRB1*, *HLA DQA1* a *HLA DQB1*. *HLA DRB1* byla určena pouze na úrovni sérologické skupiny a nebyla již dále rozlišena. Výsledky genotypizace a zastoupení jednotlivých alel u pacientů s T1D jsou uvedeny v **tabulce č.16**. Dle očekávání jsou nejvíce zastoupeny rizikové haplotypy *DRB1*04 – DQA1*0301 – DQB1*0302* (25 %) a *DRB1*03 – DQA1*0501 – DQB1*0201* (20 %). Třetí nejvíce zastoupený haplotyp je *DRB1* 01 – DQA1*0101 – DQB1*0505* (16,7%). Protektivní kombinace alel *DQA1*0103 – DQB1*0603* byla nalezena u 5 % pacientů s T1D. Genotypizace HLA II. třídy je ilustrována na **obrázku č. 5**.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23



Obrázek číslo 5. Genotypizace alely *HLA DQA1*0301*. Elektroforetická separace byla provedena na 2% TBE agarózovém gelu. Jedná se o elektroforetický záznam, který ukazuje homozygota pro alelu *HLA DQB1*0301*. Amplifikované PCR produkty nacházející se v horní řadě představují pozitivní kontroly (gen pro růstový hormon). Gen pro růstový hormon je amplifikován pomocí 2 typů primerů a dává vznik produktům o délce 430 a 515 bp. Pod nimi se nachází specifické PCR produkty různé velikosti (v tomto případě v jamkách 1, 2, 12, 14, 15, 16, a 19). Jamka č. 17 nebyla do vyhodnocení zařazena, protože specifický PCR produkt v jamce č. 17 má být na úrovni PCR produktu v jamce č. 2 (má mít velikost 220 pb).

Tabulka číslo 16: Zastoupení jednotlivých haplotypů u pacientů s T1D. Celkově bylo detekováno 13 odlišných haplotypů. Mezi nejčastější haplotypy patří *DRB1*04 – DQA1 *0301 – DQB1 0302* a *DRB1*03 – DQA1 *0501 – DQB1 0201*. Poslední sloupec tabulky uvádí, jak často se daný haplotyp vyskytuje ve studované skupině diabetiků. Frekvence haplotypu byla počítána jako podíl celkového počtu alel (60)/ počet lidí s daným haplotypem.

Genotyp			Haplotyp		
DRB1	DQA1	DQB1	Počet lidí	Č.	Frekvence (%)
04	0301	0302	15	1	25

03	0501	0201	12	2	20
01	0101	0501	10	3	16,7
07	0201	0202	5	4	8,3
11	0505	0301	4	5	6,7
13	0103	0603	3	6	5
04	0303	0302	2	7	3,3
16	0102	0502	2	8	3,3
13	0505	0301	2	9	3,3
13	0102	0604	2	10	3,3
04	0303	0301	1	11	1,7
08	0401	0402	1	12	1,7
04	0301	0202	1	13	1,7

5.2. Analýza promotorového úseku genu *HLA DQA1*

Za účelem identifikace promotoru a methylační analýzy genu *HLA DQA1* byl sekvenován 545 párů bazí dlouhý úsek genu *HLA DQA1* v pozici ve vzdálenosti -670 až -126 od start kodonu. Celkově bylo sekvenováno 192 vzorků. 20 sekvencí bylo vyřazeno z důvodu rekombinace při PCR reakci (Meyerhans *et al.* 1990). Dalších 15 sekvencí bylo vyřazeno z důvodu úspěšnosti bisulfitové konverze nižší než 95 %. Celkově bylo podrobena analýze 91 vzorků DNA z monocytů, 7 z B lymfocytů a 40 z plné krve.

5.2.1. Určení alel QAP

Nejdříve bylo nezbytné určit jednotlivé alely QAP (promotory genu *HLA DQA1*). Alely QAP byly určeny srovnáním sekvenačních dat s publikovanými polymorfismy v promotorové oblasti genu *HLA DQA1*. Kromě doposud známých alel QAP (Brünnler *et al.* 1997) byly identifikovány nové QAP alely (nepublikovaný laboratorní výzkum). Nově identifikovány byly QAP alely 1.2K, 1.2L a dále pak 4.1A a 4.1B. Sekvence všech dosud známých QAP alel je ukázána v tabulce číslo **tabulce č. 17**. Asociace mezi jednotlivými QAP alelami a alelami genu *HLA DQA1* pacientů s T1D jsou uvedeny v **tabulce č. 18**.

Tabulka číslo 17. Polymorfismy v oblasti genu *HLA DQA1*, pomocí kterých byly určeny alely QAP. Modře jsou zvýrazněny sekvence nově identifikovatelných QAP alel. Čísla zvýrazněná žlutou výplní znázorňují nukleotidovou pozici.

	-641	-640	-617	-597	-596	-595	-585	-584	-582	-581	-571	-570	-562	-561	-540	-539	-526
1.1	T	A	G	G	C	A	T	G	G	G	T	A	C	G	C	G	A
1.2K	C	G	G	G	C	A	T	G	G	G	T	A	C	G	T	T	T
1.2L	C	G	G	G	C	A	T	G	G	G	T	A	C	G	C	G	A
1.3	C	G	G	G	C	A	T	G	G	G	T	A	C	G	C	G	A
1.4	C	G	G	G	C	A	T	G	G	G	T	A	C	G	C	G	A
2.1	C	G	A	A	T	G	C	G	G	G	T	A	C	G	T	G	A
3.1	T	A	A	A	T	G	T	G	G	G	T	A	C	G	T	G	A
4.1B	-	G	G	G	T	A	C	G	A	T	C	G	T	T	T	G	A
4.1A	-	G	G	G	T	A	C	G	A	T	C	G	T	T	T	G	A
	-521	-512	-511	-508	-507	-497	-496	-495	-488	-476	-475	-464	-463	-454	-453	-444	-443
1.1	A	T	G	C	G	G	T	G	G	T	G	G	G	C	G	C	G
1.2K	A	T	G	C	G	G	T	G	G	T	G	G	G	C	G	C	G
1.2L	A	T	G	C	G	G	T	G	G	T	G	G	G	C	G	C	G
1.3	A	T	G	C	G	G	T	G	G	T	G	G	G	C	G	C	G
1.4	A	T	G	C	G	G	T	G	G	T	G	G	G	C	G	C	G
2.1	G	C	G	T	A	G	T	A	G	T	G	G	T	C	G	C	G
3.1	G	C	G	T	A	T	C	G	G	C	G	G	T	C	G	T	G
4.1B	A	C	G	C	G	G	T	G	A	T	G	A	T	T	A	C	G
4.1A	A	C	G	C	G	G	C	G	A	T	G	A	T	T	A	C	G
	-437	-431	-413	-400	-381	-374	-373	-368	-367	-366	-365	-364	-363	-362	-361	-357	-351
1.1	G	G	T	T	A	C	G	-	A	A	A	A	A	A	G	G	G
1.2K	G	G	T	T	G	C	G	-	A	A	A	A	A	A	A	G	G
1.2L	G	G	T	T	G	C	G	-	A	A	A	A	A	A	A	G	G
1.3	G	G	T	T	G	T	G	-	A	A	A	A	A	A	A	G	G
1.4	G	G	T	A	G	C	G	-	A	A	A	A	A	A	A	G	G
2.1	G	G	A	T	G	C	G	G	G	A	A	A	A	A	T	G	G
3.1	G	G	A	T	G	C	G	G	G	A	A	A	A	G	A	G	G
4.1B	T	T	A	T	G	T	A	-	A	-	-	-	-	-	A	A	A
4.1A	T	T	A	T	G	T	A	-	A	-	-	-	-	-	A	A	A
	-349	-342	-341	-340	-339	-333	-330	-328	-323	-311	-310	-308	-277	-276	-272	-271	-270
1.1	A	A	A	G	A	A	G	A	A	C	G	T	T	A	G	A	G
1.2K	A	A	A	G	G	A	G	A	A	C	G	T	T	A	T	A	A
1.2L	A	A	A	G	G	A	G	A	A	C	G	T	T	A	T	A	A
1.3	A	A	A	G	A	A	G	A	A	C	G	T	T	A	T	A	G
1.4	A	A	A	G	A	A	G	A	A	C	G	T	T	A	T	C	G
2.1	A	A	A	G	A	A	G	A	T	C	G	A	T	A	T	A	G
3.1	A	A	A	G	A	A	G	A	G	C	G	A	T	A	T	A	G
4.1B	G	A	G	A	A	G	A	G	G	T	T	T	C	G	T	C	G
4.1A	A	G	A	A	A	G	A	G	G	T	T	T	C	G	T	C	G
	-257	-245	-223	-207	-206	-205	-169	-158									
1.1	A	A	A	-	-	-	T	A									
1.2K	A	A	A	-	-	-	T	A									
1.2L	A	A	A	-	-	-	T	A									
1.3	A	A	A	-	-	-	T	A									
1.4	A	A	A	-	-	-	T	A									
2.1	T	A	A	T	A	A	G	A									
3.1	G	A	A	T	A	A	T	G									
4.1B	A	T	G	T	A	A	T	A									
4.1A	A	T	G	T	A	A	T	A									

Tabulka číslo 18: Asociace alel QAP s alelami genu *HLA DQA1* pacientů s T1D. Nestandardní haplotyp byl nalezen u pacienta č. 12, kde je alela 03 asociována s QAP 1.1. U alel označených -- nebyla zachycena druhá QAP alela.

Pacient č.	QAP	<i>DQA1</i>
5	4.1A/--	0501/0505
6	--/1.1	0301/0101
8	1.4/1.4	0102/0102
10	1.1/1.1	0301/0303
11	4.1B/3.1	0501/0303
12	3.1/1.1	0301/0303
13	1.1/1.1	0101/0101
20	--/1.3	0301/0103
21	1.3/--	0103/0505
22	1.1/--	0101/0301
23	--/2.1	0505/0201
25	4.1A/3.1	0505/0301
27	--/1.2K	0501/0102
28	--/1.2K	0303/0102
29	3.1/3.1	0301/0301
30	3.1/3.1	0301/0301

5.2.2. Určení methylačního stavu alel QAP

Methylační analýze byl podroben 489 bp dlouhý CpG bohatý úsek, který se nachází v poloze -643 až -155 od start kodonu. Odečtena byla jak celková methylace QAP alel, tak i methylace jednotlivých methylačních míst. Sekvence ze všech 3 buněčných populací byla získána pouze u pacienta číslo 11.

5.2.2.1 Rozdíly v methylaci alel QAP B lymfocytů a monocytů

Sekvenační data z monocytů a B lymfocytů ukazují na variaci v methylaci alel QAP. Jelikož bylo zpracováno příliš málo sekvencí z B lymfocytů nelze tyto rozdíly považovat za statisticky významné a je potřeba získat větší množství sekvencí. Sekvence jsou ilustrovány v **tabulce č. 19**. Aby nedošlo k ovlivnění celkové methylační analýzy alel QAP, sekvence B lymfocytů byly vyřazeny z další analýzy.

Tabulka číslo 19: Rozdíly v methylaci B lymfocytů a monocytů.

Jednotlivé sekvence jsou označeny dle původu buněčného typu podle : M (sekvence pocházejí z monocytů) a B (sekvence z B lymfocytů).

Černá tečka označuje methylované místo. Prázdná tečka bez výplně značí nemethylované místo. Jednotlivá čísla ve sloupcích označují nukleotidovou pozici.

U buňky označené X nebylo možné určit nukleotidovou sekvenci.

1) Srovnání methylace alel QAP 4.1B monocytů a B lymfocytů. 2) Srovnání methylace alel QAP 3.1 monocytů a B lymfocytů.

1)

QAP 4.1B Monocyty	-641	-639	596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193	Celková methylace
11-1M	-G	●	TG	●	●	TT	TG	●	●	TG	TG	TA	●	●	TA	TA	TT	●	○	TG	8
11-2M	-G	●	TG	●	●	TT	TG	●	●	TG	TG	TA	●	●	TA	TA	TT	●	○	TG	8
11-7M	-G	●	TG	●	●	TT	TG	●	●	TG	TG	TA	●	●	TA	TA	TT	○	●	TG	8
QAP 4.1B B lymfocyty																					
11-1B	-G	●	TG	●	●	TT	TG	●	●	TG	TG	TA	○	●	TA	TA	TT	○	●	TG	7
11-7B	-G	●	TG	●	●	TT	TG	●	●	TG	TG	TA	●	●	TA	TA	TT	○	○	TG	7
11-8B	-G	●	TG	●	●	TT	TG	●	●	TG	TG	TA	●	●	TA	TA	TT	○	○	TG	7
11-9B	-G	●	TA	○	TA	●	TG	●	TA	TG	TG	CT	○	○	X	TA	TT	●	○	TG	4

2)

QAP 3.1 Monocyty	-641	-639	596	-585	-571	-562	-540	-512	-508	-496	-476	-454	-444	-420	-374	-371	-311	-277	-271	-193	Celková methylace
11-5M	TA	○	TA	TG	TA	●	TG	●	CA	●	●	●	TG	●	●	●	●	TA	AA	AG	9
11-6M	TA	●	TA	TG	TA	●	TG	●	TA	●	●	●	TG	●	●	●	○	TA	AA	TG	9
QAP 3.1 B lymfocyty																					
11-3B	-G	●	TA	TG	TA	●	TG	○	TA	○	○	○	TG	○	●	●	●	TA	AG	TG	5
11-4B	TA	●	TA	TG	TA	●	TG	●	TA	●	●	●	TG	●	●	●	●	TA	AG	TG	10
11-5B	TA	●	TA	TG	TA	○	TG	●	TA	○	●	●	TG	●	○	●	○	TA	AG	TG	6

5.2.2.2 Srovnání celkové methylace alel QAP

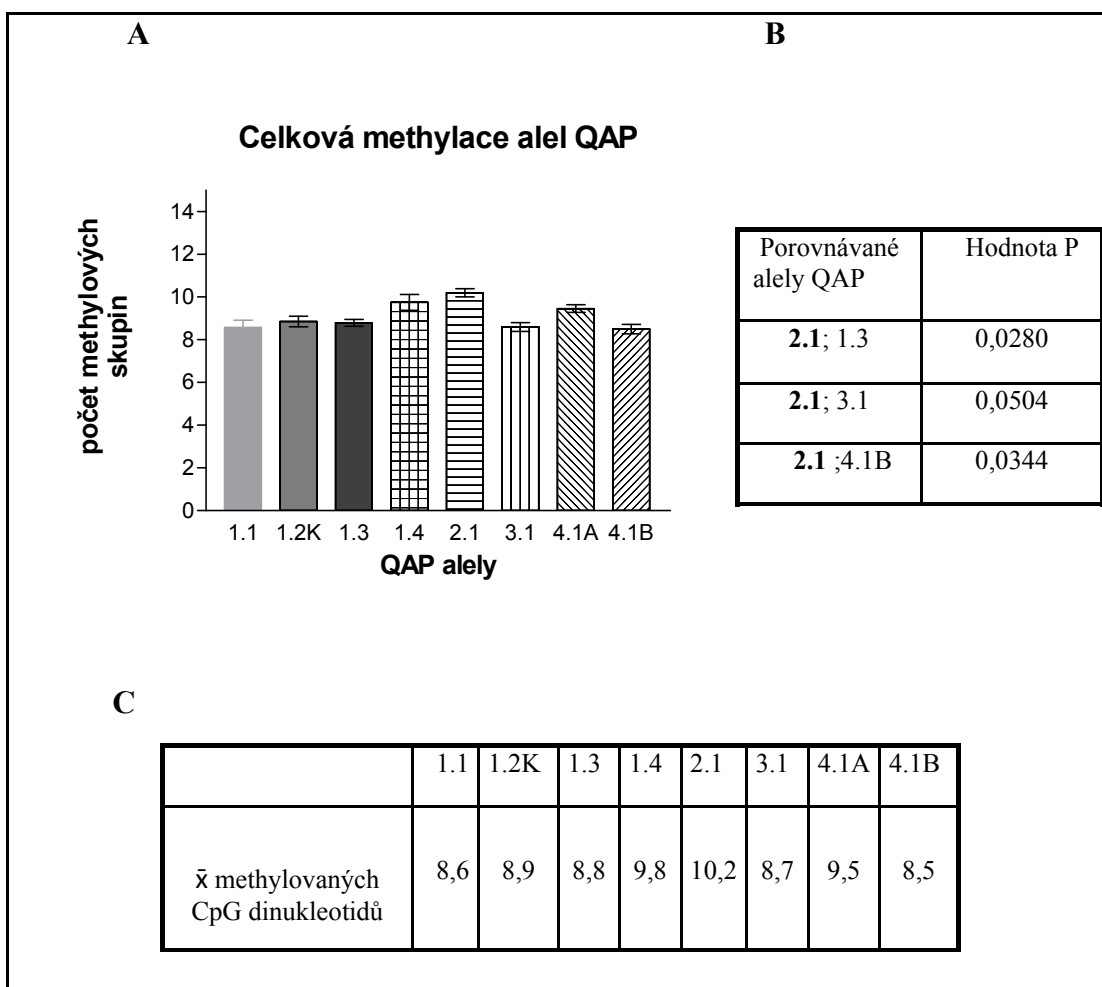
Srovnání celkové methylace mezi jednotlivými alelami QAP bylo provedeno pomocí neparametrického Mann-Whitneyho testu na hladině významnosti 0,05. Statisticky významné rozdíly byly poté korigovány celkovým počtem alel QAP (8x vynásobeny). Data pro jednotlivé QAP alely jsou uvedeny v **tabulce č. 20**. Statisticky významné rozdíly (hodnota P menší než 0,05) byly nalezeny mezi nejvíce methylovanou alelou 2.1 a alelami 1.3 (hodnota P = 0,0280), 4.1B (P = 0,0344). Na hraně statistické významnosti je pak methylační rozdíl mezi alelou 2.1 a 3.1 (P = 0,0504).

Tabulka číslo 20: Analýza celkové methylace QAP alel.

A) Graf dokumuntuje rozdíly v celkové methylaci QAP alel. Nejvíce metylované jsou alely QAP 2.1 a 1.4. Naopak mezi nejméně methylované alely QAP patří 1.1 a 4.1B. Velmi malý rozdíl v methylaci byl nalezen u alel 1.1, 1.2K, 1.3, 3.1 a 4.1B.

B) Statisticky významné rozdíly v celkové methylaci alel QAP. Statisticky významné rozdíly (hodnota P menší než 0,05) byly nalezeny mezi alelou 2.1 a alelami 1.3, 3.1 a 4.1B. Methylace mezi 2.1 a 3.1 je na hraně statistické významného rozdílu. Tučně je zvýrazněna více metylovaná alela QAP.

C) Průměrný počet methylovaných CpG dinukleotidů.



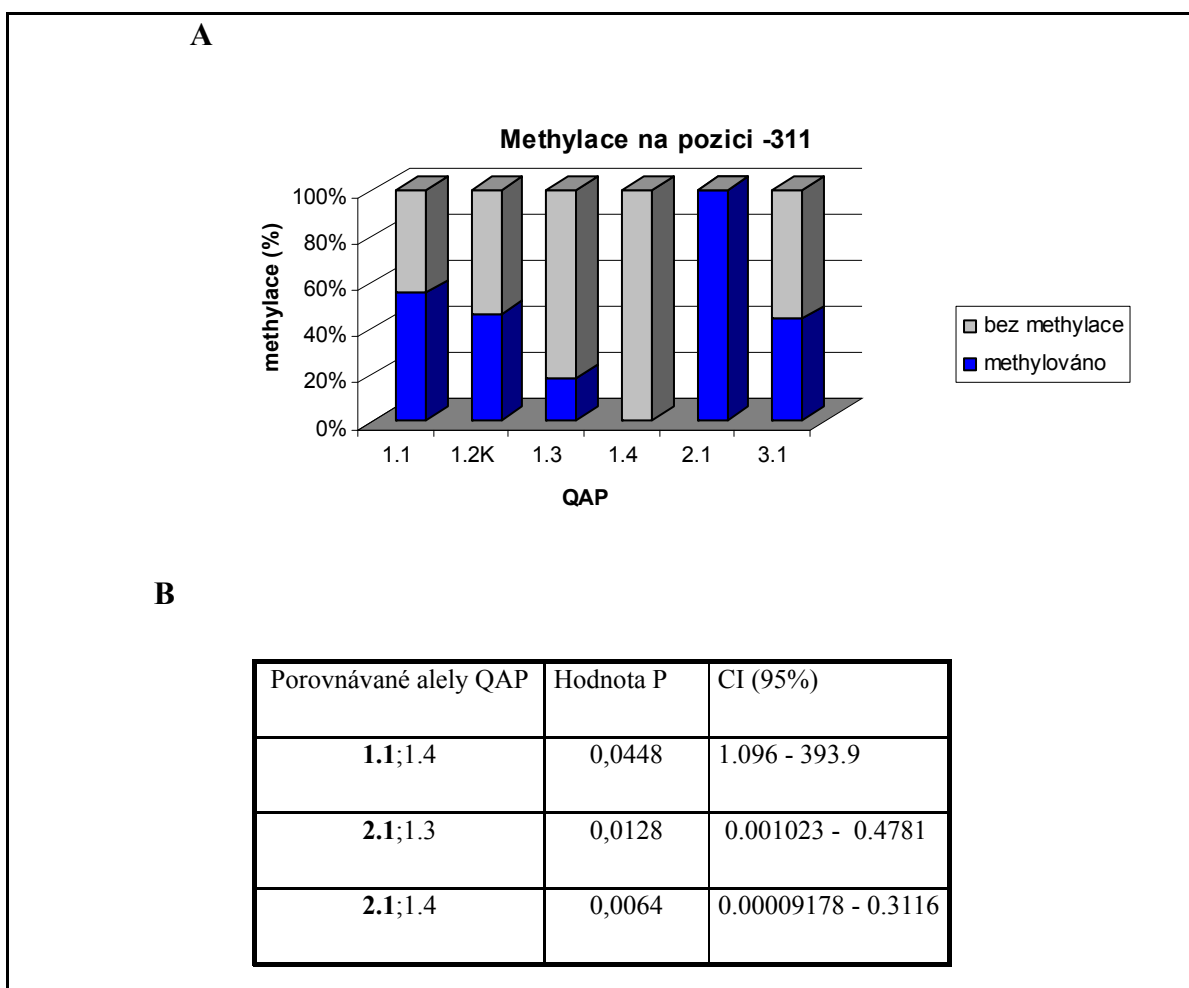
5.2.2.3 Srovnání jednotlivých methylačních pozic QAP

Na jednotlivých 20 CpG pozicích byla odečtena a statisticky vyhodnocena methylace alel QAP. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí kontingenčních tabulek dvojstranným Fisherovým exaktním testem na hladině významnosti 0,05. Statisticky významné rozdíly byly nalezeny u jediného methylačního místa na nukleotidové pozici -311. **Tabulka č. 21** znázorňuje rozdíly v methylaci jednotlivých alel QAP na pozici -631. Statisticky významné rozdíly byly korigovány celkovým počtem alel (8x vynásobeny).

Tabulka číslo 21: Analýza methylace QAP alel na pozici -311.

A) Odlišnosti v methylaci QAP alel na nukleotidové pozici -311. Zatímco alela 2.1 je kompletně methylována, alela 1.3 není methylována vůbec. Velice málo methylována je také alela 3.1.

B) Statisticky významné rozdíly (hodnota P menší než 0,05) na methylační pozici -311. Statisticky významné rozdíly byly nalezeny mezi alelami 1.1, 1.3 a 1.4. Tučně jsou zvýrazněny více methylované alely. Hodnota CI (interval spolehlivosti) nesmí v daném intervalu obsahovat hodnotu 1.

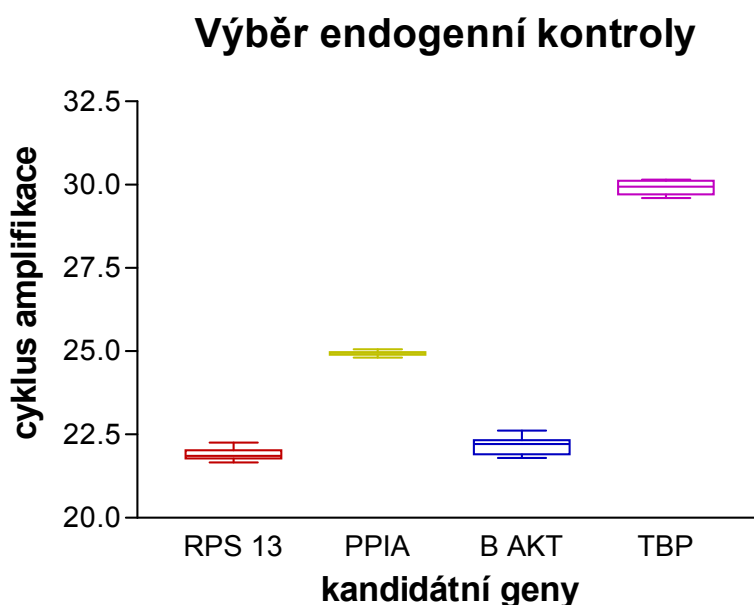


5.3. Kvantitativní PCR

5.3.1. Výběr endogenní kontroly

Byly testovány 4 kandidátní geny (RPS13, PPIA, B aktin a TBP). **Graf č. 1** dokumentuje, že nejstabilněji byl exprimován gen PPIA (cyklofilin). Dokládají to i hodnoty směrodatné odchylky (s_x) jednotlivých genů:

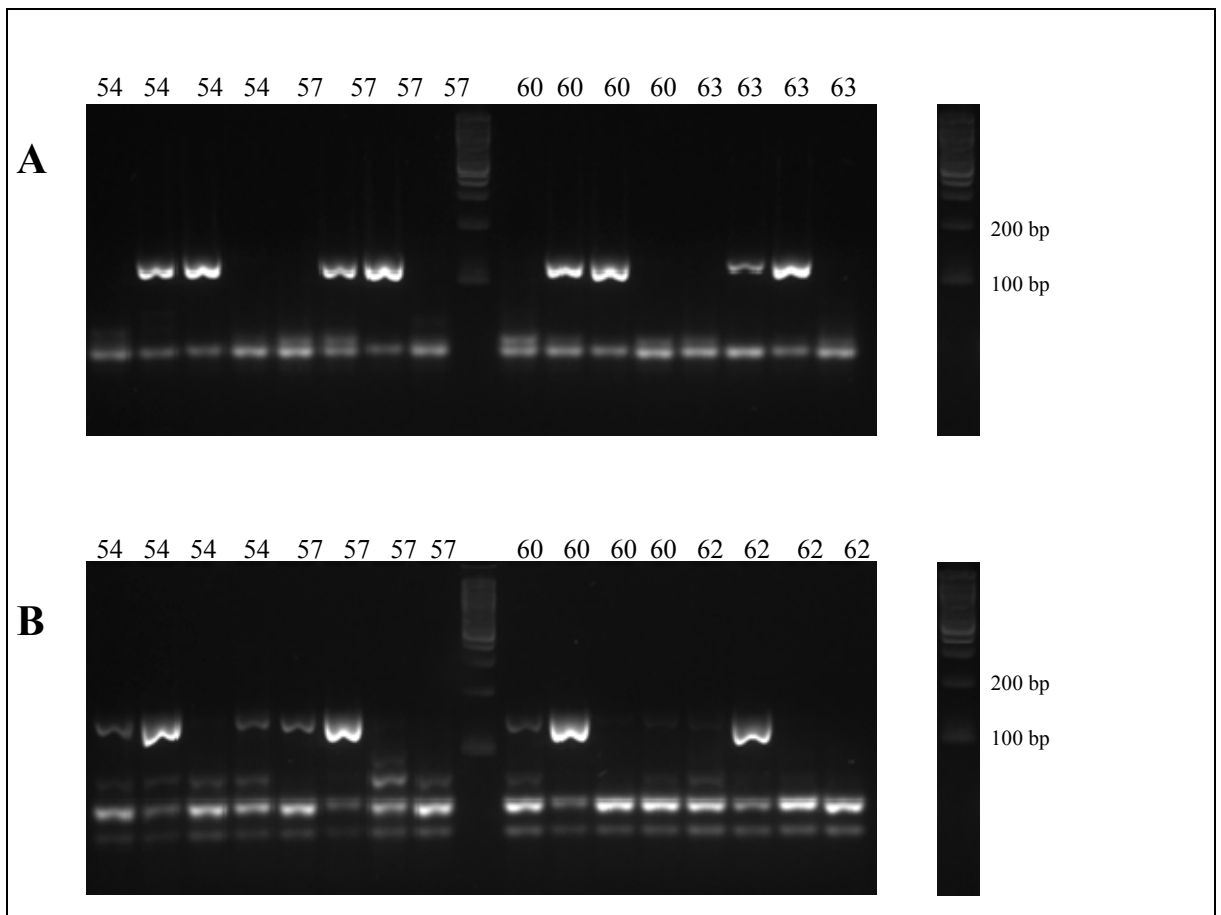
RPS13 ($s_x = 0,203$), *PPIA* ($s_x = 0,0751$), *B aktin* ($s_x = 0,280$), *TBP* ($s_x = 0,230$).



Graf číslo 1. Výběr endogenní kontroly. Na ose x jsou vyznačeny kandidátní geny pro endogenní kontrolu. Na ose y je uveden cyklus, ve kterém byl amplifikován daný gen. Vhodná endogenní kontrola byla vybrána na základě nejmenší směrodatné odchylky (*PPIA* $s_x = 0,0751$).

5.3.2. Optimalizace podmínek pro hybridizaci primerů s alelami *HLA DQA1*.

Jelikož byla sekvence primerů pro amplifikaci alel *HLA DQA1* částečně pozměněna nebo úplně nově navržena, bylo potřeba optimalizovat jejich hybridizační teplotu. Příklad optimalizace u alel *HLA DQA1*03* a *HLA DQA1*05* je zobrazen na **obrázku č. 7**. Nejlepší teplotní podmínky pro amplifikaci byly nalezeny při 60 °C (pro alely 01, 02, 03, 04) a 62 °C (pro alelu 05).



Obrázek číslo 7: Optimalizace teplotních podmínek primerů pro hybridizaci s alelami *HLA DQA1*03* a *HLA DQA1*05*.

A) Optimální teplota pro hybridizaci primerů s alelou *HLA DQ1*03*. U jednotlivých jamek elektroforetického gelu jsou uvedeny teploty (°C), při kterých byla provedena hybridizace s primery. Jamka č. 1 a 4 (při dané teplotě) obsahuje DNA pacientů, u kterých se alely 03 nevyskytují. Jamka č. 2 a 3 (při dané teplotě) obsahuje DNA pacientů, u kterých se alely 03 vyskytují. Velikost amplikonu je 127 bp. Pro porovnání je vpravo vedle gelu uveden 100 bp PCR žebříček.

B) Optimální teplota pro hybridizaci primerů s alelou *HLA DQ1*05*. U jednotlivých jamek elektroforetického gelu jsou uvedeny teploty (°C), při kterých byla provedena hybridizace s primery. Jamka č. 3 a 4 (při dané teplotě) obsahuje DNA pacientů, u kterých se alely 05 nevyskytují. Jamka č. 1 a 2 obsahuje DNA pacientů, u kterých se alely 05 vyskytují. Velikost amplikonu je 153 bp. Pro porovnání je vpravo vedle gelu uveden 100 bp PCR žebříček.

5.3.3. Účinnost amplifikace jednotlivých genů HLA II. třídy

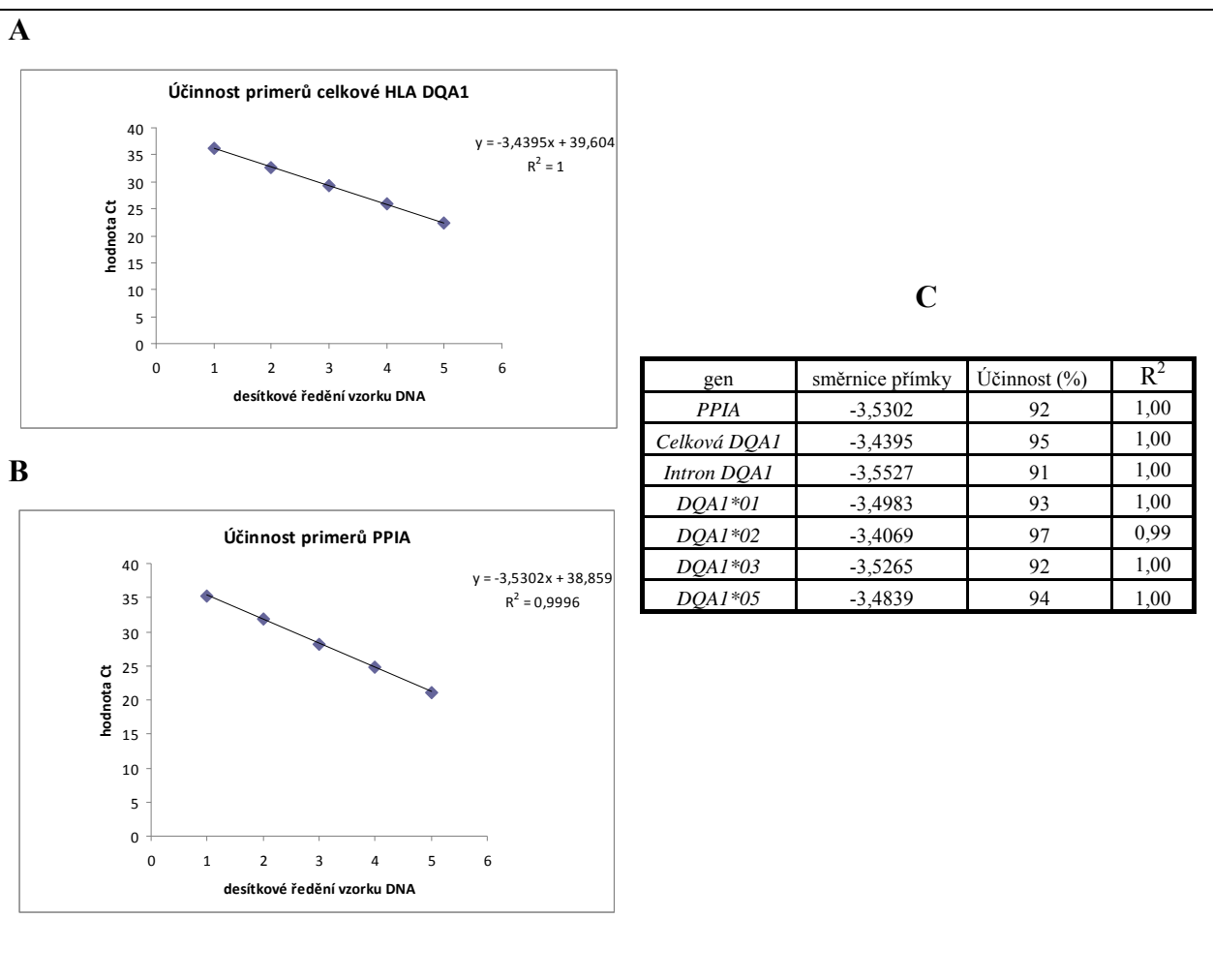
Ověření účinnosti amplifikace genů HLA II. třídy byla provedena v desítkovém ředění v tripletovém uspořádání. Účinnost primerů byla získána ze směrnice přímky závislosti hodnoty \bar{x} Ct na logaritmu ředěného vzorku DNA (tabulka č. 22).

Tabulka číslo 22: Stanovení účinnosti primerů.

A) Účinnost primerů pro amplifikaci genu pro celkové *HLA DQA1*. Závislost hodnoty Ct (osa y) na logaritmu desítkového ředění vzorku DNA (osa x). Účinnost primerů byla spočítána ze směrnice přímky daného grafu.

B) Účinnost primerů pro amplifikaci endogenní kontroly *PPIA*. Závislost hodnoty Ct (osa y) na logaritmu desítkového ředění vzorku DNA (osa x). Účinnost primerů byla spočítána ze směrnice přímky daného grafu.

C) Hodnoty účinnosti primerů u jednotlivých genů. V první sloupci jsou uvedené jednotlivé geny, u kterých byla účinnost primerů změřena. Druhý sloupec ukazuje hodnoty směrnice přímky, ze kterých byla počítána účinnost primerů. V posledním sloupci jsou uvedeny hodnoty R^2 (koeficient determinace), které měří sílu lineární závislosti. R^2 by mělo nabývat hodnot v intervalu 0,99 – 1,00.



5.3.4. Rozdíly v expresi alel *HLA DQA1*

Rozdíly v expresi *HLA DQA1* byly vztaženy vůči expresi *HLA DR*, *HLA DQA1* a vůči endogenní kontrole *PPIA*. Všechna měření byla provedena v tripletech. Získané hodnoty pro relativní exprese jsou ukázána v tabulce číslo 23. Jednotlivé grafy pro relativní exprese mezi *HLA DQA1* total, *HLA DRA1*, *PPIA* a alelami *HLA DQA1* jsou zaznamenány v **tabulce č. 24**. Nejvyšší úroveň exprese dosahovala alela *HLA DQA1*03*.

Tabulka číslo 23. Hodnoty použité pro vyhodnocení relativní exprese alely *HLA DQA1*01*.

V posledním sloupci je uveden vzorec, dle kterého byla relativní exprese počítána.

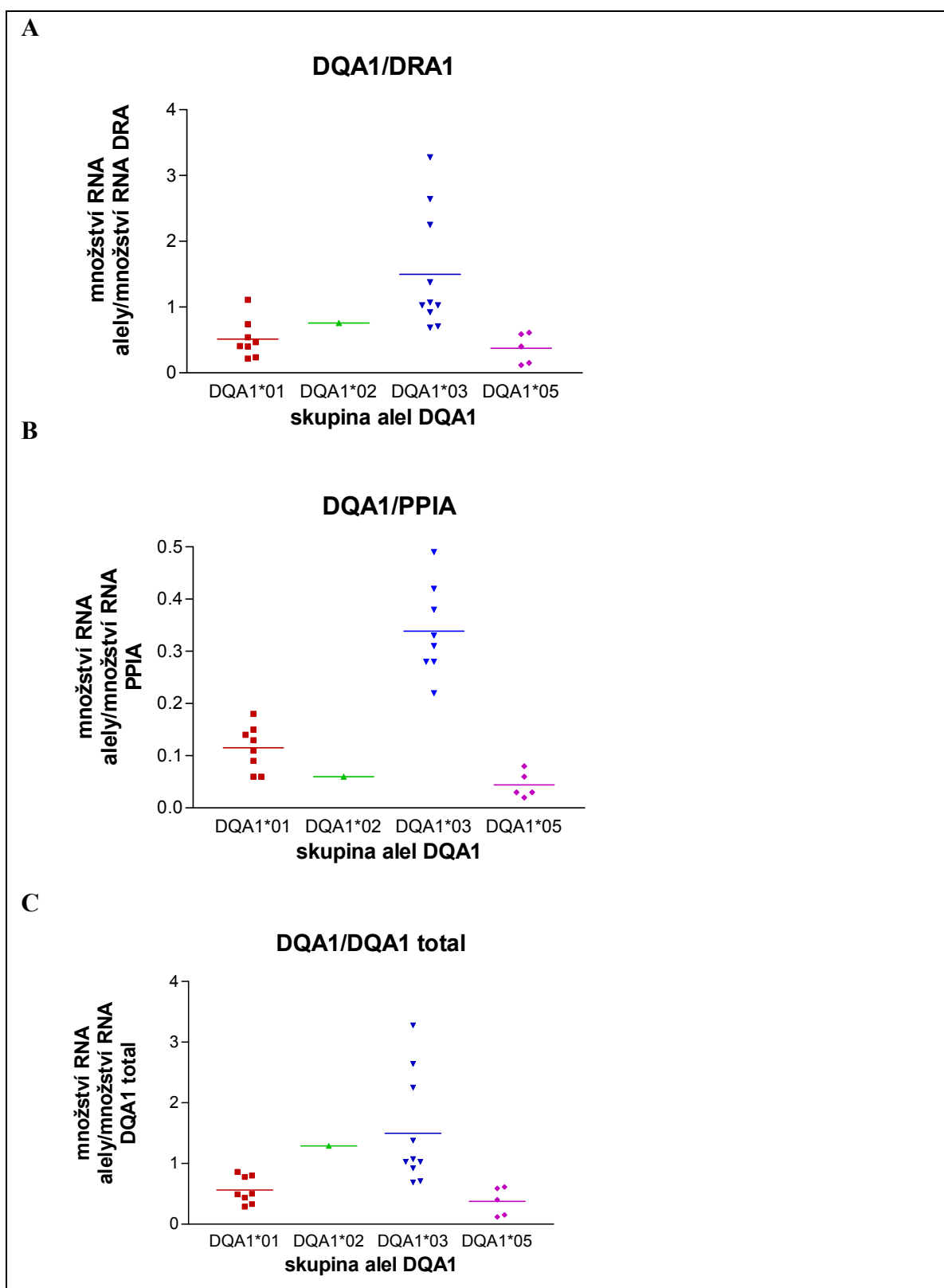
alela 01	PPIA	DRA	DQA1 total	DQA1*01	DQA1 total /DQA1*01
vzorek č.	\bar{x} Ct	\bar{x} Ct	\bar{x} Ct	\bar{x} Ct	$\frac{(1+E \text{ DQA1 total})^{\bar{x} \text{ Ct DQA1 total}}}{(1+E \text{ DQA1*01})^{\bar{x} \text{ Ct DQA1*01}}}$
8	32,03	32,49	32,93	33,65	0,44
10	29,78	28,89	30,46	32,61	0,33
13	27,02	27,31	29,61	30,08	0,50
20	27,32	27,28	28,61	30,15	0,49
21	28,72	28,63	30,28	31,12	0,78
22	29,58	30,79	31,24	33,60	0,29
27	27,53	27,86	29,92	30,73	0,80
28	26,97	29,00	29,72	28-1	0,86

Tabulka číslo 24. Relativní exprese alel genu *HLA DQA1*.

A) Relativní exprese alel *HLA DQA1/DRA1*.

B) Relativní exprese alel *HLA DQA1*/endogenní kontrola *PPIA*.

C) Relativní exprese alel *HLA DQA1/DQA1 total*.



6. Diskuze

Diabetes mellitus 1. typu představuje multifaktoriální autoimunitní onemocnění na jehož rozvoji se podílí genetické i negenetické faktory. Variabilita v epigenomu člověka může hrát významnou roli v etiopatogenezi tohoto autoimunitního onemocnění. Ačkoliv mnoho studií potvrdilo asociaci T1D s molekulami HLA DR a DQ, stále není dostatečně známa jejich úloha v etiopatogenezi T1D. Jednou z hypotéz je, že rizikovost alel je způsobena menší afinitou DR a DQ molekul k některému ostrůvkovému autoantigenu. Rizikovost alel může být také modulována rozdíly v expresi jednotlivých alel genu *HLA DQA1*. Následkem toho pravděpodobně dochází k porušení centrální a periferní tolerance vůči autoantigenu a vede k selekci odlišného buněčného repertoáru T lymfocytů.

Tato práce navazuje na studie týkající epigenetické regulace genů HLA II. třídy. Ve studované skupině pacientů byly dle očekávání zastoupeny nejvíce rizikové haplotypy *T1D: DRB1*04 – DQA1*0301 – DQB1*0302 (25 %) a DRB1*03 – DQA1*0501 – DQB1*0201 (20 %)*. Vzhledem k protektivní kombinaci alel *DQA1*0103 – DQB1*0603* je překvapivá jejich relativně vysoká frekvence u pacientů s T1D (5 %). Relativní riziko T1D při kombinaci těchto alel je uváděno jako 0,2 – 0,6 (MOUSTAKAS a PAPADOPOULOS 2002). Nejvíce protektivní alela *DQB1*0602* nebyla zachycena ani jednou.

Ve studovaném souboru T1D pacientů bylo detekováno 8 různých alel QAP (promotory genu *HLA DQA1*). Oproti publikovaným polymorfismům (Brünnler *et al.* 1997) byla definována nová QAP alela 1.2K. Alela QAP 4.1 byla rozdělena na dvě alely QAP 4.1A a 4.1B. U pacienta číslo 12 byla nalezen nestandardní haplotyp, alela QAP 1.1 byla asociována s alelou *HLA DQA1*03*. Jelikož tato asociace nebyla doposud popsána a byla u pacienta číslo 12 zachycena pouze jedna kopie této alely, může se jednat o úplně novou asociaci a nebo s větší pravděpodobností došlo k chybě při manipulaci se vzorkem. Vzhledem k tomu bude methylační analýza u pacienta číslo 12 opakována.

Úroveň exprese genů HLA II. třídy může být ovlivněna stupněm methylace regulačních oblastí (MAJUMDER a BOSS 2011). Methylační variabilita v promotorech genů byla doposud nalezena u genů *DQB1*0301, DQB1*0302 a DQB1*0303* (TOYODA *et al.* 1992). Methylační variabilita se netýká pouze genu *HLA DQB1*, ale jak je v této práci ukázáno, i genu *HLA DQA1*. Statisticky významné rozdíly v celkové methylaci alel QAP genu *HLA DQA1* byly nalezeny mezi nejvíce methylovanou QAP alelou 2.1 a alelami 1.3, 3.1 a 4.1B. Zvýšená methylace QAP 2.1 koreluje s výsledkami Britten a kol. Alela *HLA DQA1*0201* je na úrovni mRNA obecně méně exprimována než ostatní alely *HLA DQA1* (BRITTEN *et al.* 2009, DONNER *et al.* 2002). V naší studii byla prokázána snížená

úroveň exprese *HLA DQA1*02*. Vzhledem k tomu, že alela *HLA DQA1*02* byla zachycena pouze jednou, výsledek není statisticky významný. Úroveň hladiny mRNA *HLA DQA1*03* byla ve srovnání s ostatními alelami nejvyšší. Poměr mezi expresí *HLA DQA1*03* a expresí celkové *HLA DQA1* byl vyšší než 1. Poměr vyšší než 1 odporuje matematickému modelu podle kterého byl počítán. V současné době se snažíme najít chybu v metodice a vysvětlit tuto anomálii. Pravděpodobně půjde o chybu v metodice kvantifikace exprese celkové *HLA DQA1*. Exprese bude dále opakována s využitím pouze mononukleárních buněk a amplifikace celkové *HLA DQA1* bude nahrazena CD14 expresním kitem. Nicméně námi pozorovaná zvýšená exprese *HLA DQA1*03* může být, jak bylo pozorováno ve studii Britten a kol., dána zvýšenou promotorovou aktivitou *HLA DQA1*03*. Oproti *HLA DQA1*0501* a *0102* byla u některých alel dvojnásobná a v některých případech dokonce čtyřnásobná (BRITTEN *et al.* 2009). Jelikož jsou alely QAP uchovávány souhlasně s haplotypem, vypovídá to pravděpodobně i o jednotlivé promotorové síle alel QAP. Zvýšená exprese alely *HLA DQA1*03* také koreluje s námi zjištěným nižším stupněm methylace alely QAP 3.1.

V případě, že by se při regulaci uplatňovala methylace DNA, nemusí její účinek spočívat v množství, ale v rozmístění jednotlivých CpG dinukleotidů. Významné rozdíly v methylaci byly nalezeny na nukleotidové pozici -311. Nejvíce zde byla opět methylována alela QAP 2.1 spolu s alelou 1.1. Je otázkou, zda jediné methylační místo může mít vliv na expresi dané alely. V případě, že by toto jediné místo ovlivňovalo sílu promotoru, bránilo by pravděpodobně vazbě transkripčního faktoru na daný regulační úsek genu. Domníváme se, že by se mohlo jednat o vazbu transkripčních faktorů CIITA nebo XL9. Tento mechanismus *in vivo* byl například pozorován při studiu leukemických buněčných linií. Pomocí ChIP analýzy bylo zjištěno, že methylace v proximální oblasti promotoru může ovlivňovat vazbu hlavních transkripčních faktorů regulujících transkripci genů *HLA DQA1* (MAJUMDER a BOSS *et al.* 2011).

Nesrovnalosti v expresi, které se vyskytují v této studii mohou být vysvětlené různými faktory. Nejvýznamnější může být malý počet pacientů způsobený velkou variabilitou genotypu DQA1.

7. Závěr

V rámci své diplomové práce jsem stanovil methylační profil 20 pacientů pro promotorovou oblast genu *HLA DQA1*. Dále jsem stanovil relativní hladiny mRNA jednotlivých alel *HLA DQA1*. Výsledné data jsem porovnal mezi sebou a dospěl jsem k těmto závěrům:

- Byla zjištěna korelace mezi genotypem a celkovou methylací alely QAP promotoru genu *HLA DQA1*.
- Pozorovány byly rozdíly v methylaci jednotlivých CpG dinukleotidů. Jako významná se jeví methylace nukleotidové pozice -311, která je signifikantně zvýšená u alely QAP 2.1 oproti 1.4 a 1.3
- Zvýšená methylace alely QAP 2.1 koreluje s publikovanými výsledky zabývající se silou promotoru jednotlivých alel *HLA DQA1**02.
- Byla získány data o nových a doposud neidentifikovaných polymorfismech v oblasti -648 až -158 promotoru genu *HLA DQA1*.
- Byla prokázána nejvyšší úroveň exprese alely *HLA DQA1**03.

V rámci méj PhD práce bude studie rozšířena o další nosiče jednotlivých alel. Bude stanovena exprese proteinové produktu jednotlivých alel a studována methylace, acetylace histonů. Stejně analýze bude podroben i gen *HLA DQB1*, jehož produkt dimerizuje s produktem genu *HLA DQA1* a spolu vytváří molekulu HLA DQ na povrchu buňky.

Lepší znalosti o mechanismech, které aktivují imunitní systém přes HLA komplex, by mohly přispět ke zvýšení účinnosti a prevalence léčby autoimunitních onemocnění.

8. Seznam literatury

Acha-Orbea H., McDevitt H.O. (1987): The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II, I-A beta chain is unique. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2435 – 39.

Andersen L.C., Beaty J.S., Nettles J.W., Seyfried C.E., Nepom G.T., Nepoom B.S. (1991): Allelic polymorphism in transcriptional regulatory regions of HLA-DQB genes. *J Exp Med.* Jan 173: 181 – 92.

Barrett J.C., Clayton D.G., Concannon P., Akolkar B., Cooper J.D. et al. (2009): Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet* 41: 703 – 707.

Bennett S.T., Lucassen A.M., Gough S.C., Powell E.E., Undlien D.E., Pritchard L.E., Merriman M.E., Kawaguchi Y., Dronsfield M.J., Pociot F., Nerup J., Bouzekri N., Cambon-Thomsen A., Ronningen K.S., Barnett A.H., Bain S.C., Todd J.A. (1995): Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nat Genet* 9: 284 – 292.

Boss J.M., Jensen P.E. (2003) Transcriptional regulation of the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 105 – 111.

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

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

Cinek O. (2010). Molekulární epidemiologie dětského diabetu 1. typu. Habilitační práce, str. 12. Zdroj: <http://www.lmg.cz/cteni/cteni15.pdf>.

Cooney C.A., Dave A.A., Wolff G.L. (2002): Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr* 132: 2393 – 2400.

Cordovado S.K., Hancock L.N., Simone A.E., Hendrix M., Mueller P.W. (2005): High-resolution genotyping of HLA-DQA1 in the GoKinD study and identification of novel alleles HLA-DQA1*040102, HLA-DQA1*0402 and HLA-DQA1*0404. *Tissue Antigens* 65: 448 – 58.

Cuthbert G.L., Daujat S., Snowden A.W., Erdjument-Bromage H., Hagiwara T., Yamada M., Schneider R., Gregory P.D., Tempst P., Bannister A.J., Kouzarides T. (2004): Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118: 545 – 553.

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

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

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

Donner H., Seidl C., Rau H., Herwig J., Seifried E., Usadel K.H., Badenhop K. (2002):

Unbalanced amounts of HLA-DQA1 allele mRNA: DQA1*03 shows high and DQA1*0501 low amounts of mRNA in heterozygous individuals. *Eur J Immunogenet* 29: 321 –30.

Ehrlich M., Gama-Sosa M.A., Huang L.H., Madget R.M., Kuo K.C., McCune R.A., Gehrke Ch. (1982): Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res* 10: 2709 – 2721.

Fatemi M., Hermann A., Pradhan S., Jeltsch A. (2001): The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J Mol Biol* 309: 1189 – 1199.

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

Fourlanos S., Varney M.D., Tait B.D., Morahan G., Honeyman M.C., Colman P.G., Harrison L.C. (2008): The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases with lower-risk human leukocyte antigen genotypes. *Diabetes Care* 31: 1546 – 1549.

Fraga M.F., Ballestar E., Paz M.F., Ropero S., Setien F., et al. (2005): Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10604 – 10609.

Geraghty D., Inoko H., Beck S., Trowsdale J., Campbell D., Rowen L. et al. (1999): Complete sequence and gene map of human major histocompatibility complex. *Nature* 401: 921 – 923.

Haas J.P., Kimura A., Truckenbrodt H., Suschke J., Sasazuki T., Volgger A., Albert E.D. (1995): Early-onset pauciarticular juvenile chronic arthritis is associated with a mutation in the Y-box of the HLA-DQA1 promoter. *Tissue Antigens* 45: 317 – 321.

Haas J.P., Kimura A., Andreas A., Hochberger M., Keller E., Brännler G., Bettinotti M.P., Nevinny-Stickel C., Hildebrandt C., Sierp G., Sasazuki T., Albert E. (1994): Polymorphism in the upstream regulatory region of DQA1 genes and DRB1, QAP, DQA1, and DQB1 haplotypes in the German population. *Hum Immunol* 39: 31 – 40.

Hořejší V., Bartůňková J. (2009): *Základy imunologie*. 4. vydání. Triton, Praha. ISBN 978-80-7387-280-9.

Heijmans B.T., Tobi E.W., Stein A.D., Putter H., Blauw G.J., Susser E.S., Slagbloom P.E., Lumey L.H. (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 17046 – 17049.

Cheng X., Blumenthal R.M., (2008): Mammalian DNA methyltransferases: A structural perspective. *Structure* 16: 341 – 345.

Jaenisch R., Bird A. (2003): Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33: 245 – 254.

Jurkowski T.P., Meusburger M., Phalke S., Helm M., Nellen W., Reuter G., Jeltsch A. (2008): Human DNMT2 methylates tRNA(Asp) molecules using a DNAmethyltransferase-like catalytic mechanism. *RNA* 14: 1663 – 1670.

Kavvoura F.K., Ioannidis J.P.A. (2005): *CTLA-4* Gene Polymorphisms and Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus: A HuGE Review and Meta-Analysis, *Am J Epidemiol* 162: 3 – 16.

Kim M.S., Polychronakos C. (2005): Immunogenetics of Type 1 Diabetes. *Horm Res* 64: 180 – 188.

Klose, R. J. & Bird, A. P. (2006): Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31: 89 – 97.

Kološtová K., Černá M., Anděl M. (2002): Hypotézy asociácie HLA molekúl s ochoreniami autoimunitného charakteru. *Časopis lékařů českých* 141: 755 – 762.

Kropshofer H., Vogt A.B., Moldenhauer G., Hammer J., Blum J.S., Hammerling G.J. (1996): Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J* 15: 6144 – 6154.

Kouzarides T. (2007): Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693–705.

Lillicrop K.A., Phillips E.S., Torrens C., Hanson M.A., Jackson A.A., Burdge G.C. (2008): Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring. *Br J Nutr* 100: 278 – 282.

Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T. J. (1997): Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251 – 260.

Majumder J., Boss J.M. (2011): DNA methylation dysregulates and silences the *HLA-DQ* locus by altering chromatin architecture. *Genes Immun* 12: 291 – 299.

Metivier R., Gallais R., Tiffoche C., Le Peron C., Jurkowska R.Z., Carmouche R.P., Ibberson D., Barath P., Demay F., Reid G., Benes V., Jeltsch A., Gannon F., Salbert G. (2008): Cyclical DNA methylation of transcriptionally active promoter. *Nature* 452: 45 – 50.

- Meyerhans A., Vartanian J.-P., Wain-Hobson S. (1990): DNA recombination during PCR. *Nucleic Acids Res* 18 : 1687 – 1691.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
- Morgan H.D., Dean W., Coker H.A., Reik W., Petersen-Mahrt S.K. (2004): Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J Biol Chem* 279: 52353 – 52360.
- Morzycka-Wroblewska E., Harwood J.I., Smith J.R., Kagnoff M.F. (1993): Structure and evolution of the promoter regions of the DQA genes. *Immunogenetics* 37: 364 – 72.
- Mosyak L., Zaller D.M., Wiley D.C. (1998): The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation. *Immunity* 9: 377 – 383.
- Moustakas A.K., Papadopoulos G.K. (2002): Molecular properties of HLA-DQ alleles conferring susceptibility to or protection from insulin-dependent diabetes mellitus: keys to the fate of islet β -cells. *Am J Med Genet* 115: 37 – 47.
- Neefjes J., Jongstra M.L.M, Paul P., Bakke O. (2011): Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11: 823 – 836.
- Nelson C.J., Santos-Rosa H., Kouzarides T. (2006): Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* 126: 905 – 916.
- Nerup J., Platz P., Anderson O., Christy M., Lyngsoe J., Poulsen J., Ryder L., Staub Nielsen L., Thomsen M., Svejgaard A. (1974): HLA antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 2: 864 – 866.
- Okano M., Bell D.W., Haber D.A., Li E. (1999): DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247 – 257.
- Patterson C.C., Dahlquist G.G., Gyurus E., Green A., Soltesz G. (2009): EURODIAB Study Group Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989–2003 and

predicted new cases 2005–20: a multicentre prospective registration study. *Lancet* 373: 2027 – 2033.

Pelikánová T. (2003): Klasifikace a patogeneze diabetu. In: Bartoš V., Pelikánová T. (eds.): *Praktická diabetologie*. 3. vydání, Maxdorf, Praha, 47 – 53.

Perfetto C., Zacheis M., McDaid D., Meador J.W., Schwartz B.D. (1993): Polymorphism in the promoter region of HLA-DRB genes. *Hum Immunol*. Jan 36: 27 – 33.

Redondo M.J., Jeffrey J., Fain P.R., Eisenbarth G.S., Orban T. (2008): Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med* 359: 2849 – 2850.

Rocha N., Neejfes J. (2008): MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation. *Embo J* 27: 1 – 5.

Roche P.A., Teletski C.L., Stang E., Bakke O., Long E.O. (1993) Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8581 – 8585.

Roningen K.S., Spurkland A., Tait B.D., Drummond B., Lopez-Larra B., Baranda F.S. (1991): HLA class II association in insulin dependent diabetes mellitus among Blacks, Caucasoids and Japanese, In: *HLA 1991 – Proceedings of the 11th International Histocompatibility workshop and conference*. Oxford University Press.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2. vydání, Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0879693091.

Sigfried Z., Eden S., Mendelsohn M., Feng X., Tsuberi B.Z., Cedar H. (1999): DNA methylation represses transcription in vivo. *Nat Genet* 22: 203 – 206.

Shin J.S., Ebersold M., Pypaert M., Delamarre L., Hartley A., Mellman I. (2006) Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature* 444: 115 – 118.

Schreuder G.M., Tilanus M.G., Bontrop R.E., Bruining G.J., Giphart M.J., Van Rood J.J., De Vries R.R. (1986): HLA-DQ polymorphism associated with resistance to type I diabetes detected with monoclonal antibodies, isoelectric point differences and restriction fragment length polymorphism. *J Exp Med* 164: 938 – 942.

- Suetake I., Morimoto Y., Fuchikami T., Abe K., Tajima S. (2006): Stimulation effect of Dnmt3L on the DNA methylation activity of Dnmt3a2. *J Biochem* 140: 553–559.
- Sumnik Z., Drevinek P., Lanska V., Malcova H., Vavrinec J., Cinek O. (2004): Higher maternal age at delivery, and lower birth orders are associated with increased risk of childhood type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 112: 294 – 297.
- Ting J.P., Trowsdale J. (2002): Genetic control of MHC class II expression. *Cell* 109: 21 – 33.
- Todd A.J. (2010): Etiology of Type 1 Diabetes. *Immunity* 32: 457 – 464.
- Toyoda H., Redford A., Magalong D. (1992): Allele-specific methylation in the 5'-regulatory region of class II DQ beta genes in the human major histocompatibility complex (MHC): relationship to autoimmune disease susceptibility. *Dis Markers* 10: 7 –18.
- Ueda H., Howson J.M., Esposito L., Heward J., Snook H., et al. (2003): Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423: 506 – 11.
- Undlien D.E., Bennett ST, Todd J.A., Akselsen H.E., Ikäheimo I., Reijonen H., Knip M., Thorsby E., Rønningen K.S. (1995): Insulin gene region-encoded susceptibility to IDDM maps upstream of the insulin gene, *Diabetes* 44: 620 – 625.
- Uounissi-Benkalha H., Polychronakos C. (2008): The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends Mol Med* 14: 268 – 275.
- Winter W.E., Harris N., Schatz D. (2002): Immunological markers in the diagnosis and prediction of autoimmune Type 1a diabetes. *Clin Diabetes* 20: 183 – 191.
- Wolff G.L., Kodell R.L., Moore S.R., Cooney C.A (1998). Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. *FASEB J* 12: 949 – 957.
- Zhang J., Li W., Liu J., Wu W., Ouyang H., Zhang Q., Wang Y., Liu L., Yang R., Liu X., Meng Q., Lu J. (2012): Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and type 1 diabetes mellitus risk: an update by meta-analysis. *Mol Cell Endocrinol* 355: 135 – 142.