

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Martin Chmel

Studium epigenetických regulací HLA genů II. třídy v rámci příbuzenských vztahů

The study of epigenetic regulation of gene HLA II. Class within family relationships

Diplomová práce

Školitel: doc. MUDr. Marie Černá, CSc.

Praha, 2015

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, 10.8.2015

Martin Chmel

Poděkování:

Rád bych tímto poděkoval vedoucí práce doc. MUDr. Marii Černé, CSc. za umožnění vypracování diplomové práce na Ústavu obecné biologie a genetiky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Poděkování také patří všem kolegům v laboratoři za rady a pomoc a za vytvoření přátelského kolektivu.

Děkuji rovněž své rodině a přátelům za podporu během studia.

Abstrakt

Úvod: V současné postgenomické době představuje studium epigenetických regulací jeden z nástrojů pro porozumění funkci genů. Epigenetické regulace mohou přímo řídit časovou a prostorovou aktivitu genů či jejich umlčení. Molekulární podstata těchto regulací spočívá v modifikaci bází DNA, remodelaci chromatinu a RNA interferenci. Zároveň tyto mechanismy vykazují vlastní způsob přenosu dědičné informace do dalších generací nazývaný epigenetická dědičnost. V rámci mnoha chorob byla jako příčina prokázána deregulace epigenetické informace určitých genů. Z tohoto důvodu se jeví studium epigenomu HLA genů jako zvláště důležité, neboť tyto geny hrají zásadní roli v regulaci imunitního systému.

Cíle: Cílem této práce je vytvořit popis epigenetických modifikací v rámci rodin. Jedná se o analýzu histonových modifikací a metylace DNA v promotorovém úseku genu *HLA DQA1*. Cílem bylo rovněž srovnat rozdíly v epigenetických modifikacích mezi alelami a také srovnání rozdílů v daných modifikacích mezi generacemi. Získané výsledky budou porovnány s analýzou míry exprese genu *HLA DQA1*.

Metody: Z odebrané periferní krve dárců byly izolovány DNA, RNA a leukocyty. DNA byla použita ke genotypizaci. Další část vzorků DNA byla konvertována bisulfitovou metodou a posléze sekvenována. Ze získaných dat byla provedena analýza metylace DNA. Izolovaná RNA byla podrobena reverzní transkripci a poté kvantitativní PCR pro analýzu úrovně exprese. Leukocyty byly využity pro chromatinovou imunoprecipitaci a následně pro kvantitativní PCR k vyhodnocení míry trimethylace a acetylace histonu H3.

Výsledky: V rámci modifikací byl zjištěn statisticky významný rozdíl v acetylaci mezi alelami *01 a *05, kde acetylace *01 byla výrazně vyšší. Analýza trimethylace neposkytla statisticky průkazné výsledky. Statisticky neprůkazné jsou rovněž výsledky srovnání stavu histonových modifikací mezi generacemi. Analýza metylace DNA prokázala statisticky významné rozdíly mezi alelami *01 a *03 a *05, kde metylace DNA je u *01 vyšší než u alel *03 a *05. Srovnání rozdílů metylace DNA mezi generacemi prokázalo významné rozdíly mezi 1. generací, jako méně metylovanou oproti 3. generaci. Srovnáním exprese a modifikací nebyl zjištěn žádný statisticky významný vztah.

Klíčová slova: epigenetika, metylace DNA, histonové modifikace, HLA II. třídy, DQA1, exprese mRNA

Abstract

Introduction: At our post-genomic era the studies of epigenetic regulation constitutes one of the tools for understanding the function of genes. Epigenetic regulation can directly control the temporal and spatial gene activity or silencing. The molecular basis of these regulations are DNA bases modifications, chromatin remodeling and RNA interference. At the same time, these mechanisms have a special way of transferring genetic information to subsequent generations called epigenetic inheritance. It has been proven epigenetic deregulation of certain genes as cause for many disease. For this reason, the study of epigenome HLA genes seems particularly important because these genes play a fundamental role in regulating the immune system.

Aims: The aim of this work is to create a description of epigenetic modifications within families. It is an analysis of histone modifications and DNA methylation in the promoter region of the gene *HLA DQA1*. The aim was also to compare the differences in epigenetic modifications between alleles and compared the differences in these modifications between generations. The results will be compared with the analysis of the level of expression of the gene *HLA DQA1*.

Methods: From collected peripheral blood of donors were isolated DNA, RNA, and leukocytes. DNA was used for genotyping. Another part of the DNA samples were converted by bisulfite method, and then sequenced. The collected data were analyzed for DNA methylation. The isolated RNA was subjected to reverse transcription followed by quantitative PCR for analysis of expression levels. Leukocytes were used for chromatin immunoprecipitation and subsequently for quantitative PCR to assess the extent of trimethylation and acetylation of histone H3.

Results: Within the modifications was a statistically significant difference in acetylation between alleles *01 and *05 wherein acetylation of *01 was significantly higher. Trimethylation analysis did not provide statistically significant results. Statistically insignificant results are also in comparing of the state of histone modifications between generations. DNA methylation analysis revealed statistically significant differences between alleles *01 and *03 and *05, wherein the DNA methylation of *01 higher than that of alleles *03 and *05. Comparison of DNA methylation differences between generations showed significant differences between the first generation, less methylated as compared to the third generation. By comparing the expression and modification there was no statistically significant relationship.

Keywords: epigenetics, DNA methylation, histone modifications, HLA class II, DQA1, mRNA expression

Obsah

1	ÚVOD	13
2	PŘEHLED LITERATURY	14
2.1	HLA - human leukocyte antigen	14
2.1.1	HLA I. třídy	14
2.1.2	HLA II. třídy	15
2.2	Genový komplex HLA	16
2.3	Regulace exprese HLA genů	17
2.4	HLA geny a autoimunitní onemocnění	18
2.5	Molekulární mechanismy epigenetiky	19
2.5.1	Modifikace bází DNA	19
2.5.2	Remodelace chromatinu a histonový kód	23
2.5.3	RNA interference	28
2.5.4	Regulace epigenetických procesů	29
2.5.5	Reprogramování epigenomu	31
2.6	Epigenetická dědičnost	33
3	CÍLE PRÁCE	35
4	MATERIÁL	36
4.1	Pufry, roztoky a komerční soupravy	36
4.2	Primery, sondy a protilátky	41
4.3	Použité přístroje a počítačové programy	43
5	POSTUPY A METODIKA PRÁCE	44
5.1	Analýza DNA	44
5.1.1	Izolace DNA z plné krve	44
5.1.2	Stanovení koncentrace a čistoty DNA	45
5.1.3	Genotypizace	45
5.1.4	Bisulfitová konverze DNA	46
5.1.5	Přečištění po bisulfitové konverzi	47
5.1.6	Amplifikace produktu pomocí nested PCR	48
5.1.7	Izolace a přečištění PCR produktu	49
5.1.8	Klonování	50
5.1.9	Izolace plazmidové DNA alkalickou lýzou	52
5.1.10	Ověření pozitivně transformovaných kolonií - restriční štěpení	53
5.1.11	Sekvenace	54

5.2	Analýza RNA.....	55
5.2.1	Izolace RNA	55
5.2.2	Reverzní transkripce	56
5.2.3	Kvantitativní PCR	56
5.3	Analýza chromatinu	57
5.3.1	Izolace leukocytů	57
5.3.2	Izolace CD14 a CD19 buněk (monocytů a B-lymfocytů)	58
5.3.3	Crossling.....	59
5.3.4	Sonikace	59
5.3.5	Chromatinová imunoprecipitace.....	59
5.3.6	Purifikace po chromatinové imunoprecipitaci.....	61
5.3.7	Kvantitativní PCR pro analýzu chromatinu.....	61
5.4	Statistická analýza.....	61
6	VÝSLEDKY	62
6.1	Genotypizace	62
6.2	Chromatinová imunoprecipitace.....	66
6.3	Analýza metylace DNA	73
6.4	Analýza exprese genů <i>DQA1</i> a <i>DQB1</i>	74
6.5	Korelace epigenetických modifikací a míry exprese	78
7	DISKUZE.....	80
8	ZÁVĚR.....	82
9	SEZNAM LITERATURY	84

Seznam zkratek

2A-HUB	represorový komplex
5-caC	5-karboxylcytosin
5-fC	5-formylcytosin
5-hmC	5-hydroxymetylcytosin
5-mC	5-metylcytosin
6p21	pozice na chromosomu
6-mA	6-metyladenin
Acetyl-CoA	Acetyl-koenzym A
Ago	proteiny Argonaut
APC	antigen prezentující buňky
ATM	proteinová kináza
ATP	adenosintrifosfát
ATR	proteinová kináza
A^{vy}	Agouti viable yellow
B12	vitamín
bp	páry bází
CD4, 8	cluster of differentiation
CGI	CpG ostrov
CIITA	class II transactivator
CpG	cytosin-fosfát-guanin
DAMT-1	DNA metyltransferáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNMT1	DNA metyltransferáza
DNMT3a	DNA metyltransferáza
DNMT3b	DNA metyltransferáza
DQA1 0301	alela genu <i>HLA DQA1</i>
DQB1 0302	alela genu <i>HLA DQB1</i>
DRiPs	defactive ribosomal products
ds RNA	dvouřetězcová ribonukleová kyselina
DUBs	deubiquitinační enzymy
E1, 2, 3	ubiquitinační enzymy
E11.5	jedenáctý den embryonálního vývoje

ERp57	chaperon
EZH2	DNA metyltransferáza
G9/GLP	proteinový komplex
GNATs	acetyltransferáza
H1	histon H1
H2A	histon H2A
H2B	histon H2B
H3	histon H3
H3.3	varianta histonu H3
H3K9me3	modifikovaný histon H3
H4	histon H4
HATs	histon-acetyltransferáza
HCG	high CpG content
HDAC	histon-deacetyláza
HIRA	histonový chaperon
HLA	lidský leukocytární antigen
HP1	heterochromatin protein
CH₃	metylová skupina
CH₃CO	acetylová skupina
IAP	retrotranspozon
IFN-γ	interferon gamma
Ii	invariantní řetězec
Jmjc	proteinová doména
K	lysin
KDM1A	demetyláza
KDM2A	demetyláza
KMT1A	metyltransferáza
KMT2A	metyltransferáza
KMT6	metyltransferáza
LCG	low CpG content
LD	vazebná nerovnováha
lncRNA	dlouhá nekódující RNA
MBD	methyl binding domain
MeCP2	metyl vazebný protein

MHC	major histocompatibility complex
miRNA	micro RNA
mRNA	mediátorová RNA
MyaD1	myší gen
MYST HATs	histon-acetyltransferáza
NAP1	histonový chaperon
NCoA	histon-acetyltransferáza
HATs	histon-acetyltransferáza
ncRNA	nekódující RNA
NF-Y	DNA vazebný protein
NK	natural killer
Oct4	gen exprimovaný pluripotentními buňkami
p300/CBP	histon-acetyltransferáza
p53	transkripční faktor
PDI	chaperon
PGC	primordial germ cell
piRNA	piwiRNA
PO₄	fosfátová skupina
PP4	fosfatáza
PRC2	Polycomb protein
Propionyl-CoA	Propionyl-koenzym A
R	arginin
Rasgrf1	imprintovaný gen
RFX	DNA vazebný protein
RING1B	ubiquitin ligáza
RISC	RNA induced silencing complex
RNAi	RNA interference
S	serin
SAGA	histon-acetyltransferáza
SIMs	SUMO-interacting motifs
Sin3A	proteinový komplex
siRNA	short interfering RNA
Sox2	gen exprimovaný pluripotentními buňkami
SRC HATs	histon-acetyltransferáza

Su(var)205	metyl-vazebný protein
SUMO	small ubiquitin-related modifier
Suv39h1	histon-acetyltransferáza
Suv39h2	histon-acetyltransferáza
SWI/SNF	histon-acetyltransferáza
T	threonin
T1DM	<i>diabetes mellitus</i> 1. typu
TAP	transportérové protein
TATA	specifická sekvence promotoru
Tc	cytotoxické T-lymfocyty
TCR	receptor T-lymfocytu
TET1, 2, 3	oxidázy metylcytosinu
Th	pomocné T-lymfocyty
UbC	gen
USP16	deubiquitinační enzym
Xist	lncRNA

1 ÚVOD

Jednu ze zásadních rolí v imunitním systému organismu hrají produkty genů s označením HLA (human leukocyte antigen). Produktem těchto genů jsou transmembránové glykoproteiny. Jejich základní funkcí je vázat peptidové fragmenty a tyto tzv. antigeny prezentovat na svém buněčném povrchu. Rozpoznání navázaného peptidového fragmentu se účastní T lymfocyty a NK buňky. HLA glykoproteiny patří do skupiny savčích histokompatibilitních proteinů MHC (major histocompatibility complex). Obecně bychom mohli říci, že HLA molekuly zprostředkovávají organismu rozpoznání mezi „vlastním“ a „cizím“. Tato teze je zcela zásadní. Z logiky věci totiž vyplývá, že pokud organismus ztratí schopnost rozlišovat mezi těmito dvěma stavy, může tato chyba vést k fatálním důsledkům pro daný organismus. Zcela názorným příkladem jsou autoimunitní onemocnění, při kterých právě imunitní systém napadá buňky vlastního těla. Proto porozumění funkci a struktuře HLA glykoproteinů a regulaci jeho genového komplexu je zcela zásadní.

Regulace exprese genů je v současné postgenomické éře studována převážně z pohledu epigenetických procesů. Základní epigenetické mechanismy představují metylaci DNA, modifikaci histonů a RNA interferenci. Propletená síť interakcí těchto procesů vytváří důmyslné regulační mechanismy, které řídí časovou a prostorovou aktivitu genu. Epigenetické regulace navíc v některých případech mohou odpovídat na stimuly vnějšího prostředí, což může vést ke změně exprese. Další zvláštností epigenetiky je rovněž tak zvaná epigenetická dědičnost, kdy dochází k přenosu negenetické informace na další generaci. Studium všech těchto epigenetických jevů poskytuje hlubší porozumění genomu, který v tomto ohledu představuje vlastní specifický ekosystém.

Výzkum epigenetické regulace HLA genů může poskytnout ucelenější představu o jejich regulaci. Těchto výsledků poté může být využito při studiu příčin různých chorob, které jsou nějakým způsobem s HLA geny spojeny.

2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 HLA - human leukocyte antigen

Podle struktury a funkce se HLA geny dělí do dvou základních skupin s označením HLA I. třídy (HLA gpI) a HLA II. třídy (HLA gpII), kódujících transmembránové molekuly (Maenaka and Jones 1999). Mimo tyto dvě skupiny je ještě rozeznávána další skupina, HLA III. třídy, kódující převážně humorální faktory imunitního systému, jako jsou molekulární chaperony (heat-shock proteiny Hsp 70, HLA-DM), cytokiny (tumour necrosis factor α a β - TNFA a TNFB, lymfotoxin), složky komplementu (C2, C4A, C4B, properdin faktor B) a enzym 21-hydroxyláza (21A,21B).

2.1.1 HLA I. třídy

Molekuly HLA I. třídy jsou exprimovány téměř všemi jadernými buňkami lidského organismu a peptidové fragmenty, které prezentují, jsou většinou endogenního původu. Dané antigeny tedy představují proteiny vlastního buněčného repertoáru, ale jedná se i o intracelulární antigeny cizí, např. virové. HLA I. třídy jsou rozpoznávány cytotoxickými T lymfocyty (Tc). Přesněji řečeno, jsou rozpoznávány TCR receptory s koreceptory CD8 T lymfocytů, jejichž aktivace vede k cytotoxické reakci, čímž abnormální (nádorovou) nebo virem infikovanou buňku zlikvidují.

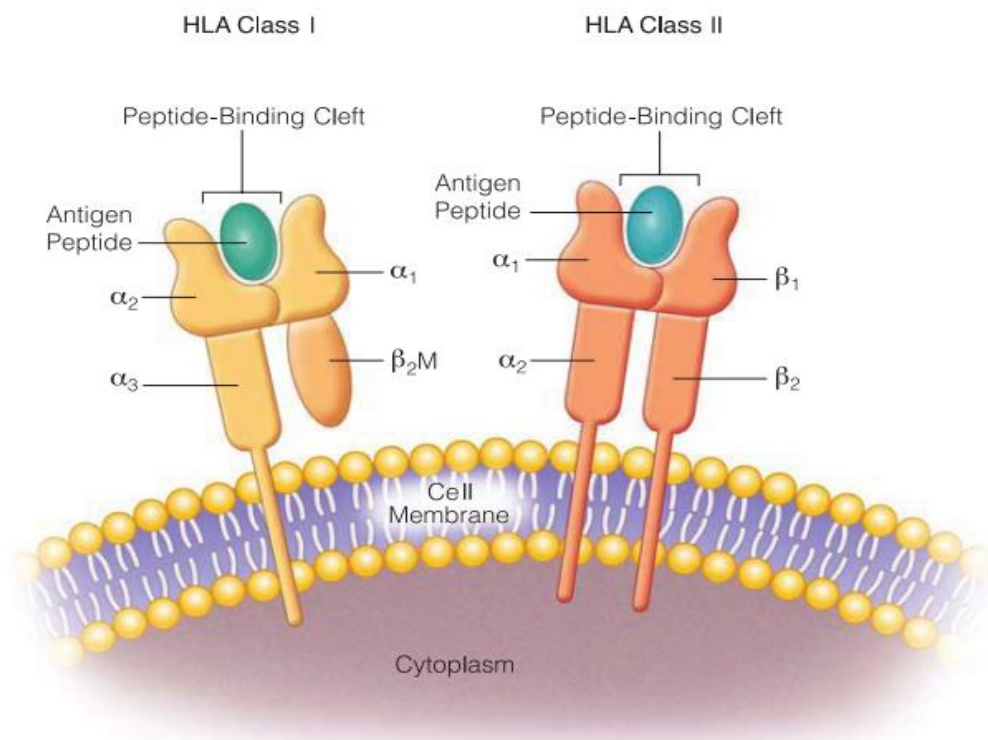
Strukturálně je glykoprotein HLA I. třídy heterodimer. Je tvořen transmembránovým těžkým řetězcem se třemi doménami ($\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\alpha 3$), který je asociován s lehkým řetězcem zvaným β_2 mikroglobulin (Maenaka and Jones 1999),(Obr. 1). Mezi doménami $\alpha 1$ a $\alpha 2$ se nachází tzv. vazebná rýha, do které se kovalentně vážou peptidové fragmenty o velikosti 8 až 10 aminokyselin (York et al. 2002). Fragmenty určené k vazbě na HLA I. třídy pocházejí z proteolytického štěpení v proteasomu. Někdy bývají tyto fragmenty označovány jako DRiPs (Defective ribosomal products). Vznikají chybami v transkripci či translaci a takto defektní proteiny jsou označeny ubiquitinací k degradaci (Li et al. 2011). Po rozštěpení jsou transportovány do endoplazmatického retikula pomocí TAP proteinů a navázány na již částečně složený komplex HLA. Vazba peptidového fragmentu a konečné složení celého komplexu je řízeno chaperony ERp57 a PDI (Park et al. 2006). Po dokončení tohoto procesu je celý komplex transportován přes Golgiho aparát, kde probíhá glykace, na povrch buňky.

2.1.2 HLA II. třídy

Struktura a funkce glykoproteinů HLA II. třídy se v několika ohledech liší od HLA I. třídy (Obr. 1). Tyto molekuly jsou exprimovány za fyziologických podmínek jen na několika málo typech buněk. Konkrétně se jedná o dendritické buňky, monocyty, makrofágy a B lymfocyty, které jsou celkově označovány jako antigen prezentující buňky (APC). Nadto, HLA II. třídy většinou prezentují antigeny exogenního původu. Jedná se tedy o proteiny, které buňka pohltila. Rozeznávání těchto HLA molekul se opět účastní T lymfocyty, ovšem typu pomocných (Th) buněk. Základem rozpoznání je interakce HLA komplexu s navázaným peptidovým fragmentem a TCR receptorem a CD4 koreceptorem. Interakce rozdílných koreceptorů, respektive buněčných typů, než tomu bylo v případě HLA I. třídy, vede k rozdílné imunitní odpovědi. Pakliže v prvním případě vedla odpověď k cytotoxickému zničení buňky, tak zde dochází za pomoci Th lymfocytů ke stimulaci sekrece cytokinů. Cytokiny následně stimulují další typy buněk, jako jsou například makrofágy a B lymfocyty.

Struktura HLA II. třídy je opět heterodimerní, ovšem tvořena dvěma transmembránovými řetězci α a β (Maenaka and Jones 1999). V N-koncové části obou řetězců jsou domény $\alpha 1$ a $\beta 1$, které k sobě těsně přiléhají a tvoří vazebnou rýhu pro peptidový fragment. Fragменты vázající se na tento typ molekul dosahují velikosti 10-15 aminokyselin (Maenaka and Jones 1999).

Další rozdíly u HLA II. třídy spočívají v jejich vlastní biogenezi. Oba těžké řetězce α i β jsou syntetizovány v endoplazmatickém retikulu, kde k nim zároveň asociuje další transmembránový protein zvaný invariantní řetězec (Ii), (Neefjes et al. 2011). Ii svou asociací ke komplexu HLA brání vazbě případných fragmentů do vazebné rýhy. Následně je celý tento komplex transportován přes Golgiho aparát, kde probíhá glykace, do sekrečních váčků, které fúzí s pozdním endosomem. V endosomu jsou připravené proteolyticky naštěpené pohlčené proteiny. Po fúzi dochází ke štěpení invariantního řetězce Ii až na pouhý fragment, který zůstane vázán do molekuly HLA II. třídy a nazývá se peptid invariantního řetězce asociovaný s II. třídou (class II-associated invariant chain peptide = CLIP). Výměna CLIP za stabilně vázající antigenní peptidy je v kompartmentu katalyzována specializovaným lyzozomálním chaperonem, označeným HLA-DM. Po dokončení tohoto procesu je celý komplex transportován na povrch buňky.



Obrázek 1. Struktura molekul HLA I. a II. třídy. Upraveno podle Wai and Foley, 2011.

2.2 Genový komplex HLA

Lidský histokompatibilní komplex je v rámci genomu rozsáhlá oblast na chromozomu 6. Přesné umístění tohoto komplexu odpovídá chromozomální pozici 6p21 a velikosti přes 3.6 Mb (Shiina et al. 2009). Tato oblast bývá v literatuře pojmenován jako HLA či MHC komplex, popřípadě jako HLA super-lokus. V této rozsáhlé oblasti je kódováno šest klasických histokompatibilitních antigenů (HLA) a přinejmenším dalších 132 různorodých proteinů (Shiina et al. 2009). Velká část genů přítomných v HLA super-lokusu má spojitost s imunitním systémem. Klasifikuje se do tří podoblastí: HLA II. třída (centromerická), HLA I. a III. třída (telomerická). Klasické HLA I. třídy se dělí na tři jednořetězcové izotypy s označením HLA A, B a C. U neklasických HLA I. třídy se rozlišují izotypy HLA E, F a G. HLA II. třídy mají dvouřetězcové izotypy HLA DR, DQ a DP. (Shiina et al. 2009). Protože glykoproteiny HLA II. jsou heterodimery tvořené dvěma transmembránovými řetězci α a β , je důležité si uvědomit další dělení daných izotypů. Konkrétní gen pro α řetězec konkrétního izotypu pak bude mít označení například HLA DQA s číselným označením konkrétní alely. Tento komplikovaný systém odráží obrovský polymorfismus daných genů. V rámci celého lidského genomu můžeme HLA super-lokus označit za nejpolymerfnější oblast. Zvláště pak vlastní HLA geny I. a II. třídy dosahují

velkých počtů různých alelových forem. Součet alel všech tří izotypů HLA I. třídy je 2215 a II. třídy 986 (Shiina et al. 2009). Kombinacemi různých alel genů pro jednotlivé řetězce je dosaženo enormní diverzity ve struktuře transmembránového komplexu. Tato diverzita poskytuje značnou výhodu jak pro jedince, tak pro celou populaci. Různorodost struktury totiž umožňuje buňkám vázat množství různorodých antigenů. Pokud nastane situace, že určitý jedinec není schopen vázat daný antigen, tak v rámci populace existuje vysoká pravděpodobnost, že se objeví u jiného jedince kombinace alel tvořící HLA komplex schopný této vazby. Na druhou stranu, vysoký polymorfismus HLA genů komplikuje transplantační medicínu.

Z hlediska genetiky je pro HLA geny charakteristická vazebná nerovnováha. Vazebná nerovnováha (LD - linkage disequilibrium) zde vyjadřuje alelové interakce mezi různými lokusy, jako důsledek selekce či genového „svezení se“ (Miretti et al. 2005). Zjednodušeně by se dalo říci, že některé alely různých lokusů se statisticky dědí s větší pravděpodobností jako konzervované bloky. Širší vysvětlení LD v rámci HLA superlokusu pak dále popisuje přímé provázání proteinových interakcí produktů těchto genů.

2.3 Regulace exprese HLA genů

V předchozích kapitolách bylo popsáno, že HLA II. třídy jsou exprimovány pouze na APC buňkách. Rozdílná distribuce molekul HLA I. a II. třídy tak vyžaduje i rozdílné regulační mechanismy. Protože praktická část této práce se zabývá HLA II. třídy, konkrétně genem *DQAI*, budou se následné informace vztahovat pouze k dané třídě.

Regulace exprese HLA gpII je primárně cílená na úroveň transkripce (Mach et al. 1996). Hlavním kontrolním elementem regulujícím transkripci je 150bp dlouhá sekvence v promotoru před místem iniciace transkripce. Tato oblast obsahuje sekvenční motivy značené jako S, X, X2 a Y boxy. Jejich sekvence, orientace a pozice umístění je konzervována u všech genů pro α i β řetězce (Benoist and Mathis 1990). Stejně sekvence se vyskytují i u genů, které jsou koregulovány s HLA gpII, například s *HLA DM*, či geny pro Ii (Brown et al. 1993). Tyto sekvence jsou cílovými místy DNA vazebných proteinů NF-Y, CREB a RFX, jež interagují s dalšími regulačními faktory (Wright and Ting 2006).

Jak již bylo zmíněno výše, geny HLA II. třídy jsou vysoce polymorfní (s výjimkou *HLA-DRA*), s desítkami až stovkami známých variant pro každý gen. Většina variant je koncentrována do oblasti kódující žlábek, do kterého se váže peptid a důsledkem toho je, že každý heterodimer II. třídy prezentuje odlišné spektrum peptidů. Nicméně, sekvenční

variabilita není omezena pouze na kódující oblast; je také hojná v promotoru a determinuje variabilitu v genové expresi mezi alelami.

Obecně je u APC buněk exprese HLA gpII konstitutivní. Naproti tomu u jiných buněčných typů je možné expresi daného komplexu indukovat. Stimulačním faktorem, který takto expresi indukuje je Interferon gama (IFN- γ), (Collins et al. 1984). Konstitutivní exprese u APC kompletně závisí na expresi regulátoru CIITA (class II transactivator), který se váže na regulační faktory boxů X, X2 a Y (Reith et al. 2005). Jeden ze základních mechanismů, jak protein CIITA indukuje transkripci, patrně spočívá v iniciaci vazby histon-acetyltransferáz (Wright and Ting 2006).

Regulace CIITA je řízena přinejmenším třemi různými promotory, značené jako CIITApI, CIITApIII a CIITApIV, které odpovídají na podněty různých signalizačních drah (LeibundGut-Landmann et al. 2004). Konstitutivní exprese CIITA v dendritických buňkách je kontrolována promotorem CIITApI, zatímco obdobná konstitutivní exprese CIITA v B lymfocytech je řízena promotorem CIITApIII. Naopak, exprese CIITA stimulovaná IFN- γ je regulována promotorem CIITApIV.

2.4 HLA geny a autoimunitní onemocnění

Svou funkcí vytvářejí komplexy HLA – peptid základ správného fungování adaptivního imunitního systému. Ovšem genetická a epidemiologická data prokázaly, že dané molekuly mají přímou souvislost s celou řadou autoimunitních onemocnění. Genetická predispozice týkající se HLA super-locusu byla již prokázána u více než sta onemocnění, zahrnujících například diabetes mellitus 1. typu (T1DM) či revmatoidní artritidu (RA), (Shiina et al. 2009). Pro mnoho chorob asociovaných s haplotypy HLA bylo velmi složité určit, která konkrétní alela/alely genů přímo ovlivňují riziko choroby, vzhledem k vazebné nerovnováze v HLA super-locusu. Prezentace antigenu pomocí HLA glykoproteinů v thymu je využívána při selekci autoreaktivních T lymfocytů a právě jejich nedostatečná centrální i periferní eliminace vede k rozvoji autoimunitního prostředí.

Současné genetické, epidemiologické a strukturální analýzy poskytují hlubší porozumění asociace některých alel s určitými autoimunitními chorobami. Zvláště popis struktury HLA značně zlepšil pochopení molekulárních mechanismů prezentace antigenu. Peptidy jsou vázány do vazebné rýhy v rozvolněné konformaci vodíkovými můstky mezi stěnami rýhy. Ze strukturálních analýz vyplývá, že konformace navázaného fragmentu nemá prakticky žádný vztah k jeho sekvenci a je řízena striktně určitými místy v HLA

molekule, zvané kotvy (Jones et al. 2006). Jednotlivé izotypy HLA jsou proto charakteristické vazbou určitých typů fragmentů na základě svých specifických kotevních míst (Jones et al. 2006). Tato specifita je dána množstvím kotevních míst, hydrofobicitou či elektrostatickým nábojem jednotlivých aminokyselin vazebné rýhy HLA molekuly.

Rozeznáváme dva typy autoimunitních onemocnění, orgánově specifické a systémové. K prvnímu typu patří např. T1DM s autoimunitní reakcí proti insulin-sekretujícím β buňkám pankreatu. Silná genetická predispozice pro T1DM byla prokázána u genu *HLA DQB1* alely *0302 a genu *HLA DQA1* alely *0301 (Todd and Wicker 2001). Naproti tomu alela *0602 genu *DQB1* je dominantně protektivní vůči T1DM. Výzkumy prokázaly, že důležitým zdrojem autoantigenů je insulin, dekarboxyláza kyseliny glutamové a tyrosin-fosfatáza (Kent et al. 2005). Rozdílná struktura vazebných rýh pro haplotypy *DQB1* *0302 a *DQA1* *0301 poskytuje možnost vazby fragmentů inzulinu, které jsou následně rozpoznávány autoreaktivními T lymfocyty (Jones et al. 2006). K druhému typu patří např. RA s autoimunitní reakcí proti obecným strukturám pojivové tkáně. Zde však genetická predispozice byla prokázána u genu *HLA DRB1* alely *04.

2.5 Molekulární mechanismy epigenetiky

Zápis epigenetické informace je z hlediska své podstaty vnímán jako proces chemické modifikace bází DNA, chemické modifikace aminokyselin v histonových polypeptidech a regulací pomocí RNA. Z uvedeného je patrné, že epigenetická regulace genové exprese probíhá na všech úrovních centrálního dogmatu molekulární biologie. Tedy na úrovni vlastní DNA (modifikace bází), na úrovni posttranskripční (RNA interference) a úrovni posttranslační (modifikace histonů). Velmi důležité je rovněž uvést, že všechny tyto epigenetické modifikace jsou reverzibilní, tedy vratné.

2.5.1 Modifikace bází DNA

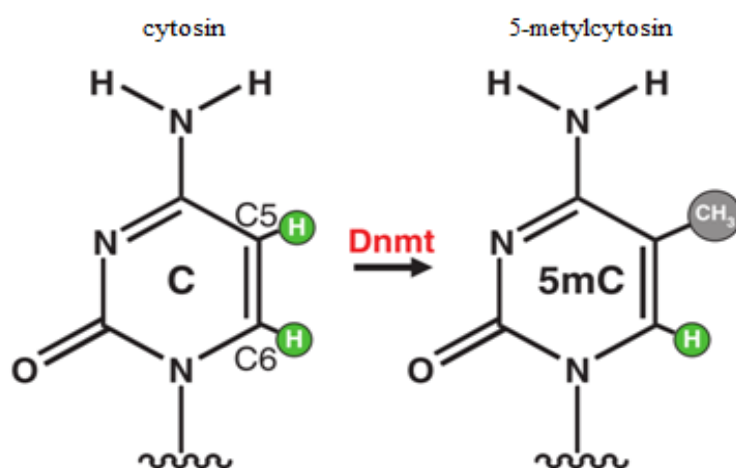
V rámci biologických procesů je známa celá řada modifikací bází, které mají mnoho různých funkcí. Dosud je popsáno již více než sto chemicky pozměněných bází (Helm 2006). Většina z nich hraje svou roli v metabolismu RNA (Helm 2006). Z epigenetického hlediska jsou dosud nejvýznamnější tyto modifikace: 5-metylcytosin, 5-hydroxymetylcytosin, 5-formylcytosin, 5-karboxylcytosin a 6-metyladenin, z nichž některé mají přímo prokázanou funkci v regulaci genové exprese a jiné jsou patrně jen meziprodukty metabolismu nukleotidů.

2.5.1.1 5-metylcytosin (5-mC)

Metylace cytosinu je v rámci epigenetiky nejlépe prostudovaná modifikace báze, a to jak z hlediska molekulárního mechanismu vzniku, tak i z hlediska jejího funkčního významu. Podstatou této modifikace je kovalentní vazba metylové (CH₃) skupiny na pátý atom uhlíku (C5) cytosinu, katalyzovaná enzymy, DNA metyltransferázami, kde donorem CH₃ je S-adenosylmetionin (Ooi et al. 2009), (Obr. 2). Prvním krokem v enzymatické konverzi cytosinu na 5-mC je vazba sulfhydrylové skupiny cysteinu aktivního místa enzymu na šestý atom uhlíku (C6) pyrimidinového kruhu. C5 se stává nukleofilním vůči metylsulfoniovému centru S-adenosylmetioninu, což vede k vazbě CH₃ skupiny (Vilkaitis et al. 2001). Samotný enzym vytváří na substrátu DNA konformační změnu zvanou „base-flipping“, kdy dochází k rotaci báze z DNA helixu směrem ke katalytickému centru enzymu (Klimasauskas et al. 1994). Základem funkčního významu metylace cytosinu je, že přítomná CH₃ skupina umístěná ve velkém žlábkku DNA helixu interaguje s DNA vazebnými proteiny (Fillion et al. 2006).

V rámci savčího genomu se metylace vyskytuje primárně v sekvenci dinukleotidů cytosin-guanin (CpG), a to až v 70-ti % z celkové metylace DNA (Ehrlich et al. 1982). Kvantitativní zastoupení CpG dinukleotidů v genomu savců není rovnoměrné a tato

sekvence se převážně vyskytuje ve shlucích, které jsou známé, jako CpG ostrovy (zkratkou CGI z anglického výrazu CpG islands), charakterizované délkou asi 1000 párů bází (bp), (Bird et al. 1985). Podle současných výzkumů je uváděno, že okolo 72 % genů obsahuje ve svých promotorových oblastech CpG ostrovy (Saxonov et al. 2006). To má důležitý význam pro regulaci daných genů a zároveň má přítomnost metylace cytosinu důležitý evoluční význam v ustavení struktury savčího genomu. V lidské DNA je relativně málo CpG dinukleotidů, než by se dalo čekat ve srovnání s přítomností cytosinu a guaninu celého genomu, což patrně souvisí s rychlejší frekvencí mutací metylovaného cytosinu (Bird 1980). Během mutačního procesu, konkrétně deaminací cytosinu, vzniká uracil, který je jednoduše rozeznáván reparačními enzymy a opraven zpět na cytosin. V případě



Obrázek 2. Změna cytosinu na 5-metylcytosin. Upraveno podle Cheng and Blumenthal, 2009.

deaminace metylovaného cytosinu vzniká thymin, který opraven není a důsledkem tak je mutace tranzicí během další replikace (Singal and Ginder 1999). Celkové nízké zastoupení CpG dinukleotidů v genomu je tedy patrně důsledkem metylace CpG, respektive jejich mutace v buňkách zárodečné dráhy a následné fixace v průběhu evoluce (Saxonov et al. 2006). Přítomnost CpG, respektive CGI v určitých oblastech genomu, není pouze důsledkem nemetylovaného (hypometylovaného) stavu, ale patrně také silného selekčního tlaku (Takai and Jones 2002). Dle obsahu CGI v promotorech genů je možné geny jednoduše rozlišit na tzv. HCG (high CpG content), tedy geny s vysokým obsahem CGI, a LCG (low CpG content) geny, které mají nízký obsah CGI (Saxonov et al. 2006). V genomických studiích bylo odhaleno, že geny patřící do skupiny HCG jsou mnohem častěji tzv. house-keeping geny (konstitutivně se exprimující a nezbytné pro základní funkce buňky). Geny, které jsou exprimovány tkáňově specificky, náležejí povětšinou do skupiny LCG a zpravidla tedy nemají CpG ostrovy v promotorech (Robinson et al. 2004). Pro shrnutí je důležité si uvědomit, že i přes 70-ti % zastoupení z celkové metylace genomu v CpG ostrovech v promotorech genů, je většina genů obsahujících CGI hypometylována (Greally 2009).

Jak bylo zmíněno výše, funkční význam 5-mC v regulaci genové exprese z mechanického hlediska spočívá v interakcích CH₃ skupiny s DNA vazebnými proteiny, které dále interagují s proteinovými komplexy. Ty následně aktivují transkripční represory či chromatin remodelující proteiny. Interakce je možná díky přítomnosti tzv. MBD domény (methyl-CpG-binding domain), pomocí které se vazebný protein může vázat na jednu molekulu CH₃ skupiny i jako monomer (Ballestar and Wolffe 2001). Počet MBD proteinů lidského organismu je v současnosti stanoven na 15 a dělí se do tří proteinových rodin dle mechanismu interakce s metylovanou DNA (Parry and Clarke 2011). Příkladem jsou proteiny s označením MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 a MeCP2 (Hendrich and Bird 1988). MBD1 se vždy váže na místa s metylovanými CpG, naproti tomu MBD2 a MBD4 se mohou vázat i na nemetylovaná CpG místa, a protein MBD3 se váže na sekvence obsahující 5-hydroxymethylcytosin (Baubec et al. 2013). Protein MeCP2 reguluje represi genu aktivací komplexu Sin3A, který obsahuje histon-deacetylázu a histon-lysin metyltransferázu, enzymy ovlivňující složení histonových modifikací (Chen et al. 2003).

Zápis metylace cytosinu lze rozdělit na tzv. *de novo* metylaci a udržovací (z angl. maintainig) metylaci. Během replikace DNA se nově syntetizovaný řetězec vytváří bez epigenetického zápisu. Tento stav je nazýván jako hemimetylovaný, neboť metylované cytosiny se vyskytují pouze v původním (templátovém) řetězci DNA. Udržovací metylace

tedy spočívá ve vytvoření epigenetické informace podle matrice původního vlákna. K tomuto procesu buňka využívá tzv. udržovací DNA metyltransferázy, u savců s označením DNMT1 (Law and Jacobsen 2010). V procesu *de novo* metylace se uplatňují DNA metyltransferázy s označením DNMT3a a DNMT3b, které jsou naváděny na nemetylovanou sekvenci DNA a vytvářejí zde zápis bez matrice (Law and Jacobsen 2010).

Protože metylace cytosinu je reverzibilní proces, dochází v buňce k odstranění CH₃ skupin z CpG dinukleotidů, tedy k demetylaci. Demetylace může být aktivní nebo pasivní (Kohli and Zhang 2013). Pasivní demetylace souvisí přímo s replikací DNA, kdy nedochází enzymem DNMT1 k udržování epigenetické informace a ta se v průběhu buněčných dělení ztrácí. K tomuto jevu dochází hlavně v průběhu embryogeneze (Smith et al. 2012). Naproti tomu během aktivní demetylace dochází přímo k odstranění CH₃ skupiny, či celého metylovaného cytosinu (Zhu 2009).

2.5.1.2 5-hydroxymethylcytosin (5-hmC)

5-hmC byl poprvé objeven v DNA některých bakteriofágů (Hershey 1953) a později v savčí DNA (Penn et al. 1972), i když jeho původní množství nebylo v následujících výzkumech prokázáno (Kothari and Shauhar 1976). Jednoznačný průkaz přítomnosti 5-hmC v DNA savčích buněk přišel až roku 2009 (Kriaucinis and Heintz 2009, Tahiliani et al. 2009).

5-hmC vzniká jako produkt oxidace metylovaného cytosinu katalyzované 5-mC oxidázami TET1, TET2 a TET3 (Tahiliani et al. 2009). Přesná funkce této modifikace není dosud známá, ale některé studie napovídají, že 5-hmC by mohl hrát roli, jako meziprodukt aktivní či pasivní demetylace cytosinu. Protože 5-hmC je produktem oxidace 5-mC, je jasné, že tvorba 5-hmC bude automaticky snižovat množství 5-mC v DNA (Wu and Zhang 2011). Během pasivní demetylace není 5-hmC kopírován enzymem DNMT1 a při následující replikaci DNA se tak epigenetický zápis ztrácí (Hashimoto et al. 2012). Aktivní demetylace využívá 5-hmC jako meziprodukt v relativně složitém metabolismu cytosinu. Deaminací 5-hmC vzniká 5-hydroxymethyluracil (Rusminratip and Sowers 2000), který je posléze odstraněn reparací bázeovou excizí (Cortellino et al. 2011). Postupná oxidace 5-hmC enzymy TET produkuje 5-formylcytosin (5-fC) a dále 5-carboxylcytosin (5-caC), který je odstraněn reparací bázeovou excizí nebo dekarboxylací (He et al. 2011).

Funkce 5-hmC možná bude spočívat i v regulaci genové exprese v opačném smyslu tak, jak jej známe u 5-mC. Některé studie naznačují, že přítomnost 5-hmC v promotorech

genů, popřípadě přímo v kódující sekvenci pozitivně koreluje s aktivitou genu (Nestor et al. 2012). Teoretický mechanismus, kterým by mohl 5-hmC přispívat k transkripční aktivitě genu, je pozměněním struktury DNA helixu do otevřenější konformace (Lopez et al. 2012). Rovněž se ukázalo, že na přítomnost 5-hmC reaguje metyl-CpG vazebný protein MeCP2 svou vazbou na danou sekvenci (Melen et al. 2012).

2.5.1.3 6-metyladenin (6-mA)

Tato modifikace adeninu je nejlépe prozkoumána u bakteriálního genomu, kde má významnou roli při ochraně proti infekci bakteriofágy. Metylovaný adenin a cytosin v bakteriální DNA nepodléhají štěpení restrikcními endonukleázami, které jinak štěpí nemetylovanou DNA bakteriofága (Ratel et al. 2006). U vyšších eukaryot je funkce 6-mA prakticky neznámá. Recentně však bylo popsáno u *Drosophila melanogaster*, že aktivní odstranění metylové skupiny z 6-mA patrně hraje roli v embryogenezi (Zhang et al. 2015). Tato aktivní demethylace adenosinu je katalyzována enzymem DNA 6mA demetylázou a v embryogenezi *Drosophily* k ní dochází primárně v oblastech transpozonů (Zhang et al. 2015). Aktivita 6-mA byla popsána i u *Caenorhabditis elegans* i s enzymy jeho metabolismu, kde DNA metyltransferázou je DAMT-1 a demethyltransferázou NMAD-1 (Greer et al. 2015). Výskyt 6-mA u savců nebyl dosud prokázán, i když nepřímé důkazy ho lokalizují do oblastí myšího genu *MyaD1* (Kay et al. 1994).

2.5.2 Remodelace chromatinu a histonový kód

Druhým molekulárním mechanismem, který významně ovlivňuje aktivitu genů, jsou chemické modifikace histonových proteinů. Souhrnně je tento mechanismus znám jako remodelace chromatinu. Základním stavebním kamenem chromatinu je tzv. nukleozom, což je struktura skládající se z oktameru histonů, obtočená řetězcem DNA o délce 147 párů bází (Cosgrove and Wolberger 2005). Oktamer histonů je tvořen z heterotetrameru histonů H3 a H4 a dvou heterodimerů histonů H2A/H2B. Vazba mezi DNA a histony poskytuje přímé funkční propojení, které tak dává možnost regulace exprese genů. Vlastní podstatou této regulace jsou biochemické modifikace aminokyselin v N-koncových částech histonových proteinů. N-konce vystupují z jinak globulární struktury zbytku histonu a jsou v literatuře označovány jako histonové ocásky (v angl. histone tails), (Cosgrove and Wolberger 2005). V rámci epigenetiky jsou nejvýznamnější

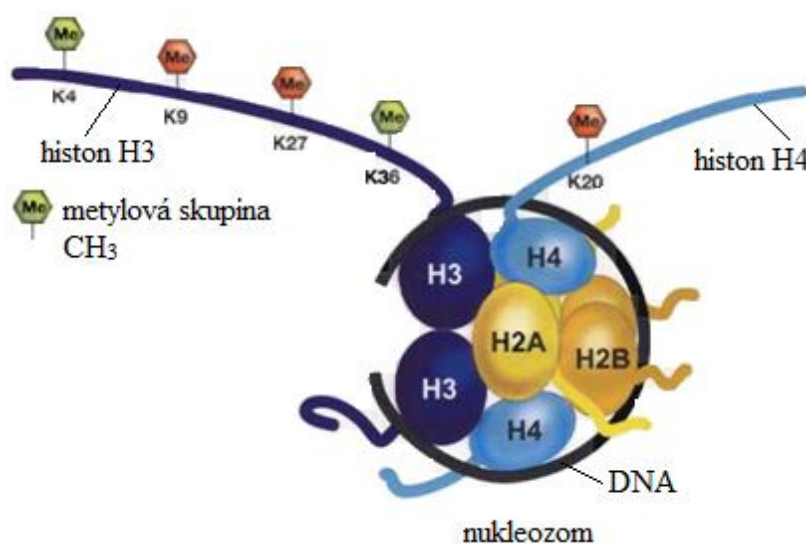
modifikace metylace, acetylace, fosforylace, ubiquitinace a sumoylace, které budou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

Interpretace chemických modifikací histonů následně ovlivňuje aktivitu daných genů ve specifických buněčných typech a v daném čase. S interpretací konkrétního významu konkrétní modifikace souvisí pojem histonový kód. Podle teorie histonového kódu je specifický vzor modifikací v nukleozomech čten jako jakýsi čárový kód, který slouží k rozpoznání stavu chromatinu v dané oblasti (Jenuwein and Allis 2001). V tomto smyslu je poté možné mnohým modifikacím přiřknout vlastní charakteristiku. Modifikace H3K4me2 a me3 je spojena s terminací transkripce (Santos-Rosa et al. 2003), H4K8ac s transkripčně aktivními geny (Agalioti et al. 2002) a například H2AS129ph signalizuje reparaci dvouřetězcových zlomů DNA (Morrison et al. 2004).

2.5.2.1 Methylace histonů

Methylace histonových proteinů je proces, při kterém dochází k vazbě CH₃ skupiny na aminokyseliny arginin (R) a lysin (K), (Obr. 3). V rámci histonového kódu rozeznáváme 24 míst, kde dochází k metylaci argininu či lysinu v histonech H3 a H4 (Wysocka et al. 2006). Methylace R a K jsou asociovány s represí i aktivitou genu v závislosti na konkrétní pozici metylace. Celkově podle počtu navázaných CH₃ skupin je možné rozlišovat mono-, di- a trimetylaci u lysinu a mono- a dimetylaci u argininu.

Vazba metylové skupiny je katalyzována enzymy s tzv. SET doménou, tvořenou 130 aminokyselinami v katalytickém centru proteinu (Jenuwein 2006). Donorem CH₃ je stejně jako u metylace cytosinu, S-adenosylmetionin (Dillon et al. 2005). V současné době se popisuje pro lidský organismus 33 histon-lysin metyltransferáz (Black et al. 2012). Mnoho z těchto histonových metyltransferáz



Obrázek 3. Methylace histonů. Upraveno podle Kouzarides and Berger, 2009.

je velmi specifických na substrát. Například KMT1A vytváří trimetylovaný lysin 9 histonu 3 (H3K9me3) z již monometylovaného H3K9me1 (Peters et al. 2003). KMT2A katalyzuje dimetylací H3K4 na H3K4me2 (Nakamura et al. 2002), ale po interakci s jinými proteinovými komplexy může stejnou pozici trimetylovat na H3K4me3 (Dou et al. 2006). Na odstranění CH₃ z lysinu a argininu participují histon demetylázy. Lysinových histon-demetyláz je v současné době popsáno u člověka 21 (Black et al. 2012). První histon-demetyláza byla KDM2A, která obsahuje tzv. JmjC doménu (Tsukada et al. 2006). Později bylo zjištěno, že proteiny s JmjC doménou využívají k demetylací histonů oxidaci CH₃ a jako kofaktory jim slouží alfa-ketoglutarát, molekulární kyslík a Fe(II) (Shi and Whetstone 2007). Nutno podotknout, že i histon-demetylázy jsou vůči substrátu velmi selektivní.

Metylované aminokyseliny histonových N-konců jsou rozeznávány vazebnými proteiny s tzv. chromodoménou, tvořenou asi 60 aminokyselinami (Koonin et al. 1995). Příkladem takového vazebného proteinu je Su(var)205 (z ang. Suppressor of variegation 205), často známějšího pod označením HP1 (Heterochromatin protein 1), (Aasland and Steward 1995). HP1 se přímo váže pomocí chromodomény na metylovaný H3K9 a indukuje represi genu (Jacobs et al. 2001). Recentně bylo odhaleno, že HP1 protein může hrát roli i v alternativním sestřihu mRNA při rozeznávání exonů (Yearim et al. 2015).

2.5.2.2 Acetylace histonů

První zprávy o vlivu acetylace histonů na aktivitu genů pochází již z 60. let 20. století (Allfery et al. 1964). Později bylo prokázáno, že tato modifikace je převážně spojena s transkripčně aktivními geny (Hebbes et al. 1988). Acetylace modifikuje všechny druhy histonů nukleozomového jádra, ovšem pouze na aminokyselině lysinu (K). Důsledkem vazby acetylové (CH₃CO) skupiny na lysin v N-koncové části histonu je neutralizace pozitivního náboje histonového ocásku, což sníží afinitu vazby k negativně nabitě DNA (Hong et al. 1993). Změnou rozložení náboje v histonech zároveň dochází ke změně konformace nukleozomu (Norton et al. 1989) a tím k usnadnění vazby transkripčních regulátorů (Lee et al. 1993).

Vazba CH₃CO je enzymaticky zprostředkována histon-acetyltransferázami (HATs). Obvyklým donorem acetylové skupiny je acetyl-CoA, ovšem některé HATs mohou využívat i alternativní donory, například propionyl-CoA (Berndsen and Denu 2008). HATs se na základě své funkční a strukturní podobnosti dělí do pěti skupin. První skupina s označením GNATs (Gcn5-related N-acetyltransferases) je charakteristická přítomností

bromo- a chromo-domény, pomocí kterých se může vázat na acetylované a metylované lysiny (Neuwald and Landsman 1997). Dalšími skupinami jsou MYST HATs, p300/ CBP, SRC HATs a NCoA HATs (Torchia et al. 1998). Vlastní molekulární mechanismus acetylace se u jednotlivých skupin HATs liší. Nejlépe je tento děj popsán u GNATs, kde glutamát v aktivním místě enzymu způsobuje deprotonaci cílového lysinu, což vyústí v nukleofilní atak na karbonylový uhlík acetyl-CoA a následnou vazbu acetylové skupiny na daný lysin (Tanner et al. 1999). Tak jako tomu bylo u histon-metyltransferáz, tak i zde u HATs je důležité si uvědomit, že dané enzymy jsou pro substrát vysoce selektivní.

Odstranění CH_3CO z lysinu je katalyzováno histon-deacetylázami (HDAC). Toho je dosaženo hydrolyzou acetyl-L-lysinu a následným odštěpením acetátu (Lombardi et al. 2011). V savčím genomu je kódováno 11 proteinů s vysoce konzervovanou deacetylázovou doménou, které je možné rozdělit do čtyř skupin (Haberland et al. 2009). HDAC I. II. a IV. třídy jako kofaktor používají Zn^{2+} , přičemž HDAC I. třídy jsou preferenčně lokalizovány v jádře a HDAC II. a IV. třídy jsou schopné se po stimulaci přesouvat mezi jádrem a cytoplasmou. HDAC III. třídy, sirtuiny, jako kofaktor používají NAD^+ , jsou lokalizovány ve všech kompartmentech buňky, což reflektuje rozmanitost jejich funkcí, včetně ovlivnění stresového metabolismu buňky (Schwer and Verdin 2008).

Acetylovaný lysin je rovněž místem vazby některých dalších histon remodelujících komplexů. Proteiny, které rozeznávají takto upravený lysin, obsahují ve své struktuře vysoce konzervovanou, tzv. bromodoménu (Zeng and Zhou 2002). Na sestavení proteinových komplexů, které dále interpretují tuto epigenetickou informaci, často participují i vlastní HATs. Příkladem takového komplexu je tzv. SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase) komplex, který je spjat s pozitivní regulací transkripce (Pokholok et al. 2004). Asi nejznámějším příkladem chromatin remodelujícího komplexu je tzv. SWI/SNF. Tento proteinový komplex je znám napříč eukaryotickými organismy od kvasinek po savce (Khavari et al. 1993). Nachází se v promotorové části genů, které jsou transkripčně aktivní (Hassan et al. 2001). Během vlastního procesu transkripce zůstává SWI/SNF asociován s RNA polymerázou II (Schwabish and Struhl 2007).

2.5.2.3 Fosforylace histonů

Fosforylace histonů spočívá v kovalentní vazbě fosfátové (PO_4) skupiny na aminokyseliny serin (S), threonin (T) a tyrosin (Y), které se mohou uskutečnit na všech čtyřech nukleozomových histonech (Rossetto et al. 2012). Obecně na vazbě PO_4 skupiny či

naopak na jejím případném odstranění participují protein kinázy, respektive fosfatázy a donorem je molekula ATP. Fosforylace histonů je značně dynamický proces a v průběhu buněčného cyklu se hladina fosforylovaných histonů výrazně mění (Fischle et al. 2005). Mimo regulaci aktivity genů má fosforylace histonů velmi významný vliv při procesu reparace DNA (Rosseto et al. 2012). Typickým markerem v takovém případě je fosforylace serinu v pozici 139 histonu H2A (Celeste et al. 2003), která je utvářena protein kinázou ATM či ATR (Shroff et al. 2004). V případě, že dojde k opravě poškozené DNA je samozřejmě nutné daný epigenetický marker odstranit. Toho je dosaženo jednak výměnou samotného histonu H2A za jinou variantu daného histonu (Papamichos-Chronakis et al. 2006), ale rovněž i defosforylací dané pozice, například fosfatázou PP4 (Nakada et al. 2008).

V rámci epigenetické regulace genové exprese má fosforylace specifický význam oproti metylaci či acetylaci. Funkční význam patrně spočívá v regulaci dalších modifikací, zvláště pak samotné acetylaci lysinu (Sawicka and Seiser 2014). Nutno podotknout, že tato regulační interakce mezi jednotlivými modifikacemi platí zejména pro histon H3. Tento jev je vysvětlován dvěma modely. V prvním modelu dochází k fosforylaci a acetylaci nezávisle na sobě, ovšem prostorově stejně na histonu H3 (Thomson et al. 2001). Druhé vysvětlení spočívá v možné součinnosti kináz a histon acetyltransferáz, které jsou aktivovány společně (Cheung et al. 2000).

Jednotlivé fosforylace jsou rozpoznávány specifickými vazebnými proteiny. Příkladem jsou proteiny ze skupiny s označením 14-3-3 (Macdonald et al. 2005). V rámci savčího genomu bylo dosud popsáno sedm proteinů této skupiny, které mohou interagovat až se 700 dalšími faktory (Uhart and Bustos 2013), jako jsou například TATA vazebné proteiny (Pan et al. 1999) či p53 (Waterman et al. 1998).

2.5.2.4 Ubiquitinace histonů

Tato modifikace se od předchozích liší v typu vázané molekuly. Ubiquitin je malý globulární polypeptid, tvořený 76-ti aminokyselinami (Hershko and Ciechanover 1998). K ubiquitinaci dochází na lysinech převážně histonů H2A a H2B (Robzyk et al. 2000). Jako epigenetický marker je ubiquitinace H2A spojena s umlčenými geny, zatímco u H2B je asociována s transkripčně aktivními geny (Minsky et al. 2008). V menší míře se ubiquitinace objevuje i na histonech H3 a H4, ovšem její význam není dosud přesně znám (Wang et al. 2006, Jones et al. 2011). Modifikaci ubiquitinem je možné charakterizovat

jako monoubiquitinaci vzhledem k vazbě jedné molekuly na daný lysin. Ovšem může docházet i k polyubiquitinaci histonů, která iniciuje degradaci proteasomem. Příkladem je polyubiquitinace histonů a jejich následná degradace ve spermatogenezi (Chen et al. 1998).

Vazbu ubiquitinu enzymaticky katalyzují ubiquitin ligázy obecně značené E3, například protein RING1B vytváří monoubiquitinaci v pozici H2AK119 (Cao et al. 2005). Vazba ubiquitinu je několika stupňový proces aktivace enzymy E1, konjugace enzymy E2 a vlastní ligace na substrát enzymy E3. Ubiquitin se váže svým C koncem na ϵ -aminoskupinu lysinu (Hershko et al. 1983). Odštěpení ubiquitinu zprostředkovávají histon deubiquitinační enzymy (DUBs). Příkladem je USP16, který katalyzuje deubiquitinaci histonu H2A a hraje velmi důležitou roli v procesu X-inaktivace či DNA reparace (Shanbhag et al. 2010).

Z hlediska regulace transkripce bylo prokázáno, že H2A ubiquitin ligázy mohou být přímo součástí represorových komplexů, např. komplexu 2A-HUB (Zhou et al. 2008). Rovněž se na monoubiquitinovaný lysin mohou vázat proteiny ze skupiny Polycomb, které indukují represi genu (Cao et al. 2005). Ubiquitinace H2A inhibuje vytvoření markerů H3K4me2 a me3, které jsou charakteristické pro aktivní geny (Nakagawa et al. 2008).

2.5.2.5 SUMOylace histonů

Velmi podobná modifikace jako ubiquitinace je tzv. sumoylace. Jedná se opět o kovalentní vazbu malých globulárních polypeptidů ze skupiny označované jako SUMO (small ubiquitin-related modifier), (Nathan et al. 2006). SUMO proteiny mají podobnou trojrozměrnou strukturu jako ubiquitin. Velikostně jsou okolo 100 aminokyselin dlouhé a metabolická dráha aktivace, konjugace a ligace pomocí E1, E2 a E3 je příbuzná ubiquitinaci (Johnson 2004). Sumoylace proteinů je z hlediska biologie buňky velmi významný proces. Bylo již popsáno více než 1000 proteinů, které mohou interagovat se SUMO (Hochstrasser 2009). V rámci epigenetiky je sumoylace asociována s transkripční represí, deacetylací histonu H3 a iniciací vazby HP1 proteinu (Shiio and Eisenman 2003). Proteiny, které rozpoznávají sumoylaci histonů, obsahují tzv. SIMs motivy (SUMO-interacting motifs), (Kerscher 2007).

2.5.3 RNA interference

V rámci molekulárních mechanismů epigenetických procesů hraje důležitou roli vliv molekul RNA. Jev zvaný RNA interference (RNAi) je proces, kdy RNA přímo

ovlivňuje expresi genu na základě komplementarity bází (Wilson and Doudna 2013). Protože popis přesných mechanismů RNAi by byl vysoce nad rámec této práce, budou zde zmíněny jen základní mechanismy.

Základem RNAi je syntéza dvouřetězcové RNA - dsRNA (double-strand RNA) o velikosti 20-30 nukleotidů, které se dále asociují s vazebnými proteiny (Carthew and Sontheimer 2009). Tento mechanismus je znám u rostlin i u živočichů a vždy jsou tyto malé fragmenty dsRNA vázány k proteinům z rodiny Argonaut (Ago), (Shabalina and Koonin 2008). RNA exogenního původu jsou označovány jako siRNA a endogenního původu jako miRNA, i když u savců existují i endogenní siRNA, např. ve vajíčku (Carthew and Sontheimer 2009). Molekula dané dsRNA je vázána na proteiny Ago. V tomto komplexu jsou poté řetězce dsRNA rozděleny a k proteinu Ago zůstane navázán jen jeden řetězec RNA, který je určen k vazbě na cílovou mRNA (Eulalio et al. 2008). Celkově malé RNA participují na vzniku proteinového komplexu RISC (RNA induced silencing complex), který umožňuje umlčení exprese daného genu (Eulalio et al. 2008). RISC navázaný na cílovou mRNA na základě komplementarity bází poté může mRNA přímo štěpit nebo pouze zastavit její transkripci či translaci (Eulalio et al. 2008).

Některé komponenty z této regulační dráhy, např. Ago proteiny či miRNA, dále mohou participovat na regulaci epigenetických procesů, jako jsou metylace DNA nebo remodelace chromatinu.

2.5.4 Regulace epigenetických procesů

Modifikace bází DNA a modifikace histonů nejsou v buňce nikterak nahodilé procesy. V průběhu ontogeneze živého organismu je nutné, aby bylo dodrženo přesné prostorové a časové zacílení epigenetického zápisu. Tedy zacílení na konkrétní pozici v DNA a v histonech v rámci určitého buněčného typu. Ustavení přesného zápisu epigenetické informace je řízený proces, který zahrnuje složitou síť interakcí mezi metylací DNA a remodelací chromatinu a interakcí s nekódujícími RNA (ncRNA). V posledních letech se poznatky právě o vlivu ncRNA stále prohlubují. Jednou z komponent, které tvoří chromatin, jsou i molekuly RNA (Mondal et al. 2010). Posléze byla prokázána přítomnost Ago proteinů a miRNA v chromatinu, jejich schopnost přesného zacílení na určitý lokus chromozomu a jejich vliv na regulaci (pozitivní i negativní) transkripční aktivity (Ren et al. 2013, Zardo et al. 2012). Příkladem, kdy jeden z typů RNA, konkrétně piRNA, může indukovat *de novo* metylaci, je imprinting genu *Rasgrf 1* při spermatogenezi (Watanabe et

al. 2011). Ovšem přesný molekulární mechanismus, jak ncRNA indukují metylaci DNA, není u savců dosud znám (Li 2014). Molekuly ncRNA mají patrně vliv i na stav chromatinu a ustavení jednotlivých modifikací histonů. Příkladem je experiment, kdy byla využita transfekce dsRNA zacílená na CpG oblasti v promotoru genu pro E-Cadherin. Výsledkem pak bylo podstatné zvýšení hladiny metylace v pozici H3K9me2 v promotoru daného genu (Ting et al. 2005). Podobný výsledek byl prokázán i při transfekci dsRNA zacílené na promotor genu *Ubc*, kdy došlo k zvýšení hladin metylace v pozicích H3K9me2 a H3K27me2 (Hawkins et al. 2009).

Dalším regulátorem modifikací jsou molekuly dlouhých nekódujících RNA (lncRNA). Nejznámější lncRNA je Xist, která reguluje inaktivaci jednoho X chromozomu u samic savců (Payer and Lee 2008). Možným mechanismem, jak se Xist účastní umlčení genů X chromozomu, je její schopnost interagovat s Polycomb proteinem PRC2 a lysin metyltransferázou KMT6 (Zhao et al. 2008). Některé druhy lncRNA, které interagují s PRC2 a KDM1A, mohou působit umlčení genů i v pozici trans (Tsai et al. 2010).

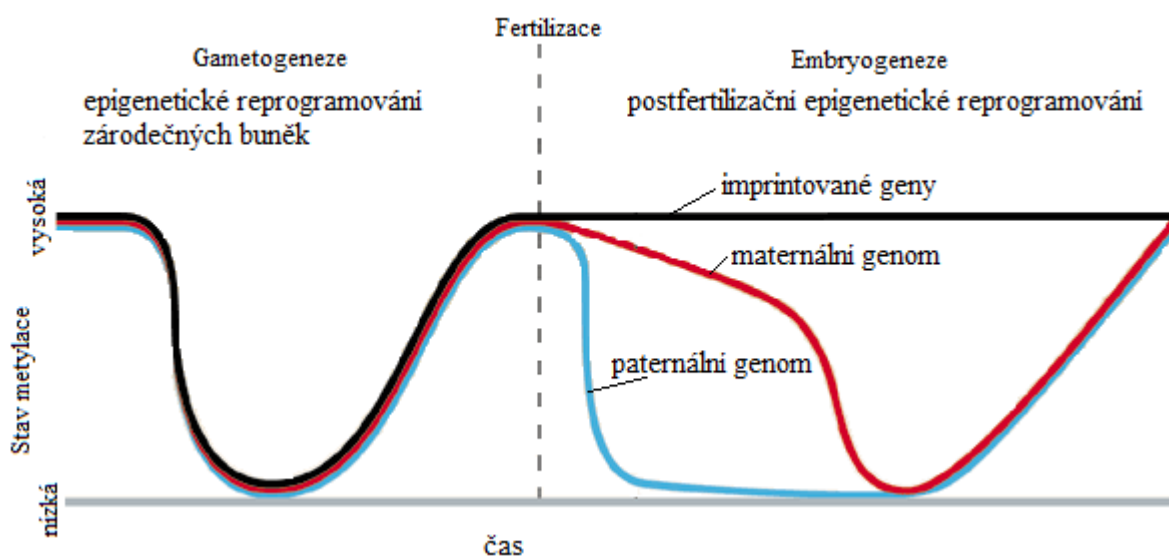
Ve spleťité síti interakcí, které regulují zápis epigenetické informace, se samozřejmě uplatňují vztahy mezi modifikacemi histonů a metylací DNA. Případy, kdy chromatinové modifikace ovlivňují metylaci DNA, byly experimentálně prokázány u histon-lysin metyltransferáz Suv39h1 a Suv39h2. Mutace v těchto genech vedly k silné redukci metylace DNA v repetitivních pericentromerických oblastech chromosomů (Lehnertz et al. 2003). Na buněčných kulturách lidských rakovinných buněk bylo ukázáno, že deficiencie metyltransferázy DNMT1 byla asociována s celogenomovou redukcí metylace histonů na pozici H3K9me2, ale naopak při transfekci daného enzymu došlo k jejímu zvýšení (Espada et al. 2004). Podobně při knockdownu genu pro DNMT1 pomocí siRNA došlo k silné redukci metylace pozice H3K9me1/me2/me3 v intergenových úsecích ribozomální DNA (Esteve et al. 2006). Propojení metylace DNA a modifikace histonů patrně souvisí s propojením aktivit enzymatických komplexů. Přímá interakce, respektive vazba, byla prokázána u Suv39h1 a DNMT1 či DNMT3a (Fuks et al. 2003), popřípadě u lysin metyltransferázy EZH2 vážící se k DNMT1, 3a i 3b, což podporuje předpoklad, že metylace H3K27 je přímo vázaná na metylaci DNA dané sekvence (Vire et al. 2006).

Samozřejmě nemalý význam v regulaci remodelace chromatinu mají i vzájemné vztahy mezi jednotlivými histonovými modifikacemi. Typickými regulátory v tomto smyslu jsou fosforylace a ubiquitinace histonů.

2.5.5 Reprogramování epigenomu

Obecné poznatky praví, že diferenciace buněk vyžaduje expresi specifických genů, jejichž produkty jsou charakteristické daným buněčným typům. Toho je dosaženo regulací, tedy aktivací či naopak represí transkripce. Jak bylo popsáno v předchozí kapitole, je regulace epigenetických procesů velmi komplikovaný děj, který zahrnuje modifikace DNA a histonů. V průběhu vývoje je tak celkový epigenom dynamická struktura, která podléhá vymazání a znovu zapsání epigenetických informací. Tento jev bývá nazýván jako epigenetické reprogramování (Fitz et al. 2009). Pokud pomineme regulaci konkrétních genů, dochází k reprogramování i na globální úrovni genomu, a to ve dvou fázích ontogeneze. Je to reprogramování zárodečných buněk a posléze reprogramování raného embrya (Morgan et al. 2005). Nejlépe je tento jev prozkoumán na úrovni metylace DNA (Obr. 4).

Reprogramování primordiálních zárodečných buněk (PGC- z ang. primordial germ cell) nastává, když se PGC diferencují z buněk epiblastu okolo 6 dne embryonálního vývoje (značeno E6.5). V průběhu této změny dochází k 90-ti % ztrátě globální metylace PGC, která byla původně stejná jako u somatických buněk (Lee et al. 2014). Ztráta metylace, přesněji demethylace, má v tomto případě dvě fáze. K první dochází během migrace PGC na genitální lištu okolo E8 (Seki et al. 2005). Tato demethylace je pasivní. Je tedy způsobena inaktivací udržovacích DNA metyltransferáz (Kagiyada et al. 2013). Zároveň jsou patrně i inaktivovány de novo metyltransferázy DNMT3a a 3b (Kurimoto et



Obrázek 4. Změny v metylaci DNA během epigenetického reprogramování. Upraveno podle Ficz et al., 2009.

al. 2008). Zajímavostí je, že demethylace se netýká celého genomu. Některé specifické sekvence zůstávají před tímto procesem chráněny až do druhé fáze reprogramování. Příkladem těchto sekvencí jsou imprintované lokusy a specifické geny buněk zárodečné dráhy (Lee et al. 2014). Rovněž se ukázalo, že pozdější demethylace těchto specifických sekvencí vyžaduje přítomnost TET1 a TET2 enzymů (Okashita et al. 2014), které oxidují 5mC na 5hmC. Druhá fáze demethylace PGC nastává okolo E11.5.

Reprogramování raného embrya je opět charakterizováno globální ztrátou metylace cytosinu. Ovšem demethylace již není v takové míře, jako tomu bylo u PGC a zároveň jsou zde rozdíly mezi maternálním a paternálním genomem (Kobayashi et al. 2012). Paternální genom je zde rychle a aktivně demetylován, pravděpodobně oxidací 5mC enzymem TET3 (Wossidlo et al. 2011). Naproti tomu maternální genom prochází pasivní demethylací. Ta je způsobena odstraněním DNMT1 ze samičího pronukleu (Kobayashi et al. 2012). U buněk vnitřní buněčné masy a placenty dochází během tohoto období k mírnému nárůstu hladiny metylace (Smith et al. 2012). Během reprogramování buněk raného embrya jsou po celou dobu procesu chráněny některé specifické sekvence. Zejména se jedná o imprintované geny a retrotranspozony IAP (Nakamura et al. 2007).

Význam vymazání a nového zapsání epigenetické informace souvisí s pluripotencí buněk. S vymazáním epigenomu dochází ke ztrátě epigenetické paměti, což usnadňuje diferenciaci buněk, která tak není nijak postižena dřívějšími událostmi (Lee et al. 2014).

Reprogramování epigenomu u PGC z hlediska stavu chromatinu se odehrává ve dvou fázích (Hajkova et al. 2008). V první fázi, tedy v období E8.5, dochází ke ztrátě epigenetického markeru H3K9me2. Redukce tohoto markeru může souviset s kompeticí jiného markeru ve stejné pozici H3K9ac či ve změně regulace G9/GLP komplexu, který danou modifikaci vytváří (Seki et al. 2007). V pozicích H3K4me2/me3, H4R3me2 a H2AR3me2 dochází ke zvýšení hladin těchto markerů (Ancelin et al. 2006). Tyto změny chromatinu jsou zejména asociovány s expresí genů specifických pro pluripotentní buňky - *Sox2*, *Oct4*, *Nanog* (Surani et al. 2004). Druhá fáze reprogramování chromatinu v období E11.5 se projevuje celkovou ztrátou histonu H1 (Hajkova et al. 2008). Zároveň dochází k významnému poklesu hladin metylace v pozicích H3K9me3 a H3K27me3 (Ancelin et al. 2006). Rychlé změny ve stavu chromatinu během reprogramování jsou vysvětlovány třemi modely (Bannister et al. 2002). První zahrnuje působení specifických enzymů měnících dané markery, druhý předpokládá odstřížení N-konců histonových ocásků a třetí nabízí výměnu histonů za jiné histonové varianty. Nahradit modifikované histony mohou jejich

varianty, např. H2AZ či H3.3 (Henikoff et al. 2004), což za přispění histonových chaperonů HIRA a NAP1 umožňuje rychlý průběh reprogramování (Hajkova et al. 2008).

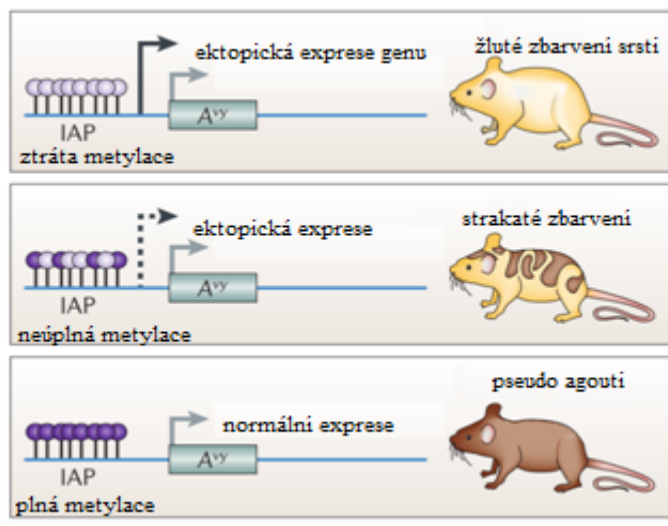
2.6 Epigenetická dědičnost

Epigenetika, jakožto podobor genetiky musí splňovat důležitou vlastnost, kterou je vlastní genetiky determinována. Touto vlastností je kromě proměnlivosti i dědičnost. Dědičnost, která je pro epigenetiku charakteristická, se vymyká ustáleným definicím dědičnosti klasické genetiky, jako přenosu genetické informace v nezměněné podobě z generace na generaci. Epigenetika je chápána jako studium mitoticky či meioticky děděných změn funkce genů, které se neprojeví ve vlastní sekvenci DNA, ale jako modifikace histonů či bází DNA (Riggs et al. 1996). Ústřední myšlenkou epigenetické dědičnosti je přenos právě oněch modifikací z generace na generaci. Zároveň se myšlenka epigenetické dědičnosti odráží v konceptu této práce.

Přenos epigenetické informace z generace na generaci bývá často znám jako tzv. transgenerační dědičnost, či transgenerační efekt (Daxinger and Whitelaw 2012, Lim and Brunet 2013). Fyzická podstata této dědičnosti úzce souvisí s reprogramováním epigenomu a relativně snadno může být ovlivněna vnějším prostředím (Heard and Martienssen 2014). Epigenetická dědičnost *sensu stricto* je velmi dobře popsána u rostlin a u nižších živočichů, jako jsou například ploštěnci (*Nematoda*). U savců je tento přenos do značné míry omezen. Během reprogramování savčího genomu dochází k velmi preciznímu vymazání původní epigenetické informace (Lee et al. 2014). Z tohoto důvodu je epigenetická dědičnost savců popisována jako tzv. parentální či intergenerační efekt (Lim and Brunet 2013). Tento termín tak přesněji vystihuje jevy, které mohou mít příčinu v ovlivnění vývoje jedince *in utero* a tady postihnou jen embryo a zárodečnou dráhu daného embrya. Dochází zde k propojení dvou respektive tří generací, pokud je započítána i matka. Vlivy prostředí, které mohou působit na změny v epigenomu, zvláště během reprogramování, jsou například stres či toxicita prostředí, působení hormonů, anebo druh výživy (Ferguson-Smith and Patti 2011).

Dnes již klasickým modelovým příkladem je parentální efekt na zbarvení srsti myši s alelou *Agouti viable yellow* (A^{vy}), (Obr. 5). Divoká alela genu *Agouti* kóduje signální molekulu, která produkuje černé barvivo eumelanin a žluté barvivo phaeomelanin. Působení této divoké alely má za následek celkově hnědé agouti zbarvení srsti, kdy každý černý chlup srsti má žluté pruhování (Duhl et al. 1994). Alela A^{vy} vznikla jako výsledek

inzerce retrotranspozonu IAP před promotorovou oblast vlastního genu (Duhl et al. 1994). Tento retrotranspozon poskytl skrytý promotor, který může způsobit ektopickou transkripci genu *Agouti* v jiných tkáních. Ektopická transkripce má za následek nejen žluté zbarvení srsti, ale i náchylnost k obezitě, diabetu či rakovinnému bujení (Morgan et al. 1999). Epigenetická regulace alely A^{vy} souvisí s metylací CpG míst v retrotranspozonu IAP. Methylaci lze relativně snadno ovlivnit *in utero* typem potravy přijímané matkou. Alela tohoto typu bývá někdy označována jako metastabilní epialela (Rakyan et al. 2002). Míra metylace CpG míst v IAP elementu byla například ovlivňována příjmem potravy bohaté či naopak chudé na kyselinu listovou, betain nebo vitamín B12, které v metabolismu fungují jako donory metylových skupin. Pokud březí samice myši dostávala potravu bohatou na tyto látky, tak docházelo u jejich mláďat k silné metylaci IAP a tedy i k umlčení ektopické transkripce genu *Agouti* (Waterland and Jirtle 2003). Naopak mláďata, jejichž matky



Obrázek 5. Schéma rozdílů v metylaci IAP elementu a následné změny v expresi genu *Agouti*. Upraveno podle Feil and Fraga, 2012.

během březosti byly krmeny stravou chudou na dané látky, vykazovaly náchylnost k obezitě, rakovině a diabetu. Zároveň byla prokázána nízká hladina metylace CpG v IAP (Waterland and Jirtle 2003). Tento experimentální model přináší přímé důkazy a zároveň i z části odhaluje molekulární mechanismy působení epigenetické dědičnosti u savců.

3 CÍLE PRÁCE

Tato diplomová práce je součástí rozsáhlejšího výzkumu probíhajícího na Ústavu obecné biologie a genetiky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, který se zaměřuje na význam epigenetických regulací genů HLA II. třídy. V širším kontextu se jedná o popis provázanosti jednotlivých epigenetických mechanismů, konkrétně metylace DNA a modifikace histonů. Cílem této práce je popsat dané mechanismy pro gen *DQA1* na pozadí pokrevních příbuzenských vztahů a jejich srovnání mezi generacemi.

Metodika k dosažení cíle práce se skládala z těchto kroků:

- 1) Genotipizace genů *HLA DQA1*, *HLA DQB1* a *HLA DRB1* pomocí sekvenčně specifických pimerů.
- 2) Určit rozdíly v metylaci DNA promotorové oblasti genu *HLA DQA1*.
- 3) Určit rozdíly v metylaci a acetylaci histonu H3 v promotorové oblasti genu *HLA DQA1*.
- 4) Pomocí kvantitativní PCR stanovit míru exprese jednotlivých alel genu *HLA DQA1*.

4 MATERIÁL

4.1 Pufry, roztoky a komerční soupravy

Izolace DNA

RCLB (Red Cell Lysis Buffer):

5mM MgCl₂ (Serva)

320mM sacharóza (Sigma Aldrich)

1% Triton X-100 (Sigma Aldrich)

WCLB (White Cell Lysis Buffer):

120mM EDTA pH 8,0 (Sigma Aldrich)

375mM NaCl (Serva)

Proteinase K, 30 U/mg (Serva)

10% SDS (Sigma Aldrich)

6M NaCl (Serva)

99,8% etanol (Sigma Aldrich)

Genotypizace

HLA genotypizační kity:

Oleroup SSPTM DR low resolution kit (GenoVision)

Oleroup SSPTM DQ low resolution kit (GenoVision)

Oleroup SSPTM DQB1 *02 (GenoVision)

Oleroup SSPTM DQB1 *03 (GenoVision)

Oleroup SSPTM DQB1 *04 (GenoVision)

Oleroup SSPTM DQB1 *05 (GenoVision)

Oleroup SSPTM DQB1 *06 (GenoVision)

Oleroup SSPTM DQA1 (GenoVision)

Taq DNA polymeráza 5U/μl (Fermentas)

Agarózová gelová elektroforéza

10x TBE pufr:

890mM Tris baze (Sigma Aldrich)

890mM kyselina boritá (Amresco)

20mM EDTA pH 8.0 (Sigma Aldrich)

Agaróza (Invitrogen)

GelRed™ (Biotium)

Bromophenol Blue Loading Solution (Promega)

Marker 100bp DNA ladder (Biosystems)

Bisulfitová konverze

Epitect Bisulfite Kit (Qiagen)

Nested PCR

dNTP's 100mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Fermentas)

PCR H₂O (Sigma Aldrich)

Platinum™ Taq DNA polymerase (Invitrogen)

Izolace a přečištění PCR produktu

50x TAE pufr:

2M Tris baze (Sigma Aldrich)

50mM EDTA pH 8,0 (Sigma Aldrich)

1M kyselina octová (Sigma Aldrich)

Low melting temperature agaróza (Sigma Aldrich)

GelRed™ (Biotium)

Agaróza (Invitrogen)

6x Loading Dye Solution (Fermentas)

99,5% 2- propanol (Sigma Aldrich)

QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)

Klonování

Bakteriální kmeny:

DH5α *Escherichia coli* (genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tetr)]) (Stratagene)

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

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

Příprava kultivačních misek

Bacto Agar (DIFCO)

LB Broth base (Invitrogen)

LB agar (Sigma Aldrich)

Ampicilin – sodná sůl (Sigma Aldrich)

X-Gal (Sigma Aldrich)

IPTG (Sigma Aldrich)

DMSO (Sigma Aldrich)

Příprava kompetentních bakterií

SOC médium:

2,5mM KCl (Penta)

8,5mM NaCl (Penta)

20g/L Tryptone (Sigma Aldrich)

5g/L kvasničný extrakt (Sigma Aldrich)

2mM sterilní glukóza (Serva)

10mM MgCl₂ (Serva)

LB Broth base (Invitrogen)

0.1M CaCl₂ (Sigma Aldrich)

glycerol (Sigma Aldrich)

99,8% etanol (Sigma Aldrich)

Ligace produktu s vektorem a transformace kompetentních buněk

pGEM[®]-T Vector system (Promega):

T4 DNA Ligase

2x Rapid Ligation Buffer
pGEM[®]-T Vector (50ng/μl)
LB Broth base (Invitrogen)

Izolace plazmidové DNA alkalickou lýzou

Roztok 1:

50 mM glukóza (Serva)
10 mM EDTA (Sigma Aldrich)
25 mM Tris HCl (Sigma Aldrich)

Roztok 2:

200 mM NaOH (Penta)
1% SDS (Sigma Aldrich)

Roztok 3:

5 M octan draselný (Penta)
bezvodá kyselina octová (Sigma Aldrich)
dH₂O

chloroform (Sigma Aldrich)
isopropanol (Sigma Aldrich)
etanol (Sigma Aldrich)

Štěpení plazmidové DNA

ApaI (Thermo Scientific)
10x pufor B (Thermo Scientific)

Izolace RNA

QIAamp[®] RNA Blood Mini Kit (Qiagen)
70% etanol (Sigma Aldrich)

Reverzní transkripce

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)

Kvantitativní PCR

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

Izolace leukocytů, monocytů a B lymfocytů

10x RBC Lysis Buffer:

8,02g NH₄Cl (Sigma Aldrich)

0,84g NaHCO₃ (Lachema)

0,37g EDTA (Sigma Aldrich)

100 ml dH₂O

pufir B:

0,5g 0,1% (w) BSA (Sigma Aldrich)

500 ml PBS pH 7,4 (Gibco)

pufir E:

0,5g 0,1% (w) BSA (Sigma Aldrich)

2ml 0,5M EDTA (Sigma Aldrich)

500ml PBS pH 7,4 (Gibco)

10x Tris-Glycin:

0,47g Glycin

50μl 1M Tris-Cl pH 8,0

5ml dH₂O

10x Tris-Glycin s inhibitory proteáz:

930μl 10x Tris-Glycin

10μl Aprotinin

10μl Pepstatin A

50μl Phenylmethanesulfonyl fluoride

Chromatinová imunoprecipitace

Chromatin Immunoprecipitation (Chip) Assay Kit (Millipore)

4.2 Primery, sondy a protilátky

Lyofilizované primery byly podle pokynů výrobce naředěny na koncentraci 100 µM a následně byly ředěny na pracovní koncentraci 50µM.

Nested PCR

Vnější primery (Metabion International AG)

Přímý primer: 5' GGTGTAAGTTAGAATATTTTGAAGGATG 3'

Zpětný primer: 5' CAAACCAAACCCTACCAAATCA 3'

Vnitřní primery (Metabion International AG)

Přímý primer: 5' AGGTTGTTTAGAAATGTTTATTTTGG 3'

Zpětný primer: 5' AAAATCCCCTATAATAACATCTCAATTAC 3'

Kvantitativní PCR

Primery pro gen DQA1 a DR (IDT, USA)

DQA1*01 F: 5' GAAGGAGACTGCCTGGCG 3'

DQA1*01 R: 5' CATGATGTTCAAGTTGTGTTTTGC 3'

DQA1*02 F: 5' TTACGGTCCCTCTTGCCAGTT 3'

DQA1*02 R: 5' TTGCGGGTCAAATCTAAGTCTG 3'

DQA1*03 F: 5' GGTCCCTCTGGGCAGTACAG 3'

DQA1*03 R: 5' CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT 3'

DQA1*04 F: 5' GTACACCCATGAATTTGATGGAGAC 3'

DQA1*04 R: 5' CAGGATGTTCAAGTTGTGTTTTGTC 3'

DQA1*05 F: 5' GATGAGCAGTTCTACGTGGACCT 3'

DQA1*05 R: 5' GTAGAGTTGGAGCGTTTAATCAGAC 3'

DQA1 total F: 5' TACAGCTCAGAACAGCAACTGC 3'

DQA1 total R: 5' CCCACAATGTCTTCACCTCCA 3'

DQA1 intron F: 5' GTTGCCCGTTTCTTTCTCTCA 3'

DQA1 intron R: 5' TGGACTCCTTTACCCACTCCC 3'

DRA1 F: 5' GGACAAAGCCAACCTGGAAA 3'

DRA1 R: 5' AGGACGTTGGGCTCTCTCAG 3'

Sondy pro gen DQA1 a DR (IDT, USA)

DQA1*01: 5' CCTGCGGGTCAAACCTCCAAATTTG 3'

DQA1*0203: 5' CCACATAGAACTCCTCGTCTCCATCAAATTCAT 3'

DQA1*0405: 5' ACTGTCTGGTGTGCTGTTCTCAGACAA 3'

DQA1 total: 5' CTTTGTTTAGGATCATCCTCTTCCCAAGGC 3'
DQA1 intron: 5' ACCTGTGCCAGTTCCCATGTGGAAAT 3'
DRA1: 5' CAACTATACTCCGATCACCAATGTACCTCCAGAG 3'
Primery pro gen DQB1 (IDT, USA)
DQB1*02 F: 5' CGTGCGTCTTGTGAGCAGAA 3'
DQB1*02 R: 5' CCCGTTTCCTCTCCAGGAT 3'
DQB1*0301 F: 5' GGGCGGTGACGCAGCT 3'
DQB1*0301 R: 5' CTGCACACCATGTCCAACTC 3'
DQB1*0302 (*04) F: 5' GCCTTCGGGTAGCAACTGTG 3'
DQB1*0302 (*04) R: 5' GCGTACTCCTCTCGGTTATAGATGTA 3'
DQB1*05 F: 5' CGTCTCAATTATGTCTTGGGAAGAAGT 3'
DQB1*05 R: 5' CTCTGCCCTCAGCCAGTGA 3'
DQB1*06 F: 5' CTTCGTCTCAGTTATGTCTTGGGAAG 3'
DQB1*06 R: 5' GAGTCTCTGCCCTCAGCCTGTA 3'
DQB1 total F: 5' CAGGTACATCAGATCCATCAGGTC 3'
DQB1 total R: 5' GTCCCGTTGGTGAAGTAGCAC 3'
DQB1 intron F: 5' CTAGGATGATGCCCACTTTGTG 3'
DQB1 intron R: 5' ACAGAACTTCAGCTTGATGCAGAT 3'

Sondy pro gen DQB1 (IDT, USA)

DQB1 *0301,*02: 5' TCCTTCTGGCTGTTCCAGTACTCGGC 3'
DQB1 *0302,*04 total: 5' ATCCTCGGGAGAGTCTCTGCCCTCA 3'
DQB1 *05,*06: 5' CTTCGGGTAGCAACTGTCACCTTGATGCT 3'
DQB1 intron: 5' CCACTAGCAGCCTCTTTCAGTCACTGGAA 3'

Endogenní kontrola

Taq Man Gene Expression Assay hu PPIA: Hs04194521_s1 (Applied Biosystems)

Chromatinová imunoprecipitace

Primery pro gen DQA1 (IDT, USA)

DQA1*01 F: 5' CCCATCCCTCTTGCGACTG 3'
DQA1*01 R: 5' GGACTTGAGGAATTGTTCTATGAATAA 3'
DQA1*02 F: 5' AAAAGAAAAATTCCCATCCCTT 3'
DQA1*02 R: 5' GGACTTGAGGAACTGTTCTATGAAGAG 3'

DQA1*03 F: 5' ACCCATCCCTCTTGCGAA 3'
DQA1*03 R: 5' GACTTGAGGAATTGTTCTATGAACAG 3'
DQA1*04 F: 5' CCCATCCCTCTTGCGACTA 3'
DQA1*04 R: 5' CACTCAGAGTGGACTTGAGGAAATA 3'
DQA1*05 F: 5' ATGCCCATCCCTCTTGCC 3'
DQA1*05 R: 5' AGAGTGGACTTGAGGAAATGTACTG 3'
DQA1 Total F: 5' AAATGCCCATCCCTCTTGC 3'
DQA1 Total R: 5' CTCTACTCAGAGTGGACTTGAGGAA 3'

Sonda pro gen DQA1 (IDT, USA)

5' CAGACATGCACACACCAGAGAAGATTCCAAT 3'

Protilátky (Millipore)

Anti-trimethyl-Histone H3(Lys9), clone 6F12-H4 (mouse monoclonal)

Anti-acetyl-Histone H3 (rabbit polyclonal)

Anti-Histone H3, CT, pan, clone A3S (rabbit monoclonal)

Normal Rabbit IgG

4.3 Použité přístroje a počítačové programy

Přístroje:

Autokláv Systec DE-23 (Systec)

Automatická pipeta jednokanálová Biopipette A (Labnet) (1000 – 5000 µl)

Automatické pipety jednokanálové Discovery+ (HTL) (Lab Solution)

(0,1 – 2; 2 – 20; 20 – 200; 100 – 1000 µl)

Centrifuga Z 300 (Hermle)

Centrifuga MPW-51 (Mechanika Precyzyjna)

Elektroforetické vany (Thermo Scientific)

Gel logic 1500 - focení agarózových gelů (Kodak)

Hlubokomrazící box U410 (New Brunswick)

LabCycler gradient SensoQuest (Scholler)

Laminární box Auramini (Bioair)

Laminární box HERAsafe (Heraeus)

Laminární box CleanAir (Scholler)

Lednička ARC (Whirlpool)
Mikrovlňná trouba (Zanussi)
Minicentrifuga Z100 M (Hermle)
Mraznička zásuvková (Whirlpool)
Nanofotometr (Implen)
Plynový kahan Schuett phoenix (Schuett – biotec.de)
Stolový vortex (Scientific industrie)
Termocykler C1000TM (Bio-Rad)
Třepačka a inkubátor NB205-QF (N-Biotek)
UV Transluminátor MUVB20 (UltraLum)
Váhy digitální 40SM-200A (Precisa)
Zdroj napětí pro elektrof. separaci PowerPac 3000 (Bio-Rad)
Zdroj napětí pro elektrof. separaci MP-250V (Major Science)
7000 SDS ABI Prism (Applied Biosystem)

Programy:

Bioedit (volně dostupná verze 7.0.9.0)
Genesnap (Syngene)
Graphpad prism 5.04
Kodak Molecular Imaging software, verze 5.0. (Kodak)
7000 Sequence Detection Software 1.2.3. (Applied Biosystems)

5 POSTUPY A METODIKA PRÁCE

5.1 Analýza DNA

5.1.1 Izolace DNA z plné krve

Periferní krev byla odebrána do zkumavek s EDTA. Izolace byla prováděna vysolovací metodou.

- 1) K 0,5 ml krve byl přidán 1 ml RCLB (red cell lysis buffer) a obsah se obracením zkumavky míchá po dobu 30 sekund. Následuje centrifugace na 16 000x g/ 3 min.
- 2) Supernatant byl odstraněn a peleta byla promyta 1 ml dH₂O. Následuje centrifugace 16 000x g/ 3 min. Krok dvě se opakuje v případě potřeby 2-3 x.

- 3) Peleta byla po promytí resuspendována v 235 μl dH_2O , 80 μl WCLB, 14 μl 10% SDS a 15 μl proteázy K.
- 4) Vzorky byly za stálého míchání inkubovány 30 minut při 55 °C.
- 5) Po inkubaci a ochlazení na pokojovou teplotu bylo přidáno 120 μl 5 M NaCl a vzorky byly intenzivně protřepány. Následuje centrifugace na 16 000x g/ 6 min.
- 6) Po centrifugaci byl supernatant přepipetován do nové 1,5 ml zkumavky a centrifugován na 16 000x g/ 3 min.
- 7) Po přepipetování do nové 1,5 ml zkumavky byl přidán 1 ml 99% etanolu a DNA byla vysrážena lehkým obracením zkumavky. Poté byly zkumavky umístěny na dobu 20 minut do -20 °C.
- 8) Následuje centrifugace 16 000x g/ 3 min.
- 9) Po odstranění supernatantu byl přidán 1 ml 70% etanolu a následovala 10 minutová inkubace za pokojové teploty.
- 10) Následuje centrifugace 16 000x g/ 3 min.
- 11) Po odstranění supernatantu byla zkumavka s peletou vysušena pomocí gázy a vysoušením v laminárním boxu po dobu 20 minut.
- 12) DNA byla rozpouštěna ve 100- 150 μl dH_2O .

5.1.2 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Kvalita a koncentrace DNA byla stanovována spektrofotometricky pomocí nanofotometru (Implen) v křemenných kyvetách při vlnové délce λ 260 nm. Kontaminace proteiny a RNA byla určena porovnáním podílu absorbancí A260/A280 a A260/A240 v doporučeném rozmezí pro čistotu DNA okolo 1,8.

5.1.3 Genotypizace

Genotypizace HLA genů byla prováděna metodou PCR-SSP pomocí kitů Olerup SSPTM AB (GenoVision). Kity obsahovaly směs sekvenčně specifických primerů pro geny HLA DRB1, HLA DQA1 a HLA DQB1. Pro gen DQB1 byla nejprve určena sérologická skupina pomocí kitu DR low resolution SSP typing a později byly jednotlivé alely daného genu rozlišeny sekvenčně specifickými kity. Po skončení PCR byly vzorky naneseny na 1,5 % TBE agarózový gel a po separaci v elektrickém poli byl gel vizualizován UV transiluminátorem. Výsledky amplifikovaných HLA alel byly vyhodnoceny pomocí

interpretačních tabulek Olerup SSP kitu. Reakční směs pro PCR je v tabulce 1 a program pro PCR v tabulce 2.

složky reakce	objem
dH ₂ O	5,166 µl
PCR mix	3,150 µl
DNA (c= 30ng/ µl)	2,100 µl
Taq polymeráza	0,084 µl
celkový objem	10 µl

Tabulka 1. Složení reakční směsi pro genotypizaci pro 1 jamku kitu.

krok	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	94 °C	120 s	
denaturace	94 °C	10 s	10
hybridizace a elongace	65 °C	60 s	10
denaturace	94 °C	10 s	20
hybridizace	61 °C	50 s	20
elongace	72 °C	30 s	20

Tabulka 2. Teplotní program pro genotypizaci.

5.1.4 Bisulfitová konverze DNA

V průběhu bisulfitové konverze mění hydrogensířičitan sodný nemetylovaný cytosin na uracil, který je následně během PCR reakce nahrazen thyminem. Metylovaný cytosin zůstává nezměněný a při následné sekvenaci je tak umožněno rozlišit metylované a nemetylované cytosiny. Pro bisulfitovou konverzi byl použit Epitect Bisulfite Kit a všechny kroky byly prováděny dle doporučení výrobce.

- 1) Bisulfitový mix byl rozpuštěn v 800 µl dH₂O bez RNáz a reakce byla připravena podle tabulky 3.
- 2) Připravené vzorky byly poté vloženy do termocykléru. Program pro bisulfitovou konverzi je v tabulce 4.

složky reakce	objem
DNA (1ng-2μg)	max. 20μl
RNase-free water	*
Bisulfite mix	85 μl
DNA Protect buffer	35 μl
celkový objem	140 μl

Tabulka 3. Složení jedné reakční směsi pro bisulfitovou konverzi.

krok	teplota	čas
denaturace	95 °C	5 min.
inkubace	60 °C	25 min.
denaturace	95 °C	5 min.
inkubace	60 °C	85 min.
denaturace	95 °C	5 min.
inkubace	60 °C	175 min.
závěrečná inkubace	20 °C	∞

Tabulka 4. Program bisulfitové konverze

5.1.5 Přečištění po bisulfitové konverzi

- 1) Po konverzi byl celý objem reakce přepipetován do 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavek.
- 2) K vzorku bylo přidáno 560 μl BL pufru a celý roztok protřepán a krátce stočen.
- 3) Celý objem byl poté přepipetován do Epiject spin kolonek, které byly umístěny ve sběrných zkumavkách. Takto byl vzorek centrifugován na 18 000x g/ 1 min.
- 4) Do kolonky bylo poté přidáno 500 μl BW pufru (s přidaným etanolem dle pokynů výrobce). Kolonka byla centrifugována na 18 000x g/ 1 min. Obsah sběrné zkumavky byl poté vylit.
- 5) Do kolonky bylo přidáno 500 μl BD pufru (s přidaným etanolem dle pokynů výrobce) a kolonka byla inkubována 15 minut při laboratorní teplotě.
- 6) Následovala centrifugace 18 000x g/ 1 min. Obsah sběrné kolonky byl vylit.
- 7) Bylo přidáno 500 μl BW pufru a kolonka byla opět centrifugována 18 000x g/ 1min. Obsah sběrné zkumavky byl vylit.
- 8) Opakování kroku 7).

- 9) Kolonka byla umístěna do nové sběrné zkumavky a centrifugována na 18 000x g/ 1 min.
- 10) Kolonka byla umístěna do nové 1,5 ml zkumavky a s otevřeným víčkem inkubována v termobloku po dobu 5 minut při teplotě 56 °C.
- 11) Na střed kolonky bylo poté napipetováno 20 µl dH₂O a centrifugováno na 18 000x g/ 1min.
- 12) DNA byla zamražena na -20 °C.

5.1.6 Amplifikace produktu pomocí nested PCR

Z důvodu nižší komplexity bisulfitované DNA byla použita pro amplifikaci cílového promotorového úseku genu *HLA DQA1* metoda nested PCR. Podle referenční sekvence genu *HLA DQA1* (zdroj: NCBI reference sequence: NC_000006.11) byly navrženy primery pro amplifikaci daného úseku. Nejprve byl amplifikován delší úsek pomocí vnějších primerů, které nasedají na promotor daného genu v místě -729 až -701 a -109 až -86 od start kodonu. Amplifikovaný úsek byl dále použit jako templát pro amplifikaci kratšího úseku za použití vnitřních primerů, které nasedají v místě -670 až -644 a -154 až -126 daného genu. PCR reakce probíhala ve dvou nezávislých reakcích, aby bylo minimalizováno riziko amplifikace daného úseku pouze u jedné alely. Sekvence primerů jsou v tabulce 5. Reakční směs je popsána v tabulce 6 a teplotní programy jsou v tabulce 7.

vnější primery		T _m
přímý primer	5' GGTTGTAAGTTAGAATATTTTGAAGGATG 3'	63 °C
zpětný primer	5' CAAACCAAACCCTACCAAATCA 3'	58 °C
vnitřní primery		
přímý primer	5' AGGTTGTTTAGAAATGTTTATTTTGG 3'	59 °C
zpětný primer	5' AAAATCCCCTATAATAACATCTCAATTAC 3'	62 °C

Tabulka 5. Sekvence a teplota tání (T_m) primerů použitých pro nested PCR.

složky reakce	objem 1. reakce	objem 2. reakce
dH ₂ O	13,25 µl	14,75 µl
10x PCR pufr	2,5 µl	2,5 µl
25mM MgCl ₂	6 µl	4 µl
dNTPs (10mM)	1,25 µl	1,25 µl
přímý primer (50µM)	0,4 µl	0,4 µl
zpětný primer (50µM)	0,4 µl	0,4 µl
Platinum <i>Taq</i> DNA polymerase	0,2 µl	0,2 µl
DNA	1 µl	1,5 µl
celkový objem	25 µl	25 µl

Tabulka 6. Složení jedné reakční směsi pro nested PCR.

krok	1. reakce			2. reakce		
	teplota	čas	počet cyklů	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	5 min		95 °C	5 min	
denaturace	95 °C	1 min	39	95 °C	1 min	49
hybridizace	56 °C	1,5 min	39	61 °C	1,5 min	49
elongace	72 °C	1 min	39	72 °C	1 min	49
závěrečná inkubace	72 °C	10 min		72 °C	10 min	

Tabulka 7. Teplotní program pro nested PCR

5.1.7 Izolace a přečištění PCR produktu

- 1) Byl připraven 1% TAE agarózový gel s nízkou teplotou tání s GelRed interkalačním barvivem (2,5 µl na 100 ml gelu).
- 2) Dublety PCR produktů byly smíchány a nanášeny na gel spolu s 6x koncentrovaným nanášecím barvivem v poměru 5:1.
- 3) Elektroforetická separace probíhala standardně 30 minut při konstantním napětí 150V.
- 4) Po elektroforéze byl gel přenesen na UV transiluminátor a produkty o správné velikosti byly pomocí skalpelu vyřezány a přeneseny do předem zvážených 1,5 ml zkumavek.
- 5) Zkumavky s gelem byly opět zváženy a rozdílem hodnot byla vypočítána váha samotného gelu.

Následné přečištění produktu bylo provedeno pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Jednotlivé kroky byly provedeny dle doporučení výrobce.

- 1) Gel byl rozpuštěn v trojnásobném množství QG pufru k váze gelu (100 mg gelu= 100 μ l) a inkubován 10 minut při 50 °C.
- 2) Každé 2-3 minuty byly zkumavky protřepány.
- 3) Ke směsi bylo přidáno jednonásobné množství 100% izopropanolu a obsah zkumavek pak byl promísen a přepipetován do MiniElute kolonek.
- 4) Následovala centrifugace na 17 900x g/ 1 min. Po centrifugaci byl obsah sběrné zkumavky vylit.
- 5) Do kolonky bylo přidáno 750 μ l PE pufru a opět centrifugováno na 17 900x g/ 1 min. Obsah sběrné zkumavky byl odstraněn.
- 6) Prázdná kolonka byla centrifugována na 17 900x g/ 1 min.
- 7) Kolonka byla poté vložena do nové 1,5 ml zkumavky a na střed kolonky bylo napipetováno 20 μ l dH₂O. Vzorek byl takto inkubován po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě.
- 8) Následovala centrifugace na 17 900x g/ 1 min. Poté byl vzorek zamrazen na -20 °C.

5.1.8 Klonování

Izolovaný a přečištěný PCR produkt byl ligován s pGEM-T vektorem, kterým byly následně transformovány bakterie *E. coli* DH5 α nebo *E. coli* XL-Blue. Tyto kmeny mají delecii v genu pro α peptid β -galaktozidázy a umožňují tak použít systém modro-bílé selekce bakteriálních kolonií. Daný gen se nachází v klonovacím místě ve vektoru a může být přerušen inzercí. V případě neúspěšné inserce dojde k uzavření vektoru a expresi β -galaktozidázy. Bakterie jsou kultivovány na médiu s X-Gal (substrát β -galaktozidázy) a IPTG (induktor β -galaktozidázy). Pokud je β -galaktozidáza exprimována, štěpí X-Gal a kolonie získají modrou barvu. V případě, že jsou bakterie transformovány správně, je sekvence β -galaktozidázy přerušena, čímž se neexprimuje a nedochází tak ke štěpení X-Gal. Bakteriální kolonie poté mají bílou barvu. Médium rovněž obsahuje ampicilin, ke kterému jsou transformované bakterie s vektorem resistantní. Tímto je dosažena negativní selekce netransformovaných bakterií.

5.1.8.1 Příprava kompetentních buněk

Pro přípravu kompetentních buněk byly použité kmeny *E. Coli* DH5 α nebo *E. Coli* XL1-Blue podle upraveného protokolu Sambrooka a kol. (1989):

- 1) Do 3 ml LB/SOC média byly zaočkovány pomocí sterilního bakteriologického očka buňky *E. Coli* DH5 α nebo *E. Coli* XL1-Blue. Inokulum bylo poté kultivováno v inkubátoru NB205-QF (N- Biotek, Korea) 16-18 hodin při 250 rpm a 37° C.
- 2) Do sterilní Erlenmayerovi baňky se 100 ml LB/SOC média (ohřátého na 37° C) bylo přidáno po 1 ml inokula a baňka byla vložena do inkubátoru (37° C a 250 rpm).
- 3) Během inkubace byla po přibližně 80 minutách měřena optická densita při 600 nm, Další měření proběhlo po patnácti minutách, dokud nebyla OD 0,5- 0,6.
- 4) Růst bakterií byl zastaven 10 minutovou inkubací na ledu. Buňky v médiu byly přeneseny do vychlazených a sterilních 50 ml polypropylenových zkumavek a byly sesbírány 10 minutovou centrifugací při 2000x g.
- 5) Peleta byla resuspendována v 12,5 ml vychlazeným a sterilním 0,1M CaCl₂ a zkumavky zcentrifugovány 10 minut při 2000x g.
- 6) Peleta resuspendována 12,5 ml vychlazeným a sterilním 0,1M CaCl₂ a zkumavky inkubovány 30 minut na ledě.
- 7) Buňky byly posbírány 10 minutovou centrifugací při 2000x g a peleta resuspendována v 3 ml vychlazeným a sterilním 0,1M CaCl₂ s 20% obsahem glycerolu.
- 8) Kompetentní buňky byly rozpipetovány po 100 μ l do 1,5 ml sterilním vychlazených zkumavek a ihned ponořené do etanolu vychlazeného na -70° C. Buňky byly skladované při -80° C v hlubokomrazícím boxu E310 (New Brunswick, UK).

5.1.8.2 Příprava kultivačních misek

- 1) Do láhve bylo naváženo 14g LB agaru a doplněno destilovanou vodou do objemu 400 ml. Dovnitř bylo umístěno magnetické míchadlo.
- 2) Roztok byl promíchán a autoklavován 15 minut při 121° C. Po vychlazení bylo přidáno 400 μ l ampicilinu (100 mg/ml), 400 μ l IPTG (100mM) a 400 μ l X-Gal (3%).
- 3) Celý roztok byl promíchán na magnetickém míchadle a nalit do Petriho misek.
- 4) Po ztuhnutí agaru byly misky přikryty víčkem a uloženy do chladničky.

5.1.8.3 Ligace

Pro ligaci byl použit vektor pGEM®-T (Promega). Poměr insertu k vektoru byl po času ligace 3:1. Množství DNA vstupující do reakce bylo vypočítáno podle vzorce:

$$\text{ngDNA} = \frac{\text{ngVektor} \cdot \text{kbInzert} \cdot 3}{\text{kbVektor}}$$

Ligace proběhla při 4° C přes noc. Složení ligační směsi je popsáno v tabulce 8. Do reakce byl vložen PCR produkt v množství 14 ng a směs byla doplněna dH₂O do 5 µl.

složky reakce	objem
dH ₂ O	*
2x Rapid Ligation Buffer	2,5 µl
pGEM-T vektor	0,5 µl
T4 ligáza	0,5 µl
PCR produkt	*
celkový objem	5 µl

Tabulka 8. Složení ligační směsi pro jednu reakci.

5.1.8.4 Transformace tepelným šokem

- 1) Suspenze kompetentních buněk *E. Coli* DH5α nebo *E. Coli* XL1-Blue byla rozmrazena na ledu a 50 µl těchto buněk bylo přidáno k celému objemu ligační reakce (5 µl). Tato nová reakční směs byla promíchána a inkubována 20 minut na ledě.
- 2) Bakterie byly transformované tepelným šokem v termobloku při 42° C a následně umístěné na 2 minuty na led.
- 3) Do 1,5 ml zkumavky s transformovanými bakteriemi bylo přidáno 950 µl sterilního LB média a tyto byly umístěny do inkubátoru při 37° C na 150 rpm a 90 minut.
- 4) Na misky s LB agarem (ampicilin, X-Gal, IPTG) bylo nanášeno po 50 µl, 200 µl a 750 µl suspenze a rozetřeno pomocí sterilní hokejky.
- 5) Misky s rozetřenými bakteriemi byly inkubované přes noc při 37° C a vyhodnocené následující den.

5.1.9 Izolace plazmidové DNA alkalickou lýzou

Pro izolaci plazmidové DNA z bakterií *E. Coli* byla použita modifikovaná metoda standardní alkalické lýzy.

1) Byly připraveny roztoky:

Roztok 1:

50 mM glukosa

10 mM EDTA

25 mM Tris HCl

Roztok 2:

200 mM NaOH

1% SDS

Roztok 3:

60 ml KOAc (5M octan draselný)

11,5 ml bezvodé kyseliny octové

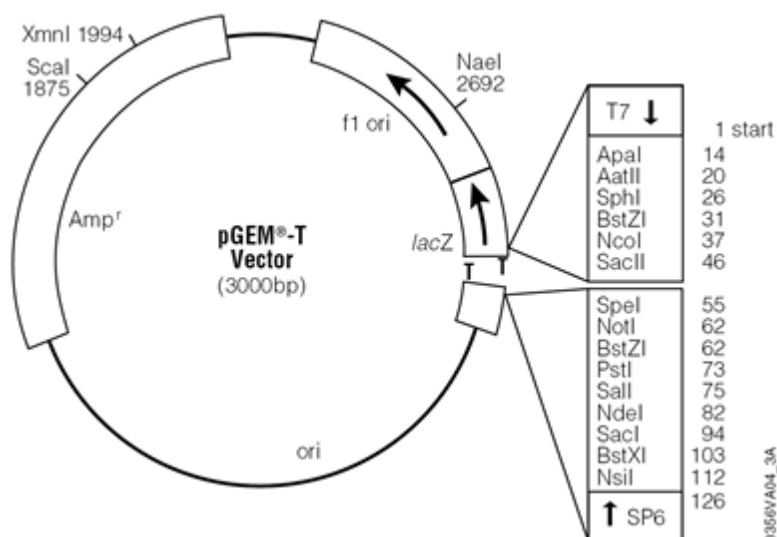
28,5 ml dH₂O

- 2) Pomocí sterilního bakteriálního očka byly vybrány bílé kolonie zaočkované do 2 ml LB/ SOC média a kultivované při 37° C a 250 rpm přes noc.
- 3) Buňky byly přeneseny do 1,5 ml zkumavek a sesbírané minutovou centrifugací při 12 000x g.
- 4) Peleta byla resuspendována v 100µl roztoku 1.
- 5) Následně bylo přidáno 200 µl roztoku 2 a ihned přidáno 200 µl chloroformu.
- 6) Buňky byly lyzovány 2 min a potom bylo přidáno 200 µl roztoku 3.
- 7) Vzorky byly zvortexovány a centrifugovány při 12 000x g po dobu 10 minut.
- 8) Horní fáze byla odebrána do nových 1,5 ml zkumavek a DNA z nich vysrážena 500 µl isopropanolu.
- 9) Zkumavky byly stočeny 10 minut při 12 000x g a supernatant odpipetován.
- 10) Peleta byla promyta 200µl 70% etanolu a stočena po dobu 5 minut při 12 000x g.
- 11) Supernatant byl opatrně vylit a DNA byla zbavena zbylého etanolu vysušením v laminárním boxu.
- 12) Plasmidová DNA byla rozpuštěna v 20 µl vody a skladována při -20° C.

5.1.10 Ověření pozitivně transformovaných kolonií - restriční štěpení

Pro ověření správné velikosti vektoru s insertovaným úsekem bylo použito štěpení plazmidu restriční endonukleázou PstI (Thermo Scientific). PstI štěpí plazmidový pGEM-T vektor 73 bp od klonovacího místa a linearizuje jej (Obr. 6). Reakční směs byla

připravena podle tabulky 9 a štěpení proběhlo v termocykleru při 37° C po dobu 90 minut. Ověřování velikosti úseků proběhlo pomocí TBE agarózové elektroforézy, kde lineární vektor (3000 bp) spolu s insertem DQA1 úseku tvoří 3544 bp lineární DNA. Tyto velikosti byly porovnány s velikostí prázdného vektoru (3000 bp).



Obrázek 6. pGEM-T vektor. Převzato z www.promega.com.

složky reakce	objem
plazmidová DNA	1 µl
H pufr	1 µl
Acetylované BSA	0.1 µl
PstI	0,25 µl
dH ₂ O	7, 65 µl
celkový objem	10 µl

Tabulka 9. Složení reakční směsi pro jednu reakci štěpení plazmidové DNA.

5.1.11 Sekvence

K sekvenování bylo odesíláno 5-10 klonů z jednoho jedince. Odeslány byly plazmidy, izolované z úspěšně transformovaných a ověřeny bakteriálních kolonií.

- 1) Byla připravena 96-ti jamková destička
- 2) Do každé jamky byl napipetován jeden vzorek plazmidové DNA o množství 300ng.
- 3) Každá jamka byla poté doplněna dH₂O do konečného objemu 7 µl.
- 4) Destička byla přelepena fólií a odeslána k sekvenaci.

5.2 Analýza RNA

5.2.1 Izolace RNA

RNA byla izolována z plné krve pomocí kitu QIAamp[®] RNA Blood Mini Kit (Qiagen) všechny kroky byly provedeny dle doporučení výrobce. Izolace probíhala na ledu a centrifugace při 4° C.

- 1) 1,5 ml plné krve bylo smícháno s 7,5 ml EL pufru a směs inkubována 10- 15 minut na ledu. Zkumavky byly během inkubace 2x zlehka zvortexovány.
- 2) Buňky byly stočeny při 500x g 10 minut a supernatant byl poté opatrně odstraněn.
- 3) Peleta byla resuspendována 3 ml EL pufru a znovu stočena 10 minut při 500 × g. Supernatant byl opatrně odstraněn pipetou.
- 4) Peleta byla resuspendována v 600 µl RLT pufru (nejprve smíchaným s β-merkaptoetanolem podle pokynů výrobce).
- 5) Lyzát byl napipetován do QIAshredder kolonky umístěné do sběrné zkumavky a centrifugován 2 minuty při 17 900x g.
- 6) K filtrátu ve sběrné zkumavce bylo přidáno 600 µl 70% etanolu a filtrát promíchán pipetováním.
- 7) Celý objem sběrné zkumavky byl napipetován do QIAamp kolonky umístěné do sběrné zkumavky. Kolonka byla 15s centrifugována při 12 000x g.
- 8) QIAamp kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky a promytá 700 µl pufru RW1 a znovu 15 s centrifugována při 12 000x g.
- 9) Kolonka byla opět přenesena do nové sběrné zkumavky a bylo k ní přidáno 500 µl RPE pufru (před použitím smíchaný s etanolem podle pokynů výrobce). Kolonka byla stočena 15s při 12 000x g.
- 10) Do kolonky bylo napipetováno 500 µl RPE pufru a byla stočena 3 minuty při 17 900x g.
- 11) Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky a stočena 1 minutu při 17 900x g.
- 12) Kolonka byla umístěna do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a na střed membrány kolonky bylo nanášeno 30 µl Rnase-free vody. RNA byla eluována minutovou centrifugací při 12 000x g.
- 13) Izolovaná RNA byla použita pro reverzní transkripci nebo skladována při -80°.

5.2.2 Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla přepsána reverzní transkripcí do cDNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit (Applied Biosystems). Všechny kroky byly provedeny dle doporučení výrobce. Reakční směs pro reverzní transkripci byla připravena podle tabulky. 10. Program pro reverzní transkripci je popsán v tabulce 11.

- 1) Celá reakční směs byla zlehka promíchána a napipetována do PCR zkumavek. Ke směsi bylo přidáno takové množství RNA, aby výsledné množství v reakci bylo 300 ng.
- 2) Reakční směs byla doplněna Rnase-free vodou do 20 μ l a zkumavky byly promíchány a stočeny.
- 3) Takto připravené zkumavky byly umístěné do termocykleru a byl spuštěn program pro reverzní transkripci.

složky reakce	objem
10x RT pufr	2 μ l
25x dNTP mix (100nM)	0,8 μ l
10x RT náhodné primery	2 μ l
Multiscribe reverzní transkriptáza	1 μ l
RNase-free water	4,2 μ l
celkový objem	10 μ l

Tabulka 10. Složení jedné reakční směsi pro reverzní transkripci.

krok	teplota	čas
hybridizace	20 °C	10 min
reverzní transkripce	37 °C	120 min
inaktivace enzymu	5 °C	85 min

Tabulka 11. Teplotní program pro reverzní transkripci

5.2.3 Kvantitativní PCR

Pro určení míry exprese jednotlivých alel *HLA DQA1* a *DQB1* byla použita kvantitativní PCR s fluorescenčně značenou sondou TagManTM. Pro endogenní kontrolu byl použit gen *DRA* a všechny uvedené kroky proběhly na ledu. Reakční směs byla připravena podle tabulky 12. Teplotní program kvantitativní PCR je popsán v tabulce 13. Sekvence použitých primerů jsou v kapitole 4.2.

- 1) Před přípravou reakční směsi byla cDNA 10× ředěna na výsledný objem 30 ng/μl.
- 2) Do jamek 96-ti jamkové destičky bylo napipetováno 7,5 μl reakční směsi a 5 μl naředěné cDNA. Reakce byly připravované v tripletech.
- 3) Destička byla krátce stočena při 2 000x g (cca minutu). Amplifikace proběhla v přístroji 7000 SDS ABI Prism.

složky reakce	objem
Gene expression master mix	6,25 μl
přímý primer	0,375 μl
zpětný primer	0,375 μl
sonda (5 μM)	0,5 μl
celkový objem	7,5 μl

Tabulka 12. Reakční směs pro jednu reakci kvantitativní PCR.

krok	teplota	čas	počet cyklů
aktivace UNG	50 °C	2 min	
aktivace polymerázy	95 °C	10 min	
denaturace	95 °C	15 s	50
hybridizace a elongace	60 °C	1 min	50

Tabulka 13. Teplotní program kvantitativní PCR.

5.3 Analýza chromatinu

5.3.1 Izolace leukocytů

- 1) Byl připraven RBC lyzační pufr (10x koncentrovaný): 8,02g NH₄Cl + 0,84g NaHCO₃ + 0,37g EDTA a dolito dH₂O do 100ml.
- 2) Do 50 ml zkumavek bylo napipetována 3 ml krve a přidán RBC pufr 15ml na 1 ml krve.
- 3) Směs byla zlehka promíchávána po dobu 10 minut.
- 4) Poté centrifugována na 250x g/ 13 min/ 4 °C při pomalém brzdění.
- 5) Byl odpipetován supernatant a peleta byla resuspendována v 10 ml PBS
- 6) Směs byla centrifugována na 250x g/ 10 min/ 4 °C při pomalém brzdění.
- 7) Supernatant byl odlit a peleta byla resuspendována v 4,5 ml PBS

Dalším krokem byl crossling. Krok je stejný pro izolaci CD14 a CD19 buněk a bude popsán dále.

5.3.2 Izolace CD14 a CD19 buněk (monocytů a B-lymfocytů)

- 1) Byl připraven pufr E: 0,5g BSA doplněno PBS do 500 ml.
Dále byl připraven pufr B: 0,5g BSA + 2 ml 0,5M EDTA doplněno PBS do 500 ml.
- 2) Do 50 ml zkumavek bylo napipetováno 13 ml krve a dvojnásobné množství pufru E.
- 3) Poté byla směs centrifugována na 500x g/ 10 min/ 4 °C při pomalém brzdění.
- 4) Byla odpipetována plazma, tak aby nedošlo k porušení vrstvy bílých krvinek.
- 5) Poté byl zbytek směsi doplněn pufr E na původní množství.
- 6) Byly přidány magnetické kuličky CD14 μ l na 1ml původního objemu krve.
- 7) Proběhla inkubace 30 minut při 4 °C za stálého míchání.
- 8) Poté byly zkumavky vloženy do magnetického stojanu a inkubována 3 minuty na ledu.
- 9) Poté byla odpipetována směs do nové 50 ml zkumavky pro izolaci CD19 buněk (bude popsáno dále)
- 10) Všechny kroky probíhají neustále se zkumavkami v magnetickém stojanu.
- 11) Do prázdné zkumavky na izolaci CD14 byl přidán pufr B na původní množství a zkumavka byla inkubována 3 minuty na ledu v magnetickém stojanu.
- 12) Po inkubaci byl roztok odstraněn a zkumavka byla opět dolita původním množstvím pufru B.
- 13) Krok 11 se opakuje 3-4x dokud není roztok ve zkumavce čirý.
- 14) Po přečištění byla vrstva buněk s kuličkami resuspendována ve 3 ml PBS.
- 15) Následuje crosslink - popsáno dále.
- 16) Od kroku 9 začíná vlastní izolace CD19 buněk.
- 17) Do zkumavky pro izolaci CD19 byly přidány magnetické kuličky CD19 18 μ l na 1 ml původního množství krve.
- 18) Směs byla poté inkubována 20 min při 4 °C za stálého míchání.
- 19) Po inkubaci byla zkumavka s CD19 vložena do magnetického stojanu a inkubována na ledu po dobu 3 min.
- 20) Poté byl odstraněn roztok a přidán pufr E na původní množství. Následovala inkubace v magnetickém stojanu na ledu po 3 min.

- 21) Krok 20 je opakován 3-4 dokud není roztok čirý.
- 22) Poté byla vrstva buněk resuspendována ve 3 ml PBS.
- 23) Následoval crossling.

5.3.3 Crossling

Krok navazuje bezprostředně na kroky izolace buněk.

- 1) Bylo přidáno 81 μ l formaldehydu do resuspendovaných buněk a inkubováno 10 minut při laboratorní teplotě.
- 2) Po inkubaci bylo přidáno do každé zkumavky 333 μ l Tris Glycinu s inhibitory proteáz. Složení: 940 μ l Tris Gly + 50 μ l PMSF + 10 μ l Pepstatin.
- 3) Směsi byly inkubovány 3 minuty za laboratorní teploty.
- 4) Poté byly centrifugovány na 250x g/ 5 min při pomalém brzdění.
- 5) Peleta byla resuspendována ve 3 ml PBS a znovu centrifugována podle kroku 4.
- 6) Opakování kroku 5.
- 7) Byl odstraněn supernatant a peleta byla rozpuštěna v SDS lyzačním pufu v množství 48 μ l na 1 000 000 buněk.
- 8) Směs byla inkubována 10 min na ledu a poté zamrazena na -80 °C.

5.3.4 Sonikace

Vzorky byly sonikovány ultrazvukem za použití přístroje Bioruptor (Diagenode). Cykly měly 30 sekundové pulzy ultrazvuku a 30 sekundové pauzy. Sonikace probíhala při 4 °C. Leukocyty byly sonikovány po 5 cyklech, CD14 a CD19 buňky po 50 cyklech.

5.3.5 Chromatinová imunoprecipitace

Chromatinová imunoprecipitace byla provedena pomocí Chromatin Immunoprecipitation (Chip) Assay Kit (Millipore) a všechny kroky byly provedeny dle doporučení výrobce.

- 1) Sonikované a rozmražené vzorky byly centrifugovány na 13 000 otáček/ 10 min při 4 °C.
- 2) Supernatant byl poté přepipetován do nové 1,5 ml zkumavky.
- 3) Ke směsi bylo přidáno 10-ti násobné množství Chip Dilution Buffer s inhibitory proteáz.

- 4) Dále bylo přidáno Salmon Sperm DNA/Protein A Agarose-50% Slury o objemu 75 μ l na 2 ml vzorku.
- 5) Směs byla inkubována 1 hodinu při 4 °C za stálého míchání.
- 6) Po inkubaci byly zkumavky centrifugovány na 2000x g/ 1 min a supernatant byl přepipetován do nové 1,5 ml zkumavky.
- 7) Supernatant byl poté rozdělen do nových 1,5 ml zkumavek pro přidání jednotlivých protilátek po 1ml a po 100 μ l pro input.
- 8) Byly přidány protilátky o objemu 2 μ l do každé určené zkumavky.
- 9) Zkumavky s protilátkami byly poté inkubovány přes noc při 4 °C za stálého míchání.
- 10) Po inkubaci bylo přidáno 60 μ l Salmon Sperm DNA/Protein A Agarose-50% Slury a inkubováno 1 hodinu při 4 °C za stálého míchání.
- 11) Zkumavky byly centrifugovány na 500x g/ 1min a supernatant byl poté přepipetován do nových 1,5 ml zkumavek.
- 12) Vzorky byly promývány s Low Salt Immune Complex Wash Buffer, High Salt Immune Complex Wash Buffer, LiCl Immune Complex Wash Buffer, a dvakrát s TE Buffer. Každý tento pufr byl aplikován v objemu 700 μ l a 5 minut inkubován při 4 °C pro první dva pufry a při laboratorní teplotě pro druhé dva pufry. Po každé inkubaci byly zkumavky centrifugovány na 500x g/ 1min.
- 13) Po posledním promytí bylo přidáno 65 μ l elučního pufru (složení: 300 μ l 0,1M NaHCO₃ + 300 μ l 10% SDS + 2,4 ml dH₂O).
- 14) Vzorky byly inkubovány na 15 minut při laboratorní teplotě a každé 3 minuty protřepány.
- 15) Poté byly centrifugovány na 500x g/ 1 min a 50 μ l supernatantu bylo přepipetováno do nové 1,5 ml zkumavky.
- 16) Ke zbývajícimu množství bylo přidáno 65 μ l elučního pufru a opakována centrifugace z kroku 15.
- 17) Bylo pak odebráno 50 μ l supernatantu a přidáno k prvnímu množství do nové zkumavky z kroku 15.
- 18) Bylo přidáno 5 μ l 5M NaCl a inkubováno přes noc při 65 °C.

5.3.6 Purifikace po chromatinové imunoprecipitaci

K přečištění byl použit MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen) a všechny kroky byly provedeny dle doporučení výrobce.

- 1) Ke vzorku bylo přidáno 5-ti násobné množství PB pufru.
- 2) Směs byla přepipetována do MiniElute kolonek a centrifugována na 17 900x g/ 1 min. Supernatant byl odstraněn.
- 3) Bylo přidáno 750 μ l PE pufru (s přidaným 96% etanolem dle návodu výrobce) a opět centrifugováno podle kroku 2.
- 4) Kolonka byla centrifugována podle kroku 2 na prázdno.
- 5) Poté byla kolonka přenesena do nové 1,5 ml. zkumavky a na střed kolonky bylo napipetováno 10 μ l dH₂O a inkubováno 1 minutu.
- 6) Poté byla zkumavka s kolonkou centrifugována na 17 900x g/ 1 min.
- 7) Vzorek byl zamrazen na -20 °C

5.3.7 Kvantitativní PCR pro analýzu chromatinu

Množství složek reakce je zcela totožné s tabulkou 12. Teplotní program je zcela totožný s tabulkou 13. Primery a sondy jsou uvedeny v kapitole 4.2.

5.4 Statistická analýza

Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí programu GraphPad Prism 6. Porovnání trimetylace H3K9 a acetylace jednotlivých alel genu *DQA1* bylo vyhodnoceno Mann-Whitneyho neparametrického testu s hladinou významnosti $p < 0,05$. Stejný postup byl proveden i pro analýzu metylace DNA daného genu a pro míru exprese. Vyhodnocení rozdílů v metylaci jednotlivých CpG míst bylo zpracováno Fisherovým exaktním testem s hladinou významnosti $< 0,05$. Korelace mezi jednotlivými epigenetickými modifikacemi a expresí byly provedeny Spearmanovou neparametrickou korelací.

6 VÝSLEDKY


6.1 Genotypizace


Genotypizace byla zpracována u všech vzorků, tj. 22 dárců krve ze tří rodin. Rodina 1 o šesti členech, rodina 2 o deseti členech a rodina 3 o šesti členech. Alely byly určeny pro geny *DRB1*, *DQA1* a *DQB1*. Veškeré genotypy byly zapsány do rodokmenů daných rodin (Obr. 7, 8 a 9), ke kterým byly poté přiřazovány výsledky analýzy histonových modifikací. Celkový počet haplotypů a jejich procentuální zastoupení ve zkoumaném souboru vzorků je znázorněn v tabulce 14.

<i>DR</i>	<i>DQA1</i>	<i>DQB1</i>	Počet haplotypů	Zastoupení v %
01	0101	0501	4	9,09%
01	0105	0501	1	2,27%
03	0501	0201	1	2,27%
04	0301	0302	6	13,63%
04	0303	0302	2	4,54%
07	0201	0202	2	4,54%
07	0201	0303	1	2,27%
08	0402	0402	3	6,81%
10	0105	0501	4	9,09%
11	0505	0301	6	13,63%
15	0102	0602	9	20,45%
16	0102	0502	5	11,36%

Tabulka 14. Celkový počet haplotypů a jejich procentuální zastoupení.

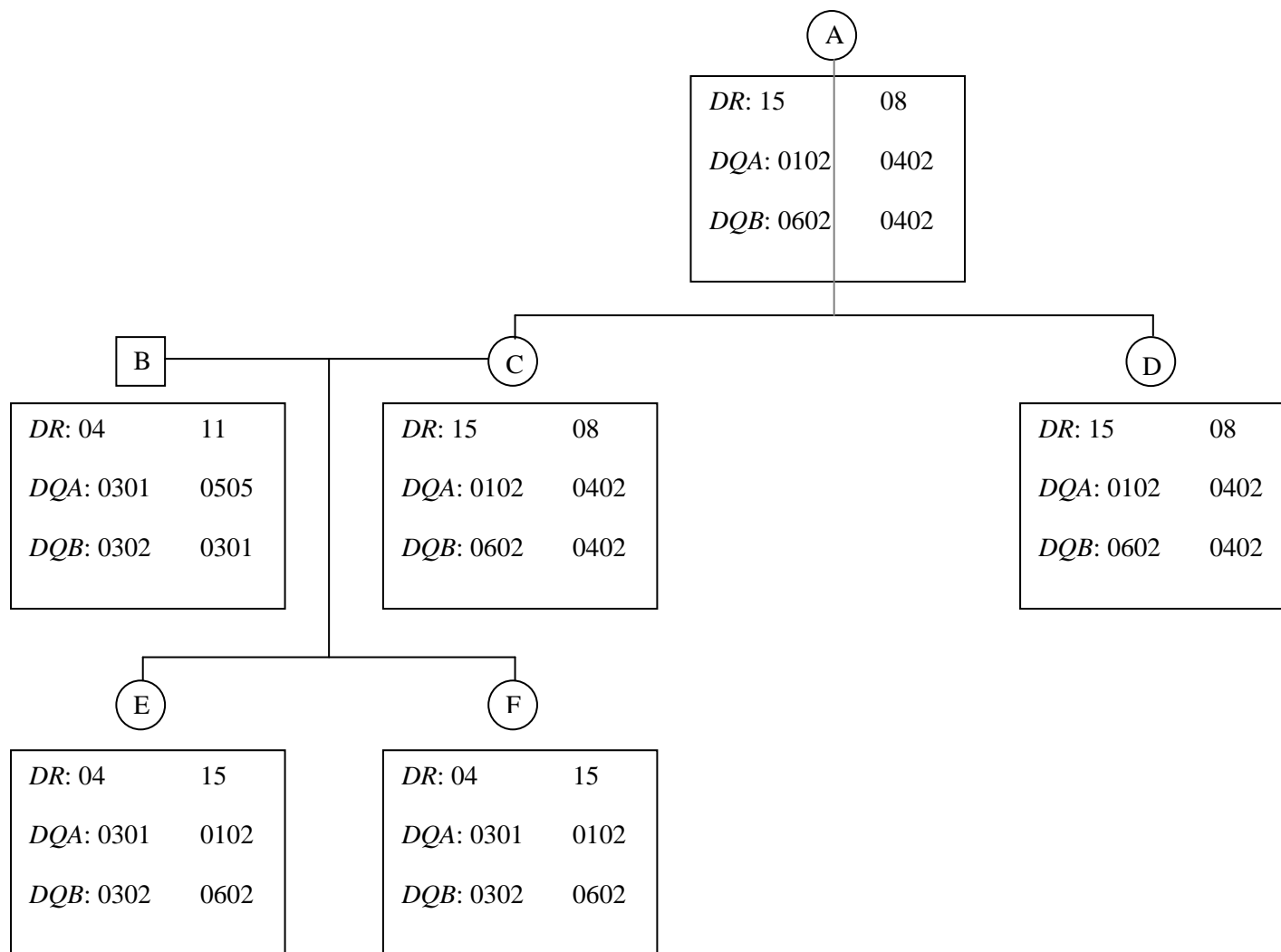
Symboly v rodokmenu:

 = muž

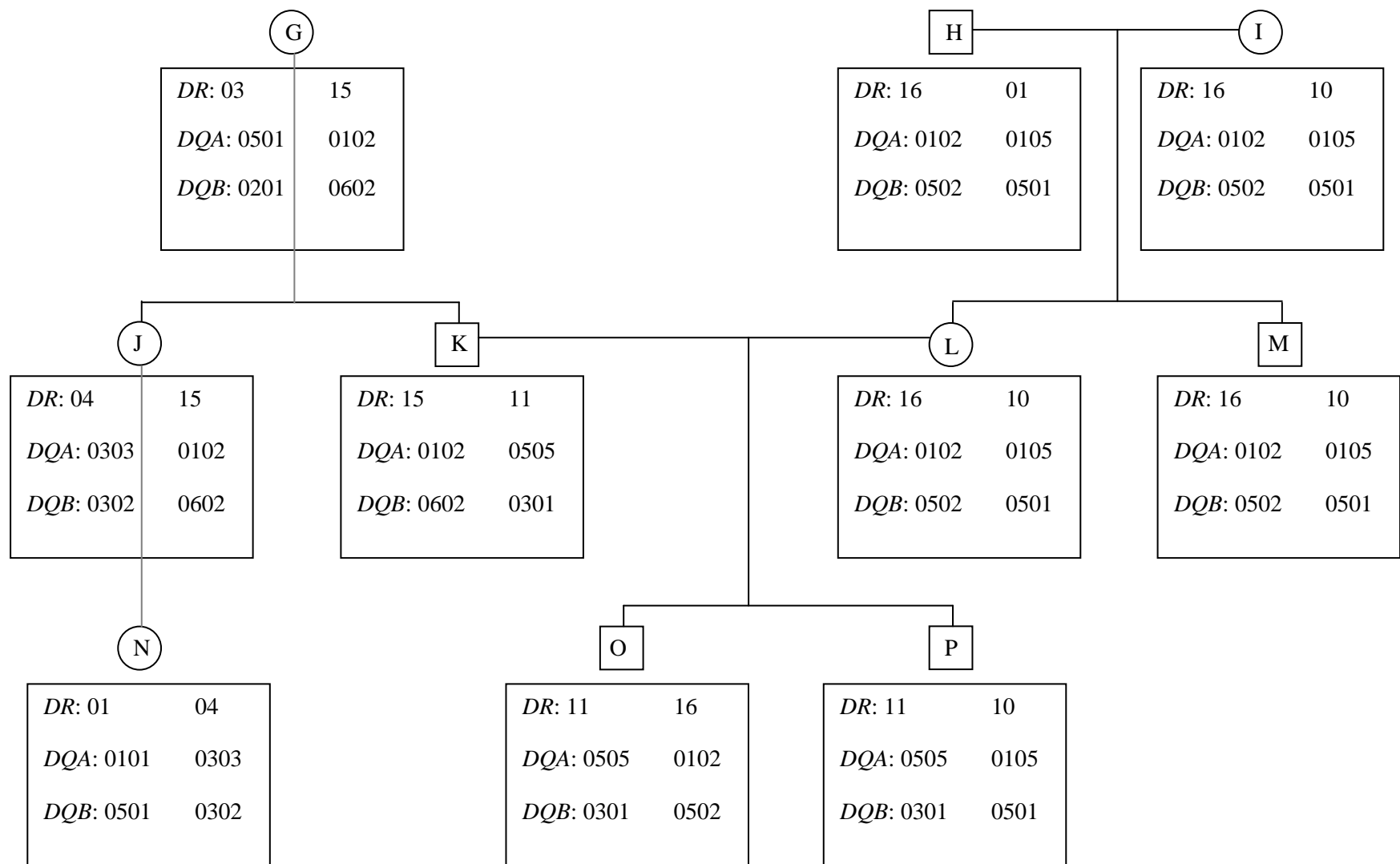
 = žena

A-V = označení konkrétního vzorku

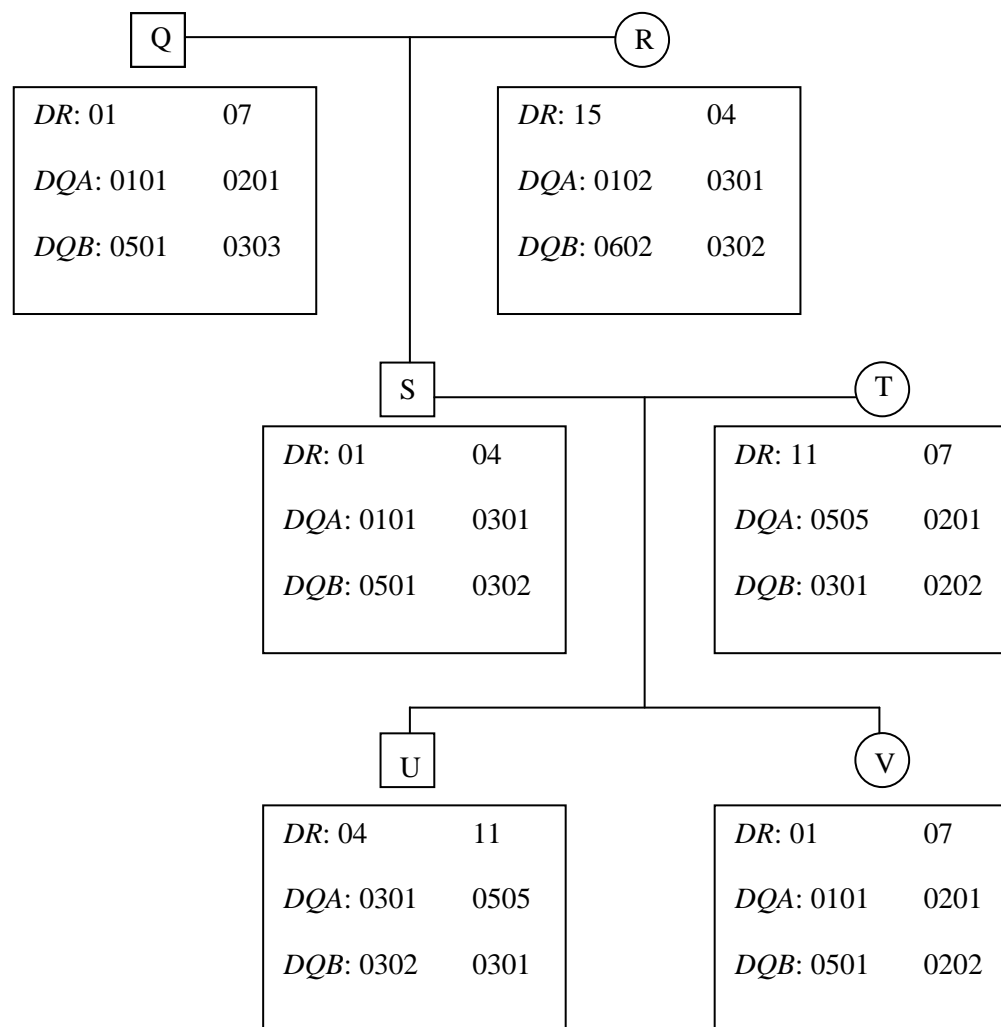
DR, *DQA*, *DQB* = genotyp



Obrázek 7. Rodokmen rodiny 1.



Obrázek 8. Rodokmen rodiny 2.



Obrázek 9. Rodokmen rodiny 3.

6.2 Chromatinová imunoprecipitace

Pro analýzu histonových modifikací chromatinovou imunoprecipitací byly použity pouze leukocyty od dárců krve s alelami genu *HLA DQA1* *01, *02, *03, *04 a *05. CD14 a CD19 nebyly použity k analýze z důvodu velmi malých koncentrací těchto buněk v krvi některých dárců. Zpracované vzorky byly označeny protilátkami anti-trimethyl-histone H3 (konkrétně proti pozici H3K9me³) a anti-acetyl-histone H3 (proti celkové acetylaci histonu H3). Dále byla použita na tyto vzorky protilátka anti-histone H3 (proti celkovému histonu H3) a protilátka anti-Igg (nespecifická protilátka sloužící jako hodnota pozadí-background).

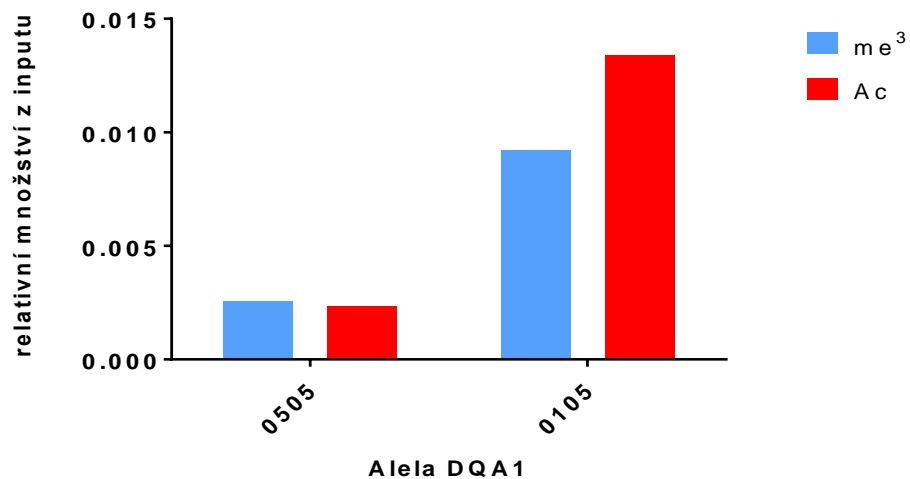
Vzorky byly zpracovány metodou kvantitativní PCR a každý vzorek byl analyzován v dupletu. Z každého vzorku byla získána hodnota Ct pro každou alelu genu *DQA1* a *DQA*total. Měřeny tak byly všechny vzorky se všemi protilátkami. Expres jednotlivých alel byly vztaženy k celkovému množství chromatinu, tj. množství inputu. Vypočteno dle vzorce:

$$\frac{n_{DQA1me^3}}{n_{DQA1input}} = (1 + E_{DQA1})^{(Ct_{DQA1input} - Ct_{DQA1me^3})/10}$$

Kde E znamená účinnost. Stejný vzorec byl použit i na analýzu acetylace. Účinnost byla vypočtena dle vzorce:

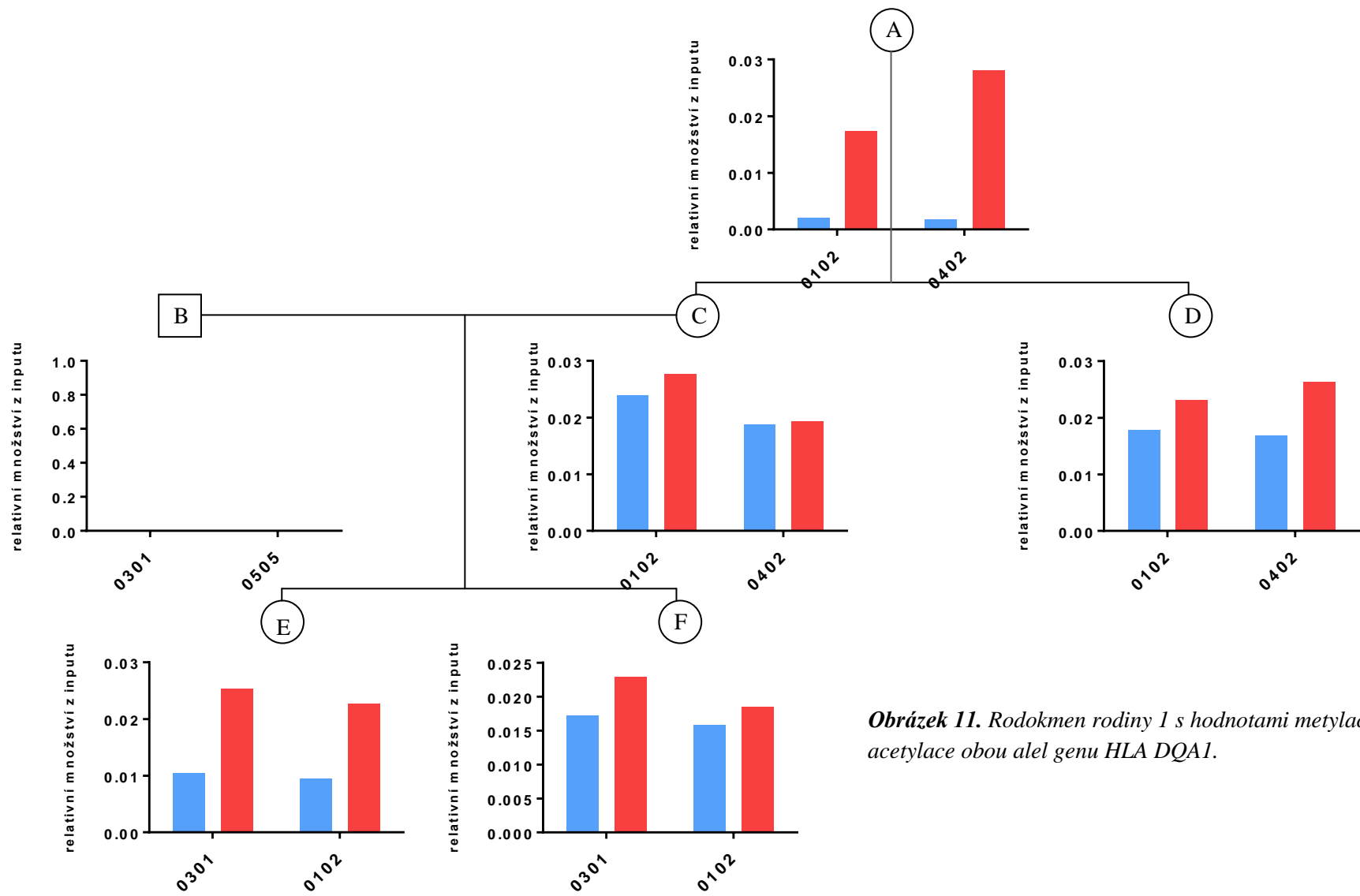
$$E_{DQA1} = 2^{Ct/C_{DQA1}-1}$$

V případě homozygotů je v grafech uveden jen jeden popisný údaj. Pro každý měřený vzorek bylo určeno relativní množství modifikace H3K9me³ a relativní množství acetylace daného histonu (Obr. 10). Každý vzorek s těmito hodnotami byl zanesen do schématu rodokmenu (Obr. 11, 12 a 13). Hodnoty jsou vyjádřeny relativním množstvím v poměru k inputu, který představuje celkové množství chromatinu daného vzorku. Symboly v rodokmenech s vyznačenými histonovými modifikacemi jsou totožné se symboly na Obr. 7, 8 a 9.

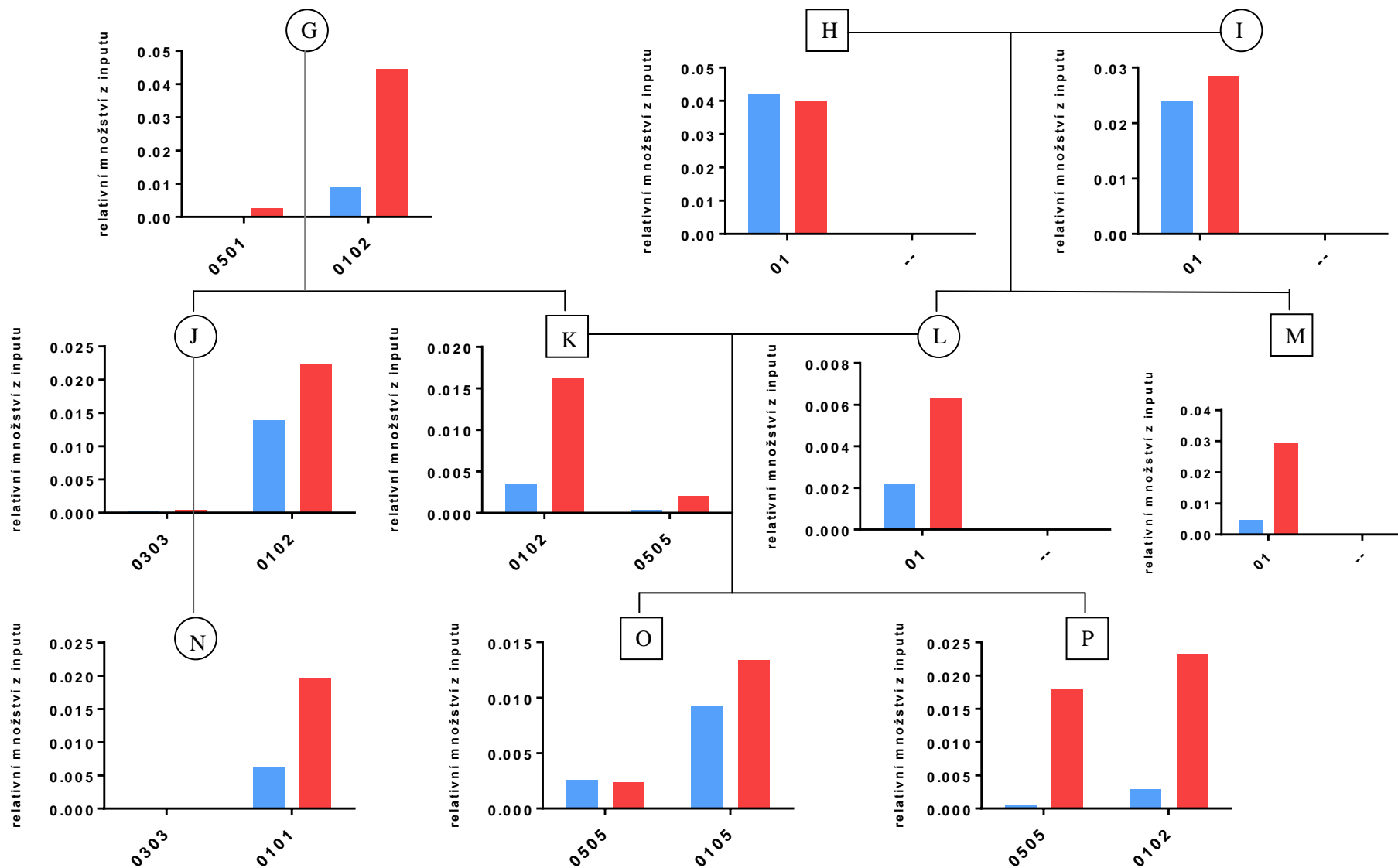


Obrázek 10. Popisná charakteristika acetylace a metylace obou alel jednoho vzorku (příklad).

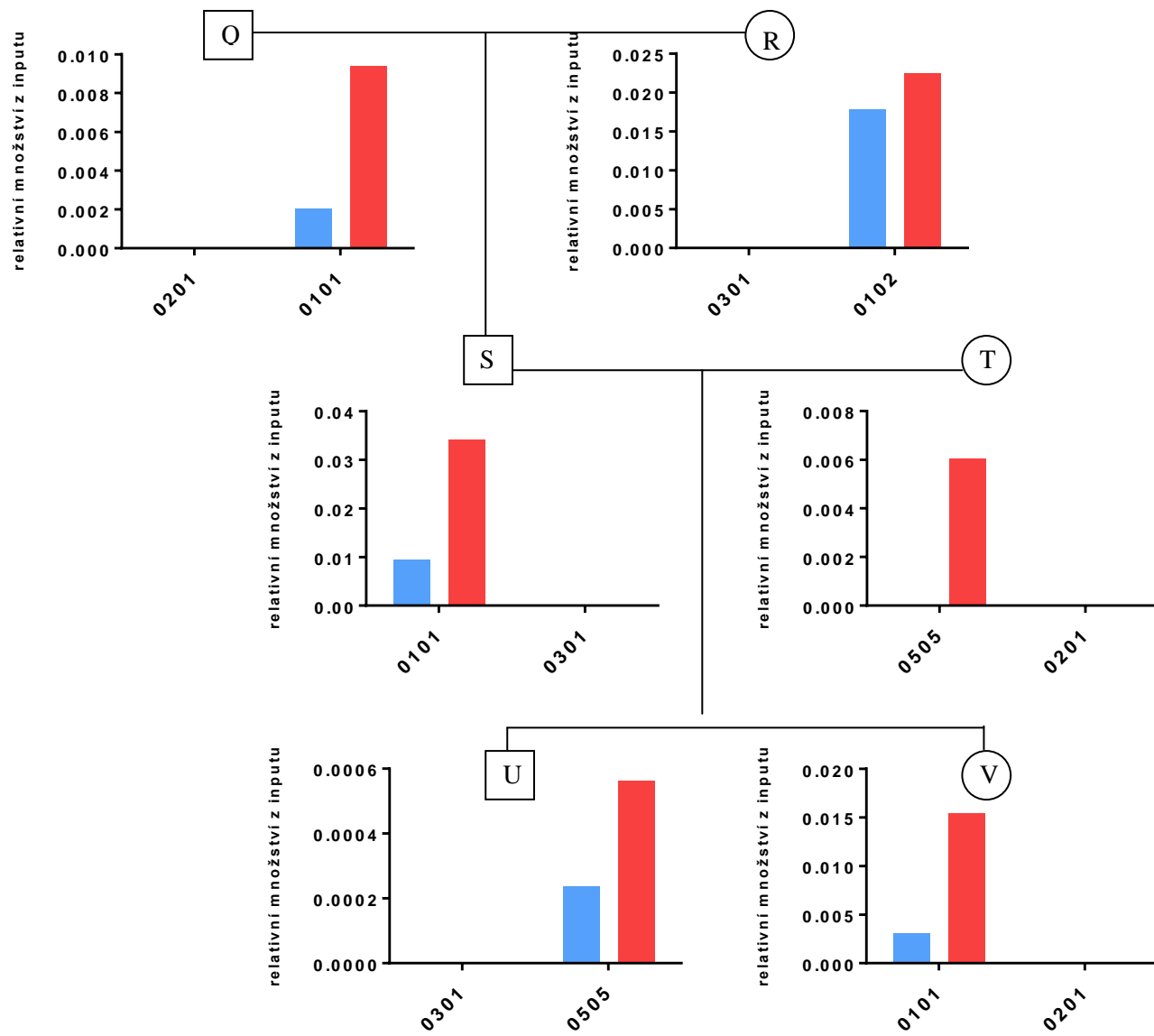
Pro chybovost měření nejsou některé alely vyhodnoceny. Zároveň bylo nemožné v některých rodových liniích určit přesný paternální či maternální původ alely. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli jednotlivé modifikace statisticky nevyhodnocovat v rámci pokrevní příbuznosti. Schémata rodokmenů s doplněnými údaji, tak představují pouze popisnou charakteristiku epigenetických modifikací pro dané rodiny.



Obrázek 11. Rodokmen rodiny 1 s hodnotami metylace a acetylace obou alel genu HLA DQA1.

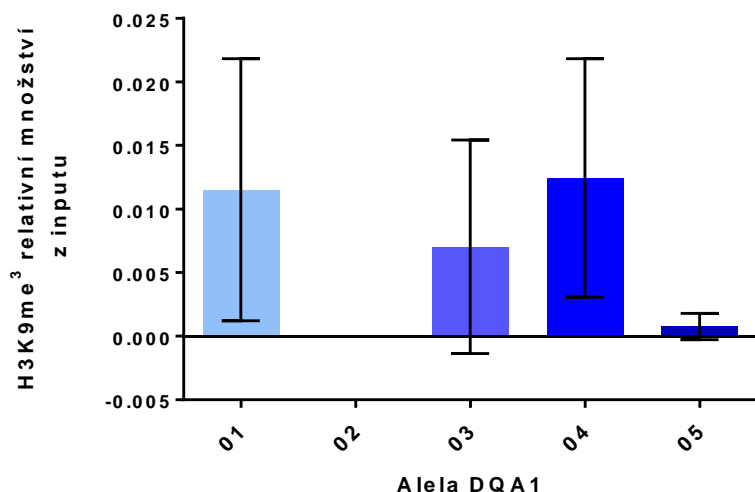


Obrázek 12. Rodokmen rodiny 2 s hodnotami metylace a acetylce obou alel genu HLA DQA1.

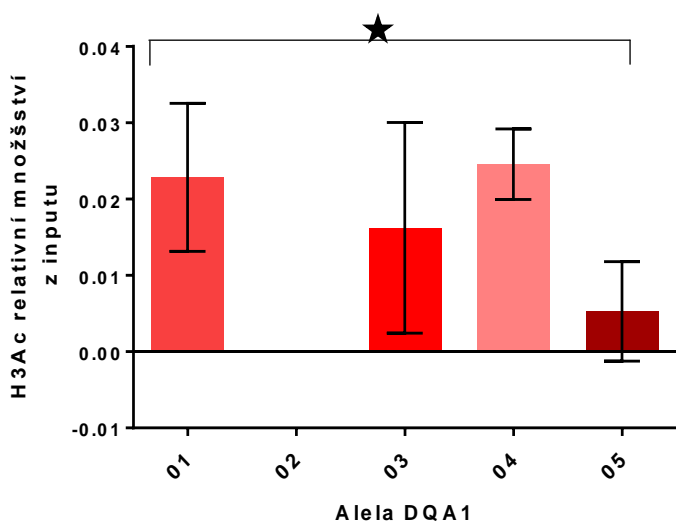


Obrázek 13. Rodokmen rodiny 3 s hodnotami metylace a acetylace obou alel genu HLA DQA1

Dále jsme pro každou alelu určili hodnotu její relativní metylace (Graf 1) a acetylace (Graf 2) v porovnání s inputem. Alely byly mezi sebou srovnány pomocí Mann-Whitneyho testu s hladinou významnosti $p < 0,05$. Statisticky významné rozdíly byly podrobeny Bonferroniho korekci (p hodnota byla násobena číslem 4). Po této korekci vyšly rozdíly se statistickou signifikancí pro acetylaci a to mezi alelami *01 a *05 ($p_{kor} = 0,0012$). Rozdíly mezi dalšími alelami navzájem byly statisticky neprůkazné. Stejný výsledek neprůkaznosti platí i pro H3K9me³.

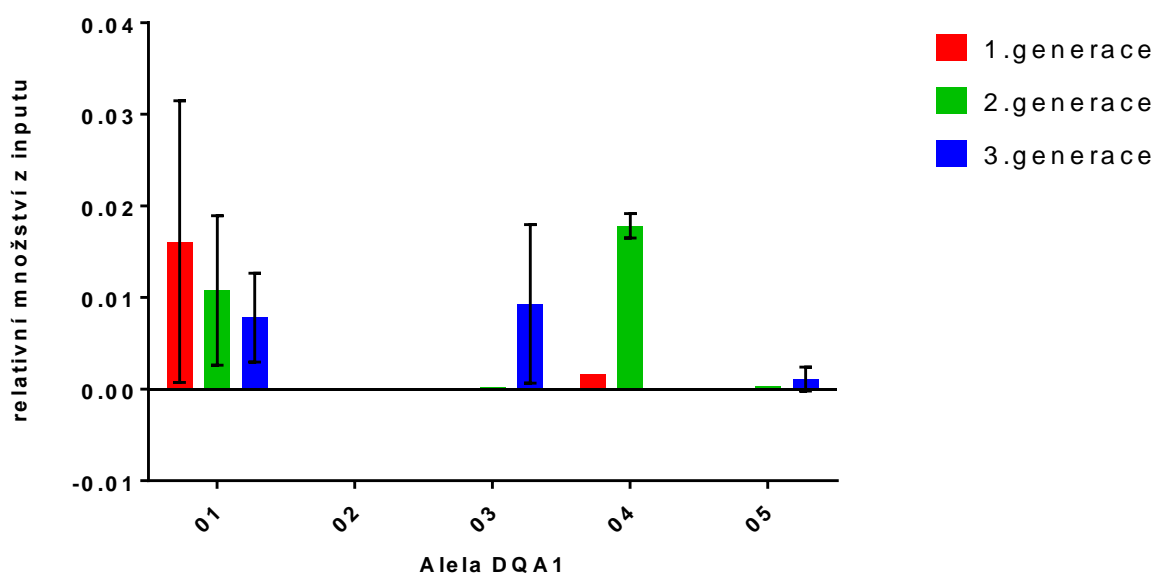


Graf 1. Relativní míra trimetylace lysinu 9 histonu H3 pro jednotlivé alely genu HLA DQA1.

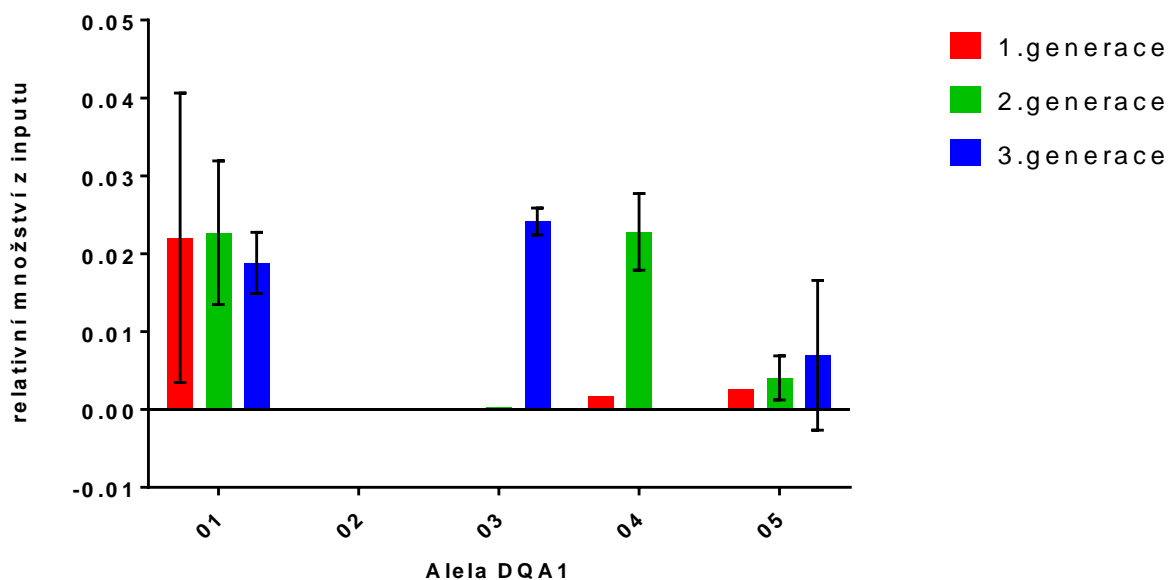


Graf 2. Relativní míra acetylace histonu H3 pro jednotlivé alely genu HLA DQA1. Jako statisticky významné se jeví rozdíly mezi alelami *01 a *05 ($p_{kor} = 0,0012$).

Pro nemožnost statisticky vyhodnotit modifikace v rámci pokrevní příbuznosti z rodokmenů jsme se rozhodli pro porovnání stavu metylace a acetylce mezi jednotlivými generacemi. První generace (věk 67- 81 let), druhá generace (věk 40- 52 let) a třetí generace (věk 17- 26 let) byly mezi sebou srovnány pro jednotlivé alely genu *HLA DQA1* v rámci metylace (Graf 3) a acetylce (Graf 4). Z porovnávaných údajů je nejlépe patrný trend zvyšování hladin metylace u alely *01 s rostoucím věkem a pro stejnou alelu relativně neměnná míra acetylce. Naproti tomu u alely *05 je s rostoucím věkem patrný trend snižování hladiny celkové acetylce histonu H3. Jednotlivé generace byly pro každou alelu v rámci metylace i acetylce srovnány pomocí Mann-Whitneyho testu a dané p hodnoty byly upraveny Bonferroniho korekcí. Ovšem žádné srovnání nedosáhlo statistické významnosti. Rozdíly v metylaci a acetylaci hitonu H3 mezi generacemi jsou tedy statisticky neprůkazné.



Graf 3. Porovnání trimethylace H3K9 mezi jednotlivými generacemi pro jednotlivé alely genu *HLA DQA1*.



Graf 4. Porovnání acetylace histonu H3 mezi jednotlivými generacemi pro jednotlivé alely genu HLA DQA1.

6.3 Analýza metylace DNA

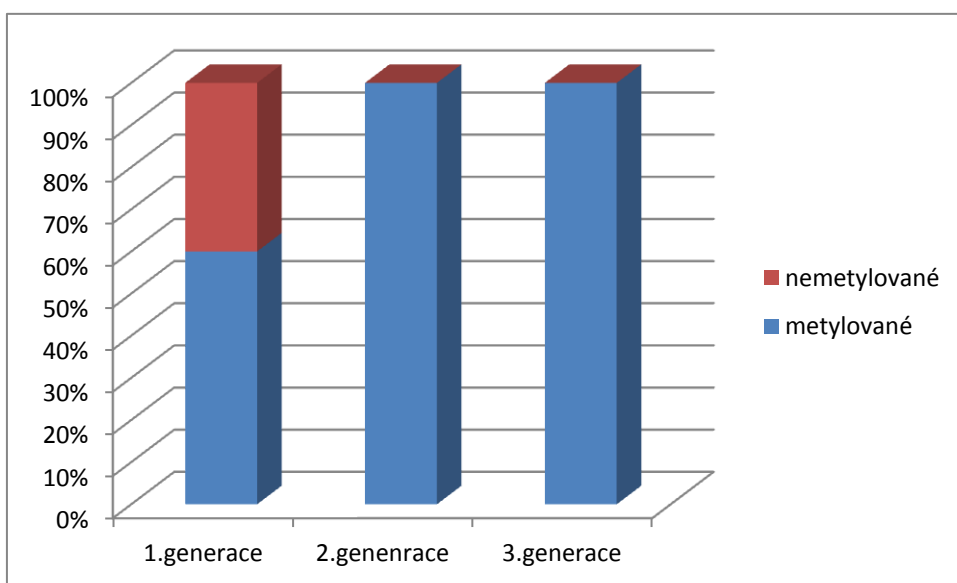
K analýze bylo použito 104 sekvencí všech 22 dárců krve. Celkově bylo sekvenováno 113 vzorků, ovšem 9 sekvencí bylo vyřazeno z důvodu malé účinnosti bisulfitové konverze (pod 95 %). Analyzovaná sekvence byla dlouhá 545 bp mezi pozicemi -670 až -126 od start kodonu. Alely byly rozlišeny na základě sekvenačních dat dle polymorfizmů v pozicích -562 až -191.

Rozdíly v celkové metylaci alel genu *DQA1* byly určeny porovnáním počtu všech metylovaných míst použitím Mann-Whitneyho neparametrického testu s hladinou významnosti $p < 0,05$. Porovnané hodnoty byly opět upraveny Bonferroniho korekcí (násobeno počtem porovnávaných alel). Porovnány byly pouze alely *01, *03 a *05. Z tohoto porovnání byla nejvíce metylována alela *01 vůči alele *03 ($p_{kor} = 0,0003$) a vůči alele *05 ($p_{kor} = 0,0066$). Rozdíl v hladině metylace mezi alelami *03 a *05 byl $p_{kor} = 0,1119$. Rozdíl metylace *03 a *05 tedy není statisticky průkazný.

Metylace alel byla rovněž promítnuta na pozadí generačních rozdílů. V tomto případě byla vyhodnocena pouze alela *01, protože výsledky metylace dalších alel nebyly zastoupeny u všech generací. Generační rozdíl v metylaci alely *01 byl za statistického hlediska nejvýznamnější mezi 1. a 3. generací, kde 3. generace vykazuje vyšší stupeň

metylace. Statistická signifikance tohoto rozdílu činí $p_{kor} = 0,0030$. V průběhu generací tedy můžeme sledovat pokles metylace alely *01 genu *DQA1*.

V rámci srovnávání míry metylace jednotlivých alel na pozadí generačních rozdílů bylo zpracováno i hodnocení míry metylace jednotlivých CpG míst. K porovnání byl použit Fischerův exaktní test s hladinou významnosti $p < 0,05$. Výsledky byly opět upraveny Bonferroniho korekcí. V tomto porovnání se nejvíce lišily CpG dinukleotidy v pozici -454. Nejmenší míra metylace v této pozici byla zaznamenána u 1. generace vůči 2. i 3. generaci (Graf 5). Rozdíl mezi 1. a 2. generací byl statisticky významný, kde $p_{kor} = 0,0003$. Rozdíl mezi 2. a 3. generací byl statisticky neprůkazný, kde $p_{kor} = 0,9999$. Rozdíl mezi 1. a 3. generací byl určen na $p = 0,035$.



Graf 5. Procentuální vyjádření rozdílů míry metylace v pozici -454 CpG místa mezi jednotlivými generacemi.

6.4 Analýza exprese genů *DQA1* a *DQB1*

RNA izolovaná z leukocytů periferní krve dárců byla pomocí metody reverzní transkripce přepsána do cDNA a množství specifické mRNA bylo následně kvantifikováno pomocí real-time PCR. Všechny reakce byly připravovány pro tři nezávislé měření. Z každého vzorku byly získány hodnoty Ct (vyjadřují cyklus PCR, kdy fluorescence amplifikovaného templátu překročí bazální fluorescenci). Hodnoty Ct byly naměřeny pro každou alelu genu *DQA1*, *DQA1* total, *DQA1* intron, dále pro každou alelu genu *DQB1*,

DQA1 total, *DQB1* intron a pro gen *DRA* a *PPIA*. Výpočet relativní exprese se prováděl dle vzorce:

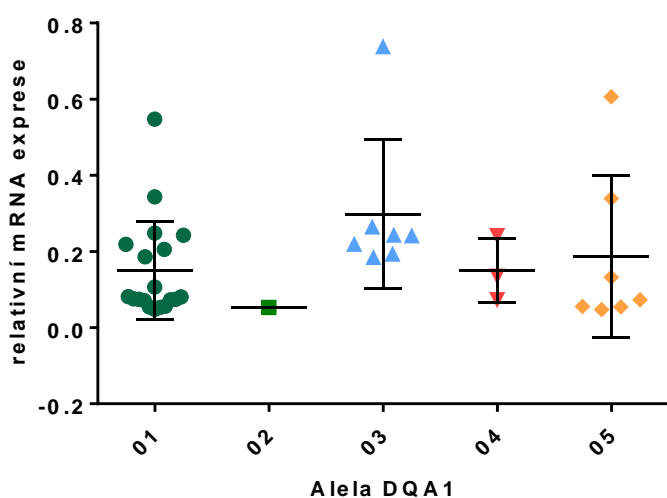
$$\frac{n_{DQA1}}{n_{DRA}} = \frac{(1 + U_{DRA})^{Ct}}{(1 + U_t)^{Ct_{DRA}}}$$

Písmeno n značí množství genu, který vstupuje do real-time PCR reakce a U označuje účinnost, která byla pro jednotlivé alely zjišťována pomocí hodnot získaných od homozygotů. Účinnost celkové amplifikace genů *DQA1*, *DQB1* a genu *DRA* byly považovány za rovny 1. Součet relativní exprese jednotlivých alel obou genů byl následně porovnán s hodnotami relativní exprese celkové *DQA1* (total) a *DQB1* (total) ve vzorku. Pokud se tyto dvě hodnoty lišily o více než 15 %, byl vzorek ze statistického souboru vyřazen. Kontrolní poměr byl vypočten pomocí vzorce:

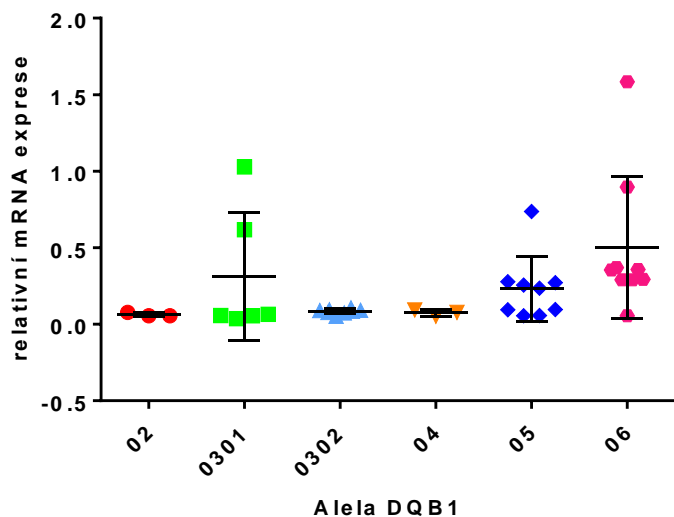
$$\frac{\sum n_{DQA1t}}{n_{DQA1t}} = \frac{2^{Ct_{DQA1t}}}{(1+U_1)^{DQA1t}} + \frac{2^{Ct_{DQA1t}}}{(1+U_2)^{DQA1t}}$$

DQA1t značí *DQA1* total.

Rozdíly v expresi mezi jednotlivými alelami byly vyhodnoceny Mann-Whitneyho teste s mírou významnosti $p < 0,05$ a statisticky významné rozdíly byly upraveny Bonferroniho korekcí (hodnota p byla násobena počtem vyhodnocených alel). V rámci rozdílů mezi alelami genu *DQA1* nebyl po korekci nalezen žádný statisticky významný rozdíl. Rovněž i u genu *DQB1* nebyl nalezen žádný rozdíl. Proto tyto výsledky hodnotíme jako statisticky neprůkazné. Hodnoty míry exprese mRNA jsou vyznačeny v grafu 6 a 7. Exprese jednotlivých alel genů *DQA1* a *DQB1* byly vztaženy k expresi genu *DRA*.

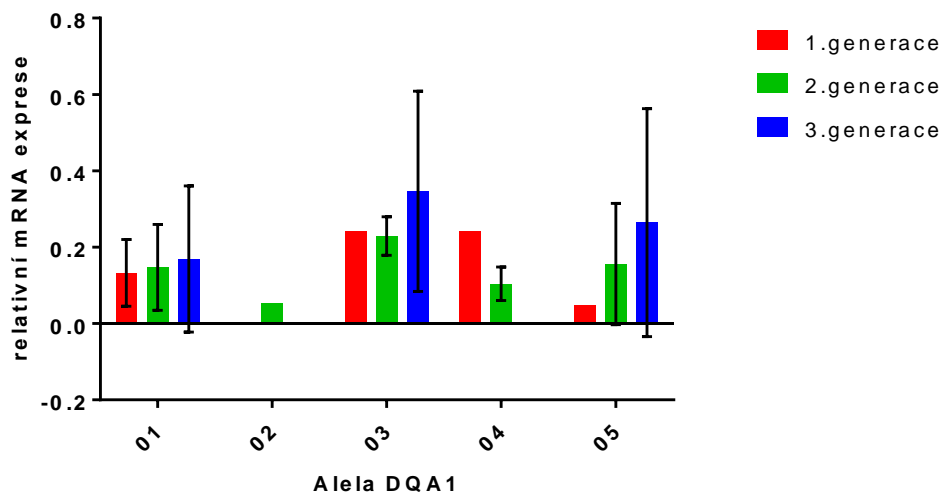


Graf 6. Porovnání úrovně exprese mRNA jednotlivých alel genu *DQA1*.

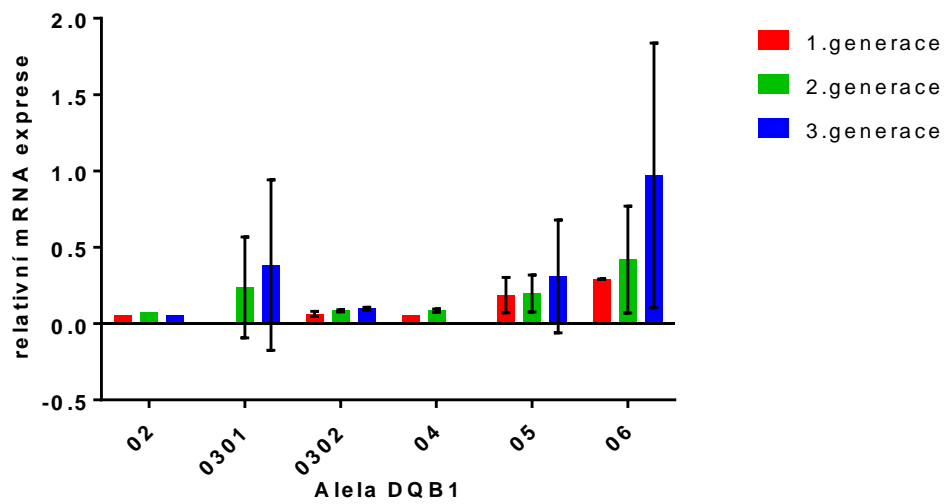


Graf 7. Porovnání úrovně exprese mRNA jednotlivých alel genu DQB1.

Dále byly porovnány relativní úrovně exprese mRNA obou genů mezi generacemi (Graf 8 a 9). Hodnoty byly opět porovnány Mann-Whitneyho testem a upraveny korekcí. Rozdíly mezi generacemi jsou bez statistické signifikance.



Graf 8. Průměrná relativní míra exprese mRNA alel genu DQA1 v rámci jednotlivých generací.



Graf 9. Průměrná relativní míra exprese mRNA alel genu DQB1 v rámci jednotlivých generací.

6.5 Korelace epigenetických modifikací a míry exprese

Jednotlivé epigenetické modifikace byly mezi sebou navzájem korelovány. K této úpravě byla použita Spearmanova neparametrická korelace s hladinou významnosti $p < 0,05$. Výsledky byly opět upraveny Bonferroniho korekcí. Statisticky nejvýznamnější korelace byla prokázána mezi trimetylací H3K9 a acetylací H3 u alely *01, kde hodnota p po korekci byla $p_{kor} = 0,0388$ (Tab. 15).

	01Ac	02Ac	03Ac	04Ac	05Ac
01me ³	0,0097				
02me ³					
03me ³			> 0,9999		
04me ³				> 0,9999	
05me ³					0,3500

Tabulka 15. Korelace mezi trimetylací a acetylací histonu H3 pro jednotlivé alely. Hodnoty v tabulce jsou uvedeny bez korekce.

Stejným postupem byla rovněž korelována míra exprese jednotlivých alel vůči trimetylaci a acetylaci. Výsledky ovšem neposkytly statisticky průkazné korelace (Tab. 16 a Tab. 17).

	mRNA 01	mRNA 02	mRNA 03	mRNA 04	mRNA 05
01me ³	0,2247				
02me ³					
03me ³			0,7500		
04me ³				> 0,9999	
05me ³					0,5167

Tabulka 16. Korelace mezi trimetylací histonu H3 a mírou exprese pro jednotlivé alely. Hodnoty v tabulce jsou uvedeny bez korekce.

	mRNA 01	mRNA 02	mRNA 03	mRNA 04	mRNA 05
01Ac	0,1560				
02Ac					
03Ac			0,3333		
04Ac				0,3333	
05Ac					0,6583

Tabulka 17. Korelace mezi acetylací histonu H3 a mírou exprese pro jednotlivé alely. Hodnoty v tabulce jsou uvedeny bez korekce.

Z celkového hlediska modifikací byly rovněž provedeny korelace metylace DNA vůči trimetylaci a acetylaci histonů a vůči míře exprese jednotlivých alel. Ani v tomto případě Spearmanova neparametrická korelace neposkytla statistickou průkaznost (Tab. 18).

	01me ³	01Ac	mRNA 01	03me ³	03Ac	mRNA 03	05me ³	05Ac	mRNA 05
met 01	0,7007	0,4803	0,4922						
met 03				> 0,999	> 0,999	0,3810			
met 05							> 0,999	> 0,999	> 0,999

Tabulka 18. Korelace mezi jednotlivými epigenetickými modifikacemi a mírou exprese pro jednotlivé alely. Hodnoty v tabulce jsou uvedeny bez korekce.

7 DISKUZE

Jak již bylo několikrát v literárním přehledu řečeno, geny ze skupiny HLA jsou úzce spojeny s regulací imunitní odpovědi. Rovněž bylo prokázáno, že některé alely genů z této skupiny určují predispozice k některým autoimunitním chorobám. Příkladem takovéto autoimunity je onemocnění *diabetes mellitus* 1. typu (T1DM). Charakteristickým predispozičním haplotypem v případě T1DM je *HLA DRB1 *04 - DQA1 *0301 - DQB1 *0302*, kde produkt těchto genů je patrně nestabilní dimer, který s nižší účinností prezentuje antigeny. Předpokládá se, že tato nízká účinnost vede k výraznému ovlivnění negativní selekce autoreaktivních T-lymfocytů v thymu, což může způsobit autoimunitní reakci (Ettinger et al. 1998). Ovšem rozvoj T1DM nemá čistě genetické pozadí. Hodnoty diskordance výskytu T1DM u monozygotických dvojčat jsou v rozmezí 13-68%, což svědčí o poměrně silném negenetickém vlivu (Huber et al. 2008). Mnoho epidemiologických studií předpokládá, že negenetický faktor, který stojí za rozvojem různých autoimunitních onemocnění, souvisí s nepříznivými podmínkami během časného vývoje embrya. Tyto teze tak cílí na příčinu v epigenetické deregulaci. Práce, které byly částečnou předlohou této diplomové práce, popisovaly epigenetické profily různých genů u souboru pacientů, kteří byli v průběhu svého prenatálního vývoje vystaveni hladomoru v Holandsku v zimě roku 1944-1945. Příkladem je studie metylace genu *IGF2*, kde byly srovnány metylační profily u pokrevně příbuzných stejného pohlaví. Jedinci, jejichž prenatální vývoj zasáhl hladomor, vykazovali výrazně nižší metylaci DNA v daném genu než jejich pokrevní příbuzní, které hladomor nepostihl (Heijmans et al. 2008). U jedinců, kteří byli takto postiženi hladomorem je zaznamenána zvýšená četnost výskytu například kardiovaskulárních chorob, *diabetes mellitus* 2 typu či rakoviny prsu (Painter et al. 2006). Rovněž bylo prokázáno, že tyto efekty se vyskytují i u jedinců následující generace (Veenendaal et al. 2013). Studie tohoto typu tak poskytly ústřední myšlenku diplomové práci k popisu epigenetických regulací HLA genů v rámci rodinné příbuznosti napříč třemi generacemi. Protože tato práce je součástí rozsáhlejšího výzkumu, je metodika provedení omezena pouze na zdravé jedince, respektive rodiny. Všechny 22 dárců krve ze tří rodin nevykazuje žádné autoimunitní onemocnění ani jiné závažné choroby. Z tohoto důvodu nesrovnáváme v této práci údaje mezi patologickým a normálním stavem, ale věnujeme se pouze popisné charakteristice. Srovnávací studie je součástí dalšího výzkumu, kde budou porovnávány stejné parametry pro gen *DQA1* ovšem u rodin s výskytem T1DM.

Základním pilířem bylo zmapování histonových modifikací (metylace a acetylace) histonu H3. Údaje získané z analýzy chromatinovou imunoprecipitací jsme zanesli do

rodokmenů a jejich vyhodnocením jsme se pokusili zjistit, zda je možné sledovat specifické dědičné vzory epigenetické informace. Protože se jednalo o jedince relativně zdravé, žádné výrazné epigenetické deregulace jsme neočekávali. Tato teze byla potvrzena analýzou rodokmenů. Žádný přenos epigenetické informace v genu *DQAI* mezi generacemi zdravých jedinců patrně souvisí s vysokou precizností vymazání epigenomu během reprogramování tak, jak jej popisuje Lee et al. (2014) a Kobayashi et al. (2012). Statistické srovnání rozdílů v modifikacích mezi pokrevně příbuznými jedinci jsme neprováděli, neboť nebylo možné u některých vzorků určit původ alely. Výsledky ovšem postačovaly jako celek, proto jsme se rozhodli provést srovnání modifikací v rámci generací. Nejlépe bylo možné sledovat změnu v míře trimetylace H3K9 u alely *01 genu *DQAI*, kde se zvyšujícím se věkem rostla i míra této modifikace. Toto zjištění je ovšem v přímém rozporu s výsledky, které získali Fraga a Esteller (2007) a Han a Brunet (2012). Výsledky jejich výzkumů popisují pokles H3K9me³ s rostoucím věkem. Tento rozpor vysvětlujeme velmi malým souborem vzorků, které jsme analyzovali. Zároveň byla analýza histonových modifikací prováděna na DNA izolované z periferní krve. Je tedy vysoce pravděpodobné, že směs různých typů buněk v analyzované krvi značně zkresluje výsledky.

Analýzou metylace DNA vztaženou na rozdíly mezi generacemi se nám podařilo prokázat, že se zvyšujícím se věkem, klesá míra metylace CpG míst. Tento trend klesání metylace byl nejlépe patrný u alely *01, kde rozdíly mezi první a třetí generací dosahovaly statisticky významných rozdílů. Stejně výsledky hypometylce u jedinců vysokého věku popisují Heyn et al. (2012) na úrovni celého genomu.

Výsledky analýzy míry exprese mRNA genu *DQAI* nám neposkytly statisticky významné rozdíly. Ovšem podle studie Britten et al. (2009) bylo možné pozorovat značné rozdíly v míře exprese jednotlivých alel. Britten et al. popisují dvojnásobně až čtyřnásobně vyšší expresi alely *03 oproti alelám *05 a *01. Z tohoto hlediska jsou výsledky exprese v našem výzkumu statisticky neprůkazné. Exprese mRNA genu *DQBI* srovnaná mezi jednotlivými alelami poskytuje stejnou statistickou neprůkaznost.

Nesrovnalosti v expresi, míře metylace a histonových modifikací v této studii vysvětlujeme zejména malým počtem zkoumaných jedinců a použitím vzorků, získaných z periferní krve, tj. vzorků ze směsi více buněčných typů.

8 ZÁVĚR

V této práci jsme se rozhodli zmapovat epigenetickou informaci genů HLA II. třídy v rámci příbuzenských vztahů. Konkrétně se jedná o gen *HLA DQA1*. Soubor zpracovaných vzorků čítá 22 jedinců ze tří rodin. Ve všech případech se jedná o jedince bez závažných onemocnění s relativně dobrým zdravotním stavem. Soubor zkoumaných vzorků tak představuje zdravé kontroly, k jejímž výsledkům budou v další fázi výzkumu srovnávány data získaná na pacientech s *diabetes mellitus* 1. typu. Po zpracování a analýze výsledků jsem dospěl k těmto závěrům:

- 1) Porovnání míry acetylce histonu H3 v regulační oblasti genu *HLA DQA1* prokázalo statisticky významný rozdíl mezi alelami *01 a *05, kde je více acetylována byla alela *01.
- 2) Porovnání míry trimetylce H3K9 v regulační oblasti genu *HLA DQA1* neprokázalo statisticky významný rozdíl mezi zkoumanými alelami.
- 3) Srovnání trimetylce a acetylce histonu H3 v regulační oblasti genu *HLA DQA1* mezi generacemi neprokázalo statisticky významné rozdíly.
- 4) Analýza metylace DNA v regulační oblasti genu *HLA DQA1* prokázala statisticky významné rozdíly v míře metylace mezi alelami *01, *03 a *05. Nejvíce metylována byla alela *01.
- 5) Srovnání metylace DNA v regulační oblasti genu *HLA DQA1* mezi generacemi u alely *01 prokázalo statisticky významný rozdíl mezi 1. a 3. generací. První generace byla méně metylována v dané alele.
- 6) Srovnání metylace jednotlivých CpG míst potvrdilo statisticky významné rozdíly v pozici -454. V této pozici byla 1. generace méně metylována než 2. a 3. generace.
- 7) Srovnání míry exprese mezi alelami genu *HLA DQA1* neposkytlo statisticky významné rozdíly. Stejný závěr platí i pro alely genu *HLA DQB1*.
- 8) Byla prokázána korelace mezi acetylací a trimetylací histonu H3 pro alelu *01 genu *HLA DQA1*.
- 9) Nebyla prokázána korelace mezi mírou exprese a histonovými modifikacemi a metylací DNA pro alely genu *HLA DQA1*.

Rozšíření souboru dárců krve by mohlo zpřesnit tento výzkum. Zpřesnění dat by mohlo být dosaženo výzkumem daných modifikací pouze na určitých buněčných typech, tj. CD14 (monocytech) a CD19 (B-lymfocytech). Srovnání výsledků získaných z těchto zdravých

kontrol s výsledky získaných u pacientů s *diabetes mellitus 1.* typu by mohlo poskytnout lepší představu o negenetických vlivech na rozvoj této choroby.

9 SEZNAM LITERATURY

Aasland, R., Stewart, A. F. (1995). The chom shadow domain, a second chromo domain in hererochromatin- binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Research*, 23: 3168-3173

Allfrey, V., Faulkner, R. M., Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 51: 786-794

Ancelin, K., et al. (2006). Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nat Cell Biol.*, 8:623–30.

Ballestar, E., Wolffe, A. P. (2001). Methyl-CpG-Binding proteins. *European Journal of Biochemistry*, 268: 1-6

Bannister, A. J., Schneider, R., Kouzarides, T. (2002). Histone methylation: dynamic or static. *Cell*, 109:801–6.

Baubec, T., Ivánek, R., Lienert, F., Schubeler, D. (2013). Methylation-dependent and independent genomic targeting principles of the MBD protein family. *Cell*, 153: 480-492

Benoist., C., Mathis, D. (1990). Regulation of major histocompatibility complex class-II genes: X, Y and other lettes of the alphabet. *Annu. Rev. Immunol.*, 8: 681-715

Berndesn, C. E., Denu, J. M. (2008). Catalysis and substrate selection by histone/protein lysine acetyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 18: 682-689

Bird, A. P. (1980). DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acid Res*, 8: 1499-1504

Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O. J., Macleod, D. (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG -rich DNA. *Cell*, 40: 91-99

Black, J. C., Van Rechem, C., Whetstine, J. R. (2012). Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact. *Molecular Cell*, 48: 491-507

Britten, A. C., Mijovic, C. H., Barnett, A. H., Kelly, M. A. (2009). Differential expression of HLA-DQ alleles in peripheral blood mononuclear. *International Journal of Immunogenetics*, 47-57

- Brown, A. M., Wright, K. L., Ting, J. P. Y. (1993). Human major histocompatibility complex class II-associated invariant chain gene promoter. Functional analysis and in vivo protein/DNA interactions of constitutive and IFN-gamma-induced expression. *J. Biol. Chem.*, 268: 26328-26333
- Cao, R., Tsukada, Y., Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring 1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol. Cell*, 20: 845-854
- Celeste, A., Difilippantonio, S., Difilippantonio, M. J., et al. (2003). H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell*, 114: 371-383
- Collins, T., Korman, A. J., Wake, C. T., Boss, J. M., Kappes, D. J., Fiers, W., Ault, K. A., Gimbrone, M. A., Strominger, J. L., Pober, J. S. (1984). Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cell and dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 4917-4921
- Cosgrove, M. S., Wolberger, C. (2005). How does the histone code work? *Biochem. Cell Biol.*, 83: 468-476
- Cosgrove, M. S., Wolberger, C. (2005). How does the histone code work? *Biochem. Cell Biol.*, 83: 468-476
- Daxinger, L., Whitelaw, E. (2012). Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nat. Rev. Genet.*, 13: 153–162.
- Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C., Cheng, X. (2005). The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol.*, 6: 227
- Dou, Y., Milne, T. A., Ruthenburg, A. J., Lee, S., Lee, J. W., Verdine, G. L., Allis, C. D., Roeder, R. G. (2006). Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13: 713-719
- Duhl, D., Vrieling, H., Miller, K. A., Wolff, G. L., Barsh, G. S. (1994). Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice. *Nat Genet.*, 8:59–65.
- Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A., Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*, 10: 2709-2721.

- Epada, J., Ballestar, E., Fraga, M. F., Villar-Garea, A., Juarranz, A., Stockert, J. C., Robertson, K. D., Fuks, F., Esteller, M. (2004). Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern. *J. Biol. Chem.*, 279: 37175-37184
- Esteve, P. O., Chin, H. G., Smallwood, A., Feehery, G. R., Gangisetty, O., Karpf, A. R., Carey, M. F., Pradhan, S. (2006). Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes. Dev.*, 20: 3089-3103
- Ettinger, R. A., Liu, A. W., Nepom, G. T., Kwok, W. W. (1998). Exceptional Stability of the HLA-*DQA1* *0102/*DQB1* *0602 alpha beta protein dimer, the class II MHC molecule associated with protection from insulin-dependent *diabetes mellitus*. *J. Immunol*, 161: 6439-6445.
- Feil, R., Fraga, M.F. (2012). Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Review Genetics* 13: 97-109
- Ferguson-Smith, A. C., Patti, M. E. (2011). You are what your dad ate. *Cell Metab.*, 13: 115–117.
- Fillion, G. J., et al, (2006). A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Molecular Cell Biology*, 26: 169-181.
- Fischle, W., Tseng, B. S., et al. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, 438: 1116-1122
- Ficz, G., et al. (2009). The Epigenomic landscape of reprogramming in mammals. *Epigenomics*, ISBN: 1007/978-1-4020-9187-2-5. str. 259-282
- Fuks, F., Hurd, P. J., Deplus, R., Kouzarides, T. (2003). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, 31: 2305-2312
- Fraga, M. F., Esteller, M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet*, 23: 413-418
- Greally, J. M. (2009). The expanding view of cytosine methylation. *Epigenomics*, ISBN:1007/978-1-4020-9187-2-5. str:67-83

- Haberland, M., Montgomery, R. L., Olson, E. N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.*, 10: 32-42
- Hajkova, P., Ancelin, K., Waldmann, T., Lacoste, N., Lange, U. C., et al. (2008). Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature*, 452: 877-881
- Han, S., Brunet, A. (2012). Histone methylation makes its mark on longevity. *Trends Cell Biol*, 22: 42-49
- Hassan, A. H., Neely, K. E., Workman, J. L. (2001). Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell*, 104: 817-827
- Hawkins, P. G., Santoso, S., Adams, C., Anest, V., Morris, K. V. (2009). Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells. *Nucleic Acids Res.*, 37: 2984-2995
- Heard, E., Martienssen, R. A. (2014). Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. *Cell*, 157: 95-109
- Hebbes, T. R., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.*, 7: 1395-1402
- Heijmans, T. B., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., Slagboom, P. E., Lumey, L. H. (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *PNAS*, 105: 17046-17049
- Helm, M. (2006). Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic Acids Research*, 34: 721-733
- Hendrich, B., Bird, A. (1998). Identification and characterization of family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell Biol.*, 18:6538-6547
- Henikoff, S., Furuyama, T., Ahmad, K. (2004). Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends Genet.*, 20:320–326.
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67: 425-479

- Hershko, A., Heler, H., Elias, S., Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system-resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 8206-8214
- Heyn, H., Li, N., Ferreira, H. J., Moran, S., Pisano, D. G., Gomez, A., Diez, J., Sanchez-Mut, J. V., et al. (2012). Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109: 10522-10527
- Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, 458: 422-429
- Hong, L., Schroth, G. P., Matthews, H. R., Yau, P., Bradbury, E. M. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 tail to DNA. *J. Biol. Chem.*, 268: 305-314
- Huber, A., Menconi, F., Corathers, S., Jacobson, E. M., Tomer, Y. (2008). Joint genetic susceptibility to type 1 diabetes and autoimmune thyroiditis: from epidemiology to mechanisms. *Endocr Rev*, 29: 697-725
- Chen, H. Y., Sun, J. M., Zhang, Y., Davie, J. R., Meistrich, M. L. (1998). Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J. Biol. Chem.*, 273: 13165-13169
- Chen, T., et al. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentrix heterochromatin. *Current Biology*, 13: 1192-1200
- Cheng, X., Blumenthal R.M. (2009). Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 16: 341-350
- Cheung, P., Tanner, K. G., Cheung, W. L., et al. (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol. Cell*, 5: 905-915
- Jenuwein, T. (2006). The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS Journal*, 273: 3121-3135
- Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu. Rev. Biochem.*, 73: 355-382

- Jones, J. M., Bhattacharyya, A., Simkus, C., Vallieres, B., Veenstra, T. D., Zhou, M. (2011). The RAG1 V(D)J recombinase/ubiquitin ligase promotes ubiquitilation of acetylated, phosphorylated histone 3.3. *Immunol. Lett.*, 136: 156-162
- Jones, Y. E., Fugger, L., Strominger, J. L., Siebold, C. (2006). MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nat. Rev. Immunol.*, 6: 271-282
- Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., Saitou M. (2013). Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *EMBO J.*, 32: 340–353
- Kay, P.H., Pereira, E., Marlow, S.A., Turbett, G., Mitchell, C.A., Jacobsen, P.F., Holliday, R., Papadimitrou, J.M. (1994). Evidence for adenine methylation within the mouse myogenic gene Myo-D1. *Gene*, 30: 89-95
- Kent, S. C., et al. (2005). Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature*, 435: 224-228
- Kerscher, O. (2007). SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep.*, 8: 550-555
- Khavari, P. A., Peterson, C. L., et al. (1993). BRG1 contains a conserved domain of the SWI2/SNF2 family necessary for normal mitotic growth and transcription. *Nature*, 366: 170-174
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J., Cheng, X. (1994). HhaI Methyltransferase Flips Its Target Base Out of the DNA Helix. *Cell*, 76: 357-369,
- Kobayashi, H., Sakurai, T., Imai, M., Takahashi, N., Fukuda, A., Yayoi, O., Sato, S., Nakabayashi, K., Hata, K., Sotomaru, Y., et al. (2012). Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks *PLoS Genet.*, 8, p. e1002440
- Kohli, R. M., Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502: 472-479
- Koonin, E. V., Zhou, S., Lucchesi, J. C. (1995). The chromo superfamily: new members, duplication of the chromo domain and possible role in delivering transcription regulators to chromatin. *Nucleic Acids Research*, 23: 4229-4233

- Kouzarides, T. (2009). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693-705
- Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Shigeta, M., Yamanaka, K., Saitou, M. (2008). Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice *Genes Dev.*, 22: 1617–1635
- Law, J. A., Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genetics*, 11: 204-220
- Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D., Wolffe, A. P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, 72: 73-84
- Lee, H. J., Hore, T. A., Reik, W. (2014). Reprogramming the Methylome: Erasing Memory and Creating Diversity. *Cell Stem Cell*, 14: 710-719
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A. A., Braunschweig, U., Perezburgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., Peters, A. H. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr. Biol.*, 13: 1192-1200
- LeibundGut-Landman, S., Waldburger, J.M., Krawczyk, M., Otten, L. A., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H., Reith, W. (2004). Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur. J. Immunol.*, 34: 1513-1525
- Li, L. C. (2014). Chromatin remodeling by small RNA machinery in mammalian cells. *Epigenetics*, 9: 45-52
- Li, M., et al. (2011). Widespread RNA and DNA sequence differences in the human transcriptome. *Science*, 333: 53-58
- Lieberman, G. E., et al. (2015). DNA Methylation on N6-Adenine in *C. elegans*. *Cell*, 161: 868-878,
- Lim, J. P., Brunet, A. (2013). Bridging the transgenerational gap with epigenetic memory. *Trends Genet.*, 29: 176–186.
- Lombardi, P. M., Cole, K. E., Dowling, D. P., Christianson, D. W. (2011). Structure, mechanism, and inhibition of histone deacetylases and related metalloenzymes. *Current Opinion in Structural Biology*, 21: 735-743

- Macdonald, N., Welbrun, J. P., Noble, M. E., Nguyen, A., et al. (2005). Molecular basis for recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone H3 by 14-3-3. *Mol. Cell*, 20: 199-211
- Maenaka, K., Jones, E. Y. (1999). MHC superfamily structure and the immune system. *Current Opinion in Structural Biology*, 9: 745-753
- Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E., Reith, W. (1996). Regulation of MHC Class II genes: Lessons from a Disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 14: 301-331
- Minsky, N., Shema, E., Field, Y., Schuster, M., Segal, E., Oren, M. (2008). Monoubiquitinated H2B is associated with the transcribed region of highly expressed genes in human cells. *Nat. Cell Biol.*, 10: 483-488
- Mitetti, M. M., Walsh, E. C., Ke, X., Delgado, M., Griffiths M., Hunt, S. et al. (2005). A high resolution linkage-disequilibrium map of the human major histocompatibility complex and first generation of tag single-nucleotide polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.*, 76: 634-646
- Mondal, T., Rasmussen, M., Pandey, G. K., Isaksson, A., Kanduri, C., (2010). Characterization of the RNA content of chromatin. *Genome Res.*, 20: 899-907
- Morgan, D. H., Santos, F., Green, K., Dean, W., Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics*, 14: R47-R58
- Morgan, H., Sutherland, H., Martin, D., Whitelaw, E. (1999). Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet.*, 23:314–318.
- Nakada, S., Chen, G. I., Gingras, A. C., Durocher, D. (2008). PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO Rep.*, 9: 1019-1026
- Nakagawa, T., Kajitani, T., Togo, S., et al. (2008). Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes Dev.*, 22: 37-49
- Nakamura, T., Arai, Y., Umehara, H., Masuhara, M., Kimura, T., Taniguchi, H., Sekimoto, T., Ikawa, M., Yoneda, Y., Okabe, M., et al. (2007). PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis *Nat. Cell Biol.*, 9: 64–71

- Nakamura, T., et al. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol. Cell*, Vol. 10: 1119-1128
- Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Starner, D. E., Bylebyl, G. R., et al. (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes and Development*, 20: 966-976
- Neefjes, J., Jongsma, M. L. M., Paul, P., Bakke, O. (2011). Towards a system understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Immunol.*, 11: 823-836
- Neuwald, A. F., Landsman, D. (1997). GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trend in Biochemical Sciences*, 22: 154-155
- Norton, V. G., Imai, B. S., Yau, P., Bradbury, E. M. (1989). Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number charge. *Cell*, 57: 449-457
- Okashita, N., Kumaki, Y., Ebi, K., Nishi, M., Okamoto, Y., Nakayama, M., Hashimoto, S., Nakamura, T., Sugasawa, K., Kojima, N., et al. (2014). PRDM14 promotes active DNA demethylation through the ten-eleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells *Development*, 141: 269–280
- Ooi, S. K., O'Donnell, A. H., Bestor, T. H. (2009). Mammalian cytosine methylation at a glance. *J Cell Sci*, 122:2787-2791.
- Painter, R. C., de Rooij, S. R., Bossuyt, P. M., Osmond, C., Barker, D. J., Bleker, O. P., et al. (2006). A possible link between prenatal exposure to famine and breast cancer: a preliminary study. *Am J Hum Biol*, 18: 853-856
- Pan, S., Sehnke, P. C., Ferl, R. J., Gurley, W. B. (1999). Specific interactions with TBP and TFIIB in vitro suggest that 14-3-3 proteins may participate in the regulation of transcription when part of a DNA binding complex. *Plant Cell*, 11: 1591-1602
- Papamichos-Chronakis, M., Krebs, J. E., Peterson, C. L. (2006). Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. *Genes Dev.*, 20: 2437-2449

- Park, B., et al. (2006). Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. *Cell*, 127: 369-382
- Parry, L., Clarke, A. R. (2011). The roles of the Methyl-CpG Binding Proteins in Cancer. *Genes and Cancer*, 2: 618-630
- Payer, B., Lee, J. T. (2008). X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. *Annu. Rev. Genet.*, 42: 733-772
- Peters, A. H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R. J., Derijck, A. A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., et al. (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell*, 12: 1577-1589
- Pokholok, D. K., Robert, F., et al. (2004). Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome. *Mol. Cell*, 16: 199-209
- Rakyan, V. K., Blewitt, M. E., Druker, R., Preis, J. I., Whitelaw, E. (2002). Metastable epialleles in mammals. *Trends Genet.*, 18:348–351.
- Ratel, D., Ravanat, J., Berger, F., Wion, D. (2006). N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. *BioEssays*, 28: 316-324.
- Reith, W., LeibundGut-Landmann, S., Walburger, J. M. (2005). Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nature Rev. Immunol.*, 5: 793-806
- Ren, S., Kang, M. R., Wang, J., Huang, V., Place, R. F., Sun, Y., Li, L. C. (2013). Targeted induction of endogenous NKX3-1 by small activating RNA inhibits prostate tumor growth. *Prostate*, 73: 1591-1601
- Riggs, A. D., Martienssen, R. A., Russo, V. E. A. (1996). Introduction. In epigenetic mechanisms of gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. New York.
- Robinson, P. N., Bohme, U., Lopez, R., Mundlos, S., Nurnberg, P. (2004). Gene-Ontology analysis reveals association of tissue-specific 5' CpG-island genes with development and embryogenesis. *Human molecular Genetics*, 13: 1969-1978.
- Robzyk, K., Recht, J., Osley, M. A. (2000). Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*, 287: 501-504

- Rossetto, D., Avvakumov, N., Coté, J. (2012). Histone phosphorylation A chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*, 7: 1098-1108
- Sawicka, A., Seiser, Ch. (2014). Sensig core histone phosphorylation- A matter of perfect timing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839: 711-718
- Saxonov, S., Berg, P., Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci*, 103: 1412-1417
- Seki, Y., et al. (2007). Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development*, 34:2627–38.
- Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., Matsui Y. (2005). Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev. Biol.*, 278: 440–458
- Shanbhag, N. M., Rafalska-Metcalf, I. U., Balane-Bolivar, C., Janicki, S. M., Greenberg, R. A. (2010). ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell*, 141: 970-981
- Shi, Y., Whetstine, J. R. (2007). Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell*, 25: 1-14
- Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H., Kulski, J. K. (2009). The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *Journal of Human Genetics* 54: 15-39
- Shiio, Y., Eisenman, R. N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 100: 13225-13230
- Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., et al. (2004). Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr. Biol.*, 14: 1703-1711
- Schwabish, M. A. Struhl, K. (2007). The Swi/Snf complex is important for histone eviction during transcriptional activation and RNA polymerase II elongation in vivo. *Mol. Cell Biol.*, 27: 6987-6995

- Schwer, B., Verdin, E. (2008). Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell Metab.*, 7: 104-112
- Singal, R., Ginder, G. D. (1999). DNA methylation. *Blood*, 93: 4059-4070
- Smith, Z. D., et al. (2012). A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature*, 484: 339-344
- Smith, Z. D., Chan, M. M., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A., Meissner A. (2012). A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo *Nature*, 484: 339–344
- Surani, M. A., et al. (2004). Mechanism of mouse germ cell specification: a genetic program regulating epigenetic reprogramming. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 69:1–9.
- Takai, D., Jones, P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *PNAS*, 99: 3740-3745
- Tanner, K. G., Trievel, M. H., et al. (1999). Catalytic mechanism and function of invariant glutamic acid 173 from the histone acetyltransferase GCN5 transcriptional coactivator. *J. Biol. Chem.*, 274: 18157-18160
- Thomson, S., Clayton, A. L., Mahadevan, L. C. (2001). Independent dynamic regulation of histone phosphorylation and acetylation during immediate-early gene induction. *Mol. Cell*, 8: 1231-1241
- Ting, A. H., Schuebel, K. E., Herman, J. G., Baylin, S. B. (2005). Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation. *Nat. Genet.*, 37: 906-910
- Todd, J. A., Wicker, L. S. (2001). Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models. *Immunity*, 15: 387-395
- Torchia, J., Glass, C., Rosenfeld, M. G. (1998). Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10: 373-383

- Tsai, M. C., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J. K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., Chang, H. Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*, 329: 689-693
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M. E., Borchers, C. H., Tempst, P., Zhang, Y. (2006). Histone-demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, 439: 811-816
- Uhart, M., Bustos, D. M. (2013). Human 14-3-3 paralogs differences uncovered by cross-talk of phosphorylation and lysine acetylation. *Plos ONE*, 8: e55703
- Veenendaal, M. V. E., Painter, R. C., de Rooij, S. R., Bossuyt, P. M., van der Post, J. A. M., Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Roseboom, T. J. (2013). Transgenerational effects of prenatal exposure to the 1944-45 Dutch famine. *BJOG*, 120: 548-553
- Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Frega, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., et al. (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, 439: 871-874
- Wang, H., Zhai, L., Xu, J., et al. (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol. Cell*, 22: 383-394
- Watanabe, T., Tomizawa, S., Mitsuya, K., Totoki, Y., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Iida, N., Hoki, Y., Murphy, P. J., Toyoda, A., et al. (2011). Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus. *Science*, 332: 848-852
- Waterland, R. A., Jirtle, R. L. (2003). Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol.*, 23:5293–5300.
- Waterman, M. J., Stavridi, E. S., Waterman, J. L., Halazonetis, T. D. (1998). ATP-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat. Genet.*, 19: 175-178
- Wai, P., Foley, D.P. (2011). Transplant immunology: Basic immunology and clinical practice. *Scientific American Surgery* DOI 10.2310/7800.2210

- Wilson, R. C., Doudna, J. A. (2013). Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annu. Rev. Biophys.*, 42: 217-239
- Wossidlo, M., Nakamura, T., Lepikhov, K., Marques, C. J., Zakhartchenko, V., Boiani, M., Arand, J., Nakano, T., Reik, W., Walter, J. (2011) 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming *Nat Commun*, 2: 241
- Wright, K. L., Ting, J. P. Y. (1992). In vivo footprint analysis of the HLA-DRA gene promoter: cell-specific interaction at the octamer site and up-regulation of X box binding by interferon-gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 7601-7605
- Wysocka, J., Allis, C. D., Coonrod, S. (2006). Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front. Biosci.*, 11: 344-355
- Yearim, A., Gelfman, S., Shayevitch, R., et al. (2015). HP1 Is Involved in Regulating Global Impact of DNA Methylation on Alternative Splicing. *Cell Reports*, 10: 1122-1134
- York, I. A., et al. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nature Immunol.*, 3: 1177-1184
- Zardo, G., Ciolfi, A., Vian, L., Starnes, L. M., Billi, M., Racanicchi, S., Maresca, C., Fazi, F., Travaglini, L., Noguera, N., et al. (2012). Polycoms and microRNA-223 regulate human granulopoiesis by transcriptional control of target gene expression. *Blood*, 119: 4034-4046
- Zeng, L., Zhou, M. M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Letters*, 513: 124-128
- Zhang, G., et al. (2015). N6-Methyladenine DNA Modification in Drosophila. *Cell*, Vol. 161: 893-906
- Zhao, J., Sun, B. K., Erwin, J. A., Song, J. J., Lee, J. T. (2008) Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*, 322: 750-756
- Zhou, W., Zhu, P., Wang, J., Pascual, G., Ohgi, K. A., Lozach, J., Glass, C. K., Rosengeld, M. G. (2008). Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Mol. Cell*, 29: 69-80

Zhu, J. K. (2009). Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annual Review of Genetics*, 43: 143-166