

Petri Peng

HLA-DQB1-GEENIN  
METYLAATIOTASOT  
LYMFOSYYTEISSÄ TYYPIN 1  
DIABETEKSESSÄ

Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Kevätlukukausi 2020

Petri Peng

HLA-DQB1-GEENIN  
METYLAATIOTASOT  
LYMFOSYYTEISSÄ TYYPIN 1  
DIABETEKSESSÄ

Biolääketieteen laitos Kevätluku-  
kausi 2020 Vastuuhenkilö: Jorma  
Ilonen

*Turun yliopiston laatujärjestelmän  
mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin  
OriginalityCheck -järjestelmällä.*

PENG, PETRI: HLA-DQB1-geenin metylaatiotasot lymfosyyteissä tyypin 1 diabeteksessa

Syventävien opintojen kirjallinen työ, 21 s.  
Biolääketieteen laitos  
Huhtikuu 2020

---

Tyypin 1 diabetes (T1D) on haiman saarekesoluihin kohdistuvan autoimmuunireaktion pohjalta syntyvä parantumaton pitkäaikais sairaus, jonka ilmaantuvuus ja esiintyvyys ovat kasvaneet maailmanlaajuisesti viime vuosikymmeninä. Muutoksen arvellaan johtuvan muutoksista ympäristössä tai elintavoissa, minkä johdosta entistä suurempi osa perinnöllisesti alttiista väestöstä sairastuu.

Ympäristötekijät voivat aiheuttaa pitkäaikaisia ja tytärsoleuille periytyviä muutoksia geenien ilmentymiseen epigeneettisillä mekanismeilla, kuten DNA-metylaatiolla. DNA-metylaatioissa liitetään entsyymaattisesti metyyliiryhmä sytosiiniin, mikä hankaloittaa transkriptiotekijöiden kiinnittymistä DNA:han. Siten DNA-metylaatio etenkin geenien promoottorialueilla voi vähentää geenien ilmentymistä. Tässä tutkimuksessa verrattiin T1D-alttiuteen vaikuttavan ja immunitetille tärkeän HLA-DQB1-geenin promoottorissa sijaitsevan geenikohdan metylaatioasteen eroja lapsidiabeetikoiden ja verrokkien välillä. Lisäksi huomioitiin tutkittavien genotyyppi ja ikä. Metylaatioasteen eroja tarkasteltiin T1D:n taudin syntyyn liitettyissä lymfosyyteissä: B-soluissa sekä CD4- ja CD8-positiivisissa T-soluissa.

Tutkimusta varten saatiin DIPP-projektin puitteissa perifeerisen veren mononukleaarisia soluja 15 lapsidiabeetikolta ja iän, sukupuolen sekä HLA-genotyypin mukaan kaltaistetuilta verrokkilta. Tutkittavat jaettiin myös HLA-genotyypin mukaan korkean riskin genotyypin (DR3-DQ2/DR4-DQ8) ja kohtalaisen korkean riskin genotyypin (DR4-DQ8/X) ryhmiin. PBMC-näytteistä eroteltiin eri lymfosyyttipopulaatiot käyttämällä lajittelevaa virtaussytometriaa. Solunäytteistä eristettiin DNA, jolle tehtiin bisulfiittikonversio ja kohde-DNA-sekvenssin rikastus PCR-menetelmällä. Tämän jälkeen DNA-näytteiden metylaatioasteet määritettiin pyrosekvenssointimenetelmällä.

Tutkimuksen ainoa tilastollisesti merkittävä metylaatioasteen ero diabeetikoiden ja verrokkien välillä havaittiin CD4-positiivisissa soluissa. Diabeetikoilla oli hyvin korkea metylaatioastetta, kun taas verrokeilla oli hieman matalampaa. Lisäksi B-soluissa havaittiin, että korkean riskin genotyypin B-soluissa esiintyi korkeampaa metylaatioastetta kohtalaisen korkean riskin genotyyppiin nähden. Mikäli havaitut korkeammat metylaatioasteet korreloivat odotetusti geenin ilmentymiseen, saattaisi vähentynyt antigeenien esittely HLA-DQB1-molekyylissä liittyä T1D:hen. Jatkotutkimuksia tarvitaan DNA-metylaation vaikutuksesta geenin ilmentymiseen ja DNA-metylaation muutoksista suhteessa taudin eri vaiheisiin. Joka tapauksessa tämän tutkimuksen tulokset viittaavat siihen, että muutoksilla HLA-DQB1-geenin metylaatioissa voi olla merkitystä T1D:n synnyssä.

Avainsanat: tyypin 1 diabetes, HLA-geenialue, DNA-metylaatio, lymfosyytit

# Sisällys

1 Johdanto	1
1.1 Haiman saarekkeisiin kohdistuva autoimmunitaetti	1
1.1.1 Insuliitti	1
1.1.2 Autovasta-aineet	2
1.2 Altistavat geenipolymorfismit	3
1.2.1 HLA-molekyylit	3
1.2.2 HLA-luokka II ja tyypin I diabetes	4
1.2.3 Muut T1D:lle altistavat geneettiset tekijät	5
1.3 Ympäristötekijät	6
1.4 Epigenetiikka	7
1.4.1 DNA-metylaatio	7
1.5 Tutkimuksen tavoitteet	8
2 Metodit	8
2.1 Näytteet	8
2.2 Bisulfiittikonversio	9
2.3 HLA-DQB1-geenin PCR- ja pyrosekvensointialukkeet	9
2.4 PCR	9
2.5 Pyrosekvensointi	10
2.6 Tulosten tilastollinen analysointi	10
3 Tulokset	10
3.1 Metylaatiotasot diabeetikoiden ja terveiden verrokkien välillä	10
3.2 Metylaatiotasot riskiryhmien välillä	11
3.3 Eri riskigenotyyppien metylaatiotasot diabeetikoiden ja terveiden verrokkien välillä	11
3.4 Ikä ja metylaatio	13
4 Pohdinta	16
Lähteet	18

# 1 Johdanto

Tyypin 1 diabetes (T1D) on insuliinipuutoksesta johtuva parantumaton pitkäaikais sairaus. Insuliinipuutoksen taustalla on useimmiten autoimmuunireaktio, joka johtaa haiman saarekkeissa sijaitsevien insuliinia tuottavien  $\beta$ -solujen tuhoutumiseen. T1D:llä tarkoitetaan jatkossa nimenomaan autoimmuunireaktiolla syntyvää tyypin 1 diabetesta. Autoimmuunireaktioon johtavat mekanismit tunnetaan edelleen melko huonosti, mutta sen tiedetään alkavan kuukausia tai vuosia ennen T1D:n oireiden ilmentymistä [1]. Merkkejä autoimmuunireaktiosta voidaan osoittaa mittamalla tutkittavan verestä autovasta-aineita, joilla voidaan ennakoida T1D:n puhkeamista [2].

T1D:n taustalla on sekä perinnöllisiä tekijöitä että ympäristötekijöitä. T1D:n perinnölliseen luonteeseen viittaa se, että T1D-potilaiden sukulaiset ovat alttiimpia sairastumaan T1D:hen muuhun väestöön verrattuna. Alttius on suurinta T1D-potilaan identtisellä kaksosella, jonka todennäköisyys sairastua T1D:hen vaihtelee eri tutkimuksissa 30–70 %:n välillä. Perinnöllistä alttiutta on liitetty useisiin geeneihin, mutta merkittävimmät T1D-alttiusgeenit sijaitsevat immunitettiin liittyvällä HLA-geenialueella. [3] T1D:n ilmaantuvuus on viime vuosikymmeninä maailmanlaajuisesti kasvussa, jota perinnölliset tekijät tuskin selittävät. Tämän vuoksi epäillään, että ympäristötekijän tai -tekijöiden vaikutuksesta entistä suurempi osa perinnöllisesti alttiista väestöstä sairastuu. [4]

T1D:tä hoidetaan jatkuvilla verensokerimittauksilla ja elinikäisellä insuliinikorvaushoidolla. Hyvällä hoitotasapainolla voidaan hidastaa, mutta ei kuitenkaan pitkällä aikajänteellä täysin välttää T1D:hen liittyviä komplikaatioita, kuten näön heikkeneminen, sydän- ja verisuonitaudit, munuais- ja ääreishermoveauriot. T1D:n ja etenkin sen pitkäaikaiskomplikaatioiden hoitokustannukset vievät Suomessa ja maailmalla merkittävän osan terveydenhuollon kuluista ja vähentävät toiminnallisia elinvuosia. [5, 6] T1D:n syntymekanismien selvittäminen onkin tärkeää, jotta parantumaton tautia voitaisiin ennaltaehkäistä.

## 1.1 Haiman saarekkeisiin kohdistuva autoimmunitteetti

### 1.1.1 Insuliitti

Ensimmäiset merkit haimassa esiintyvistä autoimmuunireaktiosta havaittiin jo 1900-luvun alussa [7], mutta vasta 1970-luvulla T1D:n mahdollinen immunologinen syntymekanismi sai laajempaa hyväksyntää. Myöhemmin immuunijärjestelmän valkosolujen tunkeutumista Langerhansin saarekkeisiin alettiin kutsua insuliitiksi, jonka tutkiminen elävillä potilailla on edelleen ongelmallista. Nykykäsitös insuliitista perustuukin edelleen lähinnä menehtyneistä diabeetikoista tai vasta-ainemäärityksien perusteella T1D:lle alttiista henkilöistä kerättyihin näytteisiin, mutta niistä saatujen näytteiden lukumäärä ja laatu on rajallista. [8] Siispä T1D:n syntymekanismia on pyritty mallintamaan jyrsijöillä, erityisesti NOD-hiirillä (engl. non-obese diabetic, suom. ei-lihava diabeettinen). Kuitenkin NOD-hiiritutkimuksista saatuja tuloksia on tarkasteltava kriittisesti, sillä jyrsijöiden ja ihmisten haiman rakenne sekä insuliittiin liittyvien solujen ilmentyminen eroavat toisistaan. [7, 8]

Insuliittia on pyritty mallintamaan NOD-hiirimalleissa, joissa immuunijärjestelmä aiheuttaa tulehdusvasteen kaikissa haiman saarekkeissa, mikä johtaa muutamassa kuukaudessa insuliinipuutokseen [9, 10]. Ihmisten insuliitti ilmenee sen sijaan matala-asteisempaan tulehdusvasteena, jossa esiintyy erillisiä, yksittäisiä tulehduskeskuksia ja niitä ilmentyy eri aikoihin. Tulehduskeskuksissa valkosolut kerääntyvät yhteen kohtaan haiman saarekkeen seinämään, josta vain pieni osa valkosoluista vaikuttaa tunkeutuvan haiman saarekkeen sisälle. [11, 12] Näiden

valkosolujen aiheuttaman tulehdusreaktion ajatellaan johtavan  $\beta$ -solujen tuhoutumiseen, mikä edelleen johtaa T1D:hen, kun riittävän suuri osa  $\beta$ -soluista on tuhoutunut [7, 10].

T1D:n oireisiin ja diagnoosiin johtavan tuhoutuneiden  $\beta$ -solujen osuudessa on havaittu olevan yksilöllisiä eroja, mutta siinä on havaittu olevan iästä riippuvaa vaihtelua: teini-ikäisillä ja vanhemmilla diabeetikoilla tuhoutuneiden  $\beta$ -solujen osuus on noin 40–60 %, kun taas nuoremmilla tämä osuus on yleensä suurempi [10, 13, 14]. Insuliitti jatkuu T1D-diagnoosin jälkeen, ja samalla  $\beta$ -solujen tuhoutuminen etenee, mikä ilmenee insuliinia sisältävien saarekkeiden määrän vähenemisenä. Kuitenkin samalla insuliittiakin todetaan vähemmän, koska insuliittia todetaan harvoin insuliinia sisältämättömissä saarekkeissa [10, 15, 16]. Lisäksi  $\beta$ -solujen tuhoutuminen ei ole täydellistä, vaan insuliinia sisältäviä saarekkeita voi esiintyä vuosikymmenienkin kuluttua T1D-diagnoosista [16, 17].

Insuliittiin osallistuvista valkosoluista suurin osa on CD8-positiivisia lymfosyyttejä (CD8+ T-solut). Muita insuliitissa esiintyviä soluja ovat ainakin CD4-positiiviset lymfosyytit (CD4+ T-solut), CD20-positiiviset lymfosyytit (B-solut) ja makrofagit. [13, 18] CD8+ T- ja CD4+ T-soluilla ajatellaan olevan merkittävä rooli  $\beta$ -solujen tuhoutumisprosessissa: sytotoksisten CD8+ T-solujen ajatellaan olevan suoraan vastuussa  $\beta$ -solujen tuhoutumisesta, kun taas CD4+ T-solujen ajatellaan edistävän CD8+ T-solujen toimintaa tuottamalla sytokiineja [19]. T-solujen merkitykseen T1D:n taustalla viittaa se, että diabeetikoiden haimoista ja verestä eristetyt CD4+ T- ja CD8+ T-solut tunnistavat haiman molekyylien epitooppeja [20, 21]. Lisäksi CD8+ T-solukloonien on havaittu tuhoavan ihmisten haiman  $\beta$ -soluja in vitro -asetelmassa [22]. Huomioitavaa on, että T1D:n geneettinen alttius kytkeytyy vahvasti HLA-geenialueelle, jolla on olennainen merkitys T-solujen toiminnan kannalta. Insuliitissa haiman saarekkeen soluissa ilmennetään poikkeuksellisen paljon luokan I HLA -molekyyliä, joiden yhteydessä CD8+ T-solut tunnistavat spesifiset antigeeniepitooppinsa [23]. On kuitenkin myös viitteitä, etteivät CD8+ T-solut välttämättä edesauta  $\beta$ -solujen tuhoutumista, koska ihmisten haimoissa esiintyy CD8+ kudosmuisti-T-soluja ilman insuliittia [24], ja insuliitin tulehduskeskuksesta merkittävä osa CD8+ T-soluista edustaa kudosmuisti-T-solujen piirteitä [25].

Hiljattaisissa tutkimuksissa on havaittu haiman saarekkeisiin tunkeutuvien B-solujen määrän korreloivan T1D:n puhkeamisiän ja diagnoosivaiheessa todetun haiman  $\beta$ -solutuhoon laajuuden kanssa. Tämän perusteella insuliitti voidaan jakaa kahteen, taudin synnyltään erilaiseen ryhmään: CD20Hi ja CD20Lo. CD20Hi-insuliitin infiltraateissa on CD8+ T-solujen lisäksi runsaasti B-soluja ja T1D:n diagnoosivaiheessa esiintyy laajalti haiman  $\beta$ -solujen tuhoa. Yleensä CD20Hi-insuliittia havaitaan nuorilla lapsipotilailla ja alle 7-vuotiaiden insuliitti onkin lähes yksinomaan CD20Hi-tyyppistä. CD20Lo-insuliitin infiltraateissa on vähän B-soluja, ja siinä haiman  $\beta$ -solujen tuho on selvästi suppeampaa CD20Hi-insuliittiin nähden. Lisäksi CD20Lo-insuliittia esiintyy useammin teini-ikäisillä ja sitä vanhemmilla potilailla [13, 18]. Koska CD20Hi-insuliitti liittyy laajempaan  $\beta$ -solutuhoon ja varhaisemmin ilmentyvään T1D:hen, onkin ajateltu, että B-solut edistäisivät  $\beta$ -solujen tuhoutumista joko epäsuorasti CD8+ T-solujen välityksellä tai suorasti omilla mekanismeillaan [26].

### 1.1.2 Autovasta-aineet

Haiman  $\beta$ -soluihin kohdistuvan tulehduksen merkinä vereen ilmaantuu vasta-aineita, jotka tunnistavat haiman  $\beta$ -solujen rakenteita – autovasta-aineita. Niiden tarkka merkitys T1D:n taudin kehityksessä on vielä epäselvää, mutta niitä pidetään enemmän merkkiaineina  $\beta$ -solujen tuhoutumisesta kuin taudin aikaansaavina tekijöinä. Nykyään autovasta-aineita käytetään diabeteksen diagnostiikassa ja T1D:tä ennustavina merkkiaineina syntymäkohorttitutkimuksissa kuten DAISY:ssä, DIPP:ssä, BABYDIAB:ssä ja TEDDY:ssä [27]. Merkittävimmät autovasta-aineet, joita diabeetikoilta on todettu, ovat: 1. IAA, jotka tunnistavat insuliinin epitooppeja; 2. GADA, jotka tunnistavat glutamaattidekarboksylaasientsyymien epitooppeja; 3. IA-2A, jotka tunnistavat  $\beta$ -solujen tyrosiinifosfaatin kaltaisen kalvoproteiinin (IA-2) solunsisäistä osaa; 4. ZnT8A, joka tunnistaa transmembraanisia sinkkitransportteri 8:n (ZnT8). Autovasta-aineiden tunnistamille antigeeneille on yhteistä se, että ne

liittyvät haiman saarekkeiden  $\beta$ -solujen eritystoimintoihin: IA-2- ja ZnT8-molekyylejä on eriterakkuloiden solukalvolla, insuliini eritetään eriterakkuloiden kautta ja GAD65-entsyymiä esiintyy solunsisäisissä eriterakkuloissa. [28]

Yleensä ensimmäinen autovasta-aine, jota T1D-alttiilla ihmisillä ilmenee, on joko IAA tai GADA. Näiden ilmentymisessä on havaittu ajallista ja perinnöllistä eroa: IAA alkaa ilmentyä yleensä 1-2 ikävuoden välillä henkilöille, joilla on HLA-DR4-DQ8-riskihaplotyyppi, kun taas GADA ilmentyy yleensä 1–5 ikävuoden välillä henkilöille, joilla on HLA-DR3-DQ2-riskihaplotyyppi. Alttius T1D:lle nousee jonkin (noin 15 %) ensimmäisen autovasta-aineen ilmennyttyä, mutta vasta kahden tai useamman autovasta-aineen ilmentyminen tekee T1D:n puhkeamisesta todennäköistä (noin 70 %) [29]. On myös mahdollista, että autovasta-aineiden ilmentyminen verestä lakkaa, mikä on yleisintä (16-24 % tapauksista) tilanteessa, jossa veressä on ollut vain yksi autovasta-aine. Edelleen, mikäli kyseessä on ollut IAA tai GADA, T1D:n riski alenee. Mikäli henkilö on ilmentänyt useampaa vasta-ainetta, on epätodennäköistä (<1 %), että henkilö ei jatkossa ilmentäisi autovasta-aineita [30]. Vaikka autovasta-aineet ennustavatkin T1D:n kehittymistä, niiden avulla ei kuitenkaan voida ennustaa taudin puhkeamisen ajankohtaa; aikaväli ensimmäisen autovasta-aineen ilmentymisen ja T1D:n puhkeamisen välillä voi olla jopa 20 vuotta [31].

## 1.2 Altistavat geenipolymorfismit

### 1.2.1 HLA-molekyylit

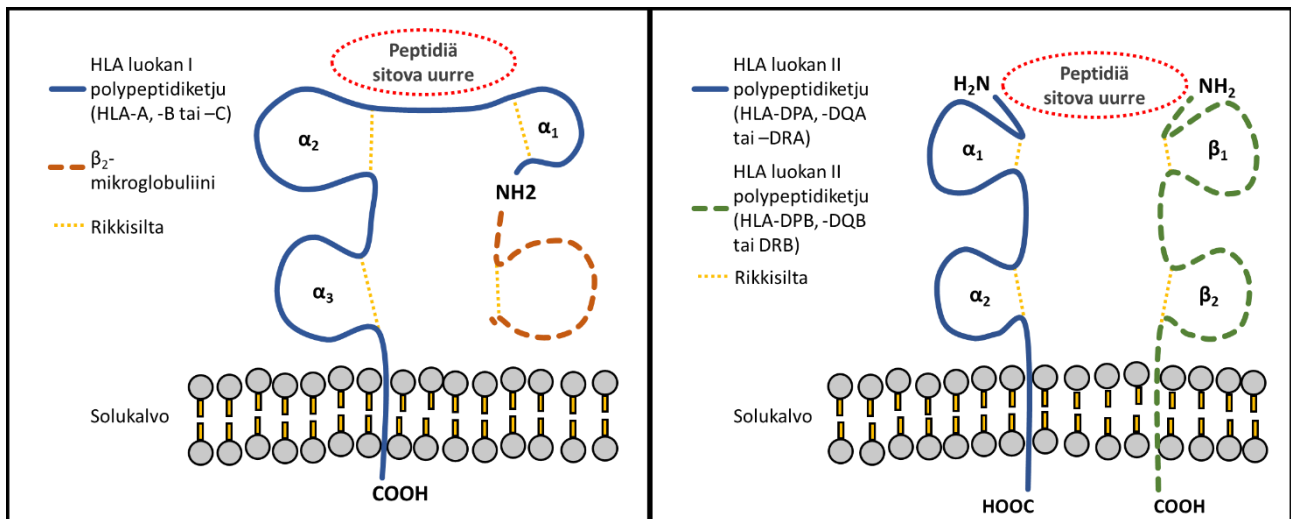
HLA-molekyylit (engl. human leukocyte antigens) eli ihmisen MHC-molekyylit (engl. major histocompatibility complex) ovat solujen pinnalla esiintyviä glykoproteiineja, jotka sitovat ja esittelevät peptidiantigeneja T-soluille T-solureseptorin välityksellä. HLA-molekyylejä koodaavat geenit jaetaan kahteen luokkaan: luokka I ja luokka II. [32, 33]

Luokan I HLA-molekyylejä ilmennetään lähes kaikissa ihmisen soluissa, ja niiden tehtävänä onkin auttaa immuunijärjestelmää tunnistamaan yksilön omat terveet solut infektoituneista, kuolevista tai vieraista soluista. Yleisesti luokan I HLA-molekyylissä tarjottavat antigeenit ovat peräisin solun sisältä, kuten solun omien proteiinien osia tai solun sisälle tunkeutuneen viruksen osia. CD8<sup>+</sup> T-solut tunnistavat luokan I HLA-molekyyliin sitoutuneen peptidiantigeenin, ja mikäli peptidiantigeeni on vieras, kyseiset T-solut aktivoituvat ja tuhoavat kohdesolunsa. Yksilön omia peptidiantigeneja esitteleviä soluja kohtaan ei tavallisesti synny vastaavaa immuunivastetta. [32]

HLA luokan I -geenit ovat HLA-A, HLA-B ja HLA-C. Kukin geneistä koodaa HLA luokan I -molekyylin  $\alpha$ -ketjua, joka voidaan jakaa viiteen rakenteellisesti ja toiminnallisesti eroavaan lohkokon eli domeeniin. Näistä  $\alpha$ 1- ja  $\alpha$ 2-domeeni muodostavat molekyylin toiminnan kannalta olennaisen antigeenistä peptidiä sitovan uurrerakenteen (Kuva 1). HLA-molekyylin toista ketjua,  $\beta$ 2-mikroglobuliinia, koodaava geeni sijaitsee HLA-alueen ulkopuolella kromosomissa 15. [33]

Luokan II HLA-molekyylejä ilmennetään antigeenejä tarjoavissa soluissa (APC, engl. antigen presenting cell), kuten B-soluissa, dendriittisoluissa ja makrofageissa. Yleisesti luokan II HLA-molekyylissä tarjottavat antigeenit ovat peräisin solunulkoisista taudinaiheuttajista, jotka APC on fago- tai endosytoosilla ottanut sisäänsä. Tunnistaessaan antigeenin vieraaksi ja saadessaan niin kutsutun sekundaarisen aktivaatiosignaalin, CD4<sup>+</sup> T-solu käynnistää immuunivasteen taudinaiheuttajaa vastaan tuottamalla sytokiineja. [32]

Kuten luokan I HLA-molekyyli, luokan II HLA-molekyyli on myös heterodimeeri, joka koostuu kahdesta polypeptidistä:  $\alpha$ - ja  $\beta$ -ketjusta (kuva 1). Toisin kuin luokan I HLA-molekyyli, luokan II HLA-molekyylin polypeptidit muodostavat yhdessä antigeenistä peptidiä sitovan uurrerakenteen, ja molempia polypeptidejä koodaa HLA-geeni. Luokan II HLA-molekyyliä koodaavia geenejä on useampia, jotka nimetään kolmen kirjaimen ja yhden numeron yhdistelmänä. Ensimmäinen kirjain (D) viittaa geenin HLA-luokkaan eli luokkaan II, toinen kirjain (P, Q tai R) viittaa yhtä molekyyliä koodaaviin geeneihin ja kolmas kirjain (A tai B) viittaa siihen kumpaa ketjua,  $\alpha$ :a vai  $\beta$ :a, geeni koodaa. Numerolla erotetaan geeniperheen itsenäiset geenit toisistaan. Geenin lukuisat alleelivariaatiot ilmoitetaan \*-merkin jälkeen numeroilla ja kaksoispisteillä. Esimerkiksi HLA-DQB1\*01:01 tarkoittaa yhtä luokan II DQ molekyylin  $\beta$ -ketjua koodaavaa alleelia. [34]



Kuva 1. Luokan I (vasemmalla) ja luokan II (oikealla) HLA-molekyyliden yleisrakenne solukalvolla kaavamaisesti esitettyinä. Mukailtu Merenmies & Partanen mukaan [33].

HLA-molekyylejä koodaava geenialue sijaitsee kromosomi 6:n lyhyessä käsivarressa (6p21.3), ja se sisältää yli 200 geeniä, joista vain noin 40 koodittaa varsinaisia HLA-molekyylejä. HLA-geenialueella esiintyy eniten polymorfismia eli perinnöllistä vaihtelua eri yksilöiden välillä; 26 214 eri alleelia on löydetty tammikuuhun 2020 mennessä [35]. Kuitenkin on huomionarvoista, että valtaosa alleeleista on hyvin harvinaisia, ja alleelien väliset erot voivat olla hyvin pieniä – jopa vain yhden nukleotidin verran [36]. Oleellista on, että polymorfismi vaikuttaa olennaisesti HLA-molekyylin uurrerakenteeseen, mikä puolestaan vaikuttaa siihen, millaisia peptidejä HLA-molekyyli kykenee sitomaan ja esittelemään. Täten polymorfismin taustalla uskotaan olevan infektioiden aiheuttama luonnonvalinta, joka on suosinut mahdollisimman monilukuisten mikrobien antigeeniepitooppien sitomiseen pystyvien alleelivarianttien kehitystä. [37]

### 1.2.2 HLA-luokka II ja tyypin I diabetes

Diabetesalttiuteen voimakkaimmin vaikuttavat riskigeenit paikannettiin 1970-luvulla luokan II HLA-geenialueelle. HLA-alueen geneeissä esiintyy huomattavasti kytkeäepätasapainoa (engl. linkage disequilibrium), joka tarkoittaa eri geenilokuksissa sijaitsevien alleelien esiintymistä samanaikaisesti tilastollista odotusarvoa useammin tai harvemmin. HLA-alueen sisällä erityishuomiota ovat saaneet HLA-DRB1, -DQA1 ja -DQB1 -geenit, joiden tietyt alleelit ovat hyvin kytkeytyneitä toisiinsa. Ne muodostavat yhtenäisesti periytyviä kokonaisuuksia, haplotyyppisiä, joista useimmiten voidaan yhden geenialleelin määrityksestä päätellä toisten geenilokusten alleelit. [38, 39] Esimerkiksi HLA-DRB1\*03:01 esiintyy lähes aina kytkeytyneenä DQA1\*05:01 ja DQB1\*02:01 -alleeleihin, jolloin muodostuu DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01 -haplotyyppi (DR3-DQ2), joka tunnetaan



T1D:lle altistavana haplotyyppinä. Toisena esimerkkinä DRB1\*04:01 on lähes aina kytkeytyneenä DQA1\*03:01, mutta siihen kytkeytyy joko DQB1\*03:01 tai DQB1\*03:02. Tässä tapauksessa kytkeytyvällä DQB1 -alleelilla on olennaista merkitystä T1D:n riskin suhteen: DRB1\*04:01-DQA1\*03-DQB1\*03:01 -haplotyyppi on T1D-riskiltään neutraali, kun taas DRB1\*04:01-DQA1\*03-DQB1\*03:02 -haplotyyppi (DR4-DQ8) on T1D:lle altistava [40]. Huomioitavaa on, että noin 90 %:ssa tutkituissa T1D:n fenotyypeissä esiintyy joko DR3-DQ2 tai DR4-DQ8 -haplotyyppi tai molemmat yhdessä. [38, 39]

Yhden riskihaplotyyppin määrittäminen ei kuitenkaan ole riittävä tutkimus, kun tavoitteena on määrittää yksilön luokan II HLA-geeneihin liittyvää T1D-alttiutta. Yksilön perimä kullakin geenialueella koostuu kahdesta haplotyyppistä, jotka muodostavat genotyypin. Tämä tarkoittaa, että yksilöllä on kaksi vastaavaa HLA-DQ -molekyylin  $\alpha$ - ja  $\beta$ -ketjua koodaavaa geeniä. HLA-DQ-molekyylin  $\alpha$ - ja  $\beta$ -ketjut voivat olla lähtöisin kummasta kromosomista tahansa: saman kromosomin geneistä muodostuu cis-heterodimeeri ja eri kromosomien geneistä muodostuu trans-heterodimeeri. Täten yksilö, joka on HLA-DQ-geenien suhteen heterotsygootti, voi ilmentää soluissaan neljää erilaista HLA-DQ-molekyyliä, joiden rakenne ja kyky esitellä erilaisia antigeenejä vaihtelee. Samalla alttius autoimmunireaktioille, ja siten alttius T1D:lle voivat muuttua huomattavasti. [40] Yhtenä esimerkkinä on havaittu, että HLA-DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02 vähentää alttiutta T1D:lle sellaisillakin yksilöillä, jotka kantavat toisena haplotyyppinään altistavaa haplotyyppiä [41]. Toisaalta on havaittu, että riskihaplotyyppit voivat synergisesti lisätä T1D-alttiutta: HLA-DR3-DQ2/DR4-DQ8 genotyypin riski sairastua T1D:hen 15 vuoden ikään mennessä on 5 %, kun taas HLA-DR3/DR3:lla vastaava luku on <2 % [2]. Synergisen ilmiön taustalla saattaa olla se, että toinen tai molemmat DR3-DQ2/DR4-DQ8 -genotyypin koodaamista trans-DQ-molekyyleistä altistaisi T1D:lle enemmän kuin cis-DQ-molekyylit [38]. Toisaalta HLA-DR3-DQ2- ja DR4-DQ8-haplotyyppit saattavat aiheuttaa T1D:tä toisistaan eroavilla syntymekanismeilla, koska niiden autovasta-aineprofiilit ovat erilaiset. Siten HLA-DR3/DR4-DQ8-genotyypin kantava yksilö voisi olla altis useammalle kuin yhdelle taudin syntymekanismin. [42]

### 1.2.3 Muut T1D:lle altistavat geneettiset tekijät

Kahden viime vuosikymmenen aikana niin kutsutut yksilön koko perimän eli genomin laajuiset assosiaatiotutkimukset (GWAS, engl. genome-wide association studies) ovat mullistaneet monitekijäisesti periytyvien tautien tutkimusta, T1D mukaan lukien. GWAS:ssa vertaillaan sairaiden ja mahdollisimman samankaltaisten terveiden verrokkien genomia toisiinsa. Tavoitteena on löytää merkittäviä eroavaisuuksia näiden kahden ryhmän väliltä jopa miljoonista ennalta määritetyistä yhden nukleotidin pistemutaatioista (SNP, engl. single nucleotide polymorphism). SNP on määritelty sellaiseksi pistemutaatioksi, jonka eri muodot esiintyvät väestötasolla vähiintään 1 %:lla [43]. GWAS:lla on havaittu yli 60 HLA-alueen ulkopuolista, T1D:hen liittyvää SNP:tä. Yleisesti GWAS:n avulla löydettyjen uusien riskialleelien vaikutus T1D-alttiuteen on vähäinen – suurimmalla osalla ristivetosuhde (OR, engl. odds ratio) on alle 1,3 [44]. HLA-alueen ulkopuolisista riskigeneistä, insuliinigeenin promoottorialueen polymorfismeilla on havaittu olevan voimakkain yhteys T1D-alttiuteen – sen OR on 2.4. Muita havaittuja geenejä, joiden OR on yli 1,5, ovat PTPN22 ja IL2RA. Kuitenkin HLA-alueen geneistä on löytynyt edelleen selvästi voimakkain suhde T1D-alttiuteen – OR vaihtelee 0.02-11.37. Edelleen HLA-DR3/DR4-DQ8 -genotyypin OR on yli 40 [43].

T1D:n monitekijäiseen periytymiseen vaikuttaa myös T1D:tä sairastavan vanhemman sukupuoli. Tutkimuksissa on havaittu, että T1D ilmenee lapsella jopa kaksi kertaa todennäköisemmin, kun T1D:tä sairastava vanhempi on ollut isä eikä äiti [45–47]. Lisäksi Harjutsalo et al. tutkimuksessa isän T1D-diagnoosi-ikä ennusti T1D:n ilmentymisen todennäköisyyttä lapsella: T1D ilmenee lapsella 2,5 kertaa todennäköisemmin isältä, jonka T1D on todettu 4-vuotiaana tai nuorempana, kuin isältä, jonka T1D on todettu 15–17 -vuotiaana [45]. T1D:tä sairastavan vanhemman sukupuoli vaikuttaa myös

lapsen T1D:n taudinkuvaan: lapsella, jonka vanhemmista isä sairastaa T1D:tä, on rajumpi taudinkuva kuin lapsella, jonka vanhemmista äiti sairastaa T1D:tä. Rajumpaan taudinkuvaan liittyy useammin ketoasidoosia ja suurempaa painonlaskua. [45] Näytöstä huolimatta on epäselvää, miksi lapsen T1D:n ilmentymiseen vaikuttaa T1D:tä sairastavan vanhemman sukupuoli. Sekä geneettisiä tekijöitä että ympäristötekijöitä on ehdotettu ilmiön taustalle, kuten geneettistä leimautumista [46] tai äidistä sikiöön siirtyvien T1D-vasta-aineiden T1D-riskiä vähentävää vaikutusta [47].

### 1.3 Ympäristötekijät

T1D:n ilmaantuvuus ja esiintyvyys ovat kasvaneet maailmanlaajuisesti viime vuosikymmeninä [48], tosin korkean ilmaantuvuuden maissa, kuten Suomessa ja Norjassa, on havaittu kasvun hidastumista [49]. T1D:n ilmaantuvuuden muutosten taustalla uskotaan olevan muutokset ympäristötekijöissä, sillä on epätodennäköistä, että näin lyhyessä ajassa tapahtuisi väestötasolla merkittäviä perinnöllisiä muutoksia. Ympäristötekijöiden vaikutusta tukevia viitteitä on saatu maahanmuuttoväestön epidemiologisista tutkimuksista, joissa T1D:n ilmaantuvuus on noussut henkilöillä, joiden vanhemmat ovat muuttaneet T1D:n suhteen matalan ilmaantuvuuden alueelta korkean ilmaantuvuuden alueelle. [50–53]

Vaikka T1D:n taudinsynty voi kestää useita vuosia, siinä on kuitenkin havaittu vuodenajasta riippuvaa vaihtelua sekä taudinsynnyn etenemisessä että taudin puhkeamisessa. Suomalaisessa aineistossa on havaittu, että T1D:lle altistavien autovasta-aineiden ilmentymisen muutokset, eli serokonversiot, tapahtuvat useammin syys- ja talvikausina [54]. Lisäksi maailmanlaajuisesti T1D-diabeetikkoja todetaan talvikausina useammin kuin kesäkausina, minkä havaittiin olevan sitä todennäköisempää, mitä kauempana tutkimuskeskus sijaitsee päiväntasaajalta. [55] Havainnot viittaavat siihen, että ainakin osa T1D:lle altistavista tai laukaisevista ympäristötekijöistä voisi olla itsessään kausiluonteisia, kuten virusinfektiot ja kylmä ilmasto. Nämä tekijät voisivat, yhdessä muiden insuliinintarvetta lisäävien tekijöiden kuten murrosiän ja ylipainon kanssa, johtaa  $\beta$ -solujen ylikuormittumiseen, joka voisi paljastaa autoimmuuniprosessin aiheuttaman  $\beta$ -solujen tuhon tai edistää sitä. [56]

Virusinfektioita on pitkään pidetty mahdollisena T1D:lle altistavana ympäristötekijänä. Erityisen kiinnostuksen kohteena ovat olleet enterovirukset, joiden epidemiat sopivat ajallisesti lisääntyneiden T1D-tapausten kanssa [54]. Lisäksi joidenkin enterovirusten on havaittu hakeutuvan ja lisääntyvän haiman  $\beta$ -soluissa solu- ja koe-eläinmalleissa [57]. Hiiritutkimuksista on saatu viitteitä syy-seuraussuhteesta: viruksilla on aiheutettu T1D:n kaltainen sairaus [58, 59] ja pystytty estämään T1D:n syntyä virusrokotteella [60]. Ihmistutkimuksissa ei ole kuitenkaan vielä pystytty osoittamaan syy-seuraussuhdetta virusten ja T1D:n välille [59, 61], vaikka vuonna 2011 tehdyssä 34 tapaus-verrokkitutkimuksen meta-analyysissä todettiin kliinisesti merkittävä yhteys T1D-potilaiden ja enteroviruksen välillä [62].

T1D:n ilmaantuvuuden kausittaiselle vaihtelun taustalle on ehdotettu myös D-vitamiinin puutosta, joka yleistyy valonmäärän vähentyessä talvisin. D-vitamiini säätelee immuunipuolustuksen vasteita D-vitamiinireseptorin välityksellä, mitä ilmennetään useissa immuunisoluissa kuten B-soluissa, T-soluissa ja APC:issä. [63] D-vitamiini onkin yhdistetty myös muihin autoimmuunitauteihin kuten MS-tautiin ja yleistyneeseen punahukkaan [64]. Kohorttitutkimus- ja meta-analyysitulokset ovat kuitenkin olleet vaihtelevia D-vitamiinin ja T1D:n suhteen eikä vakuuttavaa syy-seuraussuhdetta ole voitu todeta [65].

D-vitamiinin ja infektion lisäksi paljon huomiota on saanut suoliston mikrobiomin ja immuunipuolustuksen välinen vuorovaikutussuhde. Suoliston mikrobiomin on havaittu olevan T1D-potilailla yksipuolisempaa terveisiin verrokkeihin verrattuna prospektiivisissa syntymäkohorteissa. Lisäksi on havaittu ajallista yhtäläisyyttä varhaislapsuuden mikrobiomin epäsuotuisten muutosten ja T1D:en liitettyjen autovasta-aineiden ilmentymisen välillä. Syy-seuraussuhteen tutkiminen on kuitenkin ollut

hankalaa, sillä suoliston mikrobiomin ja immuunipuolustuksen välillä on monimutkainen vuorovaikutussuhde eikä sitä vielä täysin ymmärretä. [66] Lisäksi kolmen ensimmäisen ikävuoden aikana suoliston mikrobiomi on jatkuvassa muutoksessa, ja siinä esiintyy ihmisten välillä runsaasti vaihtelua, johon ulkoiset tekijät vaikuttavat [67]. Monet T1D:lle altistaviksi ympäristötekijöiksi epäillyt tekijät, kuten keisarileikkaus, imetyksen vähäisyys, varhainen tai myöhäinen kiinteään ruokaan siirtyminen ja antibioottikuurit, vaikuttavat merkittävästi suoliston mikrobiomin kehitykseen ja toimintaan [65].

## 1.4 Epigenetiikka

Kaikissa ihmisen tumallisissa soluissa esiintyy käytännössä sama genomi. Kuitenkin yksilön solujen välillä voi olla suuriakin rakenteellisia ja toiminnallisia eroja, mitkä selittyvät geenien erilaisena ilmentymisenä erilaisissa soluissa. Epigenetiikka tutkii solujen geenien ilmentymiseen vaikuttavia periytyviä muutoksia ja ominaisuuksia eli epigeneettistä tietoa, joka ei tee muutoksia DNA:n emäsjärjestykseen. Epigeneettiset muutokset ovat pitkäaikaisia, ja ne muodostavat yhdessä solun epigenomin. Epigeneettinen tieto periytyy tytärsoluille mitoosin aikana, mikä mahdollistaa kudosten uusiutumisen vastaavanlaisilla soluilla. [68, 69]

Epigeneettiset muutokset eivät kuitenkaan ole täysin pysyviä, vaan niitä säädellään epigeneettisillä mekanismeilla: DNA-metylaatiolla, histonimuokkauksilla ja ei-koodaavilla RNA-molekyyleillä. Eri-tyisesti alkionkehityksen aikana epigenomeissa tapahtuu runsaasti uusia muutoksia, jotka mahdollistavat kantasolujen erilaistumisen eri solulinjoihin alkionkehityksen aikana. Epigenomit voivat muuttua myös epäsuotuisasti yksilönkehityksen eri vaiheissa ja myös normaalin ikääntymisen myötä ympäristötekijöiden vaikutuksesta. Joissain tapauksissa epigeneettiset muutokset periytyvät myös meioosin aikana, jolloin sekä suotuisat että epäsuotuisat epigeneettiset muutokset voivat periytyä sukupolvelta toiselle. [68, 69]

### 1.4.1 DNA-metylaatio

DNA-metylaatiolla tarkoitetaan metyyliryhmän kiinnittämistä kovalenttisella sidoksella DNA:n emäksiin. Ihmisillä metyloitavat emäkset ovat lähes yksinomaan sytosiineja sytosiini-guaaniidinukleotideissa (CpG). CpG:tä esiintyy genomissa tilastollista odotusarvoa harvemmin paitsi keskimäärin noin 1000 emäsparin pituisilla CpG-rikkailla alueilla, joita kutsutaan CpG-saarekkeiksi. [70] CpG-saarekkeiden ja CpG-saarekkeiden ulkopuolisten CpG:iden DNA-metylaatiossa on huomattavaa eroa: ihmisten perimän CpG:istä noin 70 % esiintyy metyloituneena, mutta CpG-saarekkeiden CpG:t esiintyvät pääosin metyloitumattomina [71].

CpG-saarekkeita esiintyy erityisesti geenien promoottorialueilla, joista noin 70 %:iin liittyy CpG-saarekkeita [72]. On myös arvioitu, että jopa puolet CpG-saarekkeista esiintyisi geenien promoottorien sijasta geenialueiden sisällä tai geenialueiden väleissä [73]. Joka tapauksessa DNA-metylaatiolla vaikuttaa olevan olennainen rooli geenin ilmentymisen kannalta, sillä DNA-metylaatio hankaloittaa transkriptiotekijöiden kiinnittymistä DNA:han. Siten etenkin geenin promoottorialueen DNA-metylaatiolla voidaan estää geenin ilmentymistä [70]. Ilmiötä on havaittu kudosspesifisissä soluissa, joissa kudosspesifisten geenien promoottorialueiden muutokset DNA-metylaatiossa vaikuttavat geenin ilmentymiseen [71]. DNA-metylaatiota ei kuitenkaan voida suoraan pitää merkinä geenin hiljentymisenä, vaan sillä voi olla kohdasta riippuen muutakin merkitystä geenien säätelyssä, kuten silmukoinnissa [70].

DNA-metylaatiota säätelee joukko DNA-metyylitransferaasientsyymejä (DNMT), kuten DNMT1, DNMT3a ja DNMT3b. Perinteisesti on ajateltu, että DNAn replikaation aikana DNMT1:n tehtävänä on tunnistaa ja siirtää olemassa olevat DNA-metylaatiot tytär-DNA-juosteisiin. DNMT3a:n ja DNMT3b:n on ajateltu olevan vastuussa uusista, niin kutsutuista de novo -metylaatioista, joita tapahtuu erityisesti alkionkehityksen aikana ja syöpäsoluissa [74]. Perinteinen jaottelu on kuitenkin

jokseenkin harhaanjohtava, sillä DNMT1, DNMT3a ja DNMT3b voivat metyloida DNA:ta yhteistyössä ja lisäksi DNMT1:n on havaittu kykenevän de novo -metylaatioihin [75].

DNA-metylaation poistoa eli DNA-demetylaatiota voi tapahtua joko passiivisesti tai aktiivisesti. Passiivista DNA-metylaatiota tapahtuu, kun DNA-replikaation yhteydessä DNA-metylaation ylläpitomekanismit eivät toimi ja siten DNA-metylaatiomuutokset eivät siirry tytär-DNA-juosteisiin [76]. Aktiivisessa DNA-demetylaatiossa DNA-metylaatioon tehdään muutoksia entsyymeillä, joihin kuuluvat muun muassa TET- ja AID/APOBEC-entsyymit [77]. Ne tekevät kemiallisia muutoksia sytosiinin metyyliiryhmään, jonka seurauksena DNA-korjausmekanismit korvaavat metyloituneen sytosiinin tymiinillä tai metyloitumattomalla sytosiinilla [76].

DNA-metylaation yhteyttä T1D:hen on tutkittu viime aikoina epigenominlaajuisilla assosiaatiotutkimuksilla (EWAS, engl. epigenome-wide association study), joissa etsitään tautiin liittyviä metylaatioeroja SNP-siruilla. SNP-siruihin on ennalta määritetty olennaisia CpG-kohtia. Vuonna 2011 Rakyan et al. tutkivat diskordanttien eli T1D-taudin suhteen erilaisten identtisten kaksosten CD14-positiivisista monosyyteistä metylaatioeroja. Tutkimuksessa käytettiin Illumina 27K -sirua, jonka yli 27 000 CpG-kohdasta havaittiin tilastollisesti merkittäviä metylaatioeroja 132 CpG-kohdassa. Näistä yksi havaittiin HLA-alueella ja tarkemmin HLA-DQB1-geenissä, jossa diabeetikoilla ilmeni vähemmän metylaatiota terveisiin verrattuna [78]. Vuonna 2014 Stefan et al. kaksostutkimuksessa tutkittiin samalla Illumina 27k -sirulla B-solujen metylaatiota. Tässä tutkimuksessa ei havaittu HLA-DQB1-geenissä merkittävää eroa, mutta HLA-alueelta löytyi muita metylaatioeroja diabeetikoiden ja terveiden välillä [79]. Myöhemmissä tutkimuksissa on käytetty Illuminan 450K -sirua, jolla voidaan tutkia yli 450 000 CpG-kohdan metylaatioita [80–82]. Paul et al. kaksostutkimuksessa tarkasteltiin metylaatioeroja CD4+ T-soluissa, CD19-positiivissa B-soluissa ja CD14-positiivissa-CD16-negatiivissa monosyyteissä. Tutkimuksessa havaittiin vain yksi tilastollisesti merkittävä metylaatioero, joka ilmeni CD4+ T-solujen DDIT4-geenin läheisyydessä. Sen sijaan, tutkimuksessa havaittiin tuhansia CpG-kohtia, joiden metylaatioasteissa oli merkittävästi enemmän hajontaa diabeetikoiden välillä kuin verrokkien välillä. Aiemmin vastaavaa ilmiötä on havaittu syöpäkuudoksissa. [81]

### 1.5 Tutkimuksen tavoitteet

Syventävien opintojeni tavoitteena oli vertailla HLA-DQB1 -geenin promoottorissa sijaitsevan kohdan cg01889448 (-1401) metylaatioasteiden eroja alaikäisten diabeetikoiden ja terveiden verrokkien välillä, mikä on aiemmin havaittu Rakyan et al. toimesta CD14-positiivisissa monosyyteissä [78]. Metylaatioasteita tutkittiin T1D:n taudinsyntyyn liitetyissä lymfosyyteissä: CD20+ B-, CD4+ T- ja CD8+ T-soluissa. Merkittävät erot metylaatioasteissa voisivat olla viitteitä HLA-DQB1-geenin poikkeavasta ilmentymisestä eri ryhmissä, mikä oikeuttaisi jatkotutkimuksiin.

## 2 Metodit

### 2.1 Näytteet

Tutkimuksessa käytettyjen 15 diabeetikon ja 15 terveen verrokin näytteet ovat peräisin DIPP-projektista (engl. Diabetes Prediction and Prevention, suom. Diabeteksen ennustaminen ja ehkäisy), PBMC-näytteistä (engl. peripheral mononuclear cell, suom. veren yksitumaiset solut). DIPP-projektissa T1D:lle alttiit lapset käyvät määrääjain seurantakäynneillä, jonka yhteydessä otetaan verinäyte [79]. Tutkimushenkilöiden PBMC-näytteistä eroteltiin BD FACS Aria III (BD Biosciences) -virtausytometrillä eri lymfosyytit: CD20+ B-, CD4+ T-, CD8+ T- ja regulatoriset T-solut. Diabeetikot ja verrokkit kaltaistettiin HLA-genotyyppiin, iän ja sukupuolen mukaan. 14 tutkimushenkilöllä oli korkean riskin genotyyppi DR3-DQ2/DR4-DQ8, kun taas 16 tutkimushenkilöllä oli kohtalaisesti lisääntyneen riskin haplotyyppi DR4-DQ8 ilman DR3-DQ2-haplotyyppiä (DR4-DQ8/X).

Tutkimushenkilöt olivat 5–14-vuotiaita poikia. Mediaani-ikä oli diabeetikoilla 10v 6kk ja verrokeilla noin 9v 5kk. Ikäeroa diabeetikon ja kaltaistetun verrokin välillä oli 1kk – 2v 3kk. Diabeetikoilta näyte oli otettu 2–6 päivän sisällä T1D-diagnoosista.

## 2.2 Bisulfiittikonversio

Eristetyille DNA-näytteille tehtiin bisulfiittikonversio EZ DNA Methylation-Gold -kitillä (Zymo Research). Näytteitä otettiin bisulfiittikonversioon niin, että konversioon tulisi kitille optimaalinen määrä DNA:ta (200–500 ng): DNA-määrät vaihtelivat tutkimuksen bisulfiittikonversiossa 300 – 500 ng välillä. Työssä käytettiin DNA Engine Dyad Thermal Cycler -laitetta (Bio-Rad) ja Eppendorf Centrifuge 5417R -sentrifugia. Kaikki näytteet eluoiitiin 20 µl:aan kitin eluointiliuosta, ja niistä tehtiin PCR-reaktioita varten MQ-vedellä laimennokset, joissa DNA-pitoisuus oli noin 5 ng/µl.

## 2.3 HLA-DQB1-geenin PCR- ja pyrosekvensointialukkeet

Tarkoituksena oli tarkastella HLA-DQB1-geenin promoottorien metylaatiota. Ensisijaisen tarkastelun alla oli kohta -1401. Tarkastelun alle otettiin myös kohta -1376, koska pyrokseksensoinnilla on mahdollista tutkia useaa kohtaa samanaikaisesti. Geenialueille suunniteltiin PCR- ja pyrosekvensointialukkeet PyroMark Assay Design 2.0 -ohjelmalla. Suunnitellut alukkeet (Taulukko 1) validoitiin valmistajan ohjeiden mukaisesti [84], mutta kohdan -1376 osalta alukkeet eivät läpäisseet validointia, joten kyseisen kohdan tarkastelusta luovuttiin. Sen sijaan alukkeet läpäisivät validoinnin kohdan -1401 osalta eikä kohdan -1376 kelvottomuus vaikuta kohdan -1401 tulkintaan.

Taulukko 1. Geenialueelle suunniteltujen alukkeiden sekvenssit (5'-BIO = alukkeen 5'-pää on biotinyloitu, HPLC = aluke on puhdistettu high performance liquid chromatography (HPLC) -menetelmällä, HPSF = aluke on puhdistettu High Purity Salt Free (HPSF) -menetelmällä, Ta = annealing-lämpötila).

Aluke	Sekvenssi	Muokkaukset	Ta (°C)
<b>HLA-DQB1-F3 (forward)</b>	ATTGTTGTTGGAAGTTTAGTGG TAATT	HPSF	58
<b>HLA-DQB1-R3 (reverse)</b>	CTTCTTCTCTCCCTTCTCTCT	5'-BIO, HPLC	58
<b>HLA-DQB1-S3 (sequencing)</b>	ATTGAATAATATAGAATATTGG AGT	HPSF	58

## 2.4 PCR

PCR:n tekemiseen käytettiin PyroMark PCR -kittiä (Qiagen), joka on suunniteltu bisulfiittikonvertoitun DNA:n monistamiseen. PCR-seos valmistettiin huoneenlämmössä, ja kitin valmistus-ohjeesta poiketen ilman 25mM MgCl<sub>2</sub>-liuosta [85]. Alukkeiden HLA-DQB1-F3 ja -R3 (taulukko 1) lopullinen pitoisuus PCR-seoksessa oli 0,2 µM. Kunkin näytteen PCR-reaktioon pipetoitiin 22 µl PCR-seosta ja 3 µl bisulfiittikonvertoitunutta DNA-näytettä, jolloin näytteen määrä oli noin 15 ng. PCR-ajot tehtiin Kyratec SuperCycler Trinity -laitteella. Käytetyssä PCR-ohjelmassa oli 3 vaihetta: entsyymin aktivaatiovaihe, monistusvaihe ja ekstensiovaihe. Entsyymin aktivaatiovaihe kesti 15 minuuttia 95 °C:ssa. Monistusvaihe tehtiin 45 syklistä, joissa oli 3 lämpötilaltaan eroavaa osavaihetta: 1. denaturaatiovaihe 94 °C:ssa, 2. annealingvaihe alukkeille sopivalla 58 °C:ssa (taulukko 1) ja 3. ekstensiovaihe 72 °C:ssa. Kukin osavaihe kesti 30 s. Ekstensiovaihe kesti 10 min 72 °C:ssa. PCR:n jälkeen näytteiden monistuminen tarkistettiin agarosigeelillä.



## 2.5 Pyrosekvensointi

PCR-reaktion jälkeen PCR-tuotteita säilytettiin enintään vuorokausi +4 °C lämpötilassa ennen pyrosekvensointia. Biotinyloitu PCR-tuote valmistettiin pyrosekvensointia varten puhdistamalla sitä vakuumpöydällä (PyroMark Q24 Vacuum workstation, Qiagen) magneettisten streptavidinihelmiä (Streptavidin Sepharose High Performance, GE Healthcare Life Sciences) avulla. Puhdistettua biotinyloitua PCR-tuotetta käytettiin sitten templaattina varsinaisessa pyrosekvensoinnissa, jossa käytettiin PyroMark Q24 Advanced Reagents -kitin reagensseja (Qiagen). Pyrosekvensointiajo-ohjelma suunniteltiin PyroMark Q24 Advanced software -ohjelmalla, ja pyrosekvensointi tehtiin PyroMark Q24 -laitteella.

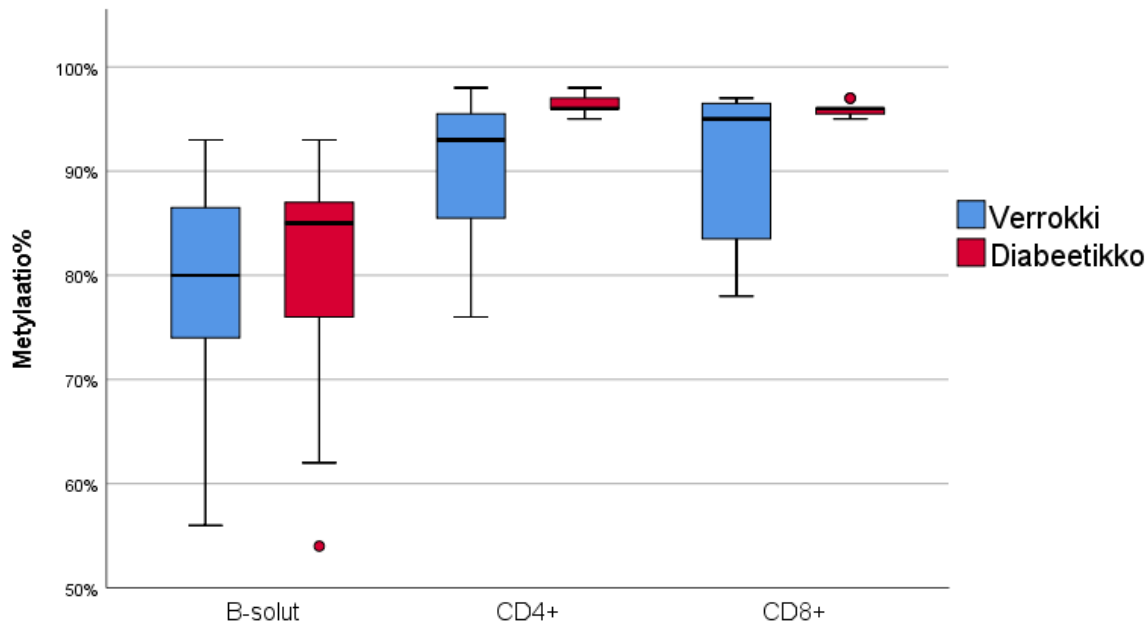
## 2.6 Tulosten tilastollinen analysointi

Tulosten tilastollinen analysointi tehtiin IBM SPSS Statistics 25.00 -ohjelmalla. HLA-DQB1-geenin promoottorin metylaatiota kohdassa -1401 vertailtiin eri ryhmien välillä Mann-Whitney U-testillä. Ryhmien välisen hajonnan merkitsevyyttä tutkittiin varianssien kautta Levenen testillä. Metylaatio-tason suhtautumista ikään analysoitiin sekä Pearsonin korrelaatiokertoimella että Spearmanin järjestyskorrelaatiokertoimella. Molempia analyysejä käytettiin, koska metylaatiotasot eivät aina noudata normaalijakaumaa [86], ja otoskoko on tässä liian pieni normaalijakauman analysoimiseksi. Tulokset olivat tilastollisesti merkittäviä, mikäli tuloksen p-arvo oli <0,05.

# 3 Tulokset

## 3.1 Metylaatiotasot diabeetikoiden ja terveiden verrokkien välillä

HLA-DQB1-geenin promoottorin CpG-kohdan -1401 metylaatiota tutkittiin kolmessa eri solupopulaatiossa: B-soluissa, CD4+ T- ja CD8+ T-soluissa (kuva 2). Diabeetikoiden ja terveiden verrokkien välisessä vertailussa havaittiin, että diabeetikoilla oli kaikissa solutyypeissä keskimääräisesti korkeammat metylaatiotasot. Diabeetikoiden T-solujen metylaatioaste oli korkea (yli 95 %) ja metylaatioasteen hajonta oli vähäistä eri diabeetikkojen kesken. Sen sijaan verrokkien T-solujen metylaatioasteiden hajonta oli merkittävästi suurempaa. Ryhmien välinen ero hajonnassa oli myös tilastollisesti merkittävää CD4+ T-soluissa ( $p < 0,001$ ) ja CD8+ T-soluissa ( $p < 0,001$ ). B-solujen metylaatioasteissa oli samankaltaista vaihtelua ryhmien välillä, ja niiden keskimääräiset metylaatioasteet olivat molemmissa ryhmissä T-solujen metylaatioasteita matalammat. Ainoa tilastollisesti merkitsevä ero keskimääräisissä metylaatioasteissa havaittiin CD4+ T-soluissa ( $p < 0,001$ ), joissa diabeetikoilla oli keskimäärin noin 6,6 %-yksikköä korkeampi metylaatioaste verrokkeihin nähden (kuva 2). CD8+ T-soluissa ei havaittu olevan tilastollisesti merkitsevää eroa ryhmien välillä ( $p = 0,148$ ), vaikka eroa näyttäisi olevan. On kuitenkin huomattava, että verrokkien mediaani on korkea (noin 95 %), mikä kertoo, että suurimmassa osassa verrokkien näytteissä on ollut keskimäärin korkea metylaatioaste.



Kuva 2. HLA-DQB1-geenin promoottorin CpG-kohtan -1401 metylaation (%) vertailua diabeetikoiden ja verrokkien eri valkosolutyypeissä. Kuvan laatikko- ja viiksikaavioissa (1 box plot) on merkitty laatikoiden (siniset ja punaiset) avulla tulosten mediaani (keskimmäinen paksu viiva) ja tulosten ala- ja yläneljännes (laatikoiden ala- ja yläreuna). Laatikoiden ulkopuoliset janat (viiksikaavio) kuvaavat aineiston suurinta ja pienintä tulosta. Muista tuloksista selvästi poikkeavat havainnot (engl. outlier) on merkitty kuvaan pallosymboleilla.

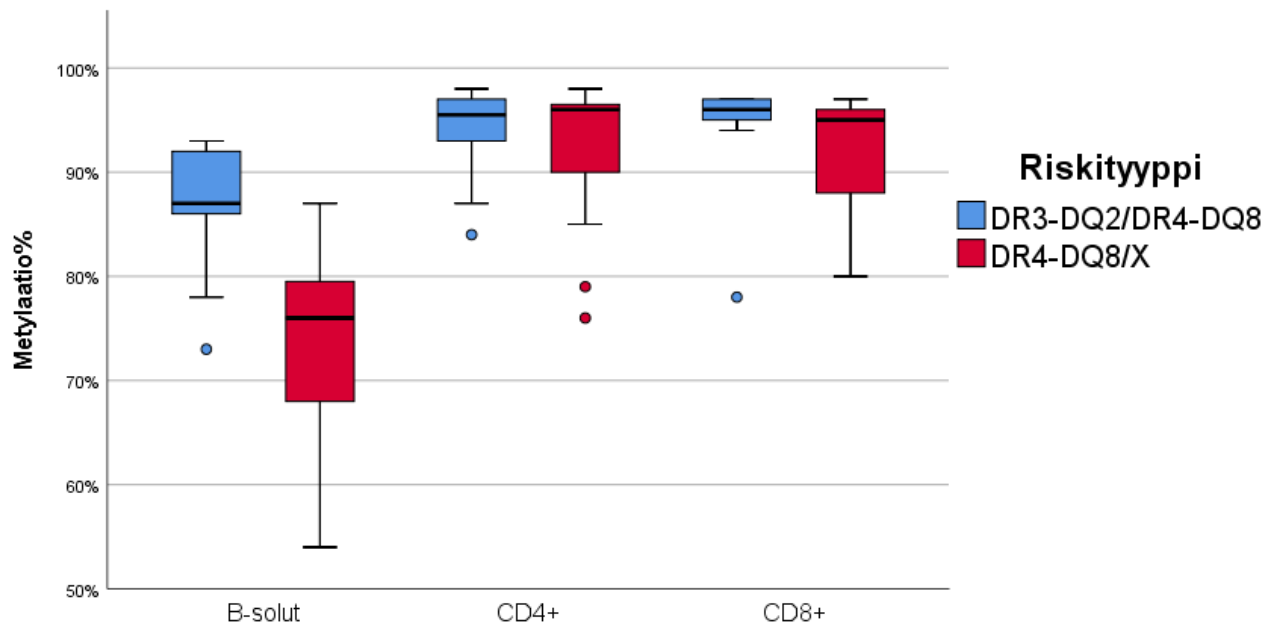
### 3.2 Metylaatiotasot riskiryhmien välillä

HLA-DQB1-geenin promoottorin CpG-kohtan -1401 metylaatiota vertailtiin myös korkean riskin genotyypin (DR3-DQ2/DR4-DQ8) ja kohtalaisesti lisääntyneen riskin genotyypin (DR4-DQ8/X) välillä (Kuva 3). Tässä vertailussa havaitaan jonkin verran hajontaa lähes kaikissa solutyypeissä. Ainoa tilastollisesti merkittävä ero hajonnan suhteen havaittiin B-soluissa ( $p=0,033$ ), joissa kohtalaisesti lisääntyneen riskin genotyypin ryhmässä esiintyi suurempaa hajontaa korkean riskin genotyypin ryhmään verrattuna. Vaikka T-soluissa vaikuttaisi olevan selvää ryhmien välistä eroa hajonnassa, se ei ole kuitenkaan tilastollisesti merkittävä (CD4+ T-solut  $p=0,126$ ; CD8+ T-solut  $p=0,080$ ).

B-soluissa todettiin myös ainoa merkittävä ero ( $p<0,001$ ) ryhmien välisissä keskimääräisissä metylaatioasteissa. Korkean riskin genotyypin keskimääräinen metylaatioaste oli keskimäärin 13,5 %-yksikköä korkeampi kuin kohtalaisesti lisääntyneen riskin genotyypillä. CD8+ T-solujen metylaatioasteero ei aivan ollut tilastollisesti merkitsevä ( $p=0,064$ ), mutta keskimääräinen metylaatioasteerokin on pieni – noin 2 %-yksikköä.

### 3.3 Eri riskigenotyyppien metylaatiotasot diabeetikoiden ja terveiden verrokkien välillä

Eri riskigenotyyppien diabeetikoiden ja verrokkien metylaatiotasojen vertailussa havaittiin merkittävin ero CD4+ T-soluissa (kuva 4). Tilastollisesti merkittävää korrelaatiota ilmeni kuitenkin vain kohtalaisesti lisääntyneen riskin genotyypissä ( $p=0,003$ ), jossa diabeetikoiden CD4+ T-soluissa oli keskimäärin 8,2 %-yksikköä korkeampi metylaatioaste kuin verrokeilla. Korkean riskin genotyypissä ei aivan ollut tilastollisesti merkittävää eroa ( $p=0,097$ ).

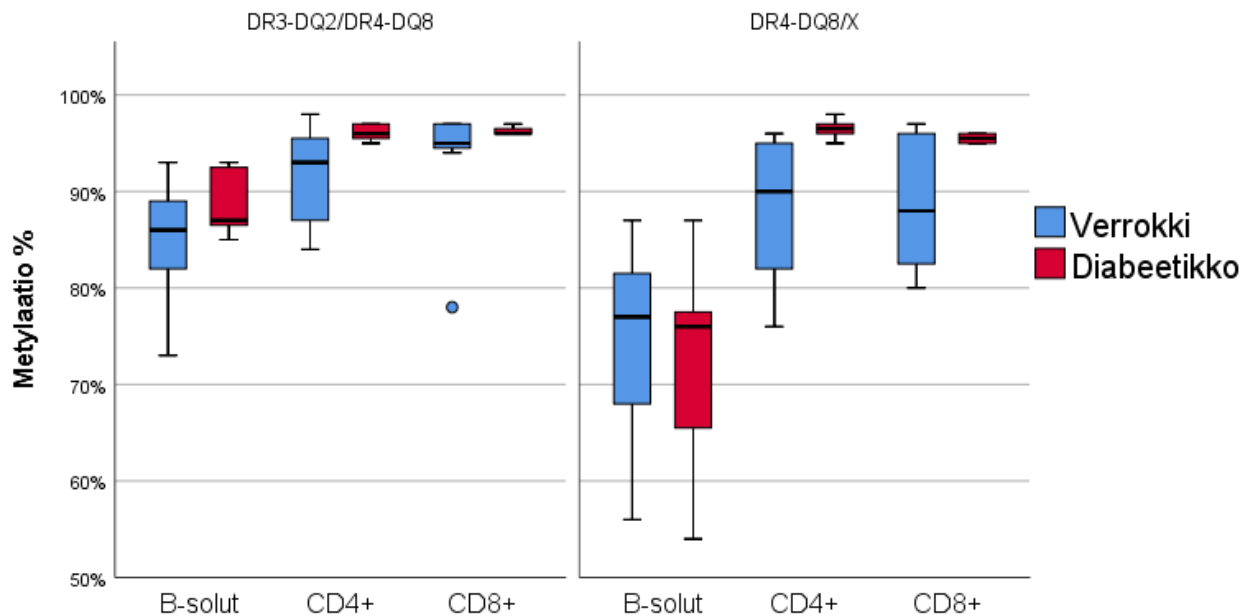


Kuva 3. HLA-DQB1-geenin promoottorin CpG-kohdan -1401 metylaatio (%) eri riskigenotyyppien eri lymfosyyteissä. Kuvan laatikko- ja viiksikaavioissa (engl. box plot) on merkitty laatikoiden (siniset ja punaiset) avulla tulosten mediaani (keskimmäinen paksu viiva) ja tulosten ala- ja yläneljännes (laatikoiden ala- ja yläreuna). Laatikoiden ulkopuoliset janat (viiksikaavio) kuvaavat aineiston suurinta ja pienintä tulosta. Muista tuloksista selvästi poikkeavat havainnot (engl. outlier) on merkitty kuvaan pallosymboleilla.

Diabeetikoiden metylaatiotasossa havaittiin merkittävää eroa eri riskigenotyyppien B-soluissa (kuva 4). Korkean riskin genotyypin diabeetikoilla on keskimäärin noin 16,6 % korkeampi metylaatioaste B-soluissa kuin kohtalaisen korkean riskin genotyypin diabeetikolla ( $p=0,002$ ). Tilastollisesti merkittävää eroa ( $p=0,040$ ) havaittiin myös CD8+ T-soluissa, minkä todellinen merkitys jää tosin kyseenalaiseksi, sillä diabeetikoiden metylaatioasteet vaihtelivat 95–97 %:n välillä.

Diabeetikoilla havaitaan edelleen vähäisempää hajontaa T-solujen metylaatioasteissa verrattuna verrokkeihin. Kuitenkin ainoastaan korkean riskin genotyypin ryhmän CD8+ T-soluissa ei ollut tilastollisesti merkittävää eroa ( $p=0,057$ ) diabeetikko- ja verrokkiryhmän metylaatioasteen hajonnassa. B-soluissa ei todeta diabeetikko- ja verrokkiryhmien välillä eroja, mutta kohtalaisen korkean riskin genotyypin diabeetikoiden metylaatioasteissa esiintyi merkittävästi enemmän hajontaa korkean riskin genotyypin diabeetikoihin verrattuna ( $p=0,046$ ).



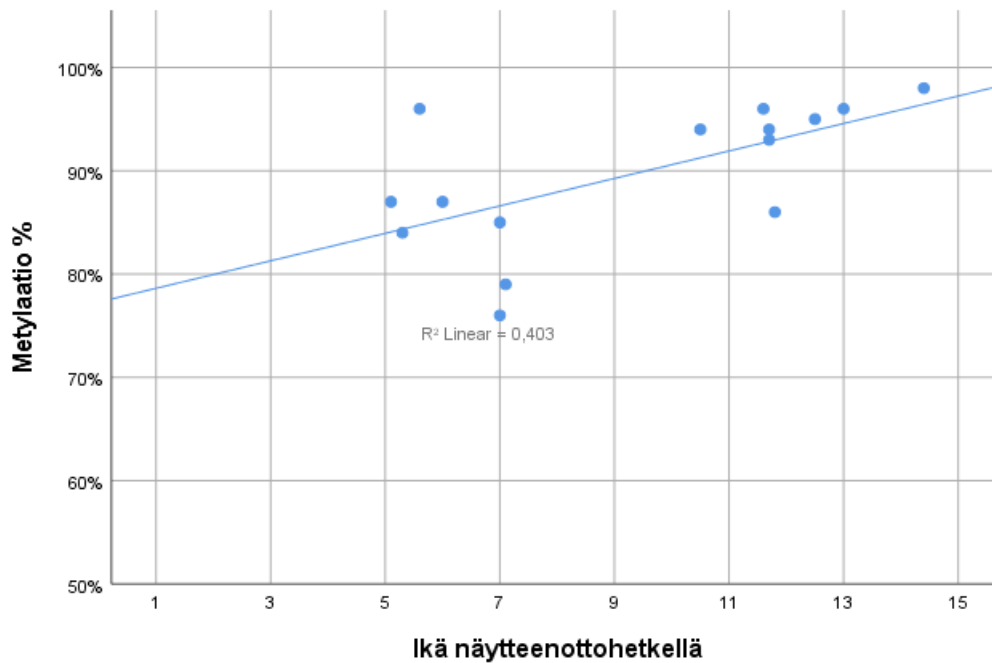


Kuva 4. HLA-DQB1-geenin promoottorin CpG-kohtaan -1401 metylaation (%) vertailua diabeetikoiden ja verrokkien eri lymfosyyteissä jakamalla aineisto ensin eri riskigenotyyppeihin. Kuvan laatikko- ja viiksikaavioissa (engl. box plot) on merkitty laatikoiden (siniset ja punaiset) avulla tulosten mediaani (keskimmäinen paksu viiva) ja tulosten ala- ja yläneljännes (laatikoiden ala- ja yläreuna). Laatikoiden ulkopuoliset janat (viiksikaavio) kuvaavat aineiston suurinta ja pienintä tulosta. Muista tuloksista selvästi poikkeava havainto (engl. outlier) on merkitty kuvaan pallosymbolilla.

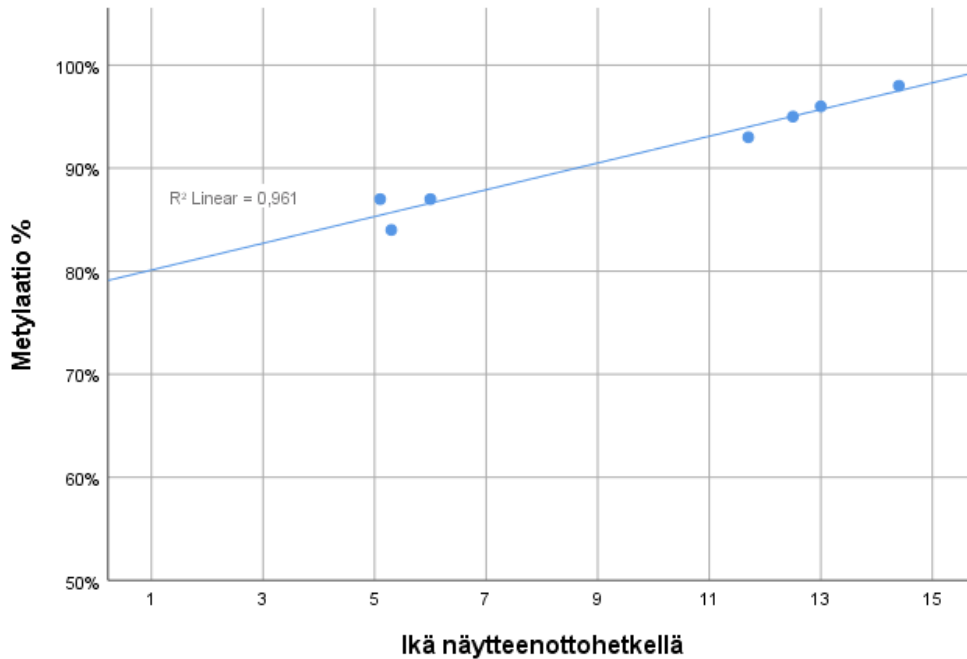
### 3.4 Ikä ja metylaatio

Verrokkien CD4+ T-soluissa havaittiin tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota metylaatioasteiden ja iän välillä: metylaatioaste nousee iän karttuessa (Pearsonin korrelaatiokertoimen p-arvo ( $R_p$ ) = 0,011, Spearmanin rho:n p-arvo ( $S_{pp}$ ) = 0,045) (kuva 5). Verrokkien CD4+ T-solut jaettiin vielä riskigenotyypeittäin, jolloin havaittiin, että DR3-DQ2/DR4-DQ8-genotyypillä korrelaatio vahvistui ( $R_p < 0,001$ ;  $S_{pp} = 0,002$ ) (kuva 6), kun taas DR4-DQ8/X-genotyypillä ei havaittu ollenkaan korrelaatiota ( $R_p = 0,828$ ,  $S_{pp} > 0,999$ ). Korkean riskin genotyypin B-soluissa havaittiin Pearsonin korrelaatiokertoimella tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota sekä diabeetikoilla että verrokeilla, mutta ei Spearmanin rho:lla: diabeetikoilla metylaatioaste laski iän karttuessa ( $R_p = 0,002$ ,  $S_{pp} = 0,054$ ), kun taas verrokeilla metylaatioaste nousi iän karttuessa ( $R_p = 0,046$ ,  $S_{pp} = 0,139$ ) (kuva 7). Huomionarvoista on, että alle 7-vuotiailla metylaatioasteen ero ryhmien välillä oli suuri, kun taas yli 10-vuotiailla metylaatioasteet olivat samankaltaiset molemmissa ryhmissä. CD8+ T-soluissa havaittu tilastollisesti merkitsevällä korrelaatiolla ( $R_p = 0,039$ ,  $S_{pp} = 0,034$ ) ei ole todennäköisesti todellista merkitystä, sillä siinä havaittu metylaatioasteen ero oli noin 1%.

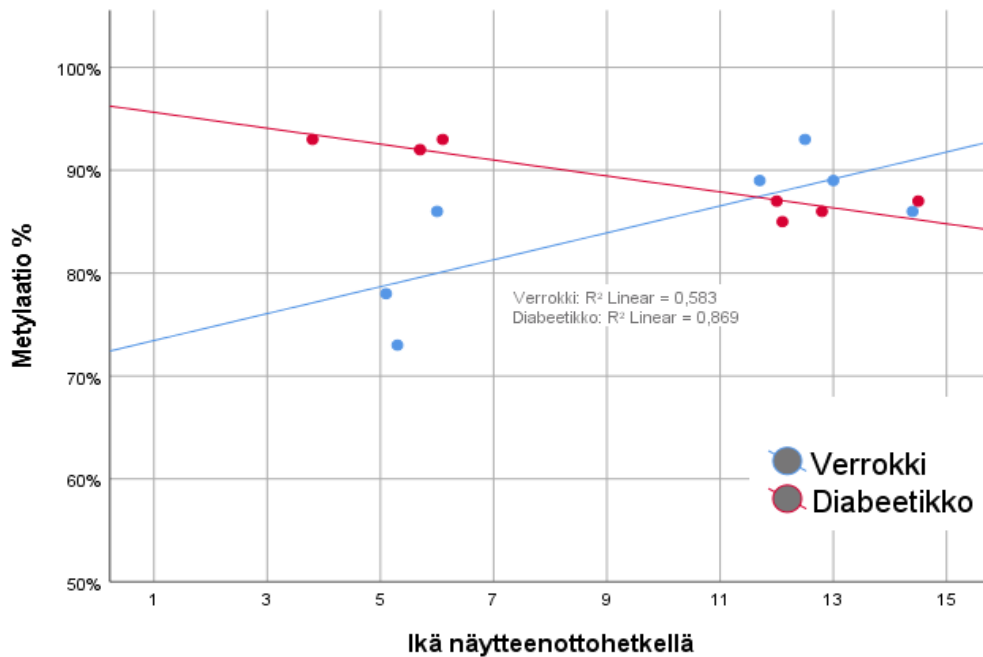
CD4+ T-solujen HLA-DQB1-geenin promoottorin CpG-kohdan -1401 metylaation (%) suhde ikään verrokeissa



Kuva 5. Verrokkien CD4+ T-solujen HLA-DQB1-geenin promoottorin CpG-kohdan -1401 metylaation (%) suhde tutkittavan ikään. Siniset pallot edustavat tutkimushenkilöiden metylaatioasteita. Sininen viiva kuvaa regressiosuoraa.  $R^2$  Linear = selityskerroin = (Pearsonin korrelaatiokerroin)<sup>2</sup>.



Kuva 6. Korkean riskin genotyypin verrokkien CD4+ T-solujen HLA-DQB1-geenin promoottorin CpG-kohdan -1401 metylaation (%) suhde tutkittavan ikään. Siniset pallot edustavat tutkimushenkilöiden metylaatioasteita. Sininen viiva edustaa regressiosuoraa.  $R^2$  Linear = selityskerroin = (Pearsonin korrelaatiokerroin)<sup>2</sup>.



Kuva 7. Korkean riskin genotyypin diabeetikoiden ja verrokkien B-solujen HLA-DQB1-geenin promoottorin CpG-kohdan -1401 metylaatioasteen (%) suhde tutkittavan ikään. Pallot (siniset ja punaiset) edustavat tutkimushenkilöiden metylaatioasteita. Viivat (sininen ja punainen) edustavat regressiosuoraa.  $R^2$  Linear = selityskerroin = (Pearsonin korrelaatiokerroin)<sup>2</sup>.

## 4 Pohdinta

Tyyppin 1 diabetes on autoimmuunitauti, jonka syntyyn liittyy todennäköisesti sekä perinnöllisiä tekijöitä että ympäristötekijöitä. Näiden tekijöiden väliseen vuorovaikutukseen osallistuvat epigeneettiset mekanismit, jotka ympäristön vaikutuksesta voivat aiheuttaa pitkäikäisiä muutoksia geenien ilmentymiseen. Yksi tutkituimmista epigeneettisistä mekanismeista on DNA-metylaatio, jonka vaikutus erityisesti geenien promoottoriaalueilla on yhdistetty geenin hiljentymiseen. Aiemmissä tutkimuksissa on havaittu metylaatioasteen eroja diabeetikoiden ja verrokkien välillä HLA-geeni-alueella, jolla on vahvin yhteys T1D:n perinnölliseen alttiuteen. Niinpä syventäviin opintoihini kuuluvassa tutkimuksessani tutkittiin, esiintyykö HLA-DQB1-geenin promoottorin CpG-kohdassa -1401 metylaatioeroja diabeetikoiden ja verrokkien välillä. Lisäksi metylaatioeroja tarkasteltiin kahdessa eri riskigenotyypissä ja kolmessa T1D:n syntyyn liitetystä lymfosyyteissä: B-, CD4+ T- ja CD8+ T-soluissa.

Tutkimuksessa havaittiin, että T-soluissa esiintyi yleisesti korkeaa keskimääräistä metylaatioastetta, mikä oli odotettua, sillä T-solujen ei ajatella kuuluvan APC-soluihin, ja siten ne eivät ilmentäisi luokan II HLA-molekyylejä. Kuitenkin T-solujen metylaatioasteissa oli diabeetikoiden kesken hyvin vähäistä hajontaa toisin kuin verrokeilla. Mahdollisesti juuri verrokeilla esiintyneen hajonnan vuoksi, diabeetikoiden CD4+ T-soluissa ilmeni tilastollisesti merkittävää hypermetylaatiota verrokkeihin nähden. Huomioitavaa on, että CD4+ T- ja CD8+ T-soluihin sisältyy monimuotoiset lymfosyyttipopulaatiot; esimerkiksi tässä tutkimuksessa erikseen erotellut regulatoriset T-solut kuuluvat CD4+ T-soluihin. Regulatoriset T-solut kykenevät ilmentämään luokan II HLA-molekyylejä, ja niiden tehtävänä on hillitä muiden T-solujen reaktiivisuutta omia kudoksia vastaan [87]. Ero diabeetikko- ja verrokkiryhmien metylaatioasteiden välillä voisikin selittyä sillä, että diabeetikoilta puuttuvat tutkitun geenikohdan suhteen tietty tai tietyt hypometyloidut CD4+ T-solualatyypit, mitkä laskisivat solupopulaation keskimääräistä metylaatioastetta.

B-soluissa havaittiin genotyypistä riippuvaa eroa metylaatioasteissa: korkean riskin genotyyppiin liittyi korkeampaa keskimääräistä metylaatioastetta kohtalaisesti lisääntyneen riskin genotyyppiin nähden. Löydös voi kieliä siitä, että HLA-DQ-molekyylin ilmentyminen olisi vähäisempää korkean riskin genotyypissä. Väitettä tukee hiljattainen Kindt et al. tutkimus. Tutkimuksessa HLA-DRB5-geenin metylaatioprofiilin perusteella pystyttiin ennustamaan vähäisempää geenin ilmentymistä DR3-DQ2-haplotyypillä DR4-DQ8-haplotyyppiin nähden PBMC-näytteissä. Lisäksi samaisessa tutkimuksessa havaittiin, että DR3-DQ2/DR4-DQ8-heterotsygoottien B-soluissa ilmensivät vähemmän HLA-DR-molekyylejä verrattuna DR3-DQ2- ja DR4-DQ8-homotsygootteihin. [80] Jälkimmäinen havainto tukee ajatusta, että genotyyppi vaikuttaa HLA-molekyylin ilmentymiseen.

B-soluissa havaittiin lisäksi tilastollisesti merkittävää iästä riippuvaa metylaatioasteen vaihtelua, mikä ilmeni korkean riskin genotyypissä: alle 7-vuotiailla diabeetikoilla esiintyi hypermetylaatiota verrokkeihinsa verrattuna. Vanhemmilla lapsilla ei ollut juuri eroa metylaatioasteissa. Alle 7-vuotiaiden metylaatioeron taustalla voi olla se, että diabeetikoilla pienempi osa B-soluista toimii APC-soluina tai ne ilmentävät antigenejä HLA-DQ-molekyylin sijasta toisissa luokan II HLA-molekyyleissä. Tämä ero voisi johtaa erilaiseen taudinkuvaan, mistä on saatu viitteitä insuliitin tutkimuksista, joissa CD20Hi-insuliitti on liitetty nuoriin ja erityisesti alle 7-vuotiaihin [13, 18].

Tässä tutkimuksessa on useita rajoittavia tekijöitä, joiden takia tuloksiin täytyy suhtautua varauksella. Ensiksi, tutkimuksessa ei huomioitu DNA-metylaation vaikutusta geenin ilmentymiseen, minkä vuoksi DNA-metylaation merkitys tutkitussa kohdassa jää avoimeksi. Toiseksi, tutkimuksesta ei voida päätellä syy-seuraussuhteita, sillä kyseessä on poikkileikkaustutkimus. Kolmanneksi, tutkimushenkilöiden valikoitumisessa ei kontrolloitu ympäristötekijöitä, joilla voi olla merkittävää vaikutusta epigeneettiseen ilmiäsuun. Ympäristötekijät olisivat helpommin kaltaistettavissa, mikäli diabeetikko-verrokkiparit muodostettaisiin diskordanteista kaksosista tai iältään läheisistä sisaruspareista.

Neljänneksi, tutkimuksessa tarkasteltiin lymfosyyttipopulaatioiden keskimääräisiä metylaatioasteita, mikä saattaa kätkeä lymfosyyttipopulaatiossa esiintyvien poikkeavien lymfosyyttialatyypin hyper- tai hypometylaatio. Metylaatioasteeltaan poikkeava lymfosyyttialatyppi täytyisi kuitenkin pystyä erottamaan muista lymfosyyteistä ennen metylaation analysoimista, sillä metylaatioasteita ei voida tutkia tuhoamalla solua.

Tutkimuksen tulokset osoittavat, että DNA-metylaatiossa esiintyy eroja eri lymfosyyttipopulaatioissa, eri genotyypeissä sekä diabeetikoilla että verrokeilla, mitä on aiheellista tutkia jatkossa. Erityistä mielenkiintoa herätti CD4<sup>+</sup> T-soluissa ja CD20<sup>+</sup> B-soluissa ilmenneet ryhmien sisäiset metylaatioasteiden vaihtelut eri yksilöissä. Jatkotutkimuksissa on syytä huomioida DNA-metylaation vaikutus geenin ilmentymiseen, valkosolujen heterogeenisyyteen ja pyrkiä minimoimaan erilaisten ympäristötekijöiden vaikutusta tarkemmalla tutkimusaineiston valinnalla. Lisäksi on syytä huomioida, että DNA-metylaatio on yksi epigeneettinen mekanismi muiden joukossa, johon kuuluvat myös esimerkiksi histonimodifikaatiot ja ei-koodaavat RNA:t.

## Lähteet

1. Katsarou A, Gudbjornsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark A. Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews.Disease Primers*. 2017;3:17016. doi: 10.1038/nrdp.2017.16.
2. Bonifacio E. Predicting Type 1 Diabetes Using Biomarkers. *Diabetes Care* 2015;38(6):989-996. doi: 10.2337/dc15-0101.
3. Redondo MJ, Steck AK, Pugliese A. Genetics of type 1 diabetes. *Pediatric Diabetes*. 2018;19(3):346–353. doi: 10.1111/pedi.12597.
4. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018;391(10138):2449-2462. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5.
5. Insuliiniinpuutosdiabetes. Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin, Suomen Sisätautilääkärin yhdistyksen ja Diabetesliiton Lääkärineuvoston asettama työryhmä. Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, Helsinki. 2018. [www.kaypahoito.fi](http://www.kaypahoito.fi) Viitattu 26.3.2020.
6. *IDF Diabetes Atlas, 9th edition*. International Diabetes Federation. Brussels, Belgium. 2019:10–21,56–60,78–93,106–113.
7. Morgan NG, Richardson SJ. Fifty years of pancreatic islet pathology in human type 1 diabetes: insights gained and progress made. *Diabetologia* 2018;61:2499–2506. doi: 10.1007/s00125-018-4731-y.
8. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014;383(9911):69–82. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60591-7.
9. Anderson MS, Bluestone JA. THE NOD MOUSE: A Model of Immune Dysregulation. *Annual Review of Immunology*. 2005;23(1):447-485. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115643.
10. In't Veld P. Insulinitis in human type 1 diabetes: a comparison between patients and animal models. *Seminars in Immunopathology*. 2014;36(5):569–579. doi: 10.1007/s00281-014-0438-4.
11. Campbell-Thompson ML, Atkinson MA, Butler AE, et al. The diagnosis of insulinitis in human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2013;56:2541–2543. doi: 10.1007/s00125-013-3043-5.
12. Richardson SJ, Morgan NG, Foulis AK. Pancreatic Pathology in Type 1 Diabetes Mellitus. *Endocrine Pathology*. 2014;25:80–92. doi: 10.1007/s12022-014-9297-8.
13. Leete P, et al. Differential insulitic profiles determine the extent of  $\beta$ -cell destruction and the age at onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 2016;65:1362–1369. doi: 10.2337/db15-1615.
14. Klinke DJ 2nd. Extent of beta cell destruction is important but insufficient to predict the onset of type 1 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2008;3(1):1374. doi: 10.1371/journal.pone.0001374.
15. Krogvold L, et al. Insulinitis and characterisation of infiltrating T cells in surgical pancreatic tail resections from patients at onset of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2016;59:492–501. doi: 10.1007/s00125-015-3820-4.
16. Campbell-Thompson M, et al. Insulinitis and  $\beta$ -cell mass in the natural history of type 1 diabetes. *Diabetes*. 2016;65:719–731. doi: 10.2337/db15-0779.
17. Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, et al. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration?. *Diabetologia* 2005;48:2221–2228. doi: 10.1007/s00125-005-1949-2.
18. Arif S, Leete P, Nguyen V, et al. Blood and islet phenotypes indicate immunological heterogeneity in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2014;63(11):3835–3845. doi: 10.2337/db14-0365.

19. Burrack AL, Martinov T, Fife BT. T Cell-Mediated Beta Cell Destruction: Autoimmunity and Alloimmunity in the Context of Type 1 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:343. doi: 10.3389/fendo.2017.00343.
20. Babon JA, DeNicola ME, Blodgett DM, et al. Analysis of self-antigen specificity of islet-infiltrating T cells from human donors with type 1 diabetes. *Nature Medicine*. 2016;22(12):1482–1487. doi: 10.1038/nm.4203.
21. Roep BO, Peakman M. Antigen targets of type 1 diabetes autoimmunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012;2(4):007781. doi: 10.1101/cshperspect.a007781.
22. Skowera A, Ellis RJ, Varela-Calviño R, et al. CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope. *Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(10):3390–3402. doi: 10.1172/JCI35449.
23. Richardson SJ, et al. Islet cell hyperexpression of HLA class I antigens: a defining feature in type 1 diabetes. *Diabetologia* 2016;59:2448–2458. doi: 10.1007/s00125-016-4067-4.
24. Radenkovic M., Uvebrant K., Skog O, Sarmiento L, Avartsson J, Storm P, Vickman P, Bertilsson PA, Fex M, Korgsgren O, Cilio CM. Characterization of resident lymphocytes in human pancreatic islets. *Clinical & Experimental Immunology*. 2017;187:418-427. doi: 10.1111/cei.12892.
25. Kuric E, et al. Demonstration of Tissue Resident Memory CD8 T Cells in Insulitic Lesions in Adult Patients with Recent-Onset Type 1 Diabetes. *The American Journal of Pathology*. 2017;187(3):581-588. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.11.002.
26. Morgan NG. Bringing the human pancreas into focus: new paradigms for the understanding of Type 1 diabetes. *Diabetic Medicine*. 2017;34:879– 886. doi: 10.1111/dme.13365.
27. Ling Q, Lu J, Li J, Xu Q, Zhu D, Bi Y. Risk of beta-cell autoimmunity presence for progression to type 1 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Autoimmunity*. 2018;86:9-18. doi: 10.1016/j.jaut.2017.09.012.
28. Lampasona V, Liberati D. Islet Autoantibodies. *Current Diabetes Reports*. 2016;16:53. doi: 10.1007/s11892-016-0738-2.
29. Ziegler AG, Rewers M, Simell O, et al. Seroconversion to Multiple Islet Autoantibodies and Risk of Progression to Diabetes in Children. *JAMA*. 2013;309(23):2473–2479. doi: 10.1001/jama.2013.6285.
30. Vehik K, Lynch KF, Schatz DA, et al. Reversion of  $\beta$ -Cell Autoimmunity Changes Risk of Type 1 Diabetes: TEDDY Study. *Diabetes Care*. 2016;39(9):1535–1542. doi: 10.2337/dc16-0181.
31. Knip M, Korhonen S, Kulmala P, et al. Prediction of type 1 diabetes in the general population. *Diabetes Care*. 2010;33(6):1206–1212. doi: 10.2337/dc09-1040.
32. Cruz-Tapias P, Castiblanco J, Anaya JM. Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation. Teoksessa Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, et al. *Autoimmunity: From Bench to Bedside*. El Rosario University Press, Bogota, Colombia. 2013. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459467/> Viitattu 11.2.2020.
33. Merenmies J, Partanen J. HLA-järjestelmä ja HLA-molekyylit. Teoksessa Hedman K., Heikkinen T., Huovinen P, Järvinen A, Meri S, Vaara M. *Immunologia*. Kustannus Oy Duodecim, Helsinki. 2011. <https://www.oppiportti.fi/op/imm00601/do> Viitattu 11.2.2020.
34. Klein J & Sato A. The HLA system. First of two parts. *New England Journal of Medicine*. 2000;343, 702–709. doi: 10.1056/NEJM200009073431006.
35. IPD-IMGT/HLA Database. Anthony Nolan Research Institute. <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> Viitattu 3.2.2020
36. Robinson J, Barker DJ, Georgiou X, Cooper MA, Flicek P, Marsh SGE. IPD-IMGT/HLA Database, *Nucleic Acids Research*. 2020;48(1):948-955. doi: 10.1093/nar/gkz950.



37. Jerram ST, Leslie RD. The Genetic Architecture of Type 1 Diabetes. *Genes (Basel)*. 2017;8(8):209. doi: 10.3390/genes8080209.
38. Erlich H, et al. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes*. 2008;57:1084–1092. doi: 10.2337/db07-1331
39. Smigoc Schweiger D. High-risk genotypes HLA-DR3-DQ2/DR3-DQ2 and DR3-DQ2/DR4-DQ8 in co-occurrence of type 1 diabetes and celiac disease. *Autoimmunity*. 2016;49:240-247.
40. Noble JA. Immunogenetics of type 1 diabetes: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*. 2015;64:101-12. doi: 10.1016/j.jaut.2015.07.014.
41. Pugliese A, Boulware D, Yu L, et al. HLA-DRB1\*15:01-DQA1\*01:02-DQB1\*06:02 Haplotype Protects Autoantibody-Positive Relatives From Type 1 Diabetes Throughout the Stages of Disease Progression. *Diabetes*. 2016;65(4):1109–1119. doi: 10.2337/db15-1105.
42. Ilonen J, Lempainen J, Veijola R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;15:635–650. doi: 10.1038/s41574-019-0254-y.
43. Pociot F. Type 1 diabetes genome-wide association studies: not to be lost in translation. *Clinical & Translational Immunology*. 2017;6:e162. doi: 10.1038/cti.2017.51.
44. Sharp SA, Weedon MN, Hagopian WA, Oram RA. Clinical and research uses of genetic risk scores in type 1 diabetes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2018;50:96–102. doi: 10.1016/j.gde.2018.03.009.
45. Harjutsalo V, Reunanen A, Tuomilehto J. Differential transmission of type 1 diabetes from diabetic fathers and mothers to their offspring. *Diabetes*. 2006;55:1517-1524. doi: 10.2337/db05-1296.
46. Steck A, Barriga KJ, Emery LM, Fiallo-Scharer RV, Gottlieb PA, Rewers MJ. Secondary Attack Rate of Type 1 Diabetes in Colorado Families. *Diabetes Care*. 2005;28(2):296-300. doi: 10.2337/diacare.28.2.296.
47. Turtinen M, Härkönen T, Parkkola A, et al. Characteristics of familial type 1 diabetes: effects of the relationship to the affected family member on phenotype and genotype at diagnosis. *Diabetologia*. 2019;62:2025–2039. doi: 10.1007/s00125-019-4952-8.
48. Hamman RF, Bell RA, Dabelea D, D’Agostino RB, Dolan L, Imperatore G, et al. The SEARCH for Diabetes in Youth Study: Rationale, Findings, and Future Directions. *Diabetes Care*. 2014 Dec;37(12):3336–44. doi: 10.2337/dc14-0574.
49. Patterson CC. Trends and cyclical variation in the incidence of childhood type 1 diabetes in 26 European centres in the 25 year period 1989-2013: a multicentre prospective registration study. *Diabetologia*. 2019 Mar;62(3):408-417. doi: 10.1007/s00125-018-4763-3.
50. Hjern A, Soderstrom U. Parental country of birth is a major determinant of childhood type 1 diabetes in Sweden. *Pediatric Diabetes*. 2008;9:35–39. doi: 10.1111/j.1399-5448.2007.00267.x.
51. Feltbower RG, Bodansky HJ, McKinney PA, Houghton J, Stephenson CR, Haigh D. Trends in the incidence of childhood diabetes in south Asians and other children in Bradford, UK. *Diabetic Medicine*. 2002;19:162–166. doi: 10.1046/j.1464-5491.2002.00691.x.
52. Hussen, HI, Moradi T, Persson M. The Risk of Type 1 Diabetes Among Offspring of Immigrant Mothers in Relation to the Duration of Residency in Sweden. *Diabetes Care*. 2015;38(5):934-936. doi: 10.2337/dc14-2348.
53. Peled A, Gordon B, Twig G, et al. Immigration to Israel during childhood is associated with diabetes at adolescence: a study of 2.7 million adolescents. *Diabetologia*. 2017;60:2226–2230. doi: 10.1007/s00125-017-4399-8.



54. Kimpimäki T, Kupila A, Hämäläinen AM, Kukko M, Kulmala P, Savola K et al. The First Signs of [beta]-Cell Autoimmunity Appear in Infancy in Genetically Susceptible Children from the General Population: The Finnish Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2001;86(10): 4782-4788.
55. Moltchanova EV, Schreier N, Lammi N, Karvonen M. Seasonal variation of diagnosis of Type 1 diabetes mellitus in children worldwide. *Diabetic Medicine*. 2009;26:673-678. doi: 10.1111/j.1464-5491.2009.02743.x.
56. Dahlquist G. Can we slow the rising incidence of childhood-onset autoimmune diabetes? The overload hypothesis. *Diabetologia*. 2006;49:20–24. doi: 10.1007/s00125-005-0076-4
57. Hyöty H, Leon F, Mikael Knip. Developing a vaccine for type 1 diabetes by targeting coxsackievirus B. *Expert Review of Vaccines*. 2018;17(12):1071-1083. doi: 10.1080/14760584.2018.1548281.
58. Yoon JW, Jun HS. Viruses cause type 1 diabetes in animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1079:138-46. doi: 10.1196/annals.1375.021.
59. Jaidane H, Sane F, Gharbi J, et al. Coxsackievirus B4 and type 1 diabetes pathogenesis: contribution of animal models. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2009;25:591–603. doi: 10.1002/dmrr.995.
60. Stone VM, Hankaniemi MM, Svedin E, et al. A Coxsackievirus B vaccine protects against virus-induced diabetes in an experimental mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2018;61(22): 476–481. doi: 10.1007/s00125-017-4492-z.
61. Xia Y, Xie Z, Huang G, Zhou Z. Incidence and trend of type 1 diabetes and the underlying environmental determinants. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2019;35:3075. doi: 10.1002/dmrr.3075.
62. Yeung WC, Rawlinson WD, Craig ME. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ*. 2011;342:35. doi: 10.1136/bmj.d35.
63. Infante M, Ricordi C, Sanchez J, et al. Influence of Vitamin D on Islet Autoimmunity and Beta-Cell Function in Type 1 Diabetes. *Nutrients*. 2019;11(9):2185. doi: 10.3390/nu11092185.
64. Yang CY, Leung PS, Adamopoulos IE, Gershwin ME. The implication of vitamin D and autoimmunity: a comprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 2013;45:217-226. doi: 10.1007/s12016-013-8361-3.
65. Rewers MJ, Ludvigsson J. Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet*. 2016;387:2340–2348. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30507-4.
66. Paun A, Yau C, Danska JS. The influence of the microbiome on type 1 diabetes. *The Journal of Immunology*. 2017;198:590–595. doi: 10.4049/jimmunol.1601519.
67. Durazzo M, Ferro A, Gruden G. Gastrointestinal Microbiota and Type 1 Diabetes Mellitus: The State of Art. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(11):1843. doi: 10.3390/jcm8111843.
68. Gibney E, Nolan C. Epigenetics and gene expression. *Heredity* 2010;105,4–13. doi: 10.1038/hdy.2010.54.
69. Villota-Salazar NA, Mendoza-Mendoza A, González-Prieto JM. Epigenetics: from the past to the present. *Frontiers in Life Science*, 2016;9(4):347-370. doi: 10.1080/21553769.2016.1249033.
70. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 2012;13:484–492. doi: 10.1038/nrg3230.
71. Ponnaluri VK, Ehrlich KC, Zhang G, et al. Association of 5-hydroxymethylation and 5-methylation of DNA cytosine with tissue-specific gene expression. *Epigenetics*. 2017;12(2):123–138. doi: 10.1080/15592294.2016.1265713.

72. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *PNAS USA*. 2006;103(5):1412–1417. doi: 10.1073/pnas.0510310103.
73. Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, et al. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genetics*. 2010;6(9):1001134. doi: 10.1371/journal.pgen.1001134.
74. Bansal A, Pinney SE. DNA methylation and its role in the pathogenesis of diabetes. *Pediatric Diabetes*. 2017;18(3):167–177. doi: 10.1111/pedi.12521.
75. Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(11):805–811. doi: 10.1038/nrg2651.
76. Kim M, Costello J. DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Experimental & Molecular Medicine*. 2017;49(4):e322. doi: 10.1038/emm.2017.10.
77. Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. *Cell*. 2011;146(6):866–872. doi: 10.1016/j.cell.2011.08.042.
78. Rakyan VK, Beyan H, Down TA, et al. Identification of type 1 diabetes-associated DNA methylation variable positions that precede disease diagnosis. *PLoS Genetics*. 2011;7(9):1002300. doi: 10.1371/journal.pgen.1002300.
79. Stefan M, Zhang W, Concepcion E, Yi Z, Tomer Y. DNA methylation profiles in type 1 diabetes twins point to strong epigenetic effects on etiology. *Journal of Autoimmunity*. 2014;50:33–37. doi: 10.1016/j.jaut.2013.10.001.
80. Kindt ASD, Fuerst RW, Ziegler AG, Bonifacio E, et al. Allele-specific methylation of type 1 diabetes susceptibility genes. *Journal of Autoimmunity* 2018;89:63-74. doi: 10.1016/j.jaut.2017.11.008.
81. Paul D, Teschendorff A, Dang M, et al. Increased DNA methylation variability in type 1 diabetes across three immune effector cell types. *Nature Communications* 2016;7:13555. doi: 10.1038/ncomms13555.
82. Elboudwarej E, Noble JA, et al. Hypomethylation within gene promoter regions and type 1 diabetes in discordant monozygotic twins. *Journal of Autoimmunity*. 2016;68:23-29. doi: 10.1016/j.jaut.2015.12.003.
83. Kupila A, Muona P, Simell T, et al. Feasibility of genetic and immunological prediction of Type I diabetes in a population-based birth cohort. *Diabetologia* 2001;44:290–297. doi: 10.1007/s001250051616.
84. *PyroMark Q24 Advanced User Manual 06/2013*. Qiagen. Venlo, Netherlands. 2013.
85. *PyroMark PCR Handbook 05/2009*. Qiagen. Venlo, Netherlands. 2009.
86. Florath I, Butterbach K, Müller H, Bewerunge-Hudler M, Brenner H, Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Human Molecular Genetics*. 2014;23(5):1186–1201. doi: 10.1093/hmg/ddt531.
87. Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC Class II Expression Identifies Functionally Distinct Human Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*. 2006;176(8):4622-4631. doi: 10.4049/jimmunol.176.8.4622.