Promjena entropije metiloma kao pokazatelj epigenetičke deregulacije uzrokovane stresom ili malignom transformacijom

Rožmanić, Carmen

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:399277

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Carmen Rožmanić

Promjena entropije metiloma kao pokazatelj epigenetičke deregulacije uzrokovane stresom ili malignom transformacijom

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za epigenetiku na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc.dr.sc. Aleksandra Vojte. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

ZAHVALE

Zahvaljujem se svom mentoru, doc. dr. sc. Aleksandru Vojti na nesebičnoj potpori i razumijevanju, uloženom trudu i vremenu, savjetima i konstruktivnim kritikama koje mi je uputio tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se mojoj obitelji, posebno roditeljima i sestri Petri, svojim dragim prijateljicama Klari i Kristini i svom dečku Marku koji su uvijek tu za mene bez obzira na situaciju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

PROMJENA ENTROPIJE METILOMA KAO POKAZATELJ EPIGENETIČKE DEREGULACIJE UZROKOVANE STRESOM ILI MALIGNOM TRANSFORMACIJOM

Carmen Rožmanić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Koncept entropije prelazi granice teorijske fizike i može se proširiti na teoriju informacije, gdje je poznat kao Shannonova entropija i služi za kvantifikaciju informacijskog sadržaja poruke. Ovaj pristup može se iskoristiti za kvantitativnu procjenu varijacije metilacije DNA, koja predstavlja važan epigenetički mehanizam. Entropija sadržana u uzorku metilacije DNA (entropija metiloma) korelira sa starošću organizma, a promjene u metilaciji DNA povezane su i s kompleksnim bolestima koje prate starenje, kao što su metaboličke bolesti i rak. Djelovanjem stresa aktiviraju se obrambeni mehanizmi stanice koji su epigenetički uvjetovani. Do sada je pokazano da se epigenetičke promjene uzrokovane starenjem i malignom transformacijom odražavaju na informacijskom sadržaju, odnosno entropiji metiloma. U ovom diplomskom radu odabrani su prikladni setovi podataka iz javne baze podataka GEO, implementirana je metoda za određivanje entropije metiloma, određena je epigenetička dob uzoraka i testirana je hipoteza da su promjene uzrokovane raznim tipovima stresa na staničnoj razini analogne promjenama kod degenerativnih procesa kao što su starenje i maligna transformacija. Dobiveni rezultati nemaju statističku značajnost i ovim istraživanjem nije potvrđena postavljena hipoteza. Odabir setova podataka s većim brojem uzoraka ili određivanje entropije posebno odabranih CpG mjesta koja su specifično vezana uz stres bi moglo u budućim istraživanjima dati statistički značajne rezultate.

(29 stranica, 2 slike, 9 tablica, 27 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: epigenetika, entropija, metilom, stres

Voditelj: doc. dr. sc. Aleksandar Vojta

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Anamaria Štambuk
doc. dr. sc. Marija Gligora Udovič

Zamjena: prof. dr. sc. Mirjana Pavlica

Rad prihvaćen: 2.11.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

THE CHANGE IN METHYLOME ENTROPY AS AN INDICATOR OF EPIGENETIC DEREGULATION CAUSED BY STRESS OR MALIGNANT TRANSFORMATION

Carmen Rožmanić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

The concept of entropy exceeds the boundaries of theoretical physics and can be expanded on the theory of information where it is known as Shannon entropy. Shannon entropy is used for quantifying information content of a message. This approach can be used to evaluate the variation in DNA methylation, which represents an important epigenetic mechanism. Entropy of DNA methylation patterns (methylome entropy) correlates with chronological age, and changes in DNA methylation are associated with age-related diseases, such as cancer and metabolic disease. On cellular level, stress activates defensive mechanisms, which are epigenetically conditioned. So far it has been shown that epigenetic changes caused by aging and malignant transformation are reflected on information content, or in other words, on methylation entropy. In this thesis we selected data sets from Gene Expression Omnibus (GEO) database, we implemented the method for calculating methylation entropy, we determined the epigenetic age of selected data and we tested the hypothesis that changes caused by various types of stress on a cellular level are synonymous to changes happening in degenerative processes like aging and malignant transformation. Obtained data doesn't have statistic value, and this experiment didn't prove the hypothesis. In further experiments of this type. Choosing data sets with bigger number of samples or determinating entropy of carefully chosen CpG places which are in specific correlation with stress could in future scientific research give statistically significant results.

(29 pages, 2 figures, 9 tables, 27 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: epigenetics, entropy, methylome, stress

Supervisor: Dr. Aleksandar Vojta, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Anamaria Štambuk, Asst. Prof.

Dr. Marija Gligora Udovič, Asst. Prof.

Replacement: Dr. Mirjana Pavlica, Prof.

Thesis accepted: 2.11.2017.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Općenito o entropiji 1

1.2. Entropija u biologiji 4

1.3. Cilj istraživanja 9

2. Materijali i metode 10

2.1. Odabir odgovarajućih setova podataka 10

2.2. Analiza entropije metiloma i procjena epigenetičke dobi 10

3. Rezultati 14

3.1. Odabrani setovi podataka 14

3.2. Rezultati analize entropije metiloma na odabranim setovima podataka 18

4. Rasprava 22

5. Zaključak 26

6. Literatura 27

7. Prilozi

Životopis

1. Uvod

1.1. Općenito o entropiji

Koncept entropije prvi je puta uveo njemački fizičar Rudolf Clausius 1865. godine kako bi opisao svojstvo zatvorenog sustava koji prolazi kroz termodinamički reverzibilni proces. Svaki sustav spontano i jednosmjerno teži prema ravnoteži, što znači da ima svojstvo koje se mijenja sve dok se ne postigne ravnoteža. Ovo svojstvo termodinamičkog sustava koje poprima određene numeričke vrijednosti dok prolazi kroz promjenu, Clausius je nazvao prema grčkoj riječi τροπή (trope), što znači transformacija (promjena). Entropija (ΔS) predstavlja termodinamičku funkciju stanja sustava kojoj beskonačno mala (infinitezimalna) promjena ΔS između dva beskonačno bliska ravnotežna stanja termodinamičkog sustava iznosi:

$$\Delta S = \frac{\Delta Q}{T}$$

gdje je T – uniformna temperatura zatvorenog sustava, ΔQ – reverzibilni prijenos toplinske energije u taj sustav (toplina razmijenjena u reverzibilnom procesu kojim sustav prelazi iz jednog stanja u drugo). Entropija ovisi samo o konačnom i početnom stanju sustava, a može imati pozitivnu i negativnu vrijednost.

Osim sa značenjem transformacije (promjene) riječ entropija povezuje se i sa značenjima nered, odnosno kaos. Ludwig Boltzmann, austrijski fizičar, uočio je da svaki sustav prepušten sam sebi teži stanju najvećeg kaosa i na temelju toga uveo vezu između entropije i vjerojatnosti i tako pridonio statističkoj interpretaciji entropije. Termodinamička vjerojatnost W nekog makroskopskog stanja sustava koji se sastoji od mnoštva čestica je broj različitih mikrostanja (određeno koordinatama položaja i brzinom čestica) s kojima se može ostvariti makrostanje. Boltzmannova entropija je mjera neuređenosti sustava i proporcionalna je logaritmu broja svih mogućih mikroskopskih stanja koja su u skladu s jednim jedinim makroskopskim stanjem sustava. Boltzmannova teorija entropije glasi :

$$S = k\ logW$$

gdje je k - Boltzmannova konstanta, a W - termodinamička vjerojatnost.

Po ovoj teoriji entropija svih zatvorenih sustava u kojima se događaju ireverzibilni procesi se povećava, jer takvi sustavi teže stanju najveće vjerojatnosti, odnosno stanju s najvećom entropijom. Uzimajući neki plin kao primjer zatvorenog sustava, njegovo mikrostanje bila bi "smrznuta" slika određenog trenutka gdje bi se mogao vidjeti položaj i brzina svake molekule. Vjerojatnost da je svaka molekula u točno određenom trenutku u istom položaju i ima istu brzinu je mala, dok je vjerojatnost da su molekule u različitim položajima i imaju različite brzine mnogo veća. U tom slučaju raste vjerojatnost, pa se tako i entropija povećava. Botzmannovim otkrićem entropija je, osim svoje fenomenološke termodinamičke zasnovanosti, dobila i mikroskopsko statističko tumačenje.

Godinama nakon otkrića Clausiusa i Boltzmanna uočeno je da je koncept entropije temeljan pa njegova primjena prelazi granice fizike i termodinamike. Modificirani pojam entropije predstavio je Claude E. Shannon 1948. u svom djelu "Matematička teorija komunikacije" u području informacijske teorije (Shannon, 1948). Shannonova entropija služi za mjerenje stope nesigurnosti povezane sa stohastičkim događajem, odnosno označava očekivanu vrijednost informacije u poruci. U informatici, mjera neodređenosti informacija; postupci njihove obradbe u kojima se gubi dio informacija analogni su termodinamičkim postupcima u kojima se entropija povećava.

U informacijskoj teoriji sustavi se sastoje od odašiljača, kanala i primatelja. Ako za primjer informacijskog sustava uzmemo ljudsko društvo, odašiljač može biti osoba koja ima neku ideju a kanal je jezik kojim pričamo, slike ili pismo, odnosno bilo koji način na koji osoba odluči izraziti svoju ideju. Svaki od ovih kanala kojim se prenosi poruka je različit no količina informacije koja se prenosi je uvijek ista, a tu količinu informacije mjerimo upravo pomoću Shannonove entropije.

Koncept informacije matematički je definiran i kaže da informacija omogućava osobi u posjedu informacije predviđanje s preciznošću boljom od slučaja (Adami, 2016). Ako za entropiju kažemo da je nesigurnost (nepredvidivost) onda je informacija razrješenje, odnosno rezolucija nesigurnosti. Kako svaki događaj ima određeni ishod i ako je vjerojatnost tog događa jednaka 1 tada nam je unaprijed poznat ishod te je u tom slučaju entropija jednaka 0, jer razrješenjem događaja nismo saznali ništa što već nismo znali *a priori*. Ako slučaj ima vjerojatnost koja je različita od 1, entropija će porasti i razrješenjem slučaja saznat ćemo nešto što prije nismo znali. Ovo je lako objasniti na primjeru političkog glasanja, ankete. Ako se glasanje odvija prvi put ishod je uglavnom potpuno nepoznat i provođenjem glasanja, odnosno

dobivanjem rezultata saznat ćemo nove informacije, što znači da je *a priori* entropija ovog događaja velika. Ako isto glasanje provedemo i po drugi put nedugo nakon prvog, ishod drugog glasanja može se predvidjeti s preciznošću boljom od slučaja jer unaprijed posjedujemo informaciju (rezultati prvog glasanja). Rezultati drugog glasanja neće sadržavati nove informacije pa je u ovom slučaju *a priori* entropija manja s obzirom na *a priori* entropiju prvog događaja.

Ako želimo kvantificirati nesigurnost (entropiju) nekog fizičkog sustava to radimo preko broja stanja u kojima taj sustav može biti, odnosno vjerojatnosti (p) da se neki sustav nalazi u tom stanju. Kada se specificiraju pitanja i odredi uređaj kojim će se mjeriti stanja, entropija postaje konačna, definirana i tada o sustavu već posjedujemo određenu količinu informacija.

Najčešće se računa entropija matematičke slučajne varijable, koja se pojavljuje u određenim stanjima s određenom vjerojatnošću, jer tada posjedujemo određenu količinu informacija. Formula za entropiju slučajne varijable X koja može biti u x_i stanja s vjerojatnosti p_i je:

$$H(x) = -\sum_{i=1}^{N} p_i log p_i$$

U slučaju uniformne distribucije kada su sva stanja jednako vjerojatna, entropija (odnosno nesigurnost nekog sustava) je maksimalna. Tada nam je poznat samo broj stanja u kojemu taj sustav može biti. Entropija se računa kao logaritam broja stanja u kojem taj sustav može biti (N) u slučaju da se svako stanje pojavljuje s istom vjerojatnošću, tada je vjerojatnost p jednaka 1/N . Formula za maksimalnu entropiju:

$$H(X)_{max} = \log N_1$$

Logaritam vjerojatnosti je korisna mjera entropije jer je aditivna za neovisne izvore. Ako se određeni sustav pojavljuje u N1 različitih stanja, a drugi u N2 različitih stanja, pitanje je u koliko se stanja može pojaviti sustav koji je nastao spajanjem ova dva sustava. Odgovor je broj stanja prvog pomnožen s brojem stanja drugog (N1xN2), ali nesigurnost ovog sustava je logaritam pa se nesigurnost ne množi već se zbraja.

$$H(N_1\ N_2) = \log(N_1\ N_2) = \log(N_1) + \log(N_2)$$

Glavni cilj određivanja entropije je predvidjeti stanje slučajne varijable što točnije. Što

više informacija imamo o slučajnoj varijabli, predviđanje će biti točnije. Entropija može biti izražena u raznim jedinicama ovisno o logaritamskoj bazi. Ako je baza broj 2 entropija je izražena u bitovima, ako je baza matematička konstanta *e* tada se jedinice entropije nazivaju natovi.

Klasičan primjer za pojašnjavanje entropije je bacanje novčića. U ovom slučaju novčić je matematička varijabla X. O svakoj matematičkoj varijabli znamo da se pojavljuje u određenim stanjima s određenom vjerojatnošću a u ovom slučaju novčić se pojavljuje u dva stanja (glava i pismo) koji se pojavljuju s jednakom vjerojatnošću koja iznosi $\frac{1}{2}$. Baza logaritma je 2 pa će entropija biti izražena u bitima. Entropiju bacanja novčića možemo izračunati na slijedeći način:

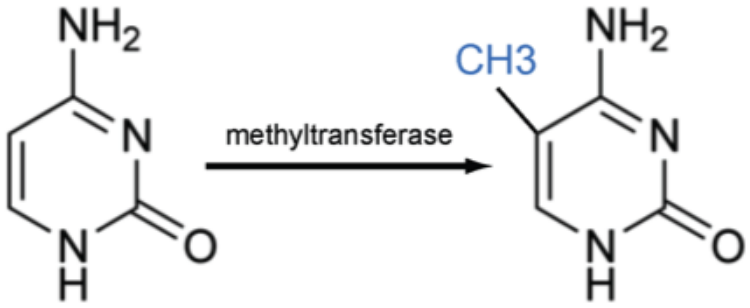
$$H(X) = -\sum_{i=1}^{n} P(x_i) \log_b P(x_i) = -\sum_{i=1}^{2} \frac{1}{2} \log_2 \frac{1}{2} = -\sum_{i=1}^{2} \frac{1}{2} (-1) = 1$$

Vrijednost entropije je u ovom slučaju 1 bit.

1.2. Entropija u biologiji

Teorija Shannonove entropije je toliko fundamentalna da prelazi granice teorijske fizike i informacijske znanosti i može se koristiti u drugim granama znanosti. U biologiji se koncept entropije može primijeniti za mjerenje količine informacije pohranjene u DNA ili proteinima, procesiranje informacija u mozgu, čak i za procjenu vjerojatnosti spontanog postanka života. Jedan od primjera korištenja entropije u biologiji je stvaranje modela stope starenja na temelju metilacijskih podataka (Hannum *i sur*, 2013).

Metilacija DNA spada u epigenetičke mehanizame, gdje dolazi do adicije metilne grupe na C5 poziciju citozina na CpG dinukleotidu (Slika 1). Ovo je najčešća kovalentna modifikacija koja se događa u genomu sisavaca (Xie *i sur*, 2011). Ovi događaji dovode do stvaranja uzorka CpG metilacije koji je dio epigenetičkog koda koji nije kodiran u sekvenci nukleotida.



Slika 1 Metilacija citozina

Hannum i sur. (2013) pokazali su da su promjene u metilaciji DNA na specifičnim CG dinukleotidima (CpG mjestima) dobar biomarker epigenetiče dobi. Metilacijske promjene povezane s godinama stečene su linearno tijekom vremena i stoga olakšavaju procjenu kronološke dobi, koja može biti bazirana na individualnim ili integriranim CpG mjestima. Na temelju 71 CpG mjesta čija je metilacija povezana sa starenjem, Hannum i sur. (2013) stvorili su kvantitativni model starenja metiloma koji omogućuje razlikovanje relevantnih faktora starenja, uključujući spol i genetičke varijante s visokom preciznošću. Pošto se ovaj model može primijeniti na različita tkiva, ukazuje na mogućnost postojanja zajedničkog molekularnog sata (epigenetičkog sata), koji je dijelom reguliran promjenama u metilomu. Sličan model za procjenu epigenetičke dobi stvorio je i Horvath (2013) bazirajući se na 353 CG dinukleotida povezanih sa starenjem.

Mehanizmi koji mijenjaju metilom tijekom starenja još su uvijek nepoznati. Moguće je da se utjecajem okoliša tijekom vremena aktiviraju stanični programi povezani s dosljednim i predvidim promjenama epigenoma (Hannum *i sur*, 2013). Dokazano je da stres mijenja ekspresiju gena preko specifičnih promjena u DNA metilaciji. Moguće su i spontane epigenetičke promjene, koje mogu nastati zbog utjecaja kemijskih agensa koji remete metilne skupine ili zbog pogrešaka u kopiranju metilacijskih stanja tijekom replikacije DNA. Ovo dovodi do razlika u metilomu jedinki koje stare, pa se može očekivati da se njihovi individualni metilomi počinju razlikovati s godinama. Ova se biološka pojava naziva epigenetički drift i bazira se na premisi da metilomi jako mladih jedinki dijele određene sličnosti koje nestaju sa starenjem (Hannum *i sur*, 2013). Ovo sve upućuje na to da je

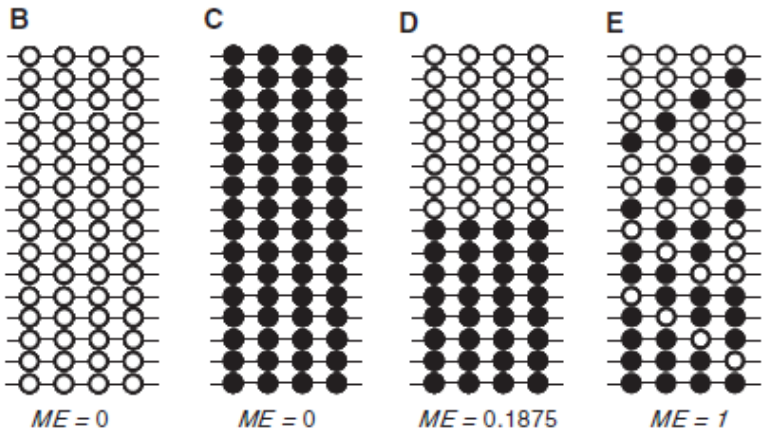
epigenom dinamičan sustav na koji utječu starenje i razni vanjski utjecaji i da se kvantitativnim mjerenjima stanja metiloma mogu identificirati faktori uključeni u sporiju ili bržu stopu starenja. Ispitivanje epigenetičkog drifta i uspostavljanje modela starenja ostvareno je računanjem Shannonove entropije ili gubitka informacijskog sadržaja u metilomu tijekom vremena. Povećanje entropije CpG markera znači da metilacijsko stanje postaje manje predvidivo u populaciji stanica. Metoda za određivanje metilacijske entropije po Hannum i sur. (2013):

$$Entropija = \frac{1}{N * \log\frac{1}{2}} \sum [MFi * \log(MFi) + (1 - MFi) * \log(1 - MFi)]$$

gdje je i-metilacijski marker (CpG mjesto), MFi - metilacijska frakcija i-tog metilacijskog markera (CpG mjesta), N - broj markera (CpG mjesta).

Metilacijska entropija može služiti i kao mjera za nasumičnost uzoraka metilacije DNA u populaciji stanica, i za procjenu varijabilnosti DNA metilacijskih uzoraka Alu ponavljanja i promotora, pa se na ovaj način može puno saznati o *genome-wide* varijaciji DNA metilacijskih uzoraka (Xie *i sur*, 2011). Podaci o metilaciji DNA temelje se na metilacijskoj razini (udjelu metiliranih CpG dinukleotida na određenoj poziciji) jednog ili više CpG mjesta, ali sama metilacijska razina ne može ponuditi odgovore o metilacijskim uzorcima. Entropija metiloma računa se preko modificirane Shannonove entropije gdje metilacijski status CpG dinukleotida može biti metiliran ili nemetiliran, a vjerojatnost jeli određeno CpG mjesto metilirano ili ne je između 0 i 1 (Xie i sur. 2011). Metilacijska entropija je minimalna kada sve promatrane molekule DNA pokazuju isti metilacijski uzorak (Slika 2. 1B i C), a maksimalna je kada su svi mogući metilacijski uzorci podjednako zastupljeni (Slika 2. 1E). Genomski lokusi s istom metilacijskom entropijom mogu imati različite srednje vrijednosti metilacijskih razina (Slika 2. 1B i C), ali genomski lokusi s različitim metilacijskim entropijama mogu imati iste srednje vrijednosti matilacijskih razina (Slika 2. 1D i E). Metilacijska entropija odražava slučajnost u distribuciji DNA metilacijskih uzoraka pa može biti indikator stohastičke metilacijske promjene. Analiza metilacijske entropije se razlikuje od konvencionalne analize metilacije DNA jer nam entropija omogućava procjenu stabilnosti i raznolikosti metilacijskih uzoraka. Entropija varira među genomskim lokusima, pri čemu metilacijska entropija većine genomskih lokusa ostaje stalna među populacijama, a u

usporedbi s normalnim tkivima, tumorska tkiva imaju veću metilacijsku entropiju (Xie i sur. 2011).



Slika 2 Genomski lokusi s različitim metilacijskim entropijama. Preuzeto iz Xie *i sur*. 2011.

Bilo kakav odmak od uskog prozora optimalnih fizičkih, kemijskih, bioloških parametara predstavlja stres, na koji sva živa bića odgovaraju adaptacijom i ponovnim uspostavljanjem homeostaze. Odgovori na stres u svim su stanicama veoma slični, a stanični putevi odgovora na stres uključuju zaustavljanje rasta, promjenu u uzorcima ekspresije i na kraju programiranu staničnu smrt. Utjecajem stresa dolazi do aktivacije raznih staničnih puteva kao što su aktivacija p53 tumor supresora (Ciccia i Elledge, 2010), stanični odgovor na toplinski šok (*heat-shock* odgovor) (Richter *i sur*, 2010), autofagni odgovor (Kroemer *i sur*, 2010), hipoksija-inducibilni faktor (HIF) odgovor (Majmundar *i sur*, 2010), aktivacija mTOR kinaze (Sengupta *i sur*, 2010) koja je važna u adaptaciji na nutritivni stres, mikro RNA mehanizam (Leung i Sharp, 2010) i translacijsko reprogramiranje (Spriggs *i sur*, 2010). Razni izvori stresa uključuju unificirane odgovore na staničnoj razini, gdje dolazi do aktivacije određenih setova gena koji kodiraju komponente odgovarajućih metaboličkih puteva odgovornih za ponovno uspostavljanje homeostaze (Vojta i Zoldoš, 2013). Ovo upućuje na moguću ulogu epigenetičke regulacije u srednjoj ili dugoj adaptaciji na specifični tip stresa. Stres može uzrokovati promjene čitavog genoma preko epigenetičkih mehanizama kao što je represivna kovalentna modifikacija DNA i histonskih proteina koji se inače nalaze u utišanom heterokromatinskom stanju. Kod ljudi nepravilna rekombinacija i kromosomski rearanžmani mogu dovesti do raka, što je u većini slučajeva karakterizirano globalnom hipometilacijom

genoma (Vojta i Zoldoš, 2013). Epigenetički putevi nisu samo mete stohastičkih promjena uzrokovanih stresom već su dio programiranih adaptivnih odgovora. Epigenetički stresni odgovor može biti kratkotrajan pa se histonske modifikacije nakon prestanka djelovanja stresora vraćaju u prvobitno stanje. Kako su epigenetički markeri pojačano osjetljivi tijekom ranih stadija razvoja moguće je da će određeni stresor utjecati na fenotip odrasle jedinke. Postoje mnogi primjeri za plastičnost ranih stadija razvoja koji rezultiraju dugoročnim adaptivnim fenotipovima. Mejotska stabilnost određenih markera upućuje na to da su ovi markeri postojani tijekom formacije gameta i nedugo nakon oplodnje, što upućuje na moguću ulogu epigenetike u (mikro)evoluciji.

Povezivanje epigenoma koji reflektira unutarstaničnu metaboličku adaptaciju na okoliš i genoma koji je stabilno nasljedstvo, predstavlja neo-lamarkistički koncept evolucije. Lamarkistički koncept evolucije pretpostavlja direktni utjecaj okoliša na nasljedna svojstva organizma i iako je ovaj pogled na evoluciju ranije odbačen, u svjetlu epigenetike i adaptacije postaje moguć. Primjer izravnog utjecaja okoliša na epigenom koji se prenosi i na potomke su lisne uši koje stvaraju veći omjer krilatih potomaka kada su izložene alarmnom feromonu (Walsh *i sur*, 2010). Krilati potomci u boljoj su mogućnosti izbjeći izvor stresa koji su zapazili i osjetili njihovi roditelji. Iako određene epigenetičke promjene mogu potrajati i nekoliko generacija, one se ne integriraju u genom i nisu dio stalnog transgeneracijskog epigenetskog nasljedstva pa ne mogu biti nazvane pravim evolucijskim silama.

Najvjerojatniji mehanizam trajne epigenetičke promjene i transgeneracijskog nasljeđivanja je metilacija gena i genskih promotora i/ili epigenetičkih kontrolnih regija (Vojta i Zoldoš, 2013). Metilacija citozina predstavlja kemijsku modifikaciju koja dovodi do većeg potencijala za mutaciju, a gusto metilirane regije kao što su CpG otoci unutar genskog promotora potencijalno imaju veću vjerojatnost mutacije. Tranzicija iz 5-metil citozina u timin, koje je nefunkcionalno popravljena pomoću metil vezujuće domene 4 (MBD4) proteina s timin DNA glikozidaznom aktivnošću, može dovesti do C-T tranzicije.

1.3. Cilj istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja su: (1) implementirati metodu za računanje entropije epigenoma u programskom okruženju R, (2) odrediti stupanj promjene entropije, odnosno deregulacije metiloma na odabranim setovima podataka implementiranom metodom te (3) procijeniti epigenetičku dob uzoraka iz odabranih setova podataka. Hipoteza istraživanja je da stres uzrokuje sličnu deregulaciju epigenoma kao starenje ili maligna transformacija, što se može pokazati određivanjem informacijskog sadržaja metiloma.

Određivanjem promjene entropije metiloma, koja je mjera stupnja epigenetičke deregulacije, može se povući paralela između degenerativnih promjena kod starenja (Hannum i sur 2013, Horvath, 2013), malignih tumora (Menichetti *i sur*, 2013, 2015) i stresa (Vojta i Zoldoš, 2013). Hannum i sur. (2013) napravili su model za predikciju dobi iz odabranih CG dinukleotida (CpG mjesta) i uočili da tumori brže "stare". Bazirajući se na ovo istraživanje pretpostavljamo da je moguće na isti način proučavati i stres, i vidjeti da li stanične linije na koje djeluje određena vrsta stresa brže stare.

2. Materijali i metode

Setovi metilacijskih podataka za izradu ovog diplomskog rada preuzeti su iz javne baze podataka *Gene Expression Omnibus* (GEO). Na tim je podacima provedena analiza entropije metiloma.

2.1. Odabir odgovarajućih setova podataka

Odgovarajući podaci metilacije traženi su u javnoj bazi podataka *Gene Expression Omnibus* (GEO). Traženi podaci morali su zadovoljavati definirane kriterije. Prihvatljive platforme baziraju se na sustavu preklapajućih polja (*tiling array)*, gdje je dostupna i usporediva metilacija pojedinačnih CpG mjesta. Prihvatljiva su istraživanja rađena na staničnim linijama, gdje su stanice tretirane raznim toksičnim agensima, odnosno bilo kojim načinom na koji bi stanice bile izvrgnute stresu i pogodno je da su pokusi izvršeni na različitim vrstama organizama. Ključne riječi po kojima se pretraživala baza podataka uključuju: metilacija (*methylation)*, stres *(stress)*, toksin *(toxin)*, etanol *(ethanol)*, okoliš *(environment)*, okolišni stres *(environmental stress)*, abiotički stres *(abiotic stress)*, stanična linija *(cell line)*, animalno tkivo *(animal tissue)*, biljno tkivo *(plant tissue)*, radijacija *(radiation)*, toplinski šok *(heat shock)*, oksidativni stres *(oxidative stress)*, metalni ion *(metal ion)*, arsen *(arsenic)*, teški metal *(heavy metal)*.

2.2. Analiza entropije metiloma i procjena epigenetičke dobi

Nakon selekcije setova podataka, odabrani podaci analizirani su korištenjem programskog okruženja R (R core team, 2015), metodom za određivanje metilacijske entropije prema Hannum i sur. (2013):

$$Entropija = \frac{1}{N * \log\frac{1}{2}} \sum [MFi * \log(MFi) + (1 - MFi) * \log(1 - MFi)]$$

gdje je i-metilacijski marker (CpG mjesto), MFi - metilacijska frakcija i-tog metilacijskog markera (CpG mjesta), N - broj markera (CpG mjesta). Izvorni kôd je naveden kao Prilog 1.

Izračunate su vrijednosti entropije za cjelokupni metilom, a nakon toga i samo za odabrana CpG mjesta koja su prikazana u Tablici 1 prema Hannum i sur. (2013). Dobivene

vrijednosti entropije za tretirane i netretirane uzorke su uspoređene s obzirom na trend između tretiranih uzoraka i kontrola te Studentovim t-testom.

Osim entropije određena je i epigenetička dob prema regresijskim koeficijentima prema Hannum i sur. (2013). Određena je epigenetička dob za tretirane stanice i kontrole iz odabranih setova podataka za koje je prethodno izračunata srednja vrijednost ukupne entropije i entropije za odabrana CpG mjesta.

Tablica 1 Odabrana CpG mjesta i regresijski koeficijenti prema Hannum i sur. 2013

Marker	Kromosom	Pozicija	Gen	CpG otok	Regresijski koeficijent
cg20822990	1	17338766	ATP13A2,SDHB	Ne	-15,7
cg22512670	1	26855765	RPS6KA1	Ne	1,05
cg25410668	1	28241577	RPA2,SMPDL3B	Ne	3,87
cg04400972	1	1,18E+08	TRIM45,TTF2	Da	9,62
cg16054275	1	1,7E+08	F5,SELP	Ne	-11,1
cg10501210	1	2,08E+08	C1orf132	Ne	-6,46
cg09809672	1	2,37E+08	EDARADD	Ne	-0,74
ch.2.30415474F	2	30561970	LBH	Ne	5,79
cg22158769	2	39187539	ARHGEF33	Da	-2,06
cg02085953	2	97202260	ARID5A	Ne	1,02
cg06639320	2	1,06E+08	FHL2	Da	8,95
cg22454769	2	1,06E+08	FHL2	Da	4,85
cg24079702	2	1,06E+08	FHL2	Da	2,48
cg23606718	2	1,32E+08	FAM123C	Da	8,35
cg22016779	2	2,3E+08	DNER,RNU7-9P	Ne	1,79
cg04474832	3	52008487	ABHD14A,ABHD14B,ACY1,GPR62,PCBP4,RPL29	Ne	-7,1
cg03607117	3	53080440	SFMBT1	Da	10,7
cg07553761	3	1,6E+08	SMC4,TRIM59	Da	3,72
cg00481951	3	1,87E+08	SST	Ne	-2,72
cg25478614	3	1,87E+08	SST	Ne	4,01
cg25428494	4	84255411	HPSE	Ne	-1,81
cg02650266	4	1,48E+08	POU4F2	Da	10,2
cg08234504	5	1,39E+08	CTD-3224K15.2,CXXC5,UBE2D2	Ne	-3,16
cg23500537	5	1,4E+08	PCDHB1	Ne	5,67
cg20052760	6	10510789	GCNT2	Ne	-12,6

cg16867657	6	11044877	ELOVL2	Da	10,8
cg22736354	6	18122719	NHLRC1,TPMT	Da	4,42
cg06493994	6	25652602	SCGN	Da	9,42
cg06685111	6	30295466	XXbac-BPG283O16.8	Ne	-13,1
cg00486113	6	31105711		Ne	-10,7
cg13001142	6	1,48E+08	STXBP5	Ne	-5,8
cg20426994	7	1,3E+08	KLF14	Da	19,1
cg14361627	7	1,3E+08	KLF14	Da	10,7
cg08097417	7	1,3E+08	KLF14	Da	27,3
cg07955995	7	1,3E+08	KLF14	Da	13,7
cg22285878	7	1,3E+08	KLF14	Da	-20,7
cg03473532	7	1,31E+08	MKLN1	Ne	-3,31
cg08540945	7	1,53E+08		Da	9,41
cg07927379	7	1,56E+08	C7orf13,RNF32	Da	-1,42
cg16419235	8	57360613	PENK	Da	-1,6
cg07583137	8	82644012	CHMP4C,ZFAND1	Ne	3,03
cg22796704	10	49673534	ARHGAP22	Ne	-10,6
cg19935065	10	98062687	DNTT	Ne	13,4
cg23091758	11	9025767	NRIP3,SCUBE2	Da	-0,392
cg23744638	11	10323902	ADM,AMPD3,SBF2	Ne	0,0859
cg04940570	11	12696758	TEAD1	Da	11,6
cg11067179	11	66083541	CD248,RIN1,TMEM151A	Ne	14,7
cg22213242	11	66083573	CD248,RIN1,TMEM151A	Da	23,7
cg06419846	11	66083697	CD248,RIN1,TMEM151A	Da	13,4
cg02046143	11	1,34E+08	IGSF9B	Ne	-10,2
cg00748589	12	11653486		Da	8,21
cg19722847	12	30849114	CAPRIN2,IPO8	Ne	-5,66
cg18473521	12	54448265	HOXC4,HOXC5	Ne	8,85
cg01528542	12	81468232	ACSS3	Ne	-2,98
ch.13.39564907R	13	40666907		Ne	-20,6
cg03032497	14	61108227	SIX1	Ne	8,4
cg04875128	15	31775895	OTUD7A	Da	-4,37
cg21296230	15	33010536	GREM1	Da	8,39
cg09651136	15	72525012	PARP6,PKM2	Ne	-15,8
cg03399905	15	79576060	ANKRD34C	Da	28
cg04416734	16	30075192	ALDOA,PPP4C	Ne	11,9
cg07082267	16	85429035		Ne	2,87

cg14692377	17	28562685	BLMH,SLC6A4,SNORD63.3	Da	19,1
cg06874016	17	40177415	DNAJC7,NKIRAS2,ZNF385C	Ne	-4,37
cg21139312	17	55663225	MSI2	Ne	17,1
cg02867102	17	62398693		Ne	-12,5
cg19283806	18	66389420	CCDC102B,TMX3	Ne	-4,29
cg14556683	19	15342982	BRD4,EPHX3	Da	-4,04
cg07547549	20	44658225	MMP9,SLC12A5	Da	3,11
cg05442902	22	21369010	LZTR1,MIR649,P2RX6,SLC7A4,THAP7	Ne	-22,7
cg08415592	22	36648973	APOL1,APOL2,Z82215.1	Ne	-6,92

Dijagnostički model starenja napravljen je preko multivarijatnog linearnog modela baziranog na algoritmu *Elastic Net* implementiranom u R paketu ''glmnet'' (Friedman *i sur*, 2010). Ovaj je pristup kombinacija tradicionalne *Lasso and ridge* regresijske metode, a koristi se za stvaranje linearnih modela u situacijama kada broj varijabli (markera) uvelike premašuje broj uzoraka. Ovom metodom dobivene su vrijednosti regresijskih koeficijenata za određivanje epigenetičke dobi. Za testiranje statističke značajnosti podataka metilacije i epigenetičke dobi izabran je Studentov t-test, a normalna distribucija je potvrđena Kolmogorov-Smirnov testom u programskom okruženju R, korištena je funkcija "ks.test()" iz R paketa "stats".

3. Rezultati

3.1. Odabrani setovi podataka

Setovi podataka preuzeti iz javne baze podataka GEO sastoje se od vrijednosti metilacijskih frakcija za autosomalne kromosome izmjerene metodom *Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip*. Ova platforma koristi *BeadChip* tehnologiju za profiliranje metilacije DNA duž čitavog ljudskog genoma, odnosno kvantificira razinu metilacije na specifičnim lokusima unutar genoma. Nakon sistematskog pretraživanja baze podataka prema unaprijed odabranim ključnim riječima izabrani su slijedeći podaci:

1. [GSE75963] Metilacijski profil izazvan reduciranom reprezentacijom bisulfidnog sekvenciranja (RRBS) H2O2-tretiranih i netretiranih HCT116 stanica - *Methylation profile generated by reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) of H2O2-treated and untreated HCT116 cells*

2.[$GSE72120$] Epigenetičko profiliranje nedonoščadi otkriva razlike u metilaciji DNA na mjestima (lokusima) povezanim s neuralnom funkcijom - *Epigenomic profiling of preterm infants reveals DNA methylation differences at sites associated with neural function*

3.[$GSE72354$] DNA metilacijski potpis izazvan prenatalnim majčinskim stresnim izlaganjem prirodnim katastrofama: Projekt Snježna oluja - *DNA methylation signatures triggered by prenatal maternal stress exposure to a natural disaster: Project Ice Storm*

4.[$GSE59592$] Analiza metiloma kod dojenčadi iz Gambije / Aflatoksin / Istraživanje sezonalnosti - *DNA methylome analysis in infants from The Gambia / Aflatoxin / Seasonality study*

5.[$GSE71398$] Tumorska hipoksija uzrokuje hipermetilaciju DNA reduciranjem TET aktivnost - *Tumor hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity (BeadChip)*

6.[$GSE69634$] Izloženost olovu inducira promjene u 5-hidroksimetilcitozin nakupinama u CpG otocima u ljudskim embrionskim stanicama i umbilikalnoj krvi – *Lead exposure induces changes in 5-hydroxymethylcytosine clusters in CpG islands in human embryonic stem cells and umbilical cord blood [Pb_hESC]*

7.[$GSE57853$] Analiza epigenoma kod konzumacije alkohola u stanicama limfocita - *Epigenome analysis of alcohol consumption in lymphocyte cell (LC) samples*

8.[GSE89400] Klonalna varijacija odgovora na lijekove i radijaciju među stanicama glioma je povezan s proneuralnom-mezenhimalnom tranzicijom *(Methylation BeadChip)* - *Clonal variation in drug and radiation response among glioma-initiating cells is linked to proneural-mesenchymal transition (Methylation BeadChip)*

9.[GSE77696] Analiza epigenoma kod infekcije HIV-om - *Epigenome-wide assoication analysis of HIV infection*

10.[GSE83379] Mapiranje epigenetičkih promjena na genomu stanica domaćina induciranih vrstom *Burkholderia pseudomallei* otkriva patogen specifične i opće potpise infekcije patogenom - *Mapping epigenetic changes to the host cell genome induced by Burkholderia pseudomallei reveals pathogen-specific and pathogen-generic signatures of infection*

11.[GSE59457] DNA metilacijske razine različitih područja mozga iz HIV+ i HIV- subjekata - *DNA methylation levels of various brain regions from HIV+ and HIV- subjects*

12.[GSE54895] Mitohondrijski-izveden oksidativni stres mijenja ekspresiju gena i metilaciju DNA u srcu (metilacija) - *Mitochondrial-derived Oxidative Stress Alters Gene Expression and DNA Methylation in the Heart [methylation]*

13.[GSE72867] DNA metilacijski odgovor hematopoetskih matičnih stanica na rekombinantnu lentivirusnu vektorsku infekciju - *DNA methylation response of hematopoietic stem cells to recombinant lentiviral vector infection*

14.[GSE54399] Stres, nasljeđe, tip tkiva i varijacija ljudskog metiloma - *Stress, heritability, tissue type and human methylome variation*

15.[GSE77445] Razine metilacije DNA duž čitavog genoma i promijenjena kortizolna stresna reaktivnost uslijed traume u djetinjstvu kod ljudi - *Genome-wide DNA methylation levels and altered cortisol stress reactivity following childhood trauma in humans*

16.[GSE27865] Bisfenol A inducira ekspresiju gena koji popravljaju DNA u ljudskim epitelnim stanicama dojke (metilacijski podaci)- *Bisphenol A Induced* the Expression of DNA Repair Genes in Human Breast Epithelial Cells (methylation data)

17.[GSE65266] Ograničeni dokazi za dosljedne promjene metilacijskih uzoraka kod kukuruza uslijed okolišnog stresa - *Limited evidence for consistent changes in maize DNA methylation patterns following environmental stress*

18.[GSE23243] Stresom inducirana aktivacija heterokromatinske transkripcije - *Stress-induced activation of heterochromatic transcription*

19.[GSE63189] Metilacija DNA upravljana RNA 4 modulira rezistenciju na hladnoću kod *Arabidopsis*a preko puta posredovanim C-ponavljajućim faktorom vezanja - *RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 4 modulates cold stress resistance in Arabidopsis through the C-REPEAT-BINDING FACTOR-mediated pathway*

20.[GSE71046] Analiza transkriptoma lista kukuruza (Zea mays) uslijed abiotičkog stresa kod divljeg tipa i RNA polimeraza IV mutanta - *Maize (Zea mays) leaf transcriptome analysis under abiotic stress in wild type and RNA Polymerase IV mutant*

21.[GSE11563] Adaptacija arhitekture korijena zbog utjecaja abiotičkog stresa - *Adaptation of Root Architecture to Abiotic Stress*

22.[GSE43166] Disbalans folata i vitamina B12 inducira stres endoplazmatskog retikuluma i ekspresiju gena za biosintezu kolesterola u ljudskim adipocitima - *Folate and vitamin B12 imbalance induces endoplasmic reticulum stress and cholesterol biosynthesis gene expression in human adipocytes*

23.[GSE21141] Derivacija ljudskih embrionskih matičnih stanica prije inaktivacije X kromosoma pod utjecajem fizioloških koncentracija kisika - *Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations*

24.[GSE67008] Duga ncRNA regulira metilaciju specifičnih lokusa u odgovoru na niske doze radijacije - *PARTICLE - a triplex-forming long ncRNA regulates locus specific methylation in response to low dose irradiation*

25.[GSE90811] Profiliranje ekspresije gena / spajanje uzoraka u iAs-transformiranim stanicama duž čitavog genoma - *Genome-wide profiling of gene expression/splicing patterns in iAs-transformed cells*

26.[GDS3848] Odgovor HMEC-1 endotelne stanične linije na infekciju *Rickettsiom prowazekii - HMEC-1 endothelial cell line response to infection by Rickettsia prowazekii*

Nakon provedbe analize određeni podaci nisu zadovoljavali uvjete i provedena je još jedna razina selekcije među navedenim setovima metilacijskih podataka. Određeni podaci odbačeni su zbog (1) neodgovarajućih platformi, (2) druge vrste eksperimenta, (3) neki nisu sadržavali podatke o metilaciji ili su (4) podaci bili za više razina izloženosti stresu umjesto tražene jedne razine (Tablica 2). Ostalo je 5 setova podataka na kojima je provedena analiza (Tablica 3).

Tablica 2 Podaci odbačeni nakon pokušaja provedbe analize

Podaci odbačeni zbog neodgovarajuće platforme	Podaci odbačeni zbog druge vrste eksperimenta	Podaci koji ne sadrže podatke o metilaciji	Podaci za više razina izloženosti stresu
GSE75963	GSE89400	GSE69634	GSE72354
GSE23243	GSE54399	GSE77696	GSE59592
GSE63189		GSE27865	GSE54895
GSE71046			GSE72867
GSE11563			GSE77445
GSE43166			GSE65266
GSE21141			
GSE67008			
GSE90811			
GDS3848			

Tablica 3 Odabrani setovi podataka preuzeti iz GEO javne baze podataka

Broj u GEO bazi	uzorci		referenca
	tretirani	kontrole	
GSE72120	36 djece rođene prije 32. tjedna trudnoće	36 zdrave djece rođene nakon 37. tjedna trudnoće	(Sparrow *i sur*, 2016)
GSE71398	12 hipoksičnih tumorskih uzoraka	12 normoksičnih tumorskih uzoraka	(Thienpont *i sur*, 2017)
GSE57853	limfociti pojedinaca koji konzumiraju alkohol (uzorci krvi uzeti za vrijeme dolaska u liječničku ustanovu i 4 tjedna nakon početka liječenja od ovisnosti)	limfociti pojedinaca koji ne konzumiraju alkohol (uzorci uzeti jednom)	(Philibert *i sur*, 2014)
GSE59457	uzorci iz HIV+ subjekata iz raznih dijelova mozga: •*cerebellum* (20 HIV+ uzoraka)	uzorci iz HIV- kontrola: • *cerebellum* (4 kontrole)	(Horvath i Levine, 2015)

	•frontalni režanj (2 HIV+ uzorka) •medijalni frontalni korteks (18 HIV+ uzoraka) •okcipitalni korteks (59 HIV+ uzoraka)	• frontalni režanj (4 kontrole) • hipokampus (4 kontrole) • okcipitalni korteks (13 kontrola) • temporalni korteks (4 kontrole)	
GSE83379	stanična linija ljudskih leukemičnih monocita - *human leukemic monocyte cell line* (U937,ATCC CRL-1593.2) • U937 stanice su diferencirane u makrofage i zaražene kulturom bakterije *B. pseudomallei* K96243 razrijeđenom u mediju L15	nezaražene kontrole su prekrivene samo medijem L15	(Cizmeci *i sur*, 2016)

3.2. Rezultati analize entropije metiloma na odabranim setovima podataka

Nakon provedbe analize entropije u programskom okruženju R, dobiveni su podaci ukupne metilacije, metilacije 71 CpG mjesta prema Hannumu i sur. (2013) i epigenetičke dobi za pet odabranih setova podataka.

Podaci metilacije dobiveni istraživanjem pod nazivom „Epigenetičko profiliranje nedonoščadi otkriva razlike u metilaciji DNA na lokusima povezanim s neuralnom funkcijom“ (Sparrow *i sur*, 2016) činili su prvi set podataka. Analizom entropije metiloma nije dobivena statistički značajna razlika između tretiranih uzoraka (DNA ekstrahirana iz sline

36 djece rođene prije 32. tjedna trudnoće) i zdravih kontrola (djeca rođena nakon 37. tjedna trudnoće). Podaci su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4 Rezultati analize seta podataka GSE72120 - Epigenetičko profiliranje nedonoščadi otkriva razlike u metilaciji DNA na lokusima povezanim s neuralnom funkcijom

	Srednja ukupna entropija	Srednja epigenetička dob	Srednja entropija odabranih CpG mjesta
Tretirani	0,4146	8,0559	0,3706
Kontrole	0,4172	7,0055	0,3690

Drugi set podataka dobiven je kao rezultat profiliranja metilacije DNA normoksičnih i hipoksičnih stanica koje su uzete iz uzoraka raka pluća (Thienpont *i sur*, 2017). Tretirani uzorci, odnosno hipoksične tumorske stanice raka pluća analizom entropije nisu pokazali statistički značajnu razliku srednje ukupne entropije, srednje entropije odabranih CpG mjesta i epigenetičke dobi u odnosu na kontrolu (normoksične tumorske stanice). Podaci su prikazani u Tablici 5.

Tablica 5 Rezultati analize seta podataka GSE71398 - Tumorska hipoksija uzrokuje hipermetilaciju DNA reduciranjem TET aktivnost

	Srednja ukupna entropija	Srednja epigenetička dob	Srednja entropija odabranih CpG mjesta
Tretirani	0,5453	39,8009	0,5988
Kontrole	0,5569	41,4592	0,6176

Treći su set podataka podaci DNA metilacijskog profiliranja limfocita pojedinaca koji konzumiraju alkohol i kontrolnih uzoraka (Philibert i sur, 2014). Rezultati analize entropije metiloma tretiranih uzoraka i kontrola pokazuju statistički neznačajnu razliku između vrijednost srednje ukupne entropije i epigenetičke dobi. Statistički značajna razlika zapažena je kod srednje entropije odabranih CpG mjesta, gdje veću vrijednost entropije imaju

kontrolni uzorci (osobe koje ne konzumiraju alkohol). Rezultati analize prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6 Rezultati analize seta podataka GSE57853 - Analiza epigenoma kod konzumacije alkohola u stanicama limfocita

	Srednja ukupna entropija	Srednja epigenetička dob	Srednja entropija odabranih CpG mjesta
Tretirani	0,5841	48,6368	0,7289
Kontrole	0,5861	47,3052	0,7396

Uzorci metilacije DNA ljudskih makrofaga koji su inficirani unutarstaničnom bakterijom vrste *Burkholderia pseudomallei*, koja uzrokuje melioidozu (Cizmeci i sur, 2016) činili su četvrti set podatka. Analizom podataka dobiveni su podaci koji su prikazani u Tablici 7. Analizom entropije metiloma nije dobivena statistički značajna razlika između vrijednosti entropije i epigenetičke dobi tretiranih uzoraka (makrofazi zaraženi bakterijom) i kontrola (nezaražene stanice).

Tablica 7 Rezultati analize seta podataka GSE83379 - Mapiranje epigenetičkih promjena na genomu stanica domaćina induciranih Burkholderiom pseudomallei otkriva patogen specifične i opće potpise infekcije patogenom

	Srednja ukupna entropija	Srednja epigenetička dob	Srednja entropija odabranih CpG mjesta
Tretirani	0,6195	175,6014	0,5798
Kontrole	0,6164	176,4531	0,5754

Posljednji set podataka metilacije DNA je bio preuzet iz istraživanja metilacijskih DNA profila različitih ljudskih područja mozga i procijene utjecaja infekcije HIV-om na razinu metilacije DNA (Horvath i Levine, 2015). Analizom podataka stanice zaražene HIV-om pokazale su statistički neznačajnu razliku vrijednosti srednje ukupne entropije, srednje

entropije odabranih CpG mjesta i epigenetičke dobi u odnosu na kontrole. Rezultati analize prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8 Rezultati analize seta podataka GSE59457 - DNA metilacijske razine različitih područja mozga iz HIV+ i HIV- subjekata

	Srednja ukupna entropija	Srednja epigenetička dob	Srednja entropija odabranih CpG mjesta
Tretirani	0,6045	29,2947	0,6688
Kontrole	0,6095	29,7681	0,6695

P-vrijednosti (p) dobivene Studentovim t-testom prikazane su u Tablici 9. P-vrijednosti dobivene Studentovim t-testom nisu pokazale statistički značajnu razliku između dobivenih entropija tretiranih i kontrolnih uzoraka, osim kod entropije odabranih CpG mjesta u setu podataka GSE57853.

Tablica 9 P-vrijednosti (p) dobivene Studentovim t-testom

Set podataka	GSE72120	GSE71398	GSE57853	GSE83379	GSE59457
Ukupna entropija	0,4359	0,6959	0,5552	0,6650	0,4139
Entropija odabranih CpG mjesta	0,7091	0,7613	0,0115	0,5039	0,9563
Epigenetička dob	0,1413	0,8538	0,4705	0,5294	0,6094

4. Rasprava

Nakon pretraživanja baze podataka GEO po unaprijed odabranim ključnim riječima odabrani su podaci na kojima je nakon provedbe analize entropije metiloma provedena još jedna selekcija. Velik broj setova podataka odbačen je zbog neodgovarajuće platforme. Ograničenje kod odabira setova podataka predstavljalo je što su kod svih setova podataka vrijednosti metilacijskih frakcija izmjerene metodom *Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip*. Takvi setovi podataka ograničeni su na istraživanja humanog genoma, odnosno staničnih linija humanog podrijetla.

Rezultati analize entropije metiloma nisu pokazali velike razlike u samim vrijednostima ukupne entropije, entropije za 71 CpG mjesto i epigenetičke dobi između kontrola i tretiranih uzoraka, što je i očekivano jer je riječ o prosječnoj entropiji po jednom CpG mjestu, gdje su vrijednosti normalizirane od 0 do 1. Razine stresa koje su utjecale na stanice, u većini eksperimenata nisu bile visokog intenziteta, pa se nije očekivala velika promjena globalne metilacijske entropije.

Rezultati Studentovog t-testa pokazuju da rezultati analize entropije metiloma pet odabranih setova podataka nemaju statističku značajnost. Važno je naglasiti da Studentov t-test nema veliku statističku snagu kod ovog tipa podataka, zbog čega bi se uz relativno nisku razinu stresa na staničnom nivou trebalo analizirati veće setove podataka, koji trenutno nisu dostupni. Alternativa bi bili setovi metilacijskih podataka gdje su stanice bile izložene jačem stresu (npr. toksikološka istraživanja), no ograničenje na *Illumina* platformu za koju je implementirana računalna analiza entropije isključilo je takve setove podataka. Zbog nedovoljne statističke snage testa razlike između tretiranih uzoraka i kontrola nisu statistički značajne, a da bi se ona dobila trebalo bi prikupiti i analizirati više uzoraka. Sama razlika bila bi mala jer se vrijednosti metilacije kreću u rasponu između 0 i 1.

Prvi set podataka činile su razine metilacije prerano rođene djece (Sparrow *i sur*, 2016). Uranjeni porod zahvati 5-13% novorođenčadi i poznat je kao rano životni stresor koji je povezan s raznim neurološkim bolestima kao što su cerebralna paraliza, kognitivni poremećaj, autizam i psihijatrijske bolesti (Sparrow *i sur*, 2016). Ozbiljnost poremećaja povezana je s gestacijskom dobi prilikom rođenja i sa štetnim izlaganjem upali, ishemiji, respiratornim bolestima i suboptimalnoj prehrani. Pošto je metilacija DNA dinamična tijekom razvoja, uključujući i područje mozga, pretpostavila sam da bi ovi podaci mogli pokazati razliku u ukupnim entropijama i da bi prerano rođena djeca mogla pokazati povećanu

epigenetičku dob. Rezultati analize nisu pokazali statistički značajnu razliku između tretiranih i kontrolnih uzoraka što je suprotno očekivanju. Za analizu procjene epigenetičke dobi po modelu Hannum i sur. (2013) DNA se ekstrahira iz krvi, dok se u ovom slučaju ekstrahirala iz sline pa to može biti razlog statistički neznačajne razlike u epigenetičkoj dobi.

Promjena metiloma može se zapaziti i kod tumorskih stanica pod utjecajem hipoksije. Tumorska hipoksija reducira aktivnost TET enzima ovisnih o kisiku, koji kataliziraju demetilaciju DNA preko oksidacije 5-metil citozina (Thienpont *i sur*, 2017). Ovaj događaj je neovisan o promjenama u ekspresiji gena TET povezanih s hipoksijom, bazalnom metabolizmu, aktivnosti HIF ili reaktivnim kisikovim radikalima nastalim u jezgri, već izravno ovisi o nedostatku kisika. Gubitak TET aktivnosti induciran hipoksijom povećava hipermetilaciju na genskim promotorima *in vitro*, i kod pacijenata su promotori primjetno više metilirani u hipoksičnim nego normoksičnim tumorima. Analiza podataka preuzetih iz istraživanja „Hipermetilacija promotora tumor supresorskog gena (TSG) pridonosi rastu stanica raka“ (Thienpont *i sur*, 2017) pokazala je da nema statistički značajne razlike među entropijama metiloma i epigenetičke dobi tretiranih i kontrolnih uzoraka. Ovakvi rezultati suprotni su očekivanju jer tumorska hipoksija reducira TET aktivnost što uzrokuje smanjene 5-hidroksimetil citozina pretežno na promotorima i pojačivačima, odnosno povećanje 5-metil citozina na tim mjestima (Thienpont *i sur*, 2017) pa sam pretpostavila da bi tumorska hipoksija mogla deregulirati metilom što bi se moglo vidjeti razlikom u entropiji između hipoksičnih i normoksičih tumora.

Podaci profiliranja metilacije DNA iz limfocita pojedinaca koji konzumiraju alkohol i kontrolnih uzoraka također su se činili kao dobar izbor za provedbu analize entropije pod utjecajem stresa. Alkohol je poznat kao stresor i u stanicama promovira stvaranje kisikovih radikala (*reactive oxygen species*, ROS), malih visoko reaktivnih molekula koje se prirodno stvaraju u stanicama tijekom metaboličkih reakcija. ROS mogu reagirati s molekulama kao što su masti, proteini i DNA i tako ih oštetiti i dovesti stanicu u stanje stresa, nakon čega dolazi do aktivacije različitih staničnih puteva, kao što je na primjer aktivacija staničnog odgovora na toplinski šok (*heat-shock* staničnog odgovora) (Richter *i sur*, 2010) i aktivacija p53 tumor supresora (Liu *i sur*, 2009). Pošto je toplinski šok (*heat-shock)* jedan od unificiranih staničnih odgovora na stres kontroliranih epigenetičkim procesima, a p53 tumor supresorski protein aktivni transkripcijski faktor koji organizira i regulira stanične odgovore na razne vrste stresa (Liu *i sur*, 2009) pretpostavila sam da bi stanice tretirane alkoholom mogle imati promijenjenu razinu metilacije DNA koja će se odraziti na entropiju metiloma. Osim što aktivira stanične

odgovore na stres, alkohol stimulira aktivnost enzima citokroma P450s, koji doprinose stvaranju ROS, može povisiti razine određenih metala koji također pridonose produkciji ROS i u stanju je reducirati razine molekula koje mogu smanjiti količine ROS kao što su antioksidansi (Defeng i Cederbaum, 2003). Velika količina ROS dovodi do oštećenja DNA i ubrzanog starenja pa je očekivano da će epigenetička dob tretiranih uzoraka biti veća. Analiza je pokazala da dobiveni podaci ukupne entropije i epigenetičke dobi nisu statistički značajni što je suprotno očekivanju. Statistički značajna razlika zapažena je kod podataka dobivenih za srednju entropiju 71 odabranog CpG mjesta gdje veću vrijednost pokazuju kontrolni uzorci, što je također suprotno očekivanju jer zbog prije navedenih razloga alkohol može deregulirati metilom.

Kako razne infekcije predstavljaju određeni stres na stanice podaci istraživanja metiloma uslijed infekcije patogenom također su bili pogodni za provedbu analize. Infekcija HIV-om povezana je s kliničkim simptomima ubrzanog starenja što dokazuje povećana učestalost i raznolikost bolesti povezanih sa starenjem u ranoj dobi. Na molekularnoj razini infekcija HIV-om utječe na razinu metilacije DNA i povezana je sa značajnim povećanjem starosti metiloma u moždanom tkivu i krvi (Horvath i Levine, 2015). Analiza podataka preuzetih iz istraživanja DNA metilacijskih profila različitih ljudskih područja mozga i utjecaja infekcije HIV-om na razinu metilacije DNA (Horvath i Levine, 2015), također nije pokazala statistički značajne razlike u dobivenim podacima, što je u potpunosti suprotno očekivanju. Pošto je analiza epigenetičke dobi u izvornom istraživanju pokazala da tretirani uzorci imaju veće vrijednosti epigenetičke dobi u odnosu na kontrole (Horvath i Levine, 2015), pretpostavljam da je u ovom istraživanju trebalo analizirati 353 CpG mjesta prema Horvathu (2013) za dobivanje entropije odabranih CpG mjesta i epigenetičke dobi kao što je to učinjeno u izvornom istraživanju. Moguće je da bi se tada dobili veći iznosi entropije i epigenetičke dobi za uzorke zaražene HIV-om u odnosu na kontrolu. Podaci metilacije DNA ljudskih makrofaga koji su inficirani unutarstaničnom bakterijom vrste *Burkholderia pseudomallei*, koja uzrokuje melioidozu pokazali su značajne promjene u metilaciji DNA stanica domaćina na višestrukim CpG mjestima u domaćinskom genomu (Cizmeci *i sur*, 2016). Rezultati analize pokazali su da nema statističke značajnosti kod dobivenih vrijednosti entropije i epigenetičke dobi. To je suprotno očekivano jer istraživanja upućuju da bakterije mogu utjecati na kromatinsku strukturu i transkripcijski program domaćinskih stanica preko interakcije s raznim epigenetičkim faktorima (Bierne *i sur*, 2012). Rezultati procjene epigenetičke dobi također su ispali suprotno očekivanju jer bi infekcija mogla ubrzati starenje

epigenoma. Patogene bakterije uzrokuju genomsku nestabilnost i mitohondrijsku disfunkciju što su oznake starenja. Smanjuju transkripciju i translaciju molekula esencijalnih u popravku DNA i povećava produkciju ROS, što dovodi do nastanka mutacija i genomske nestabilnosti (Strickertsson *i sur*, 2014).

Iako u ovom istraživanju rezultati nemaju statističku značajnost, vjerujem da se pronalaskom većeg broja setova podataka može provesti istraživanje koje će pokazati značajnu razliku između entropija tretiranih i kontrolnih uzoraka. Pretpostavljam da bi specifičan odabir CpG mjesta koja su povezana sa stresom, slično kao kod procjene epigenetičke dobi gdje je odabrano 71 CpG mjesto povezano sa starenjem (Hannum *i sur*, 2013), mogao otkriti značajnu razliku između entropija tretiranih i kontrolnih uzoraka. Tijekom pretraživanja podataka trebalo bi proširiti broj prihvatljivih platformi i bazirati se na pronalaženje pokusa rađenih na staničnim linijama, biljnim i životinjskim. Druga mogućnost je da se dobiveni podaci obrade drugim, složenijim tipom statističke analize koja bi imala veću snagu i bila prikladnija za ovakav tip podataka (gdje je broj uzoraka relativno mali i same vrijednosti se kreću između 0 i 1) za koju pretpostavljam da bi mogla pokazati značajne razlike kod dobivenih podataka.

5. Zaključak

U ovom istraživanju htjeli smo pokazati da stres uzrokuje sličnu deregulaciju epigenoma kao starenje ili maligna transformacija, određivanjem informacijskog sadržaja metiloma. Rezultati analize metiloma nisu potvrdili postavljenu hipotezu, jer svi analizirani setovi podataka nisu pokazali statistički značajno veće vrijednosti entropije kod tretiranih uzoraka kada su bili obrađeni Studentovim t-testom. Statistička značajnost možda bi se pokazala složenijim analizama koje imaju veću statističku snagu u odnosu na Studentov t-test, odnosno ako bi postali dostupni setovi podataka sa znatno većim brojem uzoraka. Odabranim statističkim testom nije potvrđena postavljena hipoteza da stres uzrokuje sličnu deregulaciju epigenoma kao starenje ili maligna transformacija, što se može pokazati određivanjem informacijskog sadržaja metiloma, odnosno nije odbačena nul-hipoteza da nema razlike među skupinama tretiranih i kontrolnih uzoraka. Prilikom izvođenja budućih istraživanja trebalo bi proširiti broj prihvatljivih platformi tijekom pretraživanja podataka što će omogućiti pronalaženje pokusa rađenih na staničnim linijama, biljnim i životinjskim i pronaći setove podataka s velikim brojem uzoraka.

6. Literatura

Adami C, Adami C (2016). What is information ? † Opinion piece Subject Areas : Author for correspondence : *Philos Trans R Soc A* .

Bierne H, Hamon M, Cossart P (2012). Epigenetics and bacterial infections. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: .

Ciccia A, Elledge SJ (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol Cell* **40**: 179–204.

Cizmeci D, Dempster EL, Champion OL, Wagley S, Akman OE, Prior JL, *i sur* (2016). Mapping epigenetic changes to the host cell genome induced by Burkholderia pseudomallei reveals pathogen-specific and pathogen-generic signatures of infection. *Sci Rep* **6**: 30861.

Defeng W, Cederbaum AI (2003). Alcohol, Oxidative stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Res Heal* **27**: 277–284.

Friedman J, Hastie T, Tibshirani R (2010). Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. *J Stat Softw* **33**: 1–20.

Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sadda S, *i sur* (2013). Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol Cell* **49**: 359–367.

Horvath S (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome biol* **14**: R115.

Horvath S, Levine AJ (2015). HIV-1 infection accelerates age according to the epigenetic clock. *J Infect Dis* **212**: 1563–1573.

Kroemer G, Mariño G, Levine B (2010). Autophagy and the Integrated Stress Response. *Mol Cell* **40**: 280–293.

Leung AKL, Sharp PA (2010). MicroRNA Functions in Stress Responses. *Mol Cell* **40**: 205–215.

Liu B, Chen Y, Clair DKS (2009). NIH Public Access. *Free Rad Bio Med* **44**: 1529–1535.

Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC (2010). Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Mol Cell* **40**: 294–309.

Menichetti G, Bianconi G, Castellani G, Giampieri E, Remondini D (2015). Multiscale characterization of ageing and cancer progression by a novel network entropy measure. *Mol BioSyst* **11**: 1824–1831.

Menichetti G, Bianconi G, Giampieri E, Castellani G, Remondini D (2013). Network Entropy measures applied to different systemic perturbations of cell basal state. 1–19.

Philibert RA, Penaluna B, White T, Shires S, Gunter T, Liesveld J, *i sur* (2014). A pilot examination of the genome-wide DNA methylation signatures of subjects entering and exiting short-term alcohol dependence treatment programs. *Epigenetics* **9**: 1212–1219.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. https://www.R-project.org/

Richter K, Haslbeck M, Buchner J (2010). The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol Cell* **40**: 253–266.

Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM (2010). Regulation of the mTOR Complex 1 Pathway by Nutrients, Growth Factors, and Stress. *Mol Cell* **40**: 310–322.

Shannon CE (1948). A mathematical theory of communication. *Bell Syst Tech J* **27**: 379–423.

Sparrow S, Manning JR, Cartier J, Anblagan D, Bastin ME, Piyasena C, *i sur* (2016). Epigenomic profiling of preterm infants reveals DNA methylation differences at sites associated with neural function. *Transl Psychiatry* **6**: e716.

Spriggs KA, Bushell M, Willis AE (2010). Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress. *Mol Cell* **40**: 228–237.

Strickertsson JAB, Desler C, Rasmussen LJ (2014). Impact of bacterial infections on aging and cancer: Impairment of DNA repair and mitochondrial function of host cells. *Exp Gerontol* **56**: 164–174.

Thienpont B, Steinbacher J, Zhao H, Anna FD, Schoonjans L, Hermans E, *i sur* (2017). Europe PMC Funders Group Tumor hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. **537**: 63–68.

Vojta A, Zoldoš V (2013). Adaptation or malignant transformation: The two faces of epigenetically mediated response to stress. *Biomed Res Int* **2013**: .

Walsh TK, Brisson JA, Robertson HM, Gordon K, Jaubert-Possamai S, Tagu D, *i sur* (2010). A functional DNA methylation system in the pea aphid, Acyrthosiphon pisum. *Insect*

Mol Biol **19**: 215–228.

Xie H, Wang M, Andrade A De, Bonaldo MDF, Galat V, Arndt K, *i sur* (2011). Genome-wide quantitative assessment of variation in DNA methylation patterns. *Nucleic Acids Res* **39**: 4099–4108.

7. Prilozi

Prilog 1

```
## Prilog 1: skripta u programskom okruženju R za izračun entropije

# izračun entropije

# markeri i koeficijenti prema: Hannum 2013
MM<-read.table(file="mmc2.csv",sep=";",dec=",",header=TRUE,as.is=TRUE)
Hannum_probes<-MM$Marker
Hannum_coeffs<-as.numeric(MM$Coefficient)
Hannum<-data.frame(ref=Hannum_probes,a=Hannum_coeffs,stringsAsFactors=FALSE)

# funkcija za izračun entropije
#  (Hannum 2013, DOI:10.1016/j.molcel.2012.10.016)
entropy<-function(X) {
  x<-na.omit(X)
  E<-0
  N<-length(x)
  for(i in 1:N) {
    if(!(x[i]==0 | x[i]==1)) {
      E<-E+x[i]*log2(x[i])+(1-x[i])*log2(1-x[i])
    }
  }
  E<-abs(1/N*E)
  return(E)
}

crunch_set<-function(GSE,CMD="source_name_ch1",ITEM=1,GRP="case",refs=NA) {
  #                                                                                XX<-
getGEO(file=paste0("GSE",as.character(GSE),"_family.soft"),GSEMatrix=FALSE)
  gsms<-names(XX@gsms)
  if (is.na(refs)) {refs<-as.character(XX@gsms[[i]]@dataTable@table$ID_REF)}
  ee<-numeric(); tt<-character(); ss<-logical()
  for (i in gsms) {
    probes<-as.character(XX@gsms[[i]]@dataTable@table$ID_REF)
    e<-entropy(as.numeric(XX@gsms[[i]]@dataTable@table$VALUE)[probes %in% refs])
    t<-XX@gsms[[i]]@header[[CMD]][ITEM]
    s<-grepl(GRP,t)
    ee<-c(ee,e)
    tt<-c(tt,t)
    ss<-c(ss,s)
  }
  RES<-list(dataset=paste0("GSE",as.character(GSE)),
            sample=gsms,
            description=tt,
            cases=ss,
            entropy=ee,
            mean_entropy=mean(ee),
            mean_entropy_cases=mean(ee[ss]),
            mean_entropy_controls=mean(ee[!ss]),
            t_test=try(t.test(ee[ss],ee[!ss])$p.value)
            )
  return(RES)
}

# pomoćne funkcije

load_set<-function(GSE) {
  DS<-getGEO(file=paste0("GSE",as.character(GSE),"_family.soft"),GSEMatrix=FALSE)
```

```
}

list_meta<-function(XX,CMD="source_name_ch1",ITEM=1) {
  gsms<-names(XX@gsms)
  for (i in gsms) {
    print(XX@gsms[[i]]@header[[CMD]][ITEM])
  }
}

show_data<-function(XX) {
  gsms<-names(XX@gsms)
  for (i in gsms) {
    print(XX@gsms[[i]]@dataTable@table$VALUE)
  }
}

## obrada podataka

# Xa<-try(crunch_set(72120,CMD="source_name_ch1",ITEM=1,GRP="preterm"))
# Xb<-try(crunch_set(71398,CMD="source_name_ch1",ITEM=1,GRP="hypoxic"))
# Xc<-try(crunch_set(57853,CMD="source_name_ch1",ITEM=1,GRP="Case"))
# Xd<-try(crunch_set(83379,CMD="source_name_ch1",ITEM=1,GRP="pseudomallei"))
# Xe<-try(crunch_set(59457,CMD="description",ITEM=2,GRP="HIV"))
# Xf<-try(crunch_set(72867,CMD="source_name_ch1",ITEM=1,GRP="LV"))

crunch_them<-function(GSE,CMD="source_name_ch1",ITEM=1,GRP="case",pick) {
  XX<-getGEO(file=paste0("GSE",as.character(GSE),"_family.soft"),GSEMatrix=FALSE)
  gsms<-names(XX@gsms)
  ee<-aa<-tt<-numeric()
  ss<-logical()
  for (i in gsms) {

    TMP<-data.frame(ref=as.character(XX@gsms[[i]]@dataTable@table$ID_REF),
                    val=as.numeric(XX@gsms[[i]]@dataTable@table$VALUE),
                    stringsAsFactors=FALSE)
    TMx<-data.frame(ref=pick$ref,stringsAsFactors=FALSE)
    TMx<-merge(x=TMx,y=TMP,by="ref",all.x=TRUE,stringsAsFactors=FALSE)
    TMx[is.na(TMx)]<-0
    TMx<-merge(x=TMx,y=pick,by="ref",all.x=TRUE,stringsAsFactors=FALSE)
    a<-entropy(TMx$val)
    e<-as.numeric(TMx$a %*% TMx$val)

    t<-XX@gsms[[i]]@header[[CMD]][ITEM]
    s<-grepl(GRP,t)
    ee<-c(ee,e)
    aa<-c(aa,a)
    tt<-c(tt,t)
    ss<-c(ss,s)
  }
  RES<-list(dataset=paste0("GSE",as.character(GSE)),
            sample=gsms,
            description=tt,
            cases=ss,
            age=ee,
            entropy=aa,
            mean_age=mean(ee),
            mean_age_cases=mean(ee[ss]),
            mean_age_controls=mean(ee[!ss]),
            t_test_age=try(t.test(ee[ss],ee[!ss])$p.value),
            mean_entropy=mean(aa),
            mean_entropy_cases=mean(aa[ss]),
            mean_entropy_controls=mean(aa[!ss]),
            t_test_entropy=try(t.test(aa[ss],aa[!ss])$p.value)
  )
  return(RES)
}

Ya<-try(crunch_them(72120,CMD="source_name_ch1",ITEM=1,GRP="preterm",pick=Hannum))
```

```
Yb<-try(crunch_them(71398,CMD="source_name_ch1",ITEM=1,GRP="hypoxic",pick=Hannum))
Yc<-try(crunch_them(57853,CMD="source_name_ch1",ITEM=1,GRP="Case",pick=Hannum))
Yd<-
try(crunch_them(83379,CMD="source_name_ch1",ITEM=1,GRP="pseudomallei",pick=Hannum)
)
Ye<-try(crunch_them(59457,CMD="description",ITEM=2,GRP="HIV",pick=Hannum))

RES<-list(Ya,Yb,Yc,Yd,Ye)

# serijalizacija i spremanje

saveRDS(RES,file="entropy_age.RDS")
```

Životopis

Osobni podaci

- Carmen Rožmanić
- 18.1.1994. u Rijeci
- Trsatske stube Petra Kružića 20, Rijeka
- carmen.rozmanic@gmail.com

Obrazovanje

- 2008. – 2012. Prva sušačka hrvatska gimnazija u rijeci, prirodoslovno-matematički smjer
- 2012. – 2015. preddiplomski studij biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu
- 2015. – sada diplomski studij eksperimentalne biologije, modul: Fiziologija i imunobiologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu

Stipendije i nagrade

- od prve godine studija (2012.) stipendist sam grada Rijeke za deficitarno zanimanje
- 2014. posebna rektorova nagrada za Istraživačko-edukacijski projekt „Grabovača 2014.“