Promjena CpG metilacije u promotoru gena BACH2 u pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva

Jelušić, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:217:604185

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

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Barbara Jelušić

Promjena CpG metilacije u promotoru gena *BACH2* u pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju pod vodstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš na mentorstvu i prilici da sudjelujem u ovom projektu. Veliko hvala na vremenu, pristupačnosti i trudu kako bih stekla znanje o znanstvenom pisanju i razmišljanju. Razgovorima i zanimljivim raspravama o diplomskog radu, kao i na sastancima Vaše istraživačke grupe, dobila sam uvid u razvoj znanstvenih projekata i motivaciju za svoj budući rad.

Najiskrenije hvala Mariji Klasić na vodstvu i nezamjenjivom doprinosu izradi ovog diplomskog rada. Uz prijateljski odnos i ugodnu atmosferu naučili ste me mnogo, te sam kroz Vaše povjerenje stekla sigurnost i samostalnost u radu u laboratoriju. Hvala na nebrojenim odgovorima na moja pitanja i velikoj pomoći pri shvaćanju korištenih metoda, te pružanju općih znanja o radu i razmišljanju znanstvenog istraživača.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji, posebice roditeljima. Od početka mog školovanja do danas pružali ste mi beskompromisnu podršku, razumijevanje i nemjerljivu pomoć bez da sam morala tražiti, ne očekujući ništa zauzvrat. Pustili ste me da odredim svoj put uvijek iskazujući poštovanje prema mojim odlukama. Bili ste mi utjeha u teškim razdobljima, motivacija i vjera u moje sposobnosti kad bih je izgubila, i dijelili ste sa mnom uzbuđenja i veselja koja mi je ovaj studij pružao. Usadili ste mi vječnu znatiželju za svijet koji nas okružuje, i oduševljenje za sva njegova mala i velika čuda koje nam znanost rasvjetljuje. Vječno sam vam zahvalna za sav vaš rad, žrtvu i ljubav koji su me doveli ovdje gdje jesam.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Promjena CpG metilacije u promotoru gena *BACH2* u pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva

Barbara Jelušić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Crohnova bolest (CD) i ulcerozni kolitis (UC) pripadaju grupi kroničnih bolesti koje karakterizira upala dijelova probavnog sustava, a objedinjene su pod zajedničkim nazivom upalne bolesti crijeva. Etiopatogeneza uključuje disbiozu crijevne mikroflore i poremećaj u funkciji imunološkog sustava. Proteinski produkt gena *BACH2* transkripcijski je faktor s važnom ulogom u razvoju, aktivaciji i sazrijevanju B limfocita te regulaciji i senescenciji T limfocita i proizvodnji citokina. Na taj način, BACH2 ima ključnu ulogu u održavanju imunološke homeostaze. Cjelogenomske asocijacijske studije povezale su *BACH2* s brojnim autoimunim bolestima, uključujući upalne bolesti crijeva. Cilj ovog istraživanja je analizirati metilaciju DNA u promotoru gena *BACH2* iz krvi osoba oboljelih od CD i UC te zdravih osoba. U tu svrhu upotrijebljeno je pirosekvenciranje nakon bisulfitne konverzije DNA te je određen stupanj metilacije CpG dinukleotida u tri fragmenta gena *BACH2*, od kojih se dva nalaze u promotoru, a jedan u prvom intronu gena. Rezultati pokazuju statistički značajnu promjenu u CpG metilaciji gena *BACH2* između pacijenata s upalnim bolestima crijeva i zdravih ljudi te ukazuje na potencijal ovoga gena kao metilacijskog biomarkera u perifernoj krvi.

(50 stranica, 12 slika, 3 tablice, 88 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: Crohnova bolest, ulcerozni kolitis, crijevni mikrobiom, CpG otok, biomarkeri iz krvi
Voditelj: Prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš
Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš,
Prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin
Izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec
Rad prihvaćen: 18. veljače 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Change in CpG methylation of *BACH2* gene promoter in patients with inflammatory bowel disease

Barbara Jelušić
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Crohn's disease and ulcerative colitis belong to a group of chronic diseases characterized by intestinal inflammation, with a common name of inflammatory bowel diseases. Ethiopatogenesis includes dysbiosis of the gut microbiota and impaired function of the immune system. The protein product of the *BACH2* gene is a transcription factor with a significant role in development, activation and maturation of B lymphocytes, as well as regulation and senescence of T-lymphocytes and antibody production. Therefore, BACH2 has the key role in maintaining immune homeostasis. Genome-wide association studies revealed a connection between *BACH2* and a number of autoimmune diseases, including inflammatory bowel disease. In this experiment, we analysed DNA methylation in *BACH2* gene promoter isolated from blood samples of individuals suffering from CD and UC as well as healthy controls. For this purpose, methylation status was determined for each CpG dinucleotide in three *BACH2* fragments using bisulfite pyrosequencing method. Two of the fragments are located in the gene promoter, and the third is in the first intron of the gene. The results show statistically significant change in the methylation pattern of *BACH2* gene in patients with inflammatory bowel diseases compared to healthy individuals, thus revealing the potential of this gene as a methylation biomaker in peripheral blood.

(50 pages, 12 figures, 3 tables, 88 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: Crohn's disease, ulcerative colitis, gut microbiom, CpG island, blood biomarker
Supervisor: PhD Vlatka Zoldoš, Associate professor
Reviewers: PhD Vlatka Zoldoš, Associate professor
PhD Gordana Lacković-Venturin, Professor
PhD Mirta Tkalec, Associate professor
Thesis accepted: 18th February 2015

Sadržaj

1. *Uvod* 1
1.1 Upalne bolesti crijeva 1
1.1.1 Crijevna mikroflora u upalnim bolestima crijeva 1
1.1.2 Imunološki sustav u upalnim bolestima crijeva 3
1.1.3 Genetički polimorfizmi povezani s upalnim bolestima crijeva 5
1.2 Epigenetički mehanizmi 5
1.3 Metilacija DNA 7
1.3.1 Metode određivanja metilacije DNA 10
1.3.2 Određivanje metilacije DNA s pomoću bisulfitnog pirosekvenciranja 12
1.3.3 Promjena stupnja metilacije DNA u bolestima čovjeka 13
1.3.4 Metilacija DNA kao biomarker 13
1.4. Gen *BACH2* 15
1.5. Cilj istraživanja 17

2. *Materijal i metode* 18
2.1 Uzorci krvi i stanične linije 18
2.2 Bisulfitna konverzija 18
2.3 Dizajn početnica 19
2.4 Umnožavanje fragmenata DNA 22
2.5 Pirosekvenciranje 23
2.6 Statistička obrada podataka 26

3. *Rezultati* 27
3.1 Provjera PCR reakcije 27
3.1. Kontrola kvalitete bisulfitne konverzije 27
3.2 Uzorak metilacije gena *BACH2* promijenjen je kod osoba oboljelih od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa 28
3.3 Stupanj metilacije CpG dinukleotida ovisan je o položaju DNA fragmenta 32

4. *Rasprava* 34

5. *Zaključak* 40

6. *Literatura* 41

7. *Životopis* 50

1. Uvod

1.1 Upalne bolesti crijeva

Crohnova bolest (engl. *Crohn's disease*, CD) i ulcerozni kolitis (engl. *ulcerative colitis*, UC) najpoznatiji su tipovi upalnih bolesti crijeva (engl. *inflammatory bowel diseases*, IBD). Obje bolesti prati kronično, remitirajuće stanje autoimunih značajki bez postojanja adekvatnog trajnog lijeka. Međusobno se razlikuju etiološki i klinički. Ulcerozni kolitis označava upalu u gornjem mukoznom sloju, te u manjem omjeru submukoznom sloju stijenke debelog crijeva, šireći se primarno iz rektuma. Upalni procesi jednoliko i kontinuirano obuhvaćaju stanjeno debelo crijevo čemu je posljedica često rektalno krvarenje. Nasuprot tome, Crohnova se bolest može razviti u bilo kojem području gastrointestinalnog trakta zahvaćajući crijevnu stijenku cijelom dubinom. Upala se može detektirati u odvojenim manjim područjima i često se manifestira zadebljanom stijenkom crijeva. Simptomi koje obje bolesti dijele uključuju abdominalnu bol, anemiju, povišenu temperaturu, gubitak težine, gubitak apetita, umor, povraćanje, bol u zglobovima, itd. (Baumgart i Sandborn 2007). Zbog načina života povoljnog za razvoj ovih bolesti, u zapadnim zemljama IBD već duže vrijeme predstavlja rastući problem. Prevalencija upalnih bolesti crijeva 2012. godine bila je najviša u Europi (505 osoba oboljelih od ulceroznog kolitisa i 322 osobe oboljele od Crohnove bolesti na 100 000 osoba) i u Sjevernoj Americi (249 UC, 319 CD na 100 000 osoba). Incidencija se povećava i u zemljama u razvoju. Bolest najviše pogađa mlađe populacije u industrijaliziranim urbaniziranim područjima. 78.0% istraživanja incidencije Crohnove bolesti i 51.1% istraživanja ulceroznog kolitisa objavila su najveću incidenciju kod osoba od 20 do 29 godina starosti (Molodecky i sur. 2012).

1.1.1 Crijevna mikroflora u upalnim bolestima crijeva

Etiopatogeneza upalnih bolesti crijeva nije još razjašnjena, iako se pretpostavlja da uzrok uključuje (1) genetičku predispoziciju, (2) imunološku reakciju na crijevnu mikrofloru i (3) utjecaje okoliša. Iako se u prvim fazama istraživanja ovih

bolesti pokušavalo pronaći jedinstveni patogen koji bi mogao pokrenuti upalnu kaskadu, rezultati posljednjih deset godina ukazuju da je vjerojatnije promijenjena crijevna mikroflora (ukupni sastav mikroorganizama) pacijentovog probavnog sustava. Mikrobiom označava ukupni genetički materijal mikroorganizama koji žive u ljudskom tijelu. Odnos čovjeka i njegove mikroflore je mutualistički – obje strane imaju koristi od zajedničkog života. Normalna crijevna mikroflora sastoji se od 1 100 vrsta bakterija, s najmanje 160 vrsta u pojedinom ljudskom organizmu. Različite ljudske populacije, s različitom prehranom, imaju jedan od tri otkrivena enterotipa, što je klasifikacija grupe organizama u ljudskom probavnom sustavu određena različitim količinama dominantne grupe bakterija (Arumugam i sur. 2011). Disbioza, trajna promjena normalnog crijevnog mikrobioma s nestajanjem mutualizma domaćina i bakterija, vjerojatno je definirajući aspekt razvoja IBD. Disbioza ima neke zajedničke karakteristike za sve tipove upalnih bolesti crijeva – poput smanjenja zastupljenosti i raznovrsnosti pripadnika iz koljena *Firmicutes*, ili povećanja broja i smanjenje raznovrsnosti bakterija iz koljena *Bacteroidetes*. Navedena su koljena, uz *Actinobacteria* i *Proteobacteria,* najzastupljenija u čovjekovom probavnom traktu. Povećane koncentracije vrste *Escherichia coli* iz koljena *Proteobacteria*, uključujući patogene varijante, dokumentirane su u Crohnovoj bolesti koja zahvaća ileum. Osim promijenjene taksonomije, mijenja se i metabolizam mikrobioma. Metagenomske analize pokazale su za 25% smanjen broj gena, dok su metaproteomske analize otkrile smanjenje u broju proteina i staničnih procesa u IBD-u. Izmijenjen je anaerobiozni status mikrobiota, metabolizam ugljikohidrata, interakcije s domaćinom, te sekretorni enzimi domaćina (Tong i sur. 2013). Pitanje koje se postavlja je da li su promjene u mikrobiomu rezultat aberantnog imunološkog odgovora genetički podložnog organizma, ili promjene u mikrobiomu dovode do nepravilnog imunološkog odgovora. Studije blizanaca pokazale su veću povezanost fenotipa bolesti nego genotipa domaćina s crijevnom mikroflorom (Willing i sur. 2010). S druge strane, istraživanje mikroflore u grupama pacijenata s rizičnim alelima gena *NOD2* i *ATG16L1* vezanim za imunološki sustav pokazalo je da su ti genotipi značajno povezani s promjenom mikrobiološkog sastava. Faktor koji se treba uzeti u obzir je i tip bolesti – spomenuta dva alela povezana su s Crohnovom bolešću koja zahvaća ileum, a ne debelo crijevo (Hold i sur. 2014). Proglašavanje određenih genetičkih defekata uzrokom disbioze predstavlja i dalje izazov, te se može naslutiti kompleksnost uloge imunološkog sustava u IBD-u.

1.1.2 Imunološki sustav u upalnim bolestima crijeva

Normalni epitel crijeva izložen je visokoj gustoći raznovrsnih mikroorganizama i time kontinuiranoj komunikaciji sa stanicama domaćina. Prva linija obrane je mukus, zaštitni sloj na unutrašnjoj površini probavnog sustava kojeg luče sekretorne stanice. Imunološki sustav mora pružati obranu od patogena i ulaska viška mikroorganizama u tkivo, u isto vrijeme održavajući imunološku toleranciju prema ostatku mikroflore. Ravnoteža ova dva aspekta komunikacije sa stranim mikroorganizmima naziva se imunološka homeostaza. Poremećena ravnoteža predisponira organizam za razvitak IBD-a. Određene vrste bakterija mogu utjecati na ravnotežu u populacijama regulatornih (Treg) i efektorskih T limfocita, međutim, točan doseg utjecaja različitih vrsta bakterija na pravilan odgovor domaćina nije poznat. Stanice epitela te prirođenog i stečenog imunološkog sustava kao prvi korak u obrani od intestinalnih mikroorganizama koriste receptore za prepoznavanje uzorka (engl. *pattern recognition receptors*, *PRR*). Prepoznavanje kroz PRR aktivira signalne puteve citokina (malih proteina međustanične komunikacije) i kemokina (citokina koji utječu na migraciju stanica), anti-mikrobne proteine, fagocitozu (unos i razgradnju stranih organizama), autofagiju (razgradnju inficiranih stanica), proizvodnju reaktivnih dušikovih i kisikovih radikala, te aktivaciju odgovora T i B limfocita. U probavnom sustavu, odgovor plazma stanica nastalih iz aktiviranih B limfocita jedinstven je po tome što se proizvode velike količine antitijela IgA. On neutralizira patogene molekule i mikroorganizme, ograničavajući tako njihov prodor u tkiva domaćina. Važan put koji doprinosi IBD-u je put aktivacije pomoćničkih T limfocita 17 (Th17) i djelovanja citokina koje Th17 sekretira, posebice interleukina 23 (IL-23). Pro-inflamatorni citokini kojima IL-23 pripada moraju biti pažljivo regulirani kako ne bi doveli do kronične upale (Abraham i Medzhitov 2011).

Mehanizmi imunološke tolerancije prema crijevnom mikrobiotu dijele se na (1) minimiziranje izloženosti mikroorganizmima i imunološko prepoznavanje mikroflore, te na (2) smanjenje imunološkog odgovora intra- i interstaničnim mehanizmima. Imunološka tolerancija potaknuta je i signalima samih mikroorganizama. Bakterijski lipopolisaharidi (LPS) primjer su takvog signala. U fetalnim epitelnim stanicama probavnog sustava LPS uzrokuju aktivaciju transkripcijskog faktora NF-κB i sekreciju kemokina, dok takav odgovor izostaje u

neonatalnom i odraslom dobu. Odgovor organizma promijenjen je nakon dugotrajne povećane izloženosti LPS-u. Bakterijske interakcije s određenim namirnicama mogu proizvesti produkte kao što su kratkolančane masne kiseline koje smanjuju upalne odgovore probavnog sustava. Također, izlaganje antigenima potiče toleranciju T limfocita. Stanice prirođenog imunološkog sustava, u koje spadaju makrofazi, dendritske stanice i neutrofili, direktno i indirektno reguliraju stanice stečenog imunološkog sustava, T i B limfocite. Tako npr. dendritske stanice i makrofazi normalnog crijevnog imunološkog sustava proizvode protuupalni interleukin 10 (IL-10), transformirajući faktor rasta (engl. *transforming growth factor*) TGF-β i retinoičnu kiselinu. Navedene molekule potpomažu diferencijaciju Foxp3-Treg limfocita (engl. *forkhead box P3*) važnih za supresiju imunološkog odgovora. Mnogi stanični tipovi reagiraju na spomenute protuupalne molekule, te je pokazan spontani nastanak kolitisa u miševa s nedostatkom IL-10 i TGF-β. Izostanak ovih molekula i/ili promjena sastava citokina koje proizvode dendritske stanice lamine proprije i makrofazi iz protuupalnih u pro-upalne prorjeđuje Treg i povećava količine Th1 i Th17, koji doprinose IBD-u. Također, ovaj put je visoko podložan utjecajima iz okoliša. Fizička barijera sastavljena od epitelnih stanica postaje propusnija u IBD-u, zbog nepravilnog funkcioniranja kritičnih međustaničnih nepropusnih spojeva. No, kao i u većini procesa u upalnim bolestima crijeva, nepravilna regulacija samo jedne komponente ne dovodi do bolesti – potrebno je više pogrešaka u sustavu. Osim toga, za većinu njih se ne zna jesu li posljedica ili uzrok bolesti (Abraham i Medzhitov 2011).

Još jedan element etiopatogeneze IBD-a je glikozilacija, na što su ukazala mnoga genetička i imunološka istraživanja. Kompleksni oligosaharidi, glikani, vezani su za lipide ili proteine (glikoproteini) na površinama stanica, te čine dio membranskih i sekretornih proteina poput imunoglobulina (Hart i Copeland 2010). Alternativna glikozilacija imunoglobulina može dovesti do promjena u njihovoj imunološkoj funkciji (Kaneko i sur. 2006). Glikozilacija je asocirana s kompleksnim upalnim bolestima, što ukazuje na bitnu ulogu u imunološkom sustavu (Feil i Fraga 2012). Glavnu komponentu mukusa čine upravo glikoproteini. Pokazana je smanjena glikozilacija glikoproteina u unutrašnjem sloju mukusa pacijenata oboljelih od IBD-a. Mukus je važan segment obrane od mikroorganizama u probavnom sustavu, te bi oslabljen sastav mukusa doveo do povećanog kontakta imunološkog

sustava s mikroflorom. Također, analiza seruma pacijenata oboljelih od UC pokazala je smanjen sadržaj galaktoze na cirkulirajućim imunoglobulinima razreda IgG (Theodoratou i sur. 2014). U potrazi za genetičkim lokusima s utjecajem na glikozilaciju IgG-a, cjelogenomska asocijacijska studija (engl. *genome wide association study, GWAS*) identificirala je brojne gene koji su prethodno povezani s autoimunim te hematološkim malignim bolestima (Lauc i sur. 2013). Jedan od gena povezan s glikozilacijom IgG-a je *BACH2,* prethodno asociran s upalnim bolestima crijeva (Franke i sur. 2010).

1.1.3 Genetički polimorfizmi povezani s upalnim bolestima crijeva

Brojne cjelogenomske asocijacijske studije povezale su određene genetičke polimorfizme s Crohnovom bolešću i ulceroznim kolitisom. GWAS proučava polimorfizme jednog nukleotida: varijacije jednog para nukleotida u populaciji prisutne s učestalošću većom od 1%. Ukupno 163 nezavisna genetička lokusa asocirana s IBD-jem pružila su novi uvid u moguće uzroke i mehanizme nastanka tih bolesti, poput autofagije, te pokazala povezanost s drugim upalnim bolestima, posebice sa psorijazom i ankilozantnim spondilitisom. Doprinos pronađenih genetičkih lokusa IBD-u je samo 13,6% u slučaju Crohnove bolesti odnosno 7,5% u slučaju ulceroznog kolitisa (Jostins i sur. 2012). Od genetičkih varijanti koje doprinose Crohnovoj bolesti, najveći rizik predstavljaju polimorfizmi u genu *NOD2*. Njegov proteinski produkt je tip PRR-a koji sudjeluje u obrani od širokog spektra mikroorganizama. U isto vrijeme, smanjuje upalni odgovor regulacijom vlastite signalizacije i aktivnosti drugih PRR-a nakon produžene mikrobne stimulacije (Abraham i Medzhitov 2011). Nasuprot negativnim učincima u Crohnovoj bolesti, isti rizični aleli (varijante gena) *NOD2* pokazuju zaštitnički efekt kod ulceroznog kolitisa. Unatoč takvim iznimkama, većina zajedničkih lokusa, kojih je 110 od 163, pokazuje istosmjerni efekt u obje bolesti (Jostins i sur. 2012).

1.2 Epigenetički mehanizmi

Ekspresija gena podrazumijeva prepisivanje slijeda nukleotida u molekulu RNA (transkripcija) te njezino prevođenje u aminokiselinski slijed (polipeptid) procesom translacije koja se odvija na ribosomima. Unatoč identičnosti genetičke

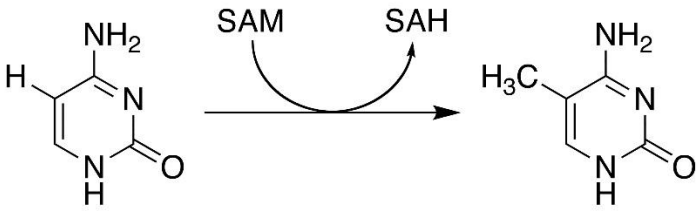
informacije (identične molekule DNA) u svim stanicama jednog organizma, uzorci ekspresije gena razlikuju se u različitim tipovima stanica. Informacije zapisane u genomu mogu biti upotrijebljene za proizvodnju proteina ili ne, ovisno o vrsti tkiva te biološkom stanju i procesu. Razvoj organizma poput sisavaca ovisi o sposobnosti diferencijalne razine ekspresije specifičnih gena potrebnih za razvoj organskih sustava. Mehanizme koji mogu aktivirati i utišati gene proučava epigenetika. Ova znanstvena disciplina opisuje sve nasljedne značajke fenotipa koje ne ovise o promjeni primarne sekvence DNA. Nasljeđivanje epigenetičke informacije primarno se odvija prilikom diobe stanica i uključuje staničnu memoriju (Allis i sur. 2007). Epigenetika uključuje stabilne, dugotrajne promjene transkripcijskog potencijala stanice koje se neće nužno naslijediti na sljedeće generacije. Uzorak epigenetičkih modifikacija na razini genoma – epigenom – podložan je preciznim, koordiniranim promjenama specifičnim za određeni stupanj razvoja. U sisavcima, i u manjem dijelu kod biljaka, epigenetičke se modifikacije resetiraju u spolnim stanicama. Epigenetičko reprogramiranje priprema spolne stanice za razvoj organizma sljedeće generacije. Osim promjena u razvoju i diferencijaciji, postoji i stohastička varijacija epigenetičkih promjena bez očigledne biološke funkcije. Pretpostavlja se da su stohastičke promjene nastale pod utjecajem okoliša i unutarnjih faktora, tijekom bioloških procesa. Utjecaji okoliša na epigenom biljnih i životinjskih vrsta uključuju prehranu, promjene u temperaturi, kemijske zagađivače, stres, pa čak i socioekonomske aspekte okoliša ljudi (Feil i Fraga 2012). Također, istraživanja su pokazala da je moguć prijenos epigenetičkih promjena nastalih pod utjecajem okoliša, te posljedičnog fenotipa, na sljedeće generacije, što podrazumijeva transgeneracijsko epigenetičko nasljeđivanje (Jirtle i Skinner 2007). Sve više istraživanja pokazuje da se epigenetički procesi u organizmima mogu prenositi s jedne generacije na drugu (Tollefsbol 2011).

Epigenetički mehanizmi uključuju: (1) metilaciju DNA, (2) posttranslacijske modifikacije histonskih proteina, (3) remodeliranje kromatina, (4) djelovanje malih nekodirajućih RNA molekula, (5) uvođenje histonskih varijanti i (6) pozicijsku informaciju (Allis i sur. 2007). Eukariotski genom organiziran je u kromatin, kompleks histonskih proteina sastavljenih u nukleosome oko kojih je omotana molekula DNA. Promjene u strukturi kromatina dio su mnogih bioloških procesa, uključujući promjene u genskoj ekspresiji. Posttranslacijska acetilacija i metilacija histonskih

proteina najčešći su mehanizmi brze promjene aktivnosti gena jer djeluju na dostupnost i prepoznavanje ciljnog mjesta vezanja proteina koji utječu na gensku regulaciju. Skupina važnih enzima uključenih u epigenetičke procese su histonske acetil-transferaze (HAT), koje kataliziraju dodavanje acetilne skupine na određena mjesta na histonima. Acetiliraju se aminokiseline lizini na amino-terminalnoj regiji proteina. Histonske deacetilaze (HDAC) odgovorne su za cijepanje tih acetilnih skupina. Acetilacija je općenito povezana s većom genskom aktivnošću jer smanjuje razliku u naboju DNA i histona, što olabavljuje kromatinsku strukturu i pruža mogućnost vezanja transkripcijskih aktivatora. Nasuprot tome, metilacija histonskih proteina ima različit utjecaj na ekspresiju, ovisno o broju dodanih metilnih skupina (jedna, dvije ili tri), te mjestu vezanja. Tako npr. metilacija lizina 9 histona H3 dovodi do genske represije. Acetilacija i metilacija histonskih proteina međusobno su povezane – određen uzorak modifikacija tvori histonski kod koji signalizira i omogućuje vezanje ili blokiranje regulacijskih proteina. Postojanje i interpretacija određenog histonskog koda ovisi o vrsti organizma. Kompaktnija struktura kromatina za posljedicu ima manju dostupnost DNA transkripcijskim faktorima (Tollefsbol 2011). Epigenetički mehanizmi uključuju i procese temeljene na djelovanju nekodirajućih molekula RNA (ncRNA). Mehanizmi utišavanja i aktivacije gena pomoću njih su brojni, s RNA interferencijom kao najpoznatijim procesom koji uključuje ncRNA, ciljnu mRNA i proteinske komplekse. Neke od prvih otkrivenih uloga RNA interferencije su inaktivacija kromosoma X i genomski imprinting tijekom ranog razvoja organizma, u kojima sudjeluje i metilacija DNA (Collins i sur. 2011).

1.3 Metilacija DNA

Najstabilniji epigenetički mehanizam jest metilacija DNA. Proces aktivne metilacije DNA premješta metilnu skupinu (CH_3) s S-adenozil-L-metionina (SAM) na peti ugljikov atom nukleotida citozina, pri čemu se SAM konvertira u SAH (S-adenozil-L-homocistein) (Slika 1). U genomu sisavaca se većinom metilira citozin s 5' strane gvanina (Frommer i sur. 1987). U dvolančanoj molekuli DNA to rezultira susjednim dijagonalno postavljenim metiliranim citozinima (5-mC) unutar dinukleotida CpG. U embrionskim stanicama citozin može biti metiliran i izvan CpG mjesta (Ramsahoye i sur. 2000).

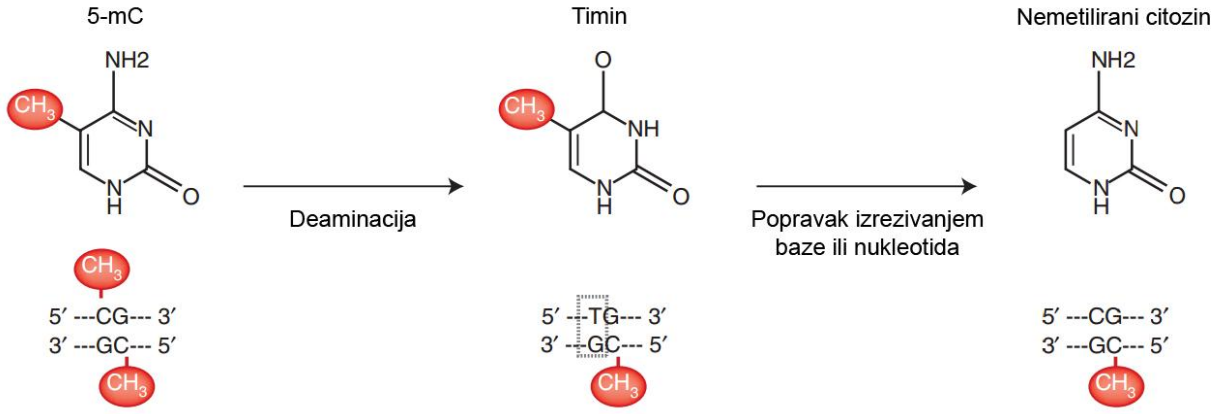


Slika 1 – Metilacija DNA. Nukleotidnu bazu citozin (lijevo) metilira enzim DNA-metil-transferaza (nije prikazana) s pomoću metilne skupine S-adenozil-metionina (SAM). SAM se konvertira u S-adenozil-homocistein, dok citozin postaje 5-metilcitozin (desno) s metilnom skupinom na petom atomu ugljika.

Kako DNA sadrži 4 različita nukleotida – s bazama adeninom, gvaninom, timinom i citozinom – postoji 16 mogućnosti za formiranje nukleotidnih parova povezanih fosfodiesterskom vezom. No CpG dinukleotid pokazuje učestalost manju od očekivane kroz većinu genoma, 0,8% umjesto 4% što se može objasniti spontanom deaminacijom metiliranog citozina u timin i fiksacije TpG tijekom evolucije sisavaca (Lander i sur. 2001). Učestalost CpG mjesta mijenja se kroz genom. Postoje područja njihovog potpunog izostanka te područja povećane gustoće, kao što je slučaj u transpozonima, ponavljajućim sekvencama DNA sa sposobnošću ugradnje u druga područja genoma. Recentnije nastali transpozoni imaju veći sadržaj CpG dinukleotida. Područja s gusto raspoređenim CpG mjestima, s učestalošću bližom očekivanoj, nazivaju se CpG otoci (Gardiner-Garden i Frommer 1987). Veličina područja koje zauzimaju može biti od 200 pb do nekoliko kilobaza. Broj CpG otoka u pojedinom kromosomu varira: na primjer 19-22 po megabazi (Mb) u kromosomima 16, 17 i 22; 2,9 po Mb u kromosomu Y; te 43 po Mb u kromosomu 19. Relativna gustoća CpG otoka korelira s gustoćom gena na spomenutim kromosomima. Oko polovice CpG otoka nalazi se u blizini promotora gena gdje se odvija inicijacija transkripcije (Lander i sur. 2001). Postotak promotora koji sadrže CpG otok kod sisavaca je oko 70%, dok ga preostali promotori ne sadrže. Metilacija CpG otoka u promotoru gena može poremetiti vezanje transkripcijskih faktora i omogućiti vezanje proteina s afinitetom za metilne skupine, te tako stabilno utišati ekspresiju gena. Iz tog razloga, metilacija CpG otoka u promotorima gena, koji mogu biti npr. tumor supresori, u pravilu je niska. Pretpostavlja se da CpG otoci unutar gena utječu na kontrolu transkripcije ncRNA.

Za razliku od CpG otoka, više od 80% CpG mjesta izvan CpG otoka je metilirano (Saxonov i sur. 2005).

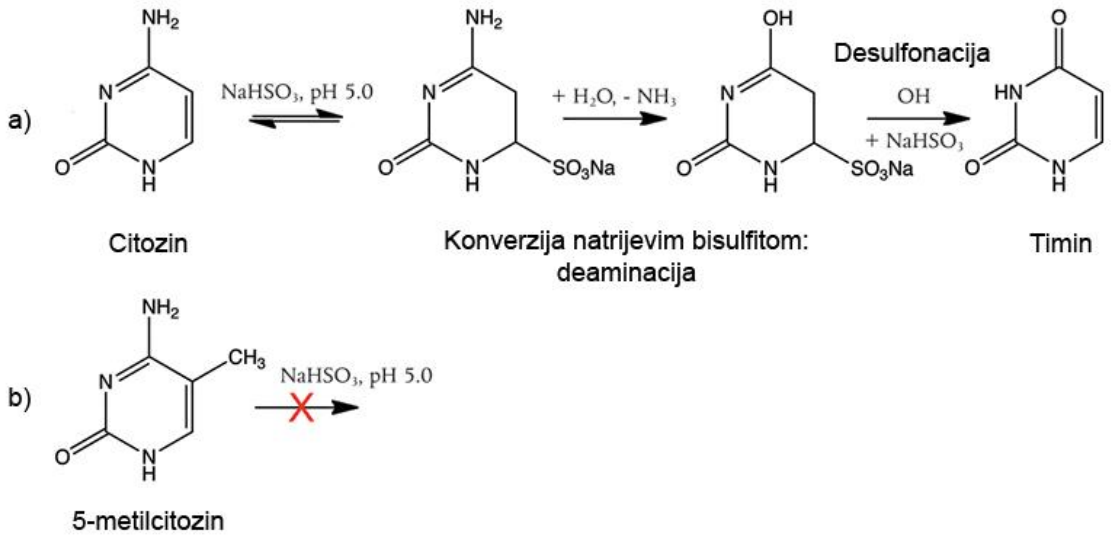
Enzimi odgovorni za metiliranje citozina su DNA-metiltransferaze (DNMT). Dijele se na dvije skupine s obzirom na preferirani supstrat, koji može biti nemetilirana DNA ili hemimetilirana DNA sa samo jednim metiliranim lancem. *De novo* DNMT (DNMT3a i DNMT3b) uspostavljaju obrazac metilacije na nemetiliranoj DNA. Inicijacija tog procesa nije u potpunosti istražena. DNMT održavateljskog tipa (DNMT1) djeluje tijekom replikacije DNA koja prethodi staničnoj diobi. Obrazac metilacije se sa starog kopira na novonastali lanac. Demetilacija se može odvijati spontano – tijekom staničnih dioba u stanicama bez aktivnosti DNMT, što se događa u muškom pronukleusu nakon oplodnje (Phillips 2008). Aktivna demetilacija DNA s pomoću enzima je dugo predstavljala kompleksniji problem. Kako je direktno cijepanje metilne skupine s 5-metilcitozina termodinamički nepovoljno, postojanje 5-hidroksimetilcitozina ključna je karika hipoteze o aktivnoj demetilaciji. TET obitelj enzima ima sposobnost oksidacije 5-metilcitozina, čemu može slijediti konverzija 5-hmC u nemetilirani citozin popravkom izrezivanjem baze s pomoću timin-DNA-glikozidaze (TDG) (Kohli i Zhang 2013). Osim TET enzima, DNA-deaminaze i posljedični popravak nepravilno sparenog nukleotida, npr. aktivnošću TDG, također vode demetiliaciji DNA (Phillips 2008) (Slika 2).



Slika 2 – Primjer demetilacije 5-metilcotozina, 5-mC. Deaminacijom se 5-mC konvertira u uracil kojeg enzimi popravka DNA izrezivanjem baze ili nukleotida zamjenjuju citozinom. Signal za popravak je pogrešno sparena baza u molekuli DNA: T/G umjesto C/G. Slika je preuzeta i prilagođena iz rada Day i Sweatt (2010).

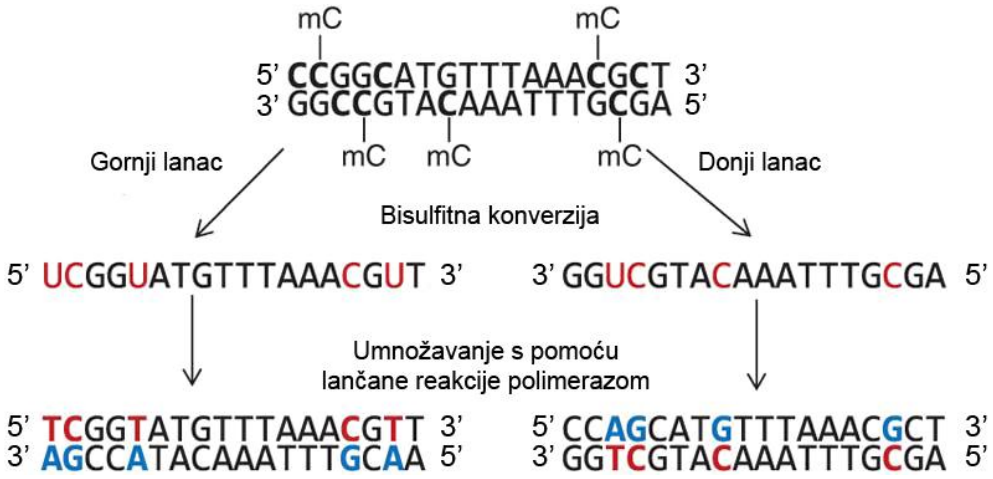
1.3.1 Metode određivanja metilacije DNA

Zbog moguće povezanosti epigenetičke deregulacije i etiologije ljudskih bolesti, pogotovo onih povezanih s okolišnim faktorima, razvile su se brojne metode za utvrđivanje epigenetičkih modifikacija. Metilacija DNA, kao i ostale epigenetičke promjene, može biti reverzibilna, što je čini atraktivnom metom terapija i prevencija bolesti. Metode za analizu metilacije DNA razlikuju se u osjetljivosti i pokrivenosti (engl. *coverage*), te izbor metode ovisi o željenoj aplikaciji i razini informacije. Analize se mogu podijeliti na one koje daju informaciju o (1) ukupnoj genomskoj metilaciji, (2) stupnju metilacije određenog lokusa/promotora gena, i (3) kompletni metilacijski status genoma rezolucije do nukleotida (metilacijske mape cijelog genoma). Standardne tehnike molekularne biologije, poput hibridizacije i sekvenciranja, ne mogu razlikovati citozin od metiliranog citozina. Također, informacija o metiliranosti gubi se tijekom amplifikacije s pomoću lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction, PCR*). Zato su potrebni predtretmani čiji rezultat ovisi o postojanju 5-mC: (1) tretiranje restrikcijskim endonukleazama, (2) obogaćivanje uzorka afinitetnim metodama i (3) bisulfitna konverzija. Restrikcijske endonukleaze (RE) su bakterijski enzimi s afinitetom za određenu kratku sekvencu DNA i sposobnošću cijepanja oba lanca DNA. Prepoznavanje DNA kod nekih RE ovisi o metilacijskom stanju ciljne sekvence, što se može iskoristiti u analizama metilacije DNA. Najpoznatije izoshizomeraze koje su diferencijalno osjetljive na metilaciju sekvence CCGG su *MspI* i *HpaII* (Umer i Herceg 2013). Obogaćivanje uzorka može se provesti i s pomoću specifičnih antitijela koja vežu 5-mC, ili proteina koji imaju domenu s afinitetom za metilirane CpG (engl. *methyl-binding domain, MBD*). Metoda koja na taj način određuje ukupnu metiliranost genoma zove se MedIP (engl. *Methylated DNA immunoprecipitation*, imunoprecipitacija metilirane DNA) (Weber i sur. 2005).



Slika 3 – Bisulfitna konverzija citozina. a) Nakon deaminacije citozina natrijevim bisulfitom, potrebna je desulfonacija za stvaranje konačnog produkta, timina. b) Tretman natrijevim bisulfitom nije efikasan u konverziji 5-metilcitozina u timin. Slika je preuzeta i izmjenjena s web stranice *www.neb.com.*

Tretman DNA s natrijevim bisulfitom deaminira nemetilirane citozine u uracil puno brže nego 5-mC (Slika 3). Metodu bisulfitne konverzije prvi su uveli Frommer i sur. (1992) kad su optimizirali uvjete za konverziju svih nemetiliranih citozina u uzorku. Sljedeći korak je umnožavanje željene sekvence PCR-om, pri čemu se uracil zamjenjuje timinom (Slika 4).



Slika 4 – Bisulfitna konverzija DNA. Nemetilirani citozini konvertiraju se u uracil, dok metilirani citozini (mC) ostaju nepromijenjeni. Željeni fragment DNA zatim se može umnožiti s pomoću lančane reakcije polimerazom tijekom koje se timin ugrađuje na mjesto uracila. Slika je preuzeta i izmjenjena iz rada Krueger i sur. (2012).

Na ovaj način, epigenetička se informacija zamjenjuje promjenom na genetičkoj razini, što se može detektirati, primjerice, sekvenciranjem ili specifičnim početnicama koje se upotrebljavaju u PCR reakciji (engl. *methylation-specific PCR, MSP*, PCR ovisan o metilaciji) (Herman i sur. 1996). Kako je MSP popraćen elektroforezom kvalitativan test, razvile su se metode poput «MethyLight», prilikom koje se konvertirana DNA analizira s pomoću kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu (qPCR). Uzorci DNA su obično dobiveni iz heterogene populacije stanica, u kojoj postoje razlike u uzorcima metilacije DNA pojedinih stanica. Rezultati kvantitativne analize metilacije određenog CpG lokusa zato prikazuju koliki postotak analiziranih molekula DNA iz uzorka ima to CpG mjesto metilirano (Mikeska i Craig 2014). Osim sekvenciranja bisulfitno-konvertirane DNA metodom temeljenom na zaustavljanju sinteze lanca ugradnjom dideosiribonukleozid-trifosfata (Frommer i sur. 1992) te brojnih novih metoda, metilacija u rezoluciji nukleotida može se odrediti i s pomoću pirosekvenciranja bisulfitno-konvertirane DNA (Colella i sur. 2003).

1.3.2 Određivanje metilacije DNA s pomoću bisulfitnog pirosekvenciranja

Jedna od metoda determinacije metiliranosti CpG lokusa je pirosekvenciranje bisulfitno-konvertirane DNA. Široko se primjenjuje zbog visoko pouzdanih, kvantitativnih rezultata, i mogućnosti analize više CpG mjesta odjednom (Umer i Herceg 2013). Termalna nestabilnost korištenih enzima, posebice luciferaze, zahtjeva temperaturu reakcije od 28 °C. Pri toj temperaturi postoji mogućnost stvaranja sekundarnih struktura DNA. Iz tog razloga poželjna je što manja veličina amplikona koji će se pirosekvencirati, što je optimalno oko 300-350 pb (Dejeux i sur. 2009). Još jedan izazov je dizajn početnica za regije od interesa jer bisulfitna konverzija rezultira molekulom DNA niske kompleksnosti (s bazama A, T, G i vrlo malo C) (Tost i sur. 2006). Bisulfitno pirosekvenciranje temeljeno je na metodologiji sekvenciranja vođenog sintezom – pojedinačne se baze detektiraju tijekom ugradnje u rastući lanac DNA. Dobiveni postotak metilacije određenog CpG mjesta pokazuje prosječno stanje metilacije svih umnoženih epialela s pomoću PCR metode (epialel je varijanta epigenetičke promjene na određenom genetičkom lokusu, u ovom slučaju metilacija CpG mjesta) (Tost i Gut 2007). Razlog postojanja više epialela je heterogenost stanica u uzorku.

1.3.3 Promjena stupnja metilacije DNA u bolestima čovjeka

Osim regulacije specifičnog uzorka ekspresije gena u različitim tkivima, metilacija DNA ključni je mehanizam za (1) utišavanje mobilnih i retroviralnih elemenata, (2) genomski utisak (ekspresija alela naslijeđenog samo od majke ili od oca), te za (3) inaktivaciju kromosoma X. Abnormalnosti u metilaciji DNA zato imaju ulogu u brojnim poremećajima i bolestima čovjeka. Najuočljivije promjene pojavljuju se tijekom karcinogenih procesa. U tumorskim stanicama, promjene u metilaciji DNA kreću se u dva smjera: hipermetilacija CpG otoka u promotorima te globalna hipometilacija ostalih područja genoma (Umer i Herceg 2013). Posljedice su utišavanje tumor-supresor gena, aktivacija onkogena, i općenita nestabilnost genoma zbog hipometilacije ponavljajućih sljedova, uključujući mobilne elemente DNA i sljedove bitne za strukturu kromosoma. Mobilni elementi, koji čine 45% ljudskog genoma, imaju sposobnost replikacije/izrezivanja i potencijalno mutagene insercije u druga područja DNA. Zbog toga su utišani globalnom hipermetilacijom, te mutacijama nastalima zbog deaminacije 5-mC kroz vrijeme (Schulz i sur. 2006). Poremećaji u metilaciji DNA povezani su s mnogim kompleksnim bolestima, tumorima, te s autoimunim bolestima. Epigenetičke modifikacije mogu se mijenjati s dobi čovjeka te pod utjecajima okoliša, što može objasniti vezu između razvoja autoimunih bolesti, dobi i određenih okolišnih uvjeta (Grolleau-Julius i sur. 2010). Epigenetičke modifikacije u autoimunim bolestima reverzibilne su i specifične za tip stanica – npr. promjene u CD4+ T limfocitima, Treg i B limfocitima kod sistemskog eritemskog lupusa, ili limfocita i fibroblasta kod reumatoidnog artritisa (Zhao i sur. 2010; Trenkmann i sur. 2010). Također, promjene u epigenetičkom statusu pronađene su u pacijenata koji pate od dijabetesa tipa 1, multiple skleroze i celijakije, te od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa. Općenito, u autoimunim bolestima raširenu su uzorci hipometilacije (Brooks i sur. 2010).

1.3.4 Metilacija DNA kao biomarker

Biomarker je svaka biološka karakteristika koja se može objektivno izmjeriti i služiti kao indikator normalnih bioloških i patogenih procesa, te odgovora organizma na terapiju (Naylor 2003). Većina kompleksnih bolesti ljudi uzrokovana je genetičkim varijacijama u kombinaciji s okolišnim uvjetima, te se oba aspekta mogu odraziti na potencijalne epigenetičke biomarkere. Pomoću njih moguće je točnije klasificirati

bolest i stratificirati pacijente prema riziku ili prognozi, što pomaže u izboru optimalne terapije. Također, biomarkeri otvaraju mogućnost za ranu detekciju progresivnih bolesti. Idealan biomarker, osim točnih mjerenja kroz široku populaciju, mora donijeti informaciju bitnu za kliničku upotrebu. Predstavljajući promjene u sastavu tjelesnih tekućina i tkiva, biomarkeri mogu proširiti naše znanje o patogenezi bolesti. Ideja epigenetičkih biomarkera je obećavajuća, no zasad je vrlo malo potencijalnih biomarkera te vrste ostvarilo potencijal za korištenje u kliničkoj praksi, i to uglavnom u području istraživanja raka. Razvoj je usporen nedostatkom standardiziranih metoda i referenci (Mikeska i Craig 2014). Zbog veće stabilnosti DNA nego drugih bioloških molekula, poput RNA i proteina, metilaciju DNA lako je analizirati i u malim uzorcima, što je čini pogodnom u potrazi za epigenetičkim biomarkerima. U prijašnjim analizama metilacije DNA u raku koristilo se uglavnom tumorsko tkivo, no povećava se broj istraživanja u kojima uzorak čine tjelesne tekućine. U njih spadaju urin, majčino mlijeko, slina, bronhijalna sluz, plazma i serum, te puna periferna krv (Mikeska i Craig 2014). DNA iz periferne krvi može se podijeliti na (1) slobodnu DNA otpuštenu iz cirkulirajućih stanica, npr. stanica raka (uzorak je plazma ili serum), i (2) DNA iz leukocita (uzorak je puna krv). Slobodna DNA postoji u vrlo malim količinama, što otežava njeno korištenje u ulozi biomarkera. Iako kvaliteta i količina perifernih leukocita, kao i lakoća njihovog analiziranja i korištenja ne predstavlja problem, biološko značenje metilacije njihove DNA nije potpuno razjašnjeno. Postavlja se pitanje u kojoj mjeri metilacija DNA iz perifernih leukocita odražava metilacijsko stanje u zahvaćenom tkivu. Dosadašnja istraživanja nisu dala uniformne rezultate (Li i sur. 2012). Varley i sur. (2013) analizirali su metilaciju DNA iz uzoraka tkiva, leukocita iz periferne krvi, i primarnih te embrijskih staničnih linija. Leukociti iz periferne krvi, kao i imortalizirane limfoblastoidne stanične linije, pokazale su specifičan uzorak metilacije na 6 511 CpG mjesta. Uočene su razlike u metilaciji DNA u odnosu na DNA iz tkiva i tumorskih staničnih linija: manji je postotak CpG otoka leukocita i limfoblastoidnih stanica pokazivao hipermetilaciju u odnosu na DNA iz tkiva i ostalih staničnih linija. Geni sa specifičnim uzorkom metilacije uključivali su gene važne za razvoj leukocita, regulaciju količine tjelesnih tekućina, koagulaciju krvi, razvoj hematopoetskih i limfoidnih organa, te za aktivaciju B limfocita.

1.4. Gen BACH2

BACH2 je protein-kodirajući gen koji se kod čovjeka nalazi na kromosomskom području 6q15 (Sasaki i sur. 2000). Ortologni geni pronađeni su u nekim gljivama i u velikom broju kralješnjaka. Početak istraživanja ovoga gena može se smjestiti u 1996. godinu kad su Oyake i sur. identificirali dva nova transkripcijska faktora s bZip domenom (engl. *basic region leucine zipper,* leucinski zatvarač s bazičnom regijom) za vezanje na molekulu DNA: BACH1 i BACH2. Osim bZip, oba sadrže i BTB domenu za vezanje s drugim proteinima, odnosno za homo- i heterodimerizaciju. Pokazano je da BACH2 (engl. *BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 2,* BTB i CNC homologija 1, transkripcijski faktor s leucinskim zatvaračem s bazičnom regijom 2*)* stvara heterodimere s malim proteinima iz porodice Maf, npr. MafK. Heterodimer BACH2-MafK veže se za područja DNA veličine 13-14 pb koja prepoznaju Maf proteini (engl. *Maf recognition elements, MARE*, elementi koje prepoznaju Maf). Nakon vezanja, BACH2 djeluje kao transkripcijski represor susjednih gena (Muto i sur. 1998). Kod čovjeka, ekspresija *BACH2* ograničena je na određena tkiva i stanične tipove, uključujući hematopoetske i neuralne stanice. Velika količina BACH2 može se naći u B limfocitima. Ekspresija se inicira u zajedničkim limfoidnim progenitorima, i ostaje visoka u B staničnoj liniji od pro-B stanica do zrelih B limfocita. Nakon aktivacije, u prisustvu antigena, B limfociti se aktiviraju i diferenciraju u plazma stanice koje luče velike količine antitijela. Ekspresija *BACH2* u plazma stanicama je vrlo niska ili se ne može detektirati. Osim u B limfocitima, *BACH2* je eksprimiran i u populacijama T limfocita (Tsukumo i sur. 2013) i tkivnim makrofazima (Nakamura i sur. 2013). Kod miša, *BACH2* je eksprimiran globalno. Uittenboogaard i sur. su 2013. godine pokazali snažno smanjenje ekspresije *BACH2* u tkivima miša u procesima starenja i stresa uzrokovanog UV svjetlom, što je utjecalo na stanični ciklus i regulaciju transkripcije. Rezultat je konzistentan s pretpostavljenom funkcijom BACH2 u staničnoj proliferaciji. Nedavno je otkrivena veza BACH2 i regulacije apoptoze (stanične smrti) u β-stanicama gušterače – povećana ekspresija *BACH2* je na β-stanice imala zaštitnički učinak. Istraživanje ukazuje na ulogu *BACH2* u razvitku dijabetesa tipa 1 (Marroquí i sur. 2014).

Razvoj B limfocita kreće iz zajedničkog limfoidnog progenitora, koji se može razviti u T limfocite, B limfocite ili stanice ubojice. Daljnje usmjeravanje zahtjeva (1) aktivaciju programa (gena) specifičnog za B limfocite i (2) supresiju alternativnih programa. U tom ranom razvoju B limfocita BACH2 ima ključnu ulogu utišavanja gena bitnih za razvitak mijeloidne linije (Itoh-Nakadai i sur. 2014). Još jedna važna uloga BACH2 u funkciji B limfocita je omogućavanje odvijanja somatske hipermutacije (SH) i promjene razreda imunoglobulina (PRI), što se događa nakon aktivacije B limfocita. Ova dva procesa nužna su za nastanak potrebnih specifičnih antitijela različitih razreda. Umjesto IgM i IgD karakterističnih za zrelu naivnu B stanicu, dugoživuća plazma stanica proizvodit će IgG, IgA i/ili IgE antitijela. Mehanizam djelovanja BACH2 sastoji se u stalnoj direktnoj represiji gena *Prdm1*, što u slučaju aktivacije B limfocita vodi indirektnim putevima do aktivacije enzima AID potrebnog za SH i PRI. AID (engl. *activation-induced cytidine deaminase*, citidinska deaminaza potaknuta aktivacijom) uvodi mutacije u DNA. Za aktivaciju AID potrebni su gen *Pax5*, te visoka razina ekspresije *Irf1* u trenutku aktivacije antigenom. Prdm1 utišava gen *Pax5*, o kojemu ovisi ekspresija *BACH2*. Reaktivacija gena *Prdm1* prilikom stimulacije antigenom vodi do diferencijacije u plazma stanicu. No, bez indirektne aktivacije *Pax5* od strane BACH2, ne bi bio moguć usporen prijelaz tijekom kojeg se odvijaju SH i PRI (Igarashi 2014). BACH2 također ima važnu funkciju u održavanju ravnoteže određenih subpopulacija T limfocita, posebice regulatornih (Treg) važnih za imunološku toleranciju (Roychoudhuri i sur. 2013).

GWAS analize asocirale su gen *BACH2* s dijabetesom tipa 1 (Cooper i sur. 2008), celijakijom (Dubois i sur. 2010), Crohnovom bolešću (Franke i sur. 2010), multiplom sklerozom (Sawcer i sur. 2011), reumatoidnim artritisom artritisom (McAllister i sur. 2013) i hipertiroidizmom (Medici i sur. 2014).

1.5. Cilj istraživanja

Cjelogenomske asocijacijske studije povezale su gen *BACH2* s upalnim bolestima crijeva. Zbog važne uloge tog transkripcijskog represora u pravilnom funkcioniranju imunološkog sustava, može se pretpostaviti da kod osoba oboljelih od upalnih bolesti crijeva postoji razlika u ekspresiji gena *BACH2*. Jedan od mehanizama regulacije ekspresije gena je metilacija promotora. Geni koji imaju CpG otok/otoke većinom su regulirani metilacijom DNA. Cilj ovog diplomskog rada je analizirati razinu metilacije CpG dinukleotida u promotoru gena *BACH2* u osoba oboljelih od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa. Promjena metilacije *BACH2* iz periferne krvi pacijenata u odnosu na zdrave osobe značila bi potencijalan biomarker Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa te novi uvid u uzrok i tijek ovih bolesti.

2. Materijal i metode

2.1 Uzorci krvi i stanične linije

U istraživanju je analizirana DNA pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa, te DNA zdravih osoba. DNA je izolirana iz pune krvi. Uzorci su prikupljeni u Edinburgu u sklopu projekta FP7 IBD-BIOM. Na početku istraživanja bilo je ukupno 260 uzoraka, od kojih su 143 bili UC, 46 CD i 71 HC (engl. *healthy control, HC*, zdrave kontrole). Prilikom optimizacije metode korištena je DNA prethodno izolirana iz staničnih linija HepG2 i HeLa. HepG2 su stanice hepatocelularnog karcinoma, epitelne u morfologiji kao i HeLa stanice raka vrata maternice.

2.2 Bisulfitna konverzija

Bisulfitna konverzija DNA podrazumijeva deaminaciju nemetiliranih citozina u uracil što se može detektirati pirosekvenciranjem. Dok se nemetilirani citozini deaminiraju u uracil, metilirani citozini ostaju nepromjenjeni.

Za ovaj korak korišten je komercijalno dostupan komplet kemikalija EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research Corp.). Postupak sam radila prema pripadnom protokolu.

Glavni koraci:

1. U smjesu DNA (optimalno 200-500 ng po reakciji) i vode dodaje se CT-Conversion Reagent za bisulfitnu konverziju
2. Denaturacija DNA toplinom (98 °C, 10 min)
3. Inkubacija 2,5 h na 64 °C
4. Desulfonacija s M-Desulphonation Buffer-om i pročišćavanje DNA

Konvertirana DNA može se čuvati na -20 °C za kasnije korištenje. Efikasnost reakcije je >99% za konverziju nemetiliranog citozina i >99% za zaštitu 5-mC, dok je prinos DNA >75% početne količine.

2.3 Dizajn početnica

Početnice su kratke molekule DNA potrebne za lančanu reakciju polimerazom. Koriste se u paru: nazvala sam ih Fw (engl. *forward,* sprijeda) za umnožavanje jednog lanca, i Rev (engl. *reverse,* obrnuto*)* za umnožavanje drugog, komplementarnog lanca željenog fragmenta DNA. Svaka početnica komplementarna je početku (5' kraju) lanca na kojeg će hibridizirati. Sekvencu gena *BACH2* pronašla sam s pomoću genomskog preglednika web stranice UCSC (University of California, Santa Cruz) u bazi podataka RefSeq (NCBI, National Center for Biotechnology Information). Sekvenca gena je iz verzije genoma čovjeka objavljene veljače 2009. godine. Identifikacijska oznaka sekvence je NM_001170794. Za umnožavanje fragmenata gena *BACH2* koje sam namjeravala pirosekvencirati, osmislila sam sekvencu početnica specifičnih za bisulfitno-konvertiranu DNA. Slijed parova baza je promijenjen: na mjestu nemetiliranog citozina nalazi se uracil. Nakon umnožavanja PCR reakcijom, uracil, specifičan za molekulu RNA, zamijenit će timin, analogna baza u molekuli DNA. Kako se 5-mC u uzorcima krvi može naći samo u CpG dinukleotidima, sve citozine koji ne pripadaju CpG mjestu sam prilikom dizajna početnica tretirala kao uracil/timin. Nakon bisulfitne konverzije, citozin u CpG mjestu može biti ili C ili T, ovisno o metilaciji. Citozin u CpG dinukleotidu sam stoga označila slovom Y (oznaka za pirimidinsku bazu, Y= C/T/U). Zbog različitog afiniteta C i T/U (C tvori par s G, a T/U s A), sparivanje početnice sa slijedom koji sadrži YpG bilo bi manje specifično. Iz tog razloga, prilikom dizajna početnica pazila sam da slijed na kojeg će se vezati ne uključuje CpG mjesto. U protokolu za bisulfitnu konverziju (EZ DNA Methylation-Gold™ Kit, Instruction Manual, Zymo Research Corp.) navedena je idealna dužina početnica od 26-32 pb. Optimalne početnice koje sam na kraju upotrijebila bile su nešto kraće. Razlozi tome su izbjegavanje CpG mjesta, te općenita pravila za dizajn početnica poput izbjegavanja sekvenci koje pogoduju stvaranju sekundarnih struktura i/ili međusobnom sparivanju početnica, te ujednačavanja temperature Tm (engl. *annealing temperature*, temperatura prianjanja) pri kojoj početnice hibridiziraju na komplementarni slijed DNA. Na sekundarne strukture unutar jedne početnice i međusobno sparivanje početnica posebice se treba paziti nakon bisulfitne konverzije, zbog smanjenja kompleksnosti slijeda – početnice se sastoje

od samo tri različite baze. Računalni programi koje sam koristila za analizu kvalitete početnica su PerlPrimer v1.1.21. i OligoAnalyzer® Tool 3.1 (IDT).

Zbog ograničene veličine molekule DNA koja se može pirosekvencirati s pomoću korištenog uređaja PyroMark® Q24 Advanced (QIAGEN®), izabrala sam tri različita fragmenta gena *BACH2*. Nazvani su fragment 1 (F1), fragment 2 (F2) i fragment 3 (F3) (Tablica 1).

Tablica 1 – Fragmenti gena *BACH2* kojima je analizirana metilacija CpG dinukleotida

Naziv fragmenta	Položaj s obzirom na gen *BACH2*	Veličina	Broj analiziranih CpG mjesta	Dio CpG otoka
F1	Promotor gena	156 pb	14	da
F2	Prvi intron	143 pb	16	da
F3	Promotor gena	104 pb	3	ne

F1 i F2 dio su CpG otoka dok je F3 izvan. F1 i F3 nalaze se unutar promotora gena, a F2 je unutar prvog introna (Slika 5). U nastavku slijedi dio sekvence NM_001170794 s promotorom gena *BACH2*, netranslatiranom regijom (engl. *untranslated region, UTR*) i početkom prvog introna gena. Velikim slovima ispisan je slijed DNA koji se translatira, zelenom bojom istaknut je fragment F3 (ttctgacag…taggagctg), plavom F1 (tgccacacc…atctgctgc) i rozom F2 (agtaataag…gctccaggc). CpG dinukleotidi istaknuti su žutom bojom. Podcrtano područje CpG otoka određeno je kriterijima genomskog preglednika UCSC.

Promotor

5'-acgtgtaataatatggaatactgcctgtacacaagagggccaagttataggtgtttagggaaacgtggcagaattttctgg
ccttggcaagaggtaaagttgcaggcaccagcacaacactaacacaaccttattttattgcaaatgtacattcagcctaaatcc
taattaccttctgtaaaatcctaaccaccaccaagctttcttctgacagggcactcacacgacggcctttaagggcagcaaca
acatcctaagagccgcagaaaggaaaggcaggggagagtggctggaaggcagtaggagctgggctgaagcccgggg
aggttggcttttaatgtcctcctgaaattgaccactctctttccaaaaacactggcttgggggcttaaaggttcgctcagtagggc
aggcggagggcctcctgaaaaggattgagaagtcaacattcaaaaggctgcttttactcgcccggtccccacccaaaaggg
agtccggtcagctttgtgggggccagtggagcatcttttcttgcccttccgggaaaacgctagctaaccctgggatcccggtc
ccgacgtctgctctccttccccaggtgcagcacctagggctctggcccccctcccacgtgccacaccagccctcaccactact
ctcaccctgctatgcccccaaccctcgtctttcgtggccgggaaggccaggccgagcgggcggtcagccggccgggag
gaggggctctccgggccgcgcggccgcacaaagcgggagatctgctgctgcggcggcatgaggcgcgccccctccc
gcgagccagcggagcgcgcgcgcccgccccgtccccgcccccgccccagccccggagcgccattcgcggagcg

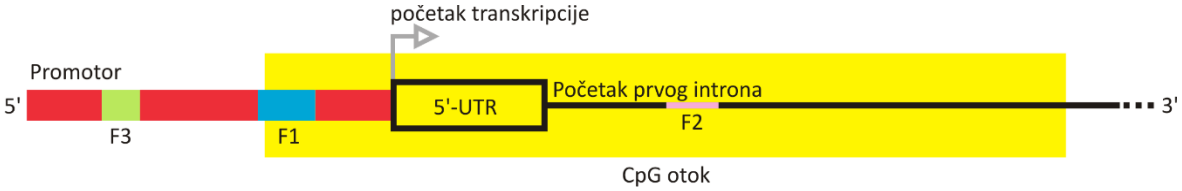
gcttacgctagtcgccgggcgtaccgcgccccagcggccgggggaggtgcgctgccggctcccgtaaagttattgtgaatg
gggagcgggtgacgtcagcgccgaat

UTR

GTCAACAATGTAGCGATTGAGAGTGTGGGCGTTCCGGGGAGAGCGCAAGCCGCGC
GGCGCGGAGCAAACAGCGCCGAGCCGCCGCCGCCTCAGCAGCAGCAGCAGCAGC
AGCAGCGGCAGCAGCGGCCGTGCACGCCCGGGCTGCGGTCGCACAGCGCTAACGT
GAGCGGCCGCCGCCCTCGCCACCCCGCCTGCCCACTCCCGCCGCCGCCCCGCTCT
CGCTTTCCCCCCGGCCTCCCCTCGCCCCTTCCCCTCCCCCTTCCCGGCGCACTCGG
GGGGCTGGGAACGAGCTGCCATGTGATGCGCGTCCCCTCCGCGAGCTTTCGGTGA
CCCACGAACTGCCCACCTCGCCGGCTGCCGGGAGGGGGCTGCGAGCCGGGAAGA
CGCGGGGAAGAGGAGGCGGAAAAGGACGCAAAGTTCTCCGGCGAG

Intron

gtgagtccgcgggcccgcgggcccgcgggcccgccgccgctgggcgcgggtggcgcgggcaagtttgcgcgggggagcgcgggcgcg
cgcgggcgcggcgcgggaggcgtgcgggaaacggcgcgcgggaagggagcccggccgccgcgggcgccgcagccgccctcc
ccgcgccctgcccgcttttatggcattttctaggaacgcggaaggggtgggagccgagccggcggccgccgccgccgaa
tgtgtgctctccctcccgcgctgtttacggcggccgaggcgcattgtattttgctggcgtcgaaggtgttttggaacagcagaggg
gaggaggagcagagagtaataagtcaggcatgcgggagggcggctgcaggaggcgcgcgtccgcgcgagccgcagc
agctgtcagaccgcggccctgcccccggccggcgaggccgggtgtccgggcccccagcctgcgatcccagctccag
gccgggcggcctcctccttaaccctcggcg-3'



Slika 5 – Shematski prikaz dijela gena *BACH2*. Transkripcija gena započinje s 5'-UTR (engl. *untranslated region*, netranslatirana regija) prikazanom u obliku praznog kvadrata. Crnom linijom označen je prvi intron gena, gdje se nalazi i analizirani fragment F2. Promotor je označen crvenom bojom. Unutar promotora nalaze se F1 i F3. CpG otok (žuto) prostire se kroz 5'UTR te kroz dio promotora i dio introna gena. Fragmenti F1 i F2 pripadaju CpG otoku.

Za pirosekvenciranje su potrebne biotinilirane jednolančane molekule DNA koje će se analizirati. Biotin omogućava izolaciju i pročišćavanje željenog lanca DNA. Zbog toga smo koristili Rev početnice s kovalentno vezanim biotinom (Btn) na 5' kraju, i nemodificirane Fw početnice (Sigma) (Tablica 2). Tijekom lančane reakcije polimerazom, biotinilirane početnice će se produžiti i tako stvoriti lanac koji će služiti kao kalup prilikom pirosekvenciranja.

Osim početnica za PCR, potrebne su i početnice za pirosekvenciranje. Tijekom pirosekvenciranja, početnica hibridizira na komplementarni slijed DNA te polimeraza nastavlja slijed dodavajući komplementarne nukleotide. Početnica za

pirosekvenciranje može i ne mora biti iste sekvence kao i Fw početnica za PCR. Uvjeti za dizajn početnice za pirosekvenciranje isti su kao za prethodno navedene početnice. Također, poželjno je da hibridiziraju što bliže YpG mjestu DNA kalupa, zbog ograničenja veličine fragmenta koji se može pirosekvencirati. Početnice korištene za pirosekvenciranje prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2 – Početnice korištene za umnožavanje i analizu metilacije fragmenata F1, F2 i F3 gena *BACH2*

Naziv početnice	Fragment	Sekvenca početnice
Fw_F1	F1	5'-GTGTTATATTAGTTTTTATTA-3'
Rev_F1		5'-[Btn]ACAACAAATCTCCCC-3'
Početnica za pirosekvenciranje F1		5'-TTGTTATGTTTTTAATTTT-3'
Fw_F2	F2	5'-AGTAATAAGTTAGGTAT-3'
Rev_F2		5'-[Btn]ACCTAAAACTAAAATC-3'
Početnica za pirosekvenciranje F2		5'-TAGGTATGGGGAGGG-3'
Fw_F3	F3	5'-TTTTGATAGGGTATTTATA-3'
Rev_F3		5'-[Btn]CAACTCCTACTACCTT-3'
Početnica za pirosekvenciranje F3		5'-TTTTGATAGGGTATTTATA-3'

2.4 Umnožavanje fragmenata DNA

Fragmenti 1, 2 i 3 umnoženi su s pomoću lančane reakcije polimerazom. Fragment 1 umnožen je u svih 260 uzoraka, dok su F2 i F3 umnoženi u njih 86. Koristila sam komercijalno dostupan komplet kemikalija prilagođen metodi bisulfitnog pirosekvenciranja, PyroMark® PCR Kit (QIAGEN®). Postupak sam radila prema pripadnom protokolu. Za umnožavanje svakog od fragmenata upotrijebila

sam specifični par početnica naveden u prethodnom potpoglavlju. Korišteni uređaj za lančanu reakciju polimerazom bio je The Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®).

Glavni koraci:

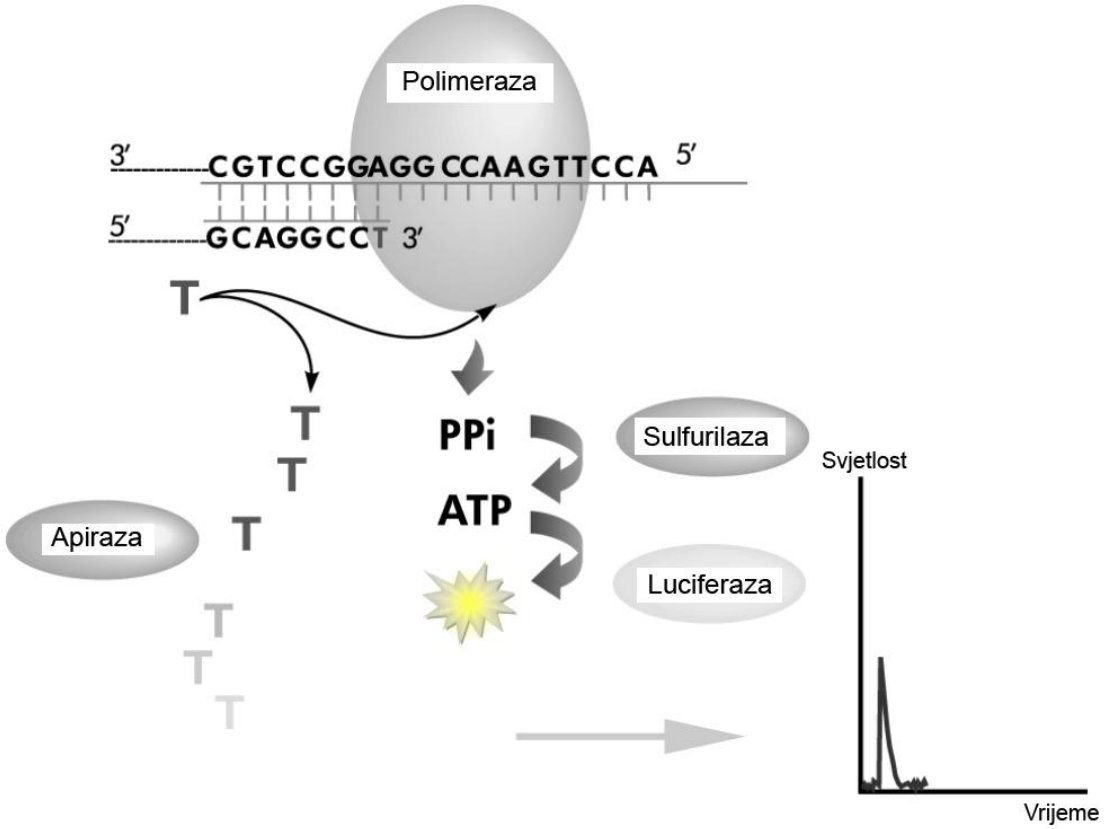
1. Priprema reakcijske smjese: Fw i Rev početnice, polimeraza, pufer koji sadrži $MgCl_2$ i deoksiribonukleotide dATP (deoksiadenozin-trifosfat), dGTP (deoksigvanozin-trifosfat), dTTP (deoksitimidin-trifosfat) i dCTP (deoksicitidin-trifosfat), voda
2. Dodavanje bisulfitno-konvertirane genomske DNA
3. Aktivacija polimeraze HotStarTaq DNA Polymerase (95 °C, 15 min)
4. 50 ciklusa lančane reakcije polimerazom; svaki ciklus sastoji se od 3 koraka:
    a. denaturacija DNA – 95 °C, 30 s
    b. hibridizacija početnica – 50 °C za F5, 39 °C za F6, 44 °C za F7; 30 s
    c. elongacija polimerazom – 72 °C, 30 s
5. Završna elongacija 72 °C, 10 min

Uzorci se mogu odmah upotrijebiti za pirosekvenciranje. Mogu se čuvati na 2-8 °C preko noći ili na -20 °C za dugotrajniju pohranu. Uspješnost PCR-a provjeravali smo elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu u TAE puferu (Tris (tris(hidroksimetil)aminometan), octena kiselina i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) u trajanju od 1h na 130 V za svaki skup uzoraka i za svaki fragment. Detekcija je postignuta bojanjem DNA u gelu u etidij bromidu (20 min u mraku). Signal je vizualiziran pod UV svjetlom i veličina fragmenta određena s pomoću smjese DNA fragmenata poznatih veličina.

2.5 Pirosekvenciranje

Na Slici 6 prikazan je princip pirosekvenciranja koji se odvija u uređaju PyroMark® Q24 Advanced (QIAGEN®). Početnica za pirosekvenciranje hibridizira na kalupnu DNA koja se želi analizirati. U reakcijsku smjesu dodaje se jedna vrsta deoksiribonukleotida (dNTP), npr. s bazom timinom, T. Polimeraza će ugraditi T samo u slučaju komplementarnosti s bazom koja slijedi u kalupnoj DNA. Prilikom ugradnje nukleotida, u ovom slučaju timina, oslobađa se anorganski pirofosfat, PPi.

ATP-sulfurilaza konvertira PPi i adenozin-5-fosfosulfat (APS) iz smjese u ATP. Luciferaza zatim koristi taj ATP za reakciju oksidacije luciferina pri čemu nastaje svjetlost. Signal se detektira i kvantificira. Jači svjetlosni signal ukazuje na ugradnju više istih nukleotida zaredom. Kako bi se izbjegli koraci ispiranja, u smjesu se u tom trenutku dodaje apiraza za konverziju deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP) u di- i monofosfate koje polimeraza ne može upotrijebiti. Sada je smjesa spremna za dodavanje nove vrste dNTP-a. Prije samog pirosekvenciranja, kalupna DNA se mora izolirati kako bi ostao samo jedan lanac DNA koji se želi analizirati. To se ostvaruje vezanjem biotiniliranog lanca DNA na sefarozne kuglice (biotin ima afinitet za sefarozu) i ispiranja nevezanih lanaca. Nakon toga slijedi oslobađanje od kuglica i hibridizacija početnice za pirosekvenciranje na komplementarni slijed kalupne DNA (QIAGEN® 2013).



Slika 6 – Prikaz pirosekvenciranja. Početnica (5'-GCAGGCC-3') hibridizira s komplementarnom sekvencom kalupne DNA. Polimeraza ugrađuje nukleotide (u ovom slučaju timin) u rastući lanac DNA, što stvara pirofosfat (PPi) kojeg sulfurilaza koristi za reakciju konverzije APS-a (nije na slici) u ATP. Luciferin i ATP supstrati su luciferazi koja stvara svjetlost, te se reakcija ugradnje timina može detektirati. Višak nukleotida razgrađuje apiraza prije dodavanja sljedeće vrste nukleotida u smjesu. Slika je preuzeta i izmjenjena iz PyroMark® Q24 Handbook.

Uzorke sam pripremila prema protokolu za PyroMark® Q24 Advanced. Za pročišćavanje željenih produkata PCR-a (koraci 2.-5.) koristila sam PyroMark® Q24 Vacuum Workstation. U nastavku su navedeni glavni koraci.

1. Prije početka rada dizajnirala sam esej (a. i b.) i postavku pločice s uzorcima (c.) u računalnom programu PyroMark® Q24 Software:
    a. Unos sekvence bisulfitno-konvertiranog fragmenta gena *BACH2* koji će se analizirati
    b. Određivanje slijeda kojim će se dodavati dNTP-ovi u reakcijsku smjesu temeljeno na sekvenci kalupa (može biti određen manualno ili automatski s pomoću programa – pokazalo se da je automatski način prihvatljiv)
    c. Unos naziva uzoraka i položaja na pločici
2. Imobilizacija biotiniliranih PCR produkata na sefarozne kuglice
3. Odvajanje lanaca DNA u denaturacijskom puferu (sastav poznat proizvođaču); biotinilirani lanac DNA ostaje vezan za sefaroznu kuglicu
4. Ispiranje nevezanih lanaca i nečistoća u puferu za ispiranje (sastav poznat proizvođaču)
5. Otpuštanje kuglica s vezanom DNA u smjesu s početnicama za pirosekv.
6. Zagrijavanje smjese DNA i početnica za pirosekv. na 80 °C 5 min
7. Hlađenje uzoraka unutar uređaja PyroMark® Q24 Advanced prilikom čega početnice za pirosek. hibridiziraju s komplementarnim slijedom DNA
8. Unošenje u nastavku navedenih kemikalija u pirosekvenator
    a. Smjesa enzima: sadrži DNA polimerazu, ATP-sulfurilazu, luciferazu i apirazu. Dodan je i protein SSB za sprječavanje stvaranja sekundarnih struktura kalupne DNA ili početnica.
    b. Supstrat: sadrži APS i luciferin
    c. Deoksiribonukleotidi: dTTP, dCTP, dGTP i dATPαS (deoksiadenozin-alfa-tio-trifosfat). Posljednji se koristi umjesto dATP jer služi kao normalni supstrat polimerazi, dok ga luciferaza ne može koristiti.
9. Analiza s pomoću uređaja PyroMark® Q24 Advanced (trajanje oko 2h)
10. Kvantifikacija metilacije s pomoću programa PyroMark® Q24 Software

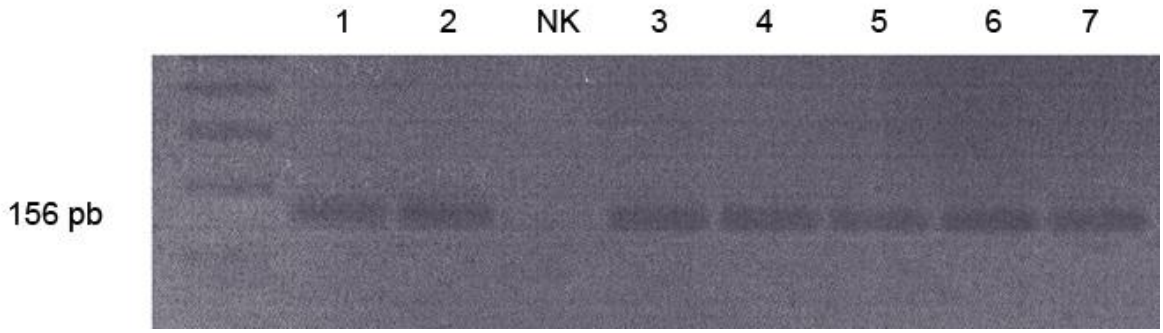
2.6 Statistička obrada podataka

Rezultati su obrađeni u računalnom programu STATISTICA®. Za usporedbu postotka metilacije pojedinih CpG mjesta svakog fragmenta između UC i CD, UC i HC, CD i HC upotrijebljena je neparametrijska analiza Mann–Whitney U test. Nadalje, za svaki skup podataka, UC, CD i HC, te svako CpG mjesto, napravljena je deskriptivna statistika za utvrđivanje srednje vrijednosti i standardne devijacije.

3. Rezultati

3.1 Provjera PCR reakcije

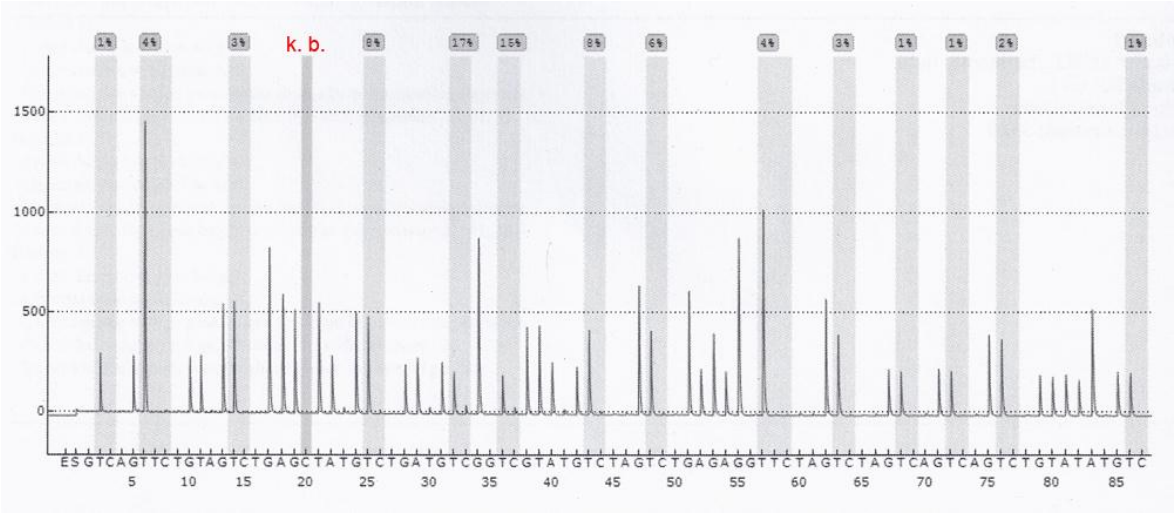
Umnožavanje fragmenata DNA provjereno je s pomoću elektroforeze DNA na agaroznom gelu. Slika 7 primjer je gela s fragmentom F1 umnoženim u nekoliko uzoraka. Negativna kontrola sadržavala je sve sastojke reakcijske smjese osim DNA, te je tako služila za provjeru onečišćenja sastojaka.



Slika 7 – Primjer gela nakon elektroforeze DNA. Fragment 1 umnožen s pomoću PCR-a i vizualiziran na agaroznom gelu nakon elektroforeze. Uzorci na slici zbog jednostavnosti su označeni brojevima od 1 do 7. Uključuju DNA izoliranu iz periferne krvi oboljelih od CD, UC te zdravih osoba, konvertiranu natrijevim bisulfitom. NK je negativna kontrola - sadrži sve sastojke reakcijske smjese za PCR osim DNA. S pomoću fragmenata DNA poznatih veličina u prvoj jažici potvrdili smo da se radi o fragmentu F1 veličine 156 parova baza.

3.1. Kontrola kvalitete bisulfitne konverzije

Kvaliteta (uspješnost) bisulfitne konverzije provjerena je prilikom pirosekvenciranja. PyroMark® Q24 Advanced sadrži kontrolu bisulfitne konverzije obično na početku sekvenciranja. Ako je konverzija bila potpuna, svaki citozin kojemu ne slijedi gvanin bit će promijenjen u timin. Kao kontrolu, uređaj u smjesu ubacuje dCTP u trenutku kad u sekvenci slijedi T konvertiran iz nemetiliranog C. Nastanak svjetlosnog signala označava nekonvertirane C u smjesi, te se uzorak odbacuje. Gotovo svi uzorci su prošli kontrolu bisulfitne konverzije. Kontrola kvalitete bisulfitne konverzije može se vidjeti na pirogramu nakon pirosekvenciranja – nedostatak svjetlosnog signala kod oznake za kontrolni C ukazuje na uspješnu konverziju (Slika 8).



Slika 8 – Primjer pirograma nakon pirosekvenciranja, u ovom slučaju fragmenta F1. Na vertikalnoj osi prikazan je intenzitet svjetlosnog signala, a na horizontalnoj slijed kojim su dNTP-ovi dodavani u smjesu. Postoci metilacije CpG mjesta prikazani su iznad grafa. Kontrola kvalitete bisulfitne konverzije nalazi se ispod oznake k. b. („kontrola bisulfitne“).

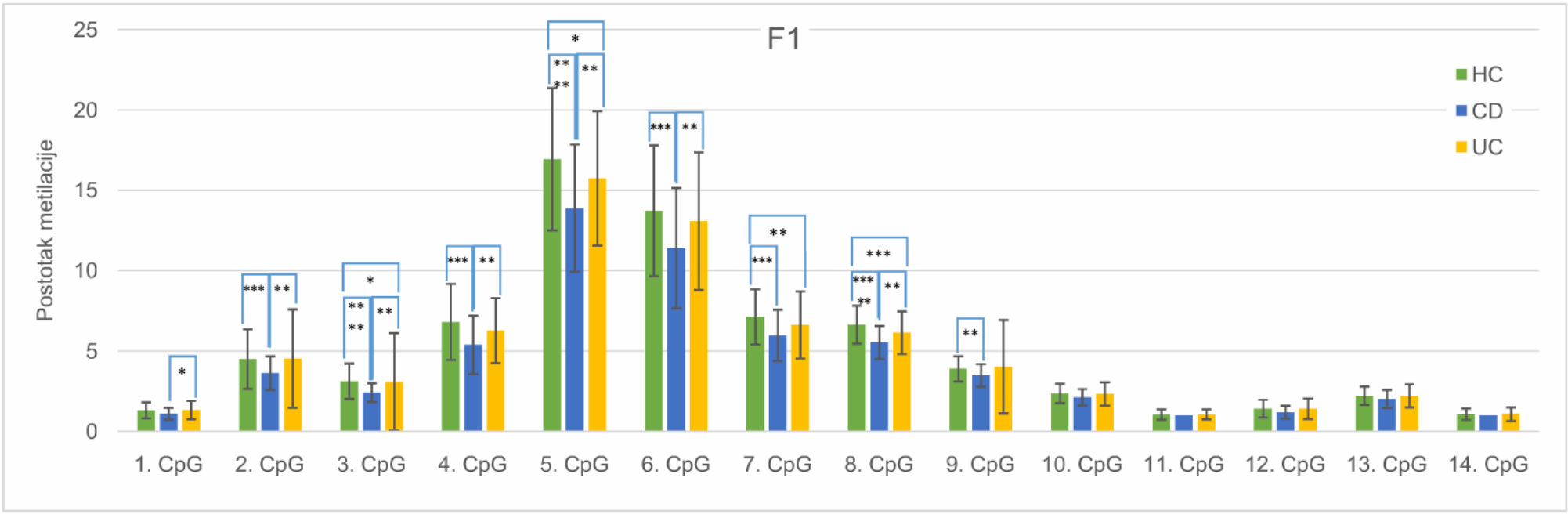
3.2 Uzorak metilacije gena BACH2 promijenjen je kod osoba oboljelih od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa

U rezultatima pirosekvenciranja, softver uređaja istaknuo je uzorke koji su pokazivali kontaminaciju ili slab signal. Ti uzorci nisu ušli u daljnju statističku analizu. Konačni broj prihvaćenih uzoraka u kojima je analiziran pojedini fragment prikazan je u Tablici 3.

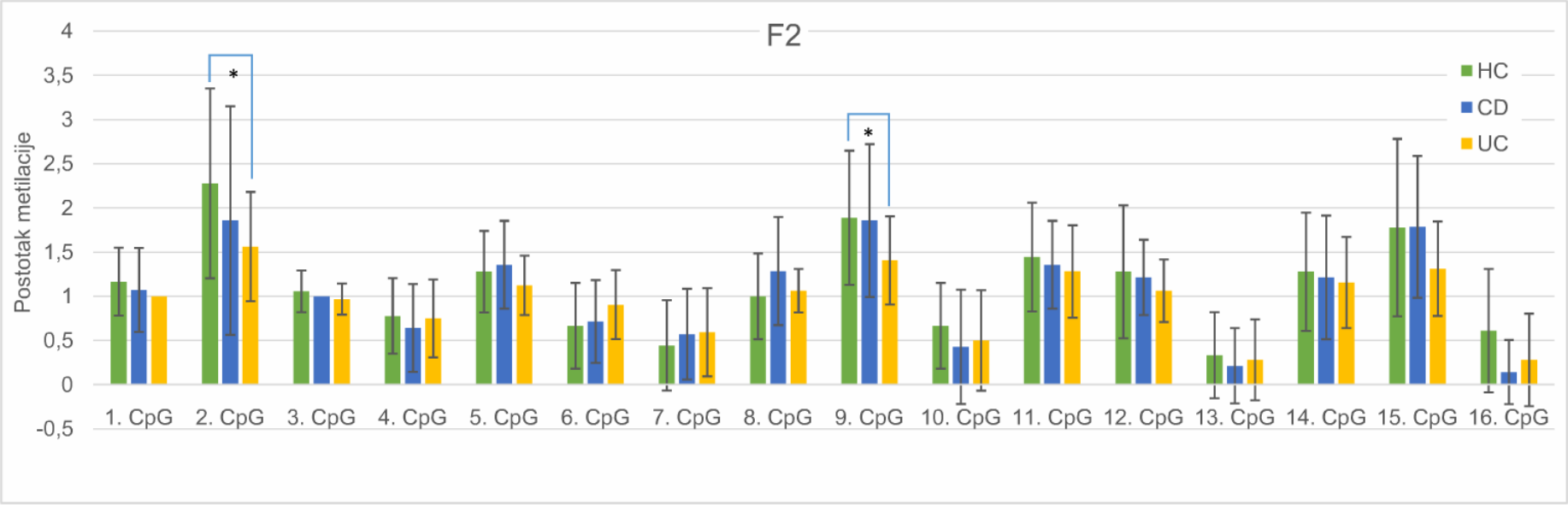
Tablica 3 – Broj uzoraka u kojima je analizirana metilacija pojedinog fragmenta gena *BACH2*

Naziv fragmenta	Broj uzoraka zdravih osoba (HC)	Broj uzoraka oboljelih od Crohnove bolesti (CD)	Broj uzoraka oboljelih od ulceroznog kolitisa (UC)
F1	68	41	133
F2	18	14	32
F3	26	15	41

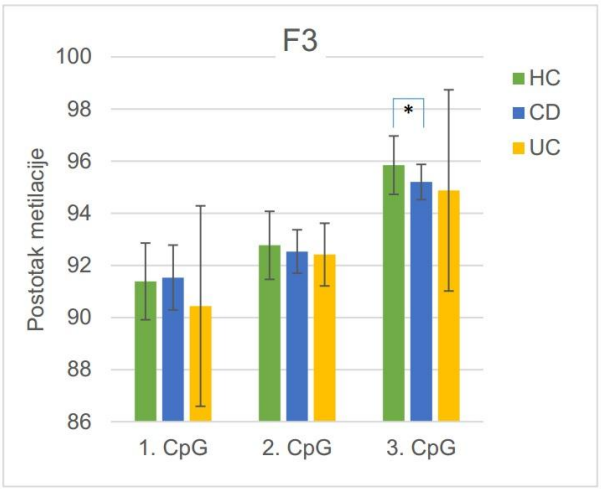
Analizom metilacije fragmenata F1, F2 i F3 gena *BACH2* pomoću bisulfitnog pirosekvenciranja određen je postotak metilacije pojedinih CpG mjesta, odnosno postotak stanica u uzorku u kojima je to CpG mjesto metilirano. Metilacija CpG dinukleotida unutar fragmenta 2 i 3 pokazuje tek male statistički značajne promjene između pacijenata i zdravih osoba, no stupanj metilacije CpG dinukleotida unutar fragmenta F1 statistički značajno je različit između osoba oboljelih od upalnih bolesti crijeva i zdravih osoba (Slika 9). Također, razlike su uočljive između uzoraka CD i UC. Većinom se radi o istim CpG mjestima koja pokazuju različit postotak metilacije između pojedinih grupa te su ta CpG mjesta više metilirana u odnosu na ostatak DNA fragmenta. Statistički najznačajnija promjena metilacije je ona u CpG mjestu 8 fragmenta F1. Korigirana p vrijednosti za HC/CD iznosi 0,000001, dok su p vrijednosti za HC/UC i CD/UC nešto niže ali također statistički značajne. 8 od ukupno 14 CpG mjesta pokazuju statistički značajnu razliku između oboljelih (CD ili CD i UC) i zdravih osoba. Također, jedno CpG mjesto pokazuje različitu metilaciju uzoraka CD i HC. Kod 2., 4., i 6. CpG mjesta postoji razlika CD/UC i CD/HC bez razlike UC/HC, što znači da se UC i CD na tim CpG mjestima više razlikuju nego UC od zdravih osoba. Općenito, metilacija svih CpG mjesta u uzorcima pacijenata s Crohnovom bolešću je niža od one u uzorcima s ulceroznim kolitisom ili u zdravih osoba, iako ne pokazuju sva mjesta statističku značajnost. 8 CpG mjesta (1.–9.) je hipometilirano u uzorcima pacijenata s Crohnovom bolešću u odnosu na zdrave osobe i ta hipometilacija predstavlja statističku promjenu. Također, u uzorcima pacijenata s UC statistički je značajno smanjena metilacija u odnosu na zdrave osobe na 4 od ukupno 14 CpG mjesta (3., 5., 7. i 8. CpG mjesto).



Slika 9 – Postotak metilacije CpG mjesta unutar fragmenta F1 gena *BACH2* određen pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije DNA. Za svako CpG mjesto prikazan je stupac metilacije u uzorku zdravih osoba (prvi stupac, HC), Crohnove bolesti (drugi stupac, CD) i ulceroznog kolitisa (treći stupac, UC). Standardna devijacija prikazana je u obliku crne linije na svakom stupcu. Statistički značajna korigirana p vrijednost označena je zvjezdicama između relevantnih grupa. Jedna zvjezdica (*) označava p vrijednost ≤ 0,05, dvije zvjezdice (**) ≤ 0,01, tri zvjezdice (***) ≤ 0,001, četiri zvjezdice (****) ≤ 0,0001 i pet zvjezdica (*****) ≤ 0,000001.



Slika 10 – Postotak metilacije CpG mjesta unutar fragmenta F2 gena *BACH2* određen pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije. Za svako CpG mjesto prikazan je stupac metilacije u uzorku zdravih osoba (prvi stupac, HC), Crohnove bolesti (drugi stupac, CD) i ulceroznog kolitisa (treći stupac, UC). Standardna devijacija prikazana je u obliku crne linije na svakom stupcu. Statistički značajna korigirana p vrijednost označena je zvjezdicama između relevantnih grupa. Jedna zvjezdica (*) označava p vrijednost ≤ 0,05 i > 0,01.



Slika 10 – Postotak metilacije CpG mjesta unutar fragmenta F3 gena *BACH2* određen bisulfitnim pirosekvenciranjem. Za svako CpG mjesto prikazan je stupac metilacije u uzorku zdravih osoba (HC, prvi stupac), Crohnove bolesti (CD, drugi stupac) i ulceroznog kolitisa (UC, treći stupac). Standardna devijacija prikazana je u obliku crne linije na svakom stupcu. Statistički značajna korigirana p vrijednost označena je zvjezdicama između relevantnih grupa. Jedna zvjezdica (*) označava p vrijednost ≤ 0,05 i > 0,01.

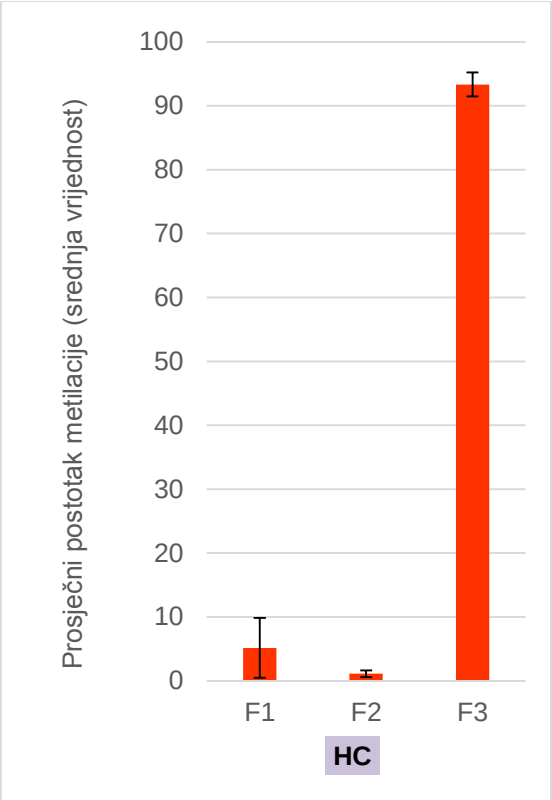
Fragment 2 dio je prvog introna gena. Kroz sva CpG mjesta pokazuje izrazito niski postotak metilacije, što je konzistentno s njegovom lokacijom unutar CpG otoka (Slika 10). Od 16 analiziranih CpG mjesta svega dva pokazuju statistički značajnu razliku između uzoraka pacijenata s UC te zdravih osoba.

F3 fragment se nalazi unutar promotora gena BACH2, no nije dio CpG otoka. Jedina statistički značajna razlika u metilaciji između grupa HC i CD zabilježena je na trećem CpG mjestu (Slika 11).

3.3 Stupanj metilacije CpG dinukleotida ovisan je o položaju DNA fragmenta

Napravljena je statistička analiza medijana i srednje vrijednosti ukupne metilacije pojedinog fragmenta u zdravih osoba. Razlika stupnja metilacije s obzirom na položaj fragmenta je vrlo velika: F1 i F2 fragmente karakterizira niska metilacija (medijan 3,5% i 1,1%, te srednja vrijednost 5,2% i 1,1%) dok F3 fragment pokazuje visoki stupanj metilacije (medijan 92,8% i srednja vrijednost 93,3%). Rezultati su u skladu s položajem ovih fragmenata u odnosu na CpG otok. Sva CpG mjesta unutar

F1 i F2 fragmenata nalaze se unutar CpG otoka, dok je F3 fragment lociran izvan CpG otoka. Kako F1 i F3 fragmenti pripadaju promotorskoj regiji, može se zaključiti da razina metilacije ne ovisi o poziciji s obzirom na promotor, već u odnosu na CpG otok. Na slici su prikazani postoci metilacije za sva tri fragmenta u obliku srednje vrijednosti (Slika 12). Linije standardne devijacije pokazuju heterogenost metilacije različitih CpG mjesta u fragmentu, što je najizraženije u F1.



Slika 11 – Srednja vrijednost postotaka metilacije CpG mjesta unutar fragmenata F1, F2 i F3 gena *BACH2* kod zdravih osoba (HC). Okomita crta standardne devijacije ukazuje na heterogenost metilacije pojedinih CpG mjesta unutar pripadnog fragmenta.

4. Rasprava

Unatoč pojednostavljenoj teoriji o utjecaju CpG otoka na transkripciju gena – hipermetiliranost je povezana s genskom represijom, dok je hipometiliranost povezana s aktivacijom gena – regulacija transkripcije metilacijom CpG dinukleotida unutar CpG otoka puno je kompleksnija. Pokazano je da postoji više stanja kromatina na području CpG otoka. Permisivno stanje nemetiliranih CpG otoka privlači transkripcijske faktore i RNA polimerazu II do mjesta inicijacije transkripcije. Pretpostavlja se da se prepoznavanje događa putem proteinskih domena koje prepoznaju nemetilirana CpG mjesta, ZF-CxxC (engl. *zinc finger, ZF*, cinkov prst). Također, sastav nukleosoma je drugačiji nego u okolnom području DNA, u rasporedu je koji pogoduje transkripciji. No za usmjerenu i uspješnu transkripciju potrebna je dodatna stimulacija transkripcijskim aktivatorima. Permisivno stanje kromatina CpG otoka omogućava brz i lak odgovor koji vodi aktivnom stanju kromatina i pravilnoj transkripciji. Nasuprot tome, promotori kojima nedostaje CpG otok koriste kromatin-remodelirajuće komplekse ovisne o ATP-u kako bi stanje kromatina postalo permisivno za vezanje aktivirajućih faktora (Guenther i sur. 2007). U embrionskim stanicama, ekspresija određenih gena nije potrebna, no ostavlja se mogućnost za kasnijom reaktivacijom prilikom diferencijacije. U diferenciranih tkiva održava se stalno utišano stanje gena nespecifičnih za tu vrstu tkiva. Privremeno utišavanje u embrionskim stanicama i stalna represija u diferenciranim stanicama održava se epigenetičkim mehanizmima kovalentnih modifikacija histonskih proteina uz aktivne represivne proteinske komplekse, npr. PRC2 (engl. *polycomb repressive complex 2*). Mali broj CpG otoka ostaje u konstitutivno utišanom stanju, primjerice zbog hipermetilacije tijekom inaktivacije kromosoma X ili stvaranja genomskog utiska (Allis i sur. 2007). Metilacija CpG mjesta sprječava vezanje proteina s ZF-CxxC domenom i stvara vezna mjesta za proteine s MBD (engl. *methyl binding domain*, metil-vezna domena) koji regrutiraju proteinske komplekse sastavljene od mnogih efektorskih proteina, od kojih HDAC imaju glavnu ulogu (Blackledge i sur. 2010). Rezultat je stabilni i epigenetički nasljedni oblik transkripcijske represije. Mehanizmi specifične metilacije određenih CpG otoka ostaju nejasni. Jedna od mogućnosti je utjecaj privremenih proteinskih kompleksa

odgovornih za utišavanje na lokalnu metilaciju DNA. Promjene metilacijskog stanja CpG otoka u promotorima gena mogu dovesti do promjene ekspresije gena, što je dokazano kroz mnogobrojna istraživanja, posebice tumorskih tkiva. Aktivna metilacija te aktivna i pasivna demetilacija zbog npr. nefunkcioniranja DNMT1 uzrok su aberantnih uzoraka metilacije DNA u brojnim poremećajima i kompleksnim bolestima (Blackledge i Klose 2011).

Analiza metilacije promotora gena *BACH2* pokazala je značajnu hipometilaciju pojedinih CpG mjesta unutar CpG otoka u uzorcima pacijenata s Crohnovom bolesti i ulceroznim kolitisom u odnosu na zdrave ljude. Broj CpG mjesta s promjenom metilacije u pacijenata najveći je u fragmentu F1, koji se nalazi u promotoru gena i dio je CpG otoka. Stupanj metilacije CpG mjesta manji je kod Crohnove bolesti nego kod ulceroznog kolitisa. Također, tri CpG mjesta pokazuju razliku metilacije između pacijenata i zdravih osoba samo kod Crohnove bolesti, što bi moglo upućivati da su ta CpG mjesta relevantnija za tijek Crohnove bolesti nego za ulcerozni kolitis. Zanimljiva je također raspodjela više metiliranih CpG mjesta u fragmentu F1 kod sve tri skupine, HC, CD i UC. Iako se fragment F1 nalazi unutar CpG otoka, što odgovara uočenoj niskoj metilaciji pripadnih CpG mjesta, u središnjem području fragmenta može se vidjeti relativno povećanje metilacije. Naglo povećanje lokalne metilacije navodi na pitanje o mogućoj regulatornoj funkciji tog dijela F1. Veće značenje mogućem regulatornom motivu pridaju i uočene značajne razlike između grupa uzoraka upravo na tom području. Nadalje, pokazana je relacija globalne metilacije analiziranih fragmenata s obzirom na lokaciju ovih fragmenta unutar promotora: niska metilacija karakteristična je za F1 i F2 fragment unutar CpG otoka, dok je fragment 3 izvan CpG otoka visoko metiliran. Brojna su istraživanja pokazala ovisnost ekspresije gena o metilaciji promotora, od kojih su neka koristila upravo metodu bisulfitnog pirosekvenciranja (Volkmar i sur. 2012; Balaguer i sur. 2010; Lan i sur. 2014; Reynard, Bui, Syddall i Loughlin 2014; Håvik i sur. 2012). No ne moraju svi CpG dinukleotidi nekog promotora pokazivati jednaku promjenu metilacijskog stanja, kao primjerice u slučaju gena *CEBPA* u akutnoj mijeloičnoj leukemiji (Fasan i sur. 2013). Od tri različita područja analizirana u promotoru gena *CEBPA* upečatljiv uzorak aberantne hipermetilacije imao je samo distalni promotor, dok je metilacija središnjeg dijela promotora u pacijenata ostala nepromijenjena. Hipermetilacija distalnog promotora negativno korelira s ekspresijom gena *CEBPA*.

Još jedno istraživanje metilacije DNA povezalo je hipometilaciju samo nekoliko CpG mjesta s povećanjem razine mRNA i to u promotorima gena *MMP13* i *IL1B* u hondrocitima (Hashimoto i sur. 2013). Štoviše, autori su uspjeli izdvojiti jedno određeno CpG mjesto unutar oba gena s najvećim utjecajem na regulaciju transkripcije. Metilacija tog CpG mjesta u genu MMP13 negativno je utjecala na vezanje transkripcijskog faktora HIF-2α. S druge strane, hipermetilacija promotora ne vodi nužno do represije transkripcije, kao što su pokazali Fouse i sur. 2008. god. Analiza mišjih embrionalnih stanica identificirala je gene s metilacijom promotora od kojih je 36% bilo eksprimirano. 80% takvih gena sadrži aktivnu histonsku oznaku, što objašnjava aktivno stanje kromatina unatoč određenoj razini metilacije DNA.

Određivanje stupnja metilacije u dijelu promotora gena *BACH2* koje smo proveli ne može nam ništa reći o utjecaju metilacije na njegovu ekspresiju. U pravilu, smanjenje hipometilacije pretpostavlja povećanje transkripcijske aktivnosti, što bi u ovom slučaju značilo veću ekspresiju *BACH2* u pacijenata oboljelih od CD i UC. Međutim, nismo bili u mogućnosti napraviti korelacijsku analizu između stupnja metilacije ovoga gena te njegove ekspresije. Franke i sur. (2010) pokazali su asocijaciju *BACH2* i IBD-a. Uočena promjena metilacije gena *BACH2* kod pacijenata mogla biti još jedan dokaz ove asocijacije. Iako statistički značajna, promjena metilacije fragmenta F1 u pacijenata je mala. Ipak, moramo uzeti u obzir da smo analizirali metilaciju iz pune krvi u kojoj se nalaze različiti tipovi stanica. Poznato je da različiti tipovi krvnih stanica pokazuju različite metilacijske profile (Li i sur. 2012). Uzorak DNA iz krvi potječe od različitih populacija bijelih krvnih stanica: T limfocita, B limfocita, monocita i granulocita (Dean 2005). Kako je *BACH2* eksprimiran pretežno u B limfocitima i T limfocitima (Tsukumo i sur. 2013), i to s razlikama između subpopulacija, bilo bi zanimljivo analizirati metilaciju fragmenta F1 te transkripcijsku aktivnost *BACH2* nakon njihovog razdvajanja pomoću staničnog sortera. Utvrđeno je da je BACH2 ključan za održavanje T limfocita u naivnom stanju, suprimirajući diferencijaciju u efektorske T limfocite (Tsukumo i sur. 2013). Također, potreban je za razvoj Treg, važnog elementa imunološke tolerancije, koja je u upalnim bolestima crijeva poremećena (Roychoudhuri 2013). U istom istraživanju, pokazano je da BACH2 koči diferencijaciju pomoćničkih limfocita Th1, Th2 i Th17, od kojih je Th17 snažno asociran s IBD-om (Satsangi i sur. 2012). Kako je za pravilan razvoj antitijela potreban BACH2, zanimljiva je činjenica da su uočene

razlike u količini antitijela koje tijelo luči u odgovoru na različite stimulanse u osoba oboljelih od IBD-a (Hevia i sur. 2014, Cai 2014, Frehn 2014). U istraživanju limfoma B limfocita pokazano je da je pojačana ekspresija *BACH2* uzrok kontinuirane somatske hipermutacije gena za teški lanac imunoglobulina (Kikuchi 2013). Analiza metilacije nasumično odabranih CpG mjesta perifernih B limfocita pokazala je razlike u metilaciji u osoba oboljelih od upalnih bolesti crijeva. CpG lokusi uključivali su put IL-12/IL-21, koji je već prethodno asociran s upalnim bolestima crijeva (Lin i sur. 2012). Također, uočena je hiperaktivnost B limfocita u osoba oboljelih od IBD-a (Noronha 2009), možda upravo zbog njihove regulatorne funkcije i supresije inflamacije (Mizoguchi i sur. 2002). Postoji mnogo indikacija za daljnje istraživanje funkcije BACH2 u upalnim bolestima crijeva. Međutim, ako je ekspresija BACH2 zaista promijenjena, postavlja se pitanje je li to uzrok ili posljedica upalnog stanja i mikrobne disbioze IBD-a (element bolesti). Osim posljedica hipometilacije u promotoru BACH2, trebao bi se istražiti proces kojim se demetilacija dogodila. Dosad su provedena brojna istraživanja metilacije DNA kod osoba oboljelih od upalnih bolesti crijeva. Neka su se usredotočila na uzorke tkiva, dok su druga analizirala perifernu krv. U oba slučaja detektirani su diferencijalni uzorci metilacije mnogih gena. Pokazano je da stupanj DNA metilacije može uspješno razlikovati upaljeno tkivo od neupaljenih područja crijeva zahvaćenog bolešću. Pojava visoke razine hipermetilacije u IBD-u povezana je s rizikom od kolorektalnog karcinoma, koji se smatra rijetkim, ali mogućim ishodom upalnih bolesti crijeva (Petronis i Petroniene 2000). Adams i sur. (2014) identificirali su 65 CpG mjesta s promjenom metilacijskog statusa u leukocitnoj DNA iz periferne krvi djece koja pate od Crohnove bolesti. Brojni identificirani lokusi nalazili su se u blizini područja oko genetičkih polimorfizama asociranim s upalnim bolestima crijeva. Najznačajnije poklapanje smješteno je u genu *MIR21*, koji kodira za mikro-RNA molekulu s ulogom u utišavanju brojnih gena. Mjesto početka transkripcije *MIR21* je hipometilirano. Analizom ekspresije tog gena u odraslih pacijenata i djece utvrđena je pojačana ekspresija u leukocitima i upaljenom tkivu. Kao primjer gena s promijenjenim metilacijskim statusom u ulceroznom kolitisu mogu navesti *MDR1* (Tahara i sur. 2009). Produkt ovog gena je membranski glikoprotein, ABC transporter koji iz stanice izbacuje strane molekule (engl. *ATP-binding cassette transporters*, ATP-vezujući kazetni transporteri). Hipermetilacija promotora *MDR1* analizirana u uzorcima tkiva povezana je s kroničnim aktivnim

ulceroznim kolitisom, ranom dijagnozom (ispod 20 godina starosti), većim brojem hospitalizacije i težim simptomima. Mnogo istraživanja je povezalo promjenu metilacije DNA iz perifernih leukocita u osoba koje boluju od upalnih bolesti crijeva u odnosu na zdrave osobe (Karatzas i sur. 2014). Konačne baze podataka o metilaciji gena u IBD-u još nema. Broj dokaza o važnosti kompleksne interakcije okoliša, crijevne mikroflore i genetičke podloge pojedinca se povećava, u čemu upravo metilacija DNA može imati ulogu. Pokazano je da je metilacija DNA brojnih gena povezana s upalnim procesima te čini jedan od medijatora utjecaja okolišnih faktora na kronična upalna stanja (Bayarsaihan 2011).

Postoje istraživanja koja su pokazala razliku u globalnoj metilaciji perifernih leukocita kod patoloških stanja, te, u manjoj mjeri, ona koja su razliku pronašla u specifičnim genima, otkrivajući potencijalne biomarkere rizika. Asocijacija bolesti i globalne metilacije DNA perifernih leukocita pronađena je u raka želuca, debelog crijeva, dojke, glave i vrata, te shizofrenije i mijelodisplastičnog sindroma (Terry i sur. 2011). Kao dobar primjer kliničkog epigenetičkog biomarkera može se navesti hipermetilacija CpG otoka u promotoru gena *MGMT* u predviđanju odgovora pacijenta na terapiju (Esteller i sur. 2000). Međutim, nedostatak konsenzusa o adekvatnoj metodologiji usporilo je implementaciju ovog biomarkera u molekularnu dijagnostiku (Mikeska i sur. 2012).

Unatoč velikom broju postojećih metoda za analizu metilacije DNA, samo su neke od njih prikladne za upotrebu u molekularnom dijagnostičkom laboratoriju. Idealne metode trebale bi moći analizirati male količine DNA varijabilne kvalitete, biti jeftine, automatizirane, i s mogućnošću procesiranja više uzoraka u isto vrijeme. Jedna od takvih metoda je bisulfitno pirosekvenciranje (Mikeska i Craig 2014). Iako je ovo istraživanje pokazalo statistički značajnu promjenu metilacijskog uzorka fragmenta F1 u promotoru gena *BACH2* kod pacijenata, uočena razlika u metilaciji vrlo je mala. Statistički najznačajnija promjena utvrđena je između HC i CD na 8. CpG mjestu F1: 6,65% kod HC i 5,54% kod CD. Najveća razlika kod statistički značajne promjene jest na 5. CpG mjestu fragmenta F1, i to ponovno između HC i CD (16,94% i 13,90%). Moguće je da se razlika poveća ako se u obzir uzmu samo relevantne stanične linije, npr. T limfociti, B limfociti ili njihove subpopulacije. Buduća istraživanja metilacije DNA iz periferne krvi kao biomarkera trebala bi posvetiti pažnju varijacijama metilacije DNA u različitim subpopulacijama leukocita. Zbog

dodatnog kompleksnog koraka razdvajanja subpopulacija, što se može napraviti pomoću npr. protočne citometrije, istraživanja metilacije DNA u bolestima dosad su najčešće analizirala ukupnu populaciju krvnih stanica (Mikeska i Craig 2014). Također, kako je razdvajanje staničnih populacija zahtjevno, pitanje je koliko bi se to moglo uključiti u kliničku upotrebu. U svakom slučaju, potrebna je potvrda ove analize u većem broju uzoraka i stratificiranjem pacijenata s obzirom na životni stil, dob, spol i slično. Kako na globalnu metilaciju DNA utječu neki okolišni čimbenici poput pušenja i fizičke aktivnosti, u obzir bi se trebale uzeti potencijalne zbunjujuće (engl. *confounding*) varijable pri evaluaciji metilacije DNA kao biomarkera. U analizu je važno uključiti informacije o aktivnosti bolesti te njezin podtip, te usporediti s drugim prognostičkim biomarkerima IBD-a. Osim toga, kvalitetan biomarker trebao bi imati objašnjenu biološku podlogu i utvrđen položaj u mreži faktora koji sudjeluju u procesima upalnih bolesti crijeva. Iako je metilacija DNA iz periferne krvi obećavajuća i poželjna vrsta biomarkera, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se metilacija gena *BACH2* smjestila na listu biomarkera IBD-a korištenih u kliničkoj praksi.

5. Zaključak

Upalne bolesti crijeva posljedica su nepravilnog funkcioniranja imunološkog sustava u odgovoru na crijevnu mikrofloru, ili pojačane imunološke reakcije na crijevne patogene. Analizom metilacije CpG mjesta u tri fragmenta u promotoru i prvom intronu gena *BACH2* iz uzoraka periferne krvi pokazana je vrlo niska metilacija lokusa koji se nalaze unutar CpG otoka, te visoka metilacija CpG mjesta izvan CpG otoka. Rezultati se slažu s poznatim činjenicama o uzorcima metilacije DNA čovjeka. Također, utvrđena je promjena u osoba oboljelih od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa u odnosu na zdrave osobe. Razlika je značajna samo u jednom fragmentu, dok je u preostala dva minimalna te vjerojatno ne doprinosi promjeni regulacije *BACH2*. Fragment koji se nalazi unutar promotora i CpG otoka pokazuje smanjeni postotak metilacije u oboljelih u odnosu na zdrave osobe, posebice u osoba koje pate od Crohnove bolesti. Promjena metilacije može značiti promjenu u ekspresiji gena, što bi ovom slučaju upućivalo na povećanu ekspresiju *BACH2* u pacijenata. S obzirom na prethodno dokazane asocijacije BACH2 s upalnim bolestima crijeva, te s komponentama imunološkog sustava, rezultati ove analize upućuju na važnost daljnjih istraživanja funkcije BACH2 u ovih bolesti. Zbog bitne uloge u održavanju imunološke homeostaze, posebice s aspekta tolerancije, BACH2 bi mogao biti još jedan faktor u kompleksnim autoimunim procesima IBD-a. Osim toga, metilacija DNA iz periferne krvi poželjan je biomarker ovih bolesti zbog manje invazivnog uzimanja uzoraka. Za utvrđivanje značaja promjena metilacije CpG dinukleotida u genu *BACH2* te njegovog potencijalnog značaja kao epigenetičkog biomarkera potrebna su dodatna istraživanja na većem broju uzoraka te određivanje metilacije na širem području unutar promotora gena.

6. Literatura

Abraham, C. i Medzhitov, R., 2011. Interactions between the host innate immune system and microbes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 140(6), 1729–37.

Adams, A., Kennedy, N., Hansen, R., Ventham, N., O'Leary, K., Drummond, H., Noble, C., El-Omar, E., Russell, R., Wilson, D., Nimmo, E., Hold, G. i Satsangi, J., 2014. Two-stage Genome-wide Methylation Profiling in Childhood-onset Crohn's Disease Implicates Epigenetic Alterations at the VMP1/MIR21 and HLA Loci. *Inflammatory Bowel Diseases*, 0, 1–10.

Allis, C.D., Jenuwein, T. i Reinberg, D., 2007. Overview and Concepts. U: Allis, C. D., Jenuwein, T., Reinberg, D. (ur.), *Epigenetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY*, 23–56.

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. i sur., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180.

Balaguer, F., Link, A., Lozano, J., Cuatrecasas, M., Nagasaka, T., Boland, C. i Goel, A., 2010. Epigenetic silencing of miR-137 is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer research*, 70(16), 6609–18.

Baumgart, D. i Sandborn, W., 2007. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet*, 369(9573), 1641–1657.

Bayarsaihan, D., 2011. Epigenetic mechanisms in inflammation. *Journal of dental research*, 90(1), 9–17.

Blackledge, N. i Klose, R., 2011. CpG island chromatin. *Epigenetics*, 6(2).

Blackledge, N.P., Zhou, J.C., Tolstorukov, M.Y. i Farcas, A. M., 2010. CpG islands recruit a histone H3 lysine 36 demethylase. *Molecular cell,* 38, 179–190.

Brooks, W., Dantec, C., Pers, J.-O., Youinou, P. i Renaudineau, Y., 2010. Epigenetics and autoimmunity. *Journal of autoimmunity*, 34(3), J207–19.

Cai, C., Shen, J., Zhao, D., Qiao, Y., Xu, A., Jin, S., Ran, Z. i Zheng, Q., 2014. Serological Investigation of Food Specific Immunoglobulin G Antibodies in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *PLoS ONE*, 9(11).

Colella, S., Shen, L., Baggerly, K.A., Issa, J. P. i Krahe, R., 2003. Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites., *BioTechniques*, 35(1), 146–50.

Collins, L.J., Schönfeld, B. i Chen, X.S., 2011. The epigenetics of non-coding RNA. U: T. Tollefsbol (ur.), Handbook of epigenetics: the new molecular and medical genetics, *London: Academic*, 49–61.

Cooper, J.D., Smyth, D.J., Smiles, A.M., Plagnol, V., Walker, N.M., Allen, J.E., Downes, K., Barrett, J.C., Healy, B.C., Mychaleckyj, J.C., Warram, J.H. i Todd, J.A., 2008. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nature genetics*, 40(12), 1399–401.

Day, J. i Sweatt, J., 2010. DNA methylation and memory formation. *Nature Neuroscience*, 13(11), 1319–1323.

Dean, L., 2005. Chapter 1, Blood and the cells it contains. U: Dean, L. (ur.), Blood Groups and Red Cell Antigens. *Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).* Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2263/.

Dejeux, E., El abdalaoui, H., Gut, I.G. i Tost, J., 2009. Identifcation and quantifcation of differentially methylated loci by the pyrosequencing technology. U: Walker, J.M. i Clifton, N.J. (ur.), Methods in Molecular Biology, *Humana Press*, 189–205.

Dubois, P.C., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K.A., Romanos, J., Curtotti, A. i sur., 2010. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nature genetics*, 42(4), 295–302.

Esteller, M., Hamilton, S.R., Burger, P.C., Baylin, S.B., Herman, J.G., 2000. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *The New England journal of medicine*, 343(19), 1350–1354.

Frehn, L., Jansen, A., Bennek, E., Mandic, A., Temizel, I., Tischendorf, S., Verdier, J., Tacke, F., Streetz, K., Trautwein, C. i Sellge, G., 2014. Distinct Patterns of IgG and IgA against Food and Microbial Antigens in Serum and Feces of Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *PLoS ONE*, 9(9).

Fasan, A., Alpermann, T., Haferlach, C., Grossmann, V., Roller, A., Kohlmann, A., Eder, C., Kern, W., Haferlach, T. i Schnittger, S., 2013. Frequency and Prognostic Impact of CEBPA Proximal, Distal and Core Promoter Methylation in Normal Karyotype AML: A Study on 623 Cases. *PLoS ONE*, 8(2).

Feil, R. i Fraga, M., 2012. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nature Reviews Genetics*, 13(2), 97–109.

Fouse, S., Shen, Y., Pellegrini, M., Cole, S., Meissner, A., Neste, L., Jaenisch, R. i Fan, G., 2008. Promoter CpG Methylation Contributes to ES Cell Gene Regulation in Parallel with Oct4/Nanog, PcG Complex, and Histone H3 K4/K27 Trimethylation. *Cell Stem Cell*, 2(2), 160–169.

Franke, A., McGovern, D., Barrett, J., Wang, K., Radford-Smith, G. i Ahmad, T., 2010. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature Genetics*, 42(12), 1118–1125.

Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collins, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L. i Paul, C.L., 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1827–1831.

Gardiner-Garden, M. i Frommer, M., 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology*, 196(2), 261–282.

Gibney, E. i Nolan, C., 2010. Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105(1), 4–13.

Grolleau-Julius, A., Ray, D. i Yung, R.L., 2010. The role of epigenetics in aging and autoimmunity. *Clinical reviews in allergy and Iimmunology*, 39(1), 42–50.

Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R. i Young, R.A., 2007. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*, 130(1) Elsevier, 77–88

Hart, G. i Copeland, R., 2010. Glycomics Hits the Big Time. *Cell*, 143(5), 672–676.

Hashimoto, K., Otero, M., Imagawa, K., Andrés, M., Coico, J., Roach, H., Oreffo, R., Marcu, K. i Goldring, M., 2013. Regulated Transcription of Human Matrix Metalloproteinase 13 (MMP13) and Interleukin-1β (IL1B) Genes in Chondrocytes Depends on Methylation of Specific Proximal Promoter CpG Sites. *Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 10061–10072.

Håvik, A., Brandal, P., Honne, H., Dahlback, H.-S., Scheie, D., Hektoen, M., Meling, T., Helseth, E., Heim, S., Lothe, R. i Lind, G., 2012. MGMT promoter methylation in gliomas-

assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 36.

Herman, J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D. i Baylin, S.B., 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9821–9826.

Hevia, A., López, P., Suárez, A., Jacquot, C., Urdaci, M., Margolles, A. i Sánchez, B., 2014. Association of Levels of Antibodies from Patients with Inflammatory Bowel Disease with Extracellular Proteins of Food and Probiotic Bacteria. *BioMed Research International*, 2014. 1–8.

Hold, G., Smith, M., Grange, C., Watt, E., El-Omar, E. i Mukhopadhya, I., 2014. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years? *World journal of gastroenterology : WJG*, 20(5), 1192–1210.

Igarashi , K., 2014. Orchestration of plasma cell differentiation by Bach2 and its gene regulatory network. *Immunological reviews*, 261(1), 116–125.

Itoh-Nakadai, A., Hikota, R., Muto, A., Kometani, K., Watanabe-Matsui, M., Sato, Y., Kobayashi, M., Nakamura, A., Miura, Y., Yano, Y., Tashiro, S., Sun, J., Ikawa, T., Ochiai, K., Kurosaki, T. i Igarashi, K., 2014. The transcription repressors Bach2 and Bach1 promote B cell development by repressing the myeloid program. *Nature Immunology*, 15(12), 1171–1180.

Jirtle, R. i Skinner, M., 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics,* 8, 253–262.

Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R., Duerr, R., McGovern, D., Hui, K. i sur., 2012. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491(7422), 119–124.

Kaneko, Y., Nimmerjahn, F. i Ravetch, J., 2006. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. *Science*, 313(5787), 670–673.

Karatzas, P.S., Mantzaris, G.J., Safioleas, M., Gazouli, M., 2014. DNA methylation profile of genes involved in inflammation and autoimmunity in inflammatory bowel disease. *Medicine*, 93(28), e309.

Kikuchi, T., Tokunaka, M., Kikuti, Y., Carreras, J., Ogura, G., Takekoshi, S., Kojima, M., Ando, K., Hashimoto, Y., Abe, M., Takata, K., Yoshino, T., Muto, A., Igarashi, K. i Nakamura, N., 2013. Over-expression of BACH2 is related to ongoing somatic hypermutation of the immu noglobulin heavy chain gene variable region of de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology International*, 63(7), 339–344.

Kohli, R. i Zhang, Y., 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472), 472–479.

Krueger, F., Kreck, B., Franke, A. i Andrews S.R., 2012. DNA methylome analysis using short bisulfite sequencing data. *Nature methods*, 9, 145–151.

Lan, J., Tai, H.-C., Lee, S.-W., Chen, T.-J., Huang, H.-Y. i Li, C.-F., 2014. Deficiency in expression and epigenetic DNA Methylation of ASS1 gene in nasopharyngeal carcinoma: negative prognostic impact and therapeutic relevance. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(1), 161–169.

Lauc, G., Huffman, J., Pučić., M., Zgaga, L., Adamczyk, B., Mužinić, A i sur. 2013. Loci Associated with N-Glycosylation of Human Immunoglobulin G Show Pleiotropy with Autoimmune Diseases and Haematological Cancers. *PLoS Genetics*, 9(1), e1003225–e1003225.

Lander, E., Linton, L., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M., Baldwin, J. i sur., 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860–921.

Li, L., Choi, J.-Y., Lee, K.-M., Sung, H., Park, S., Oze, I. i sur., 2012. DNA Methylation in Peripheral Blood: A Potential Biomarker for Cancer Molecular Epidemiology. *Journal of Epidemiology*, 22(5), 384–394.

Lin, Z., Hegarty, J., Yu, W., Cappel, J., Chen, X., Faber, P., Wang, Y., Poritz, L., Fan, J.-B. i Koltun, W., 2012. Identification of disease-associated DNA methylation in B cells from Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Digestive diseases and sciences*, 57(12), 3145–3153.

Marroquí, L., Santin, I., Dos Santos, R.S., Marselli, L., Marchetti, P. i Eizirik, D.L., 2014. BACH2, a candidate risk gene for type 1 diabetes, regulates apoptosis in pancreatic β-cells via JNK1 modulation and crosstalk with the candidate gene PTPN2. *Diabetes*, 63(7), 2516–2527.

McAllister, K., Yarwood, A., Bowes, J., Orozco, G., Viatte, S., Diogo, D. i sur., 2013. Brief Report: Identification of BACH2 and RAD51B as Rheumatoid Arthritis Susceptibility

Loci in a Meta-Analysis of Genome-Wide Data. *Arthritis and Rheumatism*, 65(12), 3058–3062.

Medici, M., Porcu, E., Pistis, G., Teumer, A., Brown, S., Jensen, R. i sur., 2014. Identification of Novel Genetic Loci Associated with Thyroid Peroxidase Antibodies and Clinical Thyroid Disease. *PLoS Genetics*, 10(2).

Mikeska, T. i Craig, J. 2014. DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond. *Genes*, 5(3).

Mikeska, T., Bock, C., Do, H. i Dobrovic, A., 2012. DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation. *Expert review of molecular diagnostics*, 12(5), 473–487.

Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R.S. i Bhan, A.K., 2002. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity,* 16, 219–230.

Molodecky, N., Soon, I., Rabi, D., Ghali, W., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H. i Kaplan, G., 2012. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology*, 142(1).

Muto, A., Hoshino, H., Madisen, L., Yanai, N., Obinata, M., Karasuyama, H., Hayashi, N., Nakauchi, H., Yamamoto, M., Groudine, M. i Igarashi, K., 1998. Identification of Bach2 as a B-cell-specific partner for small Maf proteins that negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 3′ enhancer. *The EMBO Journal*, 17(19), 5734–5743.

Nakamura, A., Ebina-Shibuya, R., Itoh-Nakadai, A., Muto, A., Shima, H., Saigusa, D., Aoki, J., Ebina, M., Nukiwa, T. i Igarashi, K., 2013. Transcription repressor Bach2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(11), 2191–2204.

Naylor, S. 2003. Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert review of molecular diagnostics*, 3(5), 525–9.

Noronha, A.M., Liang, Y., Hetzel, J.T., Hasturk, H., Kantarci, A., Stucchi, A., Zhang, Y., Nikolajczyk, B.S., Farraye, F.A. i Ganley-Leal, L.M., 2009. Hyperactivated B cells in human inflammatory bowel disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 86, 1007–1016.

O'Connor, C. M. i Adams, J. U., 2010. Essentials of cell biology. *Cambridge*. Dostupno na: http://web.iitd.ac.in/~amittal/SBL101_Essentials_Cell_Biology.pdf.

Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H., Hayashi, N., Hoshino, H., Nishizawa, M., Yamamoto, M. i Igarashi, K., 1996. Bach Proteins Belong to a Novel Family of BTB-Basic Leucine Zipper Transcription Factors That Interact with MafK and Regulate Transcription through the NF-E2 Site. *Molecular and cellular biology*, 16(11), 6083–6095.

Petronis, A. i Petroniene, R., 2000. Epigenetics of inflammatory bowel disease. *Gut*, 47, 302–306.

Phillips, T., 2008. The role of methylation in gene expression. *Nature Education* 1(1), 116.

QIAGEN®, 2013. PyroMark® Q24 Advanced and Q24 Advanced CpG Reagents Handbook, June 2013. Dostupno na: *http://www.qiagen.com/*.

Ramsahoye, B., Biniszkiewicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A. i Jaenisch, R., 2000, 'Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), 5237–5242.

Reynard, L., Bui, C., Syddall, C. i Loughlin, J., 2014. CpG methylation regulates allelic expression of GDF5 by modulating binding of SP1 and SP3 repressor proteins to the osteoarthritis susceptibility SNP rs143383. *Human Genetics*, 133(8), 1059–1073.

Roychoudhuri, R., Hirahara, K., Mousavi, K., Clever, D., Klebanoff, C., Bonelli, M. i sur., 2013. BACH2 represses effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. *Nature*, 498(7455), 506–510.

Sasaki, S., Ito, E., Toki, T., Maekawa, T., Kanezaki, R., Umenai, T. i sur. 2000. Cloning and expression of human B cell-specific transcription factor BACH2 mapped to chromosome 6q15. *Oncogene*, 19(33), 3739–3749.

Satsangi, J., Nimmo, E., Prendergast, J., Aldhous, M., Kennedy, N., Henderson, P., Drummond, H., Ramsahoye, B., Wilson, D. i Semple, C., 2012. Genome-wide methylation profiling in Crohn's disease identifies altered epigenetic regulation of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(5), 889–899.

Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C., Patsopoulos, N.A. i Moutsianas, L., 2011. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, 476(7359), 214–219.

Saxonov, S., Berg, P. i Brutlag, D., 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1412–1417.

Schulz, W., Steinhoff, C. i Florl, A., 2006. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Current topics in microbiology and immunology*, 310, 211–250.

Tahara, T., Shibata, T., Nakamura, M., Yamashita, H., Yoshioka, D., Okubo, M. i sur., 2009. Effect of MDR1 gene promoter methylation in patients with ulcerative colitis. *International Journal of Molecular Medicine*, 23(4), 521–527.

Terry, M., Delgado-Cruzata, L., Vin-Raviv, N., Wu, H. i Santella, R., 2011. DNA methylation in white blood cells: Association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics*, 6(7), 828–837.

Theodoratou, E., Campbell, H., Ventham, N., Kolarich, D., Pučić-Baković, M., Zoldoš, V., Fernandes, D., Pemberton, I., Rudan, I., Lauc, G. i sur., 2014. The role of glycosylation in IBD. *Nature Reviews Gastroenterology i Hepatology*, 11(10), 588–600.

Tollefsbol, T., 2011. Epigenetics: The new science of genetics. U: Tollefsbol, T. (ur.), Handbook of epigenetics: the new molecular and medical genetics, *London: Academic*, 49–61.

Tong, M., Li, X., Parfrey, L., Roth, B., Ippoliti, A., Wei, B., Borneman, J., McGovern, D., Frank, D., Li, E., Horvath, S., Knight, R., i Braun, J., i sur., 2013. A Modular Organization of the Human Intestinal Mucosal Microbiota and Its Association with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE*, 8(11).

Tost, J., abdalaoui, H. i Gut, I., 2006. Serial pyrosequencing for quantitative DNA methylation analysis. *BioTechniques*, 40(6), 721–726.

Tost, J. i Gut, I., 2007. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nature Protocols*, 2(9), 2265–2275.

Trenkmann, M., Brock, M., Ospelt, C. i Gay, S., 2010. Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Clinical reviews in allergy i immunology*, 39(1), 10–9.

Tsukumo, S., Unno, M., Muto, A., Takeuchi, A., Kometani, K., Kurosaki, T., Igarashi, K., Saito, T., 2013. Bach2 maintains T cells in a naive state by suppressing effector memory-related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(26), 10735–10740.

Uittenboogaard, L., Payan-Gomez, C., Pothof, J., IJcken, W., Mastroberardino, P., Pluijm, I., Hoeijmakers, J. i Tresini, M., 2013. BACH2: A marker of DNA damage and ageing. *DNA Repair*, 12(11), 982–992.

Umer, M. i Herceg, Z., 2013. Deciphering the epigenetic code: an overview of DNA methylation analysis methods. *Antioxidants i redox signaling*, 18(15), 1972–86.

Varley, K., Gertz, J., Bowling, K., Parker, S., Reddy, T., Pauli-Behn, F., Cross, M., Williams, B., Stamatoyannopoulos, J., Crawford, G., Absher, D., Wold, B. i Myers, R., 2013. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Research*, 23(3), 555–567.

Volkmar, M., Dedeurwaerder, S., Cunha, D., Ndlovu, M., Defrance, M., Deplus, R. i sur., 2012. DNA methylation profiling identifies epigenetic dysregulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. *The EMBO Journal*, 31(6), 1405–1426.

Weber, M., Davies, J. J., Wittig, D., Oakeley, E. J., Haase, M., Lam, W. L., i Schuebeler, D., 2005. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nature genetics*, *37*(8), 853–862.

Willing, B.P., Dicksved, J., Halfvarson, J., Andersson, A.F., Lucio, M., Zheng, Z., Järnerot, G., Tysk, C., Jansson, J.K. i Engstrand, L., 2010. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology*, 139(6), 1844–1854.e1.

Zhao, S., Long, H. i Lu, Q., 2010. Epigenetic perspectives in systemic lupus erythematosus: pathogenesis, biomarkers, and therapeutic potentials. *Clinical reviews in allergy i immunology*, 39(1), 3–9.

www.neb.com/applications/epigenetics/dna-methylation-analysis/bisulfite-conversion#tabselect2

7. Životopis

Rođena sam u Zagrebu 22. svibnja 1990. godine gdje sam pohađala Osnovnu školu Mate Lovraka. Školovanje sam nastavila u zagrebačkoj XV. gimnaziji koju sam završila 2009. godine. U rujnu iste godine upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Nakon stjecanja zvanja sveučilišnog prvostupnika molekularne biologije 2012. godine, u rujnu 2012. upisala sam dvogodišnji diplomski studij molekularne biologije. Odlično poznajem engleski jezik, te posjedujem osnovno znanje francuskog, njemačkog i talijanskog jezika. Od kolovoza do studenog 2014. godine obavljala sam stručnu praksu na Institutu genetike i molekularne medicine (IGMM) pri Sveučilištu u Edinburgu. Tijekom studija, sudjelovala sam u studentskim udrugama poput Udruge studenata biologije (BIUS) i pomagala u ostvarenju znanstveno-popularne manifestacije Noć biologije.