Epigenetička regulacija gena BACH2 i njegova uloga u glikozilaciji imunoglobulina G

Klasić, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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:217:074649

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Marija Klasić

EPIGENETIČKA REGULACIJA GENA *BACH2* I NJEGOVA ULOGA U GLIKOZILACIJI IMUNOGLOBULINA G

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Marija Klasić

EPIGENETIC REGULATION OF *BACH2* GENE AND ITS ROLE IN IgG GLYCOSYLATION

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018

Ovaj je doktorski rad izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju, pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš što je sa mnom, tijekom izrade ovog rada, ali i tijekom drugih istraživanja u grupi, nesebično dijelila svoje vrijeme i znanje. Hvala joj na velikoj potpori i motivaciji.

Hvala Petri na pomoći tijekom istraživanja, brojnim savjetima i korisnim diskusijama te uvijek ugodnom društvu. Hvala joj što je bila uz mene od početka i otkrila mi ljepote eksperimentiranja i znanosti.

Veliko hvala mojoj kolegici Pauli na podršci i pomoći tijekom izrade rada, kao i na nebrojenim veselim druženjima. Da ne pišem previše, citirat ću dio iz njene zahvale: „Bolju kolegicu ne bih mogla zamisliti.“.

Hvala Ivoni, Vanji i Dori, najboljim cimericama na poslu. Hvala vam na svim korisnim savjetima, nesebičnoj pomoći i brojnim trenucima u kojima ste mi izmamile osmjeh na lice.

Veliko hvala Melaniji za svaki koristan savjet, diskusiju i pomoć tijekom eksperimenata, a posebno za svako veselo druženje.

Hvala Tomi na trudu i strpljenju tijekom zajedničkog rada. Ponekad sam si mislila „Čemu to?“, a sad sam sretna što sam mogla učiti od tebe.

Hvala Goranu, Samiri i Stjepanu na ugodnoj radnoj atmosferi i nesebičnoj pomoći.

Hvala izv. prof. dr. sc. Dunji Leljak-Levanić i izv. prof. dr. sc. Nataši Bauer na omogućenoj stručnoj praksi i izradi diplomskog rada, na prenošenju znanja i ljubavi prema znanosti. Hvala Ani-Mariji Boljkovac na ugodnim razgovorima i pomoći.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Aleksandru Vojti i doc. dr. sc. Rosi Karlić na pomoći pri analizi korelacija i bioinformatičkoj analizi prije i nakon sekvenciranja.

Zahvaljujem se sadašnjim i bivšim kolegama iz grupe i svim članovima Zavoda za molekularnu biologiju na korisnim savjetima, pomoći tijekom istraživanja i ugodnom druženju.

Najiskrenije hvala mojoj obitelji i prijateljima što su uvijek uz mene, vjeruju u mene i podržavaju me u svemu što radim.

Sveučilište u Zagrebu Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

EPIGENETIČKA REGULACIJA GENA *BACH2* I NJEGOVA ULOGA U GLIKOZILACIJI IMUNOGLOBULINA G

MARIJA KLASIĆ

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Cjelogenomskim studijama povezanosti gen *BACH2* povezan je s upalnim bolestima crijeva (IBD, od engl. *inflammatory bowel disease*) i s *N*-glikozilacijom imunoglobulina G (IgG), efektorskom molekulom humoralne imunosti. Neodgovarajući imunosni odgovor na crijevnu mikrofloru u osoba s genetskom predispozicijom jedan je od uzroka IBD-a. S druge strane, različiti okolišni faktori kroz epigenetičke mehanizme sudjeluju u razvoju ove bolesti. Stoga je glavni cilj ovog istraživanja bio utvrditi ulogu gena *BACH2* u *N*-glikozilaciji IgG-a, te u razvoju IBD-a. Analizirala sam CpG-metilaciju promotora ovoga gena u punoj krvi i B-limfocitima $CD19^+$ IBD-pacijenata i zdravih ljudi, upotrebom bisulfitnog pirosekvenciranja. Kod pacijenata s Crohnovom bolesti utvrdila sam da dolazi do hipometilacije promotora gena *BACH2*. Također sam napravila analizu korelacije CpG-metilacije i glikana IgG-a istih ispitanika. Kako bih otkrila regulira li transkripcijski faktor BACH2 neke od glikoziltransferaza napravila sam kromatinsku imunoprecipitaciju na kandidat genima. Dobiveni rezultati upućuju na indirektnu ulogu BACH2 u glikozilaciji IgG-a, na mogući mehanizam regulacije ekspresije gena *BACH2* i njegove povezanosti s IBD-om kroz promjenu metilacije DNA.

(90 stranica, 24 slike, 7 tablica, 198 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: metilacija DNA, histonske modifikacije, BACH2, imunoglobulin G, glikozilacija, upalne bolesti crijeva

Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Petra Korać

izv. prof. dr. sc. Slavko Gašparov

doc. dr. sc. Inga Marijanović

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Doctoral thesis

EPIGENETIC REGULATION OF *BACH2* GENE AND ITS ROLE IN IgG GLYCOSYLATION

MARIJA KLASIĆ

Faculty of Science, University of Zagreb

Genome-wide association studies connected *BACH2* gene with inflammatory bowel disease (IBD) and *N*-glycosylation of immunoglobulin G (IgG), effector molecule of humoral immunity. Inappropriate immune response to intestinal microflora in genetically susceptible individuals is one cause of IBD. On the other hand, environmental factors are also important for disease development through epigenetic mechanisms. The main goal of this research was to determine the role of *BACH2* in IgG *N*-glycosylation and IBD development. I analyzed *BACH2* promoter methylation in blood and $CD19^+$ B lymphocytes in IBD patients and healthy people, using bisulfite pyrosequencing. In Crohn's disease patients, I found significant hypomethylation of *BACH2* promoter. I also analyzed correlations of *BACH2* methylation and IgG glycans of the same patients. To identify if BACH2 regulates genes encoding for glycosyltransferases, I performed chromatin immunoprecipitation on candidate genes. Described results indicate possible indirect role of BACH2 in IgG glycosylation, mechanism of *BACH2* regulation and its association with IBD through DNA methylation changes.

(90 pages, 24 figures, 7 tables, 198 references, original in croatian)

Keywords: DNA methylation, histone modifications, BACH2, immunoglobulin G, glycosylation, inflammatory bowel disease

Supervisor: Vlatka Zoldoš, PhD, Professor

Reviewers: Petra Korać, PhD, Associate Professor

Slavko Gašparov, PhD, Associate Professor

Inga Marijanović, PhD, Assistant Professor

Sadržaj

1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 4
2.1. Epigenetički mehanizmi u sisavaca 4
2.1.1. Metilacija DNA 4
2.1.2. Histonske modifikacije 8
2.1.2.1. Acetilacija histona 9
2.1.2.2. Metilacija histona 10
2.1.2.3. Fosforilacija histona 11
2.1.2.4. Ostale modifikacije histona 12
2.2. Uloga transkripcijskog faktora BACH2 u B-limfocitima 12
2.3. *N*-glikozilacija imunoglobulina G 15
2.3.1. Genetička i epigenetička regulacija *N*-glikozilacije imunoglobulina G 17
2.3.2. Uloga *N*-glikozilacije imunoglobulina G u bolestima 18
2.4. Upalne bolesti crijeva 18
2.4.1. Genetska predispozicija, epigenetički i okolišni faktori u upalnim bolestima crijeva 19
2.4.2. N-glikozilacija IgG-a u upalnim bolestima crijeva 20
3. MATERIJALI I METODE 22
3.1. Ispitanici i uzorci 22
3.2. Stanične linije 25
3.3. Analiza CpG-metilacije ljudskog i mišjeg gena *BACH2* 25
3.3.1. Dizajn testova za analizu CpG-metilacije gena *BACH2 i Bach2* 25
3.3.2. Određivanje stupnja CpG-metilacije gena *BACH2* iz krvi pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva 28
3.3.3. Određivanje stupnja CpG-metilacije gena *BACH2* u B-limfocitima $CD19^+$ pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva 28
3.3.4. Analiza stupnja CpG-metilacije gena *BACH2* u staničnim linijama NALM-6, LCL i Arh-77 29
3.3.5. Analiza stupnja CpG-metilacije gena *Bach2* u različitim klonovima hibridoma 30
3.3.6. Ciljana promjena metilacije gena *BACH2* u stanicama HEK293 30
3.3.6.1. Odabir ciljanih sekvenci i kloniranje sekvenci sgRNA u vektore dCas9-DNMT3A 30
3.3.6.2. Transfekcija i selekcija stanica HEK293 32
3.3.6.3. Analiza metilacije DNA i ekspresije gena *BACH2* 32

3.4. Analiza povezanosti metilacije gena *BACH2* i glikozilacije IgG-a u IBD-u 33
3.5. Analiza ekspresije gena *BACH2* i *Bach2* 34
3.5.1. Analiza ekspresije gena *BACH2* u staničnim linijama NALM-6, LCL i Arh-77 ... 34
3.5.2. Analiza ekspresije gena *Bach2* u različitim klonovima hibridoma 34
3.6. Analiza histonskih modifikacija u promotoru gena *BACH2* 35
3.6.1. Kromatinska imunoprecipitacija 35
3.6.2. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnome vremenu nakon kromatinske imunoprecipitacije 38
3.7. Analiza mjesta vezanja proteina BACH2 u stanicama NALM-6 39
3.7.1. Analiza *in silico* potencijalnih mjesta vezanja proteina BACH2 39
3.7.2. Kromatinska imunoprecipitacija 39
3.7.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnome vremenu 40
3.7.4. Sekvenciranje nakon kromatinske imunoprecipitacije 41
3.8. Statistička analiza 41
4. REZULTATI 42
4.1. Promjene metilacije unutar gena *BACH2* u upalnim bolestima crijeva 42
4.2. Povezanost metilacije gena *BACH2* i glikozilacije IgG-a u upalnim bolestima crijeva 49
4.3. Metilacija i ekspresija gena *Bach2* povezane su s različitim glikanskim profilom IgG-a u mišjim stanicama hibridoma 50
4.4. Ekspresija gena *BACH2* regulirana je CpG-metilacijom i histonskim modifikacijama u staničnim modelima ljudskih B-limfocita 57
4.5. Vezanje transkripcijskog faktora BACH2 na glikogene u staničnoj liniji NALM6 61
5. RASPRAVA 64
6. ZAKLJUČCI 75
7. LITERATURA 76
8. ŽIVOTOPIS 90

1. UVOD

Metilacija DNA i histonske modifikacije važni su epigenetički mehanizmi uključeni u održavanje stabilnosti genoma i regulaciju transkripcijske aktivnosti. Metilacija DNA najbolje je istraženi mehanizam koji se u sisavcima najčešće događa na citozinu unutar CpG-dinukleotida. Enzimi koji stavljaju metilnu skupinu su DNA-metiltransferaze (DNMT, od engl. *DNA methyltransferase*). Enzim DNMT1 stavlja metilnu skupinu na novonastali lanac tijekom replikacije DNA, dok enzimi DNMT3A i DNMT3B stavljaju metilne skupine na CpG-dinukleotide *de novo*, rano u razvoju embrija (1). U stanici se također događa i demetilacija DNA, pasivno ili oksidacijom metiliranog citozina djelovanjem enzima iz porodice TET (od engl. *Ten-eleven Translocation*) (2). CpG-dinukleotidi nalaze se u čitavom genomu, a najviše su zastupljeni unutar CpG-otoka čija se lokacija najčešće preklapa s promotorima gena. Hipermetilacija CpG-otoka najčešće se povezuje s utišavanjem gena, dok se hipermetilaciju u tijelu gena povezuje s njegovom aktivacijom (3,4). Osim CpG-otoka, metilirani mogu biti i pojačivači gena što također može dovesti do utišavanja gena (5). Osim metilacije DNA, u regulaciju ekspresije gena uključene su i različite modifikacije na N-krajevima repova histona koji formiraju oktamernu jezgru nukleosoma. Specifične histonske modifikacije povezuju se s aktivnim odnosno utišanim kromatinom. Acetilacija histona je oznaka povezana s otvorenim stanjem kromatina, a metilacija histona je dvoznačna oznaka koja može označavati otvoreno i zatvoreno stanje kromatina (6). Epigenetičke oznake često su promijenjene u različitim bolestima, gdje dovode do aberantne aktivacije ili utišavanja gena (7).

Upalne bolesti crijeva su bolesti na koje, uz genetsku komponentu, vrlo snažno utječe i okoliš kroz epigenetičke mehanizme. Ove se bolesti mogu podijeliti u dva glavna oblika – Crohnovu bolest (CD, od engl. *Crohn's disease*) i ulcerozni kolitis (UC, od engl. *ulcerative colitis*). Karakterizira ih jak upalni odgovor na antigene crijevne mikroflore u osoba s genetskom predispozicijom (8). Premda se intenzivno istražuju, još uvijek nije u potpunosti razjašnjena genetska i epigenetska pozadina nastanka bolesti. Dosad je s ovim bolestima povezano 200 genskih lokusa, a jedan od njih je i genski lokus *BACH2* (9). Protein BACH2 (od engl. *BTB and CNC homology 2*) je transkripcijski faktor koji u B-limfocitima sudjeluje u procesima preslagivanja imunoglobulinskih lanaca i somatske hipermutacije, te u diferencijaciji B-limfocita u plazma-stanice (10). *BACH2* je dio mreže gena čija ekspresija definira identitet B-limfocita (11). Utišavanjem gena *BACH2* B-limfociti se diferenciraju u plazma-stanice koje

izlučuju molekule imunoglobulina G. Njegova uloga u nastanku i progresiji upalnih bolesti crijeva još uvijek nije u potpunosti poznata.

Nedavno objavljena cjelogenomska studija povezanosti (GWA-studija, od engl. *genome-wide association*) identificirala je da je gen *BACH2* povezan s *N*-glikozilacijom imunoglobulina G (12). Glikoprotein IgG važan je element humoralne imunosti i čini otprilike 75% svih antitijela u plazmi. Čine ga četiri polipeptidna lanca – dva teška i dva laka lanca koja čine protein specifičnog oblika slova Y. Promjene u njegovoj strukturi i specifičnosti mogu rezultirati promijenjenim imunosnim odgovorom. Na teškom lancu proteina (terminalnom dijelu molekule poznatom kao dio Fc) postoji motiv na kojem dolazi do vezanja glikanske strukture na asparaginski ostatak. Različite glikanske strukture na tom mjestu dovode do promjene afiniteta vezanja na receptore te mijenjaju njegovu strukturu i funkciju. Antitijelo IgG, ovisno o glikanskoj strukturi vezanoj na Fc dijelu molekule, može imati proupalno ili pak antiupalno djelovanje. Ukoliko se na N-acetilglukozamin vežu galaktoza i sijalinska kiselina antitijelo IgG će prijeći iz proupalne u antiupalnu molekulu (13–16). Glikozilacija IgG-a stoga ima važnu ulogu u normalnoj i patološkoj funkciji imunosnog sustava što je pokazano za mnoge upalne i autoimune bolesti, uključujući i IBD (17–23). Premda je glikozilacija IgG-a važna za njegovu funkciju, dosad je vrlo malen broj istraživanja posvećen načinu regulacije sinteze točno određene glikanske strukture koja će odrediti krajnju funkciju antitijela. Cilj ovog istraživanja bilo je istražiti funkcijsku ulogu transkripcijskog faktora BACH2 u glikozilaciji IgG-a.

Hipoteza ovog istraživanja je da je BACH2 uključen u uspostavu specifičnog uzorka glikozilacije imunoglobulina G u B-limfocitima.

Specifični ciljevi istraživanja bili su:
1. analizirati CpG-metilaciju i ekspresiju gena *BACH2* i korelirati te podatke s glikozilacijom IgG-a u različitim klonovima hibridomskih stanica
2. analizirati CpG-metilaciju gena *BACH2* u krvi pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva te korelirati te podatke s promjenama glikanskih struktura IgG-a istih pacijenata
3. identificirati gene, uključene u glikozilaciju IgG-a, čiju ekspresiju regulira BACH2
4. odrediti epigenetičke mehanizme kojima je regulirana ekspresija gena *BACH2*

Stupanj metilacije gena *BACH2* u krvi pacijenata koji boluju od upalnih bolesti crijeva i zdravih ispitanika, te u modelnim staničnim linijama, analizirala sam bisulfitnim

pirosekvenciranjem. Na isti način analizirala sam stupanj metilacije mišjeg gena *Bach2* u različitim klonovima hibridomskih stanica. Budući da se klasičnim sekvenciranjem ne može razlikovati metilirani citozin od nemetiliranog, uzorke DNA sam tretirala natrijevim bisulfitom nakon kojeg su svi metilirani citozini unutar CpG-dinukleotida ostali citozini, a nemetilirani citozini su deaminirani u uracile. Tretiranu DNA sam koristila kao kalup za umnažanje specifičnih regija u genima *BACH2* i *Bach2* upotrebom lančane reakcije polimerazom (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*). Ciljanu metilaciju gena *BACH2* u stanicama HEK293 napravila sam upotrebom fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A koji je navođen u promotorsku regiju gena *BACH2* specifičnim molekulama sgRNA. Razinu ekspresije gena *BACH2* i *Bach2* analizirala sam upotrebom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu (qPCR, od engl. *quantitative PCR*) upotrebom hidrolizirajućih proba specifičnih za navedene gene. Relativnu ekspresiju sam odredila u odnosu na endogene kontrole *HPRT1* odnosno *Hprt*. Upotrijebila sam podatke metilacije DNA iz krvi pacijenata koji boluju od IBD-a te podatke o glikozilaciji IgG-a istih pacijenata za određivanje korelacije. Histonske modifikacije unutar promotora gena *BACH2* analizirala sam metodom kromatinske imuoprecipitacije nakon koje slijedi kvantitativni PCR, dok sam sekvence DNA na koje se veže protein BACH2 identificirala upotrebom metode kromatinske imunoprecipitacije nakon koje slijedi sekvenciranje nove generacije. Podatke CpG-metilacije obradila sam Mann-Whitney U-testom i Bonferronijevom korekcijom, a analize povezanosti CpG-metilacije, ekspresije gena i glikana IgG-a napravila sam Pearsonovom korelacijom. Sve statističke analize napravila sam u programima Statistica i R.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Epigenetički mehanizmi u sisavaca

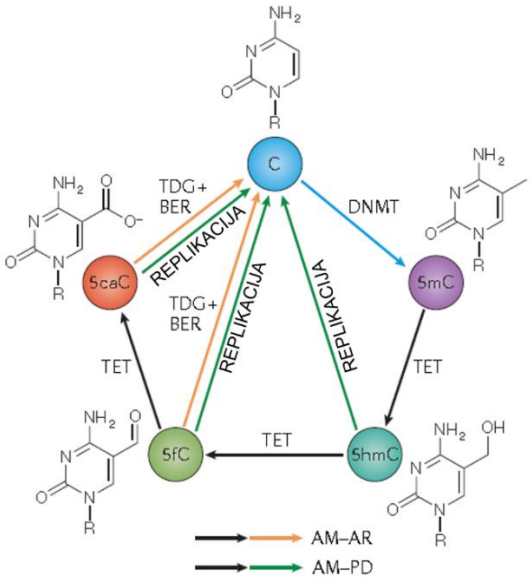
DNA je u stanicama sisavaca pakirana u kromatin, kompaktnu trodimenzionalnu strukturu koja čini funkcijske domene unutar jezgre. Stabilnost genoma i regulacija njegove aktivnosti pod kontrolom je različitih epigenetičkih mehanizama. Mehanizmi koji su najbolje istraženi su metilacija citozina u molekuli DNA, ponajviše unutar CpG-dinukleotida, te modifikacije histonskih proteina. Ostale epigenetičke mehanizme čine varijante histona, djelovanje nekodirajućih molekula RNA i konformacije kromatina koje utječu na fizički kontakt određenih kromatinskih područja u trodimenzionalnom prostoru (24).

2.1.1. Metilacija DNA

Metilacija DNA u genomu sisavaca najčešće se događa na citozinu unutar CpG-dinukleotida. Metilacija u ostalim kontekstima nedavno je otkrivena u sisavcima, ali se većinom pojavljuje u genomima biljaka i u nekih gljiva. Citozin je kemijski modificiran dodatkom metilne skupine (CH_3) na peti atom ugljika u pirimidinskom prstenu, pri čemu nastaje 5-metilcitozin (5mC). Metilacija citozina unutar CpG-dinukleotida glavna je modifikacija DNA u genomu sisavaca sa zastupljenošću od 60-80 % (25). Zbog tolike zastupljenosti, 5-metilcitozin se smatra petom bazom u molekuli DNA. U stanici se također pojavljuju i druge modifikacije citozina poput 5-hidroksimetilcitozina (5hmC), 5-formilcitozina (5fC) i 5-karboksilcitozina (5caC, Slika 1.). 5-hidroksimetilcitozin se smatra šestom bazom u genomu sisavaca jer ima ulogu u razvoju embrija, matičnim stanicama te stanicama živčanog sustava (26,27). 5-formilcitozin i 5-karboksilcitozin su najmanje zastupljene modifikacije u genomu sisavaca i smatra se da su to međuprodukti koji nastaju pri prijelazu iz 5-metilcitozina u nemodificirani citozin (27). Osim modifikacija citozina, nedavno je u mišjim embrionalnim matičnim stanicama otkrivena i modifikacija adenina (N6-metiladenin), koja je dosad bila zabilježena samo u prokariotskom genomu. Smatra se da u genomu mišjih embrijskih matičnih stanica sudjeluje u epigenetičkom utišavanju transpozona tipa LINE1 tijekom diferencijacije (28).

Enzimi koji uvode metilnu skupinu na peti atom ugljika u citozinu nazivaju se DNA-metiltransferaze. DNA-metiltransferaze *de novo* (DNMT3A i DNMT3B) su uglavnom odgovorne za uvođenje metilne skupine na citozin unutar CpG-mjesta koje prethodno nije bilo metilirano. Te DNA-metiltransferaze imaju važnu ulogu u uspostavljanju metilacijskog uzorka tijekom razvoja germinativnih stanica i tijekom rane embriogeneze, nakon faze globalne

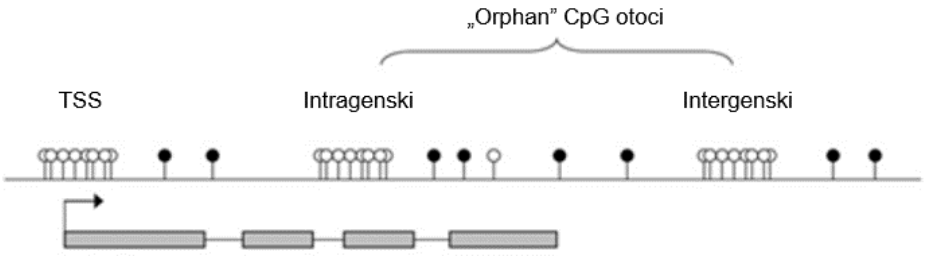
demetilacije genoma (29,30). Vrlo važan enzim je i DNMT1, DNA-metiltransferaza održavateljskog tipa koji je uglavnom aktivan tijekom replikacije DNA prilikom koje omogućava vjerno uspostavljanje metilacijskog uzorka na novonastalom lancu. Ovaj enzim kao kalup za metilaciju koristi hemimetiliranu molekulu pomoću funkcijskog partner proteina UHRF1 (31). Katalitički inaktivni enzim DNMT3L (od engl. *DNA methyltransferase 3 like)* pak formira kompleks s DNMT3A ili DNMT3B, te pozitivno utječe na njihovu aktivnost (32). U stanicama sisavaca postoji i enzim DNMT2, ali on ima mali ili gotovo nikakav efekt na metilaciju DNA (33,34). Enzimi koji sudjeluju u aktivnom gubitku metilne skupine, odnosno u demetilaciji 5-metilcitozina do nemodificiranog citozina oksidacijom, jesu enzimi iz porodice TET (2,27,35,36). Demetilacija se u stanici odvija i pasivno tijekom replikacije ako nije prisutan funkcionalan enzim DNMT1 (Slika 1.). Osim toga, vjernost aktivnosti enzima DNMT1 je oko 95% čime je omogućena demetilacija pojedinih CpG mjesta (37,38). Jedan od primjera pasivne demetilacije genoma je brisanje genomskog utiska u mišjim primordijalnim germinativnim stanicama (39).



Slika 1. Nemodificirani citozin (C) i citozin modificiran metilacijom (5mC), te citozini koji nastaju oksidacijom 5mC (5hmC, 5fC i 5caC). 5mC nastaje metilacijom pomoću enzima iz porodice DNMT, a 5hmC, 5fC i 5caC aktivnom demetilacijom pomoću enzima iz porodice TET. Nakon oksidacije dolazi do izrezivanja 5fC i 5caC putem popravka izrezivanjem baze (BER, od engl. *base excision repair*) posredovanog enzimom timin DNA glikozilaza (TDG). To je proces aktivne modifikacije i aktivnog micanja baze (AM-AR, od engl. *active modification-active removal*), a moguć je i gubitak 5hmC, 5fC i 5caC razrjeđivanjem ovisnim o replikaciji (proces aktivne modifikacije i pasivnog razrjeđenja, AM-PD, od engl. *active modification-passive dilution*). Slika preuzeta i prilagođena iz Wu i Zhang (2).

CpG-dinukleotidi nalaze se svugdje u genomu, ali najviše su zastupljeni u područjima koja se nazivaju CpG-otoci. CpG-otoci su specifična područja genoma, duljine otprilike od 300 do 3000 parova baza, u kojima su citozini najčešće nemetilirani (3). CpG-otoci, zbog obilježja sekvence DNA, najčešće imaju funkciju promotora jer u tim regijama dolazi do destabilizacije nukleosoma i stvaranja konformacije kromatina koja omogućava transkripciju. To dokazuje i pronalazak oko 50 % CpG-otoka u područjima inicijacije transkripcije, odnosno u promotorima anotiranih gena. Ostatak se nalazi unutar ili između gena u tzv. intra- i intergenskim CpG-otocima (od engl. *„orphan CpG island"*) (Slika 2.). Još uvijek se ne zna točna funkcija intra- i intergenskih CpG-otoka, ali postoje primjeri koji ukazuju na to da i s njih dolazi do inicijacije transkripcije (4,40,41). Neka istraživanja pokazala su da takvi CpG-otoci predstavljaju nove promotore (42).

Promotori unutar CpG-otoka mogu biti utišani metilacijom DNA ili dovođenjem kompleksa Polycomb koji omogućava trimetilaciju lizina na poziciji 27 u histonu H3 (H3K27me3) i ubikvitinaciju lizina na poziciji 119 u histonu H2A (H2Aub1) te dovode do kompakcije kromatina (4). CpG-otoci u promotorima anotiranih gena najčešće su nemetilirani (tek oko 3% CpG-otoka unutar genoma je metilirano), a intra- i intergenski CpG-otoci puno su češće metilirani (oko 17%) (4). Metilacija DNA je povezana s utišavanjem gena na dva načina: blokira vezanje transkripcijskih aktivatora i omogućava vezanje specifičnih proteina MBP (od engl. *methyl-CpG-binding domain proteins*) koji dovode ko-represore koji pak remodeliraju kromatin i sprječavaju transkripciju (43–45).

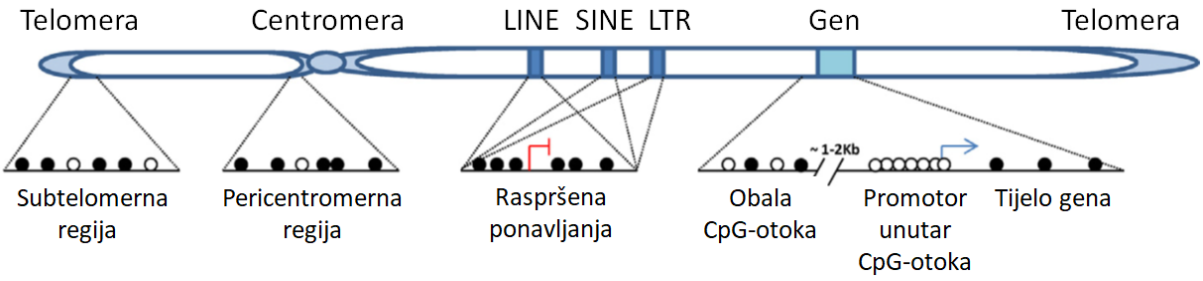


Slika 2. Mjesta CpG-otoka u genomu – u promotorima gena u području početka transkripcije (TSS, od engl. *transcription start site*), unutar tijela gena (intragenski) ili između gena (intergenski). Intra- i intergenski CpG-otoci nazivaju se „*orphan*" jer nisu povezani s poznatim promotorima i nije im u potpunosti razjašnjena funkcija. Prazni krugovi predstavljaju nemetilirane CpG-dinukleotide, a crni krugovi one metilirane. Preuzeto i prilagođeno iz Deaton i Bird (4).

Osim metilacije unutar CpG-otoka, važnu ulogu u regulaciji genske ekspresije ima i metilacija CpG-dinukleotida unutar pojačivača gena. Pojačivači gena su regulatorne regije DNA koje se nalaze distalno od mjesta početka transkripcije na koje se vežu transkripcijski faktori i sudjeluju u regulaciji ekspresije gena. Metilacija unutar pojačivača utječe na vezanje transkripcijskih aktivatora i negativno korelira s ekspresijom gena. Vrlo često je promijenjena u različitim tumorima u kojima utječe na progresiju i plastičnost tumorskih stanica (5,46–48).

Metilacija DNA ima važnu ulogu u razvoju sisavaca, ponajviše u uspostavljanju genomskog utiska, određivanju stanične sudbine, organizaciji arhitekture jezgre, inaktivaciji X-kromosoma, regulaciji genske ekspresije i utišavanju ponavljajuće DNA i mobilnih elemenata. Bitna je za normalno funkcioniranje stanice, a promjene mogu dovesti do razvoja bolesti.

Većina CpG-dinukleotida u genomu sisavaca je metilirana, a manji dio, oni koji čine CpG-otoke, je nemetiliran. Metilacija CpG-dinukleotida unutar repetitivnih sekvenci (centromerna i pericentromerna DNA, transpozoni, retrovirusi i telomere) bitna je zbog održavanja stabilnosti genoma (Slika 3.). Metilacijom se takve sekvence inaktiviraju i smanjuje se mogućnost rekombinacije i insercijske mutageneze (49–52).



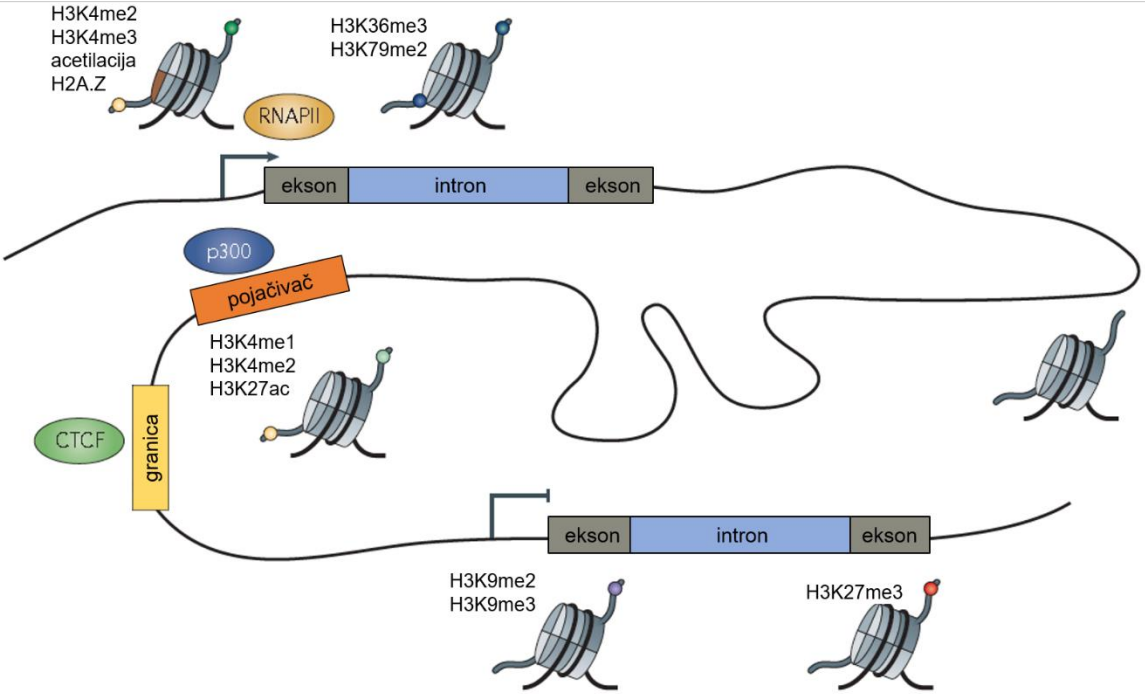
Slika 3. Shematski prikaz metilacije DNA duž kromosoma. CpG-dinukleotidi u repetitivnim područjima (centromere, pericentromerne regije, telomere, subtelomerne regije i transpozoni – LINE, SINE, LTR) su metilirani, dok su oni unutar CpG-otoka nemetilirani. CpG-dinukleotidi u tijelu gena su metilirani. Bijeli krugovi označavaju nemetilirane CpG-nukleotide, a crni krugovi metilirane. LINE (od engl. *Long interspersed nuclear element*); SINE (od engl. *Short interspersed nuclear element*); LTR (od engl. *Long terminal repeat*). Preuzeto i prilagođeno iz Zampieri i sur. (53).

Jedna od posljedica nepravilnosti prilikom održavanja metilacijskog uzorka unutar genoma je i nastanak različitih vrsta tumora. U tumorskim stanicama često dolazi do metilacije CpG-

otoka tumor-supresorskih gena što za posljedicu ima utišavanje transkripcije gena i nekontroliranu staničnu proliferaciju (54,55). Također dolazi do smanjenja globalne metilacije i posljedično do nestabilnosti genoma zbog reaktivacije utišanih ponavljajućih mobilnih elemenata te njihovog premještanja, rekombinacije ponavljajućih slijedova te sklonosti kromosomskim rearanžmanima (56). Osim u tumorima, do promjena u metilaciji DNA dolazi i u drugim bolestima. Općenito je poznato da se metilacije gubi tijekom starenja (57). Metilacija DNA reverzibilna je modifikacija na koju mogu utjecati i okolišnu uvjeti poput pušenja cigareta, prehrane i načina života (7,58).

2.1.2. Histonske modifikacije

Histoni su evolucijski vrlo očuvani proteini koji, zajedno s molekulom DNA, čine nukleosomnu strukturu kromatina. Četiri različita histona formiraju oktamernu jezgru oko koje se omata DNA duljine oko 147 parova baza u dva navoja. Najčešće se radi o dvije molekule histona H2A, H2B, H3 i H4, ali unutar pojedinih nukleosoma mogu biti prisutne i druge varijante ovih kanonskih histona kao što su H3.3, cenH3, H2A.Z, H2A.X, H2A.B i macroH2A. Varijante kanonskih histona prisutne su u specijalnim kromosomskim regijama, te sudjeluju u transkripcijskoj regulaciji, segregaciji kromosoma, popravku DNA i drugim procesima (59). Nukleosomi stvaraju nukleosomna vlakna koja formiraju strukture višeg reda. Histonske modifikacije i pozicioniranje nukleosoma u odnosu na regulatorne regije gena utječu na ekspresiju gena (Slika 4.). Histoni imaju bazične N-terminalne repove koji strše iz oktamerne jezgre. Oni mogu stupiti u kontakt s drugim nukleosomima i podložni su kemijskim modifikacijama. Ovisno o vrsti kemijske modifikacije, struktura nukleosoma može se olabaviti ili može doći do pojačane kondenzacije, često uz regrutaciju drugih proteina koji imaju enzimsku aktivnost i koji sudjeluju u remodeliranju kromatina (6,60).



Slika 4. Histonske modifikacije u regulatornim regijama gena u genomu sisavaca. Promotori aktivnih gena najčešće su obilježeni di- i trimetilacijom četvrtog lizina u histonu H3 (H3K4me2 i H3K4me3), acetilacijom histona i histonskom varijantom H2A.Z. U tijelu aktivnih gena nalaze se trimetilirani lizini na poziciji 36 u histonu H3 (H3K36me3) i dimetilirani lizini na poziciji 79 u histonu H3 (H3K79me2). U pojačivačima aktivnih gena nalazi se acetilna skupina na poziciji Lys27 histona H3 (H3K27ac), te mono- i dimetilacija četvrtog lizina u histonu H3 (H3K4me1, H3K4me2). Inaktivni geni obilježeni su di- i trimetilacijom devetog (H3K9me2, H3K9me3) i trimetilacijom lizina na poziciji 27 u histonu H3 (H3K27me3). RNAPII (RNA-polimeraza II); p300 (histonska acetiltransferaza p300); CTCF (transkripcijski faktor CTCF, od engl. *CCCTC-binding factor*). Preuzeto i prilagođeno iz Zhou i sur (60)**.**

2.1.2.1. Acetilacija histona

Acetilacija histona vrlo je dinamična modifikacija koja se događa na aminokiselinskim ostacima lizina u histonima H3 i H4. Enzimi koji stavljaju acetilnu skupinu na lizin nazivaju se histonske acetiltransferaze (HAT, od engl. *histone acetyltransferase*), a enzimi koji deacetiliraju histone su histonske deacetilaze (HDAC, od engl. *histone deacetylase*). Enzimi HAT sadrže kofaktor acetil-koenzim A (acetil-coA) i s njega prenose acetilnu skupinu na ε-amino grupu lizina. U stanicama sisavaca postoje dva tipa enzima HAT: tip A i tip B. Enzimi tipa A mogu se podijeliti u tri velike porodice s obzirom na aminokiselinski sastav i sličnost u konformaciji: CBP/p300, GNAT i MYST. Svaki od ovih enzima acetilira više lizina unutar

histona i to na N-terminalnim repovima i unutar histona (61–63). Dodatkom acetilne skupine dolazi do neutralizacije pozitivnog naboja lizina i slabljenja veza između histona i DNA. Za razliku od histonskih acetiltransferaza tipa A koje djeluju u jezgri, one tipa B uglavnom acetiliraju histone koji se još uvijek nalaze u citoplazmi. Acetilacija histona u citoplazmi bitna je za njihovo sastavljanje u nukleosom, a nakon što se formira histonska jezgra, acetilne skupine se uklanjaju pomoću enzima HDAC (64). Na taj način lizini opet postaju pozitivno nabijeni i nukleosom postaje stabilniji, pa se ovi enzimi smatraju jednim od transkripcijskih represora. Enzimi HDAC se najčešće nalaze u različitim kompleksima i mogu deacetilirati različita mjesta unutar histona (6). Acetilacija histona H3 i H4 karakteristična je za promotore i pojačivače aktivnih gena. U promotorima se najčešće javlja acetilacija histona H3 na lizinima 9 i 27, a u pojačivačima i acetilacija u globularnom dijelu histona H3 (lizini 64 i 122) i u repu histona H4 na lizinu 16 (65). Aktivnost proteina HAT i HDAC vrlo su bitne u regulaciji aktivnosti gena, a promjene u procesima acetilacije i deacetilacije pronađene su u različitim bolestima uključujući i tumore (6,61).

2.1.2.2. Metilacija histona

Metilacija histona, za razliku od acetilacije koja je jednoznačna oznaka, može biti povezana s aktivacijom i represijom gena. Događa se na aminokiselinskim ostacima lizina u obliku mono-, di- i trimetilacije, te arginina u obliku mono- i dimetilacije. Ova modifikacija ne mijenja naboj histona, nego djeluje na gensku aktivaciju/represiju i promjene u stabilnosti nukleosoma kroz regrutaciju različitih proteina koji mijenjaju konformaciju kromatina. Enzimi koji dodaju metilne skupine na lizine nazivaju se histonske lizin-metiltransferaze (HKMT, od engl. *histone lysine (K) methyltransferase*), a njima je glavni donor metilne skupine S-adenozilmetionin (SAM, od engl. *S-adenosylmethionine*) kojeg sisavci dobivaju kroz bazalni metabolizam i hranu. Enzimi HKMT su vrlo specifični, pa tako različiti enzimi stavljaju jednu, dvije ili tri metilne skupine na aminokiseline lizin i arginin. Primjer je enzim DIM5 koji trimetilira na taj način što prepoznaje sve metilirane forme lizina zbog prisutnosti fenilalanina unutar veznog mjesta za lizin. S druge strane, enzim SET7/9 koji monometilira lizine prepoznaje one lizine koji imaju unutar veznog mjesta aminokiselinu tirozin (6,66,67). Enzimi koji metiliraju aminokiselinski ostatak arginina u histonima nazivaju se arginin-metiltransferaze i dijele na tip I i tip II. Oba tipa ovih histonskih metiltransferaza rade monometilaciju, dok tip I radi asimetričnu, a tip II simetričnu dimetilaciju arginina. Donor metilne skupine u reakcijama metilacije arginina je također SAM. Metilne skupine s lizina i arginina mogu se aktivno ukloniti

djelovanjem lizinskih i argininskih demetilaza. Demetilaze, kao i metiltransferaze, pokazuju visoku specifičnost za supstrat.

Metilacija histona uključena je u regulaciju ekspresije gena te ima različita značenja ovisno o broju metilnih skupina koje se dodaju na Arg i Lys te u ovisnosti na poziciju aminokiselina u repu pojedinog histona. Oznaka H3K4me3 javlja se u blizini mjesta početka transkripcije gena koji se aktivno prepisuju, unutar promotora koji se podudaraju s pozicijom CpG-otoka. Histonska metiltransferaza SET1, enzim koji stavlja tu modifikaciju, prepoznaje nemetilirane CpG-dinukleotide pomoću domene CXXC. U regijama u kojima se javlja oznaka H3K4me3 nalaze se i druge modifikacije, koje omogućavaju više otvorenu konformaciju kromatina, a to su acetilacija histona i prisutnost histonske varijante H3.3. Promotori koji se ne podudaraju s područjem CpG-otoka najčešće nemaju te modifikacije, nego su regulirani na neke druge načine. Za promotore utišanih gena karakteristične su trimetilacije devetog i 27. lizina u histonu H3. Oznaka H3K27me3 katalizirana je pomoću proteina EZH2 koji je dio proteinskog kompleksa PRC2 (od engl. *Polycomb repressive complex 2*). Ova oznaka je signal za regrutaciju proteinskog kompleksa PRC1 (od engl. *Polycomb repressive complex 1*) koji ubikvitinira lizin na poziciji 119 u histonu H2A te dovodi do stvaranja kompaktnije konformacije kromatina i sprječavanja transkripcijske elongacije (68–70). Ti kompleksi su represori genske ekspresije i vrlo su bitni u održavanju tkivno-specifičnog uzorka aktivnosti gena (60,71). Modifikacija H3K36me3 je vrlo bitna oznaka koja se javlja u tijelu gena koji se prepisuju. Smatra se da utječe na pozicioniranje nukleosoma i prekrajanje RNA (72–74). U područjima pojačivača javlja se oznaka H3K4me1 te se upravo na temelju te modifikacije mogu s velikom sigurnošću predvidjeti područja pojačivača u genomu. Osim te modifikacije, u pojačivačima se javlja i metilacija drugih aminokiselina te acetilacija na poziciji 27 lizina u histonu H3 (75,76). Promjene u metilaciji histona ili enzimima koji stavljaju ili uklanjaju metilacijske oznake povezane su s nastanakom i progresijom tumora kroz promjenu ekspresije tumor-supresorskih gena i onkogena ili pak kroz promjenu genomske stabilnosti (6).

2.1.2.3. Fosforilacija histona

Fosforilacija histona je posttranslacijska modifikacija koja može imati različite efekte u stanici, ovisno o kontekstu u kojem se nalazi. Može se pojaviti na N-terminalnim repovima svih histona, ali mogu se fosforilirati i aminokiselinski ostaci u globularnom dijelu. Modificiraju se aminokiselinski ostaci serina, treonina i tirozina. Enzimi koji stavljaju fosfatnu skupinu,

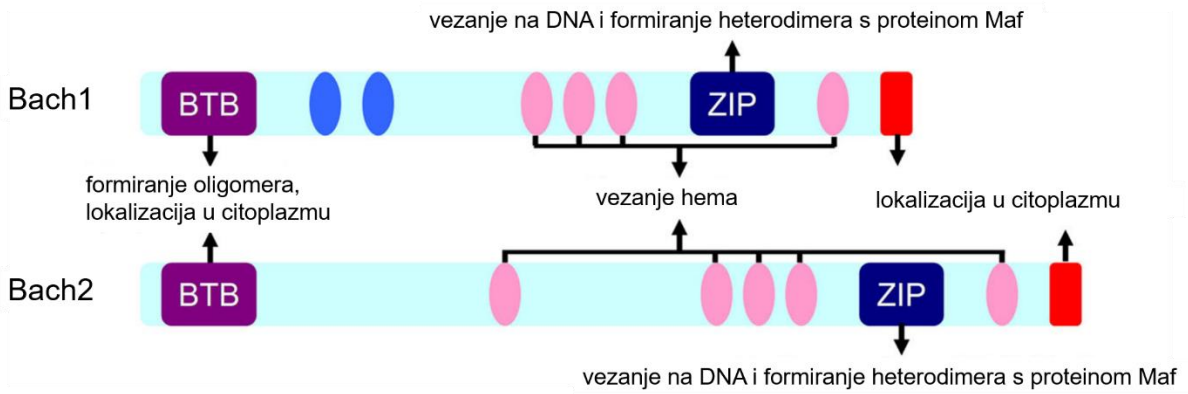
koristeći ATP kao supstrat, su kinaze, a oni koji je uklanjaju su fosfataze. Dodatkom fosfatne skupine na histon stvara se negativni naboj koji utječe na strukturu kromatina (6). Fosforilacija na poziciji 139 serina u histonu H2A.X u genomu sisavaca služi kao signal za regrutaciju proteina koji remodeliraju kromatin i mašinerije za popravak oštećenja molekule DNA. Stoga je ova oznaka vrlo važna za stabilnost genoma (77–79). Osim uloge u popravku DNA, fosforilacija histona ima ulogu i u regulaciji ekspresije gena te u procesima kompakcije kromatina. Na primjer, fosforilacija serina na poziciji 10 u histonu H3 (H3S10) često je povezana s acetilacijom istog histona na pozicijama 9 i 14 u lizinu, te obje modifikacije dovode do aktivacije gena. Fosforilacija na ostalim aminokiselinama može utjecati na aktivaciju gena kroz indukciju demetilacije i acetilacije (79).

2.1.2.4. Ostale modifikacije histona

Osim prethodno navedenih modifikacija, postoje i one koje su manje zastupljene na repovima histona, te je i slabije istražena njihova uloga u genomu. Jedna od njih je deiminacija nemodificiranog i monometiliranog arginina u citrulin kojom se smanjuje pozitivni naboj N-terminalih krajeva histona. Također, nedavno je otkriveno da je dodatak β-N-acetilglukozamina na serin i treonin u histonima H2A, H2B i H4 jedna od modifikacija koja regulira kompakciju kromatina i ekspresiju gena interferirajući s ostalim modifikacijama (80,81). Histoni također mogu biti mono- ili poli-ADP-ribozilirani. Vezanje relativno velikih proteina poput ubikvitina i proteina Sumo na histone također ima važnu ulogu u regulaciji genoma i kondenzaciji kromatina (6).

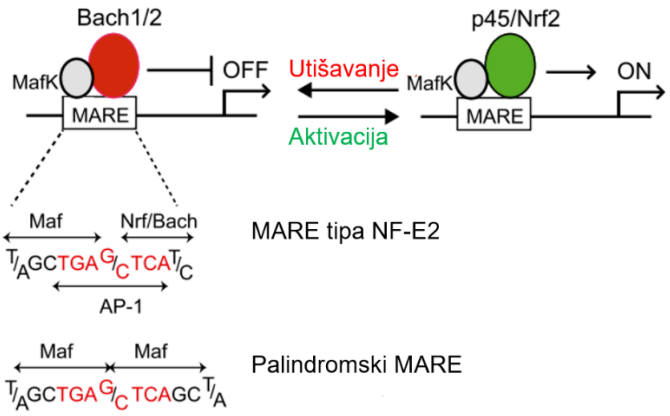
2.2. Uloga transkripcijskog faktora BACH2 u B-limfocitima

Protein BACH2 je transkripcijski represor koji pripada superporodici proteina s domenom vezanja na DNA i dimerizaciju u obliku leucinskog zatvarača (bZIP, od engl. *basic leucine zipper*). Zajedno s proteinom BACH1 čini jednu porodicu. Osim domene leucinskog zatvarača, ima i domenu BTB (od engl. *bric-a-brac, tramtrack, broad complex*), koja služi za interakciju s drugim proteinima i lokalizaciju u citoplazmu (Slika 5.).



Slika 5. Shematski prikaz strukture proteina Bach1 i Bach2. Oba proteina sadrže domene BTB (od engl. *bric-a-brac, tramtrack, broad complex*) i ZIP (od engl. *zipper*). Domena BTB služi za formiranje oligomera i lokalizaciju u citoplazmu, a domena ZIP za vezanje s proteinima Maf i vezanje za DNA. Preuzeto i prilagođeno iz Zhou i sur. (82).

Bach2 stvara heterodimere s proteinima MafK putem domene bZIP i u takvim kompleksima dovodi do utišavanja genske ekspresije vezanjem na elemente DNA koji se nazivaju MARE (od engl. *Maf recognition element*, Slika 6.) (83). Protein Bach2 specifično je eksprimiran u hematopoetskim stanicama tipa B- i T-limfocita i makrofazima, te neuronima. Ekspresija gena i proteina Bach2 visoka je u progenitorskim stanicama B-limfocita i svim daljnjim fazama diferencijacije B-limfocita, dok se u plazma-stanicama drastično smanjuje do stanja potpune utišanosti (84–91). U B-limfocitima, gen *Bach2* je transkripcijski faktor koji regulira mrežu gena uključenih u razvoj i diferencijaciju (11). Sudjeluje u procesima preslagivanja imunoglobulinskih razreda (CSR, od engl. *class switch recombination*) i somatske hipermutacije (SHM, od engl. *somatic hypermutation*). Smatra se da je indirektno uključen u te procese tako što, zajedno s proteinom Bcl6, utišava ekspresiju gena *Prdm1*. *Prdm1* kodira za protein Blimp koji je vrlo bitan za terminalnu diferencijaciju B-limfocita u plazma-stanice (92–94). Protein Bach2 također je bitan u diferencijaciji memorijskih B-limfocita u plazma-stanice, u trenutku kad je potreban brz odgovor na stimulaciju antigenom. U memorijskim B-limfocitima ekspresija gena *Bach2* je manja nego u zrelim B-limfocitima, a kada se u takvim stanicama napravi potpuno utišavanje gena *Bach2*, one diferenciraju u plazma-stanice, baš kao kada se taj gen utiša u zrelim B-limfocitima (11,86,93,95).



Slika 6. Transkripcijski faktor Bach2 utišava ekspresiju ciljanih gena tako što formira heterodimer s proteinom MafK i veže se na elemente MARE (od engl. *Maf recognition element*) unutar regulatornih regija ciljanih gena. Unutar elementa MARE nalazi se mjesto vezanja za protein AP-1 (od engl. activator protein 1). Preuzeto i prilagođeno iz Igarashi i sur. (11).

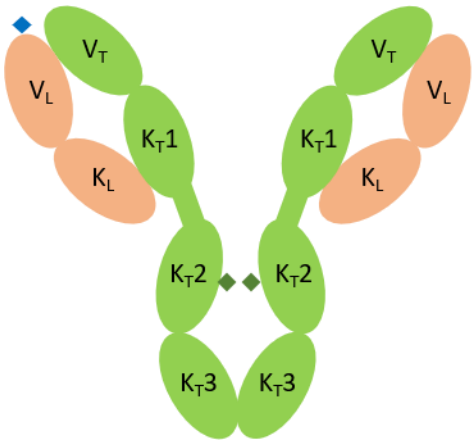
Protein Bach2 bitan je za održavanje homeostaze hematopoetskog sustava. Pokazano je da promjene u njegovoj regulaciji mogu dovesti do različitih bolesti. U mišjem modelima, u svrhu istraživanja nastanka tumora, pokazano je da insercijska mutageneza i promijenjena ekspresija gena *Bach2* mogu utjecati na malignu transformaciju stanica hematopoetskog sustava, te da on djeluje kao tumor-supresorski gen, jer sudjeluje u aktivaciji odgovora na oštećenje DNA ovisnog o proteinu p53 (96,97). Točkaste mutacije u genu *BACH2* kao i recipročna translokacija *IGHCδ- BACH2* pronađene su i u pacijentima oboljelim od različitih vrsta limfoma i leukemija. Također, u staničnoj liniji Burkittovog limfoma pronađene su i insercije Epstein-Barrovog virusa unutar tog gena što je dovelo do njegovog utišavanja (11,97–101). GWA-studije su povezale gen *BACH2* i s nekim drugim bolestima većinom autoimunog i upalnog karaktera poput Crohnove bolesti, šećerne bolesti tipa 1, celijakije, vitiliga, astme i reumatoidnog artritisa (102–109). Osim promjena u sekvenci DNA i povezanosti polimorfizama jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) u genu *BACH2* s različitim bolestima, otkrivene su i promjene u CpG-metilaciji promotora ovog gena u šećernoj bolesti tipa 1 i u karcinomu želuca (110,111).

Trenutno se vrlo malo zna o epigenetičkim mehanizmima koji su uključeni u regulaciju transkripcijske aktivnosti gena *BACH2*. U karcinomu želuca pokazano je da u tkivu gdje je došlo do hipermetilacije promotora gena *BACH2* dolazi i do smanjenja transkripcijske aktivnosti (111). Međutim, ovo je indirektni dokaz koji se temelji na korelaciji CpG-metilacije i ekspresije gena *BACH2*. U grupi u kojoj radim, nedavno je pokazano upotrebom molekularnog

alata CRISPR/Cas9-DNMT3A za ciljanu metilaciju da je CpG-metilacija unutar CpG-otoka gena *BACH2* uključena u regulaciju njegove ekspresije. U staničnom modelu HEK293, u kojem je metilacija ciljanih CpG-mjesta bila niska, ciljano je povećan stupanj metilacije do 60% te je pokazano posljedično povećanje količine transkripata ovoga gena u istim stanicama (112). Čini se da je osim CpG-metilacijom gen *Bach2* reguliran i histonskim modifikacijama što je pokazano u $CD4^+$ T-limfocitima miša. Protein Menin utječe na njegovu ekspresiju tako što se veže za promotor i održava histonsku acetilaciju (113). Uz metilaciju DNA i histonsku acetilaciju, pokazano je da ekspresija gena *Bach2* može biti utišana na razini mRNA djelovanjem malih nekodirajućih molekula, mikroRNA miR-148a (114).

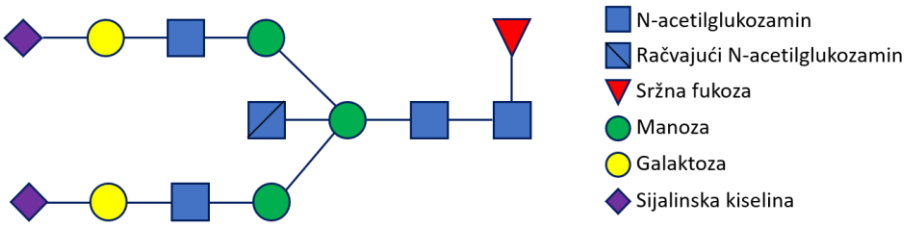
2.3. *N*-glikozilacija imunoglobulina G

N-glikozilacija je postranslacijska modifikacija koja utječe na strukturu i funkciju proteina. Mnogi eukariotski proteini, uključujući proteine koji se izlučuju iz stanice i one koji se nalaze na njezinoj površini, mogu biti modificirani dodatkom glikana ukoliko sadrže specifičan slijed aminokiselina: asparagin-X-serin/treonin. Aminokiselina X može biti bilo koja aminokiselina, osim prolina. Glikozilacija je vrlo složen proces u kojem sudjeluju različiti enzimi i drugi proteini: glikoziltransferaze, glikozidaze, enzimi za biosintezu šećera, transkripcijski faktori, ionski kanali, transportni proteini, itd. Zbog složene mreže gena uključene u biosintetski put glikana sama glikanska struktura se ne može odrediti na temelju jednog proteina odnosno gena koji ga kodira, već ona ovisi o ekspresiji nekoliko desetaka gena i proteina (115). Jedan od glikoproteina kojem funkcija ovisi o *N*-glikozilaciji je imunoglobulin G. IgG, kojeg proizvode B-limfociti i plazma stanice, je najzastupljenija klasa imunoglobulina u ljudskom serumu (oko 75 %) i ima vrlo važnu ulogu u imunosnom odgovoru. Bitan je za prepoznavanje i eliminaciju patogena i toksičnih antigena. Molekula IgG-a sastoji se od dva teška i dva laka polipeptidna lanca. Svaki od tih lanaca ima konstantnu i varijabilnu regiju. Varijabilna regija važna je za prepoznavanje antigena, a konstantna regija teških lanaca služi kao efektorski dio molekule (116). Unutar te regije nalazi se konzervirano glikozilacijsko mjesto, na asparaginu 297 (Slika 7.).



Slika 7. Struktura molekule imunoglobulina G. Sastoji se od dva teška lanca koja imaju tri konstantne (K_T1-3) i jednu varijabilnu domenu (V_T), te od dva laka lanca s jednom konstantnom (K_L) i jednom varijabilnom domenom (V_L). Unutar domene K_T2 nalazi se konzervirano *N*-glikozilacijsko mjesto (zeleni romb), a unutar domene V_L moguće je *N*-glikozilacijsko mjesto koje nastaje tijekom somatske hipermutacije (plavi romb).

Glikanske strukture koje se vežu na to mjesto su biantenarne kompleksne strukture koje mogu imati račvajući N-acetilglukozamin, sržnu fukozu, galaktozu i sijalinsku kiselinu (Slika 8.) (12,117). Glikozilacijsko mjesto može se nalaziti i unutar varijabilne regije lakog lanca, ukoliko se razvije tijekom somatske hipermutacije (Slika 7.). Glikozilacija u varijabilnoj regiji manje je zastupljena od glikozilacije na konzerviranom Asn297 mjestu unutar teškog lanca, u serumu se pojavljuje u 15-20 % molekula i tipična je za neka fiziološka i patološka stanja, poput trudnoće i reumatoidnog artritisa (118). Glikozilacija na teškim lancima IgG-a važna je za vezanje molekule na receptore Fcγ jer utječe na njenu konformaciju. Također je pokazano da, ovisno o glikozilaciji na teškom lancu IgG-a, molekula može biti pro- ili antiupalna. Ukoliko se na molekuli IgG-a nalaze glikani bez galaktoze i sijalinske kiseline tada molekula djeluje proupalno, a ako ima galaktozu i sijalinsku kiselinu onda je antiupalna (13,14,16,119). Alternativna glikozilacija IgG-a također ima efekt u procesu stanične citotoksičnosti ovisne o antitijelu (ADCC, od engl. *antibody-dependant cellular cytotoxicity*). Ovisno o prisutnosti glikanske strukture sa sržnom fukozom na Fc regiji IgG-a smanjuje se afinitet vezanja te molekule na receptor Fcγ IIIA i aktivnost ADCC-a (120).



Slika 8. Struktura *N*-glikana koji može biti vezan na konzerviranom glikozilacijskom mjestu (Asn297) unutar teškog lanca IgG-a. Osim ove glikanske strukture, na mjesto Asn297 mogu biti vezani i drugačiji *N*-glikani – oni bez račvajućeg N-acetilglukozamina, sržne fukoze, N-acetilglukozamina, galaktoze i sijalinske kiseline.

2.3.1. Genetička i epigenetička regulacija *N*-glikozilacije imunoglobulina G

U *N*-glikozilaciju proteina uključeni su različiti proteini te krajnje glikanske strukture nastaju kao posljedica njihove kombinirane aktivnosti. Osim klasičnih proteina koji dodaju ili uklanjaju šećere – glikoziltransferaza i glikozidaza - u procesu *N*-glikozilacije sudjeluju i enzimi za biosintezu šećera, transkripcijski faktori, ionski kanali, transportni proteini, itd. Nedavno su u tri istraživanja na velikim kohortama ljudi (više od 4000) napravljene cijelogenomske studije povezanosti kojima su polimorfizmi u jednom nukleotidu unutar različitih genskih lokusa povezani s glikanskim strukturama na IgG-u. Tim istraživanjima pokazano je da su za *N*-glikozilaciju IgG-a važni geni koji kodiraju za glikoziltransferaze – *ST6GAL1*, *B4GALT1*, *FUT8*, *MGAT3 i FUT6-FUT3* te geni koji kodiraju za transkripcijske faktore (*IKZF1*, *RUNX3*), proteine koji sudjeluju u remodeliranju kromatina (*SMARCD3*, *SMARCB1*, *SUV420H1*), proteine uključene u degradaciju krivo smotanih glikoproteina (*DERL3*), transportere (*ABCF2*), proteine za prijenos signala (*IL6ST*), proteine koji sudjeluju u imunosnom odgovoru (*IGH*, *HLA-B*, *HLA-C*) i proteine važne za stanični ciklus (*AZI1*, *ELL2*). Osim navedenih gena koji su značajni na razini cijelog genoma, otkriveni su i lokusi za koje postoji indikacija da su uključeni u *N*-glikozilaciju IgG-a. To su geni *PRRT1*, *HLA-DQA2*, *HLA-DQB2*, *BACH2*, *LAMB1*, *RECK*, *PEX5* i *SLC38A10* (12,121,122). Osim genetičke komponente uključene u *N*-glikozilaciju IgG-a čini se da u ovom procesu sudjeluju i epigenetički mehanizmi (123,124). Epigenomskom studijom povezanosti (EWAS, engl. *Epigenome Wide Association Study*) pronađeni su genski lokusi u kojima je CpG-metilacija povezana s različitim glikanskim strukturama (125). Nedostatak navedene epigenomske studije povezanosti je što je njome obuhvaćena analiza tek 27000 CpG-dinukleotida, a u ljudskom genomu je prisutno oko 28 milijuna CpG-dinukleotida, stoga su vrlo vjerojatno mnogi geni povezani s *N*-glikozilacijom IgG-a ostali neidentificirani (126). Osim toga, moguće je da i ostali epigenetički mehanizmi poput histonskih modifikacija,

histonskih varijanti i djelovanja nekodirajućih molekula RNA sudjeluju u regulaciji gena uključenih u biosintetske puteve različitih glikanskih struktura na molekuli IgG-a. Genetička i epigenetička regulacija *N*-glikozilacije IgG-a još uvijek je nedovoljno istražena, ali evidentno je da je za proizvodnju specifičnih glikanskih struktura potrebna dobro regulirana ekspresija i interakcija puno različitih proteina.

2.3.2. Uloga *N*-glikozilacije imunoglobulina G u bolestima

Molekule IgG-a važne su u humoralnoj imunosti i sudjeluju u njenom normalnom funkcioniranju i obrani organizma od različitih patogena. Alternativna *N*-glikozilacija molekule IgG-a može promijeniti antiupalni karakter ovog antitijela u proupalni te može imati jači ili slabiji efekt u ADCC-u. Neki od lokusa koji su GWA-studijama povezani s *N*-glikozilacijom IgG-a pokazuju pleiotropnost s nekim upalnim bolestima. Primjerice, geni *MGAT3*, *BACH2* i *IKZF1* povezani su s Crohnovom bolesti, a gen *IL6ST* s reumatoidnim artritisom (102,127–129). Iako je pokazano je da je uzorak *N*-glikozilacije IgG-a unutar jedinke stabilan ukoliko je organizam u homeostazi, on se mijenja u mnogim bolestima (130,131). Neke od bolesti u kojima se mijenja *N*-glikozilacija IgG-a su sistemski eritemski lupus, upalne bolesti crijeva i reumatoidni artritis. U tim bolestima dolazi do smanjenja molekula koje imaju glikanske strukture s galaktozom (17,18,22,23,132). Također je pokazano da u reumatoidnom artritisu smanjenje galaktozilacije prethodi nastanku bolesti (21,133,134). Osim u kroničnim bolestima koje su karakterizirane jakim upalnim procesima, promjene u *N*-glikozilaciji IgG-a pronađene su i u tumorima (20,135). Stoga sva ova istraživanja ukazuju na iznimnu važnost i uključenost *N*-glikozilacije IgG-a u nastanak i progresiju različitih bolesti (136).

2.4. Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva su kronične bolesti gastrointestinalnog sustava koje se dijele u dva glavna oblika, Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis. Osim navedenih oblika, postoje i stanja koja se ne mogu jasno, na temelju kliničkih i dijagnostičkih kriterija, svrstati u CD ili UC i javljaju se u oko 10 do 15 % bolesnika. Dosadašnja istraživanja ukazuju na to da je bolest posljedica poremećenog imunosnog odgovora na crijevnu mikrofloru u osoba s genetskom predispozicijom (8). Međutim, ovo je vjerojatno samo jedan od uzroka, te su molekularni mehanizmi koji dovode do bolesti još uvijek nedovoljno istraženi. U Europi je 2013. godine bilo otprilike tri milijuna oboljelih osoba, a incidencija se svake godine povećava (137).

Crohnova bolest i ulcerozni kolitis se mogu jasno razlikovati na temelju kliničkih i dijagnostičkih kriterija. Također, zahvaćaju različite dijelove gastrointestinalnog trakta te se razlikuju i same upalne promjene u crijevu. Ulcerozni kolitis je bolest koja zahvaća sluznicu debelog crijeva od početka rektuma, a Crohnova bolest može zahvaćati bilo koji dio probavne cijevi, s tim da najčešće zahvaća ileum i kolon. Druga razlika je što se u bolesnika s UC-om upalne promjene manifestiraju samo u sluznici probavne cijevi, a u bolesnika s CD-om upalne promjene mogu se manifestirati u cijeloj stijenci crijeva. Osim upalnih promjena koje se događaju u probavnom sustavu, kod oba oblika bolesti može doći do pojave simptoma izvan crijeva (sekundarnih komplikacija) poput artritisa, eritema, sklerotičnog kolangitisa, psorijaze i ankiloznog spondilitisa. U bolesnika s upalnim bolestima crijeva dolazi do smanjenja sekrecije mukusa iz epitelnih stanica *goblet* te do smanjenja sekrecije defenzina iz epitelnih stanica *Paneth* koji služe za obranu od bakterija. Na taj način dolazi do pojačane izloženosti epitelnih stanica crijevnoj mikroflori i do pojačanog upalnog odgovora. Također dolazi do deregulacije čvrstih veza između epitelnih stanica i do prodiranja bakterija u područje rahlog vezivnog tkiva (*lamina propria*). U području *lamina propria* u crijevu zdravih ljudi odvija se normalni imunosni odgovor, a u crijevu bolesnika s upalnim bolestima crijeva dolazi do pojačanog imunosnog odgovora. Unutar tog područja stanice urođene imunosti proizvode povećane količine molekula TNF-α (od engl. *tumor necrosis factor α*), interleukina IL1β, IL6, IL12, IL23 i kemokina. U takvim uvjetima dolazi do regrutacije stanica imunosnog sustava koje djeluju proupalno te posljedično do konstantne upale. Posljedice tih upala su kontinuirane ozljede epitela koje uzrokuju stvaranje erozija i čireva (8). Liječenje upalnih bolesti crijeva može se podijeliti u dva dijela: terapija lijekovima koji smanjuju imunosni odgovor i kirurški zahvati kojima se odstranjuje oštećeno tkivo. Od lijekova se koriste antibiotici, kortikosteroidi, 5-aminosalicilati, imunosupresivi i biološki lijekovi (monoklonalna antitijela specifična za neku proupalnu molekulu, npr. anti-TNF-α). Trenutno se razvijaju i drugi biološki lijekovi koji imaju za svrhu blokirati pojačani imunosni odgovor putem blokiranja različitih citokina i integrina (138). Osim navedenih vrsta liječenja, važno je promijeniti i životne navike (uvesti posebnu prehranu, povećati razinu kretanja, prestati pušiti u slučaju bolesnike s CD-om, smanjiti stresna stanja, itd.).

2.4.1. Genetska predispozicija, epigenetički i okolišni faktori u upalnim bolestima crijeva

GWA-studije povezale su ukupno 200 genskih lokusa s Crohnovom bolesti i ulceroznim kolitisom. Neki od tih gena kodiraju za proteine koji su uključeni u putove urođene imunosti,

signalizaciju putem T-limfocita, funkciju epitelne barijere i autofagije (9,102,127,129,139). Jedan od gena uključenih u nastanak i progresiju Crohnove bolesti je *NOD2* (od engl. *nucleotide oligomerization domain 2*), koji kodira za unutarstanični senzor bakterijskih peptidoglikana i često je mutiran u bolesnika s Crohnovom bolesti (140,141). Uz proučavanje genetske komponente uključene u IBD, danas je fokus na istraživanju utjecaja okoliša na nastanak i progresiju ove bolesti kao što su promjena crijevne mikroflore, antibiotici, infekcije, loša prehrana, moderni životni stil koji je povezan sa smanjenjem tjelovježbe, kretanja i povećanjem stresa, pušenje, itd. Većina okolišnih čimbenika utječe na ekspresiju gena i druge procese u stanici kroz epigenetičke mehanizme (142–148). Epigenomskim studijama povezanosti i analizama metilacije DNA u promotorima gena kandidata pokazano je da u pacijentima oboljelim od ovih bolesti dolazi do značajnih epigenetičkih promjena. U Crohnovoj bolesti, koja se javlja rano u životu (čak u dječjoj dobi), dolazi do promjene u metilaciji na 65 CpG-mjesta (diferencijalno metilirana mjesta, DMP, od engl. *differentially methylated position*) i u 19 regija u genomu (diferencijalno metilirane regije, DMR, od engl. *differentially methylated region*), s vrlo značajnim promjenama u regiji *MIR21*. Ta regija je hipometilirana u krvi pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti te dolazi do njene pojačane ekspresije u leukocitima (149). Gen *MIR21* kodira za molekulu mikro-RNA koja ima ulogu u diferencijaciji T-limfocita i deregulirana je u različitim tumorima, uključujući i kolorektalni karcinom (150–154). Druga epigenomska studija povezanosti otkrila je u krvi IBD-pacijenata 495 DMP-a i 5 DMR-a. Neki od tih lokusa otkriveni su u prethodnoj studiji od Adams i suradnika (149), a otkriveni su i novi lokusi koji prijašnjim istraživanjima nisu bili povezani s IBD-om (155). Analiza metilacije promotora gena kandidata, odabranih na temelju GWA-studija (12,121,122) pokazala je promjenu stupnja metilacije gena *MGAT3*, glikoziltransferaze, u punoj krvi pacijenata oboljelih od IBD-a u odnosu na zdrave ljude. Ista promjena metilacije u promotoru gena *MGAT3* potvrđena je u subklasi stanica iz pune krvi, relevantnima za IBD, a to su B-limfociti $CD19^+$ (156). Osim promjena metilacije DNA, u IBD-u dolazi i do promjena u ekspresiji molekula mikro-RNA, koje su važne za razvoj i regulaciju imunosnog sustava (157).

2.4.2. N-glikozilacija IgG-a u upalnim bolestima crijeva

Cijelogenomskom studijom povezanosti geni *IKZF1*, *LAMB1*, *IL6ST*, *MGAT3* i *BACH2* povezani su s *N*-glikozilacijom IgG-a (12,121,122). Svi navedeni geni povezani su i s Crohnovom bolesti, osim *LAMB1* koji je povezan s ulceroznim kolitisom (9,127,129). U IBD-pacijentima dolazi do poremećaja humoralne imunosti, odnosno do deregulacije proizvodnje i

sekrecije antitijela. U odnosu na zdrave ljude dolazi do povećanja količine IgG-a i u krvi i u crijevnoj mukozi (158). Također je pokazano da u IBD-pacijenata dolazi do povećanja količine molekula IgG-a koje imaju glikanske strukture bez galaktoze i sijalinske kiseline, posebice u bolesnika koji boluju od Crohnove bolesti (22,23). Takve glikanske strukture utječu na konformaciju molekule IgG-a, te mijenjaju njezino antiupalno djelovanje u proupalno (13,14,16,119).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici i uzorci

U ovom istraživanju koristila sam uzorke DNA izolirane iz periferne krvi pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa, te zdravih ljudi, iz kohorti sakupljenih od strane partnera FP7 projekta IBD-BIOM („Dijagnostički i prognostički biomarkeri za upalne bolesti crijeva“). Uzorci su sakupljeni u dva medicinska centra: „*Western General Hospital*“ u Edinburghu (Velika Britanija) i Sveučilišnoj bolnici Careggi u Firenci (Italija). U Tablici 1. navedeni su podaci o ispitanicima čija je krv korištena kao uzorak u istraživanju.

Tablica 1. Osnovne demografske i kliničke karakteristike pacijenata oboljelih od IBD-a i zdravih ljudi iz dviju kohorta (Edinburgh i Firenca), u kojima je analizirala metilacija promotora gena *BACH2* iz pune krvi. HC = zdravi ljudi; UC = ulcerozni kolitis; CD = Crohnova bolest; n = broj analiziranih ljudi.

	Kohorta Edinburgh			***Kohorta Firenca***		
	HC	**UC**	**CD**	**HC**	**UC**	**CD**
	n=89	n=263	n=79	n=177	n=169	n=173
Spol						
Muškarci	34	107	30	143	103	100
Žene	54	154	49	34	66	73
Nepoznato	1	2				
Dob (godine)	43	45.9	42.5	40.3	46	44.1
Rasa						
Azijac	2	4				
Azijac (bijelac)		1				
Australac		1				
Crnac	1	1				
Kinez		1				
Španjolac		1				
Židov	1	1				
Bijelac	74	238	62			
Bijelac (Britanac)			1			
Bijelac (Europljanin)	3	8	9			
Bijelac (Škot)	1	2	1			
Amerikanac		2				
Drugo	2	5				
Nepoznato	5	3	6			
Židovi						
Da	1	1				
Ne	88	260	79			
Pušenje cigareta						
Trenutni pušač		32	26		20	69
Bivši pušač		87	4		61	32
Nepušač	22	124	36		75	63
Nepoznato	67	20	13		13	9
IBD u obitelji						
Da	4	51	12		13	12
Ne	81	207	56		151	154
Nepoznato	4	5	11		5	7
Tip IBD-a u obitelji						
CD	2	15	8			
UC	2	33	3			
Miješano		2	1			
IBD neklasificiran		1				

U istraživanju sam također koristila i uzorke DNA izolirane iz B-limfocita $CD19^+$pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva i zdravih ljudi sakupljenih u medicinskom centru *„Western General Hospital"*. Podaci o skupini ispitanika iz čije krvi su izolirani B-limfociti $CD19^+$ za analizu CpG-metilacije navedeni su u Tablici 2.

Tablica 2. Osnovne demografske i kliničke karakteristike skupine pacijenata oboljelih od IBD-a i zdravih ljudi iz kohorte Edinburgh u kojih je analizirana metilacija promotora gena *BACH2* iz B-limfocita $CD19^+$. HC = zdravi ljudi; UC = ulcerozni kolitis; CD = Crohnova bolest; n = broj analiziranih ljudi.

	Podskupina pacijenata kohorte Edinburgh		
	HC	**UC**	**CD**
	n=28	n=19	n=20
Spol			
Muškarci	15	13	11
Žene	13	6	9
Dob (godine)	34.8	39.8	34.2
Rasa			
Španjolac	1		
Miješana rasa			1
Bijelac	1		
Bijelac (Amerikanac)			1
Bijelac (Škot)	5	2	1
Bijelac (Europljanin)	18	17	17
Drugo	1		
Nepoznato	2		
Pušenje cigareta			
Trenutni pušač	4	1	6
Bivši pušač	8	9	4
Nepušač	15	9	10
Nepoznato	1		

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Također, prikupljanje uzoraka i istraživanja odobrena su od strane Etičkih povjerenstava u Edinburghu i Firenci. Ispitanici su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

3.2. Stanične linije

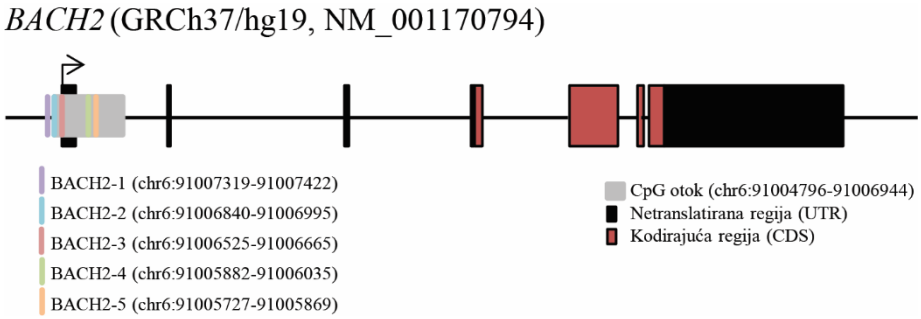
U istraživanju sam koristila ljudske stanične linije NALM-6, LCL i Arh-77, te različite klonove mišjih stanica hibridoma. Stanične linije NALM-6 i Arh-77 kupljene su od Instituta DSMZ (od njem. *Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) u Leibnizu, Njemačka, a stanična linija LCL (od engl. *lymphoblastoid cell line*) dobivena je iz Međunarodne agencije za istraživanje raka (*IARC,* od engl. *International Agency for Research on Cancer*) u Lyonu, Francuska. Stanična linija NALM-6 (DSMZ broj: ACC 128) odgovara leukemiji prekursora B-limfocita. Linija je uspostavljena iz periferne krvi 19-godišnjeg muškarca oboljelog od akutne limfoblastoidne leukemije (ALL) 1976. godine. Stanična linija LCL dobivena je infekcijom B-limfocita iz periferne krvi zdrave osobe Epstein-Barrovim virusom i na taj način je postala besmrtna. Stanična linija Arh-77 (DSMZ broj: ACC 512) odgovara leukemiji plazma stanica. Uspostavljena je iz periferne krvi 33-godišnje žene oboljele od IgG-leukemije plazma stanica. Klonovi mišjih stanica hibridoma dobiveni su iz Centra za proteomiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Dobiveni klonovi su monoklonalni, odnosno specifični za jedan epitop, i proizvode monoklonalne molekule imunoglobulina G. Stanice hibridoma dobivene su fuzijom splenocita (stanica slezene) iz miša soja BALB/c imuniziranog imunogenom i stanica mijeloma SP2/0 (ATCC: CRL-1581). Protokol produkcije mišjih stanica hibridoma opisao je Gustafsson (159). Stanice hibridoma prilagođene su rastu u mediju bez serumu radi lakše izolacije imunoglobulina G iz medija. Također, u istraživanju sam koristila stanice HEK293 (od engl. *human embrionic kidney*, ATCC-broj: CRL-1573) podrijetlom iz baze stanica ATCC.

3.3. Analiza CpG-metilacije ljudskog i mišjeg gena *BACH2*

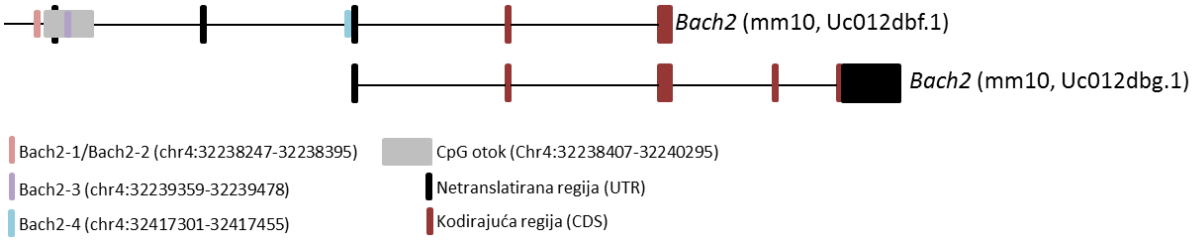
3.3.1. Dizajn testova za analizu CpG-metilacije gena *BACH2 i Bach2*

Dizajn testova za analizu metilacije gena *BACH2* napravila sam upotrebom verzije ljudskog genoma hg19 i referentne sekvence gena NM_001170794. Dizajn testova za analizu metilacije gena *Bach2* napravila sam prema sekvencama uc012dbf.1 i uc012dbg.1 u verziji mm10 mišjeg genoma. Promotorsku regiju gena (~1000 parova baza uzvodno od početka gena) podvrgnula sam tretmanu natrijevim bisulfitom *in silico,* tj. svi citozini unutar CpG-dinukleotida postali su Y, a citozini u ostalim kontekstima postali su T. Na takvim sekvencama dizajnirala sam početnice za različite regije unutar promotora gena. Prilikom dizajna početnica pratila sam prethodno opisana uputstva (160). Za analizu metilacije gena *BACH2* dizajnirala sam pet

metilacijskih testova. Shema položaja PCR-produkata unutar gena te njihove koordinate prikazane su na Slici 9. Za analizu metilacije gena *Bach2* napravila sam četiri testa. Shema položaja PCR-produkata unutar gena i koordinate prikazani su na Slici 10. Sekvence početnica za lančanu reakciju polimerazom i bisulfitno pirosekvenciranje, te broj analiziranih CpG-mjesta prikazani su u Tablici 3.



Slika 9. Shematski prikaz strukture gena *BACH2*. Ovaj gen se sastoji od 7 eksona i 6 introna, te jednog CpG-otoka koji obuhvaća promotor, prvi ekson i prvi intron. Na shemi je CpG-otok označen sivom bojom, a položaji PCR-produkata za analizu CpG-metilacije gena *BACH2* ljubičastom, plavom, crvenom, zelenom i narančastom linijom, te su navedene njihove koordinate. Četiri PCR-produkta nalaze se unutar, a jedan uzvodno od CpG-otoka. Strelica označava mjesto početka transkripcije.



Slika 10. Shematski prikaz strukture gena *Bach2*. U bazi podataka UCSC anotirana su dva transkripta gena *Bach2*: Uc012dbf.1 s CpG-otokom koji se nalazi unutar promotora, prvog eksona i prvog introna (sivi pravokutnik) i Uc012dbg.1 koji nema CpG-otok. Na shemi su prikazani položaji i koordinate PCR-produkata (crvena, ljubičasta i plava linija) za analizu CpG-metilacije gena *Bach2*.

Tablica 3. Sekvence početnica za umnažanje fragmenata reakcijom PCR te za bisulfitno pirosekvenciranje (PYRO) pet regija unutar gena *BACH2* i četiri regije unutar gena *Bach2*, temperature prianjanja (Ta) početnica tijekom reakcije PCR i broj analiziranih CpG-mjesta bisulfitnim pirosekvenciranjem.

NAZIV TESTA	***NAZIV POČETNICE***	***SEKVENCA (5'-3')***	***UPOTREBA***	***Ta / °C***	***BROJ CpG-MJESTA***
BACH2-1	*BACH2-F1*	*TTTTGATAGGGTATTTATA*	*PCR*	*44*	*3*
	BACH2-R1	*[Btn]CAACTCCTACTACCTT*			
	BACH2-SEQ1	*TTTTGATAGGGTATTTATA*	*PYRO*		
BACH2-2	*BACH2-F2*	*GTGTTATATTAGTTTTTATTA*	*PCR*	*50*	*14*
	BACH2-R2	*[Btn]ACAACAAATCTCCCC*			
	BACH2-SEQ2	*TTGTTATGTTTTTAATTTT*	*PYRO*		
BACH2-3	*BACH2-F3*	*TTATTGTGAATGGGGA*	*PCR*	*38*	*5*
	BACH2-R3	*[Btn]ACTACTACTACTAAAAC*			
	BACH2-SEQ3	*TTATTGTGAATGGGGA*	*PYRO*		
BACH2-4	*BACH2-F4*	*GTTTTTATGGTATTTTTTAGG*	*PCR*	*48*	*9*
	BACH2-R4	*[Btn]TCCCTCTACTATTCCAAAA*			
	BACH2-SEQ4	*ATGGTATTTTTTAGG*	*PYRO*		
BACH2-5	*BACH2-F5*	*AGTAATAAGTTAGGTAT*	*PCR*	*39*	*16*
	BACH2-R5	*[Btn]ACCTAAAACTAAAATC*			
	BACH2-SEQ5	*TAGGTATGGGGAGGG*	*PYRO*		
Bach2-1	*Bach2-F1*	*GTTTTTTTAGGGAAGTTGTA*	*PCR*	*46*	*4*
	Bach2-R1	*[Btn]TCAAAACTTATAAAACTAATAAA*			
	Bach2-SEQ1	*GTTTTTTTAGGGAAGTTGTA*	*PYRO*		
Bach2-2	*Bach2-F2*	*GTTTTTTTAGGGAAGTTGTA*	*PCR*	*46*	*3*
	Bach2-R2	*[Btn]TCAAAACTTATAAAACTAATAAA*			
	Bach2-SEQ2	*TGTTTATGGTTTTGG*	*PYRO*		
Bach2-3	*Bach2-F3*	*GGGTGTTTTGGAATAGTAGGG*	*PCR*	*55*	*4*
	Bach2-R3	*[Btn]AAAACCATAAATCTAACAACTACTA*			
	Bach2-SEQ3	*GGGAGGAGGAGT*	*PYRO*		
Bach2-4	*Bach2-F4*	*GAAGAGAAATATTAGAATTAT*	*PCR*	*48*	*4*
	Bach2-R4	*[Btn]AATAAATCAATAAATATCCAC*			
	Bach2-SEQ4	*TAGTAGGTAGGAGA*	*PYRO*		

3.3.2. Određivanje stupnja CpG-metilacije gena *BACH2* iz krvi pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva

Koristeći DNA izoliranu iz pune krvi pacijenata s upalnim bolestima crijeva (iz obje analizirane kohorte) napravila sam bisulfitnu konverziju kako bi se mogli razlikovati metilirani citozini od nemetiliranih. Bisulfitna konverzija je postupak kojim svi metilirani citozini ostaju nepromijenjeni, a nemetilirani citozini prolaze deaminaciju i postaju uracili. Koristila sam 500 ng genomske DNA za bisulfitnu konverziju pomoću komercijalnog seta kemikalija EZ-96 DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, Freiburg, Njemačka). Ovako pripremljenu DNA koristila sam za amplifikaciju specifičnih fragmenata gena *BACH2* upotrebom komercijalnog seta kemikalija PyroMark PCR Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Sekvence početnica i temperature prianjanja (Ta) tijekom reakcije PCR prikazane su u Tablici 3. Reakcije PCR napravljene su prema uputama proizvođača za sve fragmente, osim za fragment *BACH2-3* za koji je napravljena reakcijska smjesa od 50 µl. Volumen korištene konvertirane DNA bio je 1 µl za umnažanje svih fragmenata, osim fragmenta *BACH2-3* za koji je korišteno 4 µl DNA. Uvjeti pri kojima je izvedena reakcija PCR su bili sljedeći: početna denaturacija pri 95°C, 15 min, 50 ciklusa denaturacije pri 95°C, 30 sek, prianjanja pri temperaturama specifičnim za pojedini fragment (Tablica 3.), 30 sek, elongacija pri 72°C, 30 s, te završna elongacija pri 72°C u trajanju od 10 min. Bisulfitno pirosekvenciranje napravila sam upotrebom sustava PyroMark Q24 (za fragmente *BACH2-3* i *BACH2-4*) i PyroMark Q24 Advanced (za fragmente *BACH2-1*, *BACH2-2* i *BACH2-5*) i komercijalnih setova kemikalija PyroMark Gold Q96 Reagents i PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents (Qiagen), prema protokolu proizvođača. Za pirosekvenciranje sam koristila početnice navedene u Tablici 3. Broj analiziranih CpG-mjesta u različitim fragmentima gena *BACH2* prikazan je u Tablici 3. Analizu stupnja CpG-metilacije u svim fragmentima napravila sam na skupini uzoraka iz Edinburgha, a na kohorti pacijenata iz Firence analizirala sam metilaciju 14 CpG-mjesta unutar fragmenta *BACH2-2* (Tablica 1.). Kao kontrole za umnažanje reakcijom PCR te za bisulfitno pirosekvenciranje koristila sam komercijalno dostupne metiliranu i nemetiliranu DNA (*EpiTect Control DNA Set*, Qiagen).

3.3.3. Određivanje stupnja CpG-metilacije gena *BACH2* u B-limfocitima $CD19^+$ pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva

Analizu metilacije gena *BACH2* u B-limfocitima $CD19^+$ napravila sam na uzorcima DNA manje grupe pacijenata i zdravih ljudi iz kohorte Edinburgh. Genomska DNA je izolirana iz B-

limfocita $CD19^+$ sortiranih iz pune krvi. Koristila sam 100 ng DNA za bisulfitnu konverziju upotrebom komercijalnog seta kemikalija EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research) prema uputama proizvođača. Jedan µL konvertirane DNA koristila sam u reakciji PCR za umnažanje fragmenta *BACH2-2*. Reakcijska smjesa i protokol prema kojem sam napravila reakcije PCR opisani su u prethodnom stavku. Kao kontrole u reakciji umnažanja metodom PCR te pirosekvenciranja koristila sam metiliranu i nemetiliranu DNA (*EpiTect Control DNA Set*). Stupanj CpG-metilacije analizirana sam pirosekvenciranjem na uređaju PyroMark Q24 Advanced na isti način kao i prilikom analize CpG-metilacije u punoj krvi pacijenata i zdravih kontrola (stavak 3.3.2.). Broj i raspodjela analiziranih uzoraka prema bolesti, dobi i spolu prikazana je u Tablici 2.

3.3.4. Analiza stupnja CpG-metilacije gena *BACH2* u staničnim linijama NALM-6, LCL i Arh-77

Stanične kulture NALM-6 i Arh-77 uzgajala sam u hranjivom mediju RPMI-1640 koji je sadržavao 2 mM L-glutamin (*Roswell Park Memorial Institute,* Lonza, Basel, Švicarska) uz dodatak 10% goveđeg fetalnog seruma (FBS, od engl. *fetal bovine serum*, Gibco, Gaithersburg, Maryland, SAD), 100 jedinica/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina (Lonza). Staničnu kulturu LCL održavala sam u hranjivom mediju RPMI-1640 koji je sadržavao 2 mM L-glutamin (Lonza) uz dodatak 10% goveđeg fetalnog seruma (Gibco), 2 mM L-glutamina (Lonza), 1 mM natrijevog piruvata (Lonza), 100 jedinica/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina (Lonza). Sve stanične kulture uzgajala sam u inkubatoru s vlažnom atmosferom pri 37°C i 5%-tnim udjelom CO_2. Analizu stupnja CpG-metilacije gena *BACH2* u navedenim stanicama napravila sam u triplikatu, tj. stanice sam sakupila u tri vremenske točke kako bih utvrdila je li metilacija stabilna odnosno mijenja li se tijekom vremena. Stanice sam centrifugirala na sobnoj temperaturi 5 min pri 300 *g* te isprala dva puta u puferu PBS (engl. *phosphate buffered saline*, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl,10mM Na_2HPO_4, 2mM KH_2PO_4, pH 7,4). Stanične taloge sam zamrznula na -80°C i pri toj temperaturi su čuvani do izolacije DNA koju sam napravila pomoću komercijalnog seta kemikalija DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) prema uputama proizvođača. Koristila sam 500 ng DNA za bisulfitnu konverziju upotrebom komercijalnog seta kemikalija EZ DNA Methylation-Gold™ Kit, prema uputama proizvođača. Zatim sam u reakciji PCR koristila jedan µl konvertirane DNA, za umnažanje svih pet fragmenata gena *BACH2* prema već navedenom protokolu. Kao kontrole u reakciji PCR i za pirosekvenciranje koristila sam metiliranu i nemetiliranu DNA (*EpiTect DNA Control Set*).

Dobivene produkte reakcije PCR analizirala sam pirosekvenciranjem na uređaju PyroMark Q24 Advanced prema uputama proizvođača.

3.3.5. Analiza stupnja CpG-metilacije gena *Bach2* u različitim klonovima hibridoma

U ovom istraživanju koristila sam uzorke DNA izolirane iz 20 različitih klonova stanica hibridoma, dobivenih iz Centra za proteomiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci (u suradnji s prof. dr. sc. Stipanom Jonjićem). DNA je izolirana iz svakog klona u tri vremenske točke. Za bisulfitnu konverziju koristila sam 500 ng DNA. Protokol sam napravila upotrebom komercijalnog seta kemikalija EZ DNA Methylation-Gold™ Kit, prema uputama proizvođača. Jedan µl konvertirane DNA koristila sam za amplifikaciju fragmenata *Bach2-1*, *Bach2-2*, *Bach2-3* i *Bach2-4* komercijalnim setom kemikalija PyroMark PCR Kit, prema protokolu proizvođača. Sekvence početnica korištenih za reakcije PCR i temperature prianjanja prikazane su u Tablici 3. Koristila sam iste uvjete reakcije PCR kao i prilikom umnažanja fragmenata specifičnih za ljudski gen *BACH2*. Stupanj CpG-metilacije specifičnih fragmenata odredila sam pirosekvenciranjem na uređaju PyroMark Q24 Advanced upotrebom komercijalnog seta PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents, prema uputama proizvođača. Za reakcije pirosekvenciranja koristila sam specifične početnice navedene u Tablici 3. Broj analiziranih CpG-mjesta unutar fragmenata naveden je u Tablici 3.

3.3.6. Ciljana promjena metilacije gena *BACH2* u stanicama HEK293

3.3.6.1. Odabir ciljanih sekvenci i kloniranje sekvenci sgRNA u vektore dCas9-DNMT3A

U ovom eksperimentu dizajnirala sam tri molekule RNA (sgRNA, od engl. *single guide RNA*) koje služe za navođenje proteina dCas9-DNMT3A na ciljani lokus – regiju *BACH2-2* unutar promotora gena *BACH2*. Molekule sam dizajnirala prema referentnoj sekvenci gena *BACH2* (NM_001170794) iz verzije ljudskog genoma hg19 i tijekom dizajna sam pratila sljedeće kriterije: dužina sekvenci od 20 parova baza, komplementarnost samo s ciljanim mjestom u genomu i prisutnost PAM-sekvence (NGG) neposredno nizvodno (na 3'-kraju). Osim sekvenci sgRNA koje ciljaju gen *BACH2*, koristila sam i sekvence sgRNA koje nemaju komplementarno mjesto vezanja u ljudskom genomu (NT, od engl. *non targeting*) preuzete iz popisa sekvenci sgRNA lentiviralne biblioteke Human GeCKOv2 Library (161). Sekvence svih korištenih sgRNA prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Sekvence sgRNA korištenih za ciljanu metilaciju gena *BACH2* i kontrolne (NT) sgRNA s PAM-sekvencama (podcrtani trinukleotidi).

Naziv sgRNA	***Sekvenca***
BACH2-sgRNA1	*CCCCCAACCCTCGTCTTTCGTGG*
BACH2-sgRNA2	*AACCCTCGTCTTTCGTGGCCGGG*
BACH2-sgRNA3	*CTTTGTGCGGCCGCGCGGCCCGG*
NT-sgRNA1	*GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC*

Za svaku molekulu sgRNA dizajnirala sam komplementarne oligonukleotide koji imaju dodatne nukleotide na 5'-krajevima (da bi se tijekom kloniranja u destinacijski vektore (112) pdCas9-DNMT3A-PuroR i pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV) mogli porezati s enzimom BbsI) i jedan G prije ciljane sekvence od 20 parova baza (da bi bile kompatibilne s U6-promotorom u vektoru s kojeg kreće njihova ekspresija). Proces kloniranja sgRNA u destinacijske vektore radila sam u dva koraka: stvaranje dvolančanih oligonukleotida (*oligo annealing*) i fosforilacija, te digestija i ligacija vektora i dvolančanih oligonukleotida. Jednolančani oligonukleotidi (10 µM) spareni su i fosforilirani u puferu 1X T4 DNA Ligase Buffer s 5 U enzima T4 PNK (NEB, Frankfurt na Majni, Njemačka). Reakcija se odvijala pri sljedećim uvjetima: 37°C 30 min, 95°C 5 min, spuštanje temperature (*ramp down*) do 25°C (5°C po minuti). Zatim sam napravila digestiju i ligaciju dvolančanih oligonukleotida i destinacijskih vektora pdCas9-DNMT3A-PuroR i pdCas9-DNMT3A-PuroR (ANV) upotrebom 100 ng vektora, dvolančanih nukleotida (razrijeđenih 2500 puta nakon sparivanja i fosforilacije), 5U enzima BbsI (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD), 175 U ligaze T4 DNA Ligase (Takara, Dalian, Kina), 0,5 mM ATP (NEB), 0,5 mM DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) i pufera 1X Buffer G (Thermo Scientific). Reakcija se odvijala u šest ciklusa pri 37°C 5 min i 23°C 5 min. Nakon digestije i ligacije napravila sam tretman egzonukleazom Exonuclease V (5U, NEB) da bi se porezali svi vektori koji se nisu ligirali s oligonukleotidima tijekom prethodne reakcije. Tretman je trajao 30 min pri 37°C. Dobivene konstrukte sam ubacila u kemijski kompetentne stanice *E. coli* (soj XL10 Gold) da bih ih umnožila, te je ugradnja molekula sgRNA u vektore potvrđena sekvenciranjem. Sekvenciranje je napravljeno u servisu tvrtke Macrogen upotrebom početnice U6-For (5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC-3').

3.3.6.2. Transfekcija i selekcija stanica HEK293

Kulturu stanica HEK293 uzgajala sam u mediju DMEM (od engl. *Dulbecco's modified Eagle's medium*, Lonza) uz dodatak 4 mM L-glutamina, 10 % FBS-a, 100 jedinica/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina, u inkubatoru u vlažnoj atmosferi pri 37°C i 5 %-tnim udjelom CO_2. Stanice sam nasadila dan prije transfekcije u ploče s 24 jažica (60000 stanica po jažici) u punom mediju i na dan transfekcije su bile oko 100% konfluentne. Transfekciju sam napravila upotrebom kationskog lipidnog reagensa Lipofectamine 3000 (Invitrogen), prema uputama proizvođača. Protokol je bio sljedeći (opisano za transfekciju stanica u jednoj jažici): na dan transfekcije pripremila sam smjesu od 1,5 µl reagensa Lipofectamine 3000 i 25 µl medija opti-MEM (Gibco). Zatim sam pripremila smjesu od 1 µl reagensa P3000 i 25 µl medija opti-MEM, te u nju dodala 100 ng plazmidne DNA. U tu smjesu dodala sam prethodno napravljenu smjesu reagensa Lipofectamine 3000 i medija opti-MEM, te sve inkubirala 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, u jažice sa stanicama dodala sam 50 µl smjese. Transfekciju sam radila s vektorom koji sadrži jednu sgRNA ili kombinacijom sva tri vektora (svaki sadrži jednu sgRNA), u tehničkom duplikatu. Osim transfekcije s vektorima koji kodiraju za aktivni enzim DNMT3A (dCas9-DNMT3A), stanice sam transfecirala i s vektorima koji kodiraju za inaktivni enzim DNMT3A (dCas9-DNMT3A-ANV) te s kontrolnim konstruktom koji ima *non-targeting* sgRNA. Osim *non-targeting* kontrole, napravila sam i *mock*-transfekciju (stanice su tretirane reagensom Lipofectamine 3000, ali bez DNA) i kontrolu UTF (od engl. *untransfected,* stanice koje uopće nisu prolazile transfekciju). Stanice sam sljedeći dan presadila u ploče od 6 jažica upotrebom 0.25%-tnog tripsina i EDTA (Sigma-Aldrich, Irvine, UK). Točno 24 h nakon transfekcije napravila sam selekciju stanica s 1,5 µg/ml puromicina (Gibco) u trajanju od 48 h, da bih maknula stanice koje nisu primile plazmide i nisu rezistentne na antibiotik puromicin. Nakon selekcije, stanice sam isprala i dodala im novi puni medij, te ih uzgajala još pet dana (8 dana nakon transfekcije).

3.3.6.3. Analiza metilacije DNA i ekspresije gena BACH2

Osam dana nakon transfekcije iz stanica HEK293 izolirala sam DNA upotrebom komercijalnog seta kemikalija DNeasy Blood & Tissue Kit, prema uputama proizvođača. Zatim sam napravila bisulfitnu konverziju 100 ng izolirane DNA upotrebom komercijalnog seta kemikalije EZ DNA Methylation-Gold™, prema uputama proizvođača. Na bisulfitno konvertiranoj DNA umnožila sam u reakciji PCR fragment *BACH2-2* i odredila stupanj CpG-

metilacije bisulfitnim pirosekvenciranjem, prema prethodno navedenim uvjetima (stavak 3.3.2.). Iz stanica sam također izolirala RNA upotrebom komercijalnog seta kemikalija RNeasy Mini Kit (Qiagen), prema uputama proizvođača. Tijekom same izolacije nisam radila digestiju DNazom, jer hidrolizirajuće (TaqMan®) probe korištene za kvantitativni PCR u stvarnom vremenu ne detektiraju genomsku DNA. Zatim sam napravila reverznu transkripciju (sintezu cDNA, engl. *complementary DNA*) s 500 ng RNA upotrebom reverzne transkriptaze PrimeScript (Takara). Reakcije sam napravila na sljedeći način: 500 ng RNA pomiješala sam s nasumičnim početnicama (2,5 μM, Random Hexamers, Invitrogen), dNTP (0.5 mM, Sigma-Aldrich) i vodom do konačnog volumena 10 μL. Smjesu sam inkubirala 5 min pri 65°C te potom 5 min na ledu. Nakon inkubacije smjesi sam dodala sljedeće reagense: 100 U reverzne transkriptaze PrimeScript i pripadajući pufer, 20 U Recombinant Rnase Inhibitor (Takara) i vode do konačnog volumena od 20 μL, te napravila reverznu transkripciju pri sljedećim uvjetima: 42°C 60 min i 70°C 15 min. Dobivenu cDNA koristila sam u kvantitativnom PCR-u za analizu ekspresije gena upotrebom komercijalno dostupnih hidrolizirajućih TaqMan® proba. Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu napravila sam u uređaju 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD) upotrebom sljedećih kemikalija: TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) i TaqMan® proba specifičnih za *BACH2* (Hs00222364_m1, Applied Biosystems) i *HPRT1* (Hs02800695_m1, Applied Biosystems), prema uputama proizvođača, u konačnom volumenu od 20 μl po reakciji. Sve reakcije qPCR-a napravila sam u tehničkim duplikatima. Razinu ekspresije gena *BACH2* odredila sam relativnom metodom komparativne Ct vrijednosti, koristeći gen *HPRT1* kao endogenu kontrolu (162).

3.4. Analiza povezanosti metilacije gena *BACH2* i glikozilacije IgG-a u IBD-u

Podatke CpG-metilacije fragmenta *BACH2-2* u krvi dvije kohorte IBD-pacijenata i zdravih ispitanika korelirala sam s podatcima *N*-glikozilacije IgG-a istih ispitanika (17 glikanskih obilježja - 13 glikanskih struktura i 4 derivirana obilježja) na temelju podataka suradnika iz tvrtke Genos Laboratorij za glikobiologiju. Oni su analizu *N*-glikozilacije IgG-a u ove dvije kohorte napravili u sklopu FP7 projekta IBD-BIOM (22,23). U analizu nisam uzela u obzir podatke CpG-metilacije koji nisu prošli kontrolu kvalitete nakon pirosekvenciranja. Korelacijsku analizu sam napravila upotrebom srednje vrijednosti CpG-metilacije svih analiziranih CpG-mjesta u fragmentu *BACH2-2* i relativne količine glikanskih struktura na

molekulama IgG-a. Napravila sam Pearsonovu korelaciju i Bonferronijevu korekciju za višestruko testiranje (17 testiranja), a korelacije s *p* vrijednosti manjom od 0,01 uzela sam kao značajne. Analizu i prikaz sam napravila u programu R, upotrebom paketa „corrplot".

3.5. Analiza ekspresije gena *BACH2* i *Bach2*

3.5.1. Analiza ekspresije gena *BACH2* u staničnim linijama NALM-6, LCL i Arh-77

Prilikom sakupljanja stanica za analizu metilacije gena *BACH2* u staničnim linijama NALM-6, LCL i Arh-77, sakupila sam i stanice koje su korištene za izolaciju RNA. Izolaciju RNA napravila sam pomoću komercijalnog seta kemikalija RNeasy Mini Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. Reverznu transkripciju napravila sam s 300 ng RNA prema protokolu opisanom u stavku 3.3.6.3. Relativna ekspresija gena *BACH2* analizirana je kvantitativnim PCR-om upotrebom komercijalno dostupnih hidrolizirajućih TaqMan® proba već opisanom protokolu. Sve reakcije qPCR-a napravljene su u tehničkim triplikatima. Razina ekspresije gena *BACH2* određena je relativnom metodom komparativne Ct vrijednosti, koristeći gen *HPRT1* kao endogenu kontrolu (162).

3.5.2. Analiza ekspresije gena *Bach2* u različitim klonovima hibridoma

U ovom istraživanju koristila sam uzorke RNA izolirane iz 20 različitih klonova stanica hibridoma (izolirani istovremeno kad i uzorci DNA za analizu metilacije), dobivene iz Centra za proteomiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. RNA je izolirana iz svakog klona u tri vremenske točke. Uzorci RNA čuvani su u 75%-tnom etanolu. Prije upotrebe uzorke sam centrifugirala pet min pri 12000 *g* na 4°C. Dobivene taloge RNA sam osušila i otopila u vodi. Tijekom same izolacije nisam radila digestiju DNazom, jer TaqMan® probe korištene za analizu ekspresije gena *Bach2* i *Hprt* ne detektiraju genomsku DNA. Reverznu transkripciju napravila sam s 2000 ng RNA upotrebom reverzne transkriptaze PrimeScript (Takara). Reakcije sam napravila na sljedeći način: 2000 ng RNA pomiješala sam s nasumičnim početnicama (2.5 μM, Random Hexamers, Invitrogen), početnicama Oligo $d(T)_{16}$ (2.5 μM, Invitrogen), dNTP (0.5 mM, Sigma-Aldrich) i vodom do konačnog volumena 20 μL. Smjesu sam inkubirala pet min pri 65°C te potom pet min na ledu. Nakon inkubacije smjesi sam dodala sljedeće reagense: 200 U reverzne transkriptaze PrimeScript i pripadajući pufer, 40 U Recombinant Rnase Inhibitor (Takara) i vodu do konačnog volumena od 40 μL, te sam reverznu

transkripciju napravila pri sljedećim uvjetima: 42°C 60 min i 70°C 15 min. Uspješnost reverzne transkripcije provjerila sam metodom kvalitativnog PCR-a kojim je umnožen dio mRNA gena *Gapdh*. PCR sam radila upotrebom 0,5 U DNA polimeraze *Ex Taq* s pripadajućim puferom (Takara), 1 µl dobivene cDNA, 0,2 mM dNTP (Takara) i 0,5 µM početnica (sekvence početnica preuzela sam od Park i sur. 2011. (163), 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' i 5'-CACCACCCTGTTGCTGTAGCC-3'). Konačni volumen reakcija bio je 20 µl. Uvjeti reakcije bili su sljedeći: početna denaturacija na 95°C 1 min, 35 ciklusa denaturacije na 95°C (30 s), vezanja početnica na 65°C (30 s) i elongacije na 72°C (1 min), te završna elongacija 10 min pri 72°C. Nakon provjere uspješnosti reverzne transkripcije, dobivenu cDNA koristila sam u reakciji kvantitativnog PCR-a za analizu ekspresije gena upotrebom komercijalno dostupnih hidrolizirajućih TaqMan® proba. Kvantitativni PCR u stvarnom vremenu napravila sam u uređaju 7500 Fast Real-Time PCR System. Ekspresiju *Bach2* analizirala sam upotrebom dvije različite TaqMan® probe: Mm00464379_m1 i Mm01212378_m1 (Applied Biosystems). Relativnu ekspresiju izmjerila sam u odnosu na ekspresiju gena *Hprt* (Mm00446968_m1, Applied Biosystems), prema uputama proizvođača, u konačnom volumenu od 20 µl po reakciji. Sve reakcije qPCR napravljene su u tehničkim duplikatima. Razina ekspresije gena *Bach2* određena je relativnom metodom komparativne Ct vrijednosti (162). Dobivene podatke ekspresije gena *Bach2* (vrijednosti dCt) korelirala sam s vrijednostima CpG-metilacije svih analiziranih CpG-mjesta unutar četiri fragmenata, u istim klonovima stanica hibridoma. Također sam korelirala srednje vrijednosti CpG-metilacije pojedinog fragmenta te srednju vrijednost metilacije svih analiziranih CpG-mjesta i vrijednosti dCt dobivene upotrebom obje TaqMan probe s devet glikanskih struktura molekula IgG-a koje luče isti klonovi stanica hibridoma, u medij u kojem rastu. Analizu glikozilacije IgG-a napravili su suradnici u tvrtki Genos Laboratorij za glikobiologiju (neobjavljeni rezultati). Sve analize i prikaze korelacija napravila sam u programu R upotrebom metode Pearsonove korelacije i paketa „corrplot“ te su statistički značajne korelacije bile su one s *p* vrijednosti manjom od 0,01.

3.6. Analiza histonskih modifikacija u promotoru gena *BACH2*

3.6.1. Kromatinska imunoprecipitacija

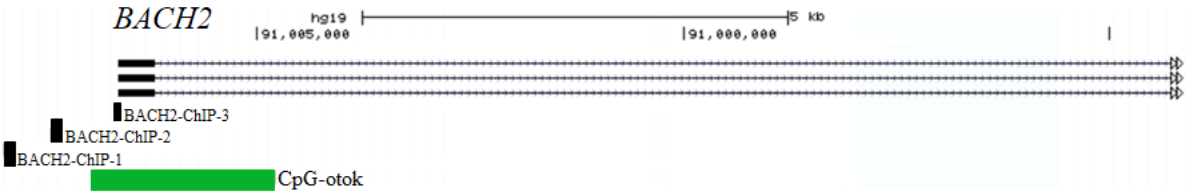
Kromatinska imunoprecipitacija (ChIP, od engl. *chromatin immunoprecipitation*) je metoda koja se upotrebljava za proučavanje interakcija između proteina/proteinskih modifikacija i regija u genomu. Ovom metodom mogu se analizirati mjesta vezanja transkripcijskih faktora

na genomsku DNA ili pak prisutnost različitih histonskih modifikacija unutar kromatina. Metoda se temelji na precipitaciji kromatina, na koji je vezan specifičan protein, antitijelom specifičnim za taj protein. Nakon imunoprecipitacije dobiveni kromatin analizira se metodom kvantitativnog PCR-a ili sekvenciranjem. U ovom istraživanju analizirala sam histonske modifikacije karakteristične za aktivni i utišani kromatin (trimetilacija četvrtog lizina u histonu H3, acetilacija i trimetilacija lizina na poziciji 27 u histonu H3, te acetilacija i trimetilacija devetog lizina u histonu H3) unutar promotora gena *BACH2*, u tri stanične linije: NALM-6, LCL i Arh-77. Stanice sam uzgajala u prethodno navedenim uvjetima u dvije vremenske točke. 15 milijuna stanica svake linije fiksirala sam 1%-tnim formaldehidom (Sigma-Aldrich) 10 min, uz rotaciju. Fiksacijom formaldehidom stvaraju se kovalentne veze između proteina, te proteina i DNA. Proteini koji su vezani međusobno ili s molekulom DNA slabim interakcijama ili se nalaze u njezinoj neposrednoj blizini (na udaljenosti manjoj od 2 Å), postaju čvrsto vezani. Nakon fiksacije, suvišak formaldehida uklonila sam inkubacijom s 0,125 M glicinom 5 min uz rotaciju. Nakon inkubacije, stanice sam isprala dva puta u PBS-u i zamrznula na -80°C do upotrebe. Prije kromatinske imunoprecipitacije, stanice sam lizirala u 1350 µl pufera za lizu (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) uz dodatak inhibitora proteaza (*cOmplete™ ULTRA Tablets, EDTA free*, Roche, Rotkreuz, Švicarska), 15 min na ledu uz povremeno miješanje na *Vortex* tresilici. Dobiveni lizat sonicirala sam u ultrazvučnoj kupelji Bioruptor® Plus (Diagenode, Liege, Belgija) ultrazvukom velike snage u trajanju od 14 ciklusa (ciklusi sonikacije: 30 s ON, 30 s OFF), u *Falcon* epruvetama od 15 ml. Nakon sonikacije provjerila sam uspješnost degradacije kromatina: veličina fragmenata pogodnih za kromatinsku imunoprecipitaciju treba biti u rasponu od 200 do 1000 parova baza. Provjeru uspješnosti sonikacije napravila sam u nekoliko koraka: prvo sam uklonila fiksirane strukture (*reverse cross-linking*) i napravila digestiju proteinazom K (15 µl soniciranog kromatina, 45 µl pufera za ChIP (1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0), 1,5 µl proteinaze K (Invitrogen), 7,5 µl 50 mM $CaCl_2$ i 2,1 µl 5 M NaCl) preko noći pri 65°C i 500 rpm. Zatim sam u uzorke dodala isti volumen smjese fenola, kloroforma i izoamilnog alkohola u omjeru 25:24:1, te sam ih dobro promiješala na *Vortex* tresilici i centrifugirala pri 13000 rpm 5 min na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja sam prebacila vodenu fazu (u kojoj se nalazi DNA) u novu epruvetu i dodala jednaki volumen smjese kloroforma i izoamilnog alkohola u omjeru 24:1. Uzorke sam opet dobro promiješala i centrifugirala pri prethodnim uvjetima. Zatim sam vodenu fazu prebacila u nove epruvete i dodala 0,1 volumen 3 M natrijevog acetata, 1 µl glikogena (Roche) i 2,5 volumena apsolutnog etanola. Nakon što se DNA precipitirala na

-80°C najmanje dva sata, uzorke sam centrifugirala 10 min pri 13000 rpm i 4°C. Dobivene taloge sam isprala u 70% etanolu, posušila i otopila u vodi. Otopljenoj DNA izmjerila sam koncentraciju i veličine fragmenata dobivenih sonikacijom provjerila sam agaroznom gel-elektroforezom. Svi uzorci imali su fragmente odgovarajućih veličina, pa sam sonicirani kromatin centrifugirala pet minuta pri 3320 *g* na 8°C da bih uklonila nečistoće, te ga zamrznula u tekućem dušiku i spremila na -80°C do upotrebe u svrhu kromatinske imunoprecipitacije. Kromatinsku imunoprecipitaciju napravila sam na sljedeći način: za jednu reakciju koristila sam 25 µg kromatina koji je razrijeđen 10 puta (da bi količina SDS-a bila 0.1%) u puferu za ChIP uz dodatak inhibitora proteaza (*cOmplete™ ULTRA Tablets, EDTA free*). U pripremljene kromatine dodala sam antitijela specifična za histonske modifikacije (H3K4me3 - 5 µg, ab1012, Abcam, Cambridge, UK; H3K27ac – 2 µg, ab4729, Abcam; H3K27me3 – 5 µg, ab6002, Abcam; H3K9ac – 3 µg, ab4441, Abcam; H3K9me3 – 2 µg, ab8898, Abcam). Antitijela specifična za histon H3 (3 µg, ab1791, Abcam) i IgG (5 µg, ab46540, Abcam) koristila sam kao pozitivnu i negativnu kontrolu. Pripremljene reakcije inkubirala sam na 4°C preko noći uz rotaciju. Sljedeći dan sam ih dodatno inkubirala 4h na 4°C uz rotaciju s magnetićima na koje je vezan protein G (Dynabeads™ Protein G for Immunoprecipitation, Invitrogen™). Ovi magnetići služe za odvajanje kompleksa antitijela i kromatina od ostalih komponenti reakcije, a odvajanje je moguće jer se između teških lanaca korištenih antitijela i proteina G stvaraju vrlo jake interakcije. Prije same inkubacije, 0,6 mg magnetića po reakciji isprala sam tri puta u 0,5% BSA u PBS-u (od engl. *bovine serum albumin*) i resuspendirala u 40 µl pufera za ChIP uz dodatak inhibitora proteaza. Nakon inkubacije s proteinom G, napravila sam četiri ispiranja u 1 ml pufera RIPA (50 mM HEPES pH 7,5, 1 mM EDTA, 0.7% natrijev deoksikolat, 1% NP-40, 0.5 M LiCl) i dva ispiranja u puferu TE (10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA). Nakon ispiranja, kromatin sam eluirala s magnetića s 200 µl pufera za eluciju (1% SDS, 100 mM $NaHCO_3$). Elucija je trajala 10 min uz rotaciju. Nakon elucije, na uzorcima sam napravila *reverse cross-linking*: inkubacija preko noći s 0,2 M NaCl pri 65°C i 500 rpm. Osim imunoprecipitiranih uzoraka, *reverse cross-linking* sam napravila i na kontrolnom uzorku kromatina (*input*, 2,5 µg) koji nije prošao proces imunoprecipitacije. Sljedeći dan sam na uzorcima napravila digestiju proteinazom K (4 µl proteinaze K, 4 µl 0.5 M EDTA i 8 µl 1 M Tris pH 6,5) 3 h pri 45°C i 500 rpm. Nakon digestije sam izolirala DNA upotrebom fenola i kloroforma prema prethodno navedenom postupku.

3.6.2. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnome vremenu nakon kromatinske imunoprecipitacije

Na imunoprecipitiranoj DNA napravila sam kvantitativni PCR u stvarnom vremenu u svrhu analize relativne količine histonskih oznaka u promotoru gena *BACH2*. Analizirala sam tri regije gena *BACH2* (Slika 11.), a kao kontrolu sam koristila gen *GAPDH* u kojem sam analizirala dvije regije.



Slika 11. Položaj fragmenata *BACH2-ChIP-1*, *BACH2-ChIP-2* i *BACH2-ChIP-3* u genu *BACH2*, u kojima je analizirana količina histonskih modifikacija karakterističnih za aktivni i utišani kromatin. Svi fragmenti nalaze se u promotoru gena *BACH2*. Treći fragment je unutar, a ostali fragmenti se nalaze uzvodno od CpG-otoka (zeleni pravokutnik). Slika je napravljena pomoću alata Blat u bazi UCSC.

Početnice za kvantitativni PCR dizajnirala sam upotrebom verzije ljudskog genoma hg19 i referentne sekvence gena NM_001170794 i provjerila njihovu kvalitetu (temperatura taljenja i stvaranje homo- i heterodimera) *in silico* u programu PerlPrimer. Osim takve provjere, efikasnost početnica sam provjerila i empirijski. Napravila sam qPCR na soniciranoj DNA koja je bila serijski razrijeđena (razrjeđenja 10x) i efikasnost početnica odredila prema nagibu dobivene standardne krivulje. Početnice koje nisu zadovoljile uvjete (efikasnost između 90 i 110 %) eliminirala sam iz daljnjih eksperimenata. Početnice koje sam koristila nakon kromatinske imunoprecipitacije i njihove sekvence prikazane su u Tablici 5. Kvantitativni PCR napravila sam upotrebom kemikalija Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) i 0,1 µM početnica u uređaju 7500 Fast Real-Time PCR System. Ukupni volumen reakcija bio je 10 µl, a sve reakcije napravila sam u tehničkim duplikatima. Obogaćenje pojedinom histonskom modifikacijom u analiziranim regijama prikazala sam kao % od kontrolnog uzorka (% od uzorka *input*) (164).

Tablica 5. Sekvence početnica za umnožavanje regija gena *GAPDH* i *BACH2* kvantitativnim PCR-om nakon kromatinske imunoprecipitacije. Ta = temperatura prianjanja početnica tijekom PCR-a.

Naziv amplikona	***Naziv početnice***	***Sekvenca***	***Ta/°C***
GAPDH-ChIP-1	*GAPDH-ChIP-F1*	*GACTTCCGCCCTCACGTCC*	*62*
	GAPDH-ChIP-R1	*CTCCCACAAAGGCACTCCTG*	
GAPDH-ChIP-2	*GAPDH-ChIP-F2*	*AAAAAAGCGGGGAGAAAGTAGGG*	*62*
	GAPDH-ChIP-R2	*AACAGGAGGAGCAGAGAGCGAAG*	
BACH2-ChIP-1	*BACH2-ChIP-F1*	*TTCCTTATCTGAAGGCCGGGT*	*62*
	BACH2-ChIP-R1	*CTGTGTGGAAAGCTAAGTGATGG*	
BACH2-ChIP-2	*BACH2-ChIP-F2*	*GGCTCCCGTAAAGTTATTGTGAATG*	*62*
	BACH2-ChIP-R2	*CCGGAACGCCCACACTCT*	
BACH2-ChIP-3	*BACH2-ChIP-F3*	*TGACAGGGCACTCACACGAC*	*62*
	BACH2-ChIP-R3	*TTTCAGGAGGACATTAAAAGCCAA*	

3.7. Analiza mjesta vezanja proteina BACH2 u stanicama NALM-6

3.7.1. Analiza *in silico* potencijalnih mjesta vezanja proteina BACH2

Protein BACH2 je transkripcijski faktor koji se veže na ciljane gene i utječe na njihovu ekspresiju. Najbolje istražena uloga tog proteina je utišavanje ekspresije gena *PRDM1* vezanjem za njegov promotor, u B-limfocitima. U ovom istraživanju željela sam utvrditi veže li se protein BACH2 na gene koji su GWA-studijama povezani s glikozilacijom IgG-a. Prvo sam napravila analizu *in silico* da bih utvrdila potencijalna vezna mjesta unutar dvije tisuće parova baza uzvodno od mjesta početka transkripcije tih gena. Analiza je napravljena upotrebom paketa MotifDb u program R i baze podataka HOMER i JASPAR, te podataka od Jolme i suradnika (165). Za analizu su korištene sljedeće matrice motiva vezanja (PWM, od engl. *position-weigth matrix*): ljudski AP1 (Hsapiens-JASPAR_CORE-AP1-MA0099.2), ljudski NFE2 (Hsapiens-jolma2013-NFE2), mišji Bach1 (Mmusculus-JASPAR_2014-Bach1::Mafk-MA0591.1) i ljudski BACH2 (Bach2(bZIP)/OCILy7-Bach2-ChIP-Seq(GSE44420)/Homer). Granična vrijednost za motive bila je 80 %, te su za daljnju analizu izabrane regije s tom ili većom vrijednosti.

3.7.2. Kromatinska imunoprecipitacija

Da bih istražila na koja mjesta u genomu stanica NALM-6 se veže protein BACH2, napravila sam kromatinsku imunoprecipitaciju s antitijelom specifičnim za BACH2. Stanice sam uzgajala u prethodno navedenim uvjetima u dvije vremenske točke. Nakon uzgoja dovoljnog broja stanice sam fiksirala 1%-tnim formaldehidom, lizirala u puferu za lizu i sonicirala prema

protokolu navedenom u stavku 3.5.1. Uspješnost sonikacije provjerila sam prema prethodno navedenom protokolu i kromatine pohranila na -80°C do upotrebe u kromatinskoj imunoprecipitaciji. Eksperiment sam napravila u dvije biološke replike i unutar svake replike imala sam devet uzoraka koje sam na kraju eksperimenta spojila u jedan, da bih imala dovoljnu količinu DNA za daljnje analize. U svakom uzorku napravila sam imunoprecipitaciju 100 µg kromatina s antitijelom specifičnim za protein BACH2. Kromatin sam razrijedila 10 puta u puferu za ChIP uz dodatak inhibitora proteaza i inkubirala s antitijelom specifičnim za BACH2 (10 µl, BACH2 (D3T3G), #80775, Cell Signaling Technology, Leiden, Nizozemska) ili antitijelom specifičnim za IgG (10 µg, ab46540, Abcam) preko noći na 4°C uz rotaciju. Sljedeći dan sam uzorke inkubirala 4 h pri 4°C uz rotaciju s magnetićima s proteinom G, koje sam pripremila kao što je prethodno opisano, s tim da sam za jednu reakciju koristila 0,99 mg magnetića. Nakon inkubacije sam uzorke isprala dva puta u 1 ml pufera 150 (50 mM HEPES pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,1% natrijev deoksikolat, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl), dva puta u 1 ml pufera RIPA 150 (50 mM HEPES pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,7% natrijev deoksikolat, 1% NP-40, 150 mM LiCl), jednom u 1 ml pufera RIPA 300 (50 mM HEPES pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,7% natrijev deoksikolat, 1% NP-40, 300 mM LiCl) i dva puta u 1 ml pufera TE. Zatim sam pročišćene imunokomplekse eluirala dva puta s 200 µl pufera za eluciju. Svako eluiranje trajalo je 10 min uz rotaciju. Nakon elucije napravila sam *reverse cross-linking* i izolaciju DNA prema prethodno opisanom protokolu. Osim imunoprecipitiranih uzoraka, *reverse cross-linking* i izolaciju DNA napravila sam i na kontrolnom uzorku kromatina (uzorak *input*, 9 µg) koji nije prošao proces imunoprecipitacije.

3.7.3. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnome vremenu

Za potvrdu uspješnosti metode kromatinske imunoprecipitacije u kojoj sam željela vidjeti na koja mjesta u genomu se veže protein BACH2, napravila sam kvantitativni PCR koristeći imunoprecipitiranu DNA i DNA koja nije prošla imunoprecipitaciju. Iz literature je poznato da se protein BACH2 veže na promotor gena *PRDM1* u B-limfocitima i da se ne veže na gen *GAPDH* u istom tipu stanica, pa sam ta dva gena odabrala kao kontrole. U kvantitativnom PCR-u koristila sam kemiju Sybr® Green prema već navedenom protokolu i početnice specifične za navedene gene čije sekvence su prikazane u Tablici 6. Početnice za gen *PRDM1* preuzela sam od Huang i suradnika (166), a za gen *GAPDH* koristila sam iste početnice kao i u eksperimentu kromatinske imunoprecipitacije za analizu histonskih modifikacija. Rezultate dobivene qPCR-om analizirala sam na isti način kao i kod analize histonskih modifikacija.

Tablica 6. Sekvence početnica za umnožavanje regija gena *GAPDH* i *PRDM1* kvantitativnim PCR-om nakon kromatinske imunoprecipitacije. Ta = temperatura prianjanja početnica tijekom PCR-a.

Naziv amplikona	***Naziv početnice***	***Sekvenca***	***Ta/°C***
GAPDH	*GAPDH_qChIP_F1*	*GACTTCCGCCCTCACGTCC*	*62*
	GAPDH_qChIP_R1	*CTCCCACAAAGGCACTCCTG*	
PRDM1	*Prdm1prof(B1)F*	*GGCCAGCCTTCAGTATGACTAC*	*62*
	Prdm1prof(B1)R	*GCCTGCTCAAGAGGGTTTATTA*	

3.7.4. Sekvenciranje nakon kromatinske imunoprecipitacije

Uzorci DNA dobiveni imunoprecipitacijom pomoću antitijela specifičnog za protein BACH2 i uzorci koji nisu prošli proces imunoprecipitacije sekvencirani su da bi se utvrdile sve regije u genomu na koje je vezan protein BACH2. Sekvenciranje je napravljeno na platformi Illumina HiSeq 2000 u servisu laboratorija EMBL Genomics Core Facilities iz Heidelberga, Njemačka. Očitani sljedovi dobiveni sekvenciranjem filtrirani su na temelju kvalitete uz pomoć programa FastQC. Filtrirani očitani sljedovi sravnjeni su na referentni ljudski genom (verzija hg38) uz pomoć programa BBMap, te su zatim korišteni za određivanje mjesta obogaćenih za vezanje koristeći modul *callpeak* u programu MACS2. Genomske koordinate gena preuzete su iz knowGene tablice u bazi podataka *UCSC Genome Browser* te je određena najmanja udaljenost od svakog gena do najbližeg mjesta obogaćenog za vezanje proteina BACH2.

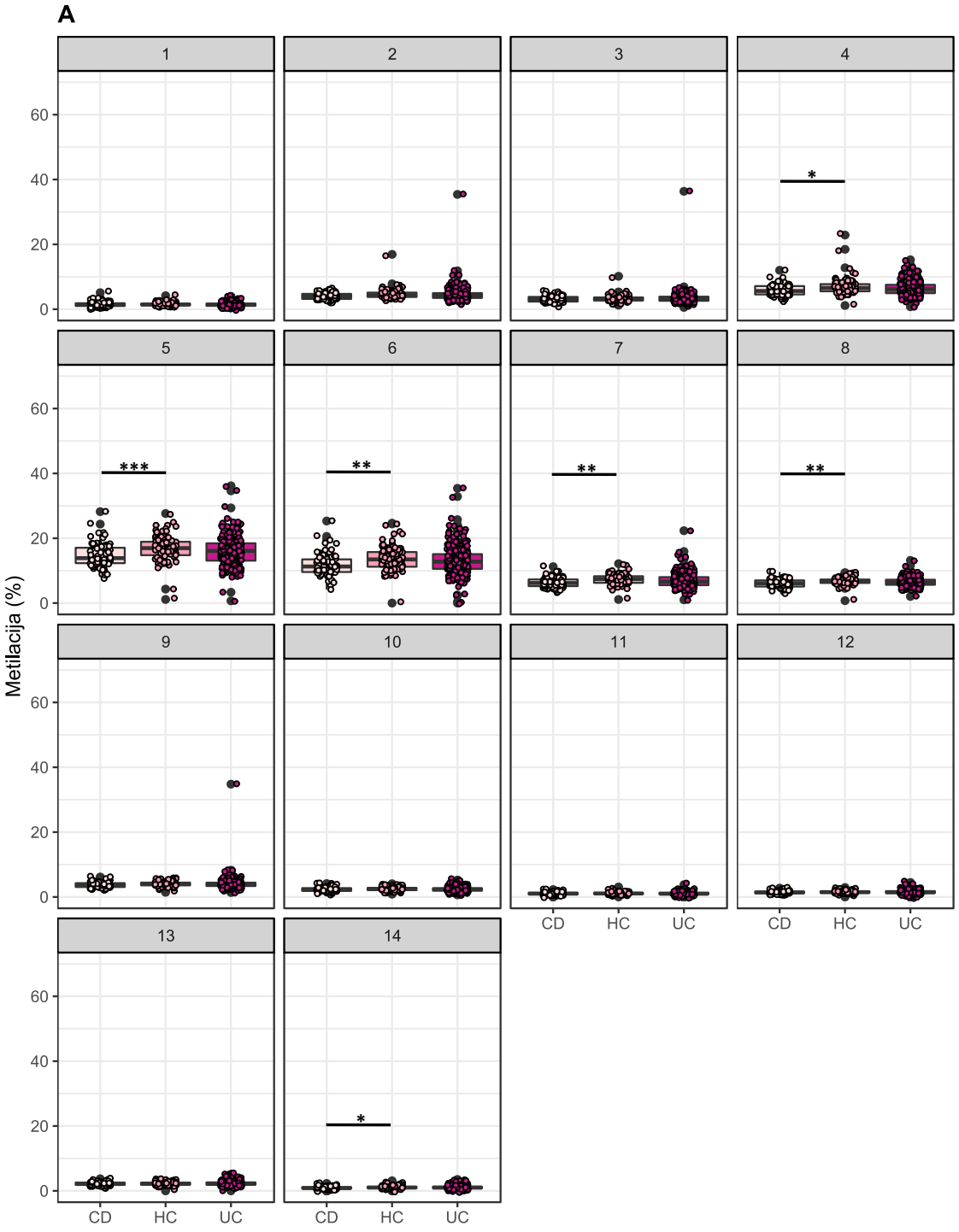
3.8. Statistička analiza

Sve statističke analize napravila sam u programu *Statistica* (verzija 13.1). Podatke stupnja metilacije fragmenta *BACH2-2* u krvi i B-limfocitima $CD19^+$ analizirala sam Mann-Whitney U-testom i na dobivenim *p* vrijednostima napravila Bonferronijevu korekciju za višestruko testiranje (14 testiranja). Iz svih analiza izbacila sam vrijednosti metilacije koje nisu prošle kontrolu kvalitete nakon pirosekvenciranja. Dobivene rezultate prikazala sam u obliku grafova koje sam napravila u programu R upotrebom paketa ggplot2. Ostale podatke prikazala sam kao aritmetičku sredinu dvije ili tri replike, a odstupanje od aritmetičke sredine u obliku standardne devijacije. Statističke značajnosti također sam odredila Mann-Whitney U-testom i *p* vrijednosti manje od 0,05 uzela sam kao statistički značajne. Za određivanje korelacija napravila sam Pearsonovu korelaciju. Statistički značajne korelacije su bile one s *p* vrijednosti manjom od 0,01. Analize i prikazi su napravljeni u programu R upotrebom paketa „corrplot“.

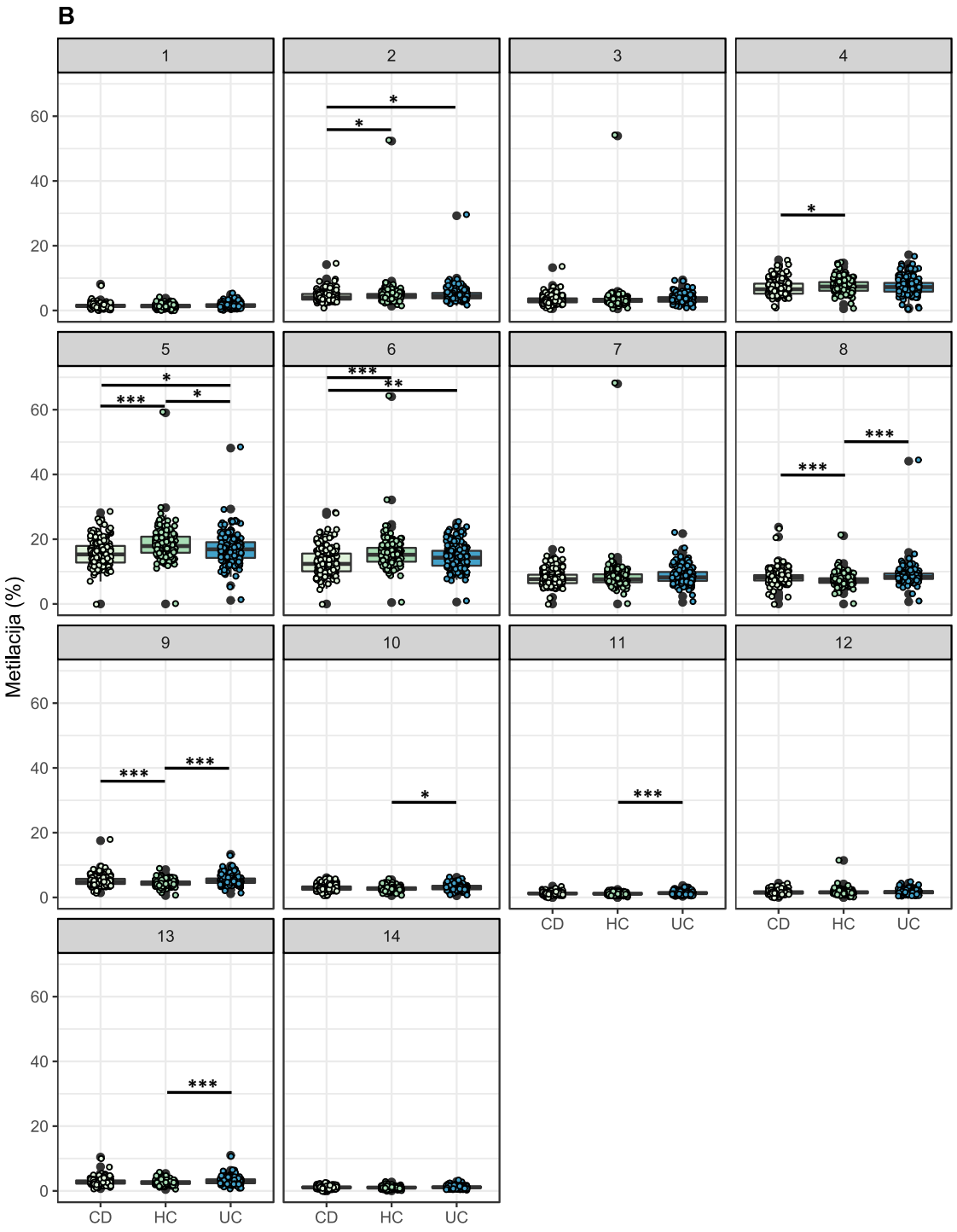
4. REZULTATI

4.1. Promjene metilacije unutar gena *BACH2* u upalnim bolestima crijeva

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti dolazi li do promjena CpG-metilacije unutar promotora i CpG-otoka gena *BACH2,* kojeg je GWA-studija prethodno povezala s upalnim bolestima crijeva i glikozilacijom IgG-a. U tu svrhu sam dizajnirala pet testova za analizu metilacije DNA upotrebom bisulfitnog pirosekvenciranja (Slika 9.). Analizirala sam metilaciju na ukupno 47 CpG-mjesta (21 CpG-mjesto smješteno u promotoru, 1 CpG-mjesto u prvom eksonu i 25 CpG-mjesta smještena u prvom intronu) u DNA izoliranoj iz krvi pacijenata i zdravih ljudi iz kohorte Edinburgh. Statističkim analizama utvrdila sam da unutar fragmenta *BACH2-2* dolazi do značajne hipometilacije u pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti i to na četvrtom (p=0,01022), petom (p=0,00018), šestom (p=0,00994), sedmom (p=0,00994), osmom (p=0,00649) i četrnaestom (p=0,01969) CpG-mjestu (Slika 12A.). Kod pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa nema značajnih promjena metilacije (Slika 12A.). U istoj regiji unutar gena *BACH2* dolazi do značajne hipometilacije i u pacijenata s Crohnovom bolesti iz druge neovisne kohorte (Firenca) i to na četvrtom (p=0,01548), petom (p=0) i šestom (p=0) CpG-mjestu (Slika 12B.). U kohorti Firenca nije replicirana hipometilacija sedmog i osmog CpG-mjesta koja je utvrđena u kohorti Edinburgh. Pacijenti oboljeli od Crohnove bolesti u kohorti Firenca imaju značajno povećanu metilaciju na osmom (p=0) i devetom (p=0,00027), te značajnu hipometilaciju drugog CpG-mjesta (p=0,03805) (Slika 12B). Kod pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa dolazi do značajne hipometilacije petog (p=0,01086) i hipermetilacije osmog (p=0), devetog (p=0), desetog (p=0,01883), jedanaestog (p=0,00001) i trinaestog (p=0,00050) CpG-dinukleotida (Slika 12B.). U kohorti Edinburgh nema statistički značajnih razlika u metilaciji između pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti i onih koji boluju od ulceroznog kolitisa, a u kohorti Firenca postoji značajna razlika na drugom (p=0,01897), petom (p=0,02906) i šestom CpG-mjestu (p=0,00456) – vrijednosti metilacije su niže u pacijenata s Crohnovom bolesti.



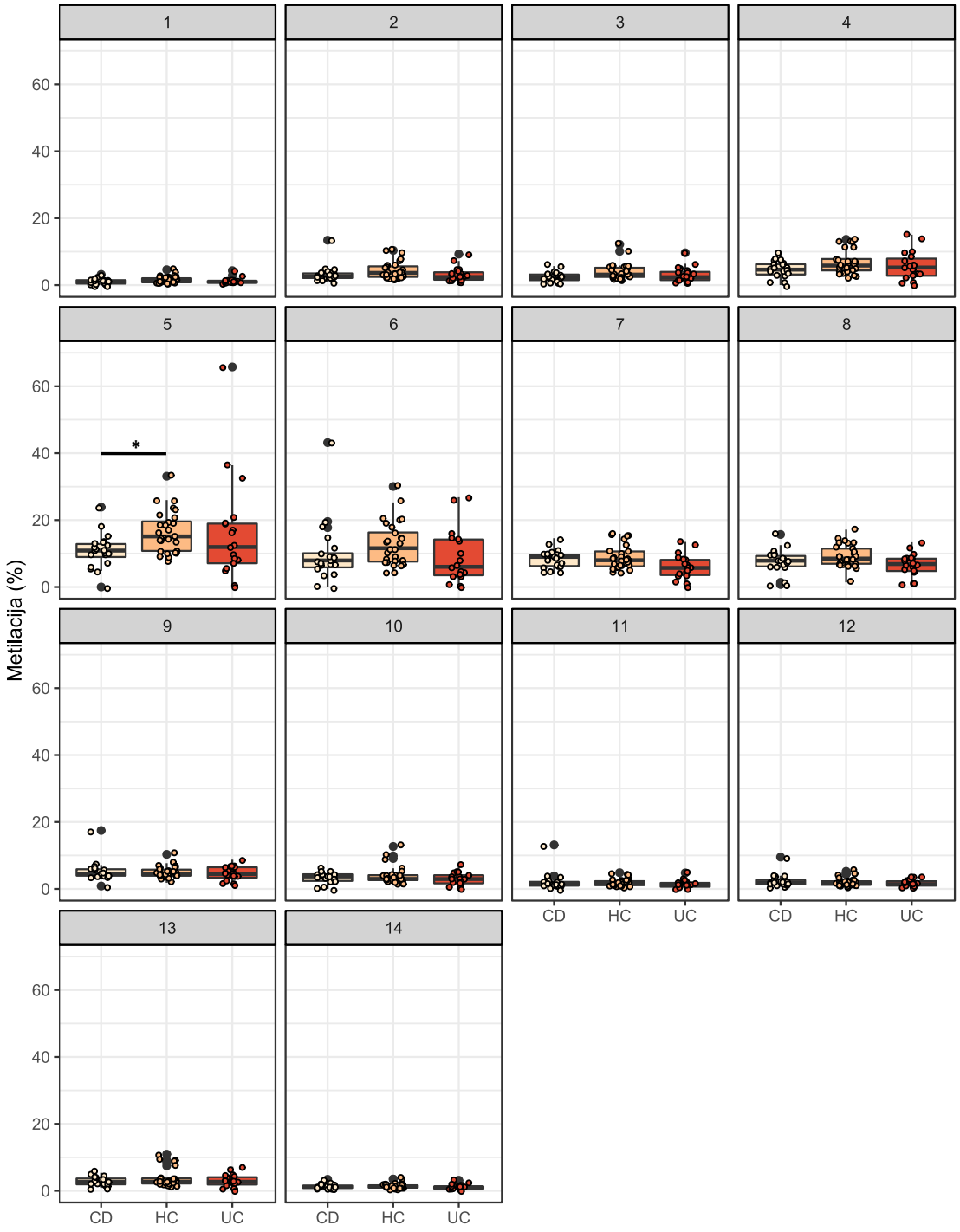
Slika 12. Opis slike na sljedećoj stranici.



Slika 12. Opis slike na sljedećoj stranici.

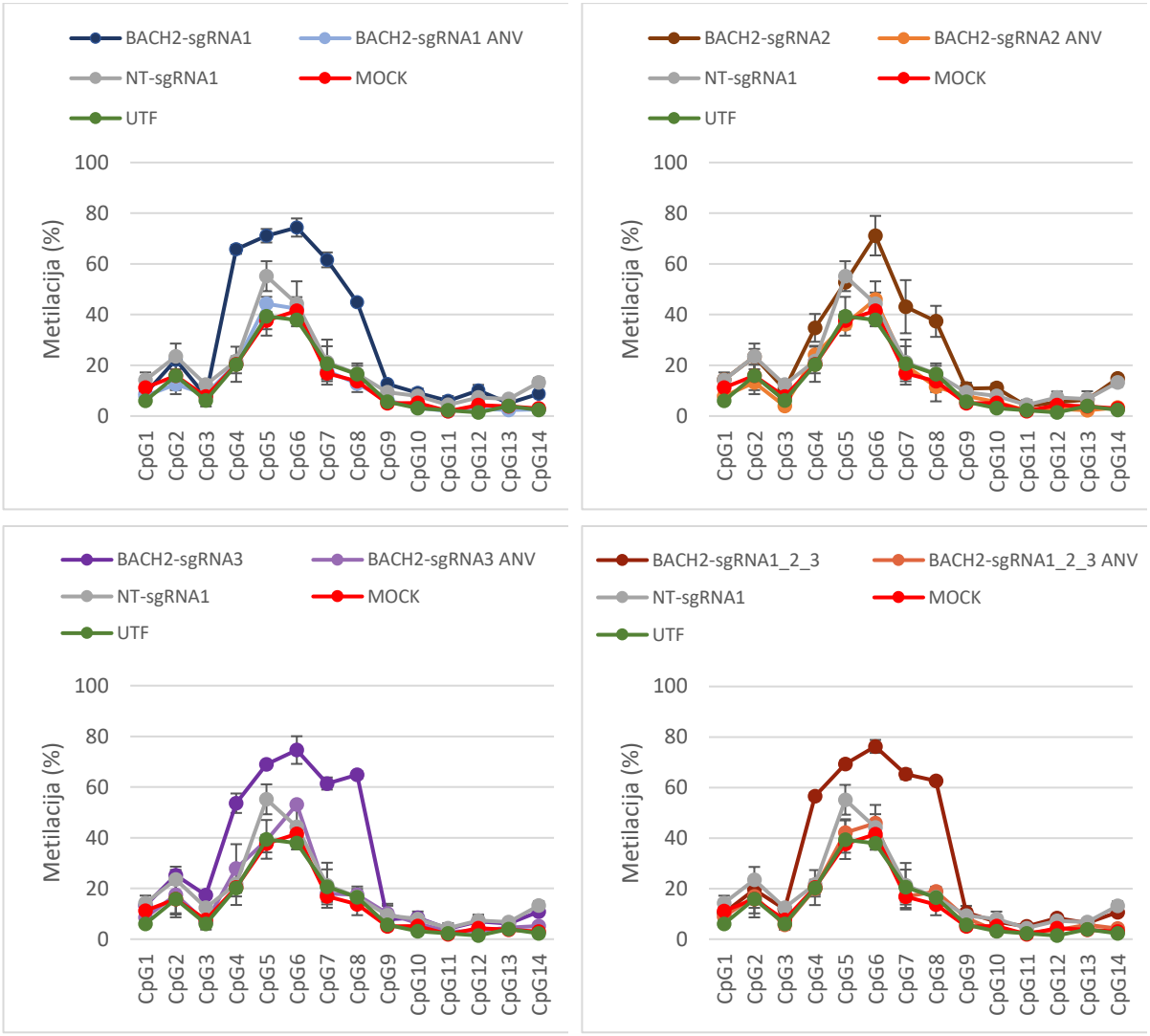
Slika 12. Metilacija CpG-dinukleotida unutar fragmenta *BACH2-2* analizirana iz pune krvi pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva u kohorti Edinburgh (A) i Firenca (B). Stupanj metilacije određen je bisulfitnim pirosekvenciranjem, a skupine ispitanika uspoređene su upotrebom Mann-Whitney U-testa i Bonferronijeve korekcije za višestruko testiranje. U obje kohorte dolazi do značajnog smanjenja metilacije četvrtog, petog i šestog CpG-mjesta kod pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti, dok ostale razlike nisu statistički značajne u obje kohorte. Statistički značajne razlike između skupina označene su na grafovima. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. CD – Crohnova bolest, HC – zdravi ljudi, UC – ulcerozni kolitis.

Osim analize CpG-metilacije gena *BACH2* iz izolata DNA iz pune krvi, CpG-metilaciju sam analizirala i iz izolata DNA iz B-limfocita $CD19^+$. Ovu sam analizu napravila na manjem broju pacijenata iz kohorte Edinburgh (Tablica 2.). U ovom tipu stanica krvi dolazi do značajne hipometilacije samo na petom CpG-mjestu u Crohnovoj bolesti u odnosu na zdrave ljude (p=0,03518, Slika 13).



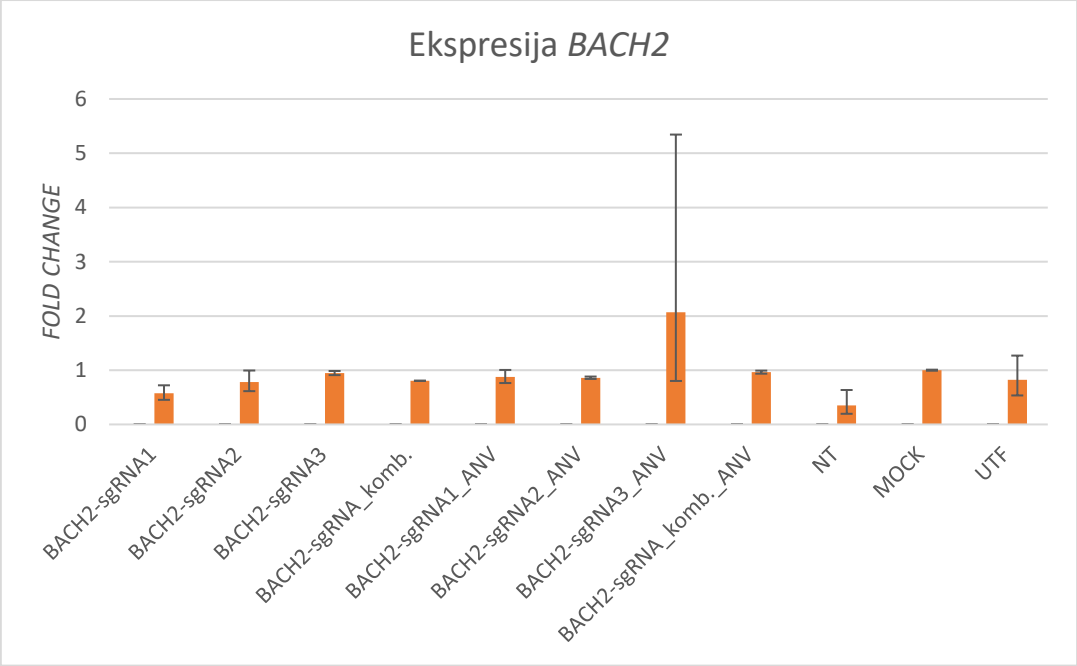
Slika 13. Metilacija CpG-dinukleotida unutar fragmenta *BACH2-2* analizirana iz B-limfocita CD19^{+} pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva kohorte Edinburgh. Stupanj metilacije određen je bisulfitnim pirosekvenciranjem, a skupine ispitanika uspoređene su upotrebom Mann-Whitney U-testa i Bonferronijeve korekcije za višestruko testiranje. Značajna promjena metilacije vidljiva je na petom CpG-mjestu, gdje dolazi do hipometilacije u Crohnovoj bolesti u odnosu na zdrave ljude. Statistički značajna razlika između skupina označena je na grafu: * $p<0,05$; CD – Crohnova bolest, HC – zdravi ljudi, UC – ulcerozni kolitis.

S obzirom da sam utvrdila promjene u stupnju metilacije unutar gena *BACH2* u pacijentima s upalnim bolestima crijeva u odnosu na zdrave ljude željela sam utvrditi jesu li navedena CpG-mjesta bitna za regulaciju ekspresije ovog gena. Stoga sam upotrijebila molekularni alat CRISPR/dCas9-DNMT3A kojim sam modulirala stupanj metilacije unutar fragmenta *BACH2-2* u staničnoj liniji HEK293. Fuzijski protein dCas9-DNMT3A za ciljanu metilaciju citozina navela sam na specifična CpG-mjesta unutar fragmenta *BACH2-2* upotrebom tri različite molekule sgRNA. Također, stanice HEK293 sam ko-transfecirala s dCas9-DNMT3A i kombinacije sve tri molekule sgRNA. Iz transfeciranih i selekcijom izdvojenih stanica izolirala sam DNA i RNA, te odredila stupanj metilacije i ekspresiju gena *BACH2*. U oba slučaja, transfekcijom s pojedinačnim molekulama sgRNA kao i njihovom kombinacijom, postignuta je ciljana CpG-metilacija pomoću alata dCas9-DNMT3A. Najveći stupanj metilacije (30 do 50 %) postignut je između četvrtog i osmog CpG-mjesta (Slika 14.). Vezanje molekula sgRNA 1 i sgRNA 2 se djelomično preklapa, a efikasnost povećanja stupnja metilacije bolja je upotrebom sgRNA1. Molekula sgRNA 3 veže se nizvodno od analiziranih CpG-mjesta i u obrnutoj orijentaciji, ali efikasnost dodavanja metilne skupine na analizirane CpG-dinukleotide vrlo je slična kao i upotrebom sgRNA 1. Kombinacija svih triju molekula sgRNA daje vrlo sličan porast stupnja metilacije kao i upotreba pojedinačnih molekula sgRNA 1 i sgRNA 3 (Slika 14.). U transfeciranim stanicama nije došlo do povećanja stupnja metilacije CpG-mjesta koja se nalaze unutar veznih mjesta za molekule sgRNA. Također, u stanicama koje su transfecirane s dCas9-DNMT3A i molekulom sgRNA NT nije došlo do značajnog porasta u CpG-metilaciji unutar fragmenta *BACH2-2*, osim na petom CpG-mjestu gdje se metilacija povećala za 18 % u odnosu na *mock*-transfekciju, ali povećanje nije bilo značajno kao u stanicama transfeciranim s dCas9-DNMT3A za ciljanu metilaciju gena *BACH2*. Stanice u kojima je eksprimiran fuzijski protein s inaktivnom katalitičkom domenom DNMT3A također nisu pokazale promjenu metilacije u analiziranom dijelu gena *BACH2* (Slika 14.).



Slika 14. Ciljana metilacija gena *BACH2* upotrebom fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A u stanicama HEK293. Navođenjem pojedinačnim (BACH2-sgRNA1, BACH2-sgRNA2 i BACH2-sgRNA3) te kombinacijom sve tri molekula sgRNA (BACH2-sgRNA1_2_3) dolazi do povećanja metilacije od četvrtog do osmog CpG-mjesta unutar fragmenta *BACH2-2* u odnosu na ciljanje inaktivnim proteinom DNMT3A (BACH2-sgRNA1 ANV, BACH2-sgRNA2 ANV, BACH2-sgRNA3 ANV i BACH2-sgRNA1_2_3 ANV), transfekciju bez DNA (MOCK), netransfecirane stanice (UTF) te stanice transfecirane s molekulom sgRNA za koju ne postoji ciljano mjesto u genomu (NT-sgRNA1).

Ekspresiju gena *BACH2* analizirala sam upotrebom hidrolizirajućih TaqMan® proba metodom kvantitativnog PCR-a. Nakon analize relativne ekspresije (u odnosu na endogenu kontrolu – gen *HPRT1*), ustanovila sam da nakon ciljane metilacije navedene regije nije došlo do statistički značajnih promjena ekspresije (Slika 15.).

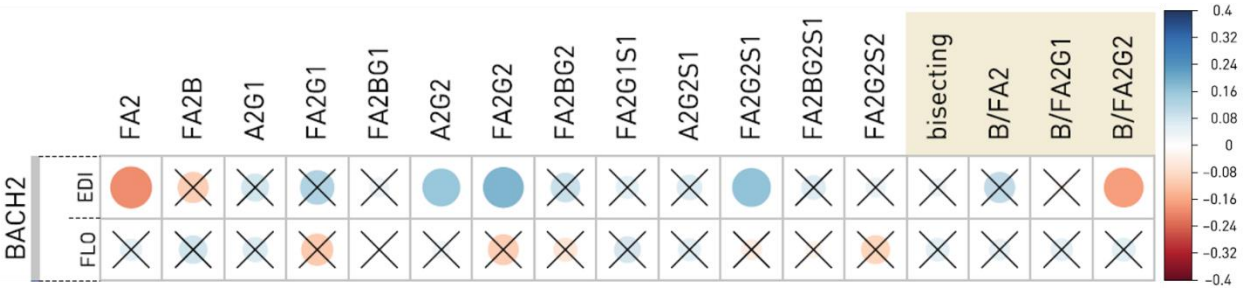


Slika 15. Ekspresija gena *BACH2* nakon ciljane metilacije unutar fragmenta *BACH2-2*, upotrebom fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A u stanicama HEK293. Nakon ciljane metilacije navođenjem pojedinačnim (BACH2-sgRNA1, BACH2-sgRNA2 i BACH2-sgRNA3) te kombinacijom sve tri molekula sgRNA (BACH2-sgRNA_komb.) ne dolazi do značajne promjene ekspresije u odnosu na ciljanje inaktivnim proteinom DNMT3A (BACH2-sgRNA1_ANV, BACH2-sgRNA2_ANV, BACH2-sgRNA3_ANV i BACH2-sgRNA_komb._ANV), transfekciju bez DNA (MOCK), netransfecirane stanice (UTF) te stanice transfecirane s molekulom sgRNA za koju ne postoji ciljano mjesto u genomu (NT). Promjena ekspresije (od engl. *fold change*) izražena je u odnosu na transfekciju bez DNA. Prikazane su srednje vrijednosti dviju replika i njihove standardne devijacije.

4.2. Povezanost metilacije gena *BACH2* i glikozilacije IgG-a u upalnim bolestima crijeva

GWA-studija povezala je nekoliko lokusa s glikozilacijom IgG-a i upalnim bolestima crijeva i jedan od tih lokusa je *BACH2*. Ovaj gen kodira za proizvodnju transkripcijskog faktora odgovornog za aktivaciju, dozrijevanje i diferencijaciju B-limfocita. Međutim, točna uloga proteina BACH2 u procesu glikozilacije IgG-a, te način na koji je ovaj gen uključen u upalne bolesti crijeva nisu poznati. Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je ispitati povezanost promjena metilacije gena *BACH2* i promjena glikanskih struktura na imunoglobulinu G u

upalnim bolestima crijeva. U krvi istih pacijenata dviju velikih kohorti u kojima sam analizirala metilaciju fragmenta *BACH2-2* analizirana je i glikozilacija molekula IgG-a izoliranih iz seruma (22,23). Podaci metilacije i glikozilacije analizirani su metodom Pearsonove korelacije i dobiveni rezultati prikazani su na Slici 16. Statistički značajne no vrlo slabe korelacije uočene su u kohorti Edinburgh, no isti rezultat nije repliciran u kohorti Firenca. Negativna korelacija uočena je između CpG-metilacije i jednostavne glikanske strukture sa sržnom fukozom (FA2), te CpG-metilacije i omjera račvajućeg N-acetilglukozamina i strukture s dvije galaktoze i sržnom fukozom (B/FA2G2). Također je ustanovljena i pozitivna korelacija CpG-metilacije i glikanske strukture s dvije galaktoze sa ili bez sržne fukoze (FA2G2 i A2G2, Slika 16.).

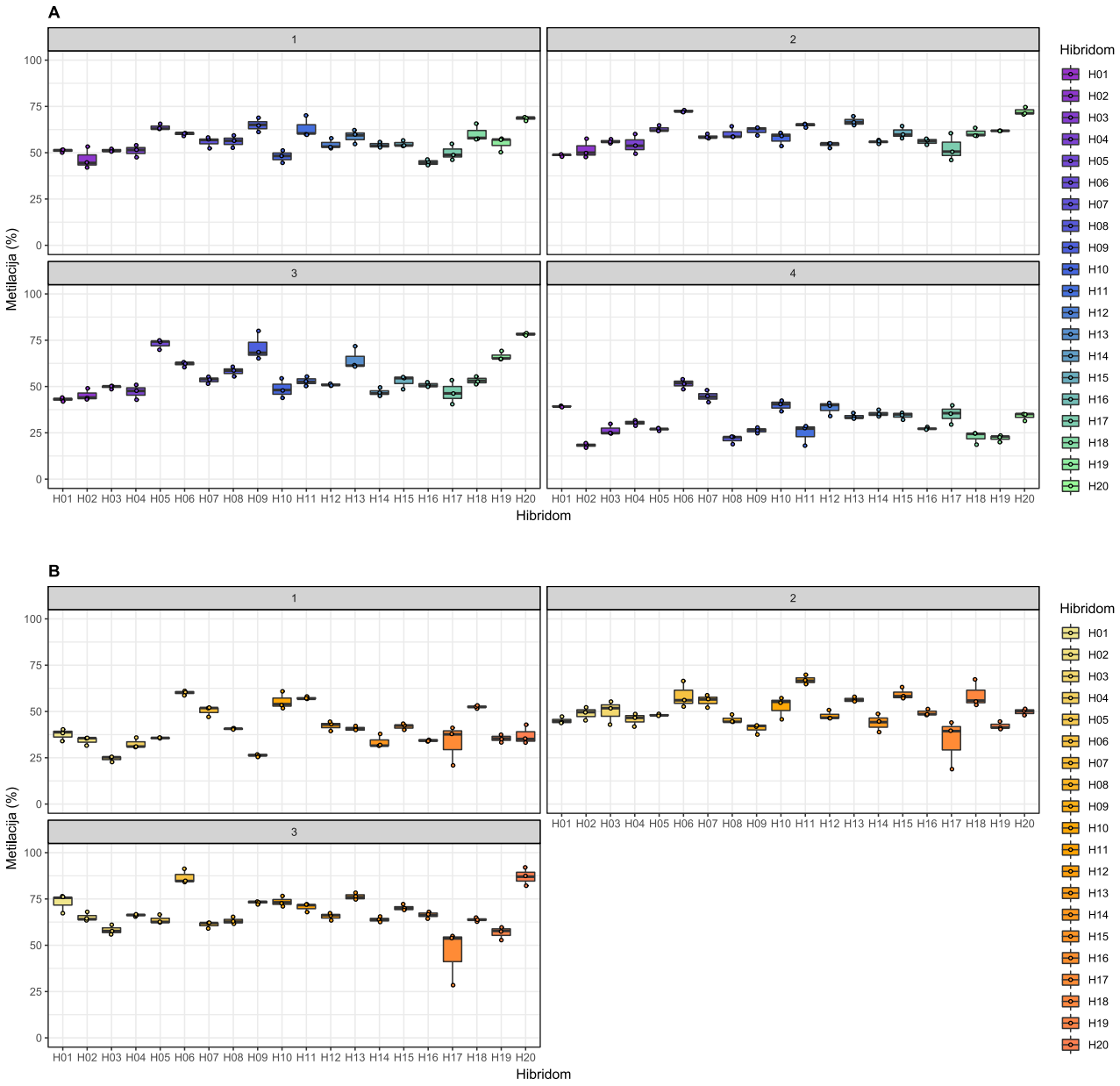


Slika 16. Analiza korelacija između CpG-metilacije gena *BACH2* i glikanskih struktura na molekulama IgG-a izoliranih iz krvi ispitanika. U kolonama je prikazano 13 individualnih glikanskih struktura i četiri derivirana obilježja. Plavom bojom prikazane su pozitivne, a crvenom negativne korelacije. Veličine krugova i nijanse boja proporcionalne su korelacijskom koeficijentu. Korelacije koje nisu statistički značajne su prekrižene. EDI – Edinburgh, FLO – Firenca.

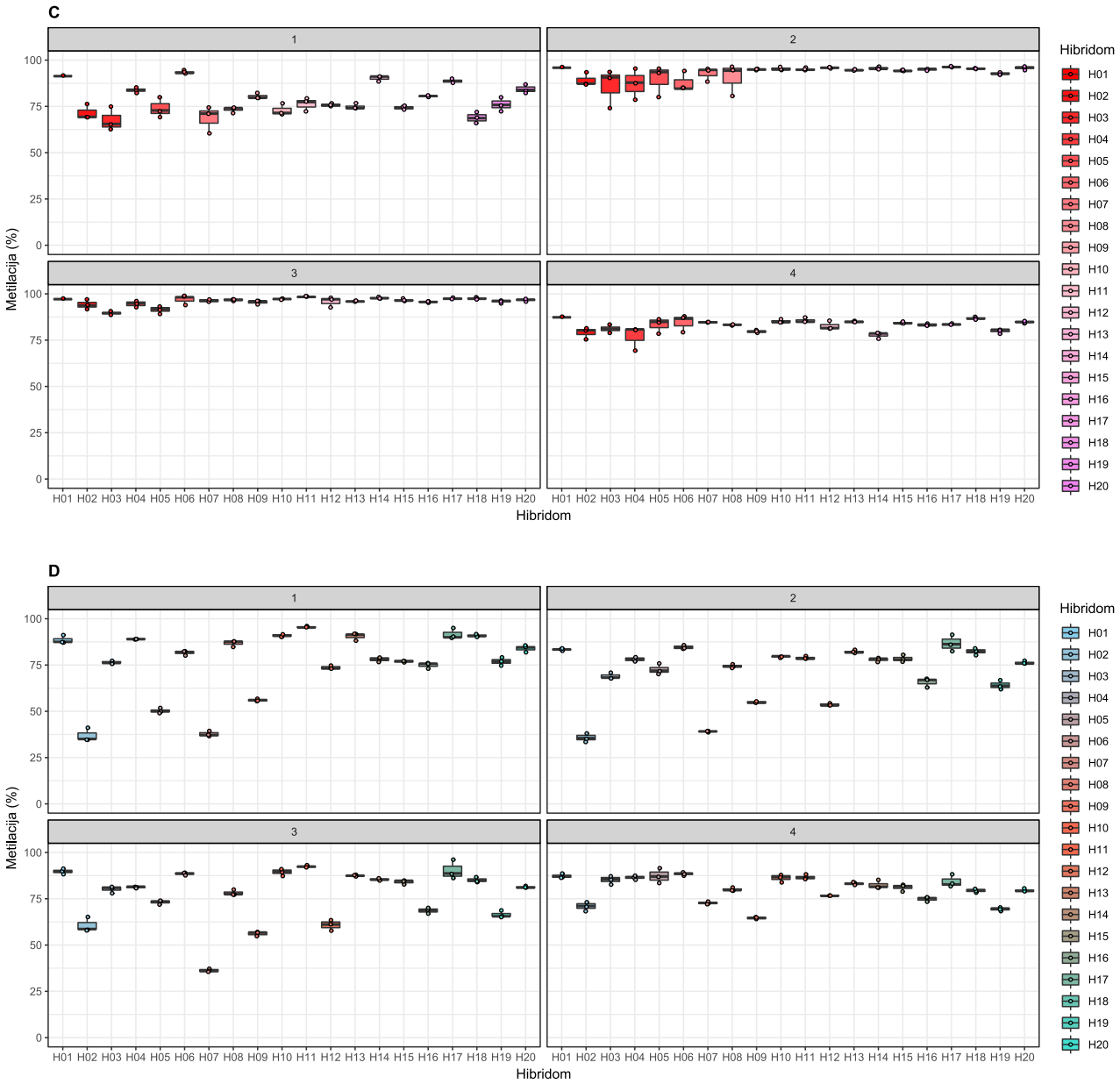
4.3. Metilacija i ekspresija gena *Bach2* povezane su s različitim glikanskim profilom IgG-a u mišjim stanicama hibridoma

Mišje stanice hibridoma koriste se za proizvodnju monoklonalnih antitijela IgG-a specifičnih za određeni antigen. Analiza glikozilacije IgG-a iz 20 različitih klonova hibridoma pokazala je da antitijela specifična za određeni antigen imaju različite uzorke glikozilacije (odnosno različite količine glikanskih struktura) na konzerviranom glikozilacijskom mjestu unutar konstantne regije (Genos Glycoscience, neobjavljeni rezultati). S obzirom na to da sam u ljudskim B-limfocitima $CD19^+$ utvrdila promjenu metilacije gena *BACH2*, željela sam istražiti pokazuju li klonovi hibridoma, specifični za određeni antigen, istu ili različitu metilaciju i ekspresiju gena *Bach2* te postoje li korelacije metilacije i ekspresije s određenim glikanskim

strukturama. U tu svrhu razvila sam četiri testa za analizu metilacije gena *Bach2* (Slika 10.), od kojih se dva nalaze u promotoru gena i sadrže ukupno sedam CpG-mjesta, jedan u prvom intronu s ukupno četiri CpG-mjesta i jedan u drugom intronu anotiranog transkripta Uc012dbf.1 (četiri CpG-mjesta). Stupanj metilacije sam izmjerila na 15 CpG-mjesta koja su pokrivena s četiri testa. Analiza je napravljena na 20 različitih klonova hibridoma (H01-H20), u tri vremenske točke. U svim klonovima i na svim CpG-mjestima metilacija se stabilno održava kroz vrijeme, ali se razlikuje između klonova. U promotoru anotiranog transkripta Uc012dbf.1 sedam CpG-mjesta pokazuju velike razlike u stupnju metilacije, koji varira od 17 % do 91 % (Slika 17A. i Slika 17B.). Stupanj metilacija četiri CpG-mjesta unutar prvog introna manje je varijabilan – kreće se od 60 % do 98 % (Slika 17C.). Metilacija četiri CpG-mjesta unutar drugog introna, odnosno promotora anotiranog transkripta Uc012dbg.1, također pokazuje veliku varijabilnost između klonova – u nekim klonovima stupanj metilacije iznosi oko 33 %, dok u nekima iznosi oko 96 % (Slika 17D.).



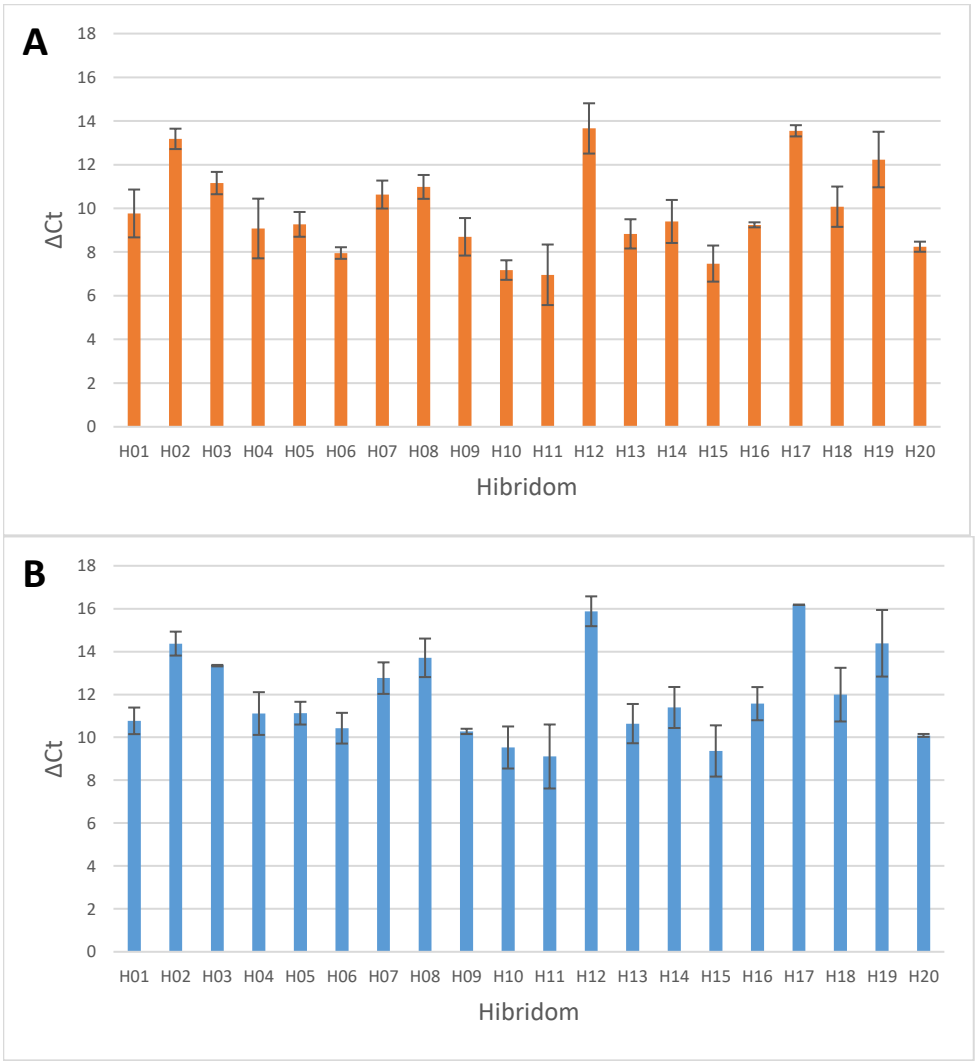
Slika 17. Opis slike na sljedećoj stranici.



Slika 17. Metilacija gena *Bach2* u klonovima hibridoma stanica. Metilacija je analizirana unutar četiri metilacijska testa upotrebom bisulfitnog pirosekvenciranja. Analizirano je ukupno 20 klonova hibridoma (H01-H20), koji su specifični za određeni antigen, u tri vremenske točke. Na slici su prikazani rezultati stupnja metilacije na četiri CpG-mjesta unutar fragmenta *Bach2-1* (A), na tri CpG-mjesta u fragmentu *Bach2-2* (B), te na četiri CpG-mjesta unutar fragmenta *Bach2-3* (C), te isto toliko CpG-mjesta unutar fragmenta *Bach2-4* (D).

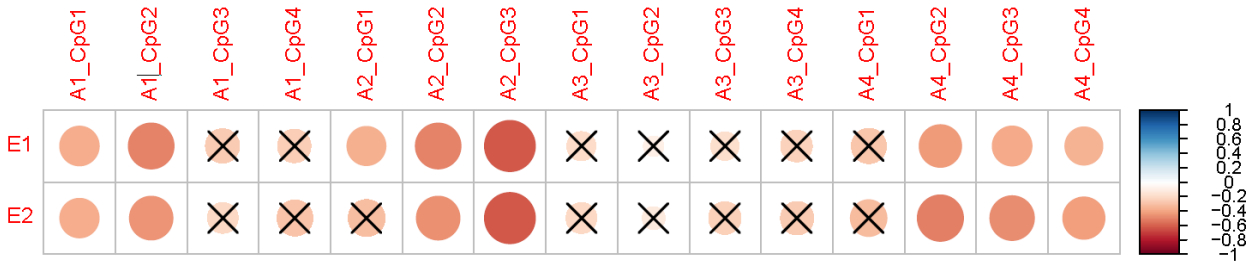
U istim klonovima hibridoma, u tri vremenske točke, analizirala sam i ekspresiju gena *Bach2* metodom kvantitativnog PCR-a. Analizu sam napravila upotrebom dvije hidrolizirajuće

TaqMan® probe te sam kao endogenu kontrolu koristila sam gen *Hprt*. Proba Mm00464379_m1 nalazi se na granici četvrtog i petog eksona transkripta NM_001109661.1 (transkript Uc012dbg.1), a proba Mm01212378_m1 na granici prvog i drugog eksona transkripta Uc012dbg.1 i na granici trećeg i četvrtog eksona transkripta Uc012dbf.1. Svi klonovi pokazali su različitu ekspresiju gena *Bach2* koja je vrlo niska u odnosu na gen *Hprt*, što je vidljivo iz vrijednosti ΔCt koje su veće od 6 te se penju do 16. U svim klonovima detektirano je više transkripata koji se umnožavaju prvom probom (Slika 18A. i Slika 18B.).



Slika 18. Ekspresija gena *Bach2* u 20 staničnih linija hibridoma. Analiza je napravljena upotrebom TaqMan® proba Mm00464379_m1 (A) i Mm01212378_m1 (B). Razina ekspresije prikazana je u obliku vrijednosti ΔCt, koja označava relativnu ekspresiju u odnosu na kontrolni gen *Hprt*. Prikazana je srednja vrijednost dobivenih vrijednosti ΔCt triju bioloških replika klonova i njihove standardne devijacije.

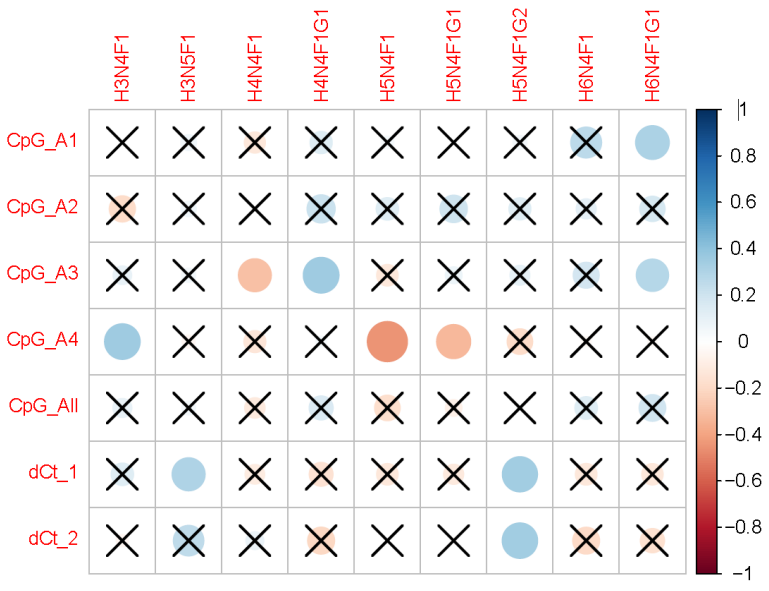
S obzirom da je metilacija DNA jedan od epigenetičkih mehanizama uključenih u regulaciju ekspresije gena, napravila sam Pearsonovu korelaciju CpG-metilacije i ekspresije gena *Bach2*. Korelirani su podatci svih analiziranih CpG-mjesta unutar četiri metilacijska testa i vrijednosti ΔCt dobivene upotrebom dvije različite probe. Unutar fragmenta *Bach2-1* (A1), stupanj metilacije prvog i drugog CpG-mjesta negativno korelira s vrijednostima ΔCt, dobivenim upotrebom obje TaqMan ® probe (E1 i E2) - što je stupanj CpG-metilacije viši, i ekspresija gena *Bach2* je viša. Ista situacija zabilježena je i na drugom i trećem CpG-mjestu unutar fragmenta *Bach2-2* (A2), te na drugom, trećem i četvrtom CpG-mjestu unutar fragmenta *Bach2-4* (A4). Metilacija unutar fragmenta *Bach2-3* (A3) nije statistički značajno povezana s ekspresijom gena *Bach2* (Slika 19.).



Slika 19. Analiza korelacija između CpG-metilacije i ekspresije gena *Bach2* iz 20 različitih klonova hibridoma. U kolonama su označena CpG-mjesta unutar analiziranih fragmenata *Bach2-1* (A1), *Bach2-2* (A2), *Bach2-3* (A3) i *Bach2-4* (A4), a u redovima ekspresija gena analizirana upotrebom dvije različite TaqMan® probe (E1 i E2) metodom kvantitativnog PCR-a. Sve dobivene korelacije su negativne (označene crvenom bojom). Veličine krugova i nijanse crvene boje proporcionalne su korelacijskom koeficijentu. Korelacije koje nisu statistički značajne su prekrižene.

Također sam napravila Pearsonovu korelaciju metilacije i ekspresije gena *Bach2* s glikanima prisutnima na imunoglobulinu G iz istih klonova. Za korelaciju su korištene srednje vrijednosti metilacije CpG-mjesta svakog od korištenih testova za analizu metilacije (na Slici 20. testovi su označeni oznakama CpG_A1 do CpG_A4). Srednja vrijednost metilacije CpG-mjesta fragmenta *Bach2-2* (CpG_A2) i srednja vrijednost metilacije svih analiziranih CpG-mjesta unutar četiri fragmenta (CpG_All) ne koreliraju s glikanskim strukturama prisutnim na molekulama IgG-a. Metilacije fragmenata *Bach2-1* (CpG_A1) i *Bach2-3* (CpG_A3) pozitivno koreliraju s glikanskom strukturom H6N4F1G1, koja na penta-saharidnoj srži glikana sadrži

sržnu fukozu, dvije galaktoze vezane β1-4 vezom i jednu vezanu β1-3 vezom, te N-glikolilneuraminsku kiselinu (sijalinsku kiselinu koja se pojavljuje na mišjem IgG-u). Metilacija fragmenta *Bach2*-3 također pozitivno korelira s glikanskom strukturom H4N4F1G1 koja na srži glikana ima vezanu sržnu fukozu, jednu galaktozu i jednu N-glikolilneuraminsku kiselinu. Osim pozitivnih korelacija, stupanj metilacije tog fragmenta negativno korelira sa strukturom H4N4F1 (srž glikana s galaktozom i sržnom fukozom). Glikanske strukture H5N4F1 i H5N4F1G1, koje na srži imaju sržnu fukozu i dvije galaktoze bez ili sa N-glikolilneuraminskom kiselinom, negativno koreliraju sa stupnjem metilacije fragmenta *Bach2-4* (CpG_A4), dok je struktura H3N4F1 (srž glikana s vezanom sržnom fukozom) pozitivno korelirana. Da bih istražila postoji li povezanost ekspresije gena *Bach2* i glikanskih struktura prisutnih na IgG-u, napravila sam korelaciju vrijednosti ΔCt, dobivenih analizom ekspresije upotrebom dvije TaqMan probe, i devet glikanskih struktura IgG-a. Glikanska struktura H5N4F1G2 (srž glikana sa sržnom fukozom, dvije galaktoze i dvije N-glikolilneuraminske kiseline) pozitivno korelira s vrijednostima ΔCt obje TaqMan probe (dCt_1 i dCt_2), a struktura H3N5F1, koja se sastoji od srži glikana sa sržnom fukozom i račvajućim N-acetilglukozaminom, pozitivno korelira s vrijednostima ΔCt dobivenim upotrebom prve TaqMan probe (Slika 20.).

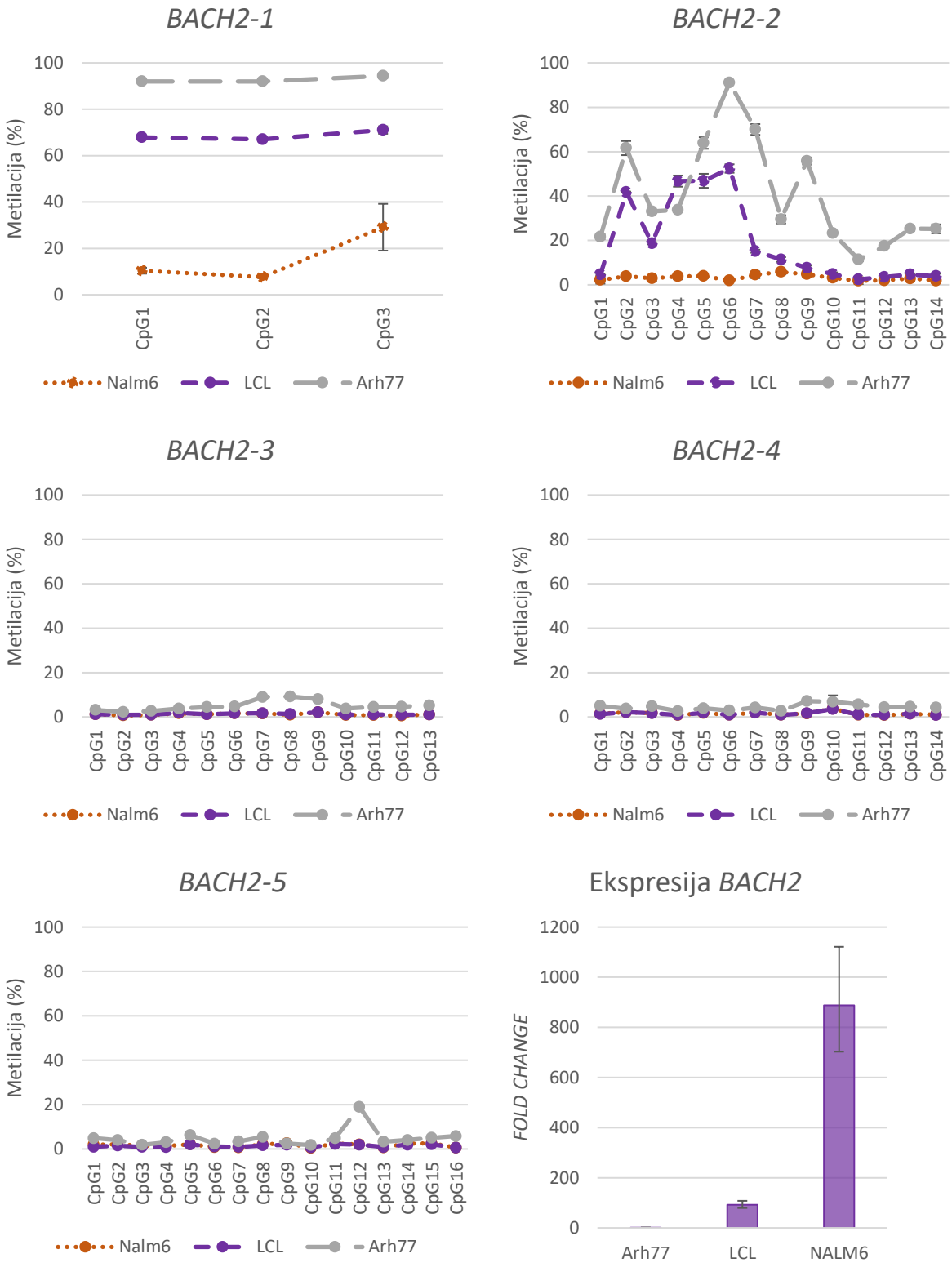


Slika 20. Opis slike na sljedećoj stranici.

Slika 20. Korelacija CpG-metilacije i ekspresije gena *Bach2* s glikanskim strukturama na molekulama IgG izoliranim iz 20 klonova stanica hibridoma. U kolonama su označene glikanske strukture dobivene upotrebom masene spektrometrije, a u redovima metilacijski testovi i ekspresija gena analizirana upotrebom dvije različite TaqMan® probe (*Bach2-1* (CpG_A1), *Bach2-2* (CpG_A2), *Bach2-3* (CpG_A3), *Bach2-4* (CpG_A4), srednja vrijednost svih CpG-mjesta (CpG_All), dCt_1 (prva TaqMan proba) i dCt_2 (druga TaqMan proba). Pozitivne korelacije označene su plavom, a negativne crvenom bojom. Veličine krugova i nijanse boja proporcionalne su korelacijskom koeficijentu. Korelacije koje nisu statistički značajne su prekrižene.

4.4. Ekspresija gena *BACH2* regulirana je CpG-metilacijom i histonskim modifikacijama u staničnim modelima ljudskih B-limfocita

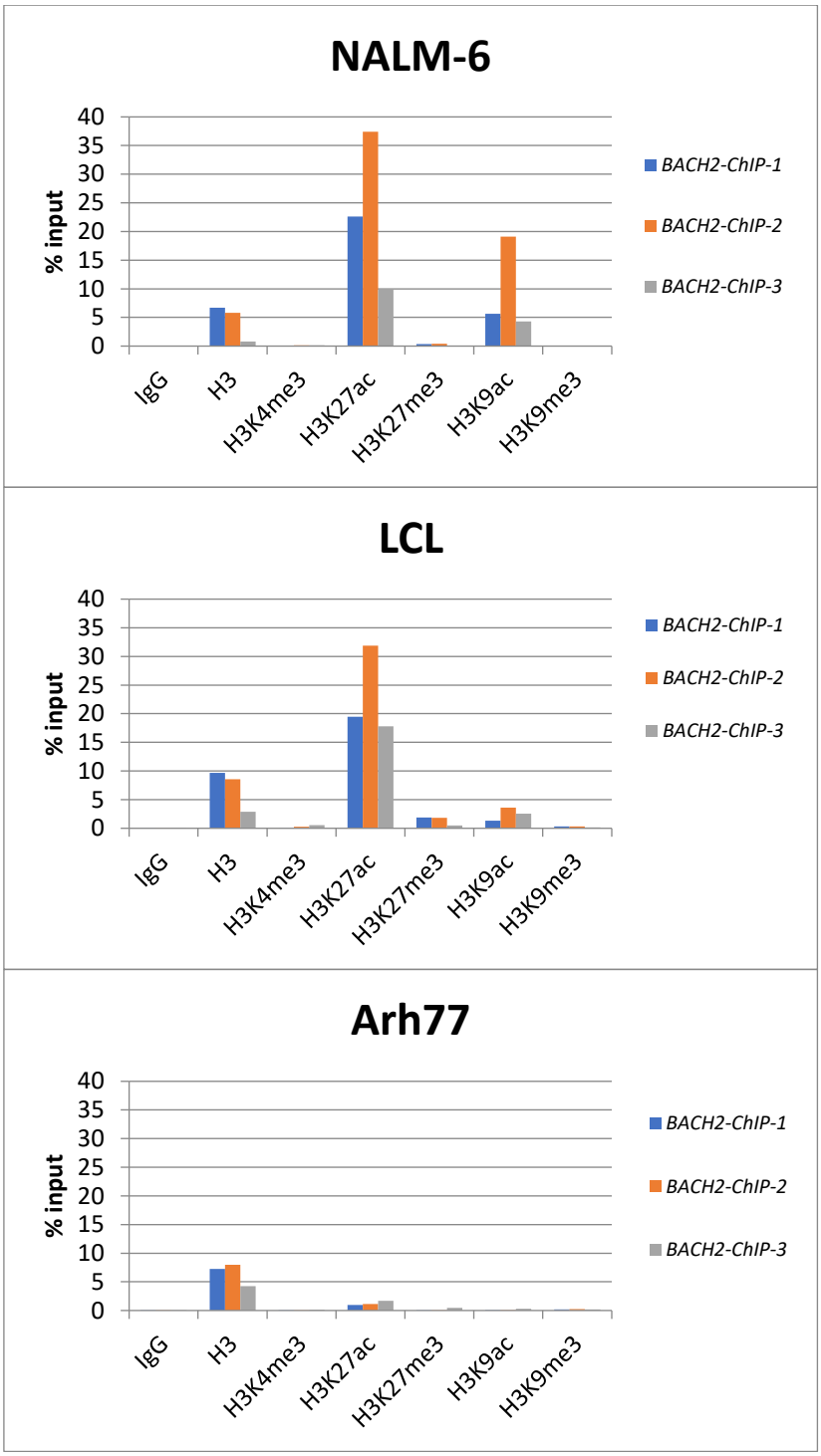
U B-limfocitima neophodna je prisutnost proteina BACH2 koji regulira mrežu gena odgovornih za identitet ovog tipa stanica, a između ostalih utišava i gen *PRDM1* te na taj način inhibira terminalnu diferencijaciju B-limfocita u plazm-stanice. Još uvijek je nedovoljno istraženo na koji način je reguliran sam gen *BACH2*, odnosno jesu li i koji epigenetički mehanizmi uključeni u taj proces. U tu svrhu analizirala sam CpG-metilaciju i različite histonske modifikacije u području promotora gena *BACH2* u različitim staničnim linijama (NALM-6, LCL i Arh-7). Ove su stanice modeli za prekursore B-limfocita, B-limfocita iz periferne krvi i plazma-stanica, te je gen *BACH2* u njima različito eksprimiran. Stupanj CpG-metilacije odredila sam na CpG-mjestima unutar prethodno navedenih fragmenata gena *BACH2* metodom bisulfitnog pirosekvenciranja (Slika 21.). Analizirala sam prisutnost histonskih modifikacija koje su oznaka aktivnog (H3K27ac, H3K9ac i H3K4me3) i utišanog (H3K27me3, H3K9me3) kromatina metodom kromatinske imunoprecipitacije (Slika 22.). Stupanj metilacije fragmenata *BACH2-1* razlikuje se između navedenih staničnih linija. U staničnoj liniji NALM-6 metilacija sva tri CpG-mjesta je niska (do 30 %), dok je u linijama LCL i Arh-77 visoka. U liniji LCL metilacija svih analiziranih CpG-mjesta je oko 70 %, a u liniji Arh-77 oko 90 %. Također se razlikuje i stupanj metilacije na 14 CpG-mjesta unutar fragmenta *BACH2-2*. U staničnoj liniji NALM-6 stupanj metilacije je najniži, a u staničnoj liniji Arh-77 najviši. Stupanj metilacije na CpG-mjestima unutar ostalih analiziranih fragmenata nije se razlikovao između analiziranih staničnih linija (Slika 21.). Analiza ekspresije gena *BACH2* pokazala je da je ovaj gen eksprimiran više od 92 puta u staničnoj liniji LCL, odnosno više od 887 puta u staničnoj liniji NALM-6 u odnosu na njegovu ekspresiju u staničnoj liniji Arh-77 (Slika 21.).



Slika 21. Opis slike na sljedećoj stranici.

Slika 21. CpG-metilacija i ekspresija gena *BACH2* u staničnim linijama NALM-6, LCL i Arh-77. Stupanj metilacije na 47 CpG-mjesta unutar pet fragmenata određen je bisulfitnim pirosekvenciranjem. Prikazana je srednja vrijednost CpG-metilacije triju bioloških replika te standardne devijacije između replika. Stupanj metilacije svih CpG-mjesta unutar fragmenta *BACH2-1* i *BACH2-2* razlikuju se između staničnih linija, dok se stupanj metilacije unutar ostalih fragmenata ne razlikuje. Ekspresija gena *BACH2* u staničnim linijama određena je kvantitativnim PCR-om i podatci su analizirani metodom komparativne Ct vrijednosti. Promjena ekspresije (*fold change*) prikazana je u odnosu na staničnu liniju Arh-77 u kojoj ovaj gen nije eksprimiran. Prikazane su srednje vrijednosti triju bioloških replika i njihove standardne devijacije.

Na kromatinu izoliranom iz navedene tri stanične linije napravila sam kromatinsku imunoprecipitaciju da bih utvrdila količinu različitih histonskih modifikacija u regiji promotora gena *BACH2*. U tu sam svrhu analizirala tri regije: 1) *BACH2-ChIP-1* koja se nalazi uzvodno od svih regija u kojima sam analizirala CpG-metilaciju; 2) *BACH2-ChIP-2* koja se nalazi u području metilacijskog testa *BACH2-1*; 3) *BACH2-ChIP-3* koja se nalazi u području metilacijskog testa *BACH2-3*. U svim staničnim linijama najviše se razlikuje količina histonskih modifikacija H3K27ac i H3K9ac, koje su oznake aktivnog kromatina. U liniji NALM-6 ima najviše tih oznaka, dok ih je u liniji Arh-77 najmanje. U sve tri stanične linije količina oznaka karakterističnih za utišani kromatin (H3K27me3 i H3K9me3), kao i oznake H3K4me3 karakteristične za aktivni kromatin, je bila vrlo mala (Slika 22.).



Slika 22. Prisutnost različitih histonskih modifikacija u promotoru gena *BACH2*. Količina histonskih modifikacija karakterističnih za aktivni (H3K4me3, H3K27ac i H3K9ac) i utišani (H3K27me3 i H3K9me3) kromatin određena je metodama kromatinske imunoprecipitacije i kvantitativnog PCR-a. Analizirane su modifikacije unutar tri regije u promotoru gena *BACH2* (*BACH2-ChIP-1*, *BACH2-ChIP-2* i *BACH2-ChIP-3*). Pozitivna kontrola eksperimenta bila je imunoprecipitacija kromatina antitijelom specifičnim za histon H3, a negativna kontrola imunoprecipitacija antitijelom specifičnim za IgG. Količina određene modifikacije izražena je kao postotak od kontrolnog uzorka DNA *(% input*).

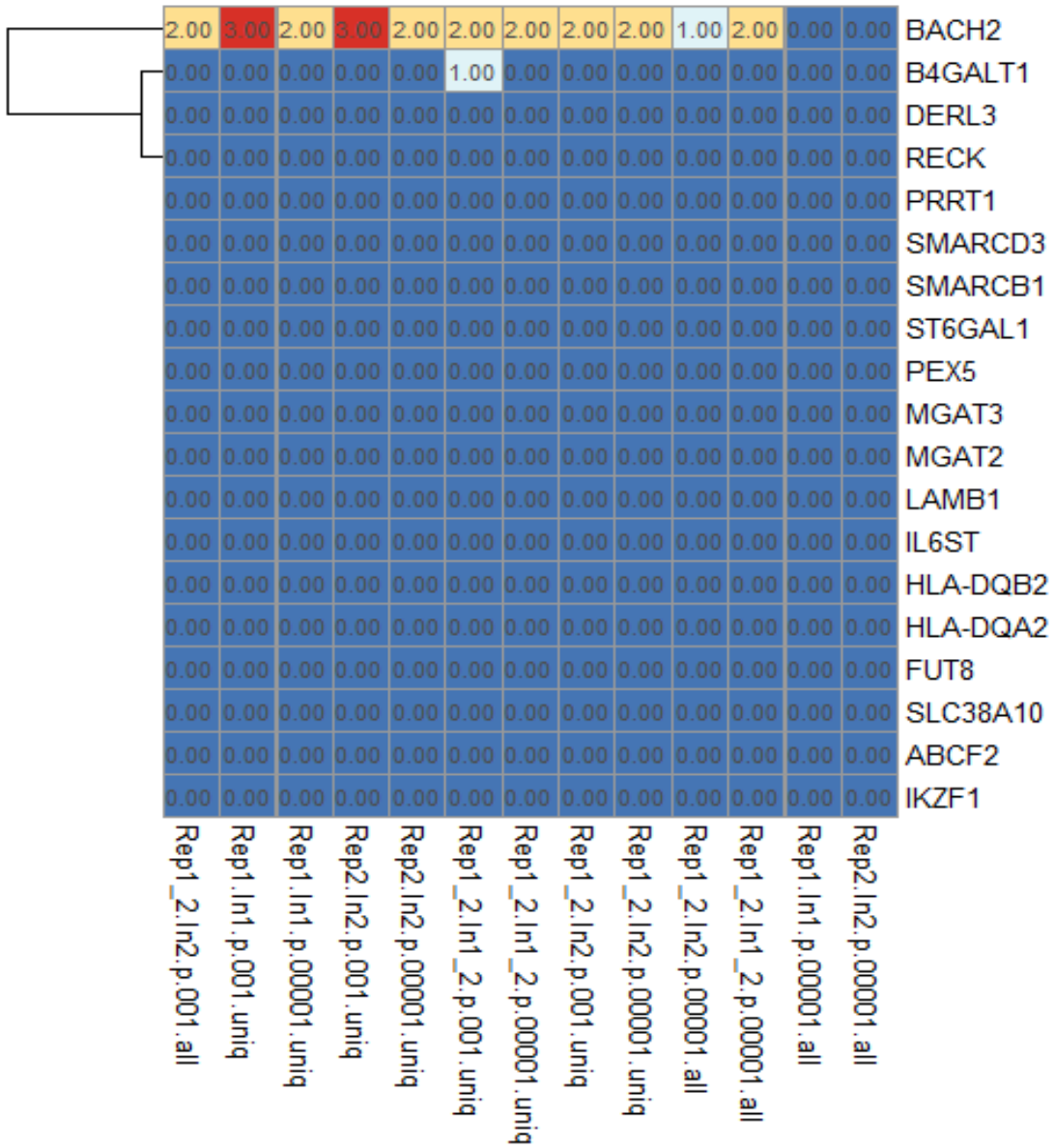
4.5. Vezanje transkripcijskog faktora BACH2 na glikogene u staničnoj liniji NALM6

Protein BACH2 je transkripcijski faktor koji sudjeluje u utišavanju gena tako da se veže na njihove promotore i pojačivače, te na taj način sprječava vezanje transkripcijskih aktivatora. BACH2 je uključen u regulaciju mreže gena u B-limfocitima. Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je istražiti ulogu BACH2 u procesu glikozilacije IgG-a. Pretpostavka je da BACH2, između ostalih gena regulira i gene koji kodiraju glikoziltransferaze i glikozidaze, tzv. glikogene. Stoga je jedan od ciljeva bio istražiti veže li se BACH2 unutar promotora nekih od glikogena i gena uključenih u glikozilaciju IgG-a. U tu svrhu napravljena je analiza *in silico,* da bi se utvrdilo postoje li potencijalna mjesta vezanja proteina BACH2 u promotorima tih gena (2000 parova baza od TSS-a). U analizi su korišteni motivi za transkripcijski faktor BACH2 i srodne transkripcijske faktore AP1, NFE2 i Bach1 poznati iz baza podataka i promotori gena koji su GWA-studijom povezani s glikozilacijom IgG-a. Analizom je utvrđeno da u promotorima devet analiziranih gena postoje potencijalna vezna mjesta za navedene transkripcijske faktore (Tablica 7.).

Tablica 7. Potencijalna mjesta vezanja proteina BACH2 u genima uključenim u *N*-glikozilaciju IgG-a.

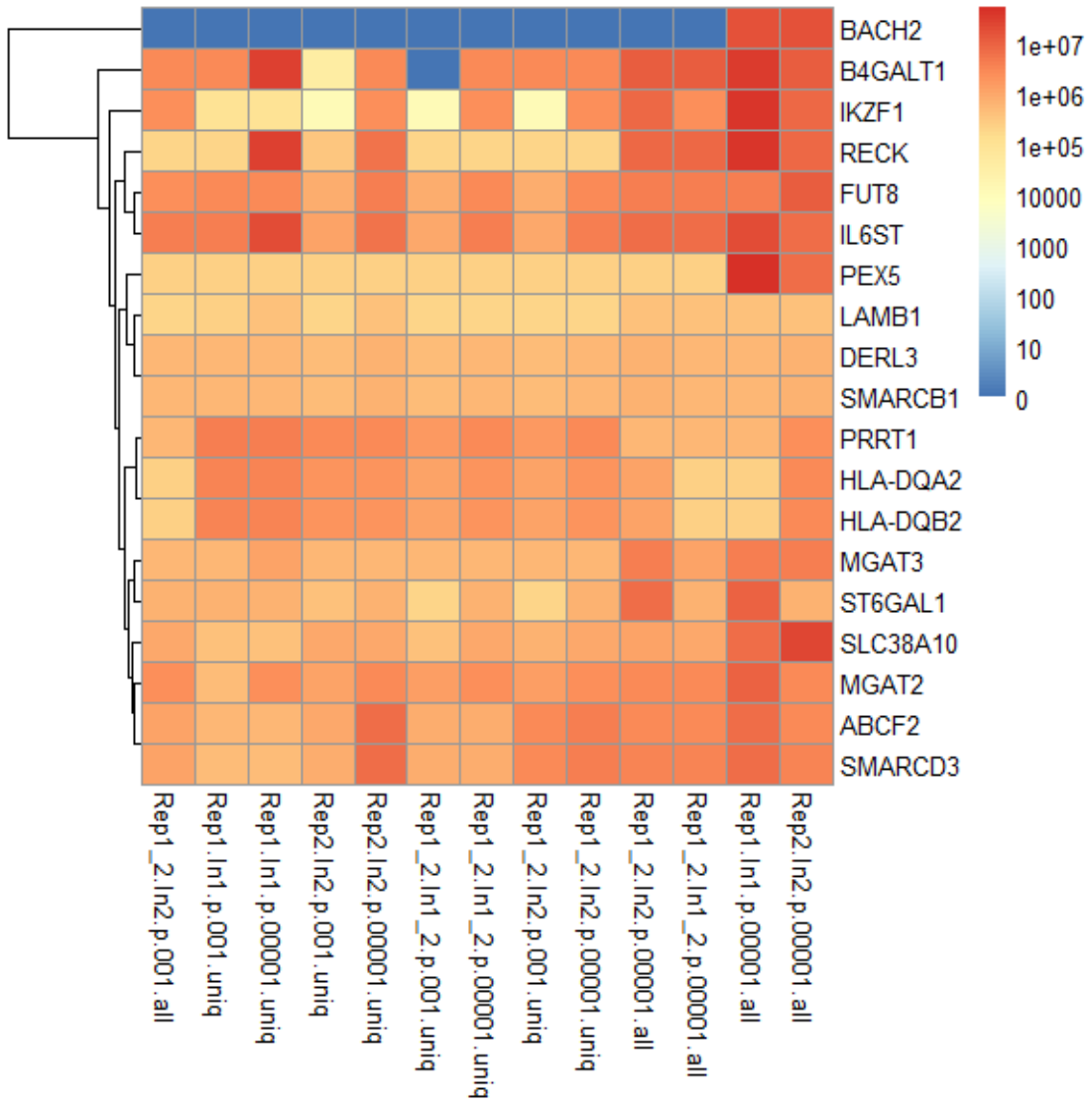
	Gen	AP1	NFE2	Bach1	BACH2
1	BACH2	0	0	1	0
2	LAMB1	1	0	0	1
3	MGAT3	2	1	3	0
4	SMARCB1	1	2	1	2
5	DERL3	2	2	1	3
6	SUV420H1	2	2	0	2
7	B4GALT1	1	1	0	2
8	ST6GAL1	5	5	0	0
9	IKZF1	0	1	0	0

Nakon analize *in silico,* napravila sam imunoprecipitaciju kromatina izoliranog iz stanica NALM-6, u kojima je ekspresija gena *BACH2* visoka (Slika 21.), antitijelom specifičnim za protein BACH2. Nakon imunoprecipitacije dobivene su sekvence sekvenciranjem nove generacije, koje su zatim obrađene bioinformatičkim metodama. Utvrđeno je da je protein BACH2 vezan jedino unutar gena *BACH2* u stanicama NALM-6. Ovo istraživanje nije potvrdilo da se protein BACH2 veže unutar promotora ciljanih gena koji su prethodnom GWA-studijom bili povezani s glikozilacijom IgG-a (Slika 23.).



Slika 23. Bioinformatička analiza sekvenci dobivenih sekvenciranjem nove generacije koje je slijedilo nakon kromatinske imunoprecipitacije antitijelom specifičnim za protein BACH2. Na desnoj strani prikaza (redovi) dana su imena gena, GWAS-lokusa za glikozilaciju IgG-a. Uspoređeni su različiti setovi podataka (kolone), te je jedino utvrđeno mjesto vezanja unutar samog gena *BACH2*. Brojevi označavaju broj mjesta vezanja u genu pronađenih u svakoj analizi. Tamno plava boja označava da u analizi s različitim setovima podataka nisu pronađena mjesta vezanja proteina BACH2 u analiziranim lokusima. Svijetlo plava boja označava postojanje jednog mjesta vezanja, žuta postojanje dva mjesta vezanja, a crvena označava tri mjesta vezanja proteina BACH2 u analiziranim lokusima.

Također, bioinformatičkom analizom utvrđeno je da se protein BACH2 veže blizu mjesta početka transkripcije gena *BACH2*, te na udaljenosti oko 10000 parova baza uzvodno od gena *IKZF1*, transkripcijskog faktora koji je također uključen u diferencijaciju B-limfocita (Slika 24.).



Slika 24. Bioinformatička analiza sekvenci dobivenih sekvenciranjem nove generacije koje je slijedilo nakon kromatinske imunoprecipitacije antitijelom specifičnim za protein BACH2. Na desnoj strani prikaza (redovi) dana su imena gena, GWAS-lokusa za glikozilaciju IgG-a.Uspoređeni su različiti setovi podataka i utvrđeno je mjesto vezanja proteina BACH2 unutar gena *BACH2* (u neposrednoj blizini TSS-a) te oko 10000 parova baza uzvodno od gena *IKZF1*. Boja označava udaljenost od gena do najbližeg mjesta vezanja proteina BACH2.

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju analizirala sam CpG-metilaciju promotora gena *BACH2* u stanicama periferne krvi pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva i zdravih ispitanika. Analizu sam napravila na dvije kohorte pacijenata. U kohorti Edinburgh analizirala sam metilaciju gena *BACH2* na 431 ispitaniku, a u kohorti Firenca analizu sam napravila na 519 ispitanika. U obje kohorte otkrila sam da dolazi do statistički značajnog smanjenja metilacije gena *BACH2* unutar fragmenta *BACH2-2* na tri CpG-mjesta, kod pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti u odnosu na zdrave ispitanike (Slika 12.). Razlike u stupnju metilacije na ostalim CpG-mjestima u ovom fragmentu uočene su samo u jednoj od dviju kohorti. Stupanj metilacije analizirala sam i u B-limfocitima $CD19^+$ izoliranim iz pune krvi manje kohorte od ukupno 67 ispitanika gdje sam identificirala smanjenje metilacije na samo jednom CpG-mjestu unutar fragmenta *BACH2-2* u pacijentima oboljelim od Crohnove bolesti u odnosu na zdrave ispitanike (Slika 13.). Značajne promjene u metilaciji gena *BACH2* u pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti, ali ne i u pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa, u skladu su s dosad objavljenim istraživanjima u kojima je polimorfizam jednog nukleotida unutar gena *BACH2* povezan s Crohnovom bolesti (102). Polimorfizmi u genu *BACH2* povezani su i s drugim upalnim bolestima poput šećerne bolesti tipa 1, celijakije, vitiliga, reumatoidnog artritisa i astme (104–109). Trenutno je poznata povezanost između polimorfizama jednog nukleotida u genu *BACH2* i Crohnove bolesti, ali se ne zna točno je li i na koji način gen/protein BACH2 uključen u nastanak i progresiju bolesti. Pošto je protein BACH2 transkripcijski faktor specifično eksprimiran u B- i T-limfocitima i ključan za diferencijaciju B-limfocita u plazma-stanice kroz represiju transkripcije gena *PRDM1* te vrlo važan u diferencijaciji T-limfocita, moguće je da je uključen u nastanak upalnih bolesti crijeva upravo kroz sudjelovanje u održavanju homeostaze imunosnog sustava (11,87). Također je otkrivena povezanost polimorfizma jednog nukleotida u genu *BACH2* (tzv. rizični alel) i povratka simptoma Crohnove bolesti nakon operacije uklanjanja upalom zahvaćenog dijela crijeva (167). Osim gena *BACH2*, nedavnim cjelogenomskim studijama povezanosti utvrđeno je da postoji oko 200 genskih lokusa povezanih s upalnim bolestima crijeva, što ukazuje na veliku genetsku predispoziciju za nastanak i progresiju ove bolesti (9).

Međutim, sva dosadašnja istraživanja pokazuju da genetska predispozicija objašnjava tek mali dio (do 15%) nastanka ove bolesti (9). Važan faktor u nastanku i progresiji upalnih bolesti crijeva imaju i okolišni faktori, kao ishrana i način života. Poznato je da su epigenetički mehanizmi medijator između okoliša i promjene ekspresije gena te na taj način sudjeluju

značajno u nastanku i progresiji multifaktorijalnih bolesti poput upalnih bolesti crijeva. Istraživanja genetičkih i epigenetičkih promjena u upalnim bolestima crijeva bitna su za razumijevanje nastanka i progresije bolesti te djelotvornosti terapije, a također i u pronalaženju genetičkih/epigenetičkih dijagnostičkih biomarkera.

Crohnova bolest i ulcerozni kolitis, dva najčešća oblika upalnih bolesti crijeva razlikuju se po dijelu probavnog sustava koji zahvaćaju i po upalnim promjenama – kod Crohnove bolesti upalne promjene zahvaćaju cijelu stijenku crijeva, a kod ulceroznog kolitisa samo sluznicu crijeva. Trenutna dijagnoza oba oblika bolesti podrazumijeva gastrointestinalnu endoskopiju i histologiju, invazivne dijagnostičke metode. Bez obzira na postojanje dijagnostičkih metoda, ponekad je teško razlikovati Crohnovu bolest od ulceroznog kolitisa, ali i ova dva oblika od drugih, rijeđe zastupljenih oblika bolesti. Osim invazivnih metoda, postoje neki biomarkeri za Crohnovu bolest i ulcerozni kolitis, no još uvijek ti biomarkeri nisu dovoljno specifični te i dalje postoji velika potreba za pronalaskom novih, neinvazivnih biomarkera koji bi uspješno razlikovali različite tipove ovih bolesti te bili dobar prediktor prognoze bolesti i učinka terapije na pojedinca u pristupu personaliziranog liječenja (168). Trenutno postoje biomarkeri koji mogu razlikovati Crohnovu bolest od ulceroznog kolitisa, primjerice pANCA (od engl. *Perinuclear Antineutrophil Cytoplasmic Antibody*) i ASCA (od engl. *Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibody*) čiji je titar povećan u pacijenata s Crohnovom bolesti. Ti biomarkeri su specifični, ali nisu dovoljno osjetljivi (169–171). Također postoje biomarkeri za mjerenje razine upale, poput C-reaktivnog proteina (CRP), fekalnog kalprotektina, fekalnog laktoferina, lipokalina-2 i proteina S100A12. Ni jedan od navedenih biomarkera ne može razlikovati Crohnovu bolest od ulceroznog kolitisa, a samo fekalni kalprotektin i laktoferin specifični su za upalne bolesti crijeva (168). Iz navedenih podataka može se zaključiti da ne postoji idealan biomarker za dijagnozu upalnih bolesti crijeva niti za razlikovanje pojedinih podtipova bolesti, te se provode istraživanja u svrhu pronalaska biomarkera iz krvi i seruma pacijenata koji bi bili dovoljno specifični i osjetljivi, a u isto vrijeme neinvazivni. Trenutno se istražuju proteini i molekule miRNA u serumu pacijenata, te se sve više istražuju i genetičke i epigenetičke promjene u krvi, u svrhu pronalaska dobrog biomarkera za dijagnozu bolesti, stratifikaciju pacijenata i predikciju odgovora na terapiju. U liječenju pacijenata oboljelih od IBD-a postoji više terapija koje se danas koriste, a to su antibiotici, kortikosteroidi, 5-aminosalicilati, imunosupresivi i biološka terapija – antitijela specifična za faktore upale. Postoji velika heterogenost pacijenata u odgovoru na pojedinu terapiju - dok neki pacijenti vrlo dobro

reagiraju na blažu terapiju koja uključuje 5-aminosalicilate, nekima pomaže isključivo biološka terapija (138). Također, neki pacijenti će razviti karcinom debelog crijeva, dok neki neće što je velik problem u strategiji liječenja upalnih bolesti crijeva, odnosno rane identifikacije komplikacija. Stoga je iznimno važna stratifikacija pacijenata kako bi se pronašla učinkovita terapija za pojedine grupe pacijenata. Današnja istraživanja u svrhu uspješnog i efikasnog liječenja pacijenata idu u smjeru personalizirane medicine, kojom bi se na temelju genetičkog profila pacijenta moglo lakše dijagnosticirati bolest i odlučiti koju terapiju primijeniti (168).

Cilj projekta FP7 „*Diagnostic and prognostic biomarkers for inflammatory bowel disease*“ (IBD-BIOM), u sklopu kojeg je napravljeno i ovo istraživanje, bio je pronalazak prognostičkih i dijagnostičkih biomarkera za upalne bolesti crijeva. U zadnjih nekoliko godina studije su pokazale da u krvi i u crijevu pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva dolazi do promjena u metilaciji DNA (149,155,172–177). U ovom istraživanju analizirala sam metilaciju gena *BACH2* u ukupnim stanicama periferne krvi i B-limfocitima $CD19^+$, ali veliki značaj u istraživanju epigenetičkih promjena na razini metilacije DNA dala bi i analiza u drugim stanicama periferne krvi poput T-limfocita $CD4^+$ i $CD8^+$ te monocita $CD14^+$, jer i ti tipovi stanica sudjeluju u upalnom odgovoru organizma. Ukoliko bi se utvrdile promjene u metilaciji gena *BACH2* specifične za neki od navedenih staničnih tipova, to bi potencijalno mogao biti biomarker za ranu dijagnozu ovih bolesti. Kod analize metilacije iz pune krvi problem je heterogeni sastav – različite stanice krvi pokazuju diferencijalnu metilaciju DNA, jer su funkcijski različite i imaju različito porijeklo (178). Također se razlikuje i njihov udio u punoj krvi, pogotovo kod ljudi koji imaju druge zdravstvene poremećaje. Zato bi bolji pristup u otkrivanju promjena u metilaciji DNA koje prethode ili su posljedica upalnih bolesti crijeva bila analiza u pojedinačnim staničnim tipovima. Upotrebom metoda koje omogućuju sortiranje stanica na temelju površinskih antigena i izolacijom DNA iz takvih sortiranih stanica mogle bi se utvrditi potencijalne promjene na razini epigenoma.

Također, od velikog značaja za razumijevanje nastanka i progresije ovih bolesti bilo bi utvrditi i promjene metilacije DNA u dijelovima probavnog sustava zahvaćenim upalom. Pošto je metilacija DNA epigenetički mehanizam bitan za diferencijaciju stanica i razlikuje se u različitim staničnim tipovima, krv nije idealno tkivo za proučavanje promjena koja se događaju u crijevu pacijenata (179). Nedavnim istraživanjem u grupi u kojoj radim pokazano je da se metilacija promotora gena *MGAT3* mijenja u krvi pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva. U krvi pacijenata dolazi do hipermetilacije gena, s tim da su razlike izraženije kod

pacijenata s Crohnovom bolesti, isto kao i u slučaju gena *BACH2* (156). Također je pokazano da dolazi i do hipermetilacije gena u B-limfocitima $CD19^+$. Analiza metilacije gena *MGAT3* u tom istraživanju napravljena je i na manjoj kohorti ljudi u kojoj su sortirani T-limfociti $CD3^+$ iz krvi i T-limfociti $CD3^+$ iz biopsija crijeva pacijenata koji boluju od ulceroznog kolitisa. Pokazano je da se promjena metilacije razlikuje u T-limfocitima $CD3^+$ iz krvi i onih iz crijeva. U T-limfocitima $CD3^+$ iz krvi dolazi do hipermetilacije u pacijentima oboljelim od ulceroznog kolitisa, a u T-limfocitima $CD3^+$ izoliranim iz biopsija crijeva dolazi do hipometilacije kod ulceroznog kolitisa (156). Ovi rezultati ukazuju na problem analize metilacija DNA iz krvi te da krv ne može biti *proxy* za epigenetičke događaje u ciljanom tkivu (u ovom slučaju crijevu). Ipak, krv je često korišteno tkivo u svrhu pronalaska biomarkera jer je neinvazivna metoda, krv je lako dostupna, a u nekim je bolestima, najčešće tumorima, pokazano da metilacija DNA iz krvi može biti dobar dijagnostički i prognostički biomarker (180–187).

Istraživanja koja su proveli suradnici na projektu IBD-BIOM pokazala su da u T-limfocitima $CD4^+$ i $CD8^+$ te monocitima $CD14^+$ dolazi do promjene u globalnoj genomskoj metilaciji u pacijentima oboljelim od IBD-a (155). To istraživanje i ostala istraživanja globalne metilacije u IBD-u nisu pokazala da dolazi do promjene i u metilaciji gena *BACH2*, a jedan od mogućih razloga je korištenje drugih metoda za analizu CpG-metilacije, odnosno određivanje CpG-metilacije na razini cijelog genoma upotrebom platforme Illumina 450K te nepotpuna pokrivenost genoma. Također, zbog nepotpune pokrivenosti genoma ne mogu se detektirati sve promjene CpG-metilacija unutar genoma, primjerice onih CpG-mjesta u promotorima ili pojačivačima koja bi mogla biti važna u regulaciji ekspresije gena. Danas postoji nova platforma Illumina 850K koja ima puno veću pokrivenost genoma koja je upravo obogaćena CpG-mjestima unutar pojačivača i ostalih regulatornih regija.

Metoda bisulfitnog pirosekvenciranja, koju sam koristila u ovom istraživanju, ima najveću rezoluciju, odnosno rezoluciju pojedinačnog CpG-mjesta. Analizirala sam ukupno 47 CpG-mjesta unutar pet regija u promotoru, prvom eksonu i prvom intronu gena *BACH2*. Neka od tih mjesta prisutna su i na platformi Illumina. Prema kriterijima baze UCSC, CpG-otok gena *BACH2* velik je 2149 parova baza i nalazi se u promotoru, prvom eksonu i prvom intronu. Sadrži ukupno 201 CpG-mjesto. Većina analiziranih CpG-mjesta u ovom istraživanju nalazi se unutar CpG-otoka. Nedostatak bisulfitnog pirosekvenciranja je što se ne može analizirati velika regija koja sadrži puno CpG-mjesta. Najčešće se unutar jedne regije može analizirati do 15 CpG-mjesta, pa upotrebom ove metode nije moguće analizirati sva CpG-mjesta koja bi

potencijalno mogla imati regulacijsku ulogu i biti promijenjena u upalnim bolestima crijeva. Najčešći ograničavajući faktor u ovoj metodi je dizajn početnica kojima se umnaža ciljana regija. Kvalitetne početnice je teško dizajnirati ukoliko je sekvenca vrlo bogata CpG-dinukleotidima, ukoliko sadrži puno citozina koji nisu unutar CpG-dinukleotida te nakon bisulfitne konverzije postaju uracili, te ako sadrži puno gvanina koji utječu na formiranje sekundarnih struktura. Također je bitno da u sekvencama nema polimorfizama jednog nukleotida, ukoliko se rade analize na razini populacija (160). Dodatna vrijednost u istraživanju promjena metilacije gena *BACH2* u upalnim bolestima crijeva bila bi analiza više CpG-dinukleotida unutar CpG-otoka gena *BACH2*. Također bi se mogla napraviti analiza metilacije u pojačivaču ili tijelu gena, jer je pokazano da je metilacija tih područja također bitna za regulaciju ekspresije gena (188–191).

Ovim istraživanjem pokazala sam da se metilacija gena *BACH2* mijenja u stanicama pune krvi i B-limfocitima $CD19^+$ u upalnim bolestima crijeva. Aberantna metilacija gena *BACH2* utvrđena je i u nekim drugim bolestima poput dijabetesa tipa 1, te karcinoma dojke i želuca (110,111,192). Osim u ovim multifaktorijalnim bolestima, promjene u metilaciji gena *BACH2* uočene su i kao rezultat starenja, te u ljudi koji rade noćne smjene (193,194). Istraživanje koje su proveli Kuwahara i suradnici (113) pokazalo je da Bach2 sudjeluje u regulaciji starenja T-limfocita $CD4^+$ u miševima. Povećana ekspresija gena *Bach2* bitna je za održavanje imunosne homeostaze, a u starim T-limfocitima $CD4^+$ dolazi do smanjenja njegove ekspresije kroz smanjenje ekspresije proteina Menin koji regulira ekspresiju gena *Bach2* tako što sudjeluje u acetilaciji njegovog promotora. Osim u starenju, ekspresija gena *Bach2* mijenja se i kao odgovor na oštećenje DNA uzrokovano UV-zračenjem (195). Stoga, ovi rezultati sugeriraju na vrlo važnu ulogu gena *BACH2* u održavanju imunosnog sustava koji je jako dereguliran u upalnim bolestima crijeva.

Metilacija DNA je jedan od epigenetičkih mehanizama uključenih u regulaciju ekspresije gena. U ovom istraživanju nisu mi bili dostupni uzorci molekula RNA iz krvi ispitanika, pa nije bilo moguće analizirati dolazi li do promjena ekspresije gena *BACH2* nakon aberantne promjene metilacije utvrđene u krvi pacijenata s upalnim bolestima crijeva. Kako bih utvrdila jesu li navedena CpG-mjesta uključena u regulaciju ekspresije gena *BACH2*, pristupila sam analizi funkcije u animalnom staničnom modelu HEK293 u kojem sam upotrebom molekularnog alata CRISPR/dCas9-DNMT3A ciljano promijenila metilaciju na specifičnim CpG-mjestima (112). Na protein Cas9 iz vrste *Streptococcus pyogenes*, koji je inaktiviran

uvođenjem promjena u dvije aminokiseline pa stoga nema nukleaznu aktivnost (dCas9, od engl. dead Cas9), fuzionirana je katalitička domena DNA metiltransferaze *de novo* DNMT3A. Modelne stanice HEK293 transfecirala sam ovakvim fuzijskim proteinom. Molekularni alat za ciljanu metilaciju, dCas9-DNMT3A, navođen je s tri različite molekule sgRNA na ciljana CpG-mjesta u genu *BACH2*. Upotrebljene su pojedinačne molekule sgRNA ali i kombinacija sve tri molekule za navođenje proteina dCas9-DNMT3A. Nakon selekcije transfeciranih stanica analizirala sam metilaciju DNA na ciljanim CpG-mjestima upotrebom bisulfitnog pirosekvenciranja te sam pokazala hipermetilaciju ciljane regije. Navođenje fuzijskog proteina dCas9-DNMT3A na gen *BACH2* upotrebom molekula sgRNA 1, sgRNA 3 i kombinacijom sve tri molekule sgRNA imalo je otprilike isti efekt na metilaciju DNA, dok je navođenje molekulom sgRNA 2 dovelo do slabijeg povećanja metilacije (Slika 14.). Dobiveni rezultati u skladu su s prijašnjim istraživanjima koja su pokazala da upotreba različitih molekula sgRNA ne dovodi do jednakog efekta na metilaciju DNA (112). Unatoč uspješno povećanoj CpG-metilaciji željene regije, u istim stanicama nije došlo do smanjenja ekspresije gena *BACH2* (Slika 15.). Nedavnim istraživanjem pokazano je da ciljanom metilacijom CpG-dinukleotida koji se nalaze nizvodnije od CpG-dinukleotida koje sam ciljala u ovom istraživanju dolazi do smanjenja ekspresije gena *BACH2* u stanicama HEK293 (112). Stanična linija HEK293 dobivena je imortalizacijom stanica bubrega ljudskog embrija, pa nije idealan model za proučavanje utjecaja metilacije DNA na ekspresiju gena *BACH2* u B-limfocitima u kojima je utvrđena razlika u metilaciji između pacijenata i zdravih ispitanika u okviru ovog istraživanja. Bolji model bila bi stanična linija koja predstavlja B-limfocite, npr. limfoblastoidna stanična linija ili primarni B-limfociti, no unos dCas9-DNMT3A koji je veličine oko 10kb, metodološki je zahtjevan te je nadilazio opseg ovog istraživanja.

Da bih detaljnije razjasnila utjecaj metilacije DNA na ekspresiju gena *BACH2* u B-limfocitima, analizirala sam metilaciju 47 CpG-mjesta unutar gena *BACH2* u tri stanične linije koje odgovaraju B-limfocitima: NALM-6, LCL i Arh77. Stanična linija NALM-6 predstavlja leukemiju prekursora B-limfocita, linija LCL je limfoblastoidna stanična linija dobivena imortalizacijom B-limfocita iz periferne krvi, a linija Arh-77 predstavlja leukemiju plazma-stanica. Te stanične linije predstavljaju zadovoljavajući model za istraživanje B-limfocita, odnosno različitih stupnjeva njihove diferencijacije. Još bolji model bili bi primarni B-limfociti, ali sam uzgoj ovakvih kultura te transfekcija molekularnim alatima CRISPR/Cas9 je zahtjevna te rad na njima nije bio moguć u okviru ovog istraživanja. U staničnim linijama koje sam

koristila u ovom istraživanju otkrila sam razlike u metilaciji unutar fragmenata *BACH2-1* i *BACH2-2* koji se nalaze u promotoru gena. Stupanj CpG-metilacija bio je nizak u stanicama NALM-6, malo viši stupanj metilacije zabilježen je u stanicama LCL, dok je u stanica Arh-77 stupanj metilacije ovih fragmenata bio vrlo visok. Također se u ovim staničnim linijama značajno razlikovala i ekspresija gena *BACH2*. U staničnoj liniji NALM-6 ekspresija je bila najviša, dok je u staničnoj liniji Arh-77 ekspresija bila vrlo niska (Slika 21.). Ti su rezultati u skladu s dosadašnjim saznanjima o funkciji gena *BACH2* u B-limfocitima – u ranijim fazama diferencijacije gen *BACH2* je jako eksprimiran, dok u kasnijim fazama dolazi do njegovog postupnog utišavanja koje dovodi do diferencijacije u plazma-stanice koje luče antitijela IgG (84). Osim metilacije DNA, u ovim staničnim linijama postoje razlike i u količini histonskih modifikacija karakterističnih za aktivni kromatin. U stanicama NALM-6 u promotoru gena *BACH2* detektirala sam najviše modifikacija H3K27ac i H3K9ac, dok je u stanicama Arh-77 količinski udio tih modifikacija puno manji (Slika 22.). Dobiveni podaci o metilaciji DNA i histonskim modifikacijama idu u prilog tome da su analizirane regije unutar gena *BACH2* bitne za njegovu ekspresiju u staničnim modelima ljudskih B-limfocita. Potvrda ovih tvrdnji bila bi ciljana metilacija DNA upotrebom molekularnog alata dCas9-DNMT3A u staničnoj liniji NALM-6 ili upotreba alata koji umjesto katalitičke domene DNMT3A ima protein TET1 za ciljanu demetilaciju potencijalnih regulacijskih CpG-dinukleotida u staničnoj liniji Arh-77. Osim ciljane metilacije/demetilacije DNA, mogla bi se napraviti i ciljana acetilacija/deacetilacija histona upotrebom katalitički inaktivnog proteina Cas9 fuzioniranog s enzimima HAT (histonske acetiltransferaze) ili HDAC (histonske deacetilaze) (196).

Sveukupno, rezultati ovog istraživanja ukazuju na bitnu ulogu metilacije DNA i acetilacije histona u regulaciji ekspresiji gena *BACH2*, a prijašnja istraživanja ekspresije gena *Bach2* u mišjim pomoćničkim T-limfocitima također pokazuju da je održavanje acetilacije histona u promotoru gena *Bach2* pomoću proteina Menin bitno za njegovu ekspresiju (113). Također je pokazano da je promotor gena *BACH2* hipermetiliran u staničnim linijama karcinoma želuca i u uzorcima karcinoma želuca uzetim iz pacijenata, a ekspresija tog gena u istim uzorcima je smanjena (111). Detaljnije analize regulacije ekspresije gena *BACH2* u staničnim linijama koje predstavljaju prekursore B-limfocita, B-limfocite ili plazma stanice nadilaze opseg ovog istraživanja zbog vrlo teške manipulacije takvom vrstom stanica. U ovom istraživanju molekularni alat za ciljanu metilaciju DNA unesen je u stanice HEK293 upotrebom lipidnih kationa (lipofekcijom), metodom kojom se stanice imunosnog sustava vrlo teško transfeciraju.

U takve stanične tipove transgeni se najčešće unose viralnom transdukcijom, koju nije bilo moguće provesti u sklopu ovog istraživanja.

U nedavno objavljenoj cjelogenomskoj studiji povezanosti, polimorfizam u jednom nukleotidu unutar gena *BACH2* povezan je i s *N*-glikozilacijom imunoglobulina G na konstantnom dijelu antitijela (regija Fc), točnije s glikanskom strukturom koja na 6-ruci ima galaktozu (12). Do sad je poznato da je BACH2 uključen u regulaciju gena bitnih za preslagivanje imunoglobulinskih razreda, somatsku hipermutaciju i diferencijaciju B-limfocita u plazma stanice, ali nije poznato sudjeluje li u regulaciji gena uključenih u *N*-glikozilaciju IgG-a (84,92,93). *N*-glikozilacija IgG-a na konzerviranom mjestu Asn297 u regiji Fc vrlo je bitna za samu funkciju antitijela – alternativna glikozilacija može promijeniti proupalno djelovanje ovog antitijela u antiupalno (13,14,16,119,120). Do promjena u *N*-glikozilaciji IgG-a dolazi u različitim bolestima, uključujući i upalne bolesti crijeva. Na dvije velike kohorte ispitanika, u kojima sam analizirala metilaciju gena *BACH2,* analizirani su i glikani na molekulama IgG-a izoliranim iz plazme i seruma pacijenata i zdravih ispitanika. Utvrđeno je da u pacijentima ima značajno manje glikanskih struktura s galaktozom i sijalinskom kiselinom, što čini molekulu IgG-a proupalnom. Razlike u glikozilaciji IgG-a izraženije su u pacijentima koji boluju od Crohnove bolesti u odnosu na one koji boluju od ulceroznog kolitisa (22,23). U ovom istraživanju željela sam utvrditi postoji li povezanost između metilacije gena *BACH2* i glikanskih struktura IgG-a iz istih pacijenata i zdravih ispitanika u obje kohorte. U tu svrhu sam napravila korelaciju oba tipa podataka i utvrdila da ne postoji statistički značajna korelacija CpG-metilacije i glikozilacije IgG-a niti u jednoj analiziranoj kohorti (Slika 16.). U kohorti ispitanika iz Edinburgha pokazale su se slabe korelacije CpG-metilacije gena *BACH2* i glikana IgG-a, ali te korelacije nisu potvrđene u kohorti ispitanika iz Firence. Moguće je da navedena promjena metilacije ne utječe na ekspresiju gena *BACH2* u stanicama periferne krvi, pa ne dolazi do promjene u količini proteina koji nastaje. Ukoliko ne dolazi do promjene ekspresije *BACH2*, vrlo vjerojatno neće doći ni do promjene na razini glikanskih struktura. Također je moguće da korelacije nije moguće identificirati pošto je protein BACH2 transkripcijski faktor, a ne glikoziltransferaza koja direktno sudjeluje u biosintezi glikana. Stoga, moguće je da protein BACH2 regulira ekspresiju gena koji kodiraju za efektorske proteine u procesu glikozilacije IgG-a (glikoziltransferaze i glikozidaze), ali i onih koji su indirektno uključeni u glikozilaciju IgG-a, pa je teško utvrditi direktnu povezanost s glikanskim strukturama. Nedostatak navedenih korelacija je i taj što su korelirani podatci metilacije stanica pune krvi s glikozilacijom IgG-a.

Pošto molekule IgG-a izlučuju plazma-stanice, značajnije rezultate dala bi korelacija metilacije gena *BACH2* iz B-limfocita ili plazma-stanica pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva i glikana IgG-a istih pacijenata.

U svrhu otkrivanja uloge proteina BACH2 u procesu *N*-glikozilacije IgG-a, analizirala sam metilaciju i ekspresiju gena *Bach2* u 20 različitih klonova stanica hibridoma. Stanice hibridoma nastale su fuzijom stanica mijeloma i aktiviranih B-limfocita, te se koriste za proizvodnju molekula IgG-a specifičnih za neki antigen. Klonovi analizirani u ovom istraživanju proizvode monoklonalne molekule IgG-a i kompozicija glikana na njima se razlikuje između pojedinog klona (neobjavljeni rezultati). Metilaciju gena *Bach2* analizirala sam na ukupno 15 CpG-mjesta te sam zabilježila razlike između pojedinih klonova (Slika 17.). Također sam zabilježila razlike u ekspresiji gena *Bach2* (Slika 18.). Podatke metilacije i ekspresije sam korelirala da bih utvrdila jesu li analizirana CpG-mjesta regulacijska. Dobiveni podaci ukazuju na pozitivnu korelaciju metilacije analiziranih CpG-mjesta i ekspresije gena *Bach2*. Direktan dokaz da su ova CpG-mjesta bitna za regulaciju ekspresije gena *Bach2* u mišjim stanicama hibridoma bila bi upotreba ranije navedenih molekularnih alata tipa CRISPR/Cas9 za ciljanu metilaciju ili demetilaciju. Takvi eksperimenti nisu napravljeni jer nadilaze opseg ovog istraživanja. U ovom istraživanju sam korelirala i podatke metilacije i ekspresije s glikanskim strukturama molekula IgG-a izoliranim iz medija u kojem su rasle stanice hibridoma. Korelacije između metilacije i glikana su također bile slabe, kao i kod pacijenata oboljelih od IBD-a (Slika 20.). Mogući razlog slabih korelacija je isti kao i u slučaju slabe korelacije između metilacije gena *BACH2* i glikana IgG-a u IBD-u. Također je moguće da metilacija gena *Bach2* porijeklom od mijeloma stanica koje su fuzionirane s B-limfocitima da bi nastao hibridom, utječe na korelacije. U analiziranim stanicama hibridoma vidljiva je negativna korelacija ekspresije gena *Bach2* i glikanske strukture sa sržnom fukozom, dvije galaktoze i dvije N-glikolilneuraminske kiseline. Pošto navedene korelacijske analize nisu direktan dokaz uloge gena *Bach2* u *N*-glikozilaciji IgG-a, jedan od vrijednih eksperimenata u proučavanju njegove uloge u tom procesu bilo bi povećanje ili smanjenje ekspresije u klonovima hibridoma i proučavanje utjecaja na glikanske strukture.

Jedan od alternativnih pristupa koji sam primijenila u ovom istraživanju je identifikacija gena čiju ekspresiju regulira protein BACH2, odnosno onih na čije promotore se ovaj protein veže, a uključeni su u *N*-glikozilaciju IgG-a. Napravila sam analizu *in silico* kako bih utvrdila postoje li motivi za vezanje proteina BACH2 unutar slijeda nukleotida udaljenog oko 2 000 parova baza od početka gena povezanih s *N*-glikozilacijom IgG-a (Tablica 7.). Nakon što sam

utvrdila da postoje potencijalna mjesta vezanja, napravila sam kromatinsku imunoprecipitaciju u stanicama NALM-6. Te stanice koristila sam jer imaju vrlo visoku ekspresiju proteina BACH2. Metoda se temelji na fiksaciji proteina i DNA, te imunoprecipitaciji fiksiranih struktura upotrebom specifičnog antitijela, u ovom slučaju antitijela za protein BACH2. Nakon kromatinske imunoprecipitacije, dobivene molekule DNA analizirane su sekvenciranjem nove generacije. Pošto je gen *BACH2* prethodno povezan s glikanskom strukturom koja sadrži galaktozu na 6-ruci, jedna od pretpostavki ovog istraživanja je bila da se protein BACH2 možda veže na gene koji kodiraju za galaktoziltranferaze,. Međutim, u ovom istraživanju nisam utvrdila da se protein BACH2 u stanicama NALM-6 veže na gene koji kodiraju za te enzime niti druge gene uključene u *N*-glikozilaciju IgG-a (Slika 23. i Slika 24.). Analizom je utvrđeno da se protein BACH2 veže otprilike 10 000 parova baza uzvodno od TSS-a u promotoru gena *IKZF1*, koji kodira za transkripcijski faktor uključen u diferencijaciju B- i T-limfocita, te u blizini TSS-a samog gena *BACH2* (Slika 23. i Slika 24.). Moguće je da protein BACH2 regulira ekspresiju nekih drugih gena koji nisu analizirani u ovom eksperimentu ili gena koji dosadašnjim istraživanjima nisu povezani s *N*-glikozilacijom IgG-a. Također je moguće da stanice NALM-6 nisu dobar model za analizu uloge proteina BACH2 u ovom procesu jer su to prekursori B-limfocita i ne proizvode molekule IgG. Bolji model bili bi B-limfociti, plazma-stanice ili stanice hibridoma koje luče IgG, ali je njihov nedostatak preniska ekspresija proteina BACH2 i posljedično nemogućnost izvođenja kvalitetnog eksperimenta kromatinske imunoprecipitacije. Stanice Arh-77 predstavljaju leukemiju plazma-stanica koje luče IgG (197). Te stanice luče molekule IgG-a u medij u kojem rastu, ali količina IgG-a nije bila dovoljna za analizu metodom HPLC-a koja je bila dostupna u ovom istraživanju. Na tim stanicama se isto tako ne bi mogla napraviti kromatinska imunoprecipitacija jer je ekspresija proteina BACH2 vrlo niska. Još jedan mogući model bile bi stanice HEK293 Freestyle koje su transfecirane plazmidima koji nose gene za laki i teški lanac molekule IgG. Radi se o tranzijentnom sustavu koji se koristi za proizvodnju velike količine antitijela IgG-a (198). Očekujem da bi se u ovom staničnom sustavu trebao pojačano eksprimirati i protein BACH2, te bi bilo korisno promatrati utječe li promjena njegove ekspresije na glikanski profil IgG-a. Za detaljnije razumijevanje uloge proteina BACH2 u vrlo složenom procesu *N*-glikozilacije IgG-a bilo bi od iznimne važnosti napraviti spomenute eksperimente.

Daljnje istraživanje epigenetičkih promjena (metilacije DNA i histonskih modifikacija) u genu *BACH2* u upalnim bolestima crijeva i u drugim upalnim bolestima u kojima dolazi do

promjena u kompoziciji glikana na molekulama IgG-a dalo bi veliki doprinos u razumijevanju patogeneze upalnih bolesti. U takvim istraživanjima bi se potencijalno mogao pronaći biomarker koji bi zadovoljavao sve uvjete specifičnosti i osjetjivosti. Također bi dodatna istraživanja uloge proteina BACH2 mogla rasvijetliti dio biosintetskog puta glikana IgG-a i mehanizme alterativne glikozilacije u upalnim bolestima i tumorima.

6. ZAKLJUČCI

- U Crohnovoj bolesti dolazi do hipometilacije regije gena *BACH2* u stanicama periferne krvi i B-limfocitima $CD19^+$.
- Ciljana metilacija promotorske regije gena *BACH2* u stanicama HEK293 ne uzrokuje smanjenje ekspresije gena *BACH2*.
- Metilacija gena *BACH2* iz stanica periferne krvi u dvije kohorte ispitanika ne korelira značajno s glikanskim strukturama IgG-a tih ispitanika.
- Metilacija i ekpresija gena *Bach2* razlikuju se u različitim klonovima mišjih hibridoma, ali su kod svih u pozitivnoj korelaciji.
- Metilacija gena *Bach2* pozitivno korelira s glikanskim strukturama H6N4F1G1 i H4N4F1G1 koje na srži glikana imaju vezanu sržnu fukozu, galaktozu i N-glikolilneuraminsku kiselinu, te sa strukturom H3N4F1 (srž glikana s vezanom sržnom fukozom).
- Metilacija gena *Bach2* negativno korelira sa strukturama H4N4F1 (srž glikana s galaktozom i sržnom fukozom), H5N4F1 i H5N4F1G1, koje na srži imaju sržnu fukozu i dvije galaktoze bez ili s N-glikolilneuraminskom kiselinom.
- Ekspresija gena *Bach2* negativno korelira s glikanskom strukturom H5N4F1G2 koja na srži glikana ima vezanu sržnu fukozu, dvije galaktoze i dvije N-glikolilneuraminske kiseline.
- Ekspresija gena *BACH2* regulirana je CpG-metilacijom i histonskim modifikacijama u promotoru gena u staničnim linijama NALM-6, LCL i Arh-77.
- Transkripcijski faktor BACH2 veže se u području mjesta početka transkripcije gena *BACH2* i oko 10000 pb od mjesta početka transkripcije gena *IKZF1*, ali se ne veže u promotorima analiziranih gena povezanih s glikozilacijom IgG-a.

Rezultati ovog istraživanja upućuju na indirektnu ulogu proteina BACH2 u *N*-glikozilaciji IgG-a kroz regulaciju transkripcije gena koji kodiraju za proteine indirektno uključene u taj proces ili gena koji dosad nisu povezani s *N*-glikozilacijom IgG-a. Osim uloge u *N*-glikozilaciji IgG-a, rezultati dobiveni u ovom istraživanju upućuju na ulogu gena *BACH2* u upalnim bolestima crijeva jer u njima dolazi do promjena u CpG-metilaciji promotora ovoga gena.

7. LITERATURA

1. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases. ChemBioChem. 2010 Nov 29;12(2):206–22.

2. Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. Nat Rev Genet. 2017;18(9):517–34.

3. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands - "A rough guide." FEBS Lett. 2009;583(11):1713–20.

4. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. Genes Dev. 2011 May 15;25(10):1010–22.

5. Fleischer T, Tekpli X, Mathelier A, Wang S, Nebdal D, Dhakal HP, et al. DNA methylation at enhancers identifies distinct breast cancer lineages. Nat Commun. 2017;8(1).

6. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res. 2011;21(3):381–95.

7. Bergman Y, Cedar H. DNA methylation dynamics in health and disease. Nat Struct Mol Biol. 2013;20(3):274–81.

8. Abraham C, Cho JH. Inflammatory Bowel Disease. New Engl J Med. 2009;361(21):2066–78.

9. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R, Takahashi A, et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. Nat Genet. 2015 Jul 20;47:979.

10. Kallies A, Nutt SL. Bach2 : plasma-cell differentiation takes a break. EMBO J. 2010;29(23):3896–7.

11. Igarashi K, Ochiai K, Itoh-Nakadai A, Muto A. Orchestration of plasma cell differentiation by Bach2 and its gene regulatory network. Immunol Rev. 2014;261(1):116–25.

12. Lauc G, Huffman JE, Pučić M, Zgaga L, Adamczyk B, Mužinić A, et al. Loci Associated with N-Glycosylation of Human Immunoglobulin G Show Pleiotropy with Autoimmune Diseases and Haematological Cancers. PLoS Genet. 2013;9(1).

13. Kaneko Y. Anti-Inflammatory Activity of Immunoglobulin G Resulting from Fc Sialylation. Science (80-). 2006;313(5787):670–3.

14. Nimmerjahn F, Ravetch J V. The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. J Exp Med. 2007;204(1):11–5.

15. Schwab I, Nimmerjahn F. Intravenous immunoglobulin therapy: How does IgG modulate the immune system? Nat Rev Immunol. 2013;13(3):176–89.

16. Quast I, Keller CW, Maurer MA, Giddens JP, Tackenberg B, Wang L-X, et al. Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. J Clin Invest.

2015 Nov 2;125(11):4160–70.

17. Vučković F, Krištić J, Gudelj I, Teruel M, Keser T, Pezer M, et al. Association of Systemic Lupus Erythematosus With Decreased Immunosuppressive Potential of the IgG Glycome. Arthritis Rheumatol. 2015 Jul 21;67(11):2978–89.

18. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. Nature. 1985 Aug 1;316:452.

19. Dubé R, Rook GA, Steele J, Brealey R, Dwek R, Rademacher T, et al. Agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease: correlation with C-reactive protein. Gut. 1990;31(4):431–4.

20. Vučković F, Theodoratou E, Thaçi K, Timofeeva M, Vojta A, Štambuk J, et al. IgG Glycome in Colorectal Cancer. Clin Cancer Res. 2016/02/01. 2016 Jun 15;22(12):3078–86.

21. Gudelj I, Salo PP, Trbojević-Akmačić I, Albers M, Primorac D, Perola M, et al. Low galactosylation of IgG associates with higher risk for future diagnosis of rheumatoid arthritis during 10 years of follow-up. Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis. 2018;1864(March):2034–9.

22. Trbojević Akmačić I, Ventham NT, Theodoratou E, Vučković F, Kennedy NA, Krištić J, et al. Inflammatory Bowel Disease Associates with Proinflammatory Potential of the Immunoglobulin G Glycome. Inflamm Bowel Dis. 2015;21(6):1.

23. Šimurina M, de Haan N, Vučković F, Kennedy NA, Štambuk J, Falck D, et al. Glycosylation of Immunoglobulin G Associates With Clinical Features of Inflammatory Bowel Diseases. Gastroenterology. 2018;154(5):1320–1333.e10.

24. Zhang G, Pradhan S. Mammalian epigenetic mechanisms. IUBMB Life. 2014;66(4):240–56.

25. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: Roles in mammalian development. Nat Rev Genet. 2013;14(3):204–20.

26. Kriaucionis S, Heintz N. The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain. 2009;324(May):929–31.

27. Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, et al. Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. 2011;333(September):1300–4.

28. Wu TP, Wang T, Seetin MG, Lai Y, Zhu S, Lin K, et al. DNA methylation on N6-adenine in mammalian embryonic stem cells. Nature. 2016;532(7599):329–33.

29. Reik W. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. Science (80-). 2001;293(5532):1089–93.

30. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. 1999;99:247–57.

31. Bostick M, Kim JK, Esteve P-O, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE. UHRF1 Plays a Role in Maintaining DNA Methylation in Mammalian Cells. Science (80-). 2007;317(5845):1760–4.

32. Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. J Biol Chem. 2004;279(26):27816–23.

33. Okano M, Xie S, Li E. Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. Nucleic Acids Res. 1998;26(11):2536–40.

34. Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A. The human Dnmt2 has residual DNA-(Cytosine-C5) methyltransferase activity. J Biol Chem. 2003;278(34):31717–21.

35. Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. 2009;(May):930–6.

36. Ito S, Alessio ACD, Taranova O V, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion , ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. Nature. 2010;466(7310):1129–33.

37. Vilkaitis G, Suetake I, Klimašauskas S, Tajima S. Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase. J Biol Chem. 2005;280(1):64–72.

38. Goyal R, Reinhardt R, Jeltsch A. Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. Nucleic Acids Res. 2006;34(4):1182–8.

39. Kagiwada S, Kurimoto K, Hirota T, Yamaji M, Saitou M. Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. EMBO J. 2012;32(3):340–53.

40. Macleod D, Ali RR, Bird A. An alternative promoter in the mouse major histocompatibility complex class II I-Abeta gene: implications for the origin of CpG islands. Mol Cell Biol. 1998;18(8):4433–43.

41. Sleutels F, Zwart R, Barlow DP. The non-coding *Air* RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. Nature. 2002;415(6873):810–3.

42. Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr ARW, James KD, Turner DJ, et al. Orphan CpG Islands Identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. PLoS Genet. 2010;6(9).

43. Watt F, Molloy PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. Genes Dev. 1988;2(9):1136–43.

44. Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. Cell. 1997;88(4):471–81.

45. Nan X, Ng H-H, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a

histone deacetylase complex. Nature. 1998 May 28;393:386.

46. Aran D, Hellman A. XDNA methylation of transcriptional enhancers and cancer predisposition. Cell. 2013;154(1):11–3.

47. Bell RE, Golan T, Sheinboim D, Malcov H, Amar D, Salamon A, et al. Enhancer methylation dynamics contribute to cancer plasticity and patient mortality. Genome Res. 2016;26(5):601–11.

48. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature. 2009;462(7271):315–22.

49. Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M, et al. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. Nat Cell Biol. 2006;8(4):416–24.

50. Jaco I, Canela A, Vera E, Blasco MA. Centromere mitotic recombination in mammalian cells. J Cell Biol. 2008;181(6):885–92.

51. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. Trends Genet. 1997;13(8):335–40.

52. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nat Rev Genet. 2008 Jun;9(6):465–76.

53. Zampieri M, Ciccarone F, Calabrese R, Franceschi C, Bürkle A, Caiafa P. Reconfiguration of DNA methylation in aging. Mech Ageing Dev. 2015;151:60–70.

54. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet. 2002;3(6):415–28.

55. Jones PA, Baylin SB. The Epigenomics of Cancer. Cell. 2007;128(4):683–92.

56. Anwar SL, Wulaningsih W, Lehmann U. Transposable elements in human cancer: Causes and consequences of deregulation. Int J Mol Sci. 2017;18(5).

57. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. Genome biol. 2013;14(10):R115.

58. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet. 2003;33(3S):245–54.

59. Henikoff S, Smith MM. Histone variants and epigenetics. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015;7(1):1–25.

60. Zhou VW, Goren A, Bernstein BE. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. Nat Rev Genet. 2011;12(1):7–18.

61. Hodawadekar SC, Marmorstein R. Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: Structure, mechanism and implications for effector design. Oncogene. 2007;26(37):5528–40.

62. Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: From structure, function and regulation to novel

strategies for therapy and prevention. Oncogene. 2007;26(37):5310–8.

63. Tjeertes J V., Miller KM, Jackson SP. Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. EMBO J. 2009;28(13):1878–89.

64. Parthun MR. Hat1: The emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. Oncogene. 2007;26(37):5319–28.

65. Pradeepa MM. Causal role of histone acetylations in enhancer function. Transcription. 2017;8(1):40–7.

66. Tamaru H, Zhang X, McMillen D, Singh PB, Nakayama J, Grewal SI, et al. Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in Neurospora crassa. Nat Genet. 2003 Apr 7;34:75.

67. Xiao B, Jing C, Wilson JR, Walker PA, Vasisht N, Kelly G, et al. Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. Nature. 2003;421(February):652–6.

68. Stock JK, Giadrossi S, Casanova M, Brookes E, Vidal M, Koseki H, et al. Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. Nat Cell Biol. 2007;9(12):1428–35.

69. Zhou W, Zhu P, Wang J, Pascual G, Ohgi KA, Lozach J, et al. Histone H2A Monoubiquitination Represses Transcription by Inhibiting RNA Polymerase II Transcriptional Elongation. Mol Cell. 2008;29(1):69–80.

70. Eskeland R, Leeb M, Grimes GR, Kress C, Boyle S, Sproul D, et al. Ring1B Compacts Chromatin Structure and Represses Gene Expression Independent of Histone Ubiquitination. Mol Cell. 2010;38(3):452–64.

71. Simon JA, Kingston RE. Mechanisms of Polycomb gene silencing: Knowns and unknowns. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(10):697–708.

72. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, et al. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. Cell. 2007;129(4):823–37.

73. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. Nature. 2007;448(7153):553–60.

74. Kornblihtt AR, Schor IE, Allo M, Blencowe BJ. When chromatin meets splicing. Nat Struct Mol Biol. 2009;16(9):902–3.

75. Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, et al. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. Nat Genet. 2007;39(3):311–8.

76. Hon G, Wang W, Ren B. Discovery and annotation of functional chromatin signatures in the human genome. PLoS Comput Biol. 2009;5(11).

77. Van Attikum H, Gasser SM. The histone code at DNA breaks: A guide to repair? Nat

Rev Mol Cell Biol. 2005;6(10):757–65.

78. Rossetto D, Truman AW, Kron SJ, Côté J. Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. Clin Cancer Res. 2010;16(18):4543–52.

79. Rossetto D, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: A chromatin modification involved in diverse nuclear events. Epigenetics. 2012;7(10):1098–108.

80. Sakabe K, Wang Z, Hart GW. β-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. Proc Natl Acad Sci. 2010;107(46):19915–20.

81. Zhang S, Roche K, Nasheuer HP, Lowndes NF. Modification of histones by sugar β-N-acetylglucosamine (GlcNAc) occurs on multiple residues, including histone H3 serine 10, and is cell cycle-regulated. J Biol Chem. 2011;286(43):37483–95.

82. Zhou Y, Wu H, Zhao M, Chang C, Lu Q. The Bach Family of Transcription Factors: A Comprehensive Review. Clin Rev Allergy Immunol. 2016;50(3):345–56.

83. Oyake T, Itoh K, Motohashi H, Hayashi N, Hoshino H, Nishizawa M, et al. 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. Mol Cell Biol. 1996;16(11):6083–95.

84. Muto A, Hoshino H, Madisen L, Yanai N, Obinata M, Karasuyama H, et al. Identification of Bach2 as a B-cell-specific partner for small Maf proteins that negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 3′ enhancer. EMBO J. 1998 Oct 1;17(19):5734 LP-5743.

85. Tsukumo S -i., Unno M, Muto A, Takeuchi A, Kometani K, Kurosaki T, et al. Bach2 maintains T cells in a naive state by suppressing effector memory-related genes. Proc Natl Acad Sci. 2013;110(26):10735–40.

86. Kometani K, Nakagawa R, Shinnakasu R, Kaji T, Rybouchkin A, Moriyama S, et al. Repression of the Transcription Factor Bach2 Contributes to Predisposition of IgG1 Memory B Cells toward Plasma Cell Differentiation. Immunity. 2013;39(1):136–47.

87. Roychoudhuri R, Hirahara K, Mousavi K, Clever D, Klebanoff CA, Bonelli M, et al. BACH2 represses effector programs to stabilize T reg-mediated immune homeostasis. Nature. 2013;498(7455):506–10.

88. Nakamura A, Ebina-Shibuya R, Itoh-Nakadai A, Muto A, Shima H, Saigusa D, et al. Transcription repressor Bach2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function. J Exp Med. 2013;210(11):2191–204.

89. Ochiai K, Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Noda T, Karasuyama H, et al. Plasmacytic transcription factor Blimp-1 is repressed by Bach2 in B cells. J Biol Chem. 2006;281(50):38226–34.

90. Delogu A, Schebesta A, Sun Q, Aschenbrenner K, Perlot T, Busslinger M. Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. Immunity. 2006;24(3):269–81.

91. Hoshino H, Igarashi K. Expression of the Oxidative Stress-Regulated Transcription

Factor Bach 2 in Differentiating Neuronal Cells. J Biochem. 2002;132(3):427–31.

92. Muto A, Tashiro S, Nakajima O, Hoshino H, Takahashi S, Sakoda E, et al. The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. Nature. 2004;429(6991):566–71.

93. Muto A, Ochiai K, Kimura Y, Itoh-Nakadai A, Calame KL, Ikebe D, et al. Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch. EMBO J. 2010;29(23):4048–61.

94. Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. Immunity. 2002;17(1):51–62.

95. Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, Moriyama S, Adachi Y, Nakayama M, et al. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. Nat Immunol. 2016;17(7):861–9.

96. Rad R, Rad L, Wang W, Cadinanos J, Vassiliou G, Rice S, et al. *PiggyBac* Transposon Mutagenesis: A Tool for Cancer Gene Discovery in Mice. Science (80-). 2010 Nov 19;330(6007):1104 LP-1107.

97. Swaminathan S, Huang C, Geng H, Chen Z, Harvey R, Kang H, et al. BACH2 mediates negative selection and p53-dependent tumor suppression at the pre-B cell receptor checkpoint. Nat Med. 2013;19(8):1014–22.

98. Kobayashi S, Taki T, Chinen Y, Tsutsumi Y, Ohshiro M, Kobayashi T, et al. Identification of IGHCδ-BACH2 fusion transcripts resulting from cryptic chromosomal rearrangements of 14q32 with 6q15 in aggressive B-cell lymphoma/leukemia. Genes, Chromosom Cancer. 2011 Apr 1;50(4):n/a-n/a.

99. Takakuwa T, Luo WJ, Ham MF, Sakane-Ishikawa F, Wada N, Aozasa K. Integration of Epstein-Barr Virus into Chromosome 6q15 of Burkitt Lymphoma Cell Line (Raji) Induces Loss of BACH2 Expression. Am J Pathol. 2004;164(3):967–74.

100. Ichikawa S, Fukuhara N, Katsushima H, Takahashi T, Yamamoto J, Yokoyama H, et al. Association between BACH2 expression and clinical prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. Cancer Sci. 2014;105(4):437–44.

101. Sakane-Ishikawa E, Nakatsuka S-I, Tomita Y, Fujita S, Nakamichi I, Takakuwa T, et al. Prognostic significance of BACH2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2005;23(31):8012–7.

102. Franke A, McGovern DPB, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL, Ahmad T, et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. Nat Genet. 2010 Nov 21;42:1118.

103. Christodoulou K, Wiskin AE, Gibson J, Tapper W, Willis C, Afzal NA, et al. Next generation exome sequencing of paediatric inflammatory bowel disease patients identifies rare and novel variants in candidate genes. Gut. 2013;62(7):977–84.

104. Plagnol V, Howson JMM, Smyth DJ, Walker N, Hafler JP, Wallace C, et al. Genome-wide association analysis of autoantibody positivity in type 1 diabetes cases. PLoS

Genet. 2011;7(8).

105. Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM, Plagnol V, Walker NM, Allen JE, et al. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. Nat Genet. 2008 Nov 2;40:1399.

106. Dubois PCA, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. Nat Genet. 2010 Feb 28;42:295.

107. Jin Y, Birlea SA, Fain PR, Ferrara TM, Ben S, Riccardi SL, et al. Genome-wide association analyses identify 13 new susceptibility loci for generalized vitiligo. Nat Genet. 2012 May 6;44:676.

108. Ferreira MAR, Matheson MC, Duffy DL, Marks GB, Hui J, Le Souëf P, et al. Identification of *IL6R* and chromosome 11q13.5 as risk loci for asthma. Lancet. 2018 Mar 4;378(9795):1006–14.

109. McAllister K, Yarwood A, Bowes J, Orozco G, Viatte S, Diogo D, et al. Brief report: Identification of BACH2 and RAD51B as rheumatoid arthritis susceptibility loci in a meta-analysis of genome-wide data. Arthritis Rheum. 2013;65(12):3058–62.

110. Elboudwarej E, Cole M, Briggs FBS, Fouts A, Fain PR, Quach H, et al. Hypomethylation within gene promoter regions and type 1 diabetes in discordant monozygotic twins. J Autoimmun. 2016 Apr 1;68:23–9.

111. Haam K, Kim HJ, Lee KT, Kim JH, Kim M, Kim SY, et al. Epigenetic silencing of BTB and CNC homology 2 and concerted promoter CpG methylation in gastric cancer. Cancer Lett. 2014;351(2):206–14.

112. Vojta A, Dobrinic P, Tadic V, Bockor L, Korac P, Julg B, et al. Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. Nucleic Acids Res. 2016;44(12):5615–28.

113. Kuwahara M, Suzuki J, Tofukuji S, Yamada T, Kanoh M, Matsumoto A, et al. The Menin–Bach2 axis is critical for regulating CD4 T-cell senescence and cytokine homeostasis. Nat Commun. 2014;5:1–12.

114. Porstner M, Winkelmann R, Daum P, Schmid J, Pracht K, Côrte-Real J, et al. MiR-148a promotes plasma cell differentiation and targets the germinal center transcription factors Mitf and Bach2. Eur J Immunol. 2015;45(4):1206–15.

115. Nairn A V., York WS, Harris K, Hall EM, Pierce JM, Moremen KW. Regulation of glycan structures in animal tissues: Transcript profiling of glycan-related genes. Vol. 283, Journal of Biological Chemistry. 2008. 17298-17313 p.

116. Janeway CA, Travers P, Walport M, Schlomchick MJ. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th ed. New York: Garland Science; 2001.

117. Lin C-W, Tsai M-H, Li S-T, Tsai T-I, Chu K-C, Liu Y-C, et al. A common glycan structure on immunoglobulin G for enhancement of effector functions. Proc Natl Acad Sci. 2015 Aug 25;112(34):10611 LP-10616.

118. van de Bovenkamp FS, Hafkenscheid L, Rispens T, Rombouts Y. The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. J Immunol. 2016;196(4):1435–41.

119. Karsten CM, Pandey MK, Figge J, Kilchenstein R, Taylor PR, Rosas M, et al. Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. Nat Med. 2012 Aug 26;18:1401.

120. Masuda K, Kubota T, Kaneko E, Iida S, Wakitani M, Kobayashi-Natsume Y, et al. Enhanced binding affinity for FcγRIIIa of fucose-negative antibody is sufficient to induce maximal antibody-dependent cellular cytotoxicity. Mol Immunol. 2007;44(12):3122–31.

121. Shen X, Klarić L, Sharapov S, Mangino M, Ning Z, Wu D, et al. Multivariate discovery and replication of five novel loci associated with Immunoglobulin G N-glycosylation. Nat Commun. 2017;8(1):1–10.

122. Wahl A, van den Akker E, Klaric L, Štambuk J, Benedetti E, Plomp R, et al. Genome-wide association study on immunoglobulin G glycosylation patterns. Front Immunol. 2018;9(FEB):1–14.

123. Zoldoš V, Grgurević S, Lauc G. Epigenetic regulation of protein glycosylation. Biomol Concepts. 2010;1(3–4):253–61.

124. Horvat T, Zoldoš V, Lauc G. Evolutional and clinical implications of the epigenetic regulation of protein glycosylation. Clin Epigenetics. 2011 Aug;2(2):425–32.

125. Menni C, Keser T, Mangino M, Bell JT, Erte I, Akmačić I, et al. Glycosylation of immunoglobulin G: Role of genetic and epigenetic influences. PLoS One. 2013;8(12):6–13.

126. Luo Y, Lu X, Xie H. Dynamic Alu Methylation during Normal Development, Aging, and Tumorigenesis. Biomed Res Int. 2014;2014.

127. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. Nat Genet. 2008 Jun 29;40:955.

128. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. Nat Genet. 2010 May 9;42:508.

129. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. Nature. 2012 Nov 1;491(7422):119–24.

130. Gornik O, Wagner J, Pučić M, Knežević A, Redžić I, Lauc G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. Glycobiology. 2009 Dec 1;19(12):1547–53.

131. Novokmet M, Lukić E, Vučković F, Durić Ž, Keser T, Rajšl K, et al. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. Sci Rep. 2014 Mar 11;4:4347.

132. Parekh R, Isenberg D, Ansell B, Roitt I, Dwek R, Rademacher T. Galactosylation of IgG

associated oligosaccharides: reduction in patients with adult and juvenile onset rheumatoid arthritis and relation to disease activity. Lancet. 1988 Apr 30;331(8592):966–9.

133. Ercan A, Cui J, Chatterton DEW, Deane KD, Hazen MM, Brintnell W, et al. Aberrant IgG galactosylation precedes disease onset, correlates with disease activity, and is prevalent in autoantibodies in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2010;62(8):2239–48.

134. Rombouts Y, Ewing E, van de Stadt LA, Selman MHJ, Trouw LA, Deelder AM, et al. Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 2013 Oct 8;

135. Theodoratou E, Thaçi K, Agakov F, Timofeeva MN, Stambuk J, Pucic-Bakovic M, et al. Glycosylation of plasma IgG in colorectal cancer prognosis. Sci Rep. 2016;6(June):1–12.

136. Lauc G, Pezer M, Rudan I, Campbell H. Mechanisms of disease: The human N-glycome. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 2016;1860(8):1574–82.

137. Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. J Crohn's Colitis. 2013;7(4):322–37.

138. Neurath MF. Current and emerging therapeutic targets for IBD. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017;14(5):269–78.

139. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. Nat Genet. 2011 Feb 6;43:246.

140. Hugot J-P, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard J-P, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature. 2001 May 31;411:599.

141. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature. 2001 May 31;411:603.

142. Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR, et al. Environmental triggers in IBD: A review of progress and evidence. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2018;15(1):39–49.

143. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature. 2007;448(7152):427–34.

144. Bonaz BL, Bernstein CN. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 2013;144(1):36–49.

145. Rubin DT, Hanauer SB. Smoking and inflammatory bowel disease. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2000 Aug;12(8):855—862.

146. Pituch-Zdanowska A, Banaszkiewicz A, Albrecht P. The role of dietary fibre in inflammatory bowel disease. Prz Gastroenterol. 2015;10(3):135–41.

147. Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. DNA methylation in inflammatory bowel disease and beyond. World J Gastroenterol. 2013;19(32):5238–49.

148. Ventham NT, Kennedy NA, Nimmo ER, Satsangi J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: The emerging role of epigenetics. Gastroenterology. 2013;145(2):293–308.

149. Adams AT, Kennedy NA, Hansen R, Ventham NT, O'Leary KR, Drummond HE, et al. Two-stage Genome-wide Methylation Profiling in Childhood-onset Crohn's Disease Implicates Epigenetic Alterations at the VMP1/MIR21 and HLA Loci. Inflamm Bowel Dis. 2014;20(10):1784–93.

150. Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, Roberts H, Keskey B, Pan J, et al. Plasma MiR-21: A potential diagnostic marker of colorectal cancer. Ann Surg. 2012;256(3):544–51.

151. Lu TX, Hartner J, Lim E-J, Fabry V, Mingler MK, Cole ET, et al. MicroRNA-21 Limits In Vivo Immune Response-Mediated Activation of the IL-12/IFN- Pathway, Th1 Polarization, and the Severity of Delayed-Type Hypersensitivity. J Immunol. 2011;187(6):3362–73.

152. Chang C-C, Zhang Q-Y, Liu Z, Clynes RA, Suciu-Foca N, Vlad G. Downregulation of Inflammatory MicroRNAs by Ig-like Transcript 3 Is Essential for the Differentiation of Human CD8+ T Suppressor Cells. J Immunol. 2012 Apr 1;188(7):3042 LP-3052.

153. Sawant D V., Wu H, Kaplan MH, Dent AL. The Bcl6 target gene microRNA-21 promotes Th2 differentiation by a T cell intrinsic pathway. Mol Immunol. 2013 Jul 1;54(3–4):435–42.

154. Ludwig K, Fassan M, Mescoli C, Pizzi M, Balistreri M, Albertoni L, et al. PDCD4/miR-21 dysregulation in inflammatory bowel disease-associated carcinogenesis. Virchows Arch. 2013;462(1):57–63.

155. Ventham NT, Kennedy NA, Adams AT, Kalla R, Heath S, O'Leary KR, et al. Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease. Nat Commun. 2016;7.

156. Klasić M, Markulin D, Vojta A, Samaržija I, Biruš I, Dobrinić P, et al. Promoter methylation of the MGAT3 and BACH2 genes correlates with the composition of the immunoglobulin G glycome in inflammatory bowel disease. Clin Epigenetics. 2018;10(1):1–14.

157. Kalla R, Ventham NT, Kennedy NA, Quintana JF, Nimmo ER, Buck AH, et al. MicroRNAs: New players in IBD. Gut. 2015;64(3):504–17.

158. Silva FAR, Rodrigues BL, Ayrizono MDLS, Leal RF. The Immunological Basis of Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterol Res Pract. 2016;2016.

159. Gustafsson B. Fusion Protocol for the Production of Mouse Hybridomas. In: Walker JM, Pollard JW, Walker JM, editors. Animal Cell Culture. Totowa, NJ: Humana Press; 1990. p. 601–7.

160. Monti M. Epigenetics protocols. Eur J Histochem. 2012;56(2):8.

161. Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. Nat Methods. 2014;11(8):783–4.

162. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc. 2008;3(6):1101–8.

163. Park SW, Chen SW, Kim M, Brown KM, Kolls JK, D'Agati VD, et al. Cytokines induce small intestine and liver injury after renal ischemia or nephrectomy. Lab Investig. 2011;91(1):63–84.

164. Lin X, Tirichine L, Bowler C. Protocol: Chromatin immunoprecipitation (ChIP) methodology to investigate histone modifications in two model diatom species. Plant Methods. 2012;8(1):1–9.

165. Jolma A, Yan J, Whitington T, Toivonen J, Nitta KR, Rastas P, et al. DNA-binding specificities of human transcription factors. Cell. 2013;152(1–2):327–39.

166. Huang C, Geng H, Boss I, Wang L, Melnick A. Cooperative transcriptional repression by BCL6 and BACH2 in germinal center B-cell differentiation. Blood. 2014;123(7):1012–20.

167. Laffin MR, Fedorak RN, Wine E, Dicken B, Madsen KL. A *BACH2* Gene Variant Is Associated with Postoperative Recurrence of Crohn's Disease. J Am Coll Surg. 2018 May 1;226(5):902–8.

168. Viennois E, Zhao Y, Merlin D. Biomarkers of IBD: from classical laboratory tools to personalized medicine. Inflamm Bowel Dis. 2015 Oct;21(10):2467–74.

169. Ruemmele FM, Targan SR, Levy G, Dubinsky M, Braun J, Seidman EG. Diagnostic accuracy of serological assays in pediatric inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 1998 Oct 1;115(4):822–9.

170. Reese GE, Constantinides VA, Simillis C, Darzi AW, Orchard TR, Fazio VW, et al. Diagnostic Precision of Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibodies and Perinuclear Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in Inflammatory Bowel Disease. Am J Gastroenterol. 2006 Oct 1;101:2410.

171. Joossens S, Reinisch W, Vermeire S, Sendid B, Poulain D, Peeters M, et al. The value of serologic markers in indeterminate colitis: A prospective follow-up study. Gastroenterology. 2002 May 1;122(5):1242–7.

172. Nimmo ER, Prendergast JG, Aldhous MC, Kennedy N a, Henderson P, Drummond HE, et al. Genome-wide methylation profiling in Crohn's disease identifies altered epigenetic regulation of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. Inflamm Bowel Dis. 2012 May;18(5):889–99.

173. Häsler R, Feng Z, Bäckdahl L, Spehlmann ME, Franke A, Teschendorff A, et al. A functional methylome map of ulcerative colitis. Genome Res . 2012 Nov 1;22(11):2130–7.

174. Cooke J, Zhang H, Greger L, Silva A-L, Massey D, Dawson C, et al. Mucosal Genome-wide Methylation Changes in Inflammatory Bowel Disease. Inflamm Bowel Dis. 2012 Nov 1;18(11):2128–37.

175. Harris RA, Nagy-Szakal D, Pedersen N, Opekun A, Bronsky J, Munkholm P, et al. Genome Wide Peripheral Blood Leukocyte DNA Methylation Microarrays Identified a Single Association with Inflammatory Bowel Diseases. Inflamm Bowel Dis. 2012 Dec 29;18(12):10.1002/ibd.22956.

176. Harris RA, Nagy-Szakal D, Mir SA V, Frank E, Szigeti R, Kaplan JL, et al. DNA methylation-associated colonic mucosal immune and defense responses in treatment-naïve pediatric ulcerative colitis. Epigenetics. 2014 Aug 6;9(8):1131–7.

177. McDermott E, Ryan EJ, Tosetto M, Gibson D, Burrage J, Keegan D, et al. DNA Methylation Profiling in Inflammatory Bowel Disease Provides New Insights into Disease Pathogenesis. J Crohn's Colitis. 2016 Jan 1;10(1):77–86.

178. Reinius LE, Acevedo N, Joerink M, Pershagen G, Dahlén SE, Greco D, et al. Differential DNA methylation in purified human blood cells: Implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. PLoS One. 2012;7(7).

179. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. Nature. 2008 Jul 6;454:766.

180. Esteller M. Epigenetics in Cancer. N Engl J Med. 2008;358(11):1148–59.

181. Toperoff G, Aran D, Kark JD, Rosenberg M, Dubnikov T, Nissan B, et al. Genome-wide survey reveals predisposing diabetes type 2-related DNA methylation variations in human peripheral blood. Hum Mol Genet. 2012 Jan 15;21(2):371–83.

182. Koestler DC, Marsit CJ, Christensen BC, Accomando W, Langevin SM, Houseman EA, et al. Peripheral blood immune cell methylation profiles are associated with nonhematopoietic cancers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2012;21(8):1293–302.

183. Langevin SM, Koestler DC, Christensen BC, Butler RA, Wiencke JK, Nelson HH, et al. Peripheral blood DNA methylation profiles are indicative of head and neck squamous cell carcinoma: An epigenome-wide association study. Epigenetics. 2012 Mar 1;7(3):291–9.

184. Moore LE, Pfeiffer RM, Poscablo C, Real FX, Kogevinas M, Silverman D, et al. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. Lancet Oncol. 2008 Apr 1;9(4):359–66.

185. Schulz WA. Do DNA-methylation changes also occur in blood? Lancet Oncol. 2008 Apr 1;9(4):312–3.

186. Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Gayther SA, Apostolidou S, et al. An epigenetic signature in peripheral blood predicts active ovarian cancer. PLoS One. 2009;4(12).

187. Lim U, Flood A, Choi SW, Albanes D, Cross AJ, Schatzkin A, et al. Genomic Methylation of Leukocyte DNA in Relation to Colorectal Adenoma Among Asymptomatic Women. Gastroenterology. 2008;134(1):47–55.

188. Schmidl C, Klug M, Boeld TJ, Andreesen R, Hoffmann P, Edinger M, et al. Lineage-

specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity. Genome Res. 2009;19(7):1165–74.

189. Wiench M, John S, Baek S, Johnson TA, Sung MH, Escobar T, et al. DNA methylation status predicts cell type-specific enhancer activity. EMBO J. 2011;30(15):3028–39.

190. Jones PA. The DNA methylation paradox. Trends Genet. 1999 Jan 1;15(1):34–7.

191. Lou S, Lee H-M, Qin H, Li J-W, Gao Z, Liu X, et al. Whole-genome bisulfite sequencing of multiple individuals reveals complementary roles of promoter and gene body methylation in transcriptional regulation. Genome Biol. 2014;15(7):408.

192. Flower KJ, Shenker NS, El-Bahrawy M, Goldgar DE, Parsons MT, Spurdle AB, et al. DNA methylation profiling to assess pathogenicity of BRCA1 unclassified variants in breast cancer. Epigenetics. 2015;10(12):1121–32.

193. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sadda SV, et al. Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. Mol Cell. 2013;49(2):359–67.

194. Adams CD, Jordahl KM, Copeland W, Mirick DK, Song X, Sather CL, et al. Nightshift work, chronotype, and genome-wide DNA methylation in blood. Epigenetics. 2017 Oct 3;12(10):833–40.

195. Uittenboogaard LM, Payan-Gomez C, Pothof J, van IJcken W, Mastroberardino PG, van der Pluijm I, et al. BACH2: A marker of DNA damage and ageing. DNA Repair (Amst). 2013;12(11):982–92.

196. Pulecio J, Verma N, Mejía-Ramírez E, Huangfu D, Raya A. CRISPR/Cas9-Based Engineering of the Epigenome. Cell Stem Cell. 2017;21(4):431–47.

197. Drewinko B, Mars W, Minowada J, Burk KH, Trujillo JM. ARH-77, an established human IgG-producing myeloma cell line. I. morphology, B-cell phenotypic marker profile, and expression of epstein-barr virus. Cancer. 1984;54(9):1883–92.

198. Vink T, Oudshoorn-Dickmann M, Roza M, Reitsma JJ, de Jong RN. A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies. Methods. 2014;65(1):5–10.

8. ŽIVOTOPIS

Marija Klasić, znanstvena novakinja – asistentica, rođena je 10. listopada 1986. godine u Zagrebu. Završila je diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2012. godine. Diplomski rad „Heterologna ekspresija gena *TaMAB2* u transgenim biljkama *Arabidopsis thaliana*“ napravila je pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nataše Bauer na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka PMF-a. Od studenog 2012. godine zaposlena je kao znanstvena novakinja – asistentica na FP7 projektu IBD-BIOM, na istom Zavodu, u grupi prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš. Trenutno je zaposlena na projektu IRI „Nova generacija visokoprotočnih gliko-servisa“, a suradnica je i na HRZZ projektu „Epigenetička regulacija glikozilacije imunoglobulina G“, pod vodstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš.

Doktorski studij Biologije upisala je 2013. godine na Biološkom odsjeku PMF-a. Koautorica je pet izvornih znanstvenih radova objavljenih u časopisima s međunarodnom recenzijom, a sudjelovala je i na međunarodnim znanstvenim skupovima s posterskim priopćenjima. Znanstveno se usavršavala u Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka u Lyonu, Francuska, od veljače do lipnja 2015. godine, u grupi za epigenetiku, pod vodstvom dr. sc. Zdenka Hercega.

Od akademske godine 2013./2014. sudjeluje u izvođenju nastave na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka PMF-a u sklopu kolegija Molekularna citogenetika, Epigenetika, Medicinska genetika, Metode istraživanja u molekularnoj biologiji i Laboratorijska stručna praksa. Također je sudjelovala u vođenju diplomskog rada studentice Anite Slana pod nazivom „Analiza metilacije promotorske regije gena *BACH2* kod infekcije virusom ljudske imunodeficijencije tipa 1“ kao neposredni voditelj.