Analiza metilacije promotorske regije gena BACH2 kod infekcije virusom ljudske imunodeficijencije tipa 1

Slana, Anita

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:578174

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Anita Slana

Analiza metilacije promotorske regije gena *BACH2* kod infekcije virusom ljudske imunodeficijencije tipa 1

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Petre Korać i neposrednim vodstvom mag. biol. mol. Marije Klasić te na Odjelu za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu u sklopu istraživanja projekta Hrvatske zaklade za znanost „Molekularna, epidemiološka i klinička obilježja zaraze HIV-om u Hrvatskoj“ (šifra projekta IP-2014-4461), pod vodstvom doc. dr. sc. Snježane Židovec Lepej. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. sc. Petri Korać na ukazanom povjerenju, razumijevanju i strpljenju tijekom izrade i pisanja ovog rada. Veliko hvala na vremenu, pristupačnosti i trudu kako bih stekla znanje o znanstvenom pisanju i razmišljanju.

Veliko hvala doc. dr. sc. Snježani Židovec Lepej na odgovorima na sva moja pitanja, na vodstvu i na podršci tijekom izrade ovog rada.

Hvala i mag. biol. mol. Mariji Klasić na trudu i velikoj pomoći pri shvaćanju korištenih metoda te pružanju općih znanja o radu i razmišljanju znanstvenog istraživača.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

Analiza metilacije promotorske regije gena *BACH2* kod infekcije virusom ljudske imunodeficijencije tipa 1

Anita Slana

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Zaraza virusom ljudske imunodeficijencije tipa 1 (HIV, eng. *Human immunodeficiency virus type 1*) povezuje se s progresivnim slabljenjem imunološkog sustava koje, ukoliko se ne liječi, uzrokuje smrt. Stanice podložne zarazi su limfociti CD4+. Tijekom infekcije dolazi do smanjenja njihovog broja u krvi HIV-pozitivnih osoba. Kao oblik liječenja HIV-pozitivnih pacijenata razvijena je antiretrovirusna terapija (ART) koja kombinira razne inhibitore virusnih proteina i dovodi do potpune supresije detektabilne viremije u pacijenata. Gen *BACH2* je transkripcijski faktor koji ima ulogu u održavanju homeostaze perifernih naivnih T-limfocita, stvaranju efektorskih memorijskih T-stanica i regulaciji CD4+ senescencije. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati razinu metilacije promotorske regije gena *BACH2* kod HIV-om zaraženih osoba u odnosu na zdravu populaciju te utvrditi postoje li razlike u razini metilacije njegovog promotora koje ovise o statusu ispitanika. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine. Prvu skupinu činili su HIV-pozitivni pacijenti kod kojih se standardnim testovima ne može detektirati prisutnost virusnih kopija. Drugu skupinu činili su HIV-pozitivni pacijenti kod kojih je viremiju moguće detektirati te, u trenutku prikupljanja uzoraka krvi, nisu primali antiretrovirusnu terapiju. Metodom bisulfitne konverzije DNA i pirosekvenciranja odabranih regija promotora gena *BACH2* određen je stupanj metilacije toga promotora. Utvrđeno je da kod obje skupine ispitanika dolazi do povećanja metilacije svih fragmenata promotorske regije u odnosu na kontrolnu zdravu skupinu što upućuje na to da hipermetilacija gena *BACH2* dovodi do njegovog utišavanja koje ima ulogu u povećanju broja efektorskih T-stanica potrebnih za imunološki odgovor na zaražene stanice. Povećana metilacija CpG-otoka kod aviremičnih ispitanika može značiti trajnu promjenu u diferencijaciji T-stanica i homeostazi cijelog imunološkog sustava.

(42 stranice, 15 slika, 2 tablice, 26 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: HIV, metilacija DNA, gen BACH2

Voditelj 1: doc. dr. sc. Petra Korać

Voditelj 2: doc. dr. sc. Snježana Židovec Lepej

Neposredni voditelj: Marija Klasić, mag. biol. mol.

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Petra Korać; doc. dr. sc. Snježana Židovec Lepej; prof. dr. sc. Goran Klobučar; izv. prof. dr. sc. Ana Galov

Rad je prihvaćen: 04. svibnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

Analysis of *BACH2* gene promoter region methylation in infection with Human immunodeficiency virus type 1

Anita Slana

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Infection with Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) leads to progressive deterioration of the immune system, and if untreated, leads to death. Cells susceptible to the infection are CD4+ lymphocytes. Their count diminishes in the blood of HIV-positive people during the infection. Antiretroviral therapy (ART) has been developed as a form of treatment and it combines different viral protein inhibitors and leads to total suppression of detectible viremia in patients. *BACH2* gene codes for a transcription factor with a role in homeostasis of naïve T-lymphocytes, development of effector memory T-cells and regulating CD4+ senescence. The aim of this study was to analyse methylation of *BACH2* promoter region in HIV-1 infected patients in relation to healthy population and determine if there are differences in methylation regarding patient status. Two groups of patients were included in this study. HIV-positive patients in whose blood no viral copies could be detected with standardised tests were first group. HIV-positive patients whose viremia could be detected and at the time of sampling were not receiving therapy were the second group. The level of gene promotor region methylation was detected using bisulfite conversion of the DNA and pyrosequencing. It was shown that both groups of HIV-positive patients have higher *BACH2* methylation in relation to the control group. This finding suggests that there has been a hypermethylation and silencing of *BACH2* gene that leads to an increase in number of effector T-cells needed for immunological response to infected cells. Hypermethylation of CpG-islands in aviremic patients could represent a permanent change in T-cell differentiation and homeostasis of the entire immune system.

(42 pages, 15 figures, 2 tables, 26 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: HIV, DNA methylation, *BACH2* gene

Supervisor 1: Dr. Petra Korać, Assist. Prof.

Supervisor 2: Dr. Snježana Židovec Lepej, Assist. Prof.

Assistant Supervisor: Marija Klasić, MSc

Reviewers: Dr. Petra Korać, Assist. Prof.; Dr. Snježana Židovec Lepej, Assist. Prof.; Dr. Goran Klobučar, Prof.; Dr. Ana Galov, Assist. Prof.

Thesis accepted: May 4, 2017.

SADRŽAJ

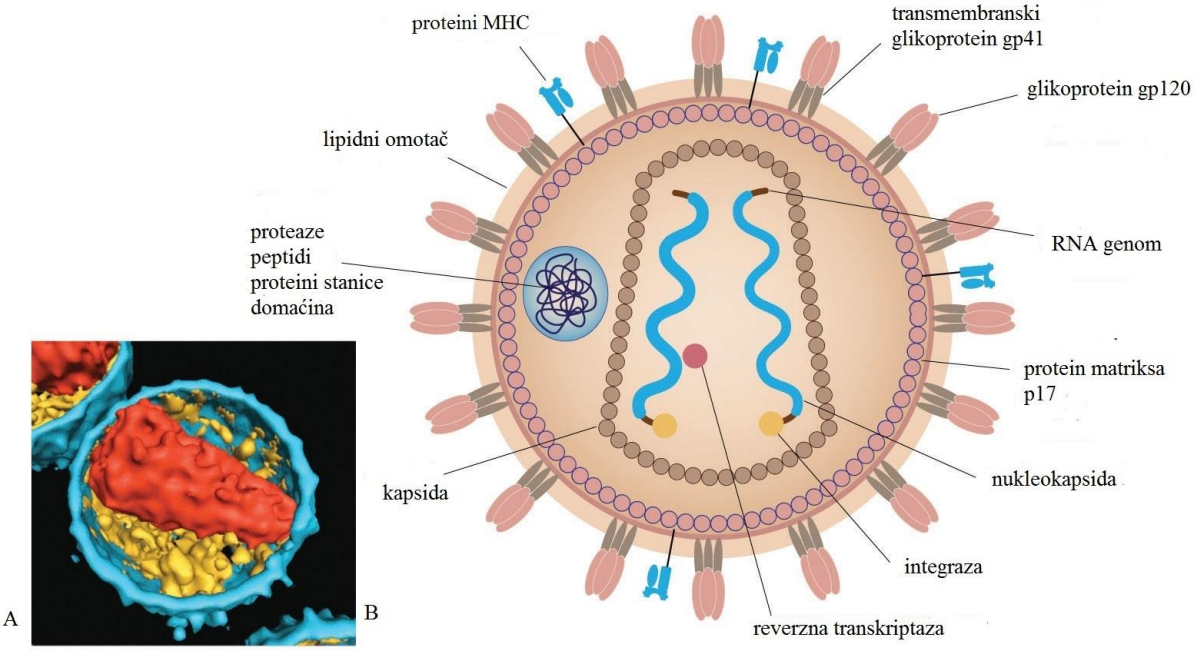
1 UVOD 1
1.1 Virus ljudske imunodeficijencije tipa I 1
1.2 Ulazak virusa u stanicu domaćina 2
1.3 Tijek infekcije 3
1.4 Antiretrovirusna terapija 5
2 EPIGENETIČKI MEHANIZMI 6
2.1 Metilacija DNA 7
2.2 Povezanost metilacije DNA i ekspresije gena 8
3 BACH2 9
4 CILJ ISTRAŽIVANJA 10
5 MATERIJALI I METODE 11
5.1 Uzorci 11
5.2 Izolacija DNA iz pune krvi 11
5.3 Bisulfitna konverzija 11
5.4 Umnažanje fragmenata DNA za pirosekvenciranje 12
5.5 Pirosekvenciranje 15
5.6 Statistička obrada podataka 16
6 REZULTATI 17
6.1 Određivanje koncentracije i kvalitete izolirane DNA 17
6.2 Umnožavanje fragmenata za pirosekvenciranje 18
6.3. Metilacija gena BACH2 18
6.4 Metilacija promotora gena BACH2 u odnosu na klinički status pacijenata 26
6.4.1. Mann-Whitneyev test 26
6.4.2. Spearmanova korelacija 26
7 RASPRAVA 29
8 ZAKLJUČAK 32
9 REFERENCE 33
10 ŽIVOTOPIS 36

1 UVOD

1.1 Virus ljudske imunodeficijencije tipa I

Virus ljudske imunodeficijencije tipa I (od eng. *human immunodeficiency virus type I*, HIV-1) je retrovirus koji pripada porodici *Retroviridae* i rodu *Lentivirus* (International Commitee on Taxonomy of Viruses, ICTV). Istraživači iz Instituta Pasteur su 1983.g. izolirali HIV-1 iz bioptata limfnog čvora muškarca koji je imao spolne odnose s muškarcima i bolovao od kronične multiple limfoadenopatije (Barré-Sinoussi i sur.,1983).

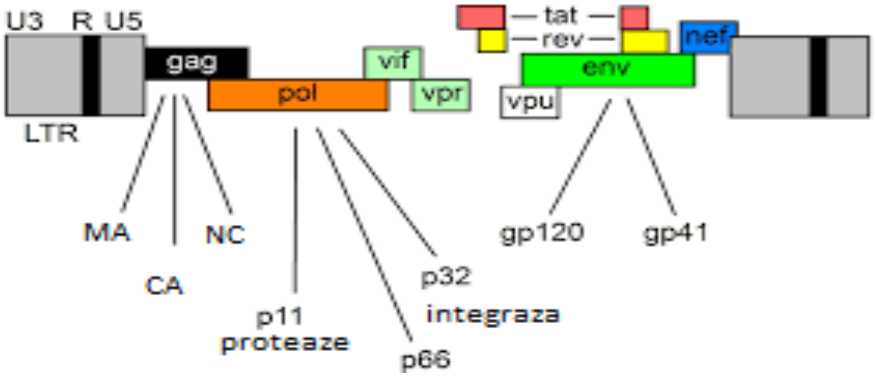
Lentivirusi su jednolančani virusi s omotačem koji, kada uđu u stanicu domaćina, prevode RNA genom u dvolančanu DNA pomoću reverzne transkriptaze. Epidemiološka istraživanja pokazuju da se virus prenosi krvlju, spolnim odnosom, tijekom trudnoće, poroda i dojenja, dok se ne prenosi vodom, hranom, ljudskim dodirom i kukcima (Andreis i sur., 2010).



Slika 1. (A) Prikaz čestice HIV-a pod elektronskim mikroskopom. (B) Shematski prikaz virusne čestice. (Preuzeto i izmijenjeno s www.nature.com)

Virioni HIV-a imaju promjer oko 120nm i sadrže dvije kopije jednolančane pozitivne RNA koja kodira 9 virusnih gena (Slika 1). Virusni genom je okružen kapsidom koja se sastoji od proteina kapside p24 dok je jednolančana RNA vezana na nukleokapsidu preko proteina p7. Unutar omotača nalaze se i enzimi reverzna transkriptaza, proteaza i integraza. Matriks se sastoji od proteina p17 koji okružuje kapsidu i osigurava integritet virusne čestice. Cijela struktura je okružena lipidnim dvoslojem stanice domaćina koji sadrži nativne površinske

proteine, ali i virusne proteine gp120 i gp41 koji su važni za vezanje virusne čestice za stanicu domaćina i njen ulazak u stanicu (Barré-Sinoussi i sur., 2013).



Slika 2. Organizacija genoma HIV-a. (Preuzeto i prilagođeno s www.hivbook.com).

Geni koji kodiraju strukturne proteine su *gag*, *pol* i *env* (Slika 2). Gen *gag* kodira za proteinski prekursor $Pr55^{Gag}$ kojeg cijepa virusna proteaza te nastaju zreli Gag proteini: proteini matriksa, kapside, nukleokapside i p6. Ista proteaza cijepa i prekursorski poliprotein pol na enzime reverznu transkriptazu koja ima i aktivnost RNAze H(p66/51), proteazu (p10) i integrazu (p32). Za razliku od njih, glikoproteini Env se sintetiziraju u obliku prekursora gp160 te njih procesira endogena proteaza tijekom prijenosa Env na površinu stanice. Tijekom ovog procesa nastaje gp120 koji sadrži mjesta potrebna za vezanje receptora i koreceptora kao i gp41 koji sudjeluje u usidravanju gp120/gp41 kompleksa u membranu i katalizira fuziju membrana između virusa i lipidnog dvosloja stanice domaćina tijekom ulaska virusa. Uz njih genom HIV-1-a kodira i druge pomoćne i regulatorne proteine poput Tat (koji je važan za transkripcijsku transaktivaciju promotora LTR), Rev (transport virusne RNA iz jezgre u citoplazmu), Vif (inhibira aktivnost proteina APOBEC3G važnog za deaminaciju citozina u uridin u jednolančanim virusnim molekulama DNA), Vpr (zaustavlja staničnu diobu u G2/M fazi), Vpu (sudjeluje u oslobađanju virusnih čestica iz stanice domaćina) i Nef (smanjuje ekspresiju CD4, MHC I i II) (Freed, 2002).

1.2 Ulazak virusa u stanicu domaćina

U početku istraživanja HIV-a utvrđeno je da on specifično inficira T-limfocite u perifernoj krvi te da su molekule CD4+ primarni stanični receptor za vezanje virusa na stanicu. Sredinom 1990-tih identificirani su koreceptori za HIV: CXC kemokinski receptor 4 (CXCR4) i CC-kemokinski receptor 5 (CCR5) (Feng i sur., 1996). Vezanje za te receptore dovodi do konformacijskih promjena važnih za ulazak X4-tropnih virusa (sojeva virusa HIV-1 koji koriste

CXCR4 receptor) i R5-tropnih virusa (onih koji koriste receptor CCR5) (Barré-Sinoussi i sur., 2013).

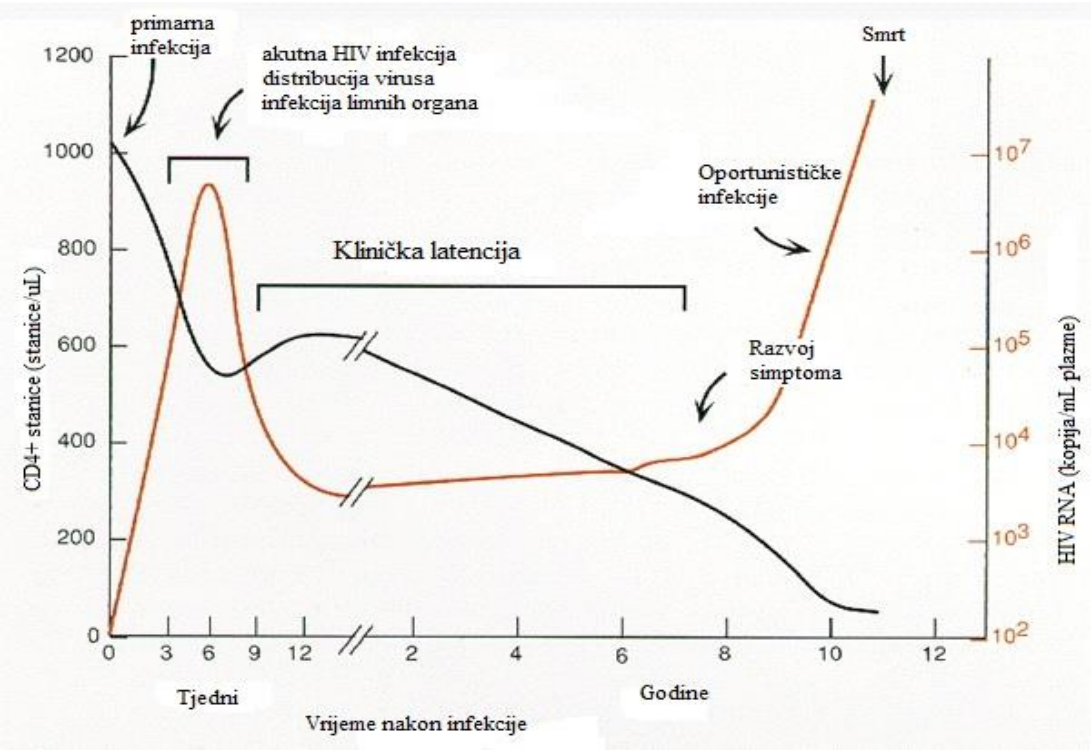
Tijek fuzije membrana započinje s promjenom konformacije gp120 nakon vezanja receptora gp120 za CD4. Tom promjenom konformacije povećava se afinitet koreceptora gp41 koji započinje fuziju membrana. Ektodomena gp41 je najvažnija za reakciju fuzije jer sadrži fuzijski peptid i N- i C-heliks koji stvaraju snop i omogućavaju spajanje dviju membrana (O'Brien i sur., 1990). Heterogenost alela za koreceptore može utjecati na podložnost osobe na infekciju HIV-om ili na tijek same infekcije što pokazuje i mutacija CCR5/Δ32 jer su homozigoti za taj alel rezistentni na infekciju HIV-om. Ukoliko je virus R5-tropan, CCR5/Δ32 mutacija blokira njegov ulazak u stanicu i dovodi do rezistencije te osobe na HIV (Dean i sur., 1996).

Nakon ulaska virusa u stanicu reverzna transkriptaza prepisuje (+)RNA genom virusa u komplementarnu DNA (cDNA). Reverzna transkriptaza ima ribonukleaznu aktivnost pa uklanja virusnu RNA tijekom sinteze cDNA, a DNA-ovisna-DNA polimeraza sintetizira komplementarni lanac cDNA. Tada se cDNA unosi u jezgru i integrira se u genom domaćina pomoću integraze i naziva se provirusna DNA. Nakon aktivacije limfocita i indukcije transkripcijskih faktora, od kojih je najvažniji NF-κB (od eng. *nuclear factor kappa B*), dolazi do transkripcije virusne DNA, nastaje virusna mRNA koja na ribosomima tvori poliproteinski lanac čijim cijepanjem nastaju novi virusi proteini koji tvore nove virusne čestice sposobne za inficiranje novih limfocita (Andreis i sur.,2010).

1.3 Tijek infekcije

Zaraza HIV-om započinje s fazom eklipse (od eng. *eclipse phase*) koja traje oko 2 tjedna tijekom koje se virus intenzivno replicira i širi od početnog mjesta infekcije do mnogih tkiva i organa. Fazu eklipse karakterizira replikacija HIV-1 u tkivima i organima (npr. limfnim čvorovima) uz aktivaciju mehanizama urođene imunosti no viremija (broj kopija HIV-1 RNA po mililitru plazme) u ovoj fazi infekcije najčešće nije mjerljiva RT-PCR testovima (Slika 3). Druga faza, odnosno akutna infekcija (od 2 do 4 tjedna infekcije), dovodi do relativno visoke razine viremije (oko 10^7 ili više kopija virusne RNA po mililitru plazme) i zaraze velikog postotka ukupne populacije CD4+ T-limfocita u organizmu. Za vrijeme najviše viremije pojavljuje se specifični imunološki odgovor na infekciju, stvaraju se antitijela na virusne proteine i odgovor CD8+ T-limfocita na HIV-1 antigene. Ovu fazu infekcije također

karakterizira i smanjenje broja CD4+ T-limfocita u krvi zbog apoptoze potaknute virusom (Coffin i Swanstrom, 2013).



Slika 3. Uobičajeni vremenski tijek tipične infekcije HIV-a. Uzorci smanjenja CD4+ T-stanica i viremije. (Preuzeto i prilagođeno iz Coffin i Swanstrom, 2013)

Treća faza (kronična infekcija, klinička latencija) karakterizirana je viremijom od oko 1000 kopija HIV-1 RNA po mililitru plazme koja se može postepeno povećavati. Duljina ove faze infekcije je individualna, a može trajati i više od 10 godina. Pacijenti su u ovoj fazi asimptomatični i najčešće nisu svjesni zaraze. Iako je faza okarakterizirana kao latentna, veliki broj CD4+ T-limfocita umire, ali i postaje inficiran svakog dana (Palmisano i Vella, 2011). Simptomi, koji uključuju visoku temperaturu, limfoadenopatiju te razvoj oportunističkih bolesti, najčešće se javljaju nakon što broj CD4 stanica padne ispod 350 stanica po mililitru krvi. Nakon pada broja CD4+ T-limfocita ispod 200 stanica po mililitru krvi ulazi se u fazu razvoja sindroma stečene imunodeficijencije (od eng. *acquired immunodeficiency syndrome,* AIDS; franc. *syndrome d'immunodéficience acquise,* SIDA) (Andreis i sur., 2010).

1.4 Antiretrovirusna terapija

Cilj antiretrovirusne terapije (ART, od eng. *antiretroviral therapy*) je smanjenje viremije odnosno supresija virusne replikacije. Smanjenje viremije ispod granice detekcije uobičajenih RT-PCR testova (50 kopija HIV-1 RNA po mililitru) može zaustaviti progresiju kliničkih simptoma bolesti (Mocroft i sur.,2007). Klase antiretrovirusnih lijekova su inhibitori reverzne transkriptaze (NRTI i NNRTI), inhibitori proteaze, inhibitori integraze, inhibitori fuzije i inhibitori ulaska virusa u stanicu to jest antagonisti koreceptora CCR5 (Menendez-Arias, 2010).

Iako je ART izrazito učinkovit, pojava rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove onemogućuje potpunu supresiju virusne replikacije. Zbog visoke stope pogrešaka reverzne transkriptaze dolazi do molekularne heterogenosti HIV-a na onim strukturama koje su ciljane antiretrovirusnim lijekovima što može biti povezano s nastankom rezistencije. Uz to, čak i kratko prekidanje terapije dovodi do ponovnog i brzog povišenja viremije te do razvoja rezistencije (Arts i Hazuda, 2011).

2 EPIGENETIČKI MEHANIZMI

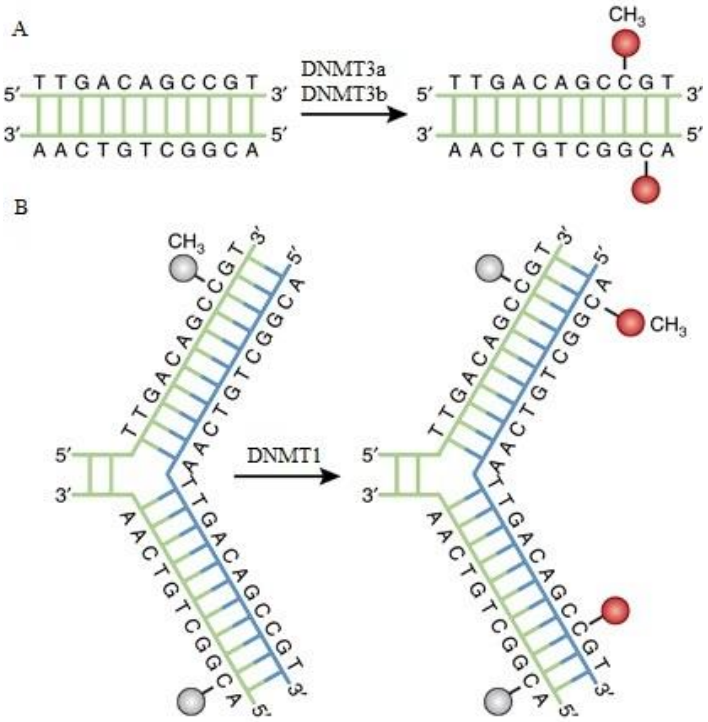
Epigenetika proučava promjene u funkciji i aktivnosti gena koje nisu nastale zbog promjena u sekvenci DNA. Nasljeđivanje epigenetičke informacije se primarno događa tijekom diobe stanica i uključuje staničnu memoriju (Allis i sur., 2007). Iako sve stanice u organizmu sadrže istu genetsku informaciju, ta informacija se ne eksprimira u svim tipovima stanica istovremeno. U višestaničnim organizmima epigenetički mehanizmi doprinose različitosti profila genske ekspresije u stanicama i tkivima (Moore i sur., 2013).

Organizacija eukariotskog genoma uključuje namatanje molekule DNA oko nukleosoma (kompleks histonskih proteina H2A, H2B, H3, H4) i stvaranja kromatina (u čemu sudjeluje i histon H1). Promjene u strukturi kromatina su dio bioloških procesa, uključujući i promjene u ekspresiji gena. Epigenetički mehanizmi koji dovode do promjene strukture kromatina uključuju metilaciju molekule DNA, posttranslacijske modifikacije histonskih proteina, remodeliranje kromatina, djelovanje malih nekodirajućih molekula RNA i pozicijsku informaciju (Allis i sur., 2007). Najviše istraženi epigenetički mehanizmi do sada su metilacija DNA i histonske modifikacije. U genomu sisavaca metilacija DNA znači dodavanje kovalentne modifikacije (metilne skupine) na peti ugljikov atom citozina (5-mC, od eng. *5-methylcytosine*) unutar CpG-dinukleotida enzimom DNA-metil-transferazom. Najčešće posttranslacijske modifikacije histonskih proteina su acetilacija i metilacija dok ostale modifikacije uključuju fosforilaciju, poliADP-ribozilaciju, ubikvitinizaciju i sumoilaciju. Modifikacije djeluju na dostupnost i prepoznavanje ciljanog mjesta vezanja proteina koji reguliraju gensku aktivnost (Allis i sur.,2007).

Enzimi uključeni u proces acetilacije su histonska acetil-transferaza (HAT, od eng. *histone acetyltranferase*) i histonska deacetilaza (HDAC, od eng. *histone deacetylase*). HAT katalizira dodavanje acetilne skupine na lizine na N-terminalnom kraju histona dok je HDAC odgovoran za uklanjanje tih acetilnih skupina. Određeni uzorak modifikacija tvori histonski kod koji signalizira i omogućuje vezanje ili blokiranje regulacijskih proteina. Tako je acetilacija histona važna za gensku aktivnost jer olabavljuje strukturu kromatina i omogućava vezanje transkripcijskih aktivatora na ciljane sekvence. Funkcija metiliranih histonskih proteina ovisi o mjestu vezanja i broju dodanih metilnih skupina; primjerice metilacija lizina na poziciji 9 histona H3 dovodi do kompaktnije strukture kromatina, manje dostupnosti DNA transkripcijskim faktorima te do utišavanja gena dok je metilacija lizina na poziciji 4 histona H3 oznaka transkripcijske aktivacije (Tollefsbol, 2011).

2.1 Metilacija DNA

Metilaciju DNA kataliziraju enzimi iz obitelji DNA-metil-transferaza (DNMT, od eng. *DNA methyltranserase*). DNMT1 ima održavateljsku ulogu: metilira citozine u hemimetiliranoj DNA te na taj način održava uzorak metilacije tijekom replikacije DNA. DNMT3a i DNMT3b su metiltransferaze *de novo* jer mogu uspostaviti novi uzorak metilacije na nemetiliranoj DNA (Slika 4). Metilacija DNA je važna za utišavanje retrovirusnih elemenata, regulaciju tkivno-specifične ekspresije gena, u genskom utisku i inaktivaciji X-kromosoma (Kim i sur.,2008).



Slika 4. Prikaz DNA-metiltransferaza. (A) DNMT3a i DNMT3b su DNA-metiltranferaze *de novo* koje prenose metilnu skupinu na nemetiliranu DNA. (B) DNMT1 je metiltransferaza održavateljskog tipa koja prepoznaje hemimetilirana mjesta (sivo) i dodaje metilnu skupinu na novosintetizirani lanac (crveno). (Slika preuzeta iz Moore i sur.,2013.)

Demetilacija DNA može biti pasivna ili aktivna. Pasivna demetilacija se događa u stanicama koje se dijele ukoliko dođe do inhibicije DNMT-a, dok je aktivna demetilacija složeniji proces. Tijekom aktivne demetilacije dolazi do oksidacije 5-metilcitozina pomoću enzima iz porodice TET (od eng. *ten-eleven-transferase*) do 5-formil-citozina i 5-karboksimetil-uracila nakon čega dolazi do izrezivanja baze pomoću timin-DNA-glikozilaze (TDG) ili do DNA-deaminacije i popravka nepravilno sparenog nukleotida. U oba slučaja dolazi do demetilacije DNA (Moore i sur., 2013).

Učestalost CpG-mjesta mijenja se kroz genom. Područja s gusto raspoređenim CpG-mjestima nazivaju se CpG-otoci, a mogu zauzimati područja od 200pb pa do nekoliko tisuća baza. Oko 70% promotora nalazi se unutar CpG-otoka i najčešće su to promotori održavajućih (od eng. *housekeeping*) gena. CpG-otoci, posebno oni povezani s promotorskim regijama, su visoko očuvani kod ljudi i miševa, te njihova lokacija i očuvanost ukazuju na evolucijsku važnost. Imaju ulogu u regulaciji kromatinske strukture i vezanju transkripcijskih faktora. Iz tog razloga metilacija CpG-otoka u promotoru gena može poremetiti vezanje transkripcijskih faktora i omogućiti vezanje proteina s afinitetom za metilne skupine te tako utišati ekspresiju gena. Za razliku od CpG-otoka, više od 80% CpG-mjesta izvan CpG-otoka je metilirano (Moore i sur.,2013).

Oko 70% genoma sisavaca je globalno metiliran kako bi se spriječila replikacija i ugradnja repetitivnih elemenata u genom. Globalno utišani elementi su satelitne DNA, transpozoni i njihovi inertni relikti, intergenske razmaknice i eksoni gena. Utišani su metilacijom DNA ili mutacijama nastalim tijekom vremena koje su dovele do deaminacije 5mC (od eng. *5-methylcytosine*). Kao primjer važnosti globalne metilacije mogu se navesti elementi LINE-1(od eng. *long interspersed nuclear elements*) koji su metilirani u somatskim stanicama, dok je njihova hipometilacija karakteristika tumorskih stanica (Moore i sur.,2013).

2.2 Povezanost metilacije DNA i ekspresije gena

U genomu sisavaca metilacija DNA ima ulogu u utišavanju transkripcije gena, kompaktnosti kromatina, održavanju stabilnosti genoma, suprimiranju homologne rekombinacije između ponavljajućih sekvenci, obrani genoma od strane DNA, inaktivaciji X-kromosoma kod ženki sisavaca te održavanju genomskog utiska. Dva su glavna načina na koja metilacija DNA regulira ekspresiju gena: interferencija s mjestima vezanja transkripcijskih faktora i proteinski kompleksi koji imaju afinitet za metilirani citozin. U slučaju interferencije, prisutnost metilne skupine na citozinu interferira s vezanjem proteina koji se specifično vežu za CpG-dinukleotide te na taj način suprimiraju transkripciju dok proteinski kompleksi dovode do represivnog stanja promotora (Allis i sur., 2007).

3 BACH2

Gen *BACH2* (od eng. *BTB and CNC homolog 2*) je transkripcijski faktor iz obitelji proteina s domenom leucinskog zatvarača s bazičnom regijom (bZip, od eng. *basic region leucine zipper*) koja veže DNA. Lokaliziran je u citoplazmi pomoću citoplazmatskog lokalizacijskog signala na domeni bZip te sadrži signal za izlazak iz jezgre na C-terminalnoj domeni. Djeluje kao transkripcijski represor i stvara heterodimere s malim onkogenima poput MafF, MafG i MafK. Negativno regulira gen za teški lanac imunoglubulina tako da se veže na element koji prepoznaje Maf (Muto i sur.,1998). Važan je u somatskoj hipermutaciji imunoglobulina i programiranju antitijela (Muto i sur., 2004).

Ekspresija *BACH2* ograničena je na određena tkiva i stanične tipove, uključujući hematopoetske i neuralne stanice. Velika količina *BACH2* može se naći u B-limfocitima. Ekspresija inicirana u zajedničkim progenitorima limfocitne loze, ostaje visoka u B-staničnoj liniji od pro-B stanica do zrelih B-limfocita. Nakon aktivacije, u prisustvu antigena, B-limfociti se aktiviraju i diferenciraju u plazma-stanice koje luče velike količine antitijela. Ekspresija BACH2 u plazma-stanicama je vrlo niska ili se ne može detektirati. Iako je *BACH2* dugo vremena bio povezan samo s B-limfocitima otkriveno je da je eksprimiran i u T-limfocitima. U njima ima ulogu u održavanju naivnog stanja T-limfocita te ukoliko dođe do represije *BACH2* dolazi do smanjenja količine naivnih T-limfocita i povećanja broja efektorskih stanica, najviše pomoćničkih T-limfocita (Th2, od eng. *T-helper cells*) (Tsukumo i sur., 2013).

4 CILJ ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ovog istraživanja je da antiretrovirusna terapija dovodi do promjene u metilacijskom statusu gena *BACH2*. Cilj ovog istraživanja je analizirati razinu metilacije promotorske regije gena *BACH2* kod HIV-om zaraženih osoba u odnosu na zdravu populaciju te utvrditi postoje li razlike u razini metilacije njegovog promotora koje ovise o statusu ispitanika.

5 MATERIJALI I METODE

5.1 Uzorci

U istraživanje je uključeno 40 HIV-om zaraženih osoba i 20 osoba koje čine kontrolnu skupinu (KON). HIV-om zaražene osobe podijeljene su u dvije grupe: ispitanike s mjerljivom viremijom u plazmi (n=20, VR) i ispitanike s nemjerljivom viremijom (<40 kopija HIV-1 RNA po 1 mL plazme, ND). Korišteni su ostatni biološki uzorci iz biobanke Odjela za imunološku i molekularnu dijagnostiku Klinike za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu. Svi uzorci su prikupljeni u sklopu istraživanja projekta Hrvatske zaklade za znanost „Molekularna, epidemiološka i klinička obilježja zaraze HIV-om u Hrvatskoj“ (šifra projekta IP-2014-4461) koje je odobrila etička komisija nadležne bolnice.

5.2 Izolacija DNA iz pune krvi

Za izolaciju DNA korišten je komercijalno dostupa set kemikalija DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača uz manje izmjene: korišteno je 400 µl pune krvi, te je DNA eluirana u 100 µl elucijskog pufera (dva puta po 50 µl). Nakon inkubacije krvi u puferu za lizu kako bi se razgradile stanice, dodaje se 96%-tni etanol i cijeli uzorak se prenosi na DNeasy Mini spin kolonice. Slijedi centrifugiranje i serija ispiranja u puferima kako bi se s kolonice isprale sve komponente krvi osim DNA. Zadnji korak je elucija DNA s kolonice. Na spektrofotometrijskom uređaju NanoVue (GE Healthcare Life Sciences, Velika Britanija) izmjerena je koncentracija DNA dobivenih izolata.

5.3 Bisulfitna konverzija

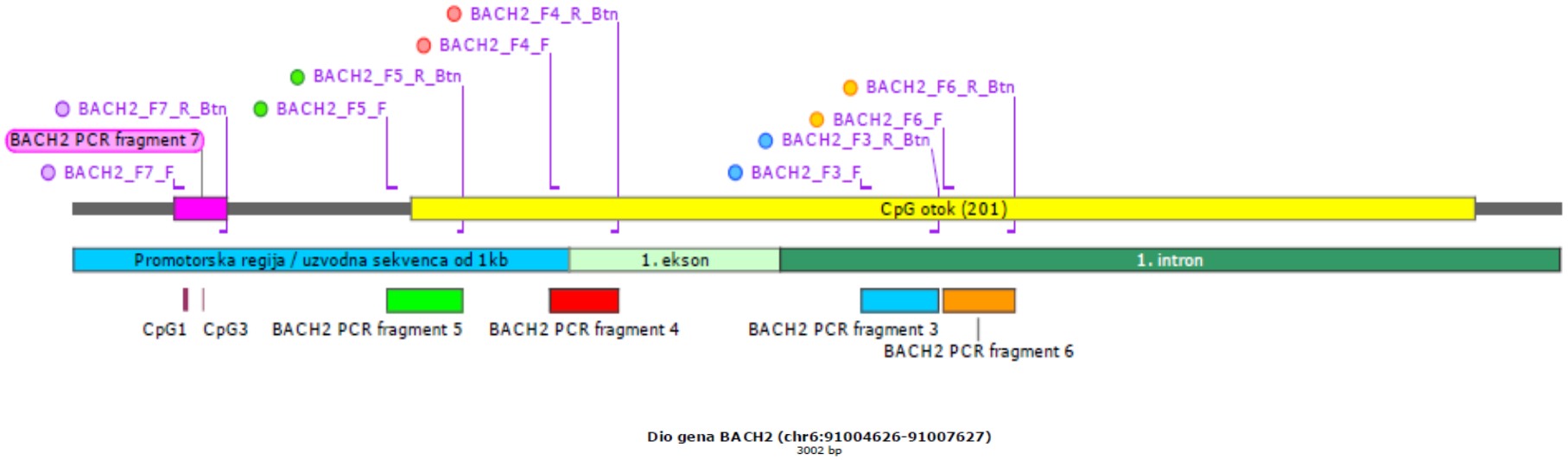
Bisulfitna konverzija je proces deaminacije nemetiliranih citozina u uracil dok metilirani citozini ostaju nepromijenjeni što se može detektirati pirosekvenciranjem. Za ovaj postupak korišten je komercijalno dostupan komplet kemikalija EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research) uz manje izmjene originalnog protokola: u CT-reagens je dodano 700 µl vode umjesto 900 µl. Prvi korak je otapanje CT-reagensa u vodi, M-Dissolving puferu i M-Dilution puferu te dodavanje 500ng DNA u reakciju. Slijedi korak denaturacije DNA toplinom, inkubacija uzorka tijekom koje se citozin konvertira u uracil dok 5-metilcitozin ostaje nepromijenjen. Nakon inkubacije uzoraka dolazi korak desulfonacije s puferom koji zaustavlja reakciju i pročišćavanje DNA na koloni kako bi se isprali svi reagensi. Konvertirana DNA se pohranjuje na -20 ºC za kasnije analize.

5.4 Umnažanje fragmenata DNA za pirosekvenciranje

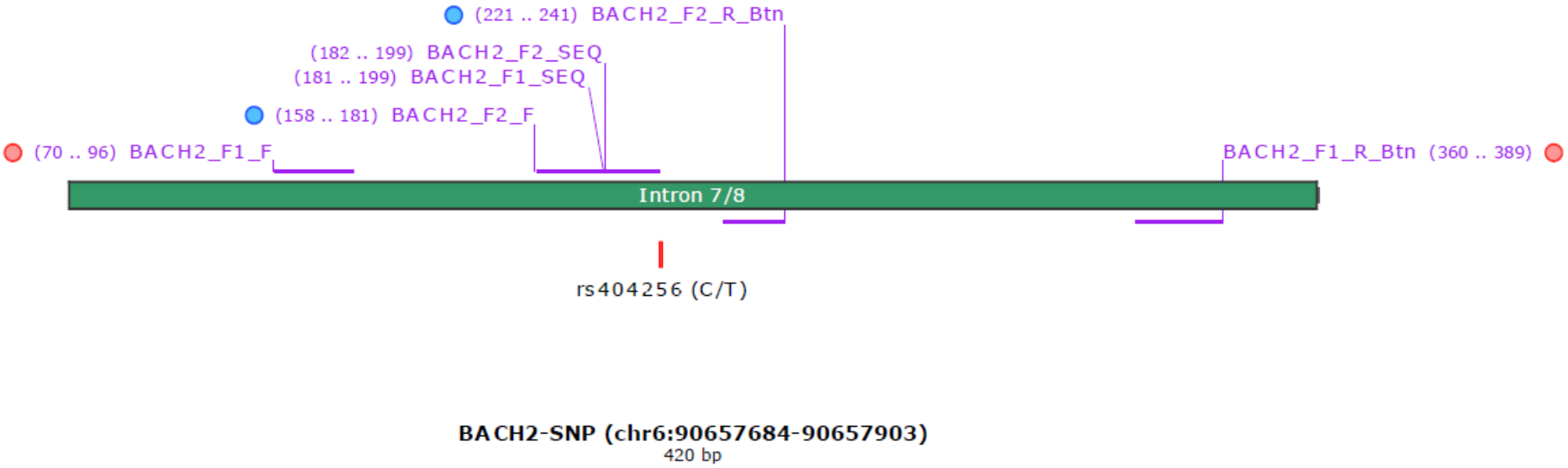
Korištene su početnice dizajnirane pomoću baze podataka RefSeq (NCBI, National Center for Biotechnology Information), identifikacijske oznake NM_001170794. Njihove sekvence specifične su za bisulfitno konvertiranu DNA tako da se na mjestu nemetiliranog citozina nalazi uracil. Nakon umnažanja PCR reakcijom, uracil će zamijeniti timin. Budući da se 5-mC nalazi isključivo u CpG dinukleotidima, takve citozine se tijekom dizajna početnica tretira kao Y odnosno pirimidinsku bazu jer nakon bisulftne konverzije mogu biti ili C ili T, dok se sve ostale citozine tretira kao uracil/timin.

Za samu reakciju pirosekvenciranja potrebne su biotinilirane jednolančane molekule DNA tako da su korištene početnice koje na 5' strani fragmenta imaju kovalentno vezani biotin. Biotin omogućava vezanje produkta amplifikacije na kuglice sefaroze na kojima se nalazi kovalentno vezan streptavidin (Slika 5).

Fragmenti 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7 umnoženi su pomoću lančane reakcije polimerazom u svim uzorcima. Za umnažanje fragmenta F2 korištena je nekonvertirana DNA. Pomoću tog fragmenta utvrđuje se polimorfizam ispitanika za mjesto rs404256 (Slika 6). Fragmentom F1, koji se umnaža s konvertirane DNA, utvrđujemo metilaciju CpG-otoka te odnos metilacije s obzirom na polimorfizam.



Slika 5. Shematski prikaz dijelova gena za koji su dizajnirane početnice korištene za umnožavanje i analizu fragmenata F3, F4, F5, F6 i F7 gena *BACH2* te pozicija svakog fragmenta.



Slika 6. Shematski prikaz dijelova gena za koji su dizajnirane početnice korištene za umnožavanje i analizu fragmenata F1 i F2 gena *BACH2* radi utvrđivanja polimorfizma na mjestu rs404256.

Korišten je komercijalno dostupan komplet kemikalija prilagođen metodi bisulfitnog pirosekvenciranja, PyroMark® PCR Kit (Qiagen, Njemačka) uz protokol proizvođača. Uređaj korišten za lančanu reakciju polimerazom je GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Byosystems, SAD). Protokol obuhvaća pripremu reakcijske smjese: početnice specifične za svaki fragment, PyroMark Master Mix (1×), boja za nanošenje uzoraka u gel i voda očišćena od nukleaza, te dodavanje bisulfitno konvertirane DNA (Tablica 1).

Tablica 1. Uvjeti korištenja lančane reakcije polimerazom.

KORAK	Fragment	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Denaturacija		95˚C	30s	
Hibridizacija početnica	F1, F2	55˚C	30s	50
	F3	48˚C		
	F4	38˚C		
	F5	50˚C		
	F6	39˚C		
	F7	44˚C		
Elongacija		72˚C	30s	
Završna elongacija		72˚C	10min	

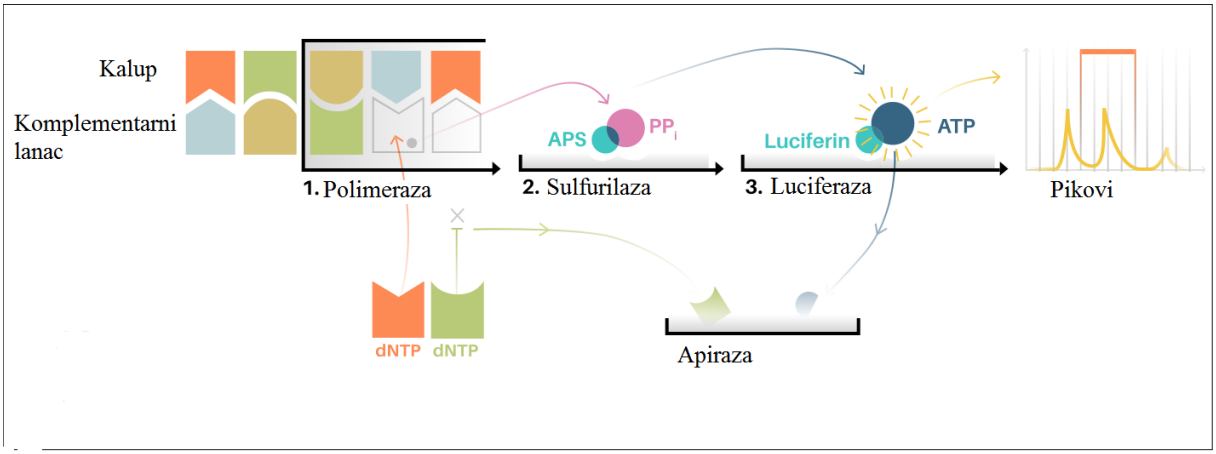
Uzorci se pohranjuju na +4 ºC. Uspješnost PCR-a provjerena je elektroforezom u 2%-tnom agaroznom gelu u TAE puferu (tris (tris(hidroksimetil)aminometan), octena kiselina i EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina)). Detekcija je postignuta bojenjem DNA etidij bromidom, a signal je vizualiziran UV svjetlom. Veličina dobivenih fragmenata određena je pomoću smjese DNA fragmenata poznatih veličina odnosno markera za elektroforezu (100pb DNA Ladder Ready to Load, Solis BioDyne).

5.5 Pirosekvenciranje

Pirosekvenciranje je bioiluminometrijska metoda sekvenciranja DNA koja se temelji na principu sekvenciranja sintezom. Koristi se za analizu polimorfizama jedne baze (SNP,od eng. *single-nucleotide polymorphisms*), detekciju mutacija, metilacije DNA i drugih primjena sekvenciranja. Produkti PCR-a se prenose na pločicu koja sadrži kuglice sefaroze na kojima je vezan streptavidin u puferu koji olakšava vezanje biotina na streptavidin. Nakon serije ispiranja, kuglice sefaroze na koje je vezana biotinilirana jednolančana DNA uranjaju se u otopinu pufera i početnica za pirosekvenciranje. Pločica s DNA i početnicama se zagrije na 80ºC, a potom se

ohladi na sobnu temperaturu. Prilikom hlađenja početnice se vežu na DNA te je konačan produkt jednolančana DNA s vezanom početnicom za pirosekvenciranje.

U reakciju se ubacuje jedan po jedan nukleotid; ukoliko se nukleotid ugradi, oslobađa se pirofosfat. Pirofosfat se prevodi u ATP (adenozin trifosfat) pomoću ATP-sulfurilaze u prisutnosti APS-a (adenozin 5'-fosfosulfata). Nastanak ATP-a potiče konverziju luciferina u oksiluciferin pomoću enzima luciferaze pri čemu nastaje vidljivo svjetlo koje je proporcionalno količini nastalog ATP-a. Svjetlosni signal se detektira pomoću CCD kamere (eng. *charged coupled device*) što se vidi kao signal na pirogramu. Svi neugrađeni nukleotidi se razgrađuju pomoću enzima apiraze (Slika 7).



Slika 7. Ilustrirani prikaz reakcije pirosekvenciranja.

5.6 Statistička obrada podataka

Rezultati pirosekvenciranja su obrađeni u računalnom programu Statistica®. Za usporedbu postotka metilacije pojedinih CpG-mjesta svakog fragmenta između VR i ND, VR i KON, ND i KON upotrijebljena je neparametrijska analiza Mann-Whitney. Za svaku skupinu podataka (VR, ND i KON) i za svako CpG-mjesto utvrđena je srednja vrijednost i standardna devijacija. Upotrijebljena je i Spearmanova korelacija za analizu povezanosti svih CpG-mjesta gena *BACH2* u odnosu na status ispitanika.

6 REZULTATI

6.1 Određivanje koncentracije i kvalitete izolirane DNA

Nakon izolacije izmjerene su koncentracija i procijenjena je čistoća dobivenih uzoraka DNA (Tablica 2).

Tablica 2. Koncentracija i čistoća izoliranih uzoraka DNA.

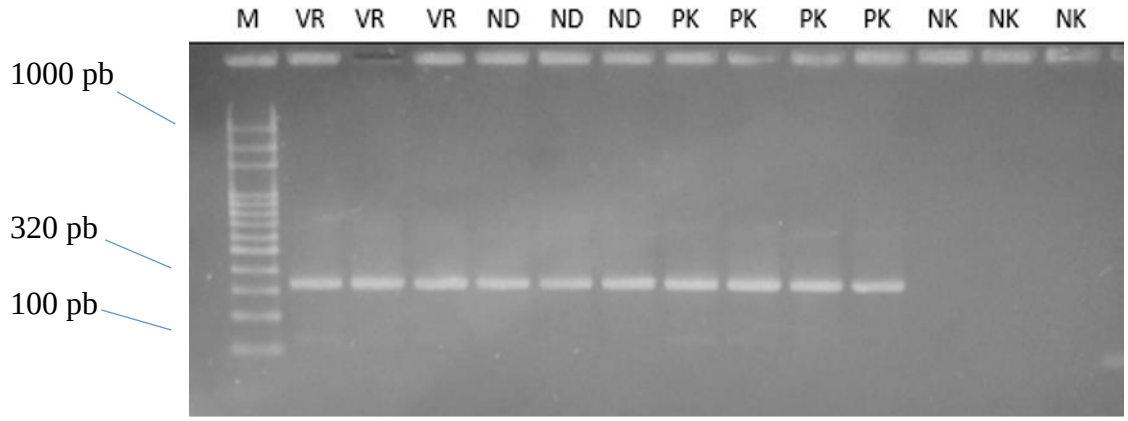
Uzorak	c(DNA)ng/µl	A260/A280
VR1	18,75	1,775
VR2	39,00	1,773
VR3	42,25	1,839
VR4	17,75	1,905
VR5	33,00	1,791
VR6	39,00	1,663
VR7	60,50	1,503
VR8	46,50	1,882
VR9	40,25	1,656
VR10	43,25	2,064
VR11	34,50	1,888
VR12	44,75	2,183
VR13	33,50	1,634
VR14	37,25	2,205
VR15	36,50	2,136
VR16	35,00	2,168
VR17	27,75	2,100
VR18	41,25	1,953
VR19	37,25	2,181
VR20	13,80	1,495

Uzorak	c(DNA)ng/µl	A260/A280
ND1	33,00	1,760
ND2	35,75	1,778
ND3	29,25	1,667
ND4	14,75	1,935
ND5	54,25	1,786
ND6	32,50	1,763
ND7	38,25	1,781
ND8	19,50	2,151
ND9	46,25	1,794
ND10	49,50	1,929
ND11	64,25	1,859
ND12	42,00	1,732
ND13	47,50	1,915
ND14	84,50	1,724
ND15	33,50	1,932
ND16	80,25	1,530
ND17	50,50	1,956
ND18	45,50	1,766
ND19	24,00	1,618
ND20	54,75	1,648

Srednja vrijednost koncentracije DNA skupine VR bila je 36,09 ng/µl dok je raspon bio od 13,8 ng/µl do 60,5 ng/µl. Čistoća, A260/280, je bila u rasponu od 1,495 do 2,183 sa srednjom vrijednosti 1,890. Srednja vrijednost koncentracija DNA skupine ND bila je 43,99 ng/µl u rasponu od 14,75 ng/µl do 84,5 ng/µl. Čistoća ND uzoraka bila je u rasponu od 1,667 do 2,151 sa srednjom vrijednosti 1,801.

6.2 Umnožavanje fragmenata za pirosekvenciranje

Nakon umnažanja fragmenata promotora gena *BACH2* uspješnost PCR-a je provjerena pomoću elektroforeze DNA u 2%-tnom agaroznom gelu (Slika 8).



VR-ispitanici s mjerljivom viremijom, ND-ispitanici s nemjerljivom viremijom, PK-pozitivna kontrola, NK-negativna kontrola, M-marker.

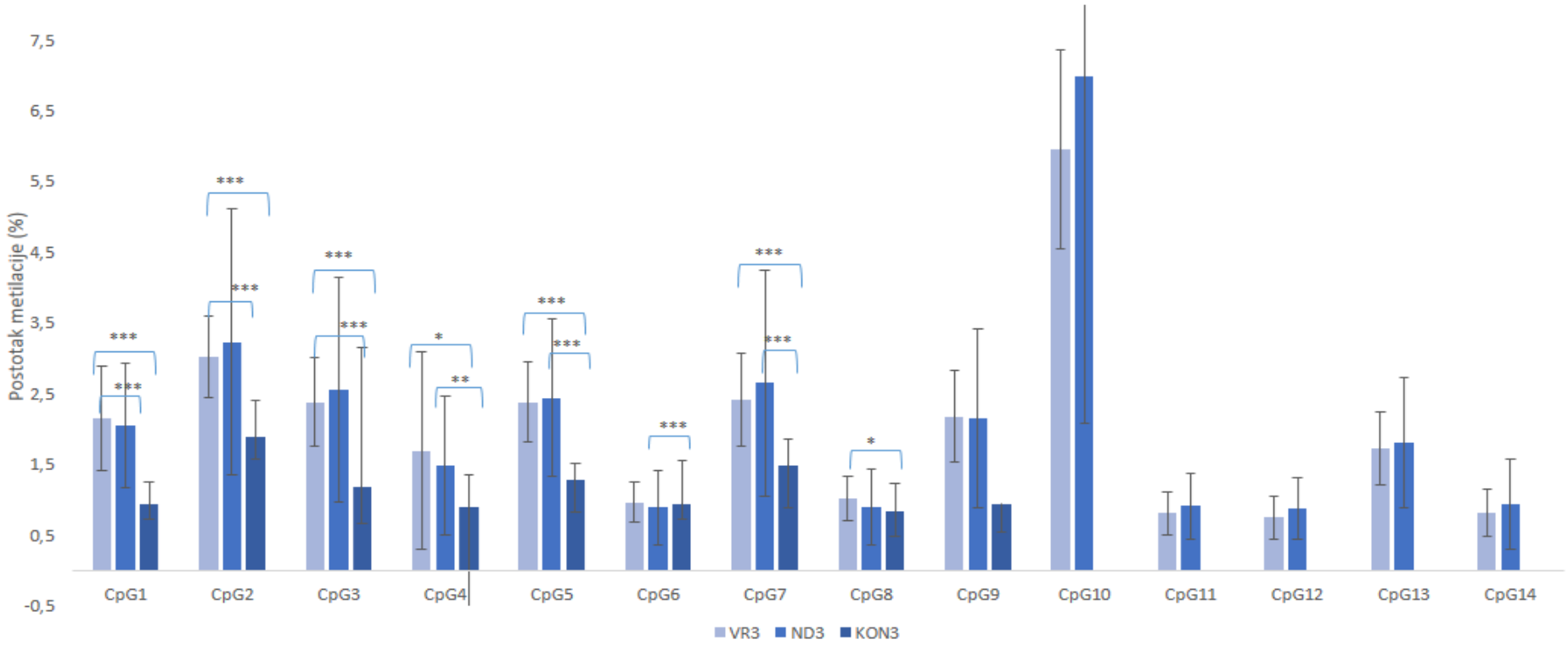
Slika 8. Umnoženi fragment F1 gena *BACH2*.

Umnožavanjem svih uzoraka dobiveni su fragmenti očekivanih veličina kod svih ispitanika.

6.3. Metilacija gena *BACH2*

Analizom metilacije fragmenata F1-F7 gena *BACH2* pomoću bisulfitnog pirosekvenciranja određen je postotak metilacije pojedinih CpG-mjesta unutar CpG-otoka ispitanika s mjerljivom viremijom u plazmi (VR), ispitanika s nemjerljivom viremijom (ND) i kontrolne skupine (KON).

Za fragment F3 gena *BACH2* vidi se povećanje metiliranosti svih CpG-mjesta skupina VR i ND u odnosu na kontrolu. Utvrđena je statistički značajna razlika u metilaciji između skupine VR i kontrolne skupine te skupine ND i kontrolne skupine, dok metilacija CpG1 i CpG2-mjesta pokazuje statističku razliku samo između skupina pacijenata (Slika 9).

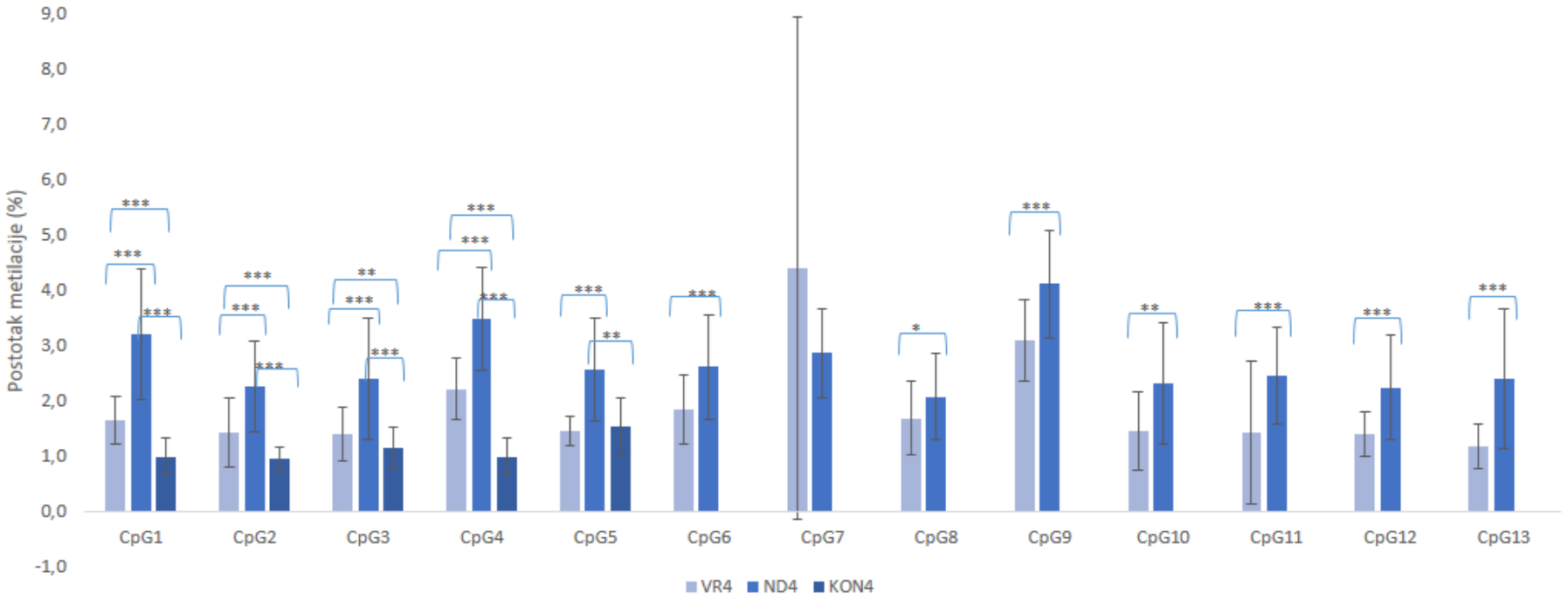


Slika 9. Postotak metilacije CpG-mjesta fragmenta F3 gena *BACH2* određen pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije DNA. Za svako CpG-mjesto prikazan je stupac metilacije u uzorku ispitanika s mjerljivom viremijom (prvi stupac, VR3), ispitanika s nemjerljivom viremijom (drugi stupac, ND3) i kontrolne skupine (KON3). Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicama između relevantnih grupa. Jedna zvjezdica (*) označava p-vrijednost ≤ 0,01, dvije zvjezdice (**) ≤ 0,001, tri zvjezdice (***) ≤ 0,0001. Metilaciju CpG-mjesta 10-14 nije bilo moguće odrediti kod kontrolne skupine.

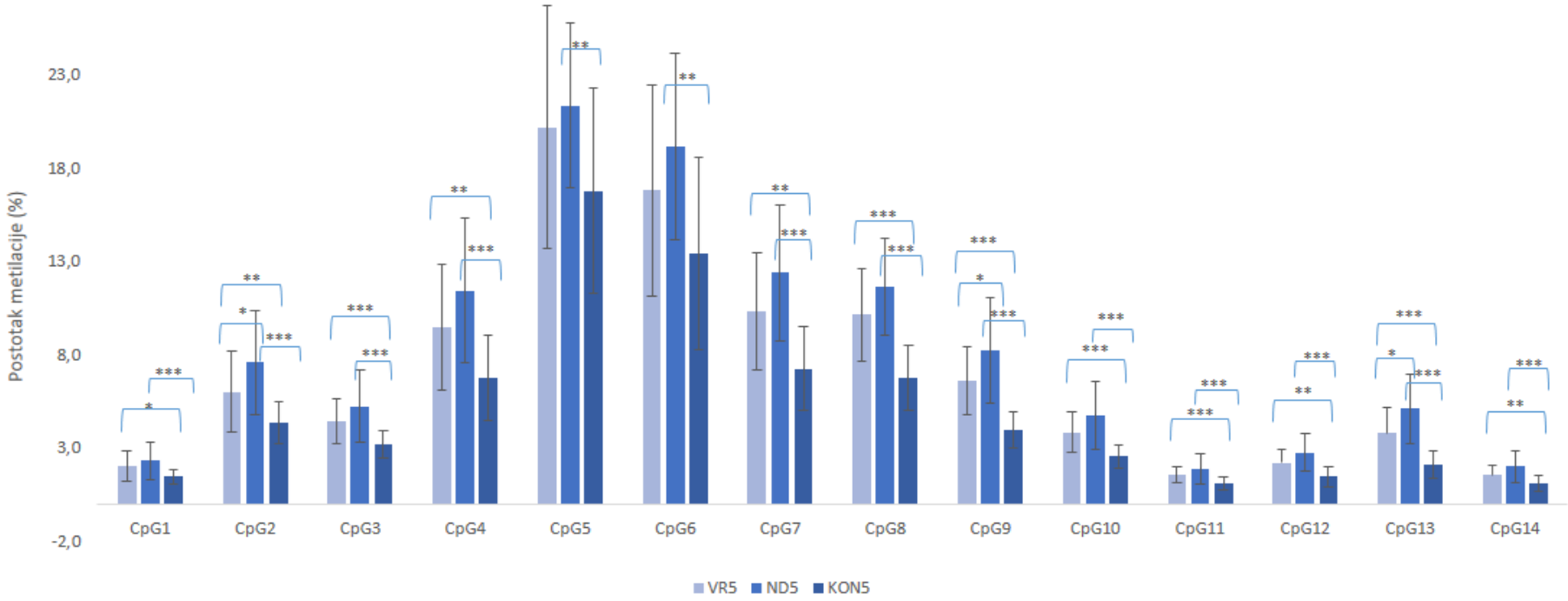
Unutar fragmenta F4 gena *BACH2* također se vidi malo, ali statistički značajno povećanje u metilaciji CpG-mjesta između svih skupina ispitanika. Najveća statistička razlika očituje se između skupine VR i skupine ND gdje su sva CpG-mjesta (osim CpG7) više metilirana kod ispitanika s nemjerljivom viremijom. Bez obzira na statistički značajnu razliku, postotak metilacije svi CpG-mjesta unutar fragmenta F4 je nizak (Slika 10).

Kod fragmenta F5 gena *BACH2* uočena je veća razlika u metilaciji između pojedinih CpG-mjesta; od CpG4 do CpG8-mjesta je postotak metilacije veći u odnosu na ostala CpG-mjesta. Sva CpG-mjesta pokazuju statističku značajnu razliku između skupine VR i kontrolne skupine, te skupine ND i kontrolne skupine. Na svim CpG-mjestima ispitanici s nemjerljivom viremijom pokazuju povećanu metilaciju u odnosu na ispitanike s mjerljivom viremijom (Slika 11).

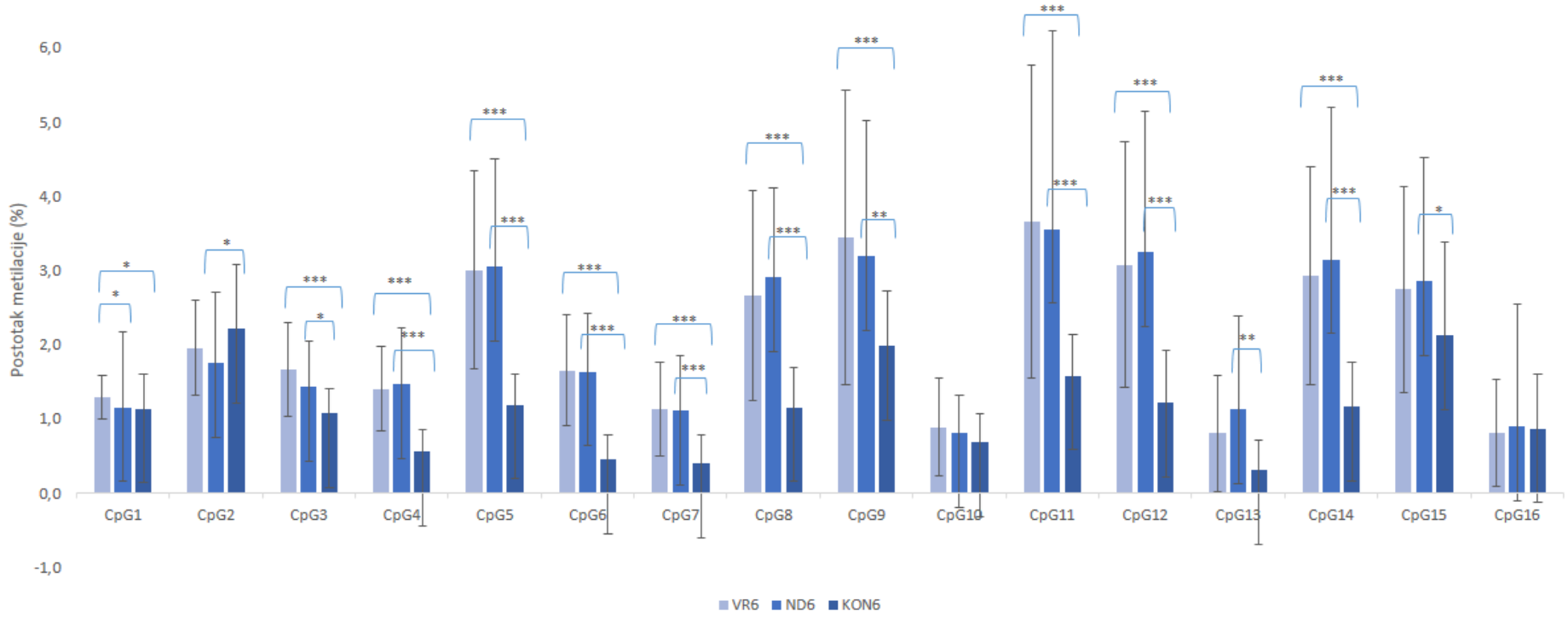
Fragment F6 gena *BACH2* pokazuje najveću varijabilnost CpG-mjesta. Sva CpG-mjesta u obje skupine ispitanika pokazuju povećanu metilaciju u odnosu na kontrolnu skupinu, osim CpG2-mjesta kod kojih obje skupine ispitanika pokazuju smanjenu metilaciju. Unutar CpG1, CpG2 i CpG15-mjesta vidi se statistički značajna razlika, dok na CpG10-mjestu nema statistički značajne razlike između skupina ispitanika (Slika 12).



Slika 10. Postotak metilacije CpG-mjesta fragmenta F4 gena *BACH2* određen pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije DNA. Za svako CpG-mjesto prikazan je stupac metilacije u uzorku ispitanika s mjerljivom viremijom (prvi stupac, VR4), ispitanika s nemjerljivom viremijom (drugi stupac, ND4) i kontrolne skupine (KON4). Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicama između relevantnih grupa. Jedna zvjezdica (*) označava p-vrijednost $\leq 0{,}01$, dvije zvjezdice (**) $\leq 0{,}001$, tri zvjezdice (***) $\leq 0{,}0001$. Metilaciju CpG-mjesta 6-13 nije bilo moguće odrediti kod kontrolne skupine.

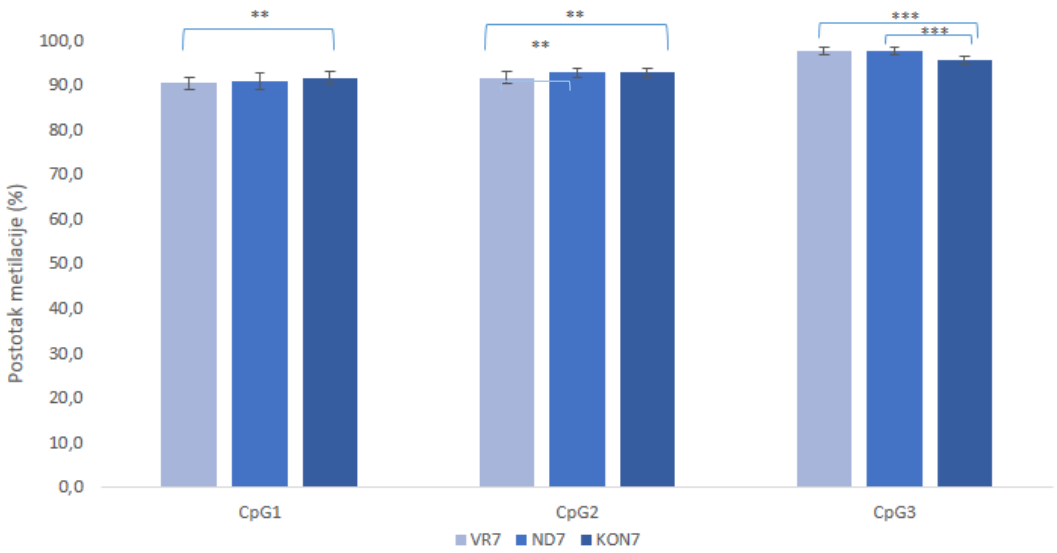


Slika 11. Postotak metilacije CpG-mjesta fragmenta F5 gena *BACH2* određen pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije DNA. Za svako CpG-mjesto prikazan je stupac metilacije u uzorku ispitanika s mjerljivom viremijom (prvi stupac, VR5), ispitanika s nemjerljivom viremijom (drugi stupac, ND5) i kontrolne skupine (KON5). Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicama između relevantnih grupa. Jedna zvjezdica (*) označava p-vrijednost ≤ 0,01, dvije zvjezdice (**) ≤ 0,001, tri zvjezdice (***) ≤ 0,0001.



Slika 12. Postotak metilacije CpG-mjesta fragmenta F6 gena *BACH2* određen pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije DNA. Za svako CpG-mjesto prikazan je stupac metilacije u uzorku ispitanika s mjerljivom viremijom (prvi stupac, VR6), ispitanika s nemjerljivom viremijom (drugi stupac, ND6) i kontrolne skupine (KON6). Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicama između relevantnih grupa. Jedna zvjezdica (*) označava p-vrijednost ≤ 0,01, dvije zvjezdice (**) ≤ 0,001, tri zvjezdice (***) ≤ 0,0001

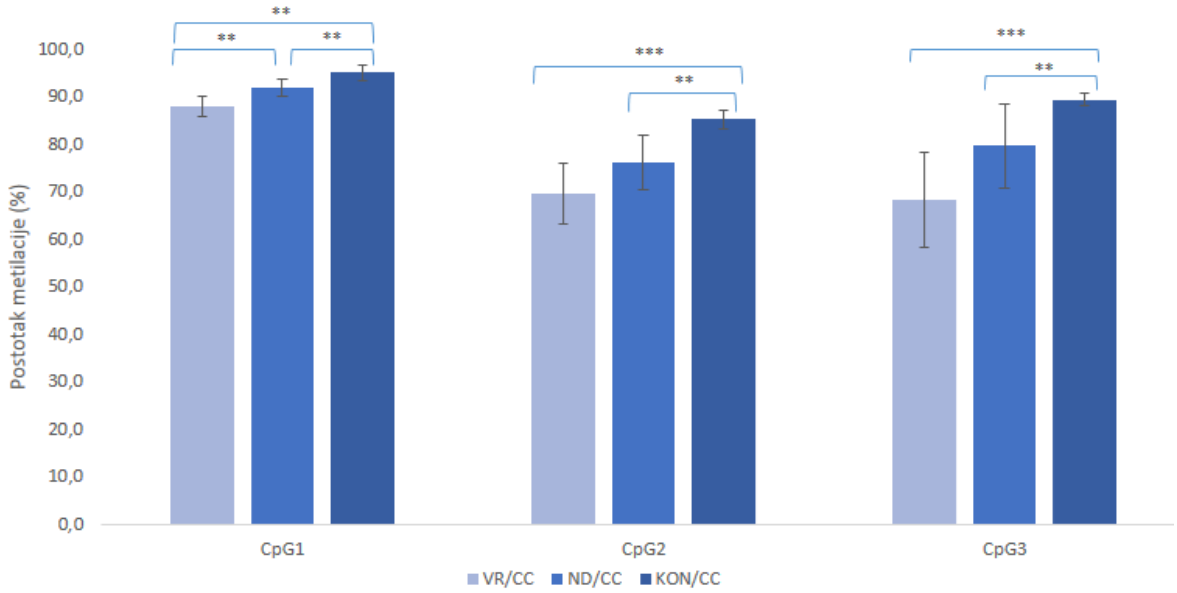
U odnosu na ostale fragmente, fragment F7 gena *BACH2* pokazuje najveći stupanj metilacije. CpG3-mjesto pokazuje najveću statistički značajnu razliku između skupine VR i kontrolne skupine te skupine ND i kontrolne skupine, te obje skupine ispitanika pokazuju povećanu metilaciju u odnosu na kontrolnu skupinu. CpG1 i CpG2-mjesto kod obje skupine ispitanika pokazuju smanjenu metilaciju u odnosu na kontrolnu skupinu. (Slika 13).



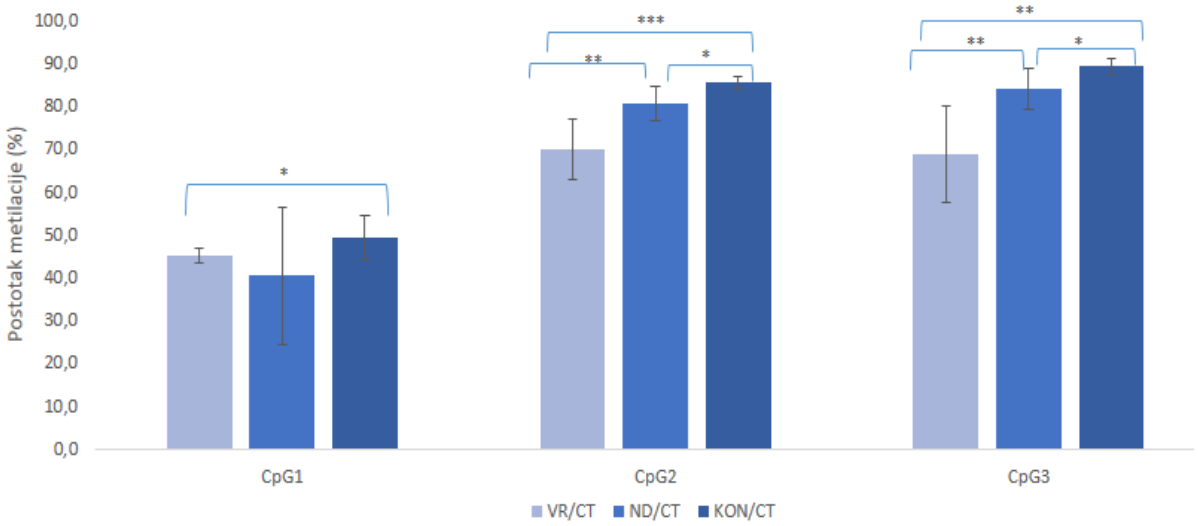
Slika 13. Postotak metilacije CpG-mjesta fragmenta F7 gena *BACH2* određen pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije DNA. Za svako CpG-mjesto prikazan je stupac metilacije u uzorku ispitanika s mjerljivom viremijom (prvi stupac, VR7), ispitanika s nemjerljivom viremijom (drugi stupac, ND7) i kontrolne skupine (KON7). Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicama između relevantnih grupa. Jedna zvjezdica (*) označava p-vrijednost ≤ 0,01, dvije zvjezdice (**) ≤ 0,001, tri zvjezdice (***) ≤ 0,0001.

Nakon pirosekvenciranja fragmenta F2 gena *BACH2* ispitanici su podijeljeni u dvije skupine CC-homozigoti i CT-heterozigoti, te su im pirosekvenciranjem fragmenta F1 gena *BACH2* pridruženi podaci za metilaciju CpG-mjesta. Najveća razlika se vidi u postotku metilacije CpG1-mjesta te dvije skupine ispitanika: CpG1-mjesto kod CT-heterozigota je manje metilirano od CpG1-mjesta CC-homozigota. Također, CT-heterozigoti imaju statistički značajnu razliku samo između viremične skupine i kontrolne skupine na CpG1-mjestu, dok CC-homozigoti imaju veću statističku razliku između svih istraživanih skupina. Razlika je vidljiva i kod CpG2 i CpG3-mjesta: dok kod CC-homozigota statistička razlika postoji između skupine viremičnih i kontrolne skupine te skupine aviremičnih i kontrolne skupine, kod CT-heterozigota je ta razlika je vidljiva i između viremične i aviremične skupine. Kod CC-homozigota i CT-

heterozigota vidi se smanjeni postotak metilacije na svim CpG-mjestima u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 14 i 15).



Slika 14. Postotak metilacije CpG-mjesta fragmenta F1 gena *BACH2* određen pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije DNA. Za svako CpG-mjesto prikazan je stupac metilacije u uzorku ispitanika s mjerljivom viremijom (prvi stupac, VR/CC), ispitanika s nemjerljivom viremijom (drugi stupac, ND/CC) i kontrolne skupine (KON/CC). Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicama između relevantnih grupa. Jedna zvjezdica (*) označava p-vrijednost ≤ 0,01, dvije zvjezdice (**) ≤ 0,001, tri zvjezdice (***) ≤ 0,0001.



Slika 15. Postotak metilacije CpG-mjesta fragmenta F1 gena *BACH2* određen pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije DNA. Za svako CpG-mjesto prikazan je stupac

metilacije u uzorku ispitanika s mjerljivom viremijom (prvi stupac, VR/CT), ispitanika s nemjerljivom viremijom (drugi stupac, ND/CT) i kontrolne skupine (KON/CT). Statistički značajna p-vrijednost označena je zvjezdicama između relevantnih grupa. Jedna zvjezdica (*) označava p-vrijednost ≤ 0,01, dvije zvjezdice (**) ≤ 0,001, tri zvjezdice (***) ≤ 0,0001.

6.4 Metilacija promotora gena *BACH2* u odnosu na klinički status pacijenata

6.4.1. Mann-Whitneyev test

Za statističku analizu Mann-Whitney testom, pacijenti su grupirani prema dva kriterija. Uspoređene su skupine pacijenata koji imaju dokazanu viremiju u trenutku uzimanja uzoraka i onih kod kojih viremija nije dokazana rutinskim metodama. Isto tako, uspoređeni su podaci za skupine pacijenata koji su na mjestu rs404256 CT-heterozigoti ili CC-homozigoti. Analizirane su potencijalne razlike u metilaciji 62 CpG-mjesta promotora *BACH2*, postotka T-limfocita CD4+ i ukupnog broja T-limfocita pri dijagnozi, kao i potencijalne razlike u dobi navedenih skupina ispitanika. Razina značajnosti bila je $p<0,05$.

Skupine viremičnih i aviremičnih ispitanika statistički se značajno razliku prema metilaciji sva tri CpG-mjesta fragmenta F1 (p=0,001) i svih CpG-mjesta fragmenta F4 (p=0) gena *BACH2*, 3. CpG-mjestu fragmenta F3 (p=0,036), 2. (p=0,036), 9. (p=0,033), i 13. (p=0,044) CpG-mjestu fragmenta F5 i 2. (p=0,007) CpG-mjestu fragmenta F7. Metilacija navedenih mjesta je viša kod aviremičnih ispitanika, osim u slučaju fragmenta F3 gdje je metilacija viša kod viremičnih ispitanika. Statistički značajna razlika utvrđena je i u dobi ispitanika ovih dviju skupina (p=0,002). Aviremični ispitanici stariji su pri postavljanju dijagnoze.

Analiza navedenih podataka između skupina CT-heterozigota i CC-homozigota pokazuje statistički značajnu razliku u prvom CpG-mjestu fragmenta F1 (p=0), 6. (p=0,035) i 14. (0,038) CpG-mjestu fragmenta F3, 5. (p=0,011), 6. (p=0,032), 12. (p=0,042), i 14. (p=0,024) CpG-mjestu fragmenta F5 te 1. (p=0,043), 2. (p=0,013), 3. (p=0,019), i 13. (p=0,045) CpG-mjestu fragmenta F6. Razlika je utvrđena i s obzirom na dob ispitanika (p=0,036).

6.4.2. Spearmanova korelacija

Korelacija metilacije svih 62 CpG-mjesta, postotka T-limfocita CD4+, ukupnog broja T-limfocita i dobi ispitanika određivana je u svakoj podskupini ispitanika: viremični (VR), aviremični (ND), CC-homozigoti i CT-heterozigoti. Razina značajnosti bila je 0,05.

Kod svih podgrupa ispitanika sva CpG-mjesta pojedinog fragmenta međusobno su u pozitivnoj korelaciji. Smjer korelacije pojedinog mjesta unutar pojedinog fragmenta s ostalim mjestima ostalih fragmenata razlikuje se od mjesta do mjesta.

Ispitanici koji su CC-homozigoti

Skupina ispitanika koji su CC-homozigoti ima snažnu pozitivnu korelaciju (p=0,000) sva 3 CpG-mjesta fragmenta F1 dok kod skupine ispitanika koji su heterozigoti za taj polimorfizam 1. CpG-mjesto fragmenta F1 nije u korelaciju s ostalima. Takvu korelaciju ne pokazuje niti 1. CpG-mjesto fragmenta F1 kod viremičnih i aviremičnih ispitanika. 2. (p=0,018) i 3. (p=0,011) CpG-mjesto fragmenta F1 pozitivno koreliraju s fragmentom F5 dok s drugim fragmentima nema korelacija. Te korelacije nema kod ostalih navedenih podskupina. Fragment F3 gena *BACH2* ne pokazuje korelaciju niti sa jednim drugim fragmentom. Iznimka su prva tri CpG-mjesta fragmenta F3 pokazuju pozitivnu korelaciju sa zadnja 3 CpG-mjesta fragmenta F6 (p=0,003; p=0,008; p=0,002). Fragment F4 ima snažnu pozitivnu korelaciju s fragmentima F5 i F6 gena *BACH2* (p=0,000), iznimka je prvo CpG-mjesto fragmenta F4 koje ima negativnu korelaciju s prva tri CpG-mjesta fragmenta F6 (p=0,013). U pozitivnoj korelaciji je broj T-limfocita s postotkom CD4+ stanica (p=0,000).

Ispitanici koji su CT-heterozigoti

Jedna od razlika skupine ispitanika koji su CT-heterozigoti je u korelaciji unutar fragmenta F1 gdje pozitivne korelacije nema kod prvog CpG-mjesta. Prva tri CpG-mjesta fragmenta F3 gena *BACH2* pokazuju pozitivnu korelaciju sa CpG-mjestima 7 do 13 fragmenta F5 (p<0,01) što je razlika u odnosu na CC-homozigote, ali i aviremične, dok viremični ispitanici imaju istu korelaciju. U ovoj skupini ispitanika fragment F3 ima istu korelaciju s fragmentom F6 kao i kod CC-homozigota. Još jedna korelacija koje nema kod CC-homozigota je i pozitivna korelacija 2. (p=0,011) i 3. (p=0,006) CpG-mjesta fragmenta F3 sa trećim CpG-mjestom fragmenta F7 te negativna korelacija tih CpG-mjesta s postotkom CD4+ stanica (p=0,01). Unutar ove skupine fragment F4 ima pozitivnu korelaciju s fragmentom F5, ali ne i sa fragmentima F6 i F7. Fragmenti F5 i F6 gena *BACH2* su u pozitivnoj korelaciji.

Viremični ispitanici

Kod skupine viremičnih ispitanika postoji negativna korelacija 1. CpG-mjesta fragmenta F1 s 1. CpG-mjestom fragmenta F3 (p=0,034), 4. (p=0,024), 8. (p=0,022) i 9. (p=0,019) CpG-mjestom fragmenta F4 te 2. CpG-mjestom fragmenta F5 (p=0,028). Fragment F3 i F4 su u

pozitivnoj korelaciji (p=0,01), dok fragment F3 nije u korelaciji s fragmentima F6 i F7. Prva tri CpG-mjesta fragmenta F3 su u pozitivnoj korelaciji sa CpG-mjestima 7-13 fragmenta F5 (p=0,01), isto kao i kod CC-homozigota. Fragment F4 ne pokazuje korelaciju s fragmentima F5 i F6, a fragment F5 je u pozitivnoj korelaciji s fragmentom F6.

Aviremični ispitanici

Unutar ove skupine samo 2. i 3. CpG-mjesto fragmenta F1 (p=0,000) pokazuju pozitivnu korelaciju jedan s drugim dok prvo CpG-mjesto nema korelacije niti s jednim drugim CpG-mjestom. 2. CpG-mjesto fragmenta F1 ima negativnu korelaciju s 1. (p=0,002), 2. (p=0,034), i 4. (p=0,011) CpG-mjestom fragmenta F4 dok kod drugih skupina ta korelacija nije uočena. 2. (p=0,001) i 3. (p=0,021) CpG-mjesto pokazuje negativnu korelaciju i s dobi ispitanika. Korelacija koja je uočena u svim skupinama ispitanika osim viremičnih uočena je i ovdje: pozitivna korelacija prva tri CpG-mjesta fragmenta F3 sa zadnja tri CpG-mjesta fragmenta F6. Fragment F4 ne pokazuje korelaciju s fragmentima F5 i F6 gena *BACH2* kao i kod viremičnih ispitanika. Razlika je u korelaciji fragmenta F5 s fragmentom F6: u ovoj skupini nema korelacije ta dva fragmenta dok je kod viremičnih ispitanika ona prisutna. Ova skupina pokazuje i pozitivnu korelaciju fragmenta F6 s drugim CpG-mjestom fragmenta F7.

7 RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je u svim analiziranim fragmentima gena *BACH2* došlo do povećanja metilacije kod viremičnih i aviremičnih ispitanika u odnosu na kontrolnu, zdravu skupinu. Kod grupe ispitanika s nemjerljivom viremijom (ND) koji primaju antiretrovirusnu terapiju vidljiva je povećana metilacija u svim fragmentima gena *BACH2* u odnosu na ispitanike s mjerljivom viremijom, ali i na kontrolnu skupinu što postavlja pitanje djelovanja terapije na metilaciju *BACH2* kod HIV-om zaraženih osoba. Spearmanovom korelacijskom analizom svih CpG-mjesta unutar svake skupine ispitanika utvrđeno je da postoji pozitivna korelacija unutar svakog analiziranog fragmenta. Unutar svake skupine ispitanika postoji razlika u korelaciji između pojedinih fragmenata što upućuje na to da kliničko stanje ispitanika, ali i polimorfizam gena *BACH2* utječu različito na metilaciju promotorske regije gena *BACH2*. Naime, pokazana je velika razlika u metilaciji i korelaciji unutar fragmenta F1 gena *BACH2* između CC-homozigota i CT-heterozigota, dok je između viremičnih i aviremičnih ispitanika najveća razlika u metilaciji unutar fragmenta F4 gena *BACH2*.

Analiza metilacije promotorske regije gena *BACH2* pokazala je značajnu razliku u metilaciji većine CpG-mjesta unutar CpG-otoka u uzorcima ispitanika zaraženih HIV-om u odnosu na zdrave ispitanike. Očita je razlika između fragmenta F7 gena *BACH2* i ostalih fragmenata (F6-F3), te unutar samog fragmenta F7 gdje jedino CpG3-mjesto pokazuje veću metilaciju kod skupina viremičnih i aviremičnih ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu. Takva razlika lokalne metilacije sugerira regulatornu funkciju tog dijela fragmenta. Kod podjele ispitanika na CC-homozigote i CT-heterozigote vidi se statistička razlika između njih i kontrolne skupine, te je u oba slučaja riječ o hipometilaciji na svim CpG-mjestima. Zanimljivo je da je CpG1-mjesto kod CT-heterozigota puno manje metilirano u odnosu na CC-homozigote. Genetički polimorfizam na mjestu rs404256 gena *BACH2* povezan je s nastankom brojnih autoimunih bolesti i alergija uključujući astmu, Crohnovu bolest, celijakiju, multiplu sklerozu i dijabetes tipa 1. Kod svih tih bolesti promotor gena *BACH2* je hipermetiliran (Roychoudhuri i sur.,2013).

Virusne infekcije, posebno infekcije DNA virusa i retrovirusa koji se mogu ugraditi u genom domaćina, često utječu na metilaciju DNA koja utišava virusne gene. Taj proces započinje metiltransferaza DNMT1 koja metilira CpG-mjesta u promotoru virusa te regrutira ostale proteine važne za utišavanje ekspresije poput MeCP, HDAC i transkripcijskog represora Sin3. Neki virusi mogu te mehanizme iskoristiti u svoju korist. Hipermetilacija promotorske regije tumorskog supresora $p16^{INK4}$ omogućava virusu hepatitisa B (HBV) nekontroliranu proliferaciju zaraženih stanica te je prisutna u 60% svih hepatocelularnih karcinoma povezanih infekcijom

HBV-om. Gen *LMP1* (od eng. *latent membrane protein 1*) Epstein-Barr virusa je prvi virusni gen povezan s aktivacijom DNMT1. Hipermetilacija velikog broja tumorskih-supresora, najčešće gena koji su korisni za replikaciju virusa, dovodi do razvoja tumora specifičnih za EBV poput Burkittovog limfoma i limfoma T-stanica (Li i sur.,2005).

Infekcija HIV-om također dovodi do povećane aktivnosti DNMT1. Aktivacija dovodi do promjena u globalnoj genomskoj metilaciji i do smanjenja ekspresije gena važnih za imunološki odgovor tijekom virusnih infekcija (IFN-γ i $p16^{INK4}$). Ovi primjeri ukazuju na to da virusni geni utječu na regulaciju DNMT1 te da metilacijski status može poslužiti kao marker u dijagnostičke svrhe (Li i sur.,2005).

Gen *BACH2* ima široku regulatornu ulogu u aktivaciji imunološkog sustava: važan je za uspješno stvaranje regulatornih T-limfocita (Treg) koji imaju ulogu u utišavanju upalnih procesa, a njegovo odsustvo je važno za diferencijaciju pomoćničkih Th1, Th2 i Th17 stanica (Roychoudhuri i sur.,2013). Najnovija istraživanja pokazuju da deficijencija gena *BACH2* dovodi do smanjenja tumorskog tkiva kod *BACH2 knock-out* miševa te do povećanja broja CD4+ i CD8+ T-limfocita koji potiču upalni odgovor na tumorsko tkivo (Roychoudhuri i sur.,2016). Povećanje metilacije promotorske regije gena *BACH2* u osoba zaraženih HIV-om može doprinijeti povećanju ukupnog broja efektorskih T-limfocita koji omogućavaju upalni odgovor na zaražene stanice.

BACH2 regulira diferencijaciju CD8+ T-limfocita i omogućava njihovu funkciju tijekom primarne i sekundarne infekcije. Ograničava završnu diferencijaciju efektorskih stanica i apoptozu stanica koje odgovaraju na virusnu infekciju te time omogućava stvaranje dugotrajnih memorijskih stanica koje su važne za prepoznavanje patogena pri ponovnom ulasku u stanicu (Roychoudhuri i sur.,2016). Kod *BACH2 knock-out* miševa opisano je povećanje ekspresije gena koji su važni za imunološki odgovor, posebice onih zaslužnih za odgovor na stres i urođenu imunost (Tsukumo i sur.,2013). Hipermetilacija *BACH2* kod HIV-om zaraženih osoba mogla bi imati upravo takav učinak na imunološki sustav. To bi objasnilo povećanu metilaciju CpG-mjesta ispitanika s nemjerljivom viremijom (ND) u odnosu na ispitanike s mjerljivom viremijom. Antiretrovirusna terapija djeluje tako da inhibira virusne proteine, ali je i izvor stresa za zaražene stanice i cijeli organizam. Povećanje metilacije *BACH2* moglo bi se povezati s aktivacijom raznih puteva imunološkog sustava koji imaju ulogu u odgovoru na stres.

Nova istraživanja govore u prilog da je *BACH2* represor super-pojačivača (SE, od eng. *super enhancer*). SE su velike grupe (klasteri) transkripcijskih pojačivača koji se od uobičajenih

pojačivača razlikuju prema veličini i broju gena koje aktiviraju. *BACH2* bi u tom slučaju vršio represiju raznih gena povezanih sa SE, važnih za funkciju T-limfocita i održavanje imunološke homeostaze (Zhou i sur.,2016). Postoje naznake da bi mogao djelovati kao pasivni transkripcijski represor: u CD8+ T-limfocitima se veže na AP1 (od eng. *activator protein* 1) mjesta unutar pojačivača i modulira dostupnost signala porodici transkripcijskih aktivatora Jun bez da utječe na kromatinsku strukturu. Time je dokazano da konkurira s AP1 za vezno mjesto na DNA (Roychoudhuri i sur.,2016).

Prema dobivenim rezultatima moglo bi se zaključiti da dolazi do utišavanja, odnosno represije, gena *BACH2* koja rezultira povećanjem broja efektorskih T-limfocita važnih za imunološki odgovor u prisutnosti patogena. Iako statistički značajna, promjena metilacije svih fragmenata je mala, no mora se uzeti u obzir da je analizirana metilacija iz pune krvi u kojoj se nalaze različiti tipovi stanica (T-limfociti, B-limfociti, monociti i granulociti). Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila funkcija gena *BACH2* u T-limfocitima zaraženih HIV-om kao utjecaj antiretrovirusne terapije na njegovu ekspresiju.

8 ZAKLJUČAK

U svim fragmentima promotorske regije gena *BACH2* kod ispitanika zaraženih HIV-om vidljiva je hipermetilacija CpG-mjesta. Kod aviremičnih ispitanika, odnosno ispitanika koji primaju antiretrovirusnu terapiju, hipermetilacija CpG-otoka je izraženija u odnosu na viremične ispitanike i na kontrolnu skupinu.

9 REFERENCE

Andreis I., Batinić D., Čulo F., Grčević D., Lukinović-Škudar V., Marušić M., Taradi M., Višnjić D., 2010. Imunologija. *Medicinska naklada*, Zagreb

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

Arts E.J., Hazuda D.J., 2011. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. *Cold Springs Harbor Laboratory Press*. 1-24

Barré-Sinoussi F., Chermann J.C., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dauquet C., Axler-Blin C., Vézinet-Brun F., Rouzioux C., Rozenbaum W. Montagnier L., 1983. Isloation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220(4599); 868-710

Barré-Sinoussi F., Ross A.L., Delfraissy J.F., 2013. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nature reviews. Microbiology.* 11(12); 877-883

Coffin J., Swanstrom R., 2013. HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells. *Cold Springs Harbor Perspectives in Medicine*, 3;1-16

Dean M., Carrington M., Winkler C., Huttley G.A., Smith M.W., Allikmets R., Goedert J.J., Buchbinder S.P., Vittinghoff E., Gomperts E., Donfield S., Vlahov D., Kaslow R., Saah A., Rinaldo C., Detels R., O'Brien S.J., 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study. San Fracisco City Cohort, ALIVE Study. *Science.* 273(5283); 1856-1862

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. i Berger, E. A.,1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272; 872–877

Freed E.O., 2002. HIV-1 replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics.* 26; 13-33

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

Kim J.K., Samaranayake M., Pradhan S., 2008. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66(2009); 596-612

Li H.P., Leu Y.W., Chang Y.S., 2005. Epigenetic changes in virus-associated human cancers. *Cell Research* 15(4);262-271

Menendez-Arias L. 2010. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: an update. *Antiviral Research*. 85(1); 210-231

Mocroft A., Phillips A.N., Gatell J., Ledergerber B., Fisher M., Clumeck N., Losso M., Lazzarin A., Fatkenheuer G., Lundgren J.D., 2007. Normalisation of DC4 counts in patients with HIV-1 infection and maximum virological suppression who are taking combination antiretroviral therapy: an observation cohort study. *The Lancet.* 370(9585); 407-413

Moore L.D., Le T., Fan G., 2013. DNA Methylation and Its Basic Functions. *Neuropsychopharmacology.* 38; 23-38

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

Muto A., Tashiro S., Nakajima O., Hoshino H., Takahashi S., Sakoda E., Ekebe D., Yamamoto M., Igarashi K.,2004. The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature.* 429(6991); 566-571

O'Brien W.A., Zack J.A., Chen I.S., 1990. Molecular pathogenesis of HIV-1. *AIDS*. 1; 41-48

Palmisano L., Vella S., 2011. A brief history of antiretroviral therapy of HIV infection: success and challenges. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 47(1); 44-48

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

Roychoudhuri R., Eil R.L., Clever D., Klebanoff C.A., Sukumar M., Grant F.M., Yu Z., Mehta G., Liu H., Jin P., Ji Y., Palmer D.C., Pan J.H., Chichura A., Crmpton J.G., Patel S.J., Stroncek D., Wang E., Marincola F.M., Okkenhaug K., Gattinoni L., Restifo N.P., 2016. The transcription factor BACH2 promotes tumor immunosuppression. *The Journal of Clinical Investigation* 126(2); 599-604

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

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

Zhou Y., Wu H., Zhao M., Chang C., Lu Q.,2016. The Bach family of transcription factors: A coprehensive review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 50; 345-356

10 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 04.04.1990. u Ljubljani. Nakon selidbe u Zagreb, pohađala sam i završila Osnovnu školu „Žitnjak“ i IV. Gimnaziju u Zagrebu kao odlična učenica. U rujnu 2009. upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i završila ga u rujnu 2014., čime sam stekla zvanje sveučilišnog prvostupnika molekularne biologije (univ. bacc. biol. mol). U rujnu 2014. upisala sam diplomski studij molekularne biologije.

Tijekom školovanja iskoristila sam mnoge prilike koje nudi studiranje na Biološkom odsjeku, uključujući demonstraturu na Zoologiji (ak. god. 2010/2011), praksu na Zavodu za mikrobiologiju (ak. god. 2011/2012, 2012/2013) na metodama izolacije biljnih virusa i njihovoj pripremi za daljnje analize, praksu na Zavodu za molekularnu biologiju (ljeto 2014.) na izolaciji identifikaciji plazmida iz *Escherichia Coli* te praksu na Zavodu za animalnu fiziologiju (ak.god. 2014/2015). Uz studiranje od 2013. radila sam u H&M-u, te od 2016. radim na recepciji i kao pomoćnik u nastavi u školi stranih jezika. Sudjelovala sam u studentskim udrugama poput Udruge studenata biologije (BIUS) i pomagala u ostvarenju znanstveno-popularne manifestacije Noć biologije.