

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Fran Lukšić

Uloga transkripcijskih faktora HNF-1α i HNF-4α u deregulaciji N-glikoma beta stanica gušterače

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Zagreb, 2026.

University of Zagreb

Faculty of science

Fran Lukšić

Role of transcription factors HNF-1α and HNF-4α in the deregulation of pancreatic beta cell N-glycome

DOCTORAL DISSERTATION

Mentor:
Prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Zagreb, 2026.

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

Prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš redovita je profesorica u trajnom izboru na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje vodi Laboratorij za epigenetiku. Njezina su glavna područja istraživanja epigenomsko uređivanje primjenom sustava CRISPR/dCas9 te genetička i epigenetička regulacija glikozilacije proteina, osobito imunoglobulina G. Njezina je istraživačka grupa 2016. godine objavila pionirski CRISPR/dCas9 alat za ciljanu metilaciju DNA temeljen na fuziji dCas9 i DNMT3A, a daljnjim razvojem ovih alata istražuje međudjelovanje epigenetičkih mehanizama u regulaciji genske ekspresije i glikozilacije. Sudjelovala je u brojnim nacionalnim i međunarodnim istraživačkim projektima, uključujući projekte programa FP7 i Horizon 2020 te projekte Hrvatske zaklade za znanost, a trenutačno vodi projekt IgGeneNET usmjeren na regulaciju glikozilacije IgG-a. Mentorirala je niz doktoranada i autorica je više od 60 znanstvenih radova iz područja epigenetike i glikobiologije koji su citirani preko 4000 puta.

Zahvale

Nisam veliki fan zahvala, pogotovo kada trebam zahvaliti zaista velikom broju ljudi i pritom možda nekoga zaboravim, ali pokušat ću sve sažeti.

Prije svega želim zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš, na pomoći, savjetima i vodstvu tijekom ovih pet godina. Još prije upisa doktorata potaknuli ste me da krenem ovim putem i pridružim se grupi, čime ste mi otvorili vrata svijeta znanosti i omogućili da iz svega toga proizađe mnogo više nego što sam tada mogao zamišljati, puno više od samog doktorata. Na tome ću Vam uvijek biti zahvalan.

Želim zahvaliti i svim starim i novim članovima Grupe za epigenetiku, koje moram poimence navesti jer su tako naredili: Vedrani, Goranu, Aniki, Niki, Kristini, Lani, Mariji, Karlu i Ani. Hvala vam na svim savjetima i uputama, pomoći i podršci, ali i na svim lijepim trenucima i zajedničkim uspomenama koje ću uvijek pamtiti. Neki su očekivali cijele odlomke zahvale, ali vjerujem da i bez njih znaju koliko sam sretan i zahvalan što sam ove godine proveo s vama. Ovdje svakako moram spomenuti i cijeli tim iz Genosa, koji mi je od samog dolaska bio velika pomoć i podrška, a nadam se se da će tako i ostati.

Želim zahvaliti i svom karate klubu „Mladost“ Samobor, u kojem sam odrastao i čiji su mi članovi i treneri kroz dvadeset godina postali druga obitelj na koju se uvijek mogu osloniti.

Za kraj, kao što to obično ide, želim zahvaliti svojoj obitelji, užoj i malo široj. Posebno hvala mojoj mami, tati i sestri. Vi ste moja podrška i oslonac u svakom trenutku, ali i glavni razlog zbog kojeg uvijek idem dalje, čak i ako vam to ne kažem dovoljno često. Hvala vam što ste bili uz mene kroz sve dobre i loše dane i što ste vjerovali u mene čak i onda kada sam ja sumnjao. Mama, tata, seka, bez vas ništa od ovoga ne bi imalo isti smisao.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

Uloga transkripcijskih faktora HNF-1α i HNF-4α u deregulaciji N-glikoma beta stanica gušterače

Fran Lukšić

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Transkripcijski faktori HNF-1α i HNF-4α ključni su regulatori funkcije beta stanica gušterače, a njihova je deregulacija povezana s monogenskim oblicima dijabetesa i dijabetesom tipa 2. Iako je poznato da uz brojne stanične procese reguliraju i glikozilaciju proteina, njihova točna uloga u tom procesu nije razjašnjena. Cilj ove disertacije bio je istražiti tu ulogu u validiranom modelu ljudskih beta stanica EndoC-βH1. U tu svrhu po prvi sam puta karakterizirao ukupni *N*-glikom tih stanica te proširio postojeći modularni CRISPR/dCas sustav promotorom RIP specifičnim za beta stanice, komponentom dCasMINI i aktivnom nukleazom Cas9 za učinkovitiju inaktivaciju, represiju i aktivaciju *HNF1A* i *HNF4A*. Nakon genskih manipulacija analizirane su promjene *N*-glikoma i ekspresije gena od interesa, a utjecaj lipotoksičnog stresa ispitan je tretmanom palmitinskom kiselinom. Utišavanje *HNF1A* izazvalo je izraženije promjene glikoma od utišavanja *HNF4A*, no njihov intenzitet nije pratio stupanj utišavanja: najveće promjene, ponajprije povećana zastupljenost razgranatih i sijaliniziranih *N*-glikana, zabilježene su nakon umjerenog utišavanja. Vrlo slične promjene uzrokovala je palmitinska kiselina, što podupire povezanost dijela učinka lipotoksičnosti s deregulacijom HNF-1α. Promjene glikoma uglavnom nisu korelirale s promjenama ekspresije analiziranih gliko-gena, što upućuje na dodatne razine regulacije *N*-glikozilacije. Rezultati povezuju aktivnost *HNF1A* i lipotoksični stres s promjenama *N*-glikoma te upućuju na nelinearan odnos između stupnja utišavanja *HNF1A* i odgovora *N*-glikoma beta stanica gušterače.

(138 stranica, 37 slika, 5 tablica, 232 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: HNF1A; HNF4A; beta stanice gušterače; EndoC-βH1; CRISPRi/a; *N*-glikozilacija

Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Aleksandar Vojta

prof. dr. sc. Olga Gornik Kljaić

doc. dr. sc. Ivan Gudelj

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

Role of transcription factors HNF-1α and HNF-4α in deregulation of pancreatic beta cell N-glycome

Fran Lukšić

Faculty of Science, University of Zagreb

Transcription factors HNF-1α and HNF-4α are key regulators of pancreatic beta-cell function, and their dysregulation is associated with monogenic forms of diabetes and type 2 diabetes. Although they regulate numerous cellular processes, including protein glycosylation, their precise role in this process remains unclear. The aim of this dissertation was to investigate this role in EndoC-βH1 cells, a validated model of human beta cells. For this purpose, I characterized the total *N*-glycome of these cells for the first time and expanded an existing modular CRISPR/dCas system by introducing the beta-cell-specific RIP promoter, dCasMINI, and catalytically active Cas9 to facilitate targeted inactivation, repression, and activation of *HNF1A* and *HNF4A*. Following genetic manipulation, *N*-glycome and gene-expression changes were analyzed, while the effects of lipotoxic stress were examined following palmitic acid treatment. *HNF1A* silencing induced more pronounced glycome changes than *HNF4A* silencing, but the magnitude of these changes did not correspond to the degree of silencing: the largest changes, primarily an increased abundance of branched and sialylated *N*-glycans, were observed after moderate silencing. Palmitic acid induced highly similar changes, supporting a link between some effects of lipotoxicity and HNF-1α dysregulation. Glycome changes generally did not correlate with changes in the expression of the analyzed glyco-genes, pointing to additional levels of *N*-glycosylation regulation. These results link HNF-1α activity and lipotoxic stress to changes in the *N*-glycome and indicate a nonlinear relationship between the degree of *HNF1A* silencing and the *N*-glycome response of pancreatic beta cells.

(138 pages, 37 figures, 5 tables, 232 references, original in Croatian)

Keywords: HNF1A; HNF4A; pancreatic beta cells; EndoC-βH1; CRISPRi/a; *N*-glycosylation

Supervisor: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Reviewers: prof. dr. sc. Aleksandar Vojta
prof. dr. sc. Olga Gornik Kljaić
doc. dr. sc. Ivan Gudelj

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Literaturni pregled 6

2.1. Gušterača, beta stanice i inzulin 6

2.1.1. Građa i uloga gušterače 6

2.1.2. Beta stanice 6

2.1.3. Inzulin 7

2.1.4. Modeli za istraživanje beta stanica 9

2.2. Dijabetes 11

2.2.1. Dijabetes tipa 1 11

2.2.2. Dijabetes tipa 2 12

2.2.3. MODY tip dijabetesa 13

2.2.4. Ostali tipovi dijabetesa 13

2.3. Hepatocitni nuklearni faktori 14

2.3.1. Transkripcijski faktor HNF-1α 14

2.3.2. Transkripcijski faktor HNF-4α 16

2.4. Glikozilacija 17

2.4.1. N-glikozilacija 18

2.4.2. Glikozilacija proteina beta stanica gušterače i dijabetes 21

2.5. Sustav CRISPR/Cas9 i derivirani sustavi za ciljanu manipulaciju gena 23

3. Materijali i metode 27

3.1. Materijali 27

3.1.1. Stanične i bakterijske linije 27

3.1.2. Popis svih sljedova početnica i molekula gRNA 27

3.2. Metode 34

3.2.1. Uzgoj stanične linije EndoC-βH1 34

3.2.2. Optimizacija selekcije stanica EndoC-βH1 antibioticima blasticidinom i puromicinom 34

3.2.3. Testiranje transfekcijskih metoda za unos plazmida u stanice EndoC-βH1 34

3.2.4. Pakiranje lentivirusa 36

3.2.5. Transdukcija stanica EndoC-βH1 36

3.2.6. Kloniranje promotora RIP2 37

3.2.7. Kloniranje modula SpCas9 38

3.2.8. Kloniranje modula dCasMINI za stvaranje N- i C-fuzija 38

3.2.9. Izrada „multi-guide“ sustava za CasMINI 40
3.2.10. Izrada finalnih konstrukata za ciljanu manipulaciju gena od interesa sustavima dCas9-KRAB i Cas9 43
3.2.11. Izrada finalnih konstrukata za ciljanu aktivaciju gena fuzijom CasMINI-VPR 44
3.2.12. Izrada stabilnih linija i ciljana manipulacija gena od interesa 45
3.2.13. Analiza promjena GSISa 46
3.2.14. Tretman stanica povišenim koncentracijama glukoze i palmitinskom kiselinom 46
3.2.15. Analiza promjena transkripcijske aktivnosti gena od interesa 47
3.2.16. Analiza promjena ekspresije gena od interesa na proteinskom razini 47
3.2.17. Analiza ukupnog N-glikoma 49
3.2.18. Statistička analiza i obrada podataka 57
4. Rezultati 58
4.1. Optimizacija uvjeta rada na staničnoj liniji EndoC-βH1 58
4.2. Nadogradnja modularnog sustava CRISPR novim modulima 63
4.2.1. Konstrukcija modula s promotorom specifičnim za beta stanice gušterače 63
4.2.2. Konstrukcija modula aktivne nukleaze Cas9 63
4.2.3. Konstrukcija modula dCasMINI za N- i C-terminalne fuzije 64
4.2.4. Konstrukcija multi-guide sustava za CasMINI 64
4.2.5. Konstrukcija finalnih vektora za ciljanu aktivaciju gena sustavom dCasMINI-VPR 65
4.2.6. Provjera učinkovitosti modula Cas9 i RIP2 66
4.2.7. Usporedba N- i C-terminalne dCasMINI-VPR fuzije 70
4.3. Izrada stabilne stanične linije EndoC-KRAB i ciljano utišavanje *HNF1A* i *HNF4A* 73
4.4. Ekspresija nizvodnih gena u stabilnoj staničnoj liniji EndoC-KRAB nakon ciljanog utišavanja gena *HNF1A* i *HNF4A* 76
4.5. *N*-glikom stanične linije EndoC- βH1 78
4.6. Promjene ukupnog *N*-glikoma stanične linije EndoC-KRAB nakon ciljanog utišavanja gena *HNF1A* ili *HNF4A* 80
4.6.1. Promjene transkripcije gena FUT8 i promjena udjela glikanskih struktura sa sržnom fukozom 80
4.6.2. Promjene transkripcije gena MGAT3 i udjela glikanskih struktura s račvajućim GlcNAc 81
4.6.3. Promjene transkripcije galaktoziltransferaze B4GALT1 i udjela glikanskih struktura s galaktozom 82

4.6.4. Promjene transkripcije sijaliltransferaza ST6GAL1, ST3GAL1, ST3GAL3 i ST3GAL4 te udjela sijaliniziranih glikana.....83

4.6.5. Promjene transkripcije gena MGAT4A, MGAT4B i MGAT5 te udjela razgranatih glikana.....86

4.7. Utjecaj ciljanog utišavanja gena *HNF1A* ili *HNF4A* na GSIS.....88

4.8. Utjecaj povišenih koncentracija glukoze i palmitinske kiseline na ukupni *N*-glikom i ekspresiju gena od interesa.....91

4.9. Ciljana aktivacija gena *FUT8* i *ST3GAL3*.....95

5. Diskusija.....98

6. Zaključak.....116

7. Popis literature.....117

8. Životopis.....138

1. Uvod

Gušterača je žlijezda s ključnom ulogom u regulaciji metabolizma glukoze u ljudskom organizmu. Za tu su ulogu neophodna dva tipa stanica, alfa i beta stanice, smještene unutar Langerhansovih otočića. Alfa stanice luče glukagon, hormon koji signalizira nedostatak glukoze u krvi, što potiče razgradnju glikogena u jetri i otpuštanje glukoze u krvotok. S druge strane, beta stanice imaju primarnu ulogu u sintezi, pohranjivanju i izlučivanju inzulina, ključnog hormona koji regulira odgovor na povišenu koncentraciju glukoze [1].

Deregulacija metabolizma beta stanica dovodi do ozbiljnih fizioloških poremećaja i razvoja dijabetesa [2], [3]. Dijabetes nije jedna bolest, već skupina kroničnih poremećaja čija je zajednička značajka hiperglikemija uzrokovana inzulinskom insuficijencijom i/ili rezistencijom. Iako su uzročni mehanizmi brojni, dijabetes se najčešće dijeli u četiri grupe: tip 1, tip 2, gestacijski dijabetes te ostali tipovi dijabetesa u kojima je najučestaliji monogenski dijabetes (eng. *maturity-onset diabetes of the young*, MODY) [4]. Dijabetes tipa 2 najučestaliji je oblik s incidencijom u stalnom porastu, što se djelomično pripisuje modernom načinu života i prehrani bogatoj mastima i šećerima [5], [6]. Za razliku od dijabetesa tipa 1, dijabetes tipa 2 nije autoimuna bolest, no još se uvijek istražuju uzroci koji do njega dovode, a koji uključuju deregulaciju različitih molekularnih mehanizama. Ta deregulacija uključuje poremećaje inzulinskog signaliziranja, metabolizma glukoze i lipida te razvoj oksidacijskog i endoplazmatskog stresa, što postupno narušava funkciju beta stanica i dodatno doprinosi razvoju inzulinske rezistencije [7]. Osim dobro opisane metaboličke deregulacije, dijabetes je povezan s opsežnim promjenama u glikozilaciji proteina, što pridonosi progresiji bolesti i razvoju komplikacija kao što su nefropatija, neuropatija, retinopatija i kardiovaskularne bolesti [8]. Najnovija istraživanja ukazuju na to da promjene glikozilacije proteina u dijabetesu utječu na ključne patološke procese, uključujući kroničnu upalu, inzulinsku rezistenciju i endotelnu disfunkciju [9], [10]. Stoga, specifični profili *N*-glikana ukupnog proteoma ili pak specifičnih proteina imaju potencijal biomarkera za ranu dijagnozu, prognozu i terapijsko praćenje dijabetesa [11].

Glikozilacija je proces kovalentnog vezanja glikana na protein, lipid ili molekulu RNA. Glikani su kompleksni ugljikohidrati koji se razlikuju po broju, rasporedu i vrsti monosaharida te po glikozidnim vezama između podjedinica. Osim strukturne funkcije, imaju ključnu ulogu u brojnim staničnim procesima poput pravilnog smatanja, lokalizacije i stabilnosti proteina, kao

i u međustaničnim interakcijama [12], [13]. Ovisno o vezi između proteina i glikana, razlikujemo više tipova glikozilacije, a najčešći su *N*- i *O*-vezana glikozilacija.

N-glikozilacija započinje u endoplazmatskom retikulumu (ER) prijenosom 14 monosaharida na asparagin u motivu Asn-X-Ser/Thr proteina. U ER-u dolazi do inicijalne obrade prekursora, nakon čega se protein s oligosaharidom transportira u Golgijev aparat. Tamo se glikan dalje modificira djelovanjem različitih enzima glikozidaza i glikoziltransferaza, formirajući konačne strukture (oligomanozne, kompleksne ili hibridne). Ključne glikozidaze su manozidaze, koje uklanjaju specifične ostatke manoze s glikana novonastalih proteina, omogućujući tako nastanak hibridnih i kompleksnih glikanskih struktura [14]. Glikoziltransferaze dijelimo u nekoliko skupina: N-acetilglukozaminiltransferaze koje stvaraju razgranate strukture; galaktoziltransferaze koje produljuju grane glikana dodatkom galaktoze; sijaliltransferaze čija je uloga dodavanje sijalinske kiseline; te fukoziltransferaze koje dodaju fukozu na srž (sržna fukozilacija) ili na grane (antenarna fukozilacija) glikana. Promjene u ovim elementima glikozilacije proteina pronađene su u brojnim patološkim procesima, od tumora, autoimunih i upalnih bolesti do metaboličkih poremećaja uključujući dijabetes [15], [16], [17].

Glikozilacija proteina ima ulogu u nizu mehanizama od presudne važnosti za stanicu poput regulacije pravilnog smatanja i lokalizacije, staničnoj adheziji, regulaciji metabolizma i prijenosa signala i odgovarajućem imunosnom odgovoru. Primjer važnosti *N*-glikozilacije specifičnog proteina je modifikacija membranskog transportera glukoze GLUT2, koji je ključan za pravilno lučenje inzulina stimulirano glukozom (eng. *glucose stimulated insulin secretion*, GSIS). Transporter GLUT2 je glikoprotein čija glikozilacija određuje ispravnu membransku lokalizaciju. Promjene glikozilacije uzrokovane povišenim koncentracijama masnih kiselina dovode do delokalizacije ovog glikoproteina što rezultira pojavom dijabetičkog fenotipa [18], [19], [20]. Radovi Ohtsuba i suradnika sugeriraju uključenost dva važna transkripcijska faktora, HNF-1α (eng. *hepatocyte nuclear factor 1 alpha*) i FOXA2 (eng. *forkhead box A2*) u proces regulacije glikozilacije transportera GLUT2. Oba su članovi porodice hepatocitnih nuklearnih faktora te su uključeni u regulaciju ekspresiju gena *MGAT4A* koji kodira N-acetilglukozaminiltransferazu 4a (GnT-IVa) zaduženu za grananje glikana. Unošenje prekomjernih količina masnih kiselina prehranom smanjuje sintezu ovih faktora i njihovu jezgrinu lokalizaciju, što posljedično smanjuje ekspresiju gena *MGAT4A* i mijenja glikozilaciju proteina GLUT2.

Transkripcijski faktori HNF-1α i HNF-4α (eng. *hepatocyte nuclear factor 4 alpha*) ključni su za pravilnu diferencijaciju i funkciju brojnih organa, posebno jetre i gušterače [21]. Ovi transkripcijski faktori kontroliraju kompleksnu regulatornu mrežu koja je uključena u pravilno funkcioniranje beta stanica gušterače [22], [23]. Mutacije u genima *HNF1A* i *HNF4A* povezane su s nastankom monogenskog dijabetesa tipa MODY3 i MODY1, a neke mutacije u genu *HNF1A* povezane su i s dijabetesom tipa 2 [24], [25]. Glikozilacija proteina gušterače i jetre jedan je od brojnih procesa koje izravno ili neizravno reguliraju ovi geni. Transkripcijski faktor HNF-1α regulira grananje *N*-glikana, a nekoliko je istraživanja predložilo da je HNF-1α i glavni regulator fukozilacije proteina, odnosno da regulira glikoziltransferaze iz porodice FUT koje dodaju sržnu i antenarnu fukozu na složene glikanske strukture [26], [27], [28]. Analizom *N*-glikoma plazme pacijenata koji boluju od dijabetesa tipa MODY3 pokazano je da HNF-1α inhibira sržnu fukozilaciju te potiče antenarnu fukozilaciju, a u regulaciji sudjeluje i HNF-4α koji s HNF-1α stvara precizno reguliranu povratnu petlju. Nedavno je pokazana i ključna uloga HNF-1α i HNF-4α u regulaciji kompleksne regulatorne mreže *N*-glikozilacije u staničnom modelu jetre [29], no još uvijek nije istražena uloga ovih transkripcijskih faktora u regulaciji *N*-glikoma beta stanica.

Čini se da alternativna glikozilacija ukupnog proteoma beta stanica ima značajnu ulogu u patofiziologiji gušterače u dijabetesu, no istraživanja su otežana zbog nedostupnosti bioloških uzoraka, kao i nedostatka staničnih linija koje posjeduju sve karakteristike beta stanica [30]. Velik dio spoznaja do danas je uglavnom proizašao iz istraživanja na animalnim staničnim linijama i modelima [31]. Iako je takav pristup uvelike pridonio razumijevanju fiziologije beta stanica, njegova je primjena ograničena značajnim razlikama među vrstama, koje otežavaju potpuno razumijevanje molekularnih mehanizama u ljudskim beta stanicama [32], [33]. Upotreba ljudskih induciranih pluripotentnih matičnih stanica olakšala je istraživanja fiziologije i metabolizma ljudskih beta stanica, no sam je proces vremenski i financijski zahtjevan [34]. Iz tog je razloga stanična linija EndoC-BH1, koja ima gotovo sve karakteristike beta stanica gušterače, uključujući GSIS, odlična alternativa koja je olakšala istraživanje fiziologije humanih beta stanica te molekularnih mehanizama koji doprinose patologiji u dijabetesu [35], [36].

Sustav CRISPR/Cas (eng. *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats; CRISPR-associated protein*) i njegove izvedenice koje koriste protein dCas (od engl. *dead Cas*) temelj su ciljane manipulacije ekspresije gena u ovoj doktorskoj disertaciji. Tehnologija CRISPR/Cas

sastoji se od dvije komponente: proteina Cas, koji može uvoditi dvostruki lom u molekulu DNA čime se postiže ciljano (*on target*) uređivanje, i od male navodeće molekule gRNA (od engl. *guide RNA*) komplementarne sekvenci na koju se navodi proteinski kompleks [37]. Uvođenjem mutacija u nukleazne domene RuvC i HNH proteina Cas dobiven je katalitički inaktivan dCas koji zadržava sposobnost vezanja molekule gRNA i ciljne sekvence DNA, ali više nema endonukleaznu aktivnost [38]. Na takav dCas mogu se vezati različite efektorske domene poput direktnih aktivatora (VPR, VP16) i represora transkripcije (KRAB) ili pak kromatinskih efektorskih domena za promjenu epigenetičkih modifikacija (metilacije DNA i histonskih oznaka) [39], [40], [41]. Usmjeravanjem tako nastalih fuzijskih proteina na promotore i druge regulatorne regije omogućuje se izravna ili epigenetički posredovana manipulacija ekspresijom gena od interesa, čime se proširuje raspon primjene ovog sustava i pridonosi razumijevanju regulacije i funkcije tih gena. Iako je originalni sustav baziran na proteinu Cas9 vrste *Streptococcus pyogenes*, sve više se koriste proteini izolirani iz drugih bakterijskih vrsta jer su manji što uvelike olakšava unos cijelog CRISPR sustava u ciljane stanice [42]. Jedan od takvih ortologa proteina dCas9 korišten je tijekom izrade ove disertacije.

Glavni cilj ove doktorske disertacije bio je istražiti ulogu ključnih transkripcijskih faktora HNF-1α i HNF-4α u regulaciji glikozilacije proteoma ljudskih beta stanica gušterače te njihovu uključenost u deregulaciju glikozilacije kao jedan od mehanizama koji dovode do razvoja dijabetičkog fenotipa. U tu je svrhu u stanicama EndoC-βH1, modelu ljudskih beta stanica gušterače, primjenom sustava CRISPR/Cas9, dCas9-KRAB i dCasMINI-VPR manipulirana ekspresija gena *HNF1A* odnosno *HNF4A*. Na ovaj način omogućeno je i otkrivanje dijela regulatorne mreže gliko-gena, nizvodno od transkripcijskih faktora HNF-1α – HNF-4α, a koji su odgovorni za glikozilaciju proteoma beta stanica, kao i istraživanje uloge tih gena u fenotipovima specifičnima za beta stanice, poput ekspresije inzulina i glukozom stimuliranog lučenja inzulina.

U svrhu postizanja navedenih glavnih ciljeva uspostavljeni su protokoli za unos CRISPR/Cas/dCas fuzija u staničnu liniju EndoC-BH1 prolaznom transfekcijom i lentivirusnom transdukcijom, te su izrađeni plazmidni konstrukti koji sadrže Cas9/dCas i fuzijske domene te selekcijske markere koji su kompatibilni s različitim metodama unosa. Konstruirani stanični sustavi validirani su ciljanjem gena *HNF1A* i *HNF4A* u svrhu određivanja uloga tih gena u regulaciji glikozilacije proteina stanične linije EndoC-BH1, a primijećene

promjene uspoređene su s promjenama uzrokovanima povišenim razinama glukoze i/ili masnih kiselina u staničnom mediju.

2. Literaturni pregled

2.1. Gušterača, beta stanice i inzulin

2.1.1. Građa i uloga gušterače

Gušterača je organ/žlijezda endodermalnog podrijetla smješten u retroperitonealnom prostoru. Sastoji se od dva morfološki i funkcionalno različita dijela, egzokrinog i endokrinog, koji imaju različite uloge u organizmu. Egzokrini dio čini većinu mase gušterače, približno 98 %, a sastoji se od acinarnih i duktalnih stanica [43]. Duktalne stanice tvore razgranatu mrežu kanalića oko kojih su organizirane acinarne stanice u obliku grozdastih nakupina [44].

Osnovna funkcija egzokrinog dijela gušterače je sinteza i izlučivanje probavnih enzima koji se putem duktalnog sustava izlučuju u dvanaesnik. Acinarne stanice sintetiziraju i luče probavne enzime poput tripsinogena, kimotripsinogena, amilaze i lipaza, dok duktalne stanice izlučuju vodenu otopinu bogatu bikarbonatima. Bikarbonati neutraliziraju kiseli sadržaj koji dolazi iz želuca i stvaraju optimalne uvjete za djelovanje probavnih enzima [45].

Endokrini dio čini manji udio ukupne mase gušterače, ali ima ključnu ulogu u regulaciji metabolizma glukoze. Organiziran je u Langerhansove otočiće koji se sastoje od pet glavnih tipova stanica: alfa, beta, delta, PP (gama) i epsilon stanica [33], [46], [47]. Alfa i beta stanice čine većinu endokrinih stanica i imaju glavnu ulogu u održavanju homeostaze glukoze. Alfa stanice luče glukagon, hormon koji potiče povećanje koncentracije glukoze u krvi stimulirajući glikogenolizu i glukoneogenezu u jetri [48]. Nasuprot tome, beta stanice prepoznaju povišenu koncentraciju glukoze u krvi te sintetiziraju i izlučuju inzulin, hormon koji omogućuje unos glukoze u stanice i time snižava njezinu koncentraciju u krvi. Ostali tipovi stanica luče somatostatin (delta stanice), pankreasni polipeptid (PP stanice) i grelin (epsilon stanice) [49].

2.1.2. Beta stanice

Diferencijacija beta stanica je postupan i kompleksan proces u kojem sudjeluju brojni transkripcijski faktori koji usmjeravaju progenitorske stanice prema potpuno diferenciranim beta stanicama. Gušterača se razvija iz endoderma, a razvoj započinje tijekom petog tjedna embrionalnog razvoja formiranjem pankreasnih pupoljaka [50]. U ovom je stadiju eksprimiran transkripcijski faktor PDX1, jedan od centralnih proteina neophodan za daljnju diferencijaciju gušterače i beta stanica [51]. Za usmjeravanje progenitorskih stanica pupoljaka prema

endokrinim stanicama neophodna je ekspresija transkripcijskog faktora NGN3 [52]. Daljnja diferencijacija endokrinih progenitorskih stanica temelji se na različitoj ekspresiji pojedinih transkripcijskih faktora, a za beta stanice presudan je PAX4 koji inhibira formaciju alfa stanica i potiče diferencijaciju beta i delta stanica [53]. Ovisno o izvorima, prve beta stanice koje luče inzulin mogu se detektirati između 7. i 9. tjedna razvoja [54], [55]. Konačna diferencijacija i održavanje funkcionalnog identiteta beta stanica ovise o koordiniranoj aktivnosti većeg broja transkripcijskih faktora. U tom kontekstu posebno se ističe NKX6.1, koji ima ključnu ulogu u specifikaciji i održavanju beta staničnog identiteta [55], [56].

U potpuno diferenciranim beta stanicama potrebna je ekspresija specifičnog seta transkripcijskih faktora koji održavaju funkcionalnost stanica. Uz PDX1 i NKX6.1, u tu skupinu ubrajaju se i MAFA te HNF-1α, koji reguliraju ekspresiju niza gena uključenih u sintezu i sekreciju inzulina [57], [58]. Beta stanice jedine su stanice u ljudskom organizmu koje mogu sintetizirati inzulin. Uz inzulin, sintetiziraju i luče amilin, peptidni hormon koji se izlučuje zajedno s inzulinom i sudjeluje u regulaciji unosa hrane, lučenja glukagona i brzine pražnjenja želuca [59].

2.1.3. Inzulin

Inzulin je hormon koji je u svom konačnom obliku sastavljen od 51 aminokiseline, odnosno dva peptida povezana disulfidnim vezama [60]. Ipak, sam biosintetski put inzulina puno je složeniji. U prvom koraku, prilikom translacije nastaje prekursorska molekula preproinzulina koja se sastoji od jednog polipeptidnog lanca sa signalnim nizom te domenama A, B i C [61]. Molekula se zatim translocira u endoplazmatski retikulum gdje dolazi do uklanjanja signalnog slijeda i nastanka proinzulina [62]. U tom se procesu formiraju tri disulfidne veze (dvije između A i B domene te jedna unutar A domene). Sljedeći je korak transport proinzulina u Golgijev aparat gdje se pakira u sekretorne vezikule i podvrgava završnoj obradi. Endopeptidaze i karboksipeptidaze cijepaju C-peptid [63], [64], čime nastaju inzulin i C-peptid u izomolarnom omjeru. U prisutnosti cinkovih iona i kiselom okolišu vezikula inzulin formira heksamere, što povećava njegovu stabilnost i kapacitet pohrane prije lučenja [65].

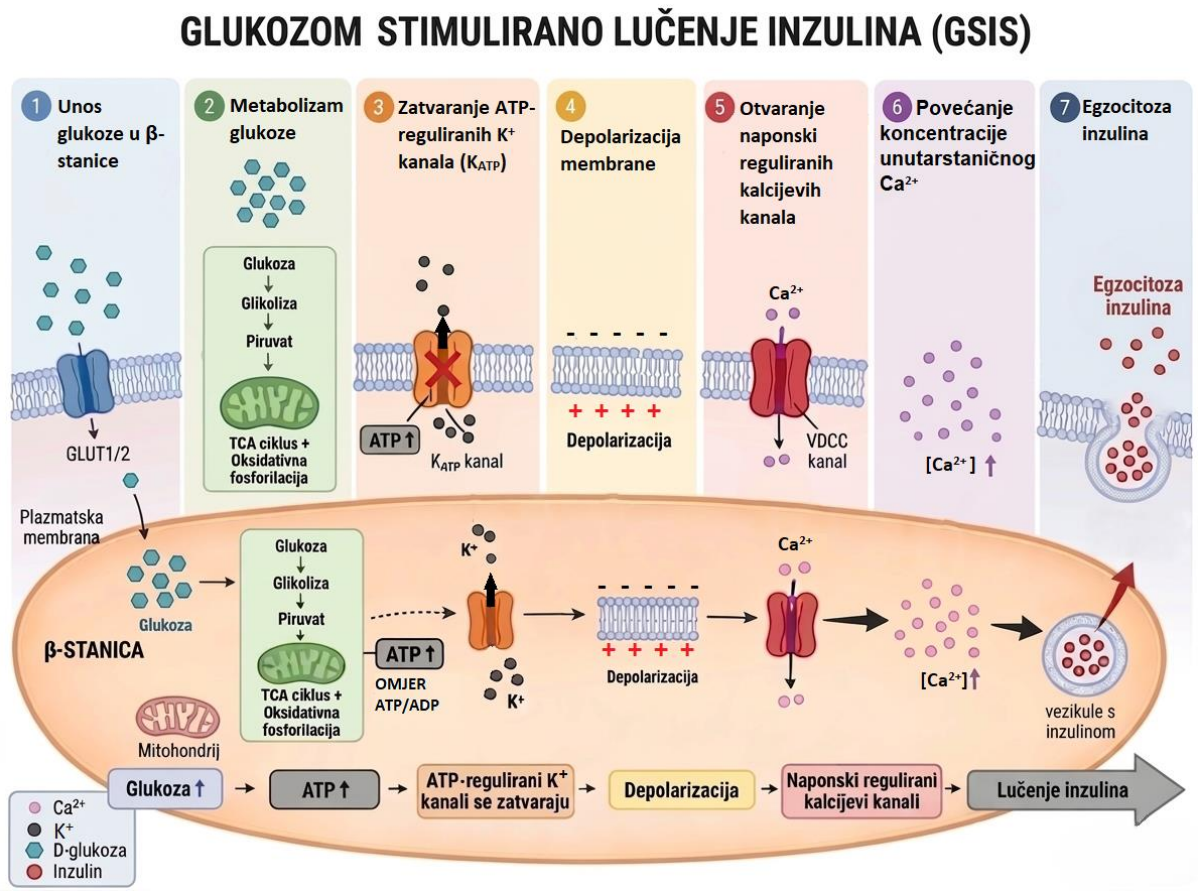
Lučenje inzulina regulirano je interakcijama nutrijenata, hormona i autonomnog živčanog sustava. Glukoza je primarni pokretač kroz mehanizam glukozom stimuliranog lučenja inzulina (eng. *glucose-stimulated insulin secretion*, GSIS). Beta stanice kontinuirano prate

koncentraciju glukoze u krvi, što omogućuje brz odgovor na promjene. To je povezano i s njihovim položajem unutar Langerhansovih otočića, koji su znatno bolje prokrvljeni od okolnog egzokrinog tkiva [66].

Membrane beta stanica sadrže transportere glukoze koji omogućuju njen unos olakšanom difuzijom. Najzastupljeniji transporter u ljudskim beta stanicama je GLUT1 [67], dok je GLUT2 slabije zastupljen, no ipak sudjeluje u unosu glukoze i regulaciji lučenja inzulina [68], [69]. Važno je napomenuti da je u beta stanicama miša dominantan GLUT2, što može dovesti do pogrešnog tumačenja podataka dobivenih na životinjskim modelima.

Nakon ulaska u stanicu, glukoza se fosforilira glukokinazom, čime započinje glikoliza i ciklus limunske kiseline (Slika 1) [70]. Posljedično dolazi do povećanja omjera ATP/ADP, zatvaranja ATP-ovisnih kalijevih kanala i depolarizacije membrane [71]. Depolarizacija uzrokuje otvaranje naponski ovisnih kalcijevih kanala i ulazak kalcijevih iona u stanice [72], koji pokreću egzocitozu vezikula i otpuštanje inzulina. Lučenje inzulina odvija se u dvije faze [73]. Prva faza je brza i uključuje otpuštanje već pohranjenog inzulina, dok je druga faza djelomično neovisna o ATP-reguliranim kalijevim kanalima i odgovorna je za dugotrajniji odgovor tijekom produžene izloženosti glukozi. U toj fazi dolazi do mobilizacije dodatnih vezikula i sinteze novog inzulina, pri čemu važnu ulogu imaju hormoni i ciklički adenozin monofosfat (cAMP).

Inkretični hormoni (inkretini) GIP i GLP-1, koje luče stanice probavnog sustava kao odgovor na unos hrane, pojačavaju lučenje inzulina vezanjem na receptore vezane s G-proteinima i aktivacijom adenilat ciklaze [74]. Nastali cAMP djeluje preko protein kinaze A (PKA) i cAMP-vezujućeg proteina Epac [75] što posljedično dovodi do promjena aktivnosti različitih ionskih kanala čime se omogućuje dugotrajniji odgovor stanice.



Slika 1. Shematski prikaz mehanizma glukozom stimuliranog lučenja inzulina (GSIS). Glukoza ulazi u stanicu putem membranskih transportera GLUT1 i GLUT2 te se metabolizira prilikom čega nastaje ATP. Promjena omjera ATP/ADP dovodi do zatvaranja ATP-reguliranih kalijevih kanala što za posljedicu ima depolarizaciju stanične membrane. Depolarizacija uzrokuje otvaranje naponom reguliranih kalcijevih kanala i ulaz kalcijevih iona u stanicu što dovodi do egzocitoze već spremnih vezikula koje sadrže inzulin te se inzulin ispušta u krvotok.

Osim glukoze, na lučenje inzulina utječu i drugi metaboliti i hormoni. Slobodne masne kiseline djeluju putem receptora GPR40 i pojačavaju lučenje inzulina [76], [77]. Također, melatonin [78], estrogen [79], leptin [80] i hormon rasta sudjeluju u regulaciji ovog procesa, što dodatno naglašava kompleksnost regulatorne mreže beta stanica [66].

2.1.4. Modeli za istraživanje beta stanica

Velik dio spoznaja kojima danas raspolažemo o razvoju i fiziologiji beta stanica potekao je iz istraživanja provedenih na animalnim modelima i staničnim linijama. Većina dosadašnjih

istraživanja provedena je na glodavcima, prvenstveno miševima i štakorima [31], što je problematično iz nekoliko razloga. Fiziologija beta stanica drugih vrsta nije istovjetna ljudskoj te onemogućuje stvaranje potpune slike mehanizama i regulacije kod ljudi. Jedan od primjera je arhitektura Langerhansovih otočića i njegovih staničnih tipova, što dovodi do drugačijih mehanizama regulacije [33], kao i razlike u ulozi membranskih GLUT transportera [67]. Drugi je problem etičke prirode. Rad na životinjskim modelima često zahtijeva njihovo žrtvovanje, a izolacija beta stanica ili otočića je zahtjevan proces koji često ne daje dovoljne količine materijala za istraživanja [30].

Stoga je dio istraživanja uloge beta stanica usmjeren na generiranje imortaliziranih beta staničnih linija koje omogućuju dostupnost velikih količina stanica. Tijekom vremena razvijene su brojne linije poput HIT-T15, beta-TC, beta-HC, NIT-1 i MIN6 koje su značajno olakšale istraživanja. Limit ovog pristupa je što takve stanične linije zapravo predstavljaju stanice izdvojene iz svog okoliša čime se gube brojni regulacijski signali iz staničnog okoliša koji djeluju *in vivo* [30], [81].

Uporaba ljudskih beta stanica uklanja problem razlika između vrsta, no i dalje postoje ograničenja jer su primarne stanice kratkoživuće i ne dijele se. Pokušaji njihove proliferacije dovode do skraćivanja telomera i senescencije [82]. Stoga je i za ljudske stanične linije dio napora bio usmjeren na stvaranje imortalizirane stanične linije koje bi zadržale sve ključne karakteristike primarnih stanica. EndoC-BH1 jedna je od recentnijih linija kreirana transdukcijom samo dva transgena u ljudske fetalne stanice gušterače – SV40 i hTERT [35]. Ova stanična linija posjeduje gotovo sve ključne karakteristike beta stanica. Primarni transporteri glukoze GLUT1 i GLUT2 omogućuju učinkovit unos glukoze u stanice, dok visoka ekspresija glukokinaze osigurava njezinu učinkovitu fosforilaciju, što dovodi do porasta omjera ATP/ADP i posljedične stimulacije lučenja inzulina [83]. Porast koncentracije glukoze potiče GSIS, koji dodatno pojačavaju inkretini, slično kao u primarnim ljudskim beta stanicama [36]. Promjene membranskog potencijala i kinetika egzocitoze također odgovaraju obilježjima primarnih ljudskih beta stanica [84]. Nadalje, proteom stanica EndoC-βH1 pokazuje visok stupanj podudarnosti s proteomom primarnih ljudskih beta stanica, dok analiza sekretoma potvrđuje lučenje proteina karakterističnih za beta stanice, uključujući inzulin, IAPP i IGF2, te upućuje na aktivno lučenje izvanstaničnih vezikula [85]. Navedena funkcionalna i molekularna obilježja čine staničnu liniju EndoC-βH1 izvrsnim modelom za istraživanje fiziologije ljudskih beta stanica. Ipak, i ovaj model ima određene nedostatke jer ne omogućuje proučavanje same

diferencijacije beta stanica te ne odražava u potpunosti svojstva primarnih beta stanica. Ista je grupa nastavila razvijati modele beta stanica pa su do danas razvili i dvije naprednije, ali za istraživanja zahtjevnije linije, EndoC-βH3 i EndoC-βH5 [86], [87].

Najbolji model za proučavanje uloge različitih tkiva i staničnih tipova su inducirane pluripotentne matične stanice (eng. *induced pluripotent stem cells*, iPSC) [88]. U kontekstu beta stanica i dijabetesa, prednost ovog pristupa je mogućnost proučavanja same diferencijacije beta stanica *in vitro* [89], kao i diferencijacije stanica pojedinog pacijenta uz praćenje patoloških promjena i učinaka potencijalnih terapeutika [34]. Konačno, diferencijacija iPSC-a otvara vrata ne samo istraživanjima već i potencijalnoj terapeutskoj primjeni ovako generiranih beta stanica u liječenju dijabetesa [34]

2.2. Dijabetes

Dijabetes predstavlja heterogenu skupinu kroničnih metaboličkih poremećaja čija je zajednička značajka hiperglikemija nastala kao posljedica defekata u izlučivanju inzulina (inzulinska deficijencija/insuficijencija), djelovanju inzulina (rezistencija) ili oba procesa istovremeno [90]. To zapravo znači da beta stanice gušterače ne proizvode dovoljno inzulina (ili ga uopće ne proizvode) ili periferna tkiva, primarno jetra, mišići i masno tkivo, pokazuju smanjenu osjetljivost na cirkulirajući inzulin [90]. Prema recentnim procjenama više od 800 milijuna ljudi boluje od nekog tipa dijabetesa, a taj je broj u neprestanom porastu [91]. Simptomi se mogu razlikovati ovisno o etiologiji, no najčešće se manifestira polidipsija, polifagija, poliurija, ili pak neobjašnjiv gubitak tjelesne mase i zamućenje vida [92].

Prema standardiziranoj klasifikaciji, dijabetes se dijeli na četiri glavne kategorije: dijabetes tipa 1, dijabetes tipa 2, gestacijski dijabetes te specifični oblici uzrokovani monogenskim mutacijama, bolestima egzokrine gušterače ili kemijski induciranim stanjima [4].

2.2.1. Dijabetes tipa 1

Dijabetes tipa 1 (T1D) autoimuna je bolest uzrokovana uništenjem beta stanica, što dovodi do apsolutne inzulinske deficijencije. U nastanku bolesti važnu ulogu imaju genetička predispozicija, osobito varijante alela unutar HLA sustava, te okolišni čimbenici koji mogu

potaknuti autoimuni odgovor [93]. Suvremeni model patogeneze dijeli razvoj bolesti u tri stadija [94], pri čemu se u ranom stadiju pojavljuju autoantitijela na beta stanične antigene, uključujući inzulin, GAD, IA-2 i ZnT8. T1D čini približno 5–10 % svih slučajeva dijabetesa te zahtijeva cjeloživotnu terapiju inzulinom [4].

2.2.2. Dijabetes tipa 2

Dijabetes tipa 2 (T2D) najučestaliji je tip dijabetesa i obuhvaća oko 90 % svih slučajeva bolesti [4]. Primarna karakteristika T2D-a jest inzulinska rezistencija, no tijekom progresije bolesti dolazi i do disfunkcije beta stanica te posljedične inzulinske insuficijencije. U nastanku bolesti sudjeluju genetički, metabolički i okolišni čimbenici, a među najvažnijim čimbenicima rizika ističu se prekomjerna tjelesna masa i sjedilački način života [95]. Metabolički i okolišni čimbenici mogu dovesti do promjena DNA metilacije, a time i do promjena transkripcijske aktivnosti i ekspresije pojedinih gena uključenih u regulaciju beta staničnog metabolizma [96]. Više je istraživanja pokazalo da je epigenom beta stanica i otočića osoba s T2D-om značajno promijenjen u odnosu na zdrave kontrole, pri čemu su zabilježene promjene dostupnosti kromatina i DNA metilacije gena važnih za normalnu funkciju beta stanica [97], [98], [99], [100]. U dijabetičkim beta stanicama promijenjena metilacija povezana je i s promjenama ekspresije gena važnih za njihovu normalnu funkciju, uključujući *INS* [98].

Terapije uključuju prvenstveno promjene životnog stila, a metformin je najčešće propisani antidijabetik. On djeluje na AMP-aktiviranu protein kinazu (AMPK) u jetri smanjujući glukoneogenezu (sintezu glukoze), a također pospješuje osjetljivost perifernih tkiva na inzulin [101]. U slučaju progresije bolesti, i za T2D terapija inzulinom postaje jedan od ključnih faktora za regulaciju razina glukoze. Napredak u istraživanjima doveo je do razvoja novih klasa antidijabetika, među kojima se osobito ističu agonisti GLP-1 receptora te inhibitori natrij-glukoza kotransportera 2 (SGLT-2). Agonisti GLP-1 receptora pojačavaju lučenje inzulina na način ovisan o glukozi i istodobno smanjuju sekreciju glukagona [102]. S druge strane, inhibitori SGLT-2 djeluju unutar bubrega, neovisno o inzulinu, gdje blokiraju reapsorpciju glukoze i time pospješuju njezino izlučivanje kroz urin [103]. Ovi lijekovi značajno su promijenili klinički pristup jer, uz regulaciju glikemije, mogu smanjiti i rizik od kardiovaskularnih događaja te usporiti progresiju bubrežne bolesti [104].

2.2.3. MODY tip dijabetesa

Monogenski dijabetes, MODY, nastaje kao posljedica mutacije unutar jednog gena, a karakterizira ga rani početak bolesti (najčešće prije 25. godine), autosomno dominantno nasljeđivanje, nedostatak autoantitijela te primarni defekt u lučenju inzulina, ali uz očuvanu inzulinsku osjetljivost [105]. Ovisno o populaciji, 1-5% svih slučajeva dijabetesa ubraja se u ovu skupinu [106], [107]. Barem 14 gena dovodi do nastanka monogenskog dijabetesa, uz još neke čija poveznica nije potpuno razjašnjena [108], ali većina slučajeva povezana je s mutacijama u tri gena: *HNF1A* (MODY3), *GCK* (MODY2) i *HNF4A* (MODY1) [109]. Ovisno o literaturi, MODY2 ili MODY3 najučestaliji su tip monogenskog dijabetesa. Dok mutacije *GCK* dovode do blaže hiperglikemije i višeg praga koncentracije glukoze potrebne za lučenje inzulina, mutacije unutar *HNF1A* koji kodira jedan od ključnih transkripcijskih faktora utječu na cijeli niz nizvodnih gena i stoga mogu rezultirati većim defektima u lučenju inzulina te zahtijevaju liječenje [109]. Prvi je pristup liječenju uporaba sulfoniluree koja pospješuje lučenje inzulina koji se ne luči učinkovito, no vremenom dolazi i do smanjenja sinteze inzulina pa terapijski pristup često u kasnijem stadiju uključuje i uporabu inzulina [110], [111].

2.2.4. Ostali tipovi dijabetesa

Osim dijabetesa tipa 1 i tipa 2, postoje i drugi oblici dijabetesa različite etiologije i kliničkih obilježja. U ovu skupinu ubrajaju se dijabetes povezan s bolestima egzokrine gušterače, endokrinopatijama, infekcijama, primjenom određenih lijekova i kemijskih spojeva te drugim specifičnim uzrocima [109]. Zbog njihove relativno male učestalosti i preklapanja kliničkih obilježja s češćim oblicima bolesti, takvi se tipovi dijabetesa mogu pogrešno dijagnosticirati kao T1D ili T2D, što može dovesti do neodgovarajućeg pristupa liječenju [112].

Poseban oblik predstavlja gestacijski dijabetes, koji se definira kao dijabetes dijagnosticiran u drugom ili trećem tromjesečju trudnoće, a koji nije bio jasno prisutan prije trudnoće [113]. Liječenje se prvenstveno temelji na promjenama životnog stila, a prema potrebi se uvodi i farmakološka terapija, pri čemu inzulin ostaje standardni izbor kada je ona potrebna [114]. Neliječeni gestacijski dijabetes povećava rizik za razvoj makrosomije, neonatalne hipoglikemije i hipokalcemije te perinatalne smrtnosti [113], dok majke nakon trudnoće imaju povećan rizik razvoja dijabetesa tipa 2 [115].

2.3. Hepatocitni nuklearni faktori

Hepatocitni nuklearni faktori (HNF) predstavljaju porodicu transkripcijskih faktora koji su prvobitno identificirani u jetri, gdje imaju ključnu ulogu u diferencijaciji i održavanju funkcije hepatocita. Kasnija istraživanja pokazala su da se njihovi genski članovi eksprimiraju i u drugim tkivima, uključujući gušteraču, bubrege, crijeva, pluća i reproduktivne organe, gdje sudjeluju u regulaciji razvoja i diferencijacije ovih organa [116]. Na temelju strukturnih obilježja i evolucijskog podrijetla, HNF-ovise dijele u četiri glavne skupine: HNF1, FOXA (ranije HNF3), HNF4 i ONECUT (ranije HNF6). Iako se razlikuju po strukturi, ove skupine zajedno sudjeluju u složenim regulatornim mrežama koje kontroliraju ekspresiju gena specifičnih za tkivo [21].

Skupina HNF1 uključuje faktore HNF-1α i HNF-1β, koji sadrže DNA-vezujuću domenu sličnu homeodomeni te vežu DNA kao homo- ili hetero-dimeri [117]. FOXA skupina obuhvaća faktore FOXA1, FOXA2 i FOXA3, koji posjeduju konzerviranu tzv. *winged-helix* DNA-vezujuću domenu i djeluju kao pionirski transkripcijski faktori sposobni za vezanje kondenziranog kromatina [118]. Skupinu HNF4 čine HNF-4α i HNF-4γ, članovi porodice jezgrinih receptora [119]. Skupinu ONECUT čine ONECUT1 i ONECUT2, transkripcijski faktori sa *single cut* domenom i divergentnom homeodomenom [120].

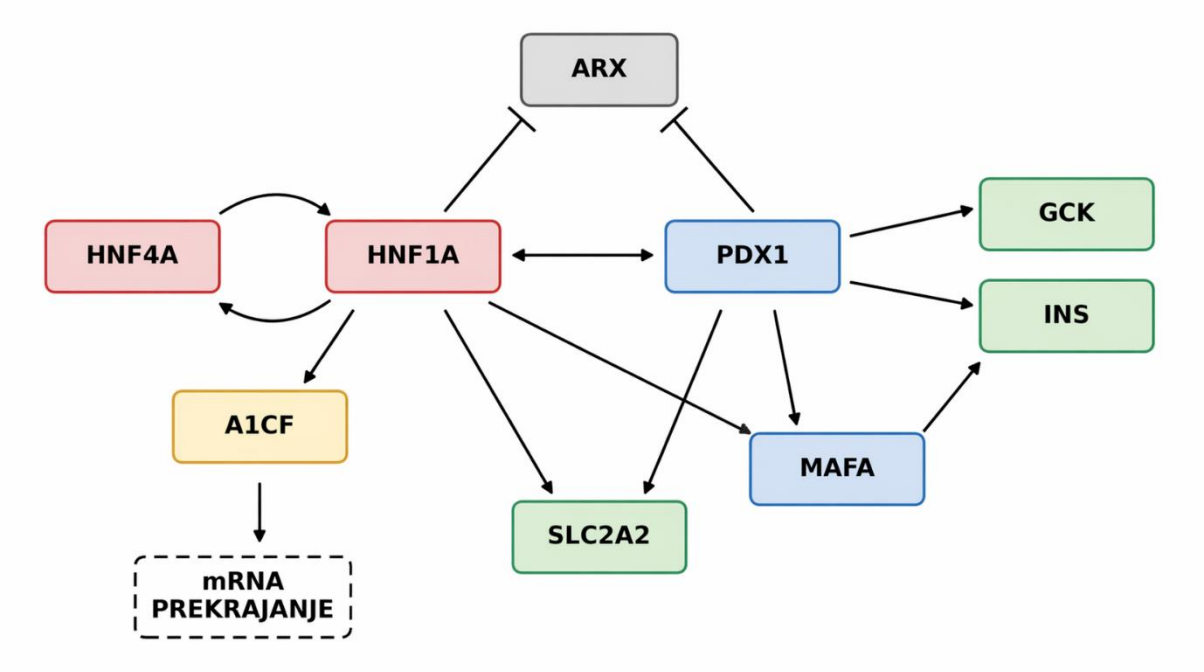
2.3.1. Transkripcijski faktor HNF-1α

HNF-1α (u literaturi često označen kao HNF1A) je transkripcijski faktor kodiran genom *HNF1A* s važnom ulogom u regulaciji pravilnog rada beta stanica. Sam protein sastoji se od tri dijela: N-terminalne dimerizacijske domene, središnje DNA-vezujuće domene i C-terminalne transaktivacijske domene [121]. Dimerizacijska domena sadrži motiv *helix-turn-helix* i sudjeluje u stvaranju homo- ili heterodimera [122]. DNA-vezujuća domena sastoji se od POU-specifične domene i POU homeodomene koje se zajedno vežu za palindromske sljedove u molekuli DNA [123], a C-terminalna domena ima ulogu u regulaciji aktivnosti samog faktora te se razlikuje u građi između tri dosad otkrivene izoforme [121].

HNF1A je eksprimiran u više tkiva i organa, a izoforme imaju tkivno specifičan obrazac ekspresije. Najdulja izoforma A eksprimirana je tijekom razvoja gušterače, dok su u diferenciranim stanicama dominantno eksprimirane kraće izoforme B i C [124]. Ovisno o

stadiju, HNF-1α ima različitu ulogu u beta stanicama, no neophodan je za pravilan razvoj i održavanje diferenciranog stanja stanica. Tijekom diferencijacije beta stanica HNF-1α djeluje kao dio regulatorne mreže koja usmjerava prekursorske stanice prema diferenciranim beta stanicama, pa tako njegovo utišavanje u prekursorskim stanicama dovodi do usmjeravanja diferencijacije prema alfa-stanicama [125]. Ipak, u tom razdoblju drugi faktori iz porodice HNF imaju značajnije uloge te reguliraju *HNF1A*. Među njima se ističe FOXA2, koji regulira ekspresiju HNF-1α i niza drugih transkripcijskih faktora uključenih u diferencijaciju beta stanica te se zbog svoje široke regulatorne uloge često opisuje kao krovni transkripcijski faktor [126].

U diferenciranim stanicama HNF-1α izravno ili neizravno regulira ekspresiju velikog broja gena neophodnih za pravilnu funkciju beta stanica (Slika 2). Njegovo utišavanje dovodi do dediferencijacije beta stanica i porasta ekspresije biljega alfa stanica [58]. HNF-1α regulira ključne transkripcijske faktore beta stanica poput HNF-4α, s kojim tvori kompleksnu povratnu petlju, kao i PDX1, MAFA i PAX6 [127]. Uz njih, izravno ili neizravno regulira i ekspresiju ključnih gena za fiziologiju beta stanica poput *INS, GCK* i *SLC2A2* [69]. Nedavno je pokazano da preko faktora A1CF regulira prekrajanje cijelog niza beta staničnih gena, što dodatno naglašava njegovu ključnu ulogu u normalnom radu gušterače [128].



Slika 2. Dio HNF-1α-HNF-4α regulatorne mreže u diferenciranim beta stanicama. Transkripcijski faktori HNF-1α i HNF-4α izravno ili neizravno reguliraju velik broj gena

uključujući i druge transkripcijske faktore (plavo), faktore koji reguliraju prekrajanje mRNA (žuto) ili gene koji kodiraju proteine s ključnim ulogama u regulaciji metabolizma glukoze (zeleno). HNF-1α također inhibira ekspresiju faktora odgovornih za diferencijaciju alfa stanica (ARX).

Mutacije unutar gena *HNF1A* uzrokuju tip dijabetesa MODY3, ali neke su mutacije također povezane s razvojem dijabetesa tipa T2D i gestacijskog dijabetesa [24], [129], [130]. Do sada je identificiran velik broj varijanti koje uzrokuju MODY3, a ovisno o njihovoj lokaciji (promotor, DNA-vezna domena i dr.) razlikuje se težina i dob pojave bolesti [124]. Razlog tome je što pojedine mutacije utječu na ekspresiju HNF-1α, njegovu sposobnost vezanja za DNA, interakciju s drugim faktorima, stabilnost proteina ili njegov transport u jezgru [24]. Određene alelne varijante ne dovode do tipa dijabetesa MODY3, ali povećavaju rizik za razvoj T2D. Njihov učinak na funkciju beta stanica je blaži, no u kombinaciji s drugim rizičnim čimbenicima mogu doprinijeti razvoju bolesti [131].

Dosadašnja istraživanja pokazala su i povezanost HNF-1α s drugim čimbenicima rizika u razvoju dijabetesa. Posebno se ističe utjecaj pretilosti i prehrane bogate masnim kiselinama. Istraživanja na mišu/štakoru pokazala su da ishrana obogaćena masnim kiselinama dovodi do smanjenja ekspresije ključnih gena, uključujući *HNF1A*, kao i do poremećaja njegove jezgrene lokalizacije. Posljedica je promjena ekspresije niza gena, uključujući *SLC2A2* (GLUT2) i *MGAT4A* (glikoziltransferaza GnT-4a). Smanjena ekspresija *MGAT4A* dovodi do promijenjene *N*-glikozilacije GLUT2, što uzrokuje njegovu smanjenu stabilnost i relokalizaciju sa stanične membrane. Time se smanjuje unos glukoze u beta stanice i njihov odgovor na porast glukoze u organizmu [18], [19].

2.3.2. Transkripcijski faktor HNF-4α

HNF-4α je transkripcijski faktor iz porodice nuklearnih receptora eksprimiran u brojnim organima uključujući gušteraču, jetru, bubrege, crijeva i masno tkivo [21]. Na DNA se veže u obliku dimera, a iako spada u receptorsku porodicu i pokazano je da se na vezno mjesto mogu vezati i masne kiseline [132], do sada nije jasno pokazano da je potrebno vezanje liganda za njegovo funkcioniranje. Gen *HNF4A* transkribira se s dva promotora, P1 i P2, a nakon prekrajanja na kraju nastaje 12 izoformi. Različiti promotori aktivni su u različitim organima i stadijima razvoja pa se tako u jetri tijekom diferencijacije transkripcija odvija s oba promotora,

a nakon diferencijacije P2 se utišava dok se P1 dodatno aktivira. U diferenciranim beta stanicama transkripcija se odvija s P2 [133], dok su prilikom diferencijacije eksprimirane i izoforme s P1 [134]. Izoforme nastale transkripcijom s oba promotora međusobno stvaraju homo- i hetero-dimere koji aktiviraju različite ciljne gene što izuzetno povećava složenost regulatornih mreža u kojima se nalazi HNF-4α [135], [136].

U beta stanicama P2 izoforme HNF-4α stvaraju kompleksnu povratnu petlju s *HNF1A* te tako reguliraju velik broj nizvodnih gena ključnih za funkciju beta stanica (Slika 2). HNF-4α također direktno interagira s HNF-1α vezujući se za iste promotore što dovodi do sinergističkog efekta na transkripciju, ali također veže HNF-1α preko ligand-vezujuće domene te na taj način regulira aktivnost HNF-1α [137], [138].

Zbog ključne uloge koju ima u regulatornoj mreži, mutacije *HNF4A* dovode do nastanka dijabetesa MODY1 ili su u blažim varijantama povezane s nastankom T2D [139]. Intenzitet simptoma dijabetesa tipa MODY1, kao i vrijeme pojave simptoma, ovisi o mjestu i tipu mutacije unutar gena pa tako mutacije koje dovode do potpunog gubitka funkcije proteina dovode do ranije pojave i težih simptoma, a samim time i drugačijeg pristupa liječenju [140]. Zbog preklapanja regulatornih mreža HNF-4α i HNF-1α, postoje i brojne sličnosti između dijabetesa tipa MODY1 i MODY3. Ipak, određene razlike poput fetalne makrosomije i hiperinzulinemije potvrđuju ulogu HNF-4α i u drugim regulatornim mehanizmima neovisnima o HNF-1α [141]. Neke pak mutacije u genu *HNF4A* nemaju tako izražen učinak na beta stanice da bi uzrokovale dijabetes tipa MODY1, no dovode do promjena u beta stanicama koje, uz druge faktore, mogu dovesti do nastanka T2D. Primjer je polimorfizam rs1800961 koji, za razliku od većine mutacija koje smanjuju aktivnost ili količinu proteina te izravno dovode do dijabetesa, predstavlja tzv. *gain-of-function* mutaciju koja dovodi do aktivacije određenih gena u beta stanicama [142].

2.4. Glikozilacija

Posttranslacijske modifikacije proteina kovalentne su promjene posredovane enzimima koje povećavaju kompleksnost ukupnog proteoma i utječu na funkcije proteina. Jedna od najraznovrsnijih i najučestalijih modifikacija je glikozilacija, proces kovalentnog vezanja glikana na proteine, ali i lipide, a nedavno je opisana i glikozilacija molekula RNA [143], [144]. Glikani su kompleksni ugljikohidrati sastavljeni od različitog broja monosaharidnih

podjedinica u različitim prostornim orijentacijama, s različitim glikozidnim vezama između podjedinica. Raznolikost svih mogućih kombinacija, uz činjenicu da pojedine molekule mogu biti glikozilirane na više mjesta, objašnjava širok spektar uloga i procesa u kojima glikani sudjeluju.

Glikani sudjeluju u procesu smatanja proteina i regulaciji stabilnosti istog. U ER-u glikani na novosintetiziranim proteinima interagiraju sa šaperonima koji imaju ulogu u inicijalnoj kontroli smatanja proteina [145]. Jednom kad je protein sintetiziran, glikani omogućuju njegovu lokalizaciju i stabilizaciju na ciljnoj poziciji, a dobar je primjer ranije spomenuti transporter glukoze GLUT2 i njegova lokalizacija i stabilizacija na staničnoj membrani [18], [19], [20]. Glikani imaju važnu ulogu i u pravilnim međustaničnim interakcijama te interakcijama stanica i međustaničnog matriksa. Većina membranskih molekula koje sudjeluju u adheziji su glikozilirane, a promjene glikozilacije dovode do promjena u njihovoj funkcionalnosti [146], [147]. Imunosni odgovor, kao i izbjegavanje istog također su značajno posredovani glikanima. Dobar primjer je imunoglobulin G (IgG), središnje antitijelo imunosnog sustava, čija glikozilacija značajno utječe na njegova efektorska svojstva, pa različite glikanske strukture mogu usmjeriti njegovo djelovanje prema proupalnom ili protuupalnom odgovoru [9], [148]. Također, alternativna glikozilacija proteina ima za posljedicu promjenu interakcija s drugim proteinima te na taj način omogućuje tumorskim stanicama izbjegavanje imunosnog odgovora i preživljavanje [149]. Glikozilacija ima bitnu ulogu i u brojnim drugim procesima uključujući regulaciju signalnih puteva u stanicama [150], [151] i regulaciju metabolizma [10], [152].

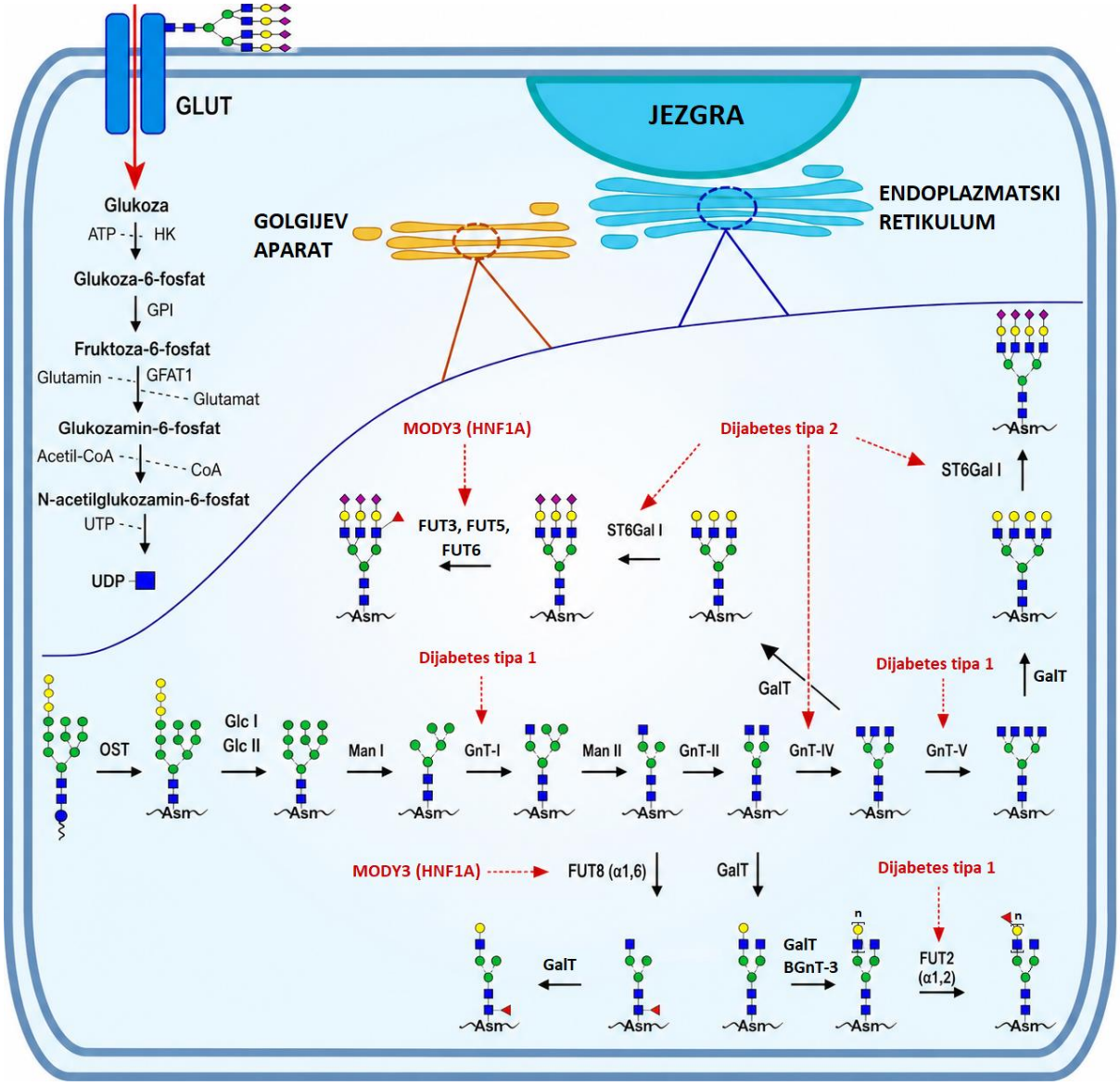
Glikan može biti vezan za protein na više načina, a ovisno o vezi između proteina i glikana, razlikujemo sljedeće tipove glikozilacije: N-vezana glikozilacija, O-vezana glikozilacija, C-manozilacija i formiranje glikozilfosfatidilinozitolnog sidra [16]. *N*-glikozilacija općenito se smatra najzastupljenijim oblikom glikozilacije u eukariotskim stanicama, no relativna zastupljenost N- i O-glikana ovisi o tipu tkiva, proteinskom kontekstu i substaničnoj lokalizaciji [153].

2.4.1. N-glikozilacija

N-glikozilacija je proces u kojem se glikan veže kovalentnom vezom za atom dušika u bočnom ogranku asparagina u aminokiselinskom slijedu Asn-X-Ser/Thr gdje X označava bilo koju aminokiselinu osim prolina. Ipak, nisu uvijek sva Asn mjesta glikozilirana čak i ako su dio

odgovarajućeg aminokiselinskog slijeda. Svi *N*-glikani imaju zajedničku sržnu strukturu koja se sastoji od tri manoze (Man) i dva N-acetilglukozamina (GlcNAc), a ovisno o ostatku glikanske strukture dijelimo ih u tri grupe: a) oligomanozni glikani gdje su dodatne monosaharidne jedinice isključivo manoze; b) kompleksni glikani kod kojih se sržna struktura grana dodavanjem šećernog ostatka GlcNAc i drugih monosaharida; c) hibridni glikani koji zadržavaju jednu oligomanoznu granu, a ostatak predstavljaju kompleksne strukture [14].

Prvi koraci sinteze odvijaju se u endoplazmatskom retikulumu (ER) gdje nastaje prekursorska struktura koja se sastoji od dva N-acetilglukozamina, devet manoza i tri glukoze (Glc) vezanih za lipidni nosač dolikol-difosfat (Dol-PP) koji je dio membrane endoplazmatskog retikuluma. Cijela glikanska struktura zatim se prenosi na Asn koji je dio rastućeg polipeptidnog lanca (Slika 3). U sljedećim koracima enzimatski se uklanjaju glukoze, a tijekom kontrole kvalitete smatanja proteina može se ukloniti i manoza, čime se regulira daljnja sudbina pravilno ili nepravilno smotanog proteina [154]. Ovako nastao pravilno smotan glikoprotein prenosi se u Golgijev aparat.



Slika 3. Shematski prikaz *N*-glikozilacije i biosintetskog puta heksozamina. Sinteza heksozamina započinje ulaskom glukoze u stanicu preko transportera iz porodice GLUT koji, kako bi bio stabilan na membrani, mora biti pravilno glikoziliran. Glukoza se u nizvodnim koracima procesira sve do UDP-GlcNAc koji je primarna gradivna jedinica u sintezi *N*-glikana. Glikanski prekursor nastaje vezanjem pojedinačnih šećernih podjedinica na dolikol, a nakon završetka sinteze prekursor se prebacuje na asparagin (Asn) unutar motiva Asn-X-Ser/Thr. Slijedi njegova početna obrada u endoplazmatskom retikulumu te daljnja modifikacija u Golgijevom aparatu djelovanjem manozidaza (Man I, Man II) i N-acetilglukozaminiltransferaza (GnT-I–V). Dodatne modifikacije uključuju dodatak galaktoze odnosno galaktozilaciju (posredovanu galaktoziltransferazom GalT), dodatak sijalinske kiseline odnosno sijalinizaciju (posredovanu sijaliltransferazom ST6Gal I) i dodatak fukoze odnosno fukozilaciju (posredovanu fukoziltransferazama FUT2-8) te alternativne putove

modifikacije poput djelovanja β1,4-N-acetilglukozaminiltransferaze III (BGnT-3) koja dodaje GlcNAc na antenarne galaktoze. Označeni su enzimi povezani s dijabetesom tipa 1, tipa 2 i tipa MODY3. Preuzeto i prilagođeno prema Rudman i sur. 2019 [11].

U Golgijevom aparatu manozidaza I najprije uklanja manoze, čime nastaje struktura koja sadrži pet manoza i dva šećerna ostatka GlcNAc. Na tu strukturu enzim GnT-1 dodaje šećerni ostatak GlcNAc, što predstavlja početak prve grane/antene. Manozidaza II potom uklanja još dvije manoze, nakon čega GnT-2 dodaje GlcNAc na preostalu manozu, čime započinje formiranje druge grane [155].

Nastala struktura može biti dodatno fukozilirana na srži glikanske molekule djelovanjem enzima FUT8. Enzimi GnT-4 (A, B i C) i GnT-5 zatim dodaju treći i četvrti šećerni ostatak GlcNAc, čime započinje formiranje treće i četvrte grane glikana. Svaka od grana može biti dodatno nadograđena galaktozom djelovanjem galaktoziltransferaza, prvenstveno B4GalT1 [14].

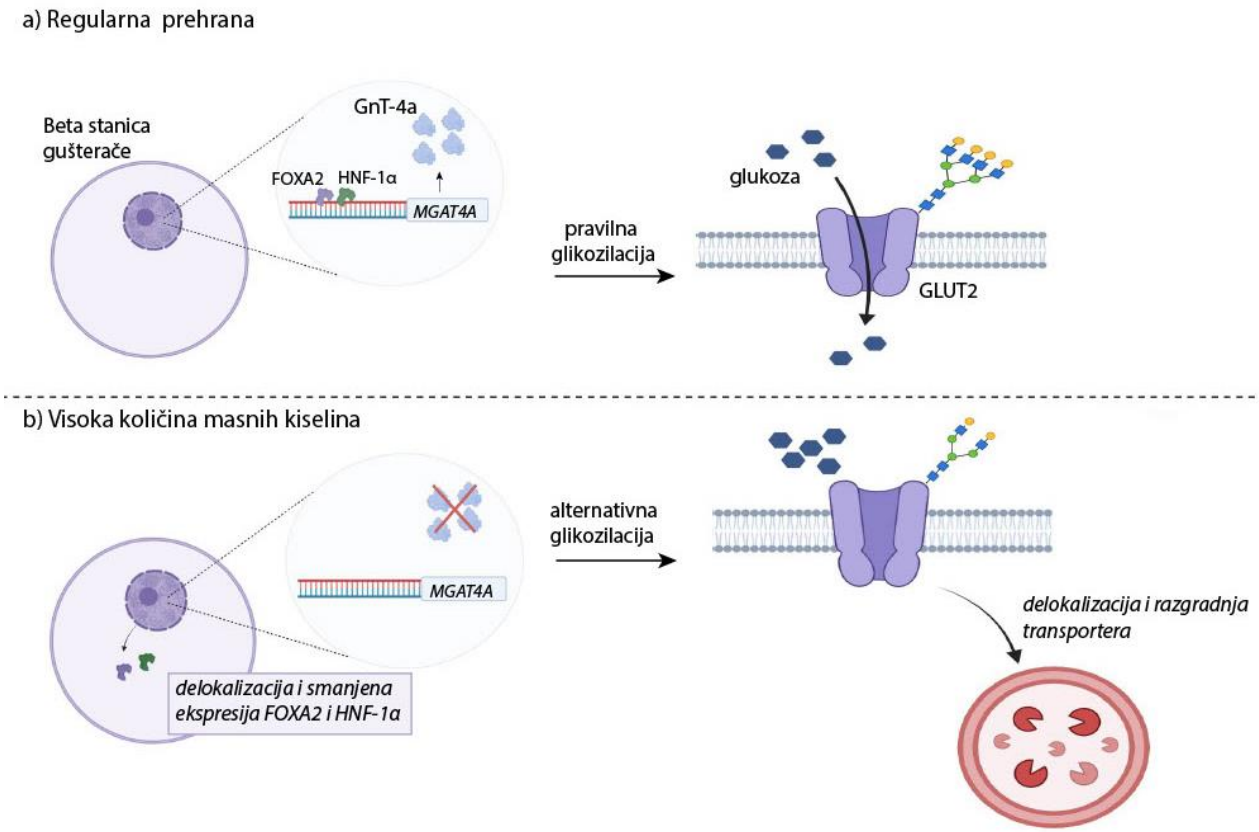
Sijaliltransferaze potom dodaju sijalinske kiseline na postojeće galaktoze na glikanskim granama, a takve strukture mogu biti i antenarno fukozilirane djelovanjem enzima FUT2, 3, 5 i 6. Postoje i neke druge modifikacije *N*-glikana, no opisani put uključuje najčešće šećerme strukture koje su prisutne u ukupnom *N*-glikomu većine stanica [14].

2.4.2. Glikozilacija proteina beta stanica gušterače i dijabetes

Glikozilacija je esencijalna modifikacija proteina koja određuje njihovu ispravnu funkciju u gotovo svim staničnim procesima, kako u homeostazi tako i u patologiji. Međutim, zbog analitičkih ograničenja uloga glikozilacije u brojnim staničnim procesima još je uvijek nedovoljno istražena, uključujući njezin značaj za endokrinu funkciju beta stanica i moguću uključenost u molekularne mehanizme razvoja dijabetesa.

Do sada je istraživana uloga glikozilacije glukoznih transportera u regulaciji fiziologije beta stanica. Pravilna lokalizacija GLUT2 (potencijalno i GLUT1) regulirana je kompleksnim razgranatim glikanom (Slika 4). Pravilno glikoziliran GLUT2 interagira s galektinom-9 što utječe na njegovu membransku lokalizaciju i stabilnost. Ključnu ulogu u nastanku te strukture ima glikoziltransferaza GnT-4a koja je kodirana genom *MGAT4A*, a čija je ekspresija

regulirana transkripcijskim faktorima FOXA2 i HNF-1α (Slika 4). Prehrana bogata mastima dovodi do smanjenja ekspresije i jezgrene lokalizacije tih faktora, a time i do smanjene ekspresije *MGAT4A*. Posljedično se smanjuje udio tri- i tetraantenarnih glikana na transporterima GLUT te njihova interakcija s galektinima, zbog čega se smanjuje njihova stabilnost na staničnoj membrani i povećava endocitoza. Smanjena zastupljenost transportera na površini beta stanica narušava njihov odgovor na promjene koncentracije glukoze, a time i GSIS [18], [19], [20].



Slika 4. Utjecaj masnih kiselina na glikozilaciju transportera glukoze GLUT2 u beta stanicama gušterače prema radovima Ohtsuba i sur. U normalnim uvjetima ekspresija glikoziltransferaze GnT-4a regulirana je transkripcijskim faktorima HNF-1α i FOXA2 koji posljedično omogućuju pravilnu glikozilaciju transportera GLUT2, što u konačnici rezultira pravilnim unosom glukoze u stanicu. Masne kiseline dovode do delokalizacije ovih faktora iz jezgre, kao i smanjenja njihove ekspresije, što dovodi do smanjenja transkripcije gena *MGAT4A* koji kodira za GnT-4a. Rezultat je alternativna glikozilacija GLUT2 što dovodi do njegove delokalizacije i razgradnje, a time i onemogućenog unosa glukoze u beta stanice.

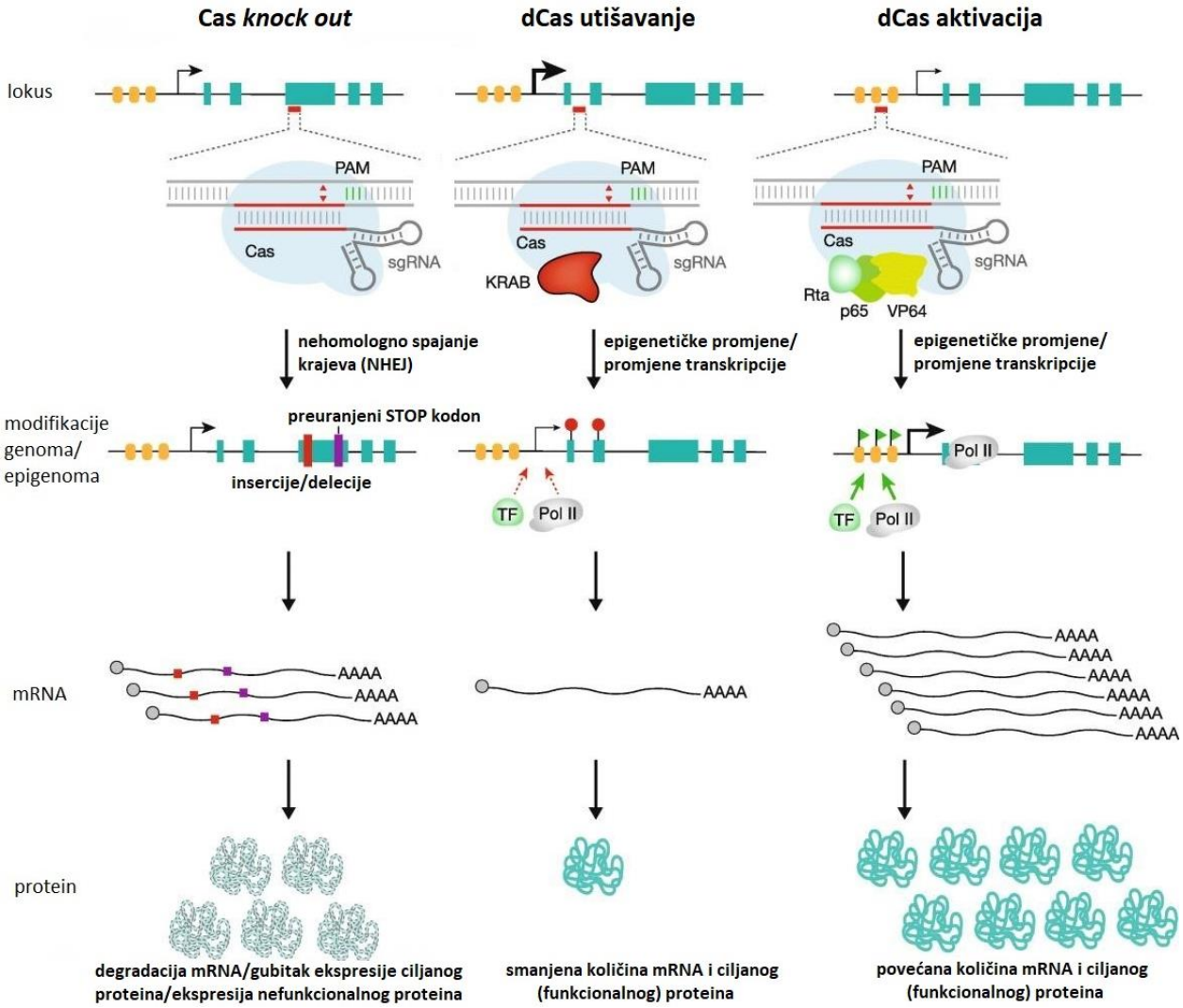
Uloga O-glikozilacije u beta stanicama gušterače također je slabo istražena. Izloženost beta stanica povišenim koncentracijama glukoze dovodi do porasta ukupne stanične O-glikozilacije, prvenstveno vezanja šećernih ostataka GlcNAc. O-glikozilacija transkripcijskog faktora NeuroD1 dovodi do njegove translokacije u jezgru i transkripcije gena *INS* [156]. S druge strane, povećana O-glikozilacija može dovesti i do apoptoze beta stanica preko inhibicije fosforilacije inzulinskih receptora IRS-1 i IRS-2 što pokazuje potrebu za preciznom regulacijom glikozilacije kako bi beta stanice pravilno funkcionirale [157], [158].

Nešto bolje su istražene promjene glikozilacije ukupnog proteoma seruma i plazme u korelaciji s nastankom i progresijom dijabetesa. Povećana kompleksnost *N*-glikoma plazme, prvenstveno udio razgranatih, galaktoziliranih i sijaliniziranih glikana povezana je s vjerojatnošću razvoja T2D, s potencijalom prediktivnog biomarkera [159], [160], [161]. Zanimljivo je da je *ST6GAL1*, gen koji kodira sijaliltransferazu važnu za sintezu kompleksnih *N*-glikana, u nekoliko cjelogenomskih asocijacijskih studija (engl. *genome-wide association study*, GWAS) povezan s T2D-om ([162], [163]. Jedan od polimorfizama u lokusu *ST6GAL1* povezanih s T2D-om u radu Mahajan i sur. prethodno je povezan i s povećanom ekspresijom *ST6GAL1*, pri čemu je taj učinak bio najizraženiji u beta stanicama [164]. Ovi rezultati upućuju na moguću ulogu promijenjene sijalinizacije u funkciji beta stanica i razvoju T2D-a, koja je zasad slabo istražena.

2.5. Sustav CRISPR/Cas9 i derivirani sustavi za ciljanu manipulaciju gena

Sustav CRISPR/Cas predstavlja vrstu adaptivnog imunog odgovora u bakterijama i arhejama koji omogućuje uništavanje strane DNA tijekom infekcije bakteriofagima ili drugim virusima [165]. Sustav se sastoji od proteinske i RNA komponente. Protein Cas je nukleaza koja sadrži dvije aktivne domene, HNH i RuvC koje cijepaju lance molekule DNA jednom kada se Cas nalazi na ciljnom slijedu. RNA dio se sastoji od dvije RNA molekule, crRNA (eng. *CRISPR RNA*) koja je komplementarna ciljanom slijedu DNA i tracrRNA (eng. *trans-activating CRISPR RNA*) koja povezuje crRNA s proteinom Cas i omogućuje sklapanje kompleksa [166]. Kako bi se nastali kompleks uspješno vezao i pocijepao stranu DNA, neposredno uz ciljani slijed mora se nalaziti i nukleotidni slijed PAM (eng. *protospacer adjacent motif*). To je kratki slijed od nekoliko parova baza koji omogućuje bakterijama razlikovanje vlastitih sljedova od stranih te zaštitu vlastitog genoma [167].

Prenamjena ovog bakterijskog sustava unutar područja genetičkog inženjerstva omogućila je ciljanu modifikaciju ljudskog genoma ([168], [169], [170]. Prvi modificirani sustavi temeljili su se na proteinu Cas9 iz vrste *Streptococcus pyogenes* i zbog njegove nukelazne aktivnosti korišteni su za uvođenje ciljanih lomova u genomskoj DNA (Slika 5). Uslijedile su prenamjene sustava temeljene na katalitički inaktivnom proteinu dCas9, koji se mogao fuzionirati s različitim efektorskim domenama. Time je omogućena ciljana aktivacija (*CRISPRa*) ili utišavanje ekspresije gena (*CRISPRi*) bez trajne promjene slijeda DNA (Slika 5) [40], [171]. Katalitički inaktivni dCas9 primijenjen je i za vizualizaciju specifičnih genomskih regija u živim stanicama [172]. Daljnjim razvojem sustava omogućeno je i ciljano uvođenje ili uklanjanje epigenetičkih oznaka, poput DNA metilacije i histonskih modifikacija [173], [174], [175], kao i izravno uređivanje dušičnih baza [176].



Slika 5. Mehanizmi djelovanja nukleaze Cas i fuzija dCas za ciljanu manipulaciju gena od interesa. Nukleaza Cas uvodi lomove u DNA koji se popravljaju nehomolognim spajanjem

krajeva što dovodi do nastanka delecija i insercija koje rezultiraju degradacijom transkribirane mRNA i gubitkom ekspresije proteina ili ekspresijom mutiranog proteina. Fuzije dCas s domena KRAB ili VPR omogućuju ciljano utišavanje ili aktivaciju gena od interesa uvođenjem epigenetičkih promjena unutar ciljanog lokusa. Rezultat je smanjene ili povećanje količine funkcionalnog proteina od interesa. Preuzeto i prilagođeno prema Bodapati i sur. [177].

Od navedenih primjena dCas9, za ovaj su rad posebno važni ciljano utišavanje i aktivacija ekspresije gena, odnosno sustavi *CRISPRi* i *CRISPRa*. Ciljano utišavanje najčešće se temelji na fuziji dCas9 s domenom KRAB (*Krüppel-associated box*), iako su razvijene i druge represorske domene [38]. KRAB je domena duga približno 70 aminokiselina prisutna u velikom broju proteina s cinkovim prstima, a represijski učinak ostvaruje interakcijom s korepresorskim proteinima. Vezanje dCas9 u blizini promotora može fizički ometati transkripciju, dok KRAB dodatno potiče stvaranje represivnog kromatinskog okruženja [178]. Ključni korepresor je KAP1/TRIM28, koji služi kao okosnica represijskog kompleksa i regrutira SETDB1 i kompleks NuRD [179], [180]. SETDB1 katalizira trimetilaciju lizina 9 histona H3, dok NuRD sudjeluje u deacetilaciji histona i remodeliranju kromatina ([181], [182]. Zajedničko djelovanje ovih čimbenika dovodi do stvaranja heterokromatina i smanjenja transkripcije ciljanog gena.

Suprotan pristup predstavlja *CRISPRa,* u kojem se dCas9 povezuje s transkripcijskim aktivatorima. Jedna od često korištenih aktivacijskih domena je VPR, sastavljena od transkripcijskih aktivatora VP64, p65 i Rta [183]. VP64 je slijed od četiri ponavljanja minimalne aktivacijske domene proteina VP16 virusa Herpes simplex, p65 predstavlja transaktivacijsku domenu ljudskog proteina p65, dok je Rta transkripcijski aktivator Epstein–Barr virusa [184]. Njihova kombinacija pojačava regrutaciju transkripcijske mašinerije na ciljanu regiju i time povećava transkripciju ciljanog gena.

Jedan od važnih nedostataka CRISPR/Cas9 i izvedenih sustava je *off-target* učinak. Iako sgRNA usmjerava kompleks prema ciljnom lokusu, moguće je i vezanje za regije sličnog, ali ne potpuno identičnog nukleotidnog slijeda. Takvo vezanje može dovesti do neželjenih promjena izvan ciljnog mjesta, pri čemu karakter promjene ovisi o korištenom proteinu Cas i pridruženoj efektorskoj domeni [185]. Smanjenje *off-target* učinka stoga predstavlja jedan od važnih smjerova daljnjeg razvoja CRISPR/Cas sustava.

Sustavi CRISPR/Cas dalje su nadograđivani i usavršavani upotrebom različitih ortologa Cas iz drugih bakterijskih vrsta, a koji su manji, omogućuju ciljane drugačijih nukleotidnih sljedova u molekuli DNA, pa čak i molekulama RNA te omogućuju manji *off-target* efekt ([186], [187], [188]. Jedna od ključnih prednosti novih ortologa njihova je veličina jer su neki višestruko manji od originalno korištenog *Sp*Cas9 što uvelike olakšava dopremanje u ciljne stanice nekim od redovito korištenih metoda poput adeno-asociranih virusa ili lentivirusa [189], [190].

Mogućnosti primjene sustava CRISPR/Cas izuzetno su velike, od primjene u bazičnim istraživanjima do terapeutske upotrebe. Sve je više kliničkih studija u tijeku koje se temelje na ovom sustavu, a neke terapije već su i odobrene čime je započelo novo razdoblje genetičkog inženjerstva u medicini [191].

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Stanične i bakterijske linije

EndoC-βH1 (Human Cell Design, Toulouse, Francuska), HEK293T (CRL-3216, ATCC, Manassas, Virginia, SAD), HepG2 (ACC 180) (DSMZ, Braunschweig, Germany), *Escherichia coli* XL10-Gold (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD), NEB Stable Competent *Escherichia coli* (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, SAD).

3.1.2. Popis svih sljedova početnica i molekula gRNA

Sljedovi svih početnica i *stuffer* fragmenata koji su korišteni prilikom kloniranja funkcionalne domene Cas9, promotora RIP te domene dCasMINI nalaze se u Tablici 1.

Tablica 1. Sljedovi početnica i *stuffer* fragmenata korištenih prilikom kloniranja novih funkcionalnih domena za potrebe izrade disertacije

NAZIV	SLIJED (5'- 3')	NAMJENA
Cas9_AatII_BsaI_Fw	TAATTGACGTCGGTCTCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGC	umnažanje domene Cas9 PCR-om
Cas9_XmaI_BsaI_Rev	ATATCCCGGGGGTCTCACGAATTTCTTCTTCTTAGCCTGTCCAGCCTTCT	
tNS_Pro_RIP2_AatII_Fw	TTAATGACGTCGGTCTCAGGTAGGACACAGCTATCAGTGGGAACT	umnažanje promotora RIP2 PCR-om
tNS_Pro_RIP2_Xma1_Rev	TTACTCCCGGGCGGTCTCAATGGTGGCAGCGCTCTAGAACCGGTTAGGGCTGGGGGTTACTGAAT	
dCasMINI_Fw_C	AAACGTCTCACCCAAGAAAAAACGCAAGGTAGGAAGC	umnažanje domene dCasMINI PCR-om za C-fuzijsku domenu
dCasMINI_Rev_C	TTTCGTCTCACGGCCTCTCTTTGGTGCTTTTCAG	

Tablica 1. Nastavak tablice s prethodne stranice

NAZIV	SLIJED (5'- 3')	NAMJENA
C-staffer-1S	CTAGAGGTCTCTCCATGCCCAAGAGACGA AACGTCTCAGCCGAAAAGGCCGGCGGCC	kreiranje modula dCasMINI za C-fuziju
C-staffer-1A	TCGTGGCCGCCGGCCTTTTCGGCTGAGACG TTTCGTCTCTTGGGCATGGAGAGACCT	
C-staffer-2S	ACGAAAAAGGCCGGACAGGCCAAAAAGA AAAAGGGAGGCGGGGGAAGCGGAGGCGG GGGAAGCGGCGGAGAGAGACCC	
C-staffer-2A	TCGAGGGTCTCTCTCCGCCGCTTCCCCCGC CTCCGCTTCCCCCGCCTCCCTTTTTCTTTTT GGCCTGTCCGGCCTTTT	
dCasMINI_Fw_N	AAACGTCTCACTCCCCCAAGAAAAAACGC AAGGTGG	umnažanje modula dCasMINI PCR-om za N-fuzijsku domenu
dCasMINI_Rev_N	TTTCGTCTCATTTTCGGCCTCTCTTTGGTGC TTTTCAGTTTCGG	
N-staffer-1S	CTAGAGGTCTCTGGAGGTGGCTCCGGAGG AGGTGGCTCCGGAGGAGGTGGCTCCAGAG ACGAAA	kreiranje modula dCasMINI za N-fuziju
N-staffer-1A	GACGTTTCGTCTCTGGAGCCACCTCCTCCG GAGCCACCTCCTCCGGAGCCACCTCCAGA GACCT	
N-staffer-2S	CGTCTCAAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAA AGGCCGGACAGGCCAAAAAGAAAAAGTT CGTGAGACCC	
N-staffer_2A	TCGAGGGTCTCACGAACTTTTTCTTTTTGG CCTGTCCGGCCTTTTTCGTGGCCGCCGGCC TTTTTGA	

Tablica 1. Nastavak tablice s prethodne stranice

NAZIV	SLIJED (5'- 3')	NAMJENA
CasMINI-guide-staffer-S	CAACTTGTCTTCAAAAGAAGACAA	kreiranje modula za CasMINI sgRNA
CasMINI-guide-staffer-A	AAAATTGTCTTCTTTTGAAGACAA	
pSgM1-MINI_S	CTAGCCGTCTCATGACTCTAGATTT TCTCGAGGGTATGAGACGA	
pSgM1-MINI_A	TCGATCGTCTCATACCCTCGAGAA AATCTAGAGTCATGAGACGG	
pSgM2-MINI_S	CTAGCCGTCTCAGGTATCTAGATTT TCTCGAGCCATTGAGACGA	
pSgM2-MINI_A	TCGATCGTCTCAATGGCTCGAGAA AATCTAGATACCTGAGACGG	
pSgM3-MINI_S	CTAGCCGTCTCACCATTCTAGATTT TCTCGAGGGAGTGAGACGA	
pSgM3-MINI_A	TCGATCGTCTCACTCCCTCGAGAA AATCTAGAATGGTGAGACGG	
pSgM4-MINI_S	CTAGCCGTCTCAGGAGTCTAGATT TTCTCGAGTTCGTGAGACGA	
pSgM4-MINI_A	TCGATCGTCTCACGAACTCGAGAA AATCTAGACTCCTGAGACGG	
pSgM5-MINI_S	CTAGCCGTCTCATTCGTCTAGATTT TCTCGAGCGCTTGAGACGA	
pSgM5-MINI_A	TCGATCGTCTCAAGCGCTCGAGAA AATCTAGACGAATGAGACGG	
pSgM6-MINI_S	CTAGCCGTCTCACGCTTCTAGATTT TCTCGAGAGGTTGAGACGA	
pSgM6-MINI_A	TCGATCGTCTCAACCTCTCGAGAA AATCTAGAAGCGTGAGACGG	
pUX21-seqF	GTAAAACGACGGCCAGT	početnice korištene za provjeru kreiranih modula sekvenciranjem
pUX21_seqR	AGCGGATAACAATTTCACACAGG	
C9seq1	TGAACCCCGACAACAGCGAC	
C9Seq2	ATCCTGACCTTCCGCATCCC	
C9seq3	GGACATCCAGAAAGCCCAGG	

Tablica 1. Nastavak tablice s prethodne stranice

NAZIV	SLIJED (5'- 3')	NAMJENA
C9seq4	GAAGTCCAAGCTGGTGTCCG	početnice korištene za provjeru kreiranih modula sekvenciranjem
CasMINIseq	TTCCGATTCCGCTGGTTAAACAG	
U6_Fw	GAGGGCCTATTTCCCATGATT	

Početnice korištene za analizu promjena ekspresije gena nakon ciljane manipulacije gena od interesa dizajnirane su upotrebom Primer-BLAST online alata [192] ili ručno, a cijeli popis nalazi se u Tablici 2.

Tablica 2. Početnice korištene za analizu gena od interesa metodom kvantitativnog PCRa

gen	naziv	5'-3' slijed
HMBS	HMBS_FW	AGCTTGCTCGCATACAGACG
	HMBS_REV	AGCTCCTTGGTAAACAGGCTT
HNF1A	HNF1A_Fw3	CAGGTCTTCACCTCAGACACT
	HNF1A_Rev3	TCTCGATGACGCTGTGGTT
HNF4A	HNF4A_4,5,6,8,9,10_Fw1	GGCCATGGTCAGCGTGAA
	HNF4A_4,5,6,8,9,10_Rev1	GGTGCCTTCTGATGGGGAC
INS	INS_FW	ACGAGGCTTCTTCTACACACCC
	INS_REV	TCCACAATGCCACGCTTCTGCA
MGAT3	MGAT3_FW	ATGAAGATGAGACGCTACAAGC
	MGAT3_REV	GCTGGACACCAGGTTAGGG
MGAT4A	MGAT4A_FW	AAAATCCATGTAAACCCACCTGC
	MGAT4A_REV	AGTCTCCAGCTATCGGTGTGA
MGAT4B	MGAT4B_FW	TGATGTACGCGCAGTCCAAAGG
	MGAT4B_REV	TCATCCAGTCCTCTGAAGGCTG
MGAT5	MGAT5_FW	AGCGCATTGGCAAGTTGGA
	MGAT5_REV	AGTGGAGTTGGTTGAGTTTGTT
B4GALT1	B4GALT1_FW_3	CCAGGCGGGAGACACTATATT
	B4GALT1_REV_3	CACCTGTACGCATTATGGTCAT

Tablica 2. Nastavak tablice s prethodne stranice

gen	naziv	5'-3' sekvenca
ST3GAL1	ST3GAL1_qRT-PCR_Fw2	GGCGACAGGATGGGAAAGAA
	ST3GAL1_qRT-PCR_Rev2	TGGTATAGCGGGGAGGGAAA
ST3GAL3	ST3GAL3_qRT-PCR_Fw1	GCTAGCCCTCTGCCTCTTTC
	ST3GAL3_qRT-PCR_Rev1	CTCCTGGGGTGAGCTAGAGT
ST3GAL4	ST3GAL4_qRT-PCR_Fw3	CATCTCCCGGGAAGACAGTT
	ST3GAL4_qRT-PCR_Rev3	CCCATAGGGCAGCTCGTAAG
ST6GAL1	ST6GAL1_FW_2	CTACCACCCGCTGCTCTATG
	ST6GAL1_REV_2	GTGTGGCTTTTCCAAGCAGG
FUT6	FUT6_qRT-PCR_Fw1	GAGTGGGTGGGGAAAGGAAG
	FUT6_qRT-PCR_Rev1	CAGCACCAAGGCAATAGGGA
FUT8	FUT8_FW	AACTGGTTCAGCGGAGAATAAC
	FUT8_REV	TGAGATTCCAAGATGAGTGTTCG
GLUT1	SLC2A1_FW1	ATGGGCTTCTCGAAACTGGG
	SLC2A1_REV1	CCGCAGTACACACCGATGAT
GLUT2	SLC2A2_FW1	GTGCCACACTCACAAGACC
	SLC2A2_REV1	TGACAGTGAAAACCAGGGTCC
IFNγ	IFNg_qRT-PCR_Fw3	CTAGGCAGCCAACCTAAGCA
	IFNg_qRT-PCR_Rev3	TCAAACCGGCAGTAACTGGA
ASCL1	ASCL1_qRT-PCR_Fw2	GAACTGATGCGCTGCAAACG
	ASCL1_qRT-PCR_Rev2	TGACCAACTTGACGCGGTT
HBG1	HBG1_qRT-PCR_Fw2	ACTCGCTTCTGGAACGTCTG
	HBG1_qRT-PCR_Rev2	CCTCTGGGTCCATGGGTAGA

Molekule sgRNA koje su korištene za ciljanu manipulaciju gena od interesa dizajnirane su upotrebom alata dostupnog online, dCasMINI Guide Design Tool [193], CRISPOR [194], CHOPCHOP [195] ili ručno, a popis svih molekula kao i točni sljedovi nalaze se u Tablici 3.

Tablica 3. Lista molekula sgRNA koje su korištene za ciljanu manipulaciju gena od interesa

gen	**domena**	**Naziv**	**5'-3' slijed**
HNF4A	KRAB	HNF4A_KRAB_sg01	GGGCGCGTTCACGCTGACCA
HNF4A	KRAB	HNF4A_KRAB_sg03	GAAGCGGTCACATTGCCTCCG
HNF1A	KRAB	HNF1A_KRAB_sg01	GAGGCAGGGGCCCTGATTCAC
HNF1A	KRAB	HNF1A_KRAB_sg03	GCCCTACCTCCTGGCTGGAGA
HNF1A	KRAB	HNF1A_KRAB_sg04	GCGAGTCTCCCCCAGCCCATT
non target	KRAB/Cas9	NT_sgRNA	GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC
HNF1A	Cas9	HNF1A_KO_sg01	GGCTTCTTCTTTGCGCCGGT
HNF1A	Cas9	HNF1A_KO_sg02	GTACGTCCGCAAGCAGCGAG
HNF1A	Cas9	HNF1A_KO_sg03	GGGCTCCAACCTCGTCACGG
HNF1A	Cas9	HNF1A_KO_sg04	CTGGCTCAGTTTAGAAACCA
HNF1A	Cas9	HNF1A_KO_sg05	TATCGACCACCTCCCGCTGT
HNF1A	Cas9	HNF1A_KO_sg06	GGGTCTCCACCACGGCTTTC
HNF1A	Cas9	HNF1A_KO_sg07	GGACGGGATCTGCTCAGCAA
HNF4A	Cas9	HNF4A_KO_sg01	CCGAATGTCGCCGTTGATCC
HNF4A	Cas9	HNF4A_KO_sg02	TCCTCACCTGGTCGTCCAGG
HNF4A	Cas9	HNF4A_KO_sg03	CAGCTCGTCAAGGATGCGTA
HNF4A	Cas9	HNF4A_KO_sg04	GGGACCGGATCAGCACTCGA
HNF4A	Cas9	HNF4A_KO_sg05	ACCCCGGTACCTGTCGGGAC
HNF4A	Cas9	HNF4A_KO_sg06	TAGGAGGTGTGCACTGTACC
non target	CasMINI	MINI_NT	CGAATACGCCCACGCGATGGG TA
HNF1A	CasMINI	HNF1A_MINI_VPR_sg01	GGACCCTTCCACCCCACTCCC GG
HNF1A	CasMINI	HNF1A_MINI_VPR_sg02	GCTCTCCTGTCTCAGCATGAT GC
HNF1A	CasMINI	HNF1A_MINI_VPR_sg03	CAGGGCTGAAGTCCAAAGTTC AG
HNF1A	CasMINI	HNF1A_MINI_VPR_sg04	GACTTCAGCCCTGCAAAGTGC AG
HNF1A	CasMINI	HNF1A_MINI_VPR_sg05	TAGGGGCATCATGCTGAGACA GG

Tablica 3. Nastavak tablice s prethodne stranice

gen	domena	Naziv	5'-3' slijed
HNF4A	CasMINI	HNF4A_MINI_VPR_sg01	GGAAGTTATTGAATTAGGGGATC
HNF4A	CasMINI	HNF4A_MINI_VPR_sg02	ACCCTTGACTCACCCACCCCTCC
HNF4A	CasMINI	HNF4A_MINI_VPR_sg03	AAAGGAAGGCAGAGAGGGCACTG
IFNγ	CasMINI	IFNg_MINI_VPR_sgrna	AGATGAGATGGTGACAGATAGGC
ASCL1	CasMINI	ASCL1_MINI_VPR_sgrna	CAAGGAGCGGGAGAAAGGAACGG
HBG1	CasMINI	HBG1_MINI_VPR_sgrna	CATTGAGATAGTGTGGGGAAGGG
ST3GAL3	CasMINI	ST3GAL3_MINI_VPR_sg01	CGTTCCCCGCGCGGGCGACGAAA
ST3GAL3	CasMINI	ST3GAL3_MINI_VPR_sg02	CCGTCCCGCCCACCCCGCCTACC
ST3GAL3	CasMINI	ST3GAL3_MINI_VPR_sg03	GTCCGCGCGTGGCACAAGGCCTC
ST3GAL3	CasMINI	ST3GAL3_MINI_VPR_sg04	CAGGTTCAGCGTGGGTGTCTCTC
ST3GAL3	CasMINI	ST3GAL3_MINI_VPR_sg05	CGCTGGTGGAGCACCCCAGCTTG
FUT8	CasMINI	FUT8_MINI_VPR_sg01	GGCGGTAGAGGGCGGCCTACGCC
FUT8	CasMINI	FUT8_MINI_VPR_sg02	AAGCTGGCTCCTTGCTACTTTTA
FUT8	CasMINI	FUT8_MINI_VPR_sg03	GTGCGGGTGCCCCCTAGGGCCGC
FUT8	CasMINI	FUT8_MINI_VPR_sg04	TCTCCCCGCGGAATGGGGCCGGC

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj stanične linije EndoC-βH1

Za uzgoj stanične linije EndoC-βH1, Petrijeve zdjelice (10 cm) ili pločice sa 6 ili 12 jažica tretirane su Matrigelom (100 μg/ml; Corning, New York, SAD) i fibronektinom (2 μg/ml; Roche, Mannheim, Njemačka) u mediju DMEM-u (4,5 g/l glukoze; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Stanice su uzgajane u mediju DMEM koji je sadržavao 5,6 mM glukoze, 2 % BSA frakcije V (*Fatty-acid-free*, Capricorn, Ebsdorfergrund, Njemačka), 50 μM 2-merkaptoetanola (Sigma-Aldrich), 10 mM nikotinamida (Sigma-Aldrich), 5,5 μg/ml transferina (Roche), 6,7 ng/ml selenita (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicilina i 100 μg/ml streptomicina (Sigma-Aldrich), odnosno u mješavini medija DMEM (4,5 g/l glukoze), DMEM (0 g glukoze; Gibco, New York, SAD) i Ham F-12 (Capricorn)(omjer 2:1:1) uz ranije navedene dodatke za potrebe tretmana stanica glukozom i/ili palmitinskom kiselinom. Stanice su uzgajane u inkubatoru s vlažnom atmosferom pri 37 °C i s 5% CO2, a presađivane su jednom tjedno.

3.2.2. Optimizacija selekcije stanica EndoC-βH1 antibioticima blasticidinom i puromicinom

Krivulja smrtnosti za puromicin određena je na pločicama sa 6 ili 12 jažica u gustoći od 70 000 stanica/cm². Stanice su tretirane različitim koncentracijama puromicina (Gibco) u rasponu od 0,5 do 8 μg/ml tijekom dva dana, nakon čega je određena najniža koncentracija koja je omogućila potpunu eliminaciju netransduciranih/netransfeciranih stanica. Koncentracija blasticidina (Gibco) odabrana je prema prethodno objavljenim protokolima za staničnu liniju EndoC-βH1 te nije dodatno optimirana, budući da se koristio za dugotrajnu selekciju stabilno transduciranih stanica.

3.2.3. Testiranje transfekcijskih metoda za unos plazmida u stanice EndoC-βH1

Za optimizaciju unosa plazmidne DNA u staničnu liniju EndoC-βH1 testirana su četiri različita transfekcijska reagensa: PEI MAX (PolySciences, Warrington, Pennsylvania, SAD), Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, SAD), FuGENE HD (Promega, Madison; Wisconsin, SAD) i Fektin (Gibco). Stanice su nasađivane u pločice sa šest jažica u

gustoći od $6{,}8 \times 10^5$ stanica po jažici, a na dan transfekcije dodan je svježi medij. Kao probni konstrukt korišten je plazmid KRAB-MeCP-NT koji sadrži fluorescentni marker mRuby. Za svaku transfekciju korišteno je 2 μg plazmidne DNA resuspendirane u mediju Opti-MEM (Gibco).

Prilikom transfekcije transfekcijskim sredstvom PEI MAX, DNA i PEI MAX pripremani su odvojeno u mediju Opti-MEM, nakon čega su pomiješani i inkubirani 30 minuta pri sobnoj temperaturi prije dodavanja na stanice. Omjer PEI MAX-a i DNA bio je 3:1.

Pri transfekciji Fektinom, plazmidna DNA i Fektin pripremani su zasebno u mediju Opti-MEM, inkubirani 5 minuta te potom pomiješani vorteksiranjem i dodatno inkubirani 20–30 minuta prije dodavanja na stanice. Omjer Fektina i DNA bio je 2:1.

Za transfekciju tansfekcijskim sredstvom FuGENE HD, plazmidna DNA resuspendirana je u mediju Opti-MEM, nakon čega je direktno dodan FuGENE HD u omjeru 3 μl reagensa na 1 μg DNA. Nakon inkubacije od 5–15 minuta smjesa je dodana na stanice.

Prilikom transfekcije Lipofektaminom zasebno su pripremljeni kompleksi Lipofektamin/Opti-MEM i DNA/P3000, koji su potom pomiješani u omjeru 1:1, inkubirani 10–15 minuta pri sobnoj temperaturi te dodani na stanice. Omjer Lipofektamina i DNA bio je 3:1.

Elektroporacija stanica EndoC-βH1 napravljena je pomoću uređaja Nucleofector™ Transfection 2b Device (Lonza, Basel, Švicarska). Za svaki uzorak korišteno je 1×10^6 stanica koje su nakon centrifugiranja resuspendirane u 100 μl otopine Nucleofector Solution V, prethodno pripremljenoj dodatkom Supplement I u omjeru 4,5:1. Kao probni konstrukt korišten je plazmid KRAB-MeCP-NT, a za svaku transfekciju korišteno je 2 μg plazmidne DNA. Suspenzija stanica i DNA prenesena je u elektroporacijske kivete bez stvaranja mjehurića, nakon čega je provedena elektroporacija programom X-005 predviđenim za staničnu liniju PANC-1. Neposredno nakon završetka elektroporacije u kivetu je dodano 500 μl medija za uzgoj stanica EndoC-βH1, a stanice su potom prebačene u ploče sa šest jažica koje su sadržavale prethodno zagrijani medij za uzgoj do ukupnog volumena od 2 ml.

3.2.4. Pakiranje lentivirusa

Lentivirusne čestice proizvedene su u stanicama HEK293T metodom transfekcije kalcijevim fosfatom. Stanice su uzgajane u mediju DMEM (4,5 g/l glukoze) uz dodatak 10% FBS-a i 100 U/ml penicilina te 100 µg/ml streptomicina. Dan prije transfekcije nasađeno je $2,7 \times 10^6$ stanica po Petrijevoj zdjelici promjera 100 mm u mediju bez antibiotika kako bi se na dan transfekcije postigla konfluentnost stanica od približno 80%.

Za pakiranje lentivirusnih čestica korišteni su pomoćni plazmidi psPAX2 (Plasmid #12260, Addgene) i pMD2.G-VSV (Plasmid 12259, Addgene) zajedno s transfer plazmidom u izomolarnom omjeru 2,4 nM po Petrijevoj zdjelici. Plazmidi su pripremljeni u sterilnoj vodi, nakon čega je dodan $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich), a dobivena smjesa postupno je dodavana u pufer HeBes 2× uz kontinuirano miješanje radi formiranja kalcijevo-fosfatnih kompleksa. Smjesa je inkubirana 30 minuta pri sobnoj temperaturi te potom dodana na stanice kapanjem po cijeloj površini zdjelice. Prije samog nakapavanja smjese na stanice je dodan klorokin (Sigma-Aldrich) u finalnoj koncentraciji 25 uM. Stanice su inkubirane pri 37 °C i 5 % CO_2 tijekom 16 sati. Nakon inkubacije medij je uklonjen i zamijenjen svježim medijem za uzgoj u sastavu DMEM (4,5 g/l glukoze), FBS (Capricorn) 3%, 100 U/ml penicilin 100 U/ml, streptomicin 100 µg/ml (Sigma-Aldrich) i natrijev butirat 2 mM (Sigma-Aldrich). Virusni supernatant prikupljan je 48 sati nakon promjene medija te je centrifugiran pri 500 × g tijekom 5 minuta radi uklanjanja staničnih ostataka i filtriran kroz 0,45 µm filtarski sustav. Lentivirusne čestice potom su koncentrirane upotrebom 40% otopine polietilenglikola (PEG) 8000, pH 7,4. Virusni supernatanti i PEG pomiješani su u omjeru 3:1, inkubirani pri +4 °C na klackalici, u trajanju od 16 sati °C te potom centrifugirani jedan sat pri 1600 × g. Supernatanti su uklonjeni, a talog je resuspendiran u odgovarajućem mediju.

3.2.5. Transdukcija stanica EndoC-βH1

Stanice EndoC-βH1 nasađene su u pločice sa 6 ili 12 jažica u gustoći od 30 000 stanica/cm² četiri dana prije transdukcije. Na dan transdukcije uklonjen je postojeći medij te je dodan medij koji je sadržavao resuspendirane lentivirusne čestice i polibren (Sigma-Aldrich) finalne koncentracije 3 µg/ml radi povećanja učinkovitosti transdukcije. Količina dodanih lentivirusnih čestica ovisila je o veličini lentivirusnog konstrukta. Za konstrukte manje od 6 kb

korišten je ekvivalent pola petrijevke virusa po jažici na pločicama s 12 jažica, odnosno jedne petrijevke po jažici na pločicama sa 6 jažica. Za konstrukte veličine između 6 i 8 kb količina virusa je udvostručena, dok su za konstrukte veće od 8 kb korištene četiri puta veće količine lentivirusnih čestica. Nakon 24 sata, medij s virusnim česticama je uklonjen, a stanice su isprane 1 × PBS-om te je dodan svježi medij koji je sadržavao puromicin ili blasticidin radi selekcije transduciranih stanica.

Stanice HepG2 (uzgajane u mediju RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) uz dodatak 10% FBS-a (Sigma-Aldrich)) koje su korištene za testiranje modula Cas9 transducirane su na isti način u pločicama sa 6 jažica uz iznimku konačne koncentracije polibrena od 8 μg/ml.

3.2.6. Kloniranje promotora RIP2

Za potrebe proširenja modularnog sustava baziranog na Golden Gate kloniranju kreiranog i korištenog u Grupi za epigenetiku [196] s promotorom specifičnim za beta stanice, kloniran je štakorski inzulinski promotor RIP2. RIP2 najprije je umnožen PCR reakcijom iz genomske DNA stanica EndoC-βH1, koje u genomu sadrže integrirani štakorski inzulinski promotor korišten tijekom njihove originalne imortalizacije, upotrebom DNA polimeraze visoke vjernosti Herculase II Fusion Enzyme (Agilent Technologies) i početnica tNS_Pro_RIP2_AatII_Fw i tNS_Pro_RIP2_Xma1_Rev. Reakcijska smjesa potom je stavljena na 1 %-tni agarozni gel uz marker GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, Walthman, Massachusetts, SAD). Gel je obojan bojom GelGreen® Nucleic Acid Stain 10000X Water (Biotium, Freemont, Kalifornija, SAD), vizualiziran plavim svjetlom pomoću uređaja UVIBLUE Uvitec Cambridge Transilluminator (Uvitec, Cambridge, UK) te je iz gela izrezan fragment odgovarajuće veličine koji je pročišćen iz gela pomoću kita QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Pročišćeni fragment i plazmid pUK21gg pocijepani su restrikcijskim enzimima AatII (New England Biolabs) i XmaI (New England Biolabs), pUK21gg je potom defosforiliran termosenzitivnom alkalnom fosfatazom FastAP (Thermo Scientific) te su tako defosforilirani pUK21gg i pocijepani fragment ligirani DNA ligazom T4 (TaKaRa, Shiga, Japan) u omjeru 1:5 u smjesi s puferom T4 DNA ligase Buffer (TaKaRa), 30 min pri 16 °C. Bakterije *E. coli* XL10-Gold transformirane su ligacijskom smjesom i razmazane na agarozne ploče s kanamicinom. Selektirane kolonije su umnožene i izoliran je plazmid kitom ZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, Kalifornija,

SAD) koji je potom sekvenciran početnicom pUX21-seqF kako bi se potvrdila ispravnost modula.

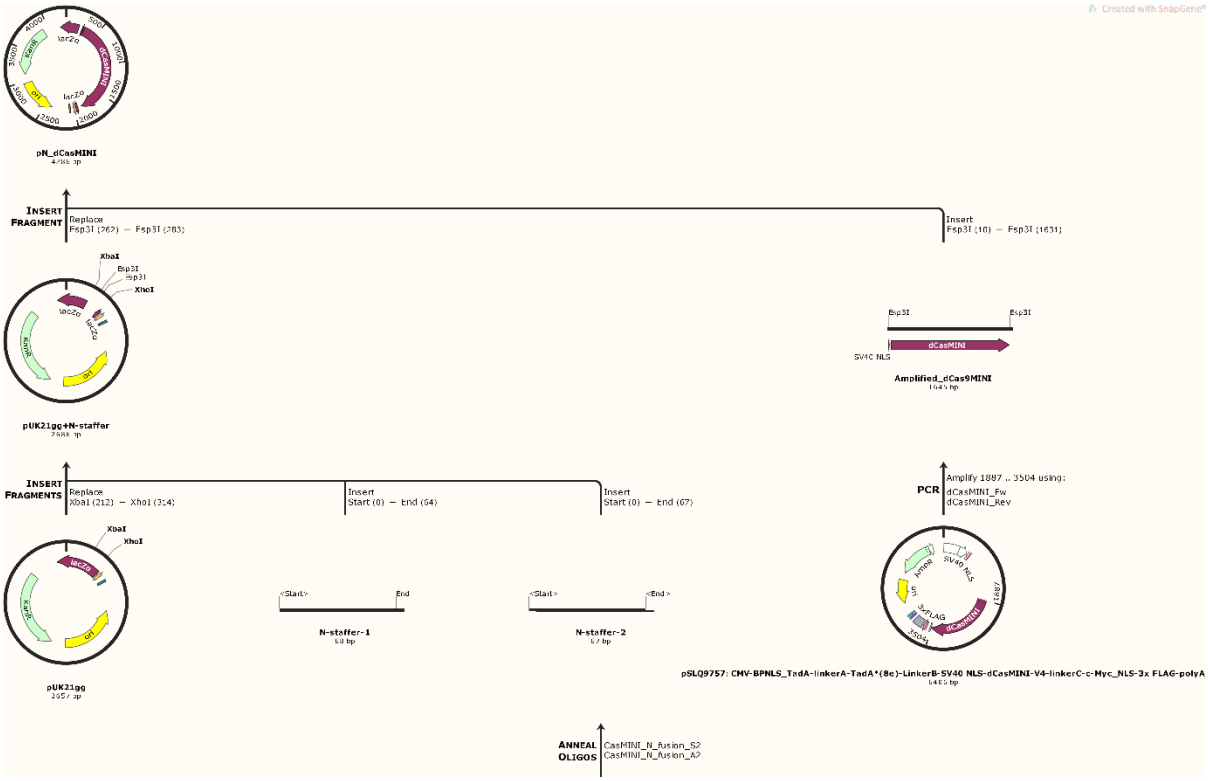
3.2.7. Kloniranje modula SpCas9

Modul za nukleazu *Sp*Cas9 kloniran je po istom principu kao ranije opisani promotor RIP2 uz nekoliko izmjena. Cas9 najprije je umnožen početnicama Cas9_AatII_Bsa_Fw i Cas9_XmaI_ BsaI_Rev iz plazmida lentiCRISPR v2 (Plasmid #52961, Addgene). Fragment odgovarajuće veličine izrezan je iz gela, pročišćen i porezan restrikcijskim enzimima AatII i XmaI, kao i plazmid pUK21gg. Potom su fragmenti ligirani u omjeru 5:1, bakterije transformirane ligacijskom smjesom razmazane su na kanamicinske ploče te su selektirani i umnoženi klonovi iz kojih je izoliran plazmid. Točnost kloniranog modula provjerena je sekvenciranjem s početnicama pUX21-seqF, pUX21_seqR, C9seq1, C9Seq2, C9seq3 i C9seq4.

3.2.8. Kloniranje modula dCasMINI za stvaranje N- i C-fuzija

Prilikom izrade modula dCasMINI, izrađeni su moduli za C- i N- fuziju kako bi se testirala oba pristupa orijentacije efektorske domene. Za N-fuzijski modul, najprije su spareni i fosforilirani oligonukleotidni lanci N-staffer-1S i N-staffer-1A te N-staffer-2S i N-staffer-2A koji su sintetizirani od strane tvrtke Macrogen (Slika 6). Oligonukleotidi su fosforilirani na 5’ kraju i spareni u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala 100 pmol svakog oligonukleotida, 1 × T4 ligase Buffer (TaKaRa) i 5 U T4 polinukleotid kinaze (New England Biolabs), u termocikleru postupnim snižavanjem temperature za 5 °C po minuti, od 95 °C do 25 °C. N-staffer oligonukleotidi sadrže jezgreni lokalizacijski signal (od engl. *nuclear localization signal*, NLS), slijed koji kodira fleksibilni linker između fuzijskih proteina, kao i restrikcijska mjesta za Esp3I i BsaI što omogućuje nizvodne korake kloniranja. Dva restrikcijska mjesta za enzim BsaI nalaze se na krajevima oligonukleotida te omogućuju kloniranje modula u finalne konstrukte, dok se dva restrikcijska mjesta za enzim Esp3I nalaze između lokalizacijskog signala i veznog slijeda što omogućuje kloniranje konstrukta dCasMINI između tih sljedova. Nakon sparivanja oligonukleotida nastala je dvolančana DNA s ljepljivim krajevima koji odgovaraju restrikcijskim enzimima XbaI i XhoI. Istim je enzimima pocijepan plazmid

pUK21gg koji je potom defosforiliran. Defosforilirani pUK21gg ligiran je sa sparenim oligonukleotidima ligazom T4 u omjeru 1:5 te su bakterije transformirane ligacijskom smjesom i razmazane na kanamicinske ploče. Selektirani su i umnoženi klonovi iz kojih je izoliran plazmid, a točnost je provjerena sekvenciranjem početnicom pUX21-seqF.



Slika 6. Shematski prikaz pojedinih koraka u konstrukciji modula dCasMINI za N-terminalne fuzije. Spareni i fosforilirani oligonukleotidi N-staffer-1 i N-staffer-2, koji sadrže jezgreni lokalizacijski signal, slijed koji kodira fleksibilni linker te restrikcijska mjesta za enzime Esp3I i BsaI, ligirani su u plazmid pUK21gg između restrikcijskih mjesta XbaI i XhoI čime je nastao plazmid pUK21gg-N-staffer. Restrikcijska mjesta Esp3I omogućuju umetanje dCasMINI slijeda između linker i NLS regije, dok BsaI mjesta omogućuju naknadno uključivanje modula u finalne Golden Gate konstrukte. Sekvenca dCasMINI umnožena je metodom PCR iz plazmida CMV-BPNLS_TadA-linkerA-TadA*(8e)-LinkerB-SV40_NLS-dCasMINI-V4-linkerC-c-Myc_NLS-3xFLAG-polyA koristeći početnice dCasMINI_Fw_N i dCasMINI_Rev_N koje uvode kompatibilne Esp3I krajeve. Nakon pročišćavanja PCR produkta, dCasMINI fragment i pUK21gg-N-staffer istovremeno su pocijepani enzimom Esp3I i ligirani DNA ligazom T4 čime je dobiven konačni dCasMINI N-fuzijski modul kompatibilan s daljnjim Golden Gate sastavljanjem funkcionalnih CRISPR/dCasMINI konstrukata.

Domena dCasMINI umnožena je iz plazmida CMV-BPNLS_TadA-linkerA-TadA*(8e)-Linker B-SV40 NLS-dCasMINI-V4-linkerC-c-Myc_NLS-3x FLAG-polyA (Plasmid #176270, Addgene) upotrebom DNA polimeraze visoke vjernosti Herculase II Fusion pomoću početnica dCasMINI_Fw_N i dCasMINI_Rev_N za N-fuzijsku domenu u uvjetima: inicijalna denaturacija 95° C 1 minuta; 30 ciklusa denaturacija 95 °C 20 sekundi; prianjanje 57° C 20 sekundi, elongacija 72 °C 1 minuta te 4 minute finalne elongacije pri 72 °C. Reakcijska smjesa potom je stavljena na 1 %-tni agarozni gel uz marker GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific). Gel je obojan bojom GelGreen® Nucleic Acid Stain 10000X Water (Biotium), vizualiziran pod plavim svjetlom uređajem UVIBLUE Uvitec Cambridge te je iz gela izrezan fragment odgovarajuće veličine (1600 parova baza) koji je pročišćen kitom QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

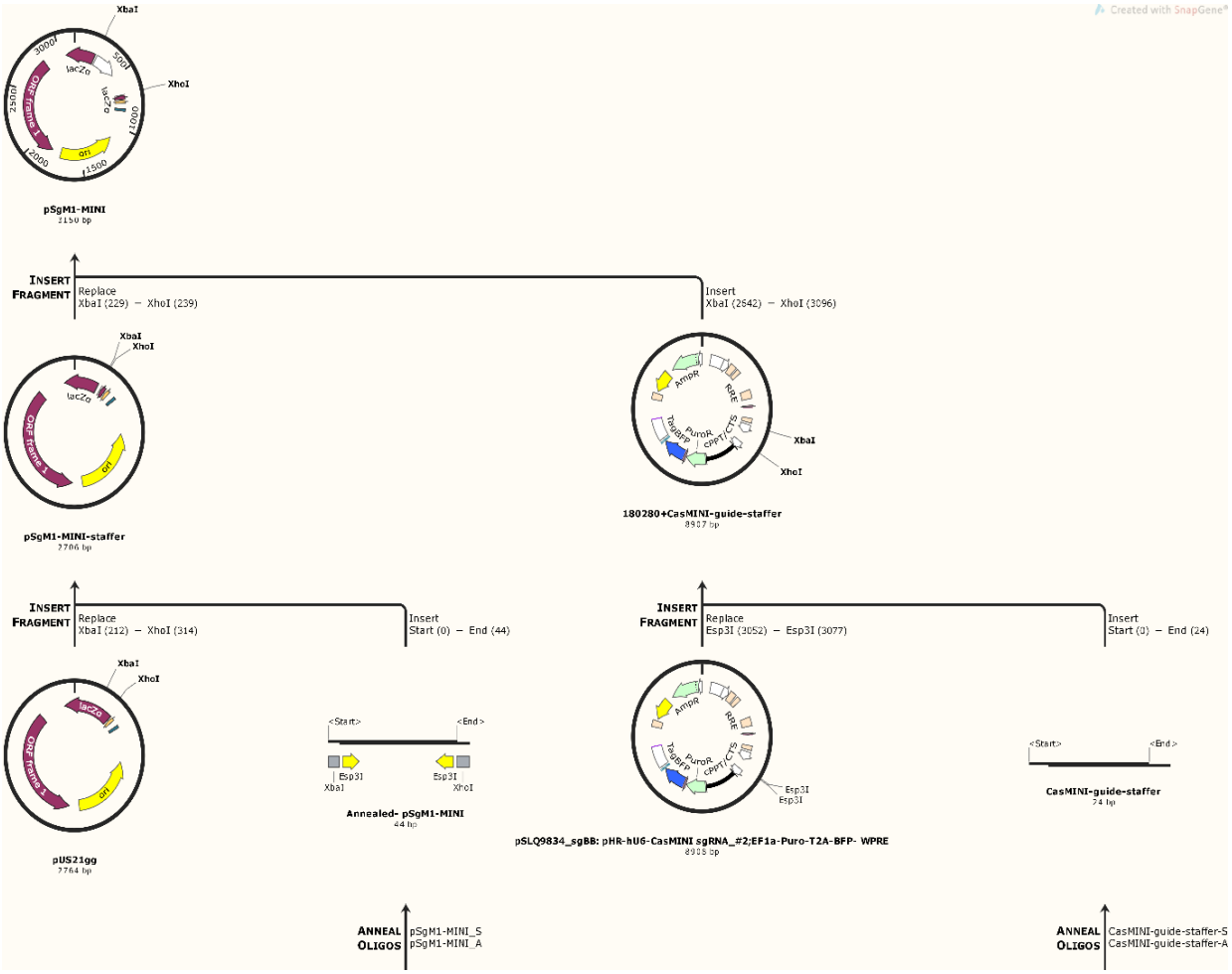
U sljedećem su koraku pročišćeni PCR produkt CasMINI-N i pUK21gg_N-stuffer istovremeno pocijepani enzimom Esp3I i ligirani DNA ligazom T4 u puferu Tango (Thermo Scientific) uz dodatak ATP-a i DTT-a do finalne koncentracije od 1 mM, pri čemu je korišten molarni omjer insert:vektor = 5:1. Reakcijski uvjeti bili su: 10 ciklusa 37 °C 5 min/ 16 °C 10 min; 37 °C 50 min; 80 °C 10 min te 4 °C do prekida reakcije. Ligacijska smjesa transformirana je u bakterije XL-10 Gold te su bakterije razmazane na kanamicinske ploče. Selektirani su klonovi koji su umnoženi, izolirani su plazmidi te je točnost konstrukta potvrđena sekvenciranjem početnicama pUX21-seqF, pUX21-seqR i CasMINIseq.

Za C-fuzijski modul, pristup je bio identičan uz razliku da je dCasMINI umnožen početnicama dCasMINI_Fw_C i dCasMINI_Rev_C (temperatura prianjanja 52 °C) kako bi se dobili odgovarajući restrikcijski krajevi, a u pUK21gg je ugrađen oligonukleotid koji je nastao sparivanjem oligonukleotidnih lanaca C-staffer-1S, C-staffer-1A, C-staffer-2S i C-staffer-2A. Konstrukti s ugrađenim oligonukleotidom provjereni su sekvenciranjem početnicom pUX21-seqF, a finalni konstrukt tj. C-fuzijski modul CasMINI provjeren je sekvenciranjem početnicama pUX21-seqF, pUX21-seqR i CasMINIseq.

3.2.9. Izrada „multi-guide“ sustava za CasMINI

Za konstrukciju „multi-guide“ CasMINI sustava najprije su izrađeni pojedinačni moduli za umetanje molekula sgRNA na unaprijed definirane pozicije unutar konačnog konstrukta. Kao

temelj korišten je plazmid pUS21gg u koji su između restrikcijskih mjesta XbaI i XhoI umetnuti spareni oligonukleotidi specifični za pojedinu poziciju sgRNA modula (pSgM1-MINI_S i pSgM1-MINI_A za prvu poziciju, pSgM2-MINI_S i pSgM2-MINI_A za drugu itd.; Slika 7). Svaki oligonukleotid sadržavao je dva mjesta prepoznavanja za restrikcijski enzim Esp3I koja su nakon cijepanja stvarala jedinstvene ljepljive krajeve specifične za pojedinu poziciju gRNA u finalnom konstruktu (pSgM1, pSgM2 itd.). Takav dizajn omogućio je sekvencijski definirano povezivanje više sgRNA modula tijekom naknadnog Golden Gate kloniranja konačnog „multi-guide“ konstrukta. Uz mjesta Esp3I, *stuffer* fragmenti sadržavali su i dodatna restrikcijska mjesta XbaI i XhoI smještena između Esp3I mjesta koja su omogućavala umetanje kompletnog sgRNA ekspresijskog modula unutar točno definiranih Esp3I granica. Najprije je plazmid pUS21gg pocijepan enzimima XbaI i XhoI, potom su krajevi defosforilirani alkalnom fosfatazom FastAP, a zatim je slijedila ligacija sparenih oligonukleotida i defosforiliranog plazmida ligazom T4 u omjeru 5:1. Sljedeći je korak bila transformacija bakterija XL10-Gold ligacijskom smjesom i razmazivanje na agarozne ploče sa spektinomicinom. Selektirane kolonije su umnožene, izolirani su plazmidi te je točnost provjerena sekvenciranjem početnicom U6_Fw.



Slika 7. Shematski prikaz pojedinih koraka u konstrukciji „multi-guide“ sustava za CasMINI na primjeru prvog sgRNA modula (pSgM1-MINI). Spareni oligonukleotidi pSgM1-MINI_S i pSgM1-MINI_A, koji sadrže restrikcijska mjesta za Esp3I te XbaI/XhoI mjesta za umetanje sgRNA ekspresijskog modula, ligirani su u plazmid pUS21gg između restrikcijskih mjesta XbaI i XhoI čime je nastao plazmid pSgM1-MINI-staffer. Paralelno je u plazmid pSLQ9834_sgBB: pHR-hU6-CasMINI sgRNA_#2; EF1a-Puro-T2A-BFP-WPRE ugrađen CasMINI-guide-staffer koji sadrži restrikcijska mjesta za enzim BpiI namijenjena naknadnom umetnju sgRNA slijeda. Nakon restrikcije plazmida enzimima XbaI i XhoI izrezan je kompletan sgRNA ekspresijski modul koji uključuje promotor U6, mjesto za umetanje sgRNA slijeda i okosnicu sgRNA te je ligiran u pSgM1-MINI-staffer. Time je dobiven prvi pozicijski sgRNA modul kompatibilan s daljnjim Esp3I-posredovanim Golden Gate kloniranjem „multi-guide“ konstrukata, kojim se u jedinstveni CasMINI sustav može povezati do šest različitih sgRNA modula.

Paralelno je modificiran plazmid pSLQ9834_sgBB: pHR-hU6-CasMINI sgRNA_#2; EF1a-Puro-T2A-BFP-WPRE (Plasmid #180280, Addgene) ugradnjom drugog oligonukleotidnog fragmenta. Taj oligonukleotid izrađen je sparivanjem sljedova CasMINI-guide-staffer-S i CasMINI-guide-staffer-A, prilikom kojeg su nastali ljepljivi krajevi komplementarni krajevima plazmida pSLQ9834_sgBB porezanog enzimom Esp3I. Oligonukleotid je sadržavao dva mjesta prepoznavanja za restrikcijski enzim BpiI čime je omogućeno umetanje pojedinačnih sgRNA sljedova pristupom Golden Gate kloniranja. Reakcija rezanja enzimom Esp3I i ligacija ligazom T4 odvijala se u jednoj reakcijskoj smjesi oligonukleotida i plazmida u omjeru 5:1. Ligacijskom smjesom transformirane su bakterije XL10-Gold te razmazane na agarozne ploče s ampicilinom, selektirane kolonije su umnožene i točnost je provjerena sekvenciranjem s početnicom U6_Fw.

Nakon konstrukcije pojedinačnih pSgM entry modula za svaku poziciju i pripreme CasMINI sgRNA plazmida sa BpiI oligonukleotidom, kompletan sgRNA ekspresijski modul (promotor U6, okosnica sgRNA i restrikcijska mjesta BpiI za ugradnju sgRNA) izrezan je iz plazmida pSLQ9834_sgBB restrikcijskim enzimima XbaI i XhoI te ligiran u odgovarajući pSgM modul porezan istim enzimima korištenjem DNA ligaze T4 u omjeru 5:1. Točnost konstrukata potvrđena je sekvenciranjem s početnicom U6_Fw. Time su dobiveni pojedinačni sgRNA moduli za definirane pozicije unutar „multi-guide“ sustava. Konačno, više različitih sgRNA modula moglo se povezivati kloniranjem Golden Gate posredovanim enzimom Esp3I zahvaljujući unaprijed definiranim kompatibilnim ljepljivim krajevima. Sustav je omogućavao sastavljanje do šest različitih sgRNA modula unutar jednog konačnog konstrukta.

3.2.10. Izrada finalnih konstrukata za ciljanu manipulaciju gena od interesa sustavima dCas9-KRAB i Cas9

Za ciljanu manipulaciju gena od interesa u liniji EndoC-βH1 izabran je pristup lentivirusne transdukcije. Stabilne linije s konstruktima od interesa kreirane su u dva uzastopna koraka transdukcije. U prvom je krugu u staničnu liniju ugrađen lentivirusni konstrukt koji sadrži fuziju dCas9-KRAB i selekcijske markere. Plazmid je kreiran Golden Gate slaganjem posredovanim enzimom BsaI. Kao okosnica korišten je plazmid LentiBB_mut×7+tNS-Staffer-LacZ u koji su ugrađeni oligonukleotidni slijed Ig-dual (oligonukleotidni slijed Ig-dual koji služi kao zamjenski modul u konstrukcijama bez sgRNA) , promotor EFS, *Sp* dCas9, biljeg za

rezistenciju na blasticidin te fluorescentni marker Clover (omjer okosnica: inserti = 1:3). Uz BsaI, u reakcijskoj smjesi nalazili su se i pufer CutSmart (New England Biolabs), ligaza T4 te ATP do finalne konc. 1 mM, a uvjeti reakcije bili su sljedeći: 30 ciklusa 37 °C 5 min/ 16 °C 5 min; 37 °C 10 min; 60 °C 10 min te 4 °C do prekida reakcije.

Dizajnirane molekule sgRNA najprije su sparene i fosforilirane po ranije opisanom protokolu, a potom ugrađene u modularne jedinice pSgM1-3 ovisno o konačnom broju i poziciji pojedine sgRNA. Reakcijska smjesa sastojala se od željene sgRNA i plazmida pSgMx u omjeru 5:1, pufera Buffer G (Thermo Scientific), ligaze T4 te ATP-a i DTT-a do finalne konc. 1 mM. Reakcijski uvjeti bili su: 6 ciklusa 37 °C 5 min/ 23 °C 5 min; 4 °C do prekida reakcije. Istovremeno su složeni konstrukti temeljeni na lentivirusnoj okosnici po ranije opisanom protokolu: u plazmid LentiBB_mut×7+tNS-Staffer-LacZ ugrađeni su „multi-guide“ prihvatni modul pSgX (pSgX1 ako se ugrađuje jedna sgRNA, pSgX2 ako se ugrađuju dvije…), promotor EFS, biljeg rezistencije na puromicin te fluorescentni marker mRuby.

U finalnom je koraku kompletan sgRNA ekspresijski modul ugrađen u kreirani lentivirusni konstrukt upotrebom enzima Esp3I. Ukratko, lentivirusna okosnica i modul pSgM-sgRNA pomiješani su u omjeru 1:5 uz dodatak ligaze T4 i enzima Esp3I u puferu Tango uz ATP i DTT finalne konc. 1 mM uz ranije opisane reakcijske uvjete.

Konstrukti za ciljanu manipulaciju upotrebom Cas9 kreirani su po istom principu, uz razliku da su primarni lentivirusni konstrukti, koji sadrže Cas9 i selekcijski biljeg rezistencije na blasticidin te fluorescentni marker Clover, bili sastavljeni ili s promotorom EFS ili s promotorom RIP radi usporedbe efikasnosti pojedinih promotora. Molekule sgRNA, specifične za aktivni *Sp*Cas9, sastavljene su i ugrađene u finalne konstrukte po ranije navedenoj metodi. Točnost svih konačnih konstrukata provjerena je restrikcijskom analizom odabranim restrikcijskim enzimima.

3.2.11. Izrada finalnih konstrukata za ciljanu aktivaciju gena fuzijom CasMINI-VPR

Za ciljanu aktivaciju gena najprije su izrađeni konstrukti za prolaznu transfekciju radi provjere efikasnosti pojedine klonirane fuzijske domene. Molekule sgRNA najprije su ugrađene u modul pSgM_MINI kloniranjem Golden Gate posredovanim enzimom BpiI (Thermo

Scientific) prema ranije opisanom protokolu, a potom su prebačene u modul pSgX u reakciji posredovanoj enzimom Esp3I. Tako kreiran sgRNA modul ugrađen je u finalni konstrukt čija je okosnica plazmid pBB1, a istovremeno su ugrađeni i promotor EFS, CasMINI C-fuzijski modul spojen s VPR domenom ili VPR domena spojena s CasMINI N-fuzijskim modulom, selekcijski biljeg rezistencije na puromicin, fluorescentni marker mRuby te bGH terminator. Finalni konstrukt kreiran je Golden Gate pristupom posredovanim enzimom BsaI po ranije opisanom protokolu i reakcijskim uvjetima.

Konstrukti za lentivirusnu transdukciju rađeni su u dva koraka kao i drugi opisani lentivirusni konstrukti. Prvi je konstrukt sastavljen od plazmida LentiBB_mut×7+tNS-Staffer-LacZ u koji su ugrađeni oligonukleotidni slijed Ig-dual, promotor RIP, CasMINI C-modul + VPR/ VPR + CasMINI N-modul, biljeg rezistencije na blasticidin te fluorescentni marker Clover upotrebom BsaI. Drugi je konstrukcija plazmida s sgRNA modulom koji je rađen u dva koraka; u prvom koraku sgRNA slijed ugrađen je u pSgM_MINI modul upotrebom enzima BpiI. U drugom je koraku cijeli sgRNA modul ugrađen u već opisani plazmid koji sadrži pSgX i selekcijski biljeg rezistencije na puromicin te fluorescentni protein mRuby upotrebom Esp3I. Točnost svih konačnih konstrukata provjerena je restrikcijskom analizom odabranim restrikcijskim enzimima.

3.2.12. Izrada stabilnih linija i ciljana manipulacija gena od interesa

Svi eksperimenti temeljeni na stabilno ugrađenim modulima izrađeni su u dva koraka: u prvom je koraku stabilno ugrađen modul od interesa zajedno sa selekcijskim biljezima nakon čega je slijedila selekcija transduciranih stanica blasticidinom koja je trajala sve do uklanjanja netransducirane populacije stanica. Nastale poliklonske linije korištene su za sljedeći krug transdukcije kojom su u stanice ugrađene molekule sgRNA za gene od interesa. Drugi krug selekcije izveden je pomoću puromicina te je trajao dva dana nakon čega je stanicama omogućen oporavak. Za većinu analiza stanice su skupljane 5. dan od drugog kruga transdukcije (analiza ekspresije, ukupnog glikoma i GSISa), dok su u eksperimentima koji su uključivali sustav Cas9 uzorci sakupljani 3. i 10. dan kako bi se provjerila učinkovitost ciljanja i vijabilnost stanica nakon ciljanja potencijalno vitalnih gena.

Kreirani moduli CasMINI-VPR testirani su u staničnoj liniji HEK293T prolaznom transfekcijom metodom kalcijevog fosfata, istom kao i prilikom pakiranja lentivirusa. Transfecirane stanice selektirane su puromicinom tijekom dva dana te su stanice za daljnje analize sakupljene petog dana nakon transfekcije.

3.2.13. Analiza promjena GSISa

Stanice EndoC-βH1 stimulirane su glukozom petog dana od transdukcije sa sgRNA modulima. Stanice su podvrgnute gladovanju inkubacijom preko noći u standardnom mediju koji je sadržavao 2,8 mM glukoze. Sljedeći dan medij je uklonjen te su stanice inkubirane 60 minuta u HEPES-puferiranom Krebs-Ringer puferu (KRB) sastava: 116 mmol/L NaCl, 5,06 mmol/L KCl, 1,007 mmol/L $CaCl_2$, 1,01 mmol/L $MgCl_2$, 1,19 mmol/L KH_2PO_4, 23,96 mmol/L $NaHCO_3$, 10 mmol/L HEPES, pH 7,4, uz dodatak 0,2 % BSA i 0,5 mM glukoze.

Nakon inicijalne inkubacije stanice su tretirane tijekom 40 minuta puferom KRB koji je sadržavao 0,5 mM ili 20 mM glukoze. Po završetku tretmana sakupljen je supernatant za određivanje količine izlučenog inzulina metodom ELISA, dok su stanice prikupljene za određivanje točnog broja stanica te analize ekspresije. Koncentracija inzulina određena je kitom Human Insulin ELISA Kit (Mercodia AB, Uppsala, Švedska) prema uputama proizvođača.

3.2.14. Tretman stanica povišenim koncentracijama glukoze i palmitinskom kiselinom

Za indukciju metaboličkog stresa stanice EndoC-βH1 tretirane su povišenim koncentracijama glukoze i palmitinske kiseline. Kao osnovni medij korištena je mješavina originalnog medija i medija s dodatkom Ham f-12, s konačnom koncentracijom glukoze od 5,26 mM. Osnovna otopina glukoze (1 M) pripravljena je otapanjem glukoze u destiliranoj vodi uz naknadnu sterilizaciju filtracijom.

Palmitinska kiselina pripravljena je u kompleksu s BSA bez masnih kiselina u molarnom omjeru 5:1. Najprije je pripremljena 100 mM otopina palmitinske kiseline (Sigma-Aldrich) u 0,1 M NaOH inkubacijom pri 70 °C uz stalno miješanje. Otopina je potom postupno dodavana

u prethodno pripremljenu otopinu BSA *fatty acid free* (Capricorn) u mediju za tretman uz kontinuirano miješanje i inkubaciju pri 50 °C tijekom 1 h radi kompleksiranja. Nakon dodatka medija do konačnog volumena otopina je sterilizirana filtracijom i pohranjena na −20 °C do upotrebe. Kao kontrola tretmana pripravljena je identična otopina BSA bez dodatka palmitinske kiseline.

Stanice su tretirane u pločicama sa 6 jažica pri ukupnom volumenu od 1,5 ml medija po jažici. Eksperimentalni uvjeti uključivali su kontrolni medij, tretman s 20 mM glukoze, kontrolu s BSA, tretman s 1 mM palmitinske kiseline te kombinirani tretman palmitinskom kiselinom (1 mM) i glukozom (20 mM). Medij s tretmanom obnavljan je nakon 24 i 48 h, a stanice su sakupljene nakon 72 h za analizu ekspresije gena i promjena ukupnog glikoma.

3.2.15. Analiza promjena transkripcijske aktivnosti gena od interesa

U svrhu analize promjene ekspresije gena od interesa na razini mRNA nakon ciljanih manipulacija, izolirana je ukupna RNA iz sakupljenih staničnih taloga upotrebom kita RNeasy Mini Kit (Qiagen). Za uklanjanje zaostale DNA u izoliranim uzorcima korišten je TURBO DNA-free Kit (Thermo Scientific), dok je za reverznu transkripciju RNA u cDNA korištena reverzna transkriptaza PrimeScript Reverse Transcriptase (200 U/µl, TaKaRa) u smjesi s puferom 5X PrimeScript Buffer (TaKaRa), inhibitorom Recombinant RNase Inhibitor (40 U/µl, TaKaRa), miksom nukleotida dNTP mix (10 mM, Sigma - Aldrich) i početnicama Random hexamers (50 µM, Thermo Scientific). Transkripcijska aktivnost ciljanih gena, kao i odabranih nizvodnih gena, analizirana je metodom kvantitativnoga PCRa u stvarnom vremenu, upotrebom fluorescentne boje Power SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific) i početnica navedenih u Tablici 2. Ekspresija gena normalizirana je na gen *HMBS* i analizirana upotrebom metode ΔΔCt.

3.2.16. Analiza promjena ekspresije gena od interesa na proteinskom razini

Kako bi se potvrdilo da su promjene transkripcijske aktivnosti gena od interesa rezultirale i promjenama na razini proteina, provedena je analiza Western blot. Stanice su sakupljene ispiranjem u puferu PBS te je stanični talog liziran tijekom 30 minuta pri +4 °C u puferu RIPA

(150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,5 % natrijeva deoksikolata, 0,1 % SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) uz dodatak inhibitora proteaza cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Nakon lize stanica uzorci su sonificirani četiri puta po 8 sekundi te centrifugirani pri 12 000 rpm tijekom 20 minuta pri +4 °C radi uklanjanja staničnih ostataka. Koncentracija proteina određena je Pierce BCA Protein Assay Kitom (Thermo Scientific) prema uputama proizvođača.

Za razdvajanje proteina korišten je 10 %-tni SDS-poliakrilamidni gel sa 4 %-tnim sabirnim gelom. Za svaki uzorak na gel je nanošeno 30 µg ukupnih proteina. Prije nanošenja uzorci su pomiješani s puferom Roti-Load 2 (Carl Roth, Mannheim, Njemačka) i DTT-om te denaturirani 8 minuta pri 99 °C. Uzorci i PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) razdvojeni su elektroforezom u puferu za elektroforezu (25 mM Tris, 190 mM glicin, 0,1 % SDS) tijekom 120 minuta pri 100 V.

Proteini su potom preneseni na nitroceluloznu membranu Amersham Protran Premium 0,45 µm NC Nitrocellulose Blotting Membrane (Cytiva, Marlborough, Massachusetts, SAD) metodom mokrog prijenosa u transfernom puferu (25 mM Tris, 190 mM glicin, 20 % metanol) tijekom 90 minuta pri 100 V i +4 °C. Uspješnost prijenosa provjerena je bojanjem membrana otopinom Ponceau S (Sigma-Aldrich). Membrane su zatim blokirane tijekom jednog sata u 5 %-tnom mlijeku pripravljenom u puferu TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween-20).

Nakon kratkog ispiranja u puferu TBST-u membrane su inkubirane preko noći pri +4 °C s primarnim antitijelima. Za detekciju HNF-1α korišteno je antitijelo anti-HNF1A (ab272693, Abcam, Cambridge, UK) u razrjeđenju 1:10 000, za HNF-4α anti-HNF4A (sc-374229, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, SAD) u razrjeđenju 1:500, za histon H3 anti-Histone H3 (ab1791, Abcam) u razrjeđenju 1:5000 te za β-aktin anti-β-actin (sc-69879, Santa Cruz Biotechnology) u razrjeđenju 1:1000. Antitijela za HNF-1α, HNF-4α i histon H3 razrijeđena su u 5 %-tnom mlijeku, dok je antiitjelo za β-aktin razrijeđeno u 0,5 %-tnom mlijeku.

Sljedeći dan membrane su isprane tri puta po 10 minuta u puferu TBST te inkubirane jedan sat sa sekundarnim antitijelima. Za HNF-1α i histon H3 korišteno je antitijelo Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab6721, Abcam) u razrjeđenju 1:50 000. Za HNF-4α korišteno je antitijelo Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (ab205719, Abcam) u razrjeđenju 1:2000, dok je za β-aktin isto antitijelo korišteno u razrjeđenju 1:400 000.

Nakon završnih ispiranja u TBST puferu proteini su vizualizirani primjenom kemiluminiscentnog supstrata Clarity Max Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD), a signal je zabilježen uređajem UVIBLUE Uvitec Cambridge.

3.2.17. Analiza ukupnog N-glikoma

Stanični talozi resuspendirani su u 50 µl 1 × PBS-a (pH 7,4), nakon čega je dodan RapiGest™ (Waters, Milford, Massachusetts, SAD) do finalne koncentracije od 0,2 %, iz 2,2 %-tne izvorne otopine pripravljene u istom puferu. Proteini su reducirani dodatkom 5 µl 60 mM DTT-a, uz sonikaciju uzoraka tijekom 5 minuta u ultrazvučnoj kupelji, nakon čega su uzorci inkubirani 30 minuta pri 60 °C. Nakon hlađenja, proteini su alkilirani dodatkom 4 µl 160 mM jodoacetamida (IAA) tijekom 30 minuta u mraku, a višak IAA neutraliziran je dodatkom 1 µl 60 mM DTT-a. *N*-glikani su oslobođeni dodatkom 5 µl enzimske smjese koja je sadržavala 1 U PNGaze F (Promega), razrijeđene u 1 × PBS-u uz inkubaciju preko noći pri 37 °C.

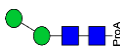
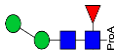
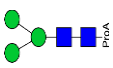
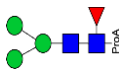
Oslobođeni *N*-glikani obilježeni su prokainamidom (ProA) i 2-pikolin boranom (2-PB), pri čemu su oba reagensa zasebno otopljena u smjesi DMSO-a i ledene octene kiseline u omjeru 7:3 (v/v; Sigma-Aldrich). U svaki uzorak *N*-glikana dodan je ProA u količini od 4,32 mg u 25 µl, uzorci su miješani tresenjem tijekom 10 minuta i inkubirani 1,5 h pri 65 °C. Zatim je dodan 2-PB u količini od 4,48 mg u 25 µl, nakon čega su uzorci inkubirani dodatnih 1 h pri 65 °C. Višak obilježivača i redukcijskog sredstva uklonjen je metodom pročišćavanja na čvrstoj fazi (eng. *solid-phase extraction*, SPE), pri čemu je kao stacionarna faza korištena 0,2 µm wwPTFE filtarska pločica (Pall Corporation, Port Washington, New York, SAD). Jažice su isprane 70 %-tnim etanolom i vodom, a zatim ekvilibrirane 96 %-tnim acetonitrilom (ACN), pri čemu je otapalo između pojedinih koraka uklanjano vakuumom. Uzorci su razrijeđeni acetonitrilom (ACN) i isprani pet puta s 200 µl 96 %-tnog ACN. *N*-glikani su eluirani s dva alikvota od 90 µl vode.

Fluorescentno obilježeni *N*-glikani analizirani su metodom HILIC-UHPLC na uređaju Waters Acquity UPLC opremljenom kvaternarnim upravljačem otapalima, upravljačem uzorcima i fluorescentnim detektorom, pri čemu su valne duljine ekscitacije i emisije iznosile 310/370 nm. Sustavom se upravljalo pomoću programa Empower (Waters). Kromatografsko razdvajanje provedeno je na koloni Waters BEH Glycan (150 × 2,1 mm, veličina čestica 1,7 µm), uz 100

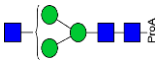
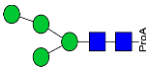
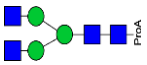
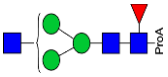
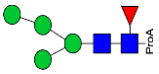
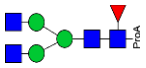
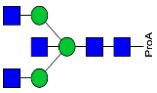
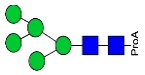
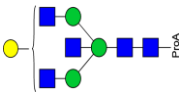
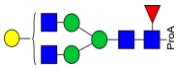
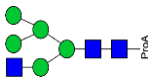
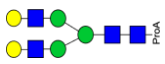
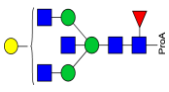
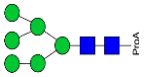
mM amonijev formijat (pH 4,4) kao otapalo A i ACN kao otapalo B. Primijenjen je linearni gradijent od 70 % do 50 % (v/v) ACN-a tijekom 40 minuta, uz ukupno trajanje od 47 minuta i protok od 0,56 ml/min. Kromatogrami su obrađeni i integrirani ručno, a rezultati su izraženi kao postotak ukupne normalizirane površine pikova (% površine).

Kako bi se omogućila strukturna potvrda kromatografski razdvojenih N-glikanskih pikova, UHPLC sustav bio je spojen s kvadrupolnim *time-of-flight* masenim spektrometrom Bruker Compact QTOF (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka), koji je radio u pozitivnom ionizacijskom modu. Izvor za elektrosprej ionizaciju (ESI) radio je pri kapilarnom naponu od 2,25 kV, tlaku nebulizacijskog plina od 5,5 bara, protoku suhog plina od 4 l/min i temperaturi suhog plina od 300 °C. MS podaci prikupljani su u rasponu m/z od 50 do 2750, uz frekvenciju snimanja od 0,5 Hz, a za CID fragmentaciju odabirana su tri najintenzivnija prekursorska iona. Podaci su prikupljeni pomoću programa DataAnalysis (Bruker Daltonics). Značajke detektirane u MS spektrima uspoređene su s mogućim sastavima prokainamidom obilježenih *N*-glikana pomoću alata GlycoMod (ExPASy), na temelju jednostruko nabijenih m/z vrijednosti. Snimljeni MS/MS spektri analizirani su pomoću programa GlycoWorkbench radi potvrde predviđenih fragmentacijskih obrazaca i validacije anotiranih glikanskih struktura, čime je omogućena strukturna dodjela pojedinih kromatografskih pikova. Predložene glikanske strukture dodijeljene su na temelju kombinacije točne mase i karakterističnih fragmentacijskih obrazaca te su sažete u Tablici 4.

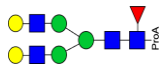
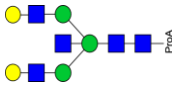
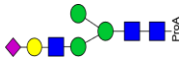
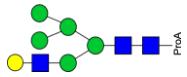
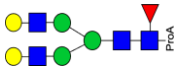
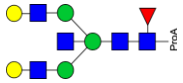
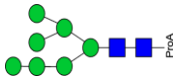
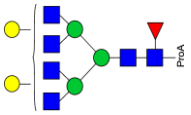
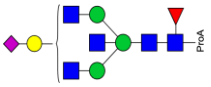
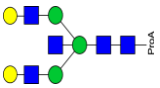
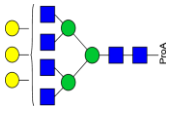
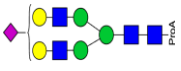
Tablica 4. Anotacija kromatografskih pikova ukupnog *N*-glikoma stanica EndoC-βH1 analiziranih metodom HILIC-UHPLC-MS/MS.

Glikanski pik (GP)	Teorijska masa $[M+H]^+$	Sastav glikana	Predložena glikanska struktura
1	968.464	N2H2	
2	1114.522	N2H2F1	
3	1130.517	N2H3	
4	1276.575	N2H3F1	

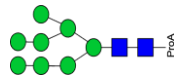
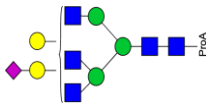
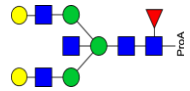
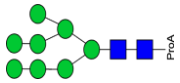
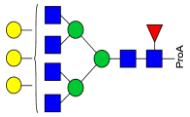
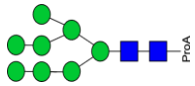
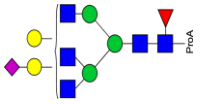
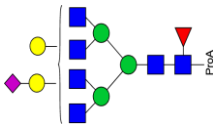
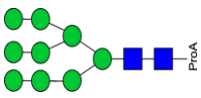
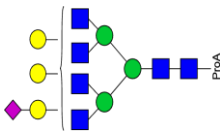
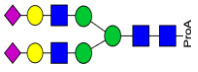
Tablica 4. Nastavak tablice s prethodne stranice

Glikanski pik (GP)	Teorijska masa $[M+H]^+$	Sastav glikana	Predložena glikanska struktura
5	1333.596	N3H3	
6	1292.57	N2H4	
7	1536.676 major	N4H3	
	1479.654	N3H3F1	
8	1438.627	N2H4F1	
9	1682.733 major	N4H3F1	
	1739.755	N5H3	
10	1454.62237	N2H5	
11	1901.808 major	N5H4	
	1844.786	N4H4F1	
12	1657.702	N3H5	
13	1860.781 major	N4H5	
	2047.866	N5H4F1	
14	1616.675	N2H6	

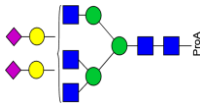
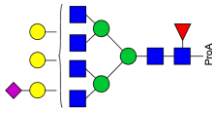
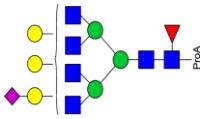
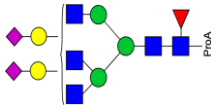
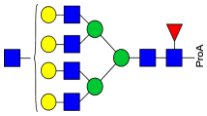
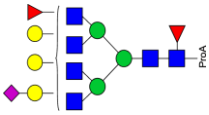
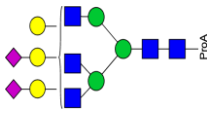
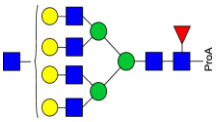
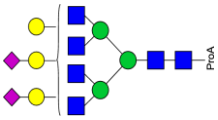
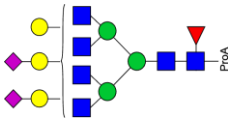
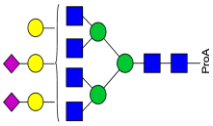
Tablica 4. Nastavak tablice s prethodne stranice

Glikanski pik (GP)	Teorijska masa $[M+H]^+$	Sastav glikana	Predložena glikanska struktura
15	2006.83907 major	N4H5F1	
	2063.861	N5H5	
16	1932.802	N3H4S1F1	
	1819.755	N3H6	
	2006.83907	N4H5F1	
17	2209.919	N5H5F1	
18	1778.728	N2H7	
19	2168.892	N4H6F1	-
	2412.998	N6H5F1	
20	2338.961	N5H4S1F1	
21	2063.861	N5H5	
	2428.993	N6H6	
	2250.945	N4H5S1	

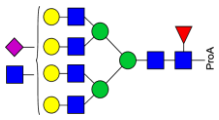
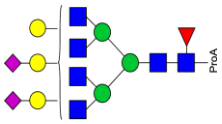
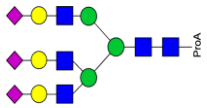
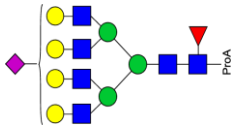
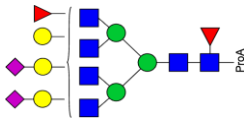
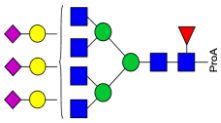
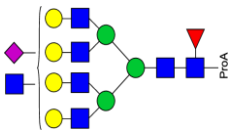
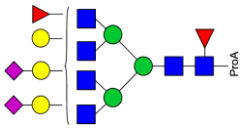
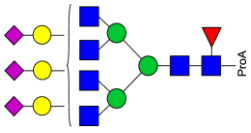
Tablica 4. Nastavak tablice s prethodne stranice

Glikanski pik (GP)	Teorijska masa $[M+H]^+$	Sastav glikana	Predložena glikanska struktura
22	1940.781	N2H8	
	2354.956	N5H5S1	
23	2209.919	N5H5F1	
	1940.781	N2H8	
	2574.043	N6H6F1	
24	1940.781	N2H8	
25	2501.01387	N5H5S1F1	
26	2704.093	N6H5S1F1	
27	2102.834	N2H9	
28	2720.088	N6H6S1	
	2442.972	N4H5S2	

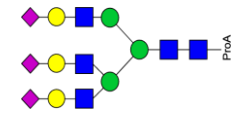
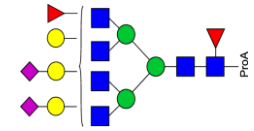
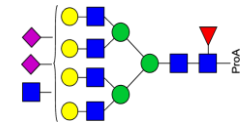
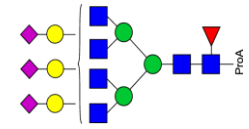
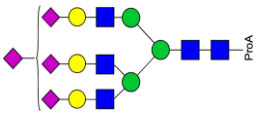
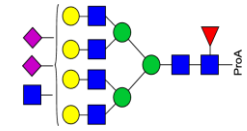
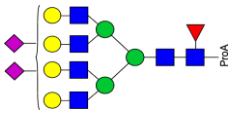
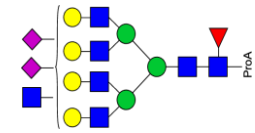
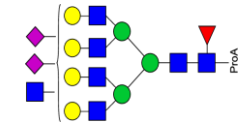
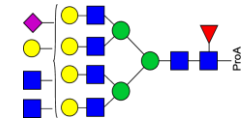
Tablica 4. Nastavak tablice s prethodne stranice

Glikanski pik (GP)	Teorijska masa $[M+H]^+$	Sastav glikana	Predložena glikanska struktura
29	2646.051	N5H5S2	
	2866.146	N6H6S1F1	
30	2866.146	N6H6S1F1	
31	2792.109	N5H5S2F1	
	2940.183	N7H7F1	
	3012.204	N6H6S1F2	
32	2808.104 major	N5H6S2	
	2940.183	N7H7F1	
	3011.184	N6H6S2	
33	3157.241 major	N6H6S2F1	
	3011.184	N6H6S2	

Tablica 4. Nastavak tablice s prethodne stranice

Glikanski pik (GP)	Teorijska masa $[M+H]^+$	Sastav glikana	Predložena glikanska struktura
34	3231.278	N7H7S1F1	
35	3156.234	N6H6S2F1	
36	3099.199	N5H6S3	
37	3028.199	N6H7S1F1	
	3303.299	N6H6S2F2	
	3448.337	N6H6S3F1	
38	3231.278 major	N7H7S1F1	
	3303.299	N6H6S2F2	
	3448.337	N6H6S3F1	

Tablica 4. Nastavak tablice s prethodne stranice

Glikanski pik (GP)	Teorijska masa $[M+H]^+$	Sastav glikana	Predložena glikanska struktura
39	3099.199 major	N5H6S3	
	3303.299	N6H6S2F2	
	3522.374	N7H7S2F1	
40	3448.337 major	N6H6S3F1	
	3390.295	N5H6S4	
41	3522.374 major	N7H7S2F1	
	3319.294	N6H7S2F1	
42	3522.374	N7H7S2F1	
43	3522.374 major	N7H7S2F1	
	3596.411	N8H8S1F1	

3.2.18. Statistička analiza i obrada podataka

Statistička analiza provedena je u programu GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, California, SAD). Za analizu relativnih promjena ekspresije gena nakon ciljanih manipulacija te za usporedbu promjena relativnih udjela pojedinih glikanskih struktura korišten je Welchov t-test. Za analizu *N*-glikoma korišteni su relativni udjeli pojedinih glikanskih struktura izraženi kao postotak ukupnog glikoma. Derivirana glikanska svojstva računata su prema podacima iz Tablice 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška srednje vrijednosti (eng. *standard error of the mean,* SEM), a razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

Tablica 5. Lista glikanskih pikova koji su zbrajani za izračun pojedinih deriviranih svojstava

Derivirano svojstvo	*Ubrojeni glikanski pikovi*
Sržna fukozilacija	2+4+8+9+15+17+19+20+25+26+30+31+33+34+35+37+38+40+41+42+43
Račvajući GlcNAc	11+17+20
Sijalinska kiselina	20+25+26+28+29+30+32+33+34+35+36+37+38+39+40+41+42+43
Galaktoza	11+13+15+16+17+19+21+22+23+25+26+28+29+30+31+32+33+34+35+36+37+38+39+40+41+42+43
Strukture s tri grane	25+32+36+39
Strukture s četiri grane	26+30+33+34+35+37+38+40+41+42+43

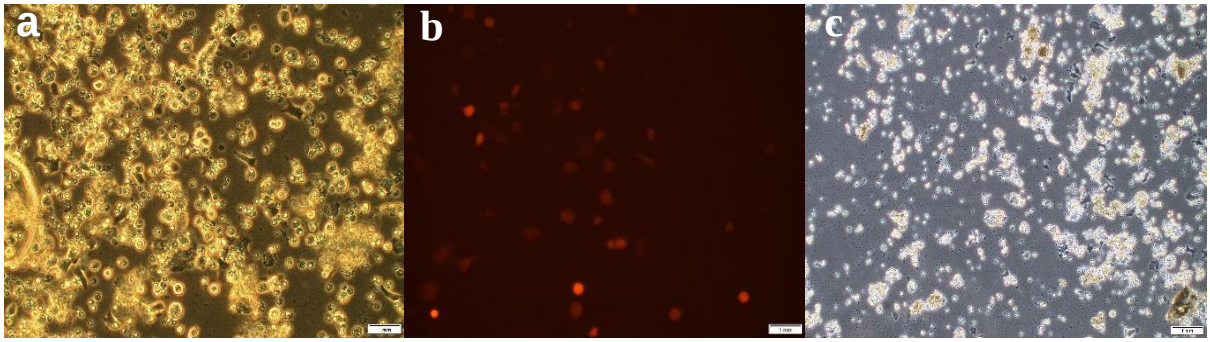
Rezultati analize Western blot obrađeni su u programu ImageJ (ImageJ, verzija 1.53k, National Institutes of Health, Maryland, SAD) mjerenjem integrirane optičke gustoće pojedinih vrpci nakon automatskog uklanjanja pozadinskog signala. Dobivene vrijednosti normalizirane su na odgovarajuću kontrolu opterećenja (β-aktin ili histon H3), a potom na kontrolni uzorak (non-target), čime je određena semikvantitativna promjena ekspresije proteina HNF-1α i HNF-4α.

4. Rezultati

4.1. Optimizacija uvjeta rada na staničnoj liniji EndoC-βH1

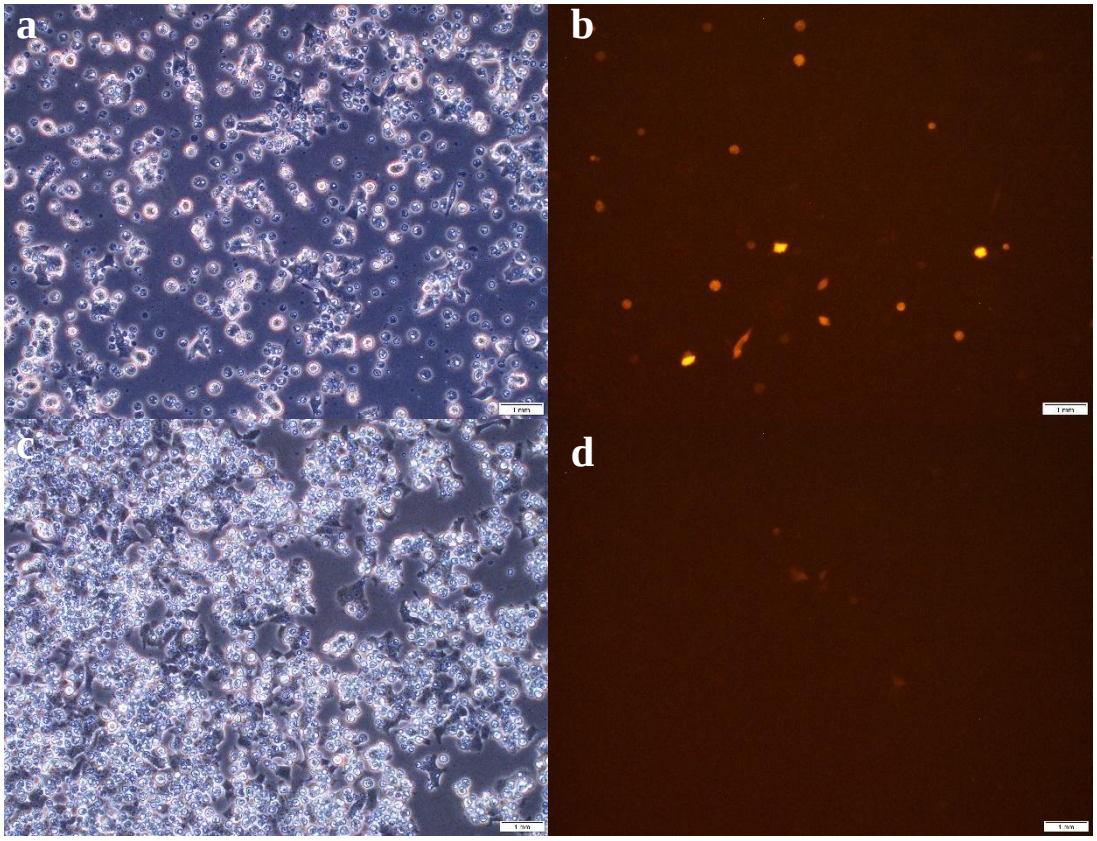
Za potrebe ciljanih manipulacija gena od interesa bilo je potrebno optimizirati metodu unosa fuzijskih konstrukata u same stanice. Za optimizaciju je korišten prethodno dostupan vektor koji je veličinom i sadržanim selekcijskim markerima odgovarao konstruktima planiranima za ciljane manipulacije gena. Sve testirane metode transfekcije, kao i elektroporacija, rezultirale su vrlo velikom smrtnosti stanica i/ili vrlo malom efikasnosti transfekcije.

Unos probnog vektora u stanice EndoC-βH1 elektroporacijom rezultirao je velikom smrtnosti stanica već nakon 24 sata. Oko 20% stanica kod kojih je opažena crvena fluorescencija morfološki su znatno odudarale od morfologije izvornih stanica te nije bilo moguće odrediti koliko su vijabilne (Slika 8a i b). Vijabilnost stanica 7. dana od elektroporacije dodatno je pala (Slika 8c), a od malobrojnih preživjelih stanica niti jedna nije eksprimirala crveni fluorescentni marker.



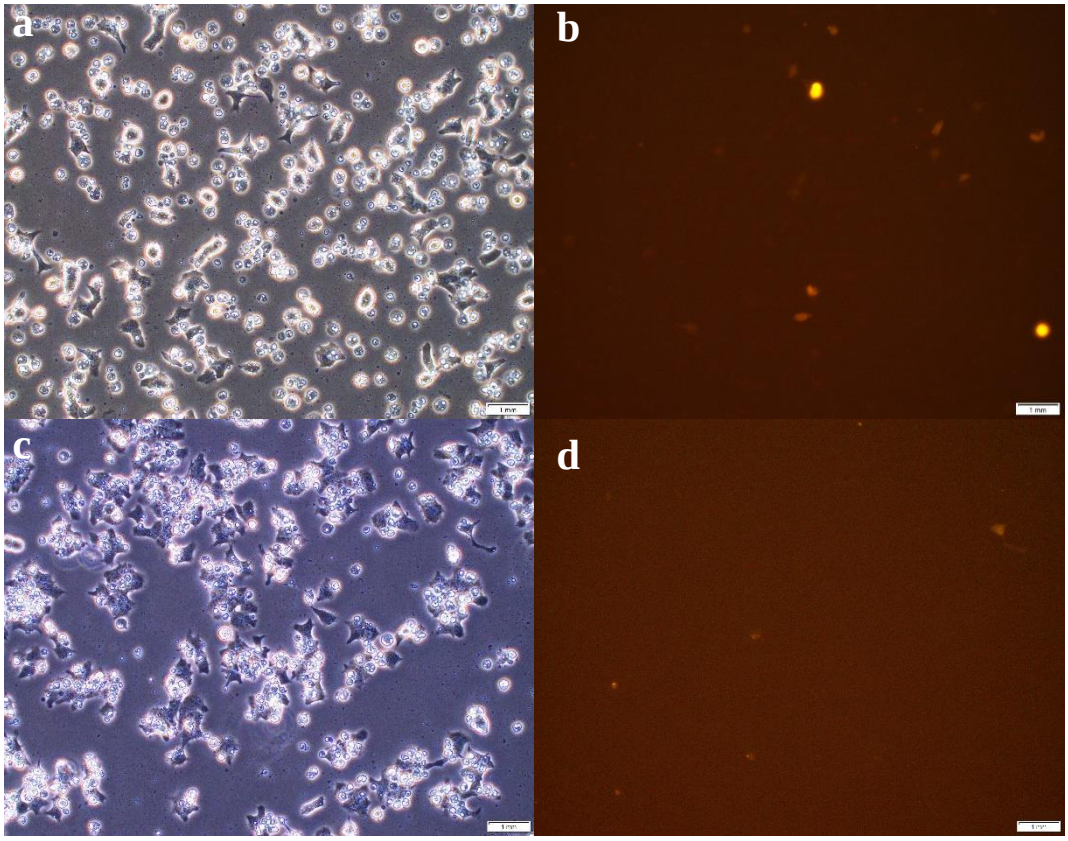
Slika 8. Morfologija i fluorescencija stanica EndoC-βH1 24 sata (a, b) i 7 dana (c) nakon elektroporacije. Paneli a i c prikazuju stanice u svijetlom polju, a panel b prikazuje fluorescenciju. Stanice su slikane na invertnom mikroskopu Olympus IX73 na povećanju 200×.

Transfekcija stanica EndoC-βH1 fektinom bila je podjednako efikasna kao elektroporacija, ali je nakon 24h rezultirala manjom smrtnosti stanica u odnosu na elektroporaciju (Slika 9a, b) Većina stanica koje su fluorescirale ni u ovom slučaju nisu imale očuvanu morfologiju izvorne stanične linije. Nakon 7 dana bilo je mnogo više vijabilnih stanica, iako je i dalje bio vidljiv velik broj apoptotičnih stanica (Slika 9c). Samo je mali postotak stanica (~3%) fluorescirao crveno (Slika 9d).



Slika 9. Morfologija i fluorescencija stanica EndoC-βH1 24 sata (a, b) i 7 dana (c, d) nakon transfekcije fektinom. Paneli a i c prikazuju stanice u svijetlom polju, a paneli b i d prikazuju fluorescenciju. Stanice su slikane na invertnom mikroskopu Olympus IX73 na povećanju 200×.

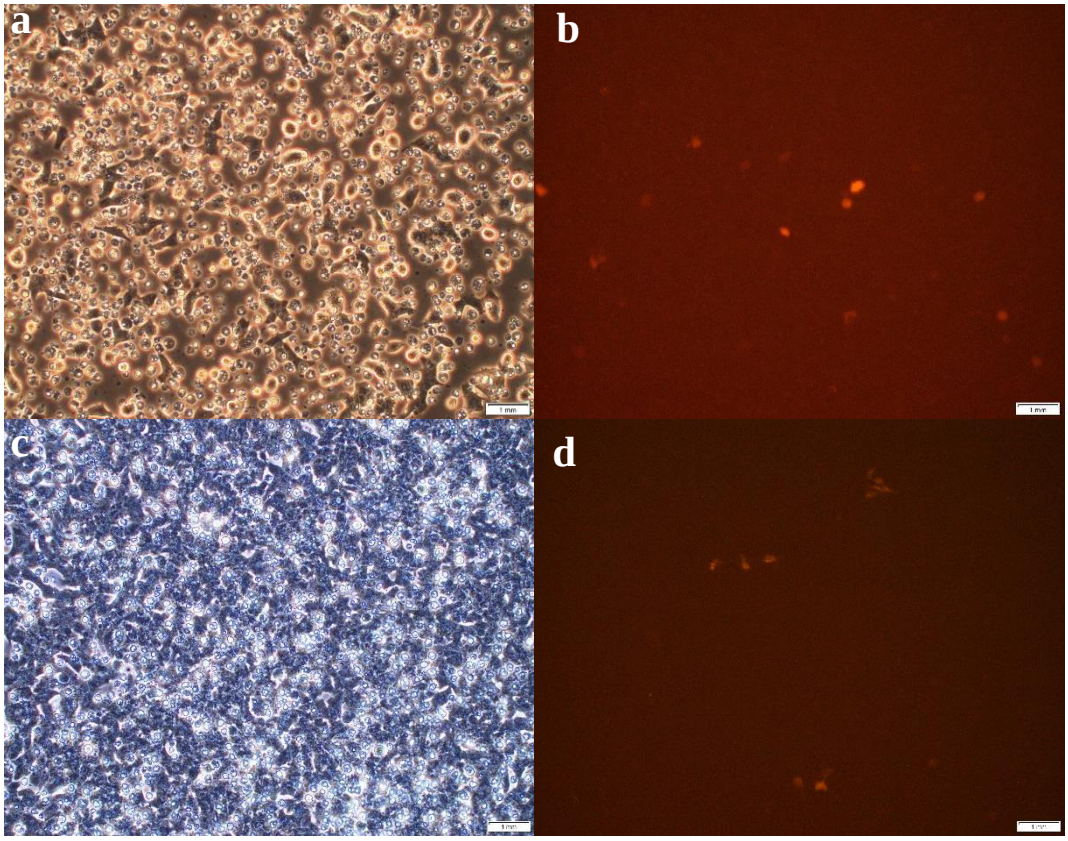
Transfekcija reagensom Lipofectamine 3000 bila je podjednako smrtonosna za stanice EndoC-βH1 nakon 24 sata kao i transfekcija fektinom, a postotak stanica koje su fluorescirale bio je nešto manji (5-6%; Slika 10a,b). Nakon 7 dana, morfologija stanica više je nalikovala izvornoj te je uočen manji broj apoptotičnih stanica nego nakon transfekcije fektinom. Unatoč donekle očuvanoj morfologiji i vijabilnosti stanica, broj stanica koje su fluorescirale bio je svega 1-2% (Slika 10c, d).



Slika 10. Morfologija i fluorescencija stanica EndoC-βH1 24 sata (a, b) i 7 dana (c, d) nakon transfekcije reagensom Lipofectamine 3000. Paneli a i c prikazuju stanice u svijetlom polju, a paneli b i d prikazuju fluorescenciju. Stanice su slikane na invertnom mikroskopu Olympus IX73 na povećanju 200×.

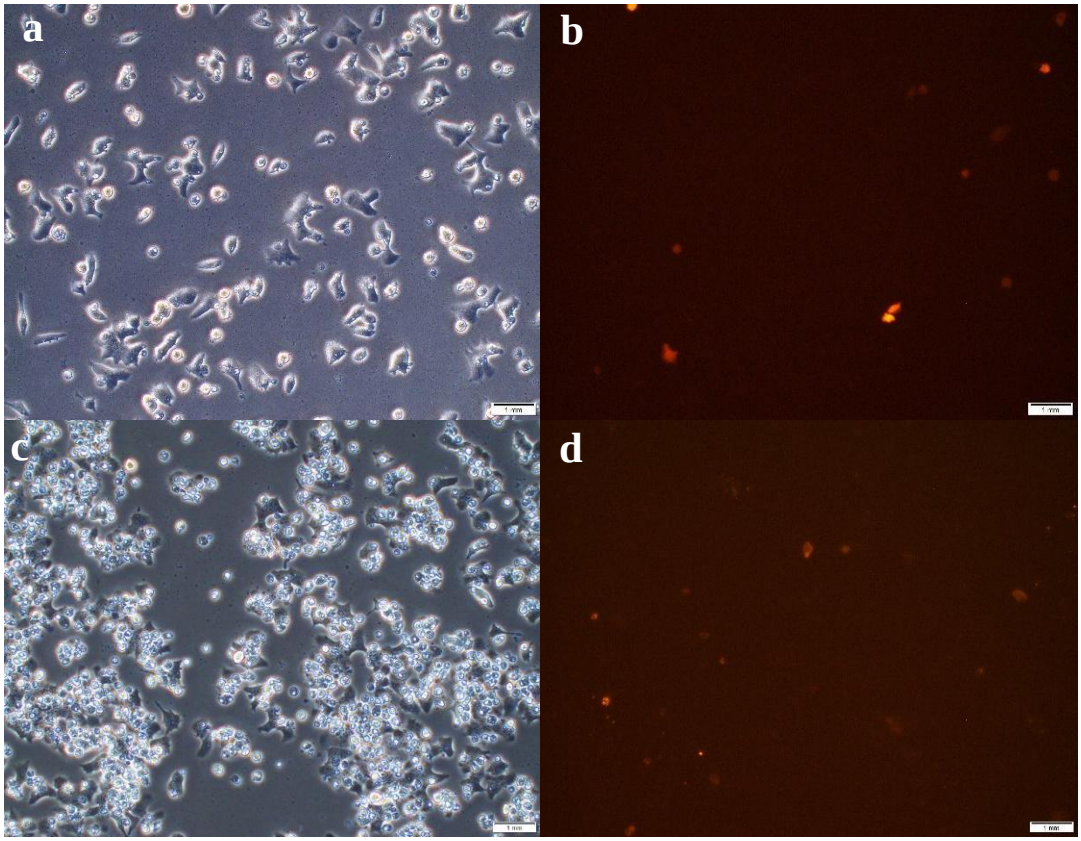
Transfekcija reagensom PEI MAX manje je utjecala na morfologiju stanica EndoC-βH1 naspram drugih reagensa, ali efikasnost transfekcije ni u ovom slučaju nije prelazila 10% (Slika 11a,b). Sedam dana nakon transfekcije stanice su se morfološki oporavile, no postotak živih stanica koje fluoresciraju bio je svega 2% (Slika 11c,d).

Transfekcija stanica EndoC-βH1 reagensom FuGENE HD dala je najbolje rezultate. Vijabilnost stanica 24 sata nakon transfekcije bila je preko 50% (Slika 12a), a efikasnost transfekcije procijenjena prema broju fluorescentnih stanica iznosila je 10% (Slika 12b). Sedam dana nakon transfekcije, morfologija stanica bila je uglavnom očuvana, iako nešto manje nego nakon transfekcije PEI MAX-om, ali je broj fluorescentnih stanica i dalje iznosio 10% (Slika 12c, d).



Slika 11. Morfologija i fluorescencija stanica EndoC-βH1 24 sata (a, b) i 7 dana (c, d) nakon transfekcije reagensom PEI MAX. Paneli a i c prikazuju stanice u svijetlom polju, a paneli b i d prikazuju fluorescenciju. Stanice su slikane na invertnom mikroskopu Olympus IX73 na povećanju 200×.

Kako su PEI MAX i FuGENE HD rezultirali najuspješnijim transfekcijama, pokušao sam dodatno optimizirati protokole transfekcije ne bi li se povećala efikasnost transfekcije i postotak preživljelih stanica. Testirani su različiti omjeri DNA i transfekcijskog reagensa te ukupna količina plazmida po uzorku, no pokazalo se da su početni omjeri i količine od 2 µg plazmida po replici rezultirali najvećom efikasnošću transfekcije. Nakon transfekcija provedena je selekcija puromicinom koja je optimizirana na 48 sati u finalnoj koncentraciji antibiotika od 4 µg/ml. Zaključno, FuGENE HD pokazao se kao najučinkovitiji transfekcijski reagens za stanice EndoC-βH1, no nakon selekcije i oporavka dobiveno je svega 3% inicijalnog broja stanica što je bilo nedovoljno za većinu planiranih nizvodnih analiza.



Slika 12. Morfologija i fluorescencija stanica EndoC-βH1 24 sata (a, b) i 7 dana (c, d) nakon transfekcije reagensom FuGENE HD. Paneli a i c prikazuju stanice u svijetlom polju, a paneli b i d fluorescenciju. Stanice su slikane na invertnom mikroskopu Olympus IX73 na povećanju 200×.

Kako se transfekcija pokazala kao neučinkovita metoda, optimiziran je protokol pakiranja lentivirusa i lentivirusne transdukcije za unos plazmidnih vektora u stanice EndoC-βH1. Veličina lentivirusne kazete koja bi sadržavala fuzijsku domenu, selekcijske markere i molekule sgRNA prelazila bi 10 kilobaza što se u literaturi smatra granicom efikasnog pakiranja pa je iz tog razloga optimizacija transdukcija napravljena za dvije veličine vektora. Prva skupina bili su mali vektori, veličine 6 kilobaza od 5' LTR do 3' LTR kraja (veličina konstrukta koji sadrži jednu do tri sgRNA i selekcijske markere), a druga skupina vektora su bili vektori veličine preko 9 kilobaza (veličina plazmida koji sadrži selekcijske markere i Cas9/dCas fuzijske konstrukte). Efikasnost transdukcije stanične linije EndoC-βH1 za manje je vektore nakon optimizacije iznosila 60-70% što je uz selekciju puromicinom dovoljna količina stanica. Efikasnost transdukcije za velike vektore nakon optimizacije iznosila je svega nekoliko posto, no budući da su vektori bili stabilno ugrađeni, to je omogućilo postepenu selekciju i umnažanje modificiranih staničnih linija.

4.2. Nadogradnja modularnog sustava CRISPR novim modulima

4.2.1. Konstrukcija modula s promotorom specifičnim za beta stanice gušterače

Promotor EFS, koji je dio postojećeg modularnog sustava, konstitutivno je aktivan, ali je slab promotor. Kako bi se izbjeglo moguće utišavanje stabilno ugrađenih vektora, a pritom osigurala jaka ekspresija istih, kloniran je i promotor RIP2 specifičan za beta stanice. Promotor RIP2 je kloniran iz genomske DNA same modelne linije EndoC-βH1 u koju je ugrađen prilikom imortalizacije izvornih beta stanica. Modul je kreiran u dva koraka. U prvom je koraku umnožen cijeli promotor s početnicama kojima su na krajeve promotora dodani sljedovi prepoznavanja za restrikcijske enzime AatII, XmaI i BsaI. Rezanjem PCR produkta enzimima AatII i XmaI omogućena je ugradnja promotora u plazmid pUK21gg koji služi kao okosnica za module modularnog sustava. U tako izrađenom modulu i dalje se nalaze dva mjesta cijepanja za enzim BsaI kojim nastaju ljepljivi krajevi koji odgovaraju pozicijama A-I u modularnom sustavu [196]. Time je dobiven pUK21gg-RIP2 modul kompatibilan s BsaI-posredovanim Golden Gate sastavljanjem finalnih konstrukata.

4.2.2. Konstrukcija modula aktivne nukleaze Cas9

Cijeli modularni sustav za izradu vektora korišten u ovoj disertaciji temeljen je na inaktivnoj nukleazi dCas koja se veže s aktivnim domenama od interesa. Kako bi se sustav proširio i omogućio potpunu inaktivaciju gena od interesa, izrađen je i modul s aktivnom nukleazom *Sp*Cas9. Modul je kreiran istim pristupom u dva koraka kao i modul promotora RIP2. U prvom koraku umnožen je slijed nukleaze Cas9 iz plazmidne DNA početnicama kojima su na krajeve nukleaze dodani sljedovi prepoznavanja za restrikcijske enzime AatII, XmaI i BsaI. Rezanjem PCR produkta enzimima AatII i XmaI omogućena je ugradnja Cas9 u plazmid pUK21gg koji služi kao okosnica za module modularnog sustava. U tako izrađenom modulu i dalje se nalaze dva mjesta cijepanja za enzim BsaI kojim nastaju ljepljivi krajevi koji odgovaraju pozicijama I-III u modularnom sustavu [196]. Dobiveni modul *Sp*Cas9 omogućio je uključivanje aktivne nukleaze Cas9 u postojeći modularni sustav i izradu konstrukata za ciljanu inaktivaciju gena.

4.2.3. Konstrukcija modula dCasMINI za N- i C-terminalne fuzije

Kako bi se sustav CRISPR/dCasMINI mogao koristiti za ciljanu regulaciju ekspresije gena, bilo je potrebno omogućiti povezivanje proteina dCasMINI s efektorskim domenama. Budući da položaj efektorske domene u odnosu na dCas protein može utjecati na učinkovitost sustava, izrađeni su moduli koji omogućuju konstrukciju i N-terminalnih i C-terminalnih fuzija.

Moduli su izrađeni u plazmidu pUK21gg, koji se koristi kao okosnica za pojedinačne module modularnog sustava. Najprije su konstruirani pUK21gg moduli koji sadrže jezgreni lokalizacijski signal, slijed koji kodira fleksibilni linker te restrikcijska mjesta potrebna za daljnje Golden Gate sastavljanje. Time su dobiveni pUK21gg-N-*stuffer* i pUK21gg-C-*stuffer* moduli, namijenjeni ugradnji dCasMINI slijeda u odgovarajućoj orijentaciji za N- odnosno C-terminalne fuzije. Ispravnost dobivenih *stuffer* modula potvrđena je Sangerovim sekvenciranjem.

U sljedećem koraku u izrađene pUK21gg *stuffer* module ugrađen je slijed dCasMINI. Time su dobiveni finalni pUK21gg moduli za N- i C-terminalne fuzije proteina dCasMINI. Konačni konstrukti potvrđeni su Sangerovim sekvenciranjem, čime je potvrđena ispravnost ugrađenog dCasMINI slijeda. Dobiveni moduli omogućuju daljnje sastavljanje konstrukata CRISPR/dCasMINI u kojima se efektorske domene mogu povezati s N- ili C-krajem dCasMINI proteina.

4.2.4. Konstrukcija multi-guide sustava za CasMINI

Kako bi se omogućilo istovremeno ciljanje više regija istog gena ili više gena sustavom dCasMINI, izrađen je multi-guide sustav prilagođen CasMINI sgRNA okosnici. Sustav je konstruiran prema principu postojećeg modularnog *multi-guide* sustava, u kojem pojedinačni sgRNA moduli nose unaprijed definirane ljepljive krajeve koji određuju njihov redoslijed tijekom konačnog Golden Gate sastavljanja.

Najprije su izrađeni pojedinačni pozicijski moduli za ugradnju CasMINI sgRNA ekspresijskih kazeta. U plazmid pUS21gg ugrađeni su stuffer fragmenti koji određuju poziciju pojedinog sgRNA modula u konačnom konstruktu. Time su dobiveni stuffer moduli pSgM1-MINI-stuffer s krajevima B–A, pSgM2-MINI-stuffer s krajevima A–I, pSgM3-MINI-stuffer s krajevima I–

II, pSgM4-MINI-stuffer s krajevima II–III, pSgM5-MINI-stuffer s krajevima III–IV i pSgM6-MINI-stuffer s krajevima IV–Z. Ispravnost svih pozicijskih modula potvrđena je Sangerovim sekvenciranjem.

Paralelno je modificiran plazmid koji sadrži CasMINI sgRNA okosnicu, kako bi se omogućilo jednostavno umetanje pojedinačnih sgRNA sljedova. Ugradnjom *stuffer* fragmenta s restrikcijskim mjestima za BpiI dobiven je modificirani plazmid pSLQ9834_sgBB_CasMINI-guide-stuffer, kompatibilan s Golden Gate ugradnjom pojedinačnih sgRNA sljedova. Time je omogućena priprema CasMINI sgRNA ekspresijske kazete koja se sastoji od U6 promotora, mjesta za umetanje sgRNA slijeda i CasMINI sgRNA okosnice.

Nakon toga je kompletna CasMINI sgRNA ekspresijska kazeta prenesena iz plazmida pSLQ9834_sgBB_CasMINI-guide-stuffer u pojedinačne pSgM-MINI-stuffer pozicijske module. Budući da su pozicijski moduli nosili jedinstvene ljepljive krajeve definirane prema modularnom sustavu, svaki dobiveni pSgM-MINI-sgRNA modul mogao se ugraditi na točno određenu poziciju u konačnom konstruktu. Ispravnost ugrađene U6–sgRNA ekspresijske regije potvrđena je Sangerovim sekvenciranjem početnicom U6_Fw.

Dobiveni multi-guide sustav omogućuje modularno sastavljanje do šest različitih CasMINI sgRNA modula unutar jednog konačnog konstrukta. Time je proširen skup dostupnih CRISPR/dCasMINI molekularnih alata te je omogućeno istovremeno usmjeravanje CasMINI sustava na više ciljnih mjesta.

4.2.5. Konstrukcija finalnih vektora za ciljanu aktivaciju gena sustavom dCasMINI-VPR

Nakon konstrukcije osnovnih dCasMINI modula za N- i C-terminalne fuzije, izrađeni su finalni vektori u kojima je dCasMINI povezan s transkripcijskom aktivacijskom domenom VPR. Cilj ove konstrukcije bio je dobiti alate za ciljanu aktivaciju ekspresije gena te istovremeno omogućiti usporedbu učinkovitosti N- i C-terminalnog položaja VPR domene u odnosu na dCasMINI protein.

Kako bi se provjerila učinkovitost pojedine dCasMINI-VPR fuzije, najprije su izrađeni vektori namijenjeni prolaznoj transfekciji u staničnoj liniji HEK293T. U tu svrhu pojedinačni sljedovi sgRNA ugrađeni su u CasMINI sgRNA module, a zatim preneseni u pSgX module

kompatibilne s finalnim Golden Gate sastavljanjem. Tako pripremljeni sgRNA modul ugrađen je u finalni pBB1 konstrukt zajedno s EFS promotorom, selekcijskim markerom rezistencije na puromicin, fluorescentnim markerom mRuby i terminatorom bGH. Usporedno su izrađene dvije varijante aktivacijskog vektora: jedna u kojoj je VPR domena spojena na C-terminalni kraj proteina dCasMINI i druga u kojoj je VPR domena spojena na N-terminalni kraj proteina dCasMINI. Korištene su sgRNA za aktivaciju kontrolnih gena *HBG1, ASCL1* i *IFNγ*, prema originalnom radu Xu i sur. [189]. Na taj je način usporedba N- i C-terminalne fuzije provedena ciljanjem istih gena ranije validiranim sljedovima sgRNA, čime je smanjen utjecaj odabira sgRNA na procjenu učinkovitosti pojedine fuzije.

Nakon vektora za prolaznu transfekciju izrađeni su i vektori za lentivirusnu transdukciju namijenjeni stabilnoj ugradnji sustava dCasMINI-VPR u stanice EndoC-βH1. Kao i kod ostalih lentivirusnih sustava, vektori su osmišljeni za dvostupanjski pristup. U prvom su koraku dobiveni lentivirusni vektori koji sadrže RIP promotor, dCasMINI-VPR fuzijski modul, marker rezistencije na blasticidin i fluorescentni marker Clover. Budući da se u tim plazmidima ne nalazi sgRNA ekspresijska kazeta, u odgovarajuću poziciju ugrađen je zamjenski oligonukleotidni slijed Ig-dual.

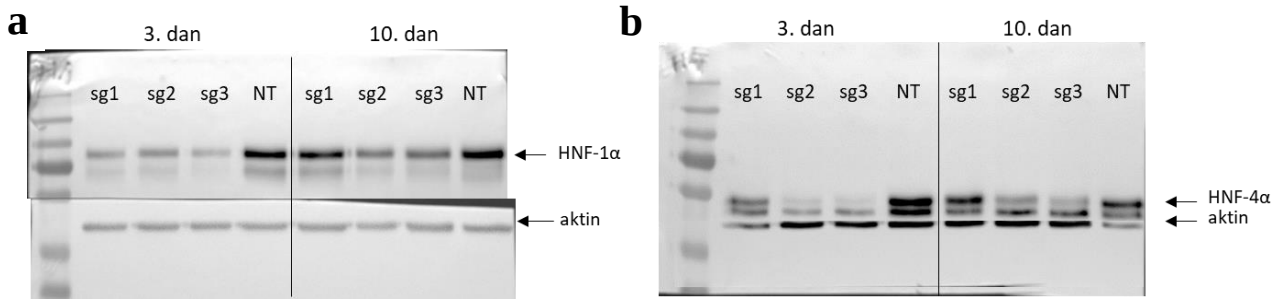
U drugom su koraku izrađeni lentivirusni vektori koji nose odgovarajuće CasMINI sgRNA module. Pojedinačni sgRNA sljedovi najprije su ugrađeni u pSgM_MINI module, nakon čega je cijela sgRNA ekspresijska kazeta prenesena u pSgX lentivirusni vektor s puromicinskom selekcijom i fluorescentnim markerom mRuby. Time su dobiveni vektori potrebni za usmjeravanje stabilno ugrađenog dCasMINI-VPR sustava prema odabranim ciljnim regijama.

Ispravnost svih konačnih vektora za prolaznu transfekciju i lentivirusnu transdukciju potvrđena je restrikcijskom analizom odabranim restrikcijskim enzimima. Dobiveni vektori omogućili su daljnje testiranje učinkovitosti dCasMINI-VPR sustava za ciljanu aktivaciju gena te usporedbu N- i C-terminalne VPR fuzije.

4.2.6. Provjera učinkovitosti modula Cas9 i RIP2

Kako bi se utvrdila efikasnost kreiranog modula Cas9, najprije je kreirana linija HepG2 sa stabilno ugrađenim vektorom. Nakon potpune selekcije blasticidinom napravljen je drugi krug

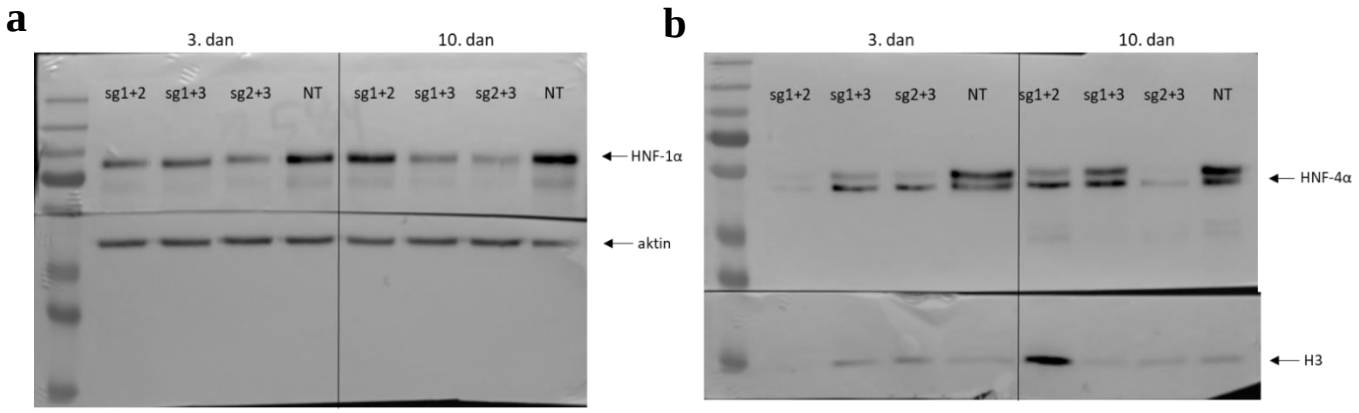
lentivirusnih transdukcija s različitim sgRNA za ciljani *knock out* gena *HNF1A* ili *HNF4A*. Ekspresija na proteinskoj razini analizirana je 3. i 10. dan nakon transdukcije (Slika 13).



Slika 13. Analiza ekspresije HNF-1α (a) i HNF-4α (b) nakon ciljane manipulacije gena sustavom CRISPR/Cas9 u staničnoj liniji HepG2 sa stabilno ugrađenom kazetom EFS-Cas9-blasticidin-Clover. Ekspresija je analizirana metodom Western blot 3. i 10. dan od transdukcije sa sgRNA konstruktima.

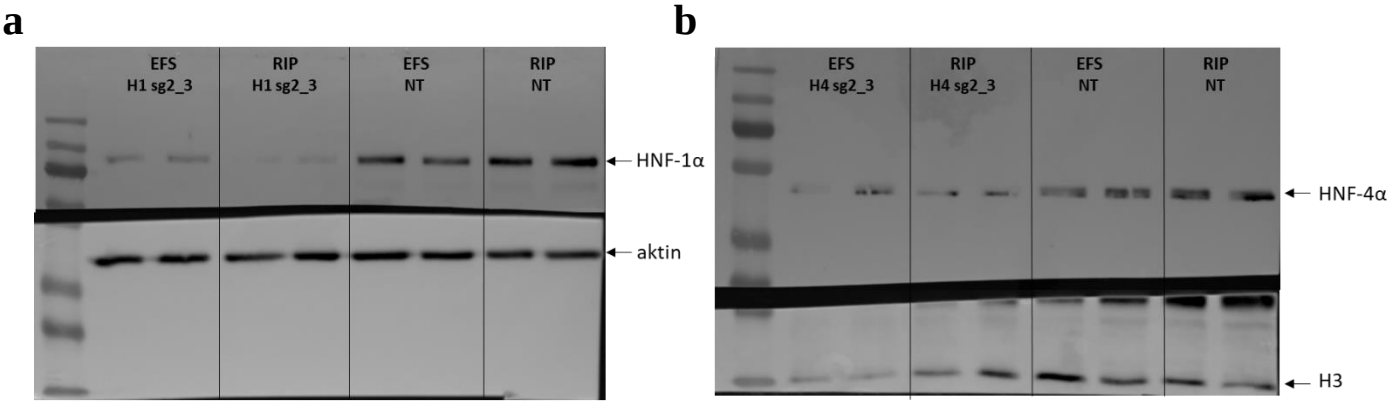
Tri dana nakon transdukcije, uočeno je smanjenje količine HNF-1α i HNF-4α u slučaju svih testiranih sljedova sgRNA. Međutim, nijedna pojedinačna sgRNA nije dovela do potpune inaktivacije navedenih gena. Deset dana nakon transdukcije i dalje je jasno vidljivo smanjenje ekspresije, ali je, u usporedbi s endogenom kontrolom, smanjenje slabije nego trećeg dana.

Nakon toga, testirane su i kombinacije sgRNA koje su ranije korištene pojedinačno kako bi se utvrdilo može li se njihovim istovremenim korištenjem postići potpuna inaktivacija gena od interesa (Slika 14). Kombinacija sg2 i sg3 za *HNF1A* rezultirala je najvećim smanjenjem ekspresije i 3. i 10. dan, iako i dalje nije postignuto potpuno utišavanje ekspresije proteina. Kombinacija sg2 i sg3 također je pokazala najveći učinak za gen *HNF4A*, ali ni u ovom slučaju nije došlo do potpunog gubitka genske ekspresije.



Slika 14. Analiza ekspresije HNF-1α (a) i HNF-4α (b) nakon ciljane manipulacije gena sustavom CRISPR/Cas9 u staničnoj liniji HepG2 sa stabilno ugrađenom kazetom EFS-Cas9-blasticidin-Clover. Ekspresija je analizirana metodom Western blot 3. i 10. dan od transdukcije s lentivirusima koji su sadržavali različite kombinacije sljedova sgRNA.

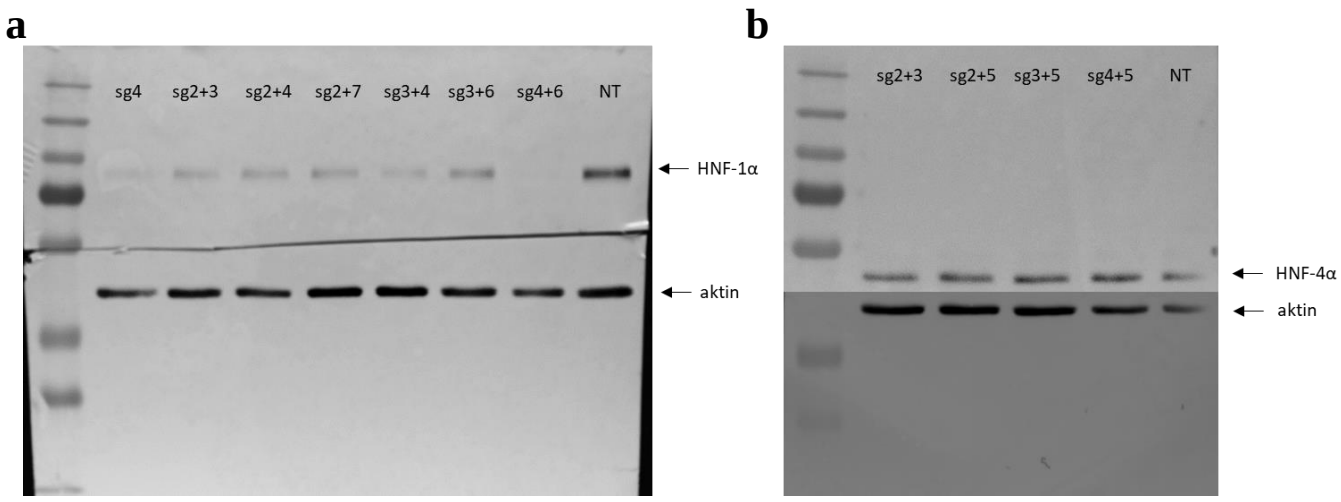
Sljedeći je korak bio potvrditi učinak izabranih sgRNA u staničnoj liniji EndoC-βH1, kao i usporediti potencijalne razlike između novokloniranog promotora RIP2 i standardno korištenog promotora EFS. Za potrebe testiranja izrađene su dvije stabilne stanične linije. Jedna od linija sadržavala je ekspresijsku kazetu koja se sastoji od Cas9, markera rezistencije na blasticidin i fluorescentnog markera Clover pod kontrolom promotora RIP2, dok je druga stanična linija sadržavala istovjetnu kazetu pod kontrolom promotora EFS. Izabrane kombinacije molekula sgRNA (sg2 i sg3 za *HNF1A* i sg2 i sg3 za *HNF4A*) testirane su u obje linije te je ekspresija na proteinskoj razini analizirana 5. dan od transdukcije (Slika 15). Analiza ekspresije u obje stanične linije pokazala je da su geni *HNF1A* i *HNF4A* uspješno utišani. Učinkovitost utišavanja bila je bolja u liniji sa RIP2 promotorom, osobito u slučaju *HNF1A* iako ni u ovom slučaju nije postignut potpuni gubitak ekspresije proteina.



Slika 15. Analiza ekspresije HNF-1α (a) i HNF-4α (b) nakon ciljane manipulacije gena sustavom CRISPR/Cas9 u staničnim linijama EndoC-βH1-EFS-Cas9 ili EndoC-βH1-RIP2-

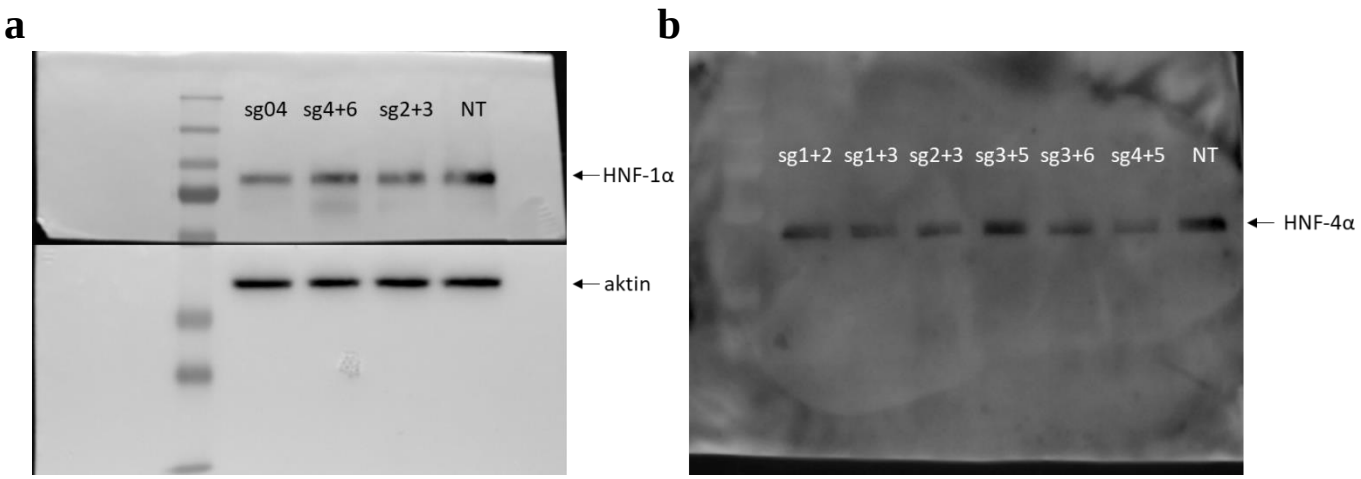
Cas9. Ekspresija je analizirana metodom Western blot 5. dan od transdukcije s lentivirusima koji su sadržavali sljedove sg2 i sg3 za *HNF1A* ili sg2 i sg3 za *HNF4A*.

Daljnjim testiranjem različitih sgRNA na staničnoj liniji HepG2 pronađeni su sljedovi koji potencijalno dovode do potpunog utišavanja HNF-1α (Slika 16a), dok HNF-4α ni sa jednom kombinacijom nije potpuno utišan (Slika 16b).



Slika 16. Analiza ekspresije HNF-1α (a) i HNF-4α (b) nakon ciljane manipulacije gena sustavom CRISPR/Cas9 u staničnoj liniji HepG2 sa stabilno ugrađenom kazetom EFS-Cas9-blasticidin-Clover. Ekspresija je analizirana metodom Western blot 10. dan od transdukcije s lentivirusima koji su sadržavali različite kombinacije sljedova sgRNA.

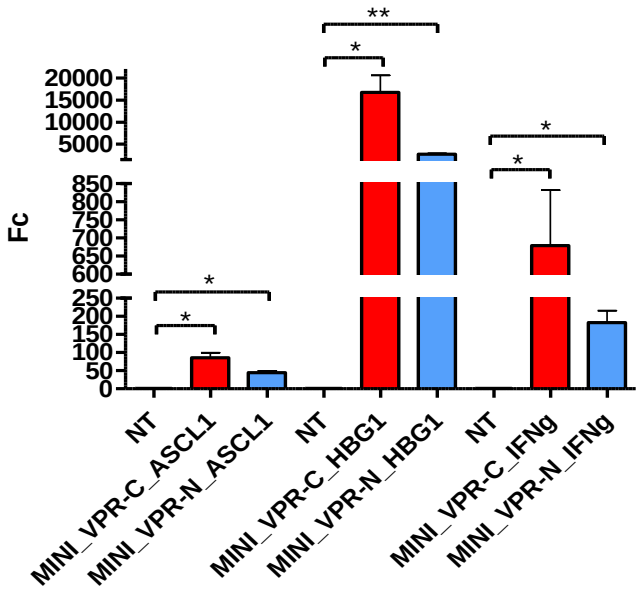
Najefikasnije kombinacije za utišavanje *HNF1A* (ranije testirani sg2+sg3, sg4 i sg4+sg6), kao i sve kombinacije koje su testirane za utišavanje *HNF4A* u staničnoj liniji HepG2 zatim su testirane u stanicama EndoC-βH1-RIP2-Cas9. Za razliku od prvog testiranja, utišavanje *HNF1A* ovoga je puta bilo znatno slabije (Slika 17a). Kombinacija sg4+sg6 koja je u HepG2 liniji dovela do potpunog utišavanja, u ovoj je liniji imala slabiji učinak, a čak i kombinacija sg2+sg3 koja je u prvom testiranju linije imala jak učinak, ovog je puta pokazala slabiji učinak. Gen *HNF4A* nije bilo moguće potpuno utišati ni s jednom kombinacijom sgRNA (Slika 17b).



Slika 17. Analiza ekspresije HNF-1α (a) i HNF-4α (b) nakon ciljane manipulacije gena sustavom CRISPR/Cas9 u staničnoj liniji EndoC-βH1-RIP2-Cas9. Ekspresija je analizirana metodom Western blot 5. dan od transdukcije s lentivirusima koji su sadržavali prethodno odabrane pojedinačne ili kombinirane sgRNA za *HNF1A* ili *HNF4A*.

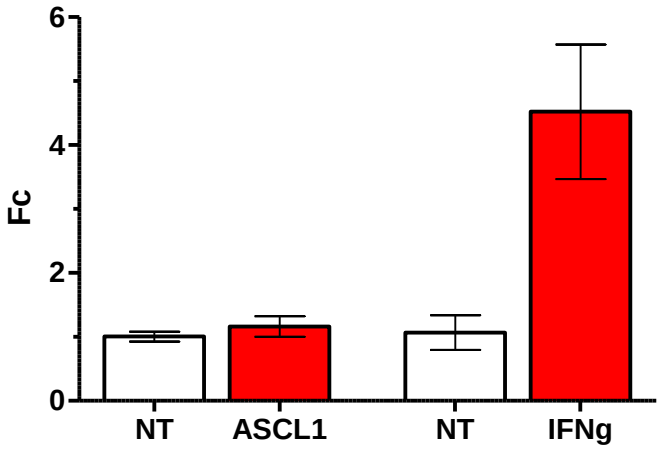
4.2.7. Usporedba N- i C-terminalne dCasMINI-VPR fuzije

Sljedeće su testirane fuzije modula dCasMINI s domenom VPR (N i C fuzija). Kako bi se što efikasnije i brže odredila efikasnost pojedine fuzije, iste su testirane u staničnoj liniji HEK293T prolaznom transfekcijom u kombinaciji sa sljedovima sgRNA za tri gena, *ASCL1*, *HBG1* i *IFNγ*. Obje su fuzije uspješno aktivirale transkripciju svih ciljanih gena. U svim provedenim testiranjima, C-fuzija je bila efikasnija od N-fuzije (Slika 18). Ekspresija *ASCL1* povećana je oko 85 puta upotrebom C-fuzije, dok je upotrebom N-fuzije povećana 40 puta (Fc = 85,95 odnosno 44,12). Ekspresija *HBG1* s obje je fuzije povećana više tisuća puta: Fc = 16 735 za C-fuziju odnosno 2720 za N-fuziju. Isti je slučaj s genom *IFNγ* čija je ekspresija C-fuzijom povećana više od 600 puta, dok je N-fuzijom povećana 180 puta (Fc = 678 odnosno 182). Iz tog je razloga dCasMINI-VPR C-fuzija izabrana za daljnje eksperimente.



Slika 18. Promjene ekspresije gena *ASCL1, HBG1* i *IFNγ* nakon ciljane aktivacije fuzijama dCasMINI-VPR u C- ili N-terminalnoj orijentaciji u staničnoj liniji HEK293T. Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR petog dana nakon transfekcije i prikazana kao relativna promjena ekspresije u odnosu na *non-target* kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * p <0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

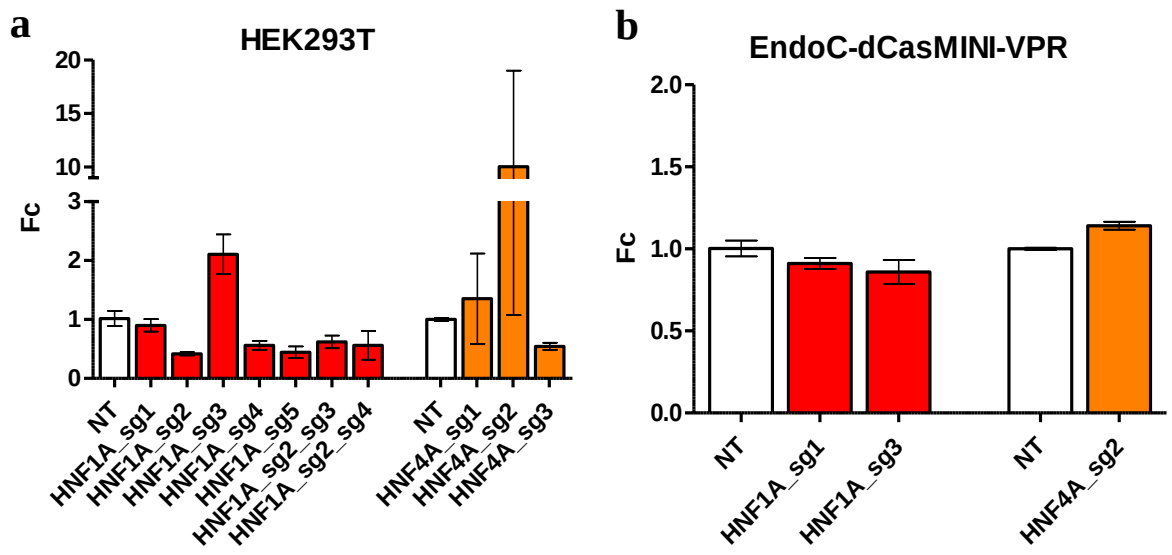
U sljedećem je koraku izrađena stabilna stanična linija EndoC-dCasMINI-VPR s ugrađenom kazetom koja sadrži promotor RIP, dCasMINI u C-fuziji s domenom VPR, marker rezistencije na blasticidin i fluorescentni marker Clover. Nakon selekcije čiste linije, napravljen je drugi krug transdukcija s konstruktima koji su sadržavali sgRNA za *ASCL1* ili *IFNγ*, gene koji su podjednako eksprimirani u linijama HepG2 i EndoC-βH1. Suprotno očekivanju, ekspresija *ASCL1* nije se promijenila, dok je ekspresija IFNγ povećana svega 4 puta (u usporedbi s povećanjem od 600 puta u liniji HepG2; Slika 19).



Slika 19. Promjene ekspresije gena *ASCL1* i *IFNγ* nakon ciljane aktivacije fuzijom dCasMINI-VPR u C-terminalnoj orijentaciji u staničnoj liniji EndoC-dCasMINI-VPR. Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR petog dana nakon transdukcije i prikazana kao relativna promjena ekspresije u odnosu na *non-target* kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * p <0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

Nakon potvrde da dCasMINI-VPR C-terminalna fuzija radi kao sustav, ali pokazuje znatno slabiju učinkovitost nakon stabilne ugradnje u stanice EndoC-βH1, dizajnirane su sgRNA za aktivaciju *HNF1A* ili *HNF4A* te su najprije testirane u stanicama HEK293T (Slika 20a). Molekule sgRNA dizajnirane su uz pomoć *online* alata CRISPOR i dCasMINI *Guide Design Tool* koji biraju sgRNA prema nizu kriterija te ih rangiraju prema finalnoj ocjeni. Neke sgRNA, prvenstveno za *HNF1A*, dizajnirane su ručno kako bi se što bolje ciljala regija koja bi prema dostupnim rezultatima trebala dovesti do najvećeg učinka promjene ekspresije. Od svih testiranih sgRNA i njihovih kombinacija, isključivo je sgRNA 4 dovela do blagog porasta ekspresije *HNF1A*. Molekula sgRNA 2 dovela je do porasta ekspresije *HNF4A*, ali pozornijim uvidom u rezultate vidljivo je da je promjena rezultat ekspresije u samo jednoj replici te je upitan točan uzrok promjene.

U staničnoj liniji EndoC-dCasMINI-VPR zbog opsega eksperimenata testirane su samo sgRNA koje su imale potencijalni efekt tijekom inicijalnog testiranja. Molekule sg1 i sg3 nisu dovele do promjene ekspresije *HNF1A*, dok je sg2 dovela do blagog, ali statistički neznačajnog porasta ekspresije *HNF4A* (Slika 20b).

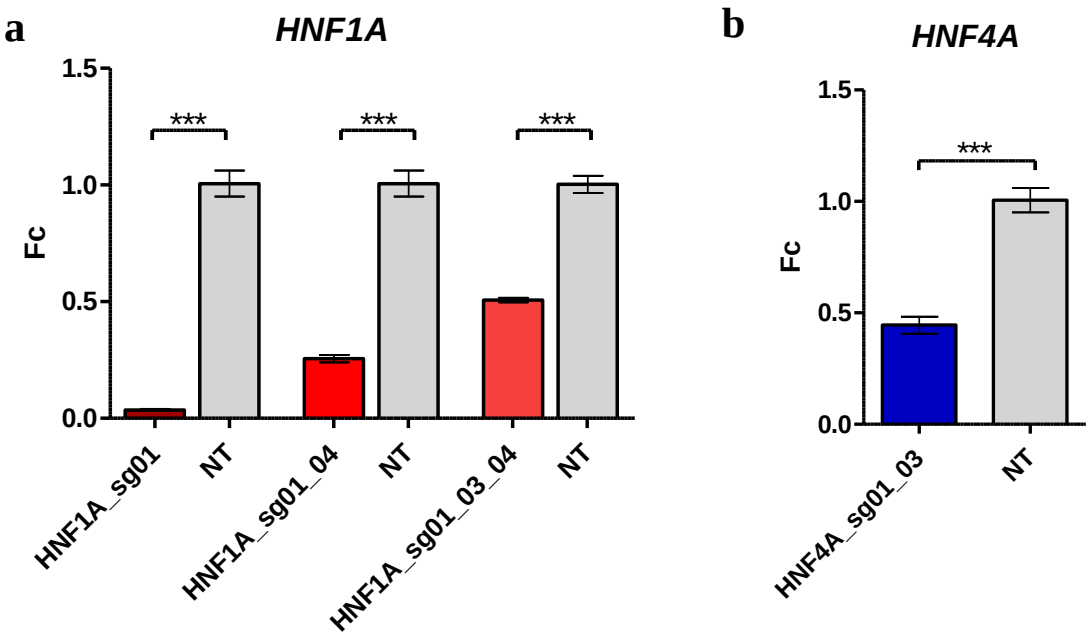


Slika 20. Promjene ekspresije gena *HNF1A* i *HNF4A* nakon ciljane aktivacije fuzijom dCasMINI-VPR u C-terminalnoj orijentaciji u staničnoj liniji HEK293T (a) ili EndoC-dCasMINI-VPR (b). Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR petog dana nakon transfekcije linije HEK293T odnosno petog dana nakon transdukcije linije EndoC-βH1 i prikazana kao relativna promjena ekspresije u odnosu na *non-target* kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * p <0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

4.3. Izrada stabilne stanične linije EndoC-KRAB i ciljano utišavanje *HNF1A* i *HNF4A*

Za ciljano utišavanje gena od interesa kreirana je stabilna stanična linija EndoC-βH1 s ugrađenom kazetom koja sadrži fuziju *Sp* dCas9-KRAB. Fuzija *Sp* dCas9-KRAB je već ranije opisana [197], stoga nije ponovo validirana u sklopu ove doktorske disertacije. Stanice EndoC-βH1 transducirane su lentivirusnim vektorom koji nosi promotor EFS, fuziju *Sp* dCas9-KRAB, gen za rezistenciju na blasticidin te fluorescentni marker Clover. Nakon transdukcije, stanice su podvrgnute višemjesečnoj selekciji blasticidinom u svrhu uspostavljanja čiste poliklonske linije EndoC-KRAB. U drugom krugu transdukcije, u staničnu liniju EndoC-KRAB ugrađene su kazete koje sadrže specifične sgRNA za *HNF1A* ili *HNF4A*, marker rezistencije na puromicin te fluorescentni marker mRuby. Uspješnost transdukcije i selekcije praćena je promatranjem ekspresije crvenog fluorescentnog proteina mRuby. Stanice su selektirane puromicinom i skupljene peti dan od transdukcije.

Razina ekspresije gena *HNF1A* i *HNF4A* analizirana metodom RT-qPCR 5. dana od transdukcije pokazala je da su oba gena uspješno utišana na razini transkripcije (Slika 21a, b). Uočeno je da je ugradnja različitog broja specifičnih sgRNA dovela do stupnjevitog utišavanja gena *HNF1A*. Ugradnja jedne sgRNA dovela je do njegovog gotovo potpunog utišavanja (Fc = 0,036), dvije sgRNA imale su nešto slabiji učinak (Fc = 0,256), dok su tri različite sgRNA dovele do smanjenja genske ekspresije za ~50% (Fc = 0,507; Slika 19a). Kombinacija sgRNA 01 i 03 dovela je do smanjenja ekspresije gena *HNF4A* za otprilike ~50% (Fc = 0,54; Slika 21b).

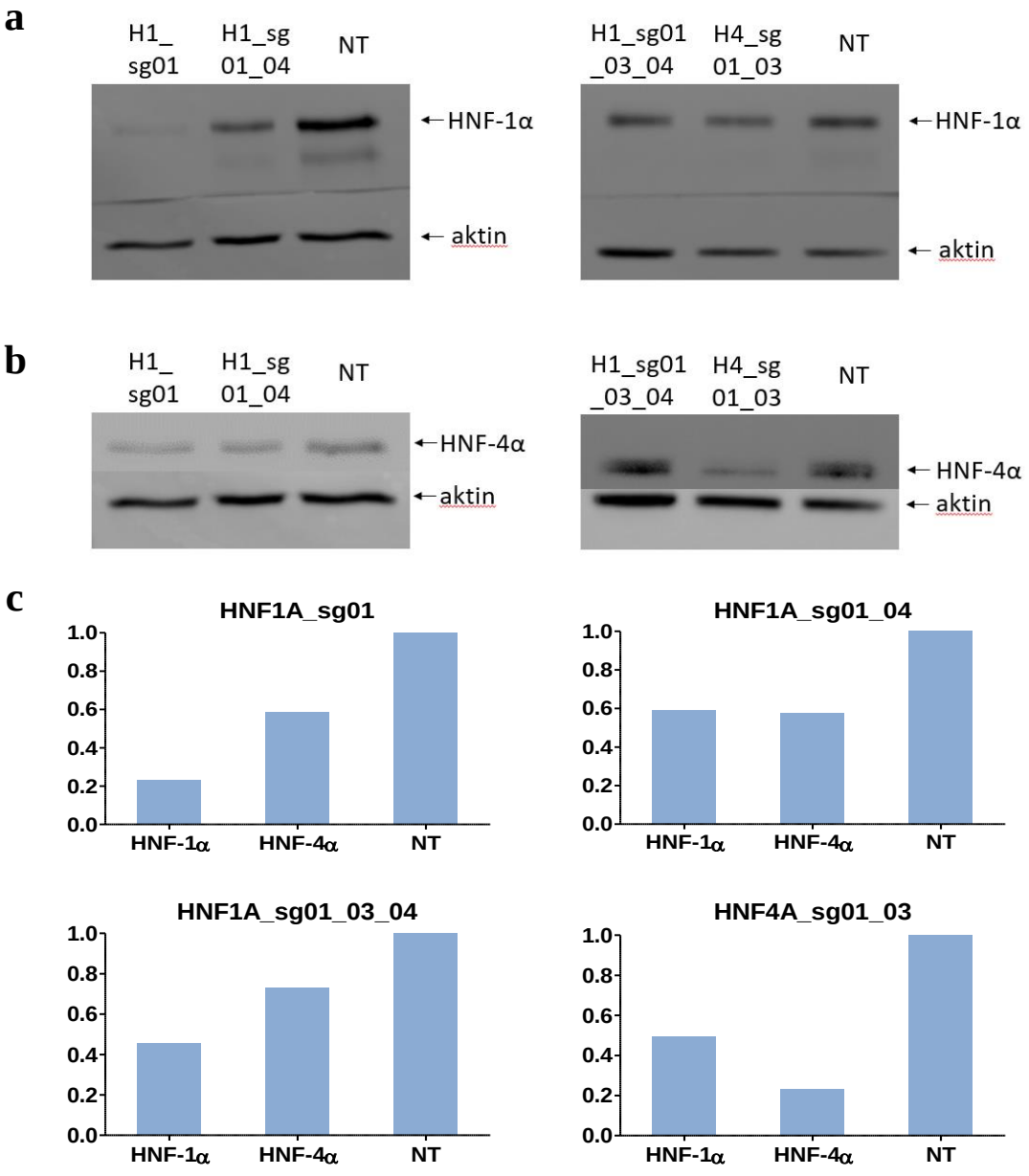


Slika 21. Promjene ekspresije gena *HNF1A* (a) i *HNF4A* (b) nakon ciljanog utišavanja fuzijom *Sp* dCas9-KRAB u staničnoj liniji EndoC-KRAB. Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR petog dana nakon transdukcije i prikazana je kao relativna promjena ekspresije u odnosu na *non-target* kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; *** $p < 0,001$.

Ekspresija gena *HNF1A* i *HNF4A* analizirana je i na proteinskoj razini ponoću metode Western blot (Slika 22). Najprije je analizirana promjena ekspresije HNF-1α nakon ciljanog utišavanja *HNF1A* ili *HNF4A* (Slika 22a). Uočeno je da je u stabilnoj liniji EndoC-KRAB količina proteina HNF-1α smanjena u slučaju utišavanja bilo kojeg od ova dva gena. Također je primijećeno da promjene u ekspresiji proteina HNF-1α donekle reflektiraju promjene u količini transkripta te je stupanj promjene ovisan o broju korištenih sgRNA molekula. Tako je i na

proteinskoj razini vidljivo da jedna sgRNA dovodi do najvećeg smanjenja ekspresije, dok dvije i tri sgRNA dovode do blažeg smanjenja ekspresije proteina (Slika 22a, c).

Ciljano utišavanje gena *HNF1A* dovelo je i do smanjenja količine proteina HNF-4α, a stupanj utišavanja ovisio je o broju ugrađenih sgRNA - najjači učinak imala je jedna sgRNA, dok su dvije sgRNA imale slabiji učinak (Slika 22b). Mjerenjem integrirane optičke gustoće pojedinih vrpci nakon automatskog uklanjanja pozadinskog signala, pokazano je da i tri sgRNA dovode do blagog smanjenja količine proteina HNF-4α u odnosu na kontrolu (Slika 22c). Očekivano, ciljano utišavanje *HNF4A* kombinacijom sgRNA 01 i 03 dovelo je do najvećeg smanjenja ekspresije HNF-4α na proteinskoj razini (Slika 22b,c).



Slika 22. Ekspresije proteina nakon ciljanog utišavanja *HNF1A* ili *HNF4A* u staničnoj liniji

EndoC-KRAB. Analizirane su promjene ekspresije HNF-1α (a) i HNF-4α (b) metodom Western blot. Za preciznije određivanje stope utišavanja rezultati Western blot analize obrađeni su u programu ImageJ mjerenjem integrirane optičke gustoće pojedinih vrpci (c). Dobivene vrijednosti normalizirane su na β-aktin, a potom na kontrolni uzorak (NT), čime je određena semikvantitativna promjena ekspresije proteina HNF-1α i HNF-4α.

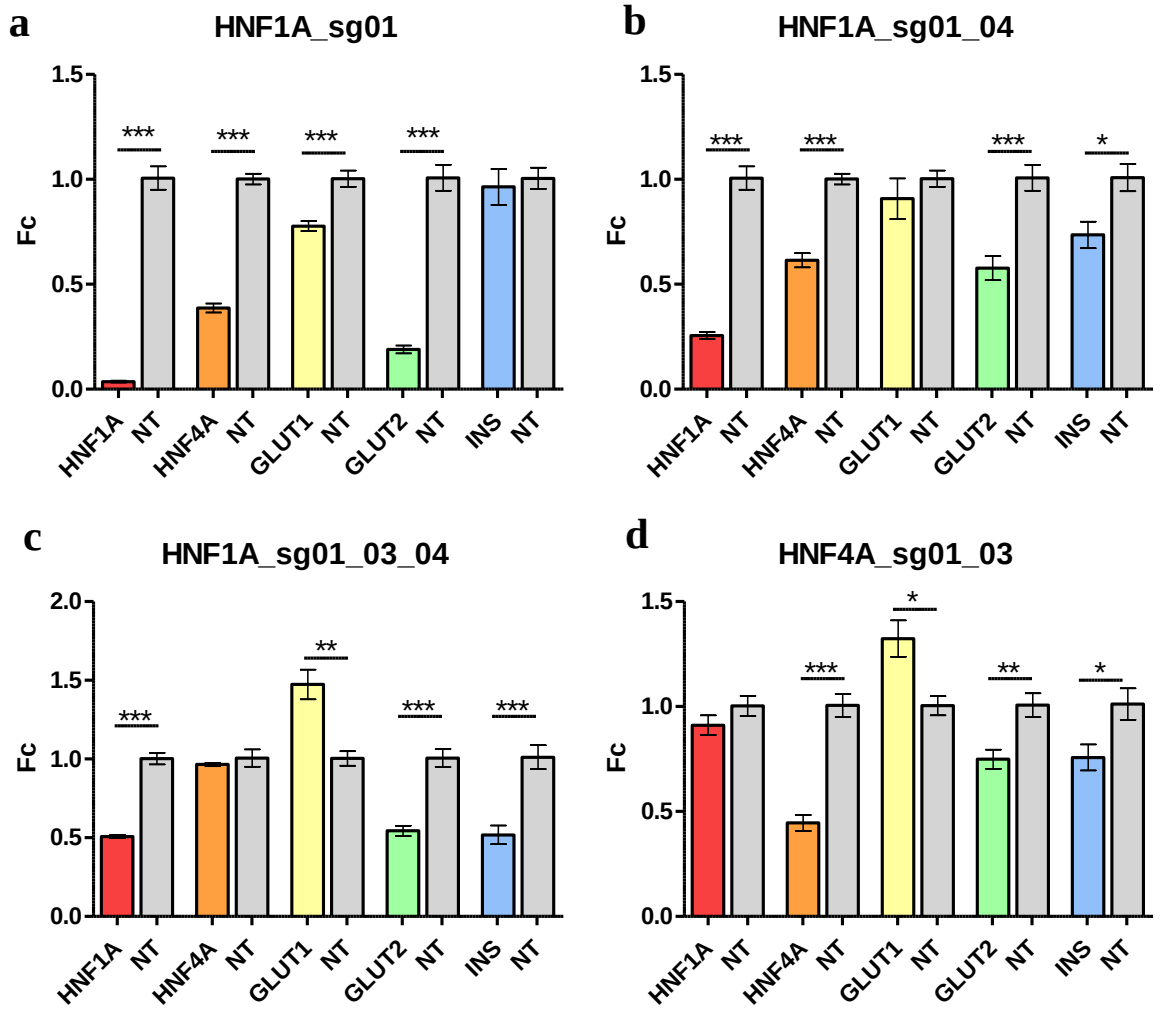
4.4. Ekspresija nizvodnih gena u stabilnoj staničnoj liniji EndoC-KRAB nakon ciljanog utišavanja gena *HNF1A* i *HNF4A*

U sljedećem je koraku u staničnoj liniji EndoC-KRAB analizirana ekspresija nizvodnih gena za koje je poznato da su izravno ili neizravno regulirani transkripcijskim faktorima HNF-1α ili HNF-4α (Slika 23). Razina transkripcije gena *GLUT1*, *GLUT2* i *INS* nakon utišavanja HNF-1α ili HNF-4α u staničnoj liniji EndoC-KRAB utvrđena je metodom RT-qPCR 5. dan od transdukcije. Također, kako je poznato da ova dva transkripcijska faktora čine regulatornu petlju, analizirana je i ekspresija HNF-4α nakon utišavanja HNF-1α i obratno.

Rezultati su pokazali da promjene u ekspresiji nizvodnih gena ovise o stupnju utišavanja *HNF1A* ili *HNF4A*. Gen *INS*, koji kodira za inzulin, neizravno je reguliran transkripcijskim faktorom HNF-1α. Utišavanje *HNF1A* pomoću jedne sgRNA nije dovelo do promjena u transkripciji *INS*, iako je sam *HNF1A* u ovim uvjetima najjače transkripcijski utišan (Slika 23a). Suprotno tome, utišavanje *HNF1A* pomoću 2 ili 3 sgRNA, koje nije bilo jednako učinkovito kao utišavanje pomoću jedne sgRNA, te utišavanje *HNF4A* kombinacijom sgRNA 01 i 03, dovelo je do značajnog smanjenja transkripcije gena *INS* (Fc = 0,73; 0,52 odnosno 0,76) (Slika 23c-d).

Gen *HNF1A* direktno regulira ekspresiju *HNF4A*, a stupanj utišavanja *HNF1A* također ima učinak na ekspresiju *HNF4A*. Naime, rezultati pokazuju da kada je *HNF1A* najmanje utišan (upotrebom tri sgRNA; Slika 23c), ne dolazi do značajne promjene u transkripciji HNF-4α iako je Western blotom pokazana promjena na proteinskoj razini. Za razliku od toga, jako i umjereno utišavanje *HNF1A* rezultiraju smanjenjem transkripcije *HNF4A* (Fc = 0,39 odnosno 0,61). Utišavanje *HNF4A* nije dovelo do značajne promjene u transkripciji *HNF1A* (Slika 23d), iako je izmjerena promjena u količini proteina HNF-1α.

Sva četiri ciljana utišavanja dovela su do smanjenja transkripcije gena *GLUT2*, dok se razina transkripcije gena *GLUT1* razlikovala ovisno o stupnju utišavanja *HNF1A*, odnosno *HNF4A*. U slučaju jakog ciljanog utišavanja *HNF1A* pomoću jedne sgRNA, transkripcija *GLUT1* bila je značajno smanjena (Fc = 0,78), dok umjereno utišavanje s dvije sgRNA nije dovelo do promjene ekspresije (Slika 23a, b). Za razliku od toga, slabije utišavanje *HNF1A* pomoću tri sgRNA ili utišavanje *HNF4A* dovelo je do porasta transkripcije *GLUT1* (Fc = 1,47 odnosno 1,32) (Slika 23c, d).



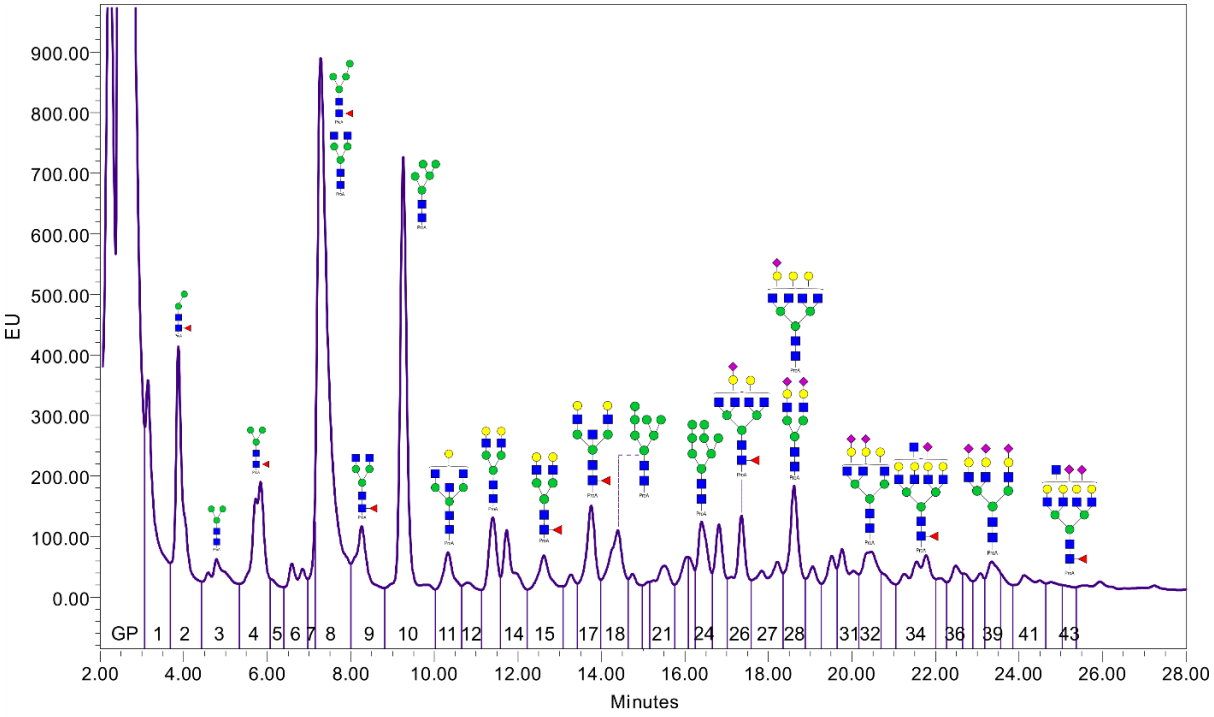
Slika 23. Promjene ekspresije nizvodnih gena nakon ciljanog utišavanja *HNF1A* ili *HNF4A* fuzijom *Sp* dCas9-KRAB u staničnoj liniji EndoC-KRAB. Gen *HNF1A* je utišan upotrebom jedne (a), dvije (b) ili tri (c) sgRNA dok je gen *HNF4A* utišan upotrebom dvije sgRNA (d). Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR petog dana nakon transdukcije i prikazana kao relativna promjena ekspresije u odnosu na *non-target* kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja

vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.5. *N*-glikom stanične linije EndoC- βH1

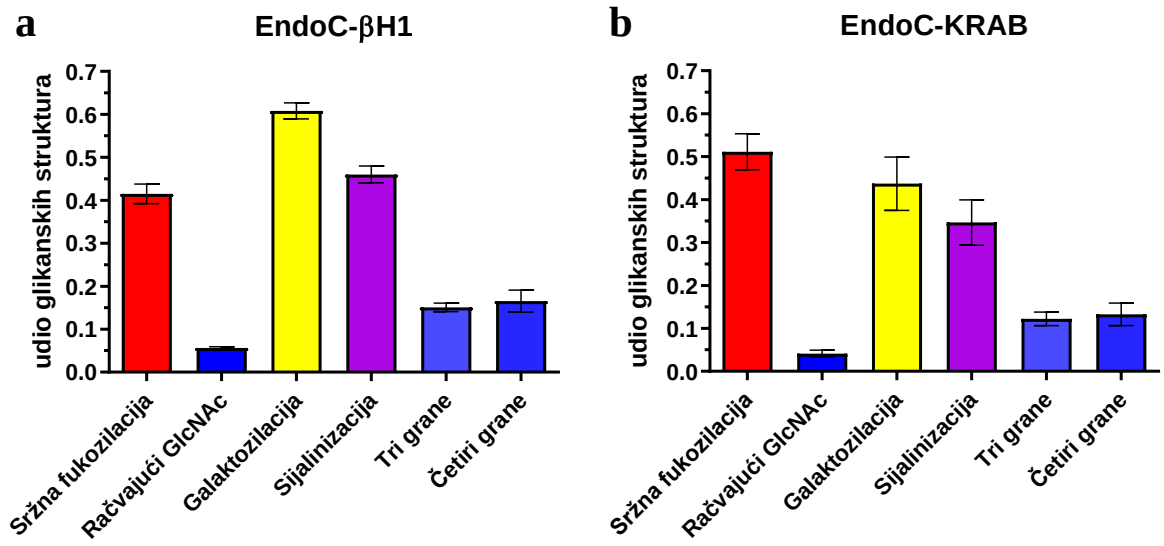
U sklopu ove doktorske disertacije, prvi put je analiziran ukupni *N*-glikom stanične linije EndoC-βH1. Stanice su sakupljene u dvije različite vremenske točke u razmaku 10 pasaža, a ukupni *N*-glikom analiziran je metodom HILIC-UHPLC-MS/MS nakon oslobađanja svih *N*-glikana enzimom PNgaza F.

Utvrđeno je da se se ukupni *N*-glikom stanične linije EndoC-βH1 sastoji od 43 glikanska pika, od kojih neki sadrže više različitih glikanskih struktura (Tablica 4; Slika 24). Na temelju zajedničkih strukturnih karakteristika, a kako bi se olakšala analiza promjena glikoma usred ciljanih manipulacija, pikovi su grupirani u grupe tzv. deriviranih svojstava.



Slika 24. Ukupni *N*-glikom stanične linije EndoC-βH1 analiziran pomoću metoda HILIC-UHPLC-MS/MS. Metodom UHPLC ukupni *N*-glikom razdvojen je na 43 različita pika, a najvećim pikovima pridružene su i odgovarajuće glikanske strukture.

Ukupno je analizirano 6 deriviranih svojstava: sržna fukoza, račvajući GlcNAc, glikani koji sadrže galaktozu, glikani koji sadrže sijalinsku kiselinu, složeni glikani s tri grane (triantenarni glikani) i glikani s četiri grane (tetraantenarni glikani) (Tablica 5; Slika 25a). Najveći udio *N*-glikana sadrži galaktozu (61 ± 2 %), dok je udio sijaliniziranih struktura oko 35 posto (36 ± 2 %) . Oko 40% svih glikana stanica EndoC-βH1 sadrži sržnu fukozu (41 ± 2,5 %), dok je udio struktura koje sadrže račvajući GlcNAc svega nekoliko posto (5,6 ± 0,3 %) (Slika 25). Složene glikanske strukture koje sadrže tri ili četiri grane manje su zastupljene (15 ± 1 % odnosno 16,5 ± 2,5 %).



Slika 25. Udio pojedinih deriviranih svojstava u ukupnom *N*-glikomu stanične linija EndoC-βH1 (a) i EndoC-KRAB (b). Ukupni je glikom analiziran metodom HILIC-UHPLC-MS/MS nakon čega su pojedine strukture grupirane na temelju zajedničkih karakteristika u derivirana svojstva. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD.

Usporedno je analiziran i ukupni *N*-glikom izvedene stanične linije EndoC-KRAB i to u dvije vremenske točke u razmaku 20 pasaža, a obrasci glikozilacije nalikuju izvornoj staničnoj liniji iako postoje vidljive razlike udjela pojedinih glikanskih struktura (Slika 25b). Udio glikana koji sadrže sržnu fukozu veći je nego u izvornoj liniji (51± 4 %), dok je udio glikana sa račvajućim GlcNAc nešto manji (4,1 ± 0,8 %; Slika 23b). Udio svih drugih analiziranih deriviranih svojstava manji je nego u izvornoj liniji, pa je tako galaktozilirano 43 ± 6 % glikana, sijalinizirano 35 ± 5 %, a dok udio glikana s tri odnosno četiri grane iznosi 12 ± 1,6 % odnosno 13 ± 2,6 %.

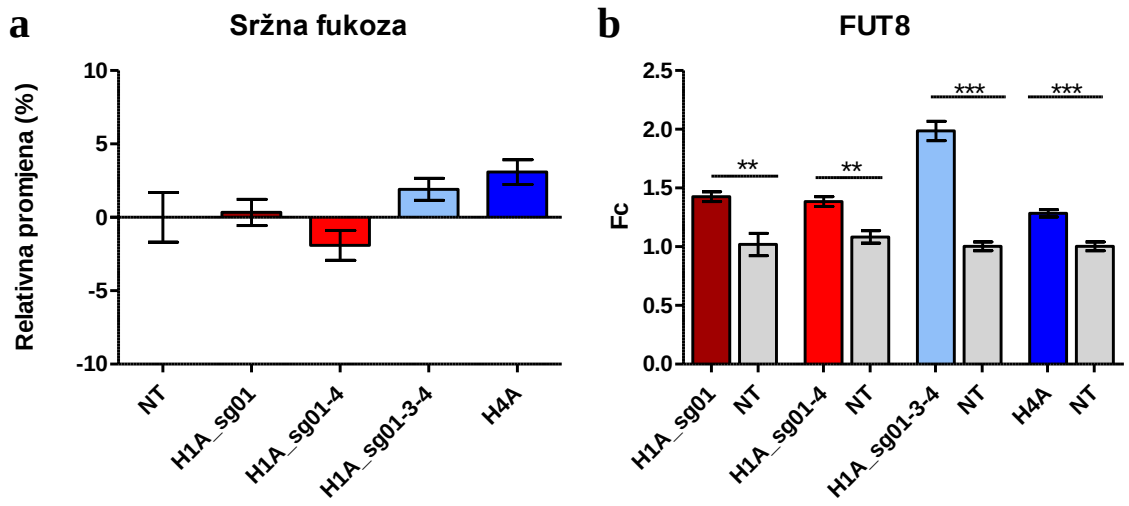
4.6. Promjene ukupnog *N*-glikoma stanične linije EndoC-KRAB nakon ciljanog utišavanja gena *HNF1A* ili *HNF4A*

Nakon ciljanog utišavanja gena *HNF1A* i *HNF4A* potvrđenog na transkripcijskoj i proteinskoj razini, analizirane su promjene *N*-glikoma stanične linije EndoC-KRAB, kao i promjene ekspresije glikoziltransferaza koje imaju ulogu u procesu glikozilacije.

Kako su udjeli nekih deriviranih svojstava u ukupnom *N*-glikomu relativno mali, promjene pojedinih deriviranih svojstava nakon ciljanih manipulacija analizirane su kao relativne promjene u odnosu na početni udio. Na ovaj način moguće je uočiti i promjene koje su male na razini ukupnog glikoma, ali potencijalno značajne.

4.6.1. Promjene transkripcije gena FUT8 i promjena udjela glikanskih struktura sa sržnom fukozom

Sržna fukozilacija je enzimski proces u kojem se molekula fukoze vezuje α(1-6) vezom za proksimalni GlcNAc u *N*-glikanu, a posredovana je fukoziltransferazom FUT8. Ciljano utišavanje *HNF1A* i *HNF4A* u staničnoj liniji EndoC-KRAB nije utjecalo na udio glikana sa sržnom fukozom (Slika 26a), iako je svako utišavanje dovelo do značajnog porasta ekspresije gena *FUT8* (Slika 26b). Najveći porast primjećen je nakon ciljanja gena *HNF1A* s tri molekule sgRNA (Fc = 1,99), dok je utišavanje *HNF1A* s jednom ili dvije sgRNA rezultiralo podjednakom promjenom ekspresije (Fc = 1,42 odnosno 1,39).

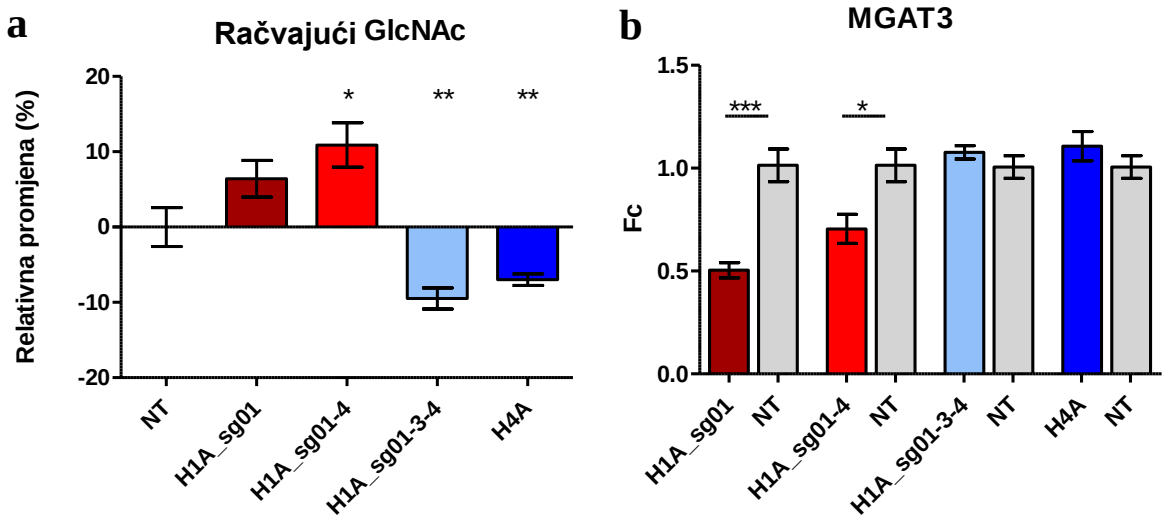


Slika 26. Utjecaj ciljanog utišavanja *HNF1A* ili *HNF4A* na sržnu fukozilaciju (a) i ekspresiju fukoziltransferaze *FUT8* (b) u liniji EndoC-KRAB. Ukupni glikom analiziran je metodom HILIC-UHPLC-MS/MS nakon čega su grupirani svi kromatografski pikovi koji sadrže sržnu fukozu. Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR petog dana nakon transdukcije i prikazana kao relativna promjena ekspresije u odnosu na *non-target* kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.6.2. Promjene transkripcije gena MGAT3 i udjela glikanskih struktura s račvajućim GlcNAc

Glikani s račvajućim GlcNAc nastaju djelovanjem enzima GnT - III koji dodaje molekulu GlcNAc β(1-4) vezom na središnju manozu rastućeg glikana. Promjene udjela račvajućeg GlcNAc u ukupnom glikomu stanične linije EndoC-KRAB nakon ciljanih manipulacija bile su minimalne (unutar jedan posto), no prikazane kao relativne promjene bile su značajne (Slika 27a). Iako je ciljanje *HNF1A* jednom sgRNA rezultiralo najvećim utišavanjem nizvodne glikoziltransferaze *MGAT3* (Fc = 0,50), ta se promjena nije reflektirala na relativnu promjenu udjela glikana s račvajućim GlcNAc. Za razliku od toga, utišavanje *HNF1A* pomoću dvije sgRNA dovelo je do značajnog povećanja relativnog udjela glikana s račvajućim GlcNAc od 10,89% . Utišavanje *HNF1A* pomoću 3 sgRNA, kao i utišavanje *HNF4A*, iako nisu doveli do značajnih promjena u razini transkripta *MGAT3* (Slika 27b), rezultirali su značajnim smanjenjem relativnog udjela glikana s račvajućim GlcNAc (- 9,48 % za 3 sgRNA, -6,98% za *HNF4A*). Iz rezultata je vidljivo da ne postoji jasan obrazac promjena jer najveće utišavanje *HNF1A* ne dovodi do značajnih promjena u glikanskim strukturama, dok umjereno utišavanje

rezultira suprotnim promjenama tj. u jednom slučaju dovodi do porasta, a u drugom do smanjenja udjela glikanskih struktura s račvajućim GlcNAc.

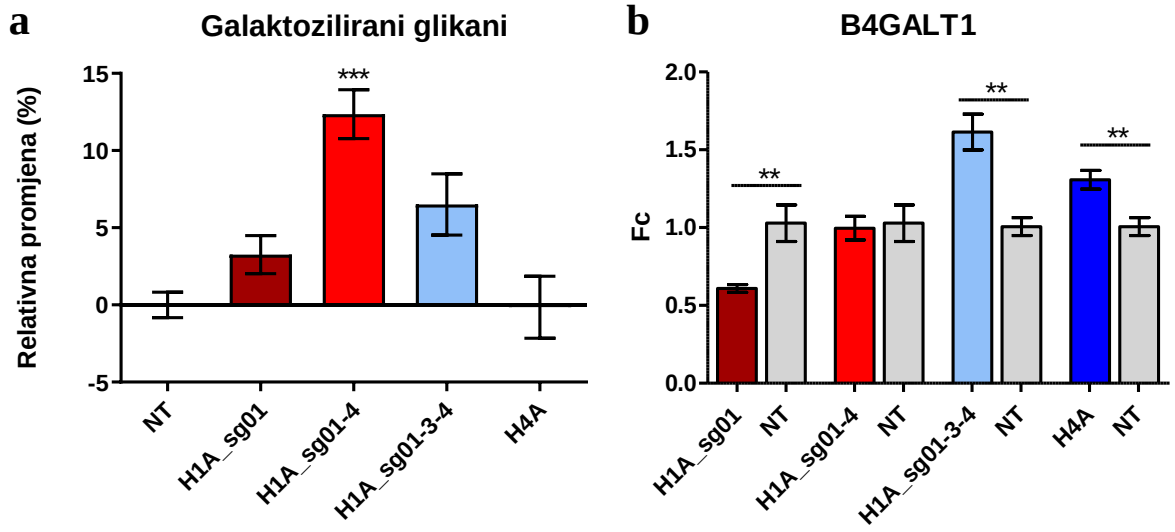


Slika 27. Utjecaj ciljanog utišavanja gena *HNF1A* ili *HNF4A* na dodatak račvajućeg GlcNAc (a) i ekspresiju glikoziltransferaze *MGAT3* (b), odgovornog za dodavanje GlcNAc, u liniji EndoC-KRAB. Ukupni je glikom analiziran metodom HILIC-UHPLC-MS/MS nakon čega su grupirani svi kromatografski pikovi koji sadrže račvajući GlcNAc. Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR petog dana nakon transdukcije i prikazana kao relativna promjena ekspresije u odnosu na *non-target* kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.6.3. Promjene transkripcije galaktoziltransferaze B4GALT1 i udjela glikanskih struktura s galaktozom

Galaktozilacija glikana ključan je korak u sintezi složenih *N*-glikana, a posredovana je enzimima iz porodice galaktoziltransferaza koja uključuje i beta-1,4-galaktoziltransferazu 1 kodiranu genom *B4GALT1*. Iako je, ukupno gledano, ciljano utišavanje *HNF1A* u staničnoj liniji EndoC-KRAB rezultiralo porastom udjela gelaktoziliranih glikana, značajan porast (+12,35 %) vidljiv je isključivo nakon umjerenog utišavanja *HNF1A* s dvije sgRNA (Slika 28a). Suprotno tome, ciljano utišavanje *HNF4A* nije rezultiralo promjenama u galaktozilaciji. Posljedične promjene ekspresije nizvodnog gliko-gena *B4GALT1* značajno su se razlikovale ovisno o broju korištenih sgRNA (Slika 28b). Tako je utišavanje pomoću jedne sgRNA, koje

je dovelo do najvećeg utišavanja *HNF1A*, također rezultiralo i najjačim transkripcijskim utišavanjem *B4GALT1* (Fc = 0,61). Suprotno tome, slabo utišavanje *HNF1A* pomoću 3 sgRNA i utišavanje *HNF4A* doveli su do značajnog porasta transkripcije ovog gena (Fc = 1,61 odnosno 1,31). Ciljanje pomoću dvije sgRNA, iako je imalo umjeren učinak na transkripcijsko utišavanje *HNF1A*, nije rezultiralo promjenom u razini transkripcije *B4GALT1*.



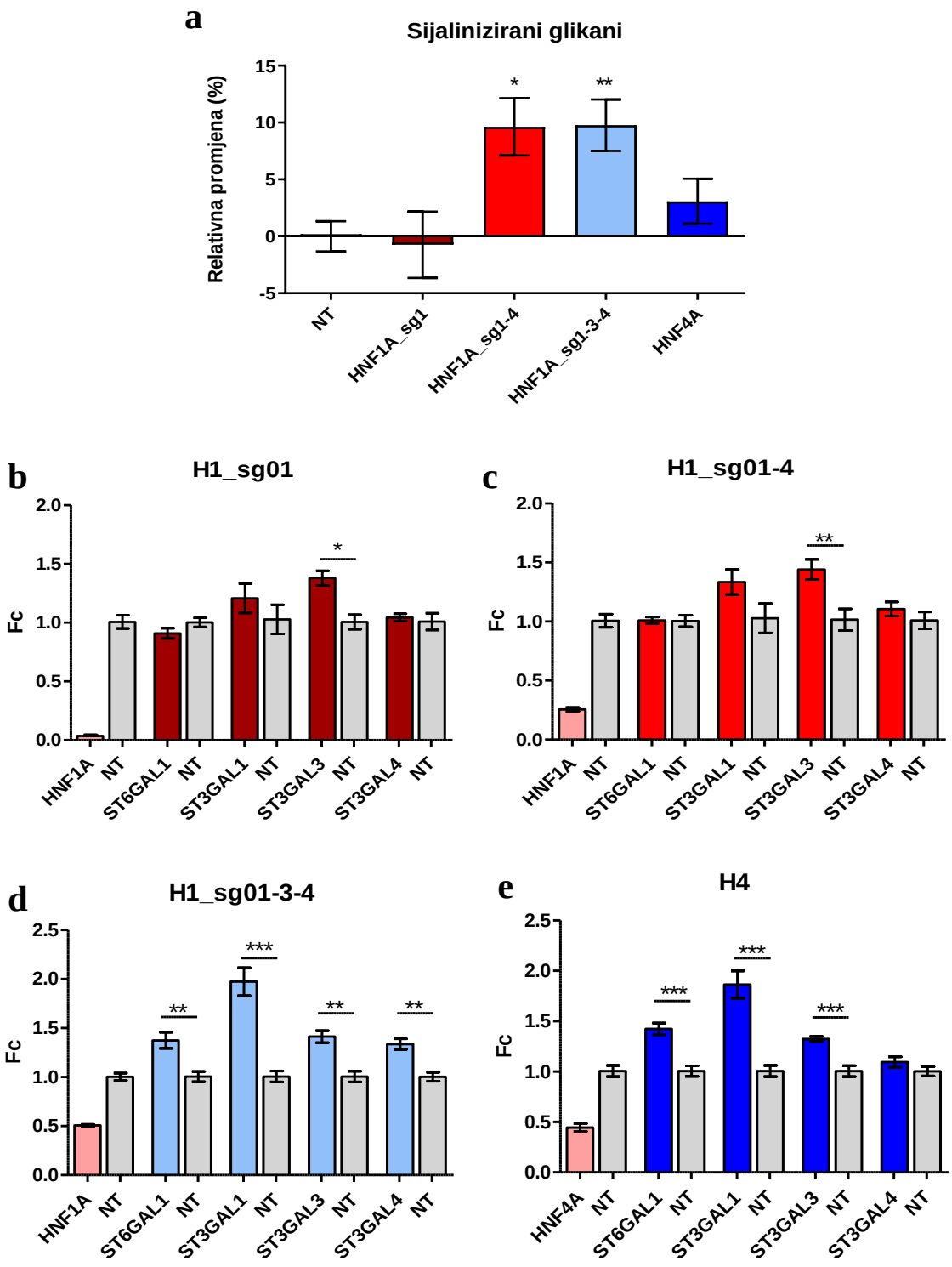
Slika 28. Utjecaj ciljanog utišavanja *HNF1A* ili *HNF4A* na galaktozilaciju (a) i ekspresiju galaktoziltransferaze *B4GALT1* (b), odgovornog za dodatak galaktoze na glikansku strukturu, u liniji EndoC-KRAB. Ukupni je glikom analiziran metodom HILIC-UHPLC-MS/MS nakon čega su grupirani svi kromatografski pikovi koji sadrže galaktozu. Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR petog dana nakon transdukcije i prikazana kao relativna promjena ekspresije u odnosu na *non-target* kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.6.4. Promjene transkripcije sijaliltransferaza ST6GAL1, ST3GAL1, ST3GAL3 i ST3GAL4 te udjela sijaliniziranih glikana

ST6GAL1 (beta-galaktozid alfa-2,6-sijaliltransferaza), *ST3GAL1* (beta-galaktozid alfa-2,3-sijaliltransferaza 1), *ST3GAL3* (beta-galaktozid alfa-2,3-sijaliltransferaza 3) i *ST3GAL4* (beta-galaktozid alfa-2,3-sijaliltransferaza 4) su geni koji kodiraju enzime iz porodice sijaliltransferaza odgovorne za dodavanje sijalinske kiseline na *N*-glikanske strukture. Utišavanje *HNF1A* u staničnoj liniji EndoC-KRAB uporabom dvije ili tri sgRNA rezultiralo je

značajnim porastom udjela sijaliniziranih glikana (9,62 odnosno 9,77 %; Slika 29a). Jako utišavanje *HNF1A* pomoću jedne sgRNA nije imalo značajan utjecaj na sijalinizaciju, kao ni ciljano utišavanje *HNF4A*.

Sva ciljana utišavanja gena *HNF1A* ili *HNF4A* rezultirala su promjenama u transkripciji jedne ili više navedenih sijaliltransferaza. Jako i umjereno utišavanje *HNF1A* pomoću jedne i dvije sgRNA dovelo je do porasta transkripcije *ST3GAL3* (Fc = 1,38 odnosno 1,44) (Slika 29b,c). Slabije utišavanje *HNF1A* pomoću tri sgRNA bilo je praćeno povećanjem transkripcije svih četiriju sijaliltransferaza (Fc = 1,37; 1,38; 1,41 odnosno 1,34) (Slika 29d), a utišavanje *HNF4A* dovelo je do povećanja transkripcije *ST6GAL1*, *ST3GAL1* i *ST3GAL3* (Fc = 1,42; 1,86 odnosno 1,32) (Slika 29e).



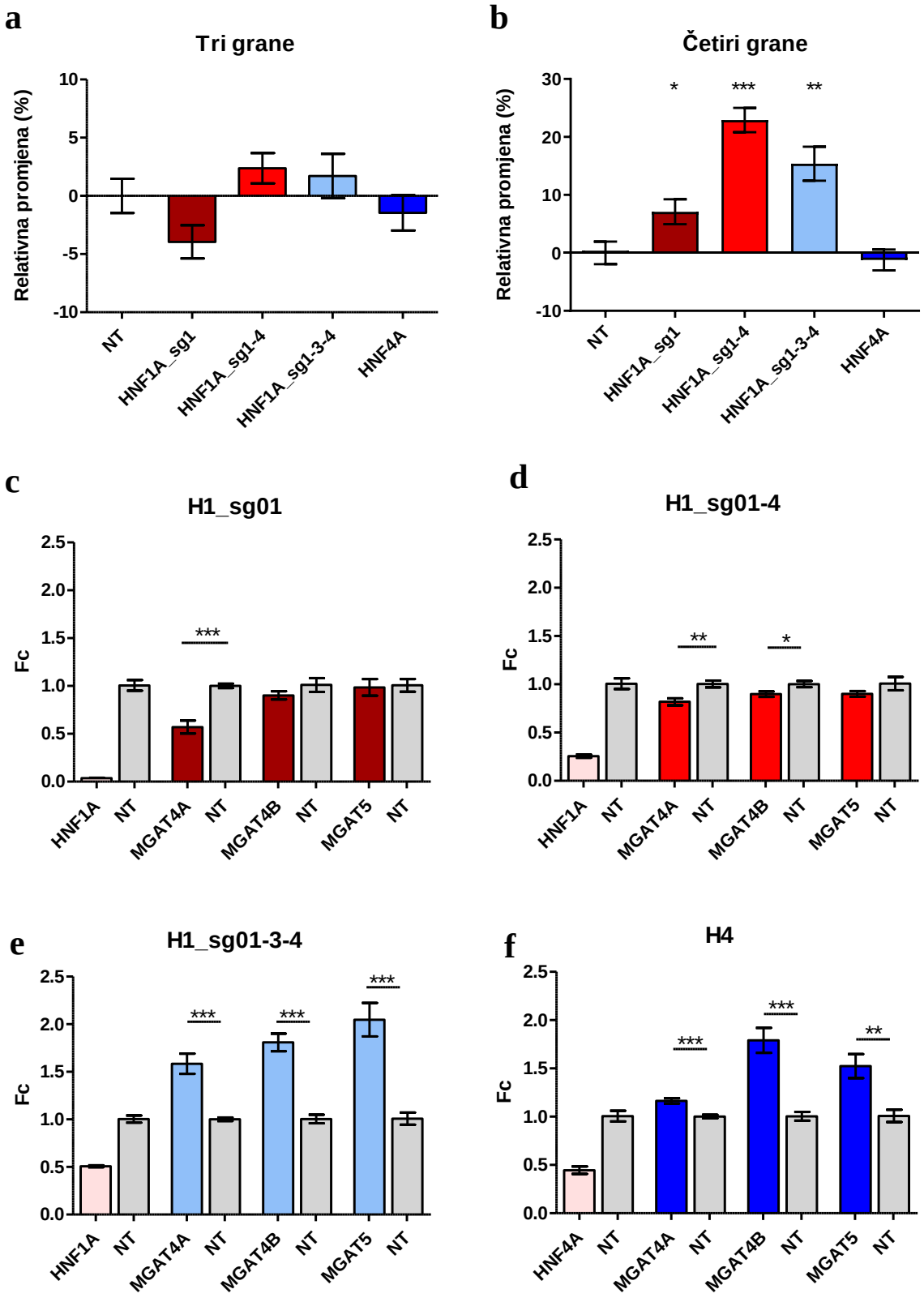
Slika 29. Promjene udjela sijaliniziranih glikana (a) i ekspresija gena *ST6GAL1*, *ST3GAL1*, *ST3GAL3* i *ST3GAL4* u liniji EndoC-KRAB nakon ciljanog utišavanja *HNF1A* s jednom (b), dvije (c) i tri (d) sgRNA te nakon ciljanog utišavanja *HNF4A* (e). Ukupni je glikom analiziran metodom HILIC-UHPLC-MS/MS nakon čega su grupirani svi kromatografski pikovi koji sadrže sijalinsku kiselinu. Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR petog dana nakon

transdukcije i prikazana kao relativna promjena ekspresije u odnosu na *non-target* kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.6.5. Promjene transkripcije gena MGAT4A, MGAT4B i MGAT5 te udjela razgranatih glikana

Nastanak kompleksnih glikana koji sadrže tri ili četiri grane posredovan je glikoziltransferazama GnT-IVa i GnT-IVb kodiranim genima *MGAT4A* i *MGAT4B*, odnosno glikoziltransferazom GnT-V koju kodira gen *MGAT5*.

Analiza relativnih udjela složenih glikana s tri grane (triantenarni glikani) nakon utišavanja *HNF1A* i *HNF4A* pokazala je da na glikanskoj razini ne postoje razlike u odnosu na *non-target* kontrolu (Slika 30a). U svim slučajevima utišavanja *HNF1A* uočen je značajan porast relativnog udjela složenih tetraantenarnih glikana, dok utišavanje *HNF4A* nije dovelo do značajne promjene (Slika 30b). Iako ne dolazi do promjena u udjelu triantenarnih glikana, svaka ciljana manipulacija značajno je utjecala na ekspresiju barem jedne od dvije glikoziltransferaze uključene u proces njihovog nastanka (Slika 30c-f). Najjače utišavanje *HNF1A* dovelo je do smanjenja transkripcije *MGAT4A* (Fc = 0,57), dok je umjereno utišavanje s dvije sgRNA rezultiralo značajnim smanjenjem ekspresije *MGAT4A* i *MGAT4B* (Fc = 0,82 odnosno 0,90). Slabo utišavanje *HNF1A*, kao i ciljano utišavanje *HNF4A*, rezultiralo je istim obrascem promjena ekspresije - došlo je do porasta transkripcije oba gena (Fc = 1,58 odnosno 1,81 za tri sgRNA ili 1,16 odnosno 1,79 za *HNF4A*). Ni jedna od navedenih promjena ekspresije ne korelira s promjenama udjela triantenarnih glikana. Ekspresija *MGAT5* nije značajno promijenjena nakon jakog i umjerenog utišavanja *HNF1A*, a slabo utišavanje, kao i ciljano utišavanje *HNF4A*, rezultirali su porastom transkripcije (Fc = 2,05 odnosno 1,52) (Slika 30c-f). Jedina jasna podudarnost između promjena udjela razgranatih glikana i transkripcijske aktivnosti odgovarajućih glikoziltransferaza uočena je pri slabom utišavanju *HNF1A*. U tim se uvjetima porast ekspresije *MGAT5*, zajedno s prethodno opisanim porastom ekspresije *MGAT4A* i *MGAT4B*, podudarao s povećanjem udjela tetraantenarnih glikana koji predstavljaju krajnji produkt uzastopnog djelovanja tih enzima.



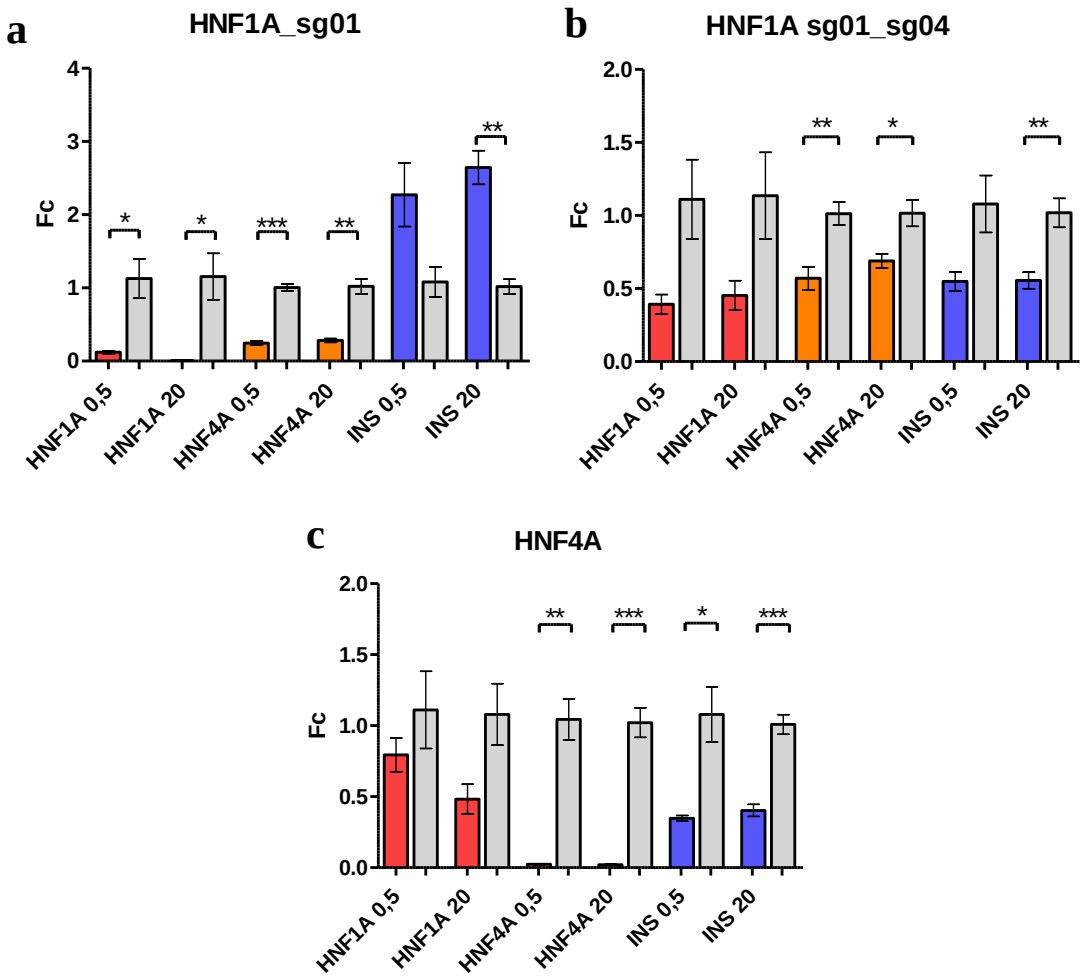
Slika 30. Promjene udjela glikana s tri (a) i četiri (b) grane te ekspresija gena koji kodiraju glikoziltransferaze odgovorne za razgranate glikanske strukture, u liniji EndoC-KRAB nakon ciljanog utišavanja gena *HNF1A* s jednom (c), dvije (d) i tri sgRNA (e), te ciljanog utišavanja gena *HNF4A* s dvije sgRNA (f). Ukupni je glikom analiziran metodom HILIC-UHPLC-

MS/MS nakon čega su grupirani svi kromatografski pikovi koji sadrže tri, odnosno četiri grane. Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR petog dana nakon transdukcije i prikazana kao relativna promjena ekspresije u odnosu na *non-target* kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.7. Utjecaj ciljanog utišavanja gena *HNF1A* ili *HNF4A* na GSIS

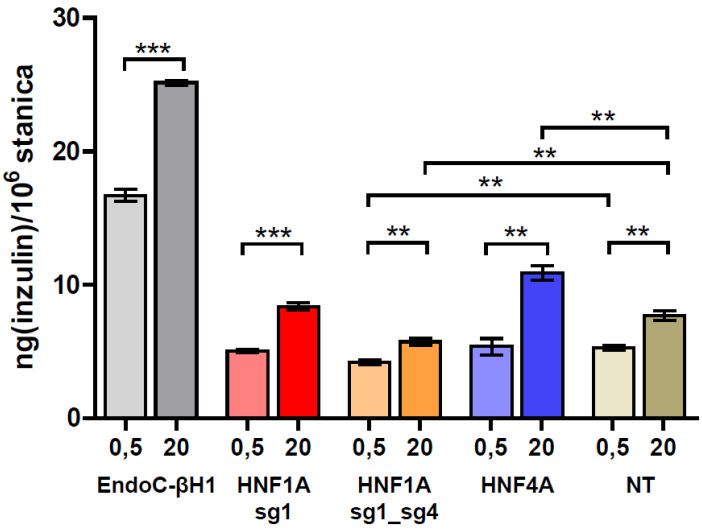
Kako bi se analizirao utjecaj ciljanog utišavanja *HNF1A* ili *HNF4A* na temeljnu ulogu beta stanica, glukozom stimulirano lučenje inzulina, napravljena je analiza GSIS-a. Stimulacije glukozom rađene su u izvornoj staničnoj liniji EndoC-βH1 te u stabilnim linijama EndoC-KRAB, s ugrađenim sgRNA za utišavanje gena *HNF1A* ili *HNF4A*, peti dan nakon transdukcije s vektorima koji sadrže sgRNA. Stanice su najprije izgladnjivane 24 sata prije tretmana, a potom tretirane 0,5 ili 20 mM glukozom kroz 40 minuta. Količina izlučenog inzulina određena je metodom ELISA.

Nakon tretmana analizirana je promjena ekspresije ciljanih gena te nizvodnog gena *INS* koji kodira za inzulin. Ciljanje jednom sgRNA dovelo je do višestrukog utišavanja *HNF1A* što je za posljedicu imalo i smanjenje ekspresije *HNF4A* (Slika 31a). Suprotno očekivanju, ekspresija gena *INS* nije bila smanjena već značajno povećana (Fc = 2,64). Utišavanje *HNF1A* s dvije sgRNA opet je dovelo do umjerenog smanjenja ekspresije *HNF1A* i blažeg, ali značajnog utišavanja *HNF4A* (Slika 31b). Ovakvo umjereno utišavanje imalo je i ovoga puta različit učinak od jakog utišavanja te je dovelo do značajnog smanjenja ekspresije gena *INS* (Fc = 0,56), baš kao i utišavanje *HNF4A* (Fc = 0,40) (Slika 31c). Zanimljivo je da je ciljano utišavanje *HNF4A* u ovom eksperimentu bilo višestruko veće nego u prvim testiranjima kada je nakon utišavanja analiziran ukupan glikom, a prilikom koje su i nizvodne promjene ekspresije *HNF1A* i *INS* bile manjeg intenziteta, ali istog smjera.



Slika 31. Promjene ekspresije gena od interesa nakon stimulacije stanica EndoC-KRAB s koncentracijama glukoze od 0,5 mM i 20 mM u linijama s utišanim genom *HNF1A* ili genom *HNF4A*. Gen *HNF1A* utišan je pomoću jedne (a) ili dvije (b) sgRNA dok je gen *HNF4A* utišan pomoću dvije sgRNA (c). Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR petog dana nakon transdukcije i prikazana kao relativna promjena ekspresije u odnosu na *non-target* kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Najveća promjena u lučenju inzulina vidljiva je između izvorne stanične linije EndoC-βH1 i izvedene stabilne linije EndoC-KRAB, koja sadrži stabilno ugrađenu fuziju *Sp* dCas9-KRAB (NT). Iako izvedena linija ima očuvanu sintezu inzulina, kao i očuvan GSIS, intenziteti lučenja inzulina sa i bez podražaja bili su znatno manji nego u izvornoj liniji (5,27 ng inzulina naspram 16,69 ng bez podražaja odnosno 7,7 ng naspram 25,15 ng nakon podražaja glukozom) (Slika 32).



Slika 32. Izlučivanje inzulina iz stanične linije EndoC-KRAB s utišanim genima *HNF1A* ili *HNF4A* nakon stimulacije s koncentracijom glukoze od 0,5 mM i 20 mM. Stimulacije glukozom rađene su peti dan nakon transdukcije s vektorima koji sadrže sgRNA, a količina izlučenog inzulina određivana je metodom ELISA i normalizirana na ukupan broj stanica po replici (n = 5). EndoC-βH1 predstavlja izvornu staničnu liniju, HNF1A_sg1 i HNF1A_sg1_4 označavaju stanice u kojima je *HNF1A* utišan s jednom odnosno dvije sgRNA, HNF4A označava stanice u kojima je ciljano utišan *HNF4A*, dok kontrola NT predstavlja stanice u koje je ugrađena *non-target* sgRNA. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

U stabilnoj staničnoj liniji EndoC-KRAB ciljano utišavanje gena *HNF1A* ili *HNF4A* nije dovelo do gubitka GSIS-a, međutim utvrđena je razlika u količini bazalno izlučenog inzulina, kao i količini izlučenog inzulina nakon podražaja 20 mM glukozom u odnosu na kontrolnu liniju NT. U usporedbi s kontrolom NT, ciljano utišavanje *HNF1A* s jednom sgRNA nije dovelo do značajnih promjena u lučenju inzulina niti u bazalnim uvjetima, a niti nakon stimulacije glukozom. Ipak, utišavanje s dvije sgRNA rezultiralo je smanjenjem bazalno izlučenog inzulina i inzulina izlučenog nakon podražaja glukozom od 21 %, odnosno 26 % (Slika 32). Utišavanje *HNF4A* dovelo je do drugačije promjene; bazalna razina izlučenog inzulina nije se promijenila u odnosu na kontrolu NT, ali došlo je do značajnog porasta izlučenog inzulina od 41 % nakon podražaja glukozom u odnosu na kontrolu NT.

4.8. Utjecaj povišenih koncentracija glukoze i palmitinske kiseline na ukupni *N*-glikom i ekspresiju gena od interesa

Izloženost beta stanica povišenim koncentracijama glukoze i masnih kiselina uzrokuje disfunkciju beta stanica, pojavu poznatu kao glukotoksičnost odnosno lipotoksičnost. Kako bi se odredio učinak povišenih koncentracija glukoze i masnih kiselina na ukupni *N*-glikom korištenog staničnog modela beta stanica, linija EndoC-βH1 tretirana je glukozom koncentracije 20 mM i palmitinskom kiselinom koncentracije 1 mM ili pak kombinacijom glukoze i palmitinske kiseline tijekom 72 sata.

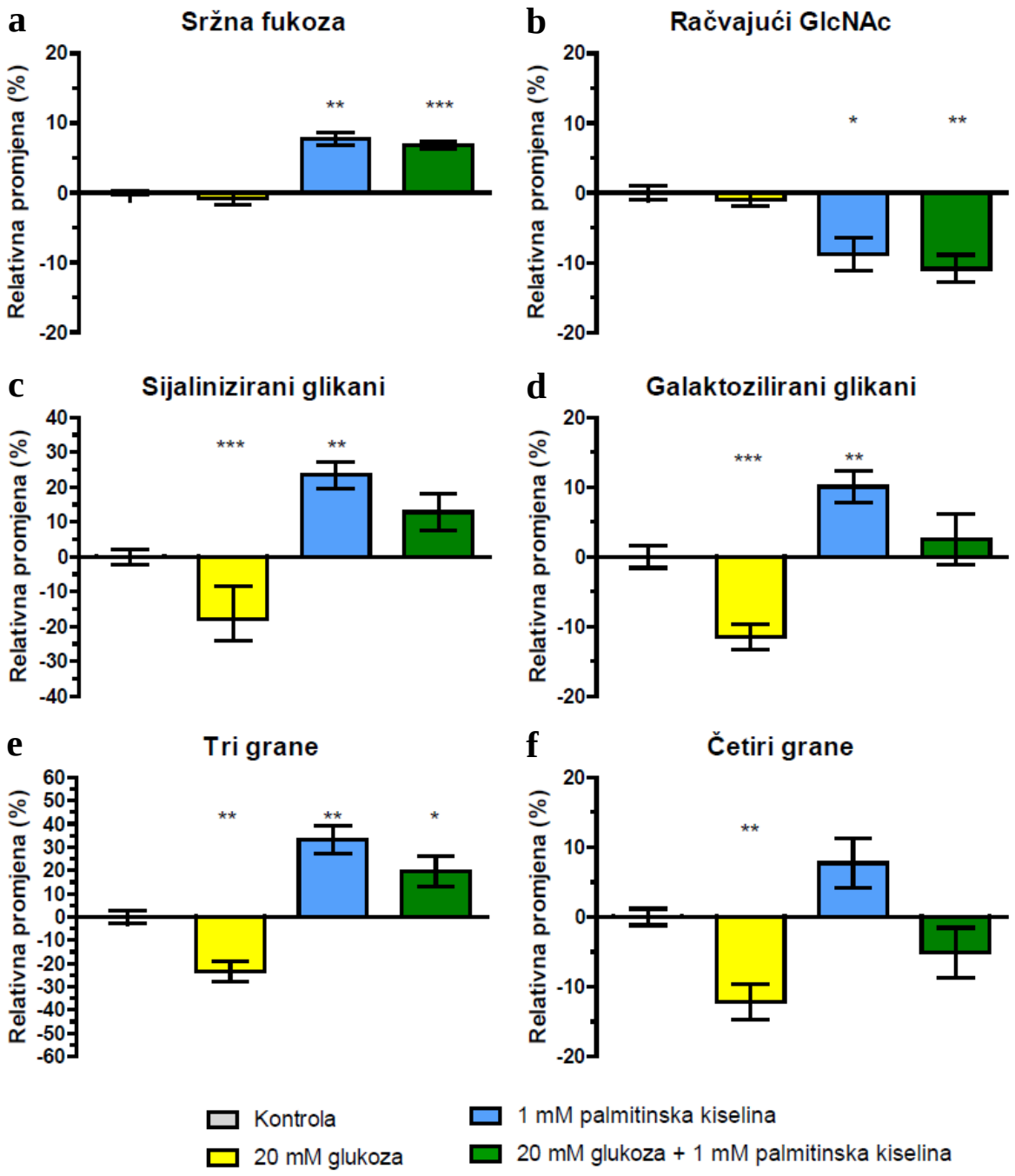
Većina analiziranih deriviranih svojstava mijenja se na različite načine ovisno o tome jesu li stanice bile izložene glukozi ili palmitinskoj kiselini (Slika 33). Povišena koncentracija glukoze ne utječe značajno na udio sržno fukoziliranih glikana, dok palmitinska kiselina dovodi do značajnog porasta relativnog udjela glikana koji sadrže sržnu fukozu (+ 7,71 %; Slika 33a). Isti je učinak imala i kombinacija glukoze i palmitinske kiseline (+ 6,87 %).

Povišena glukoza nije značajno utjecala ni na udio glikana s račvajućim GlcNAc, dok su palmitinska kiselina, kao i kombinacija s glukozom, dovele do značajnog smanjenja udjela ovih glikanskih sruktura (-8,78 odnosno -10,82 %; Slika 33b).

Preostala derivirana svojstva pokazala su isti obrazac promjene ovisno o tome jesu li stanice bile izložene glukozi, palmitinskoj kiselini ili kombinaciji oba faktora. Povišena koncentracija glukoze dovela je do smanjenja kompleksnosti ukupnog glikoma. Značajno se smanjio udio glikana s tri i četiri grane (-23,39 odnosno -12,16 %), a smanjio se i udio glikana koji su sijalinizirani te galaktozilirani (-17,91 odnosno -11,44 %) (Slika 33c-f). Palmitinska kiselina dovela je do suprotnog obrasca promjena; udio galaktoziliranih i sijaliniziranih glikana značajno je porastao (+ 10,06 odnosno + 23,49 %), kao i udio triantenarnh glikana (+ 33,23 %; Slika 33c-e), dok je udio tetraantenarnih glikana pokazao tendenciju rasta, ali taj porast nije bio statistički značajan (Slika 33f).

Kombinacija glukoze i palmitinske kiseline dovela je do promjena koje nalikuju kombinaciji zasebnih utjecaja oba faktora. Udio sijaliniziranih glikana bio je povećan, ali ne značajno kao prilikom zasebnog tretmana palmitinskom kiselinom (Slika 33c), isto kao i udio galaktoziliranih glikana (Slika 33d) te triantenarnih glikana (Slika 33e). Udio tetraantenarnih

glikana pokazao je tendenciju smanjenja (iako statistički neznačajnu) što odgovara zasebnom tretmanu glukozom (Slika 33f).



Slika 33. Utjecaj tretmana stanica EndoC-βH1 glukozom (20 mM), palmitinskom kiselinom (1 mM) te kombinacijom glukoze i palmitinske kiseline kroz 72 sata na ukupni stanični *N*-glikom. Analizirani su udjeli glikana koji sadrže sržnu fukozu (a), račvajući GlcNAc (b), sijalinsku kiselinu (c) i galaktozu (d), te udjeli triantenarnih (e) i tetraantenarnih (f) glikanskih struktura. Ukupni je glikom analiziran metodom HILIC-UHPLC-MS/MS nakon čega su

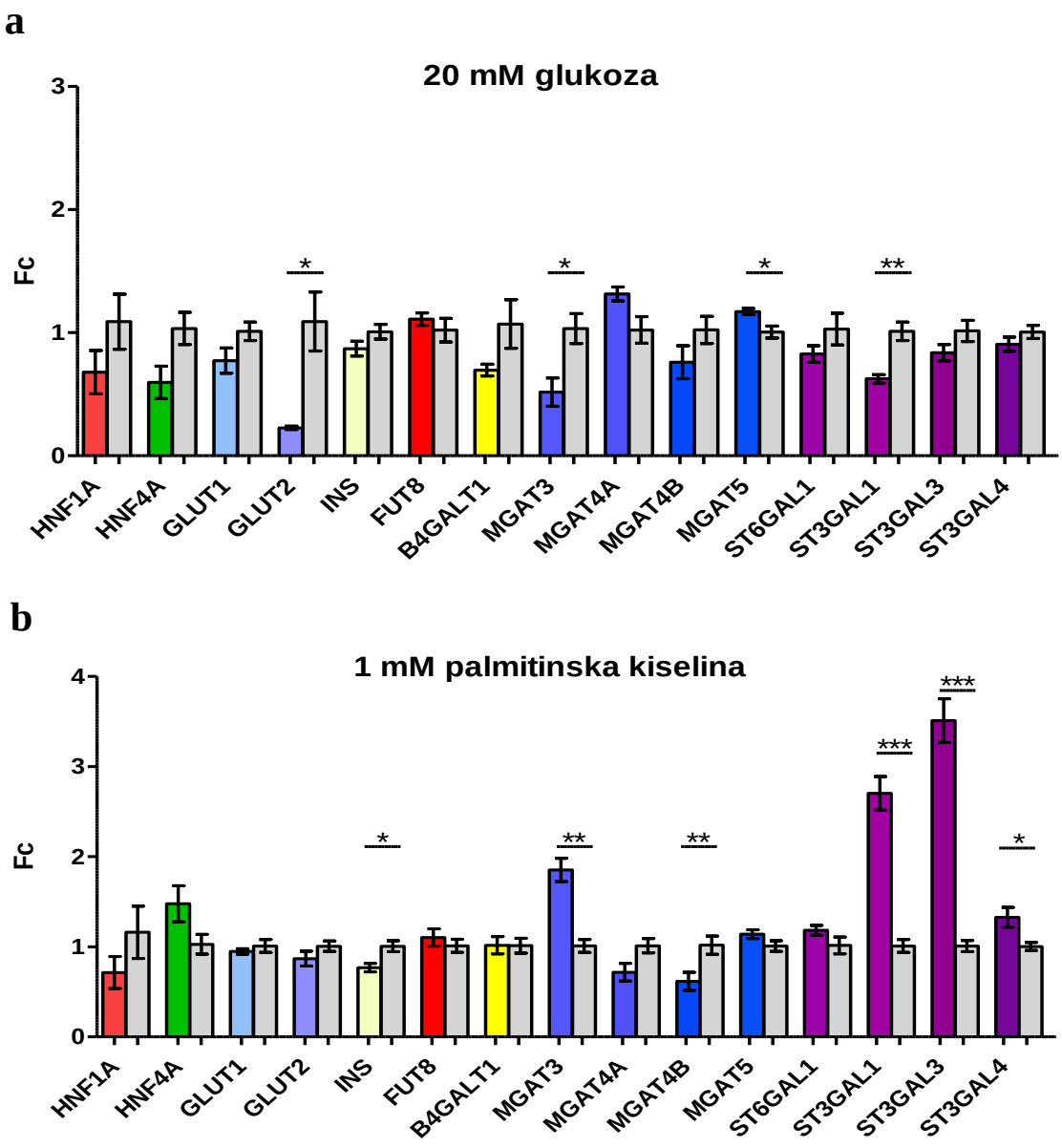
grupirani svi kromatografski pikovi koji sadrže pojedine glikanske strukture. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Uz promjene glikoma analizirane su i promjene ekspresije gena *HNF1A* i *HNF4A* te nizvodnih gena od interesa koji su praćeni i nakon ciljanih utišavanja *HNF1A* i *HNF4A*. Sva tri tretmana rezultirala su smanjenjem ekspresije *HNF1A*, (iako ne statistički značajnim) dok je tretman glukozom smanjio, a tretmana palmitinskom kiselinom povećao transkripciju *HNF4A* (Slika 34a-c). Ekspresija gena *INS* je pak značajno smanjena nakon tretmana palmitinskom kiselinom ili kombinacijom palmitinske kiseline i glukoze, dok sama glukoza nije značajno utjecala na njegovu ekspresiju. Promjene ekspresije *INS* bile su stupnjevite; tretman glukozom nije djelovao značajno na ekspresiju, tretman palmitinskom kiselinom doveo je do značajnog smanjenja ekspresije (Fc = 0,77), a kombinacija tretmana rezultirala je najvećim smanjenjem ekspresije (Fc = 0,67). Ekspresija gena *GLUT*1 i *GLUT2* nije se značajno mijenjala uz iznimku smanjenja ekspresije *GLUT2* nakon tretmana glukozom (Fc = 0,23; Slika 34a).

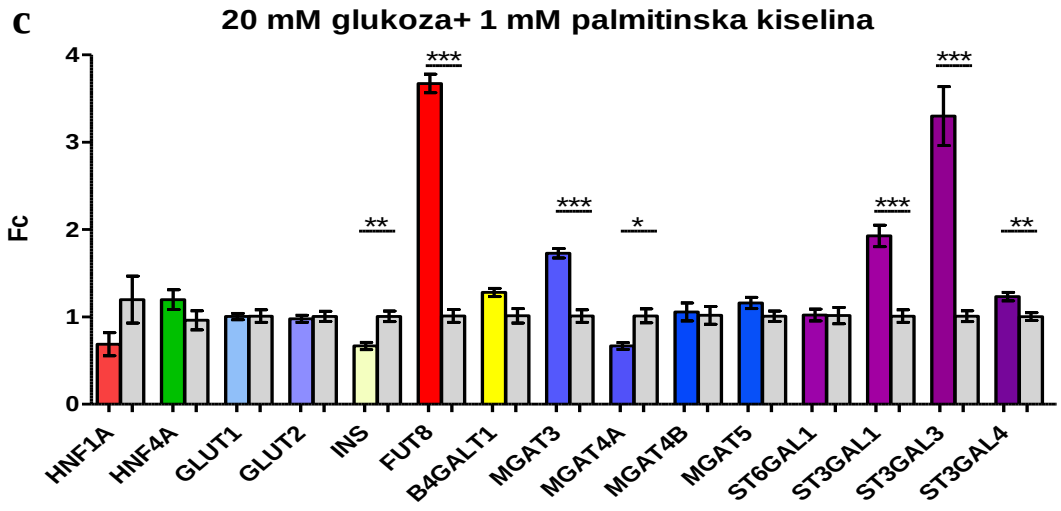
Utjecaj povišene glukoze na ekspresiju glikoziltransferaza bio je raznolik. Ekspresija galaktoziltransferaze *B4GALT1* pokazuje tendenciju smanjenja, iako promjena nije dosegla značajnost, dok je ekspresija *MGAT5* značajno povećana (Fc = 1,17; Slika 34a). Ekspresija svih sijaliltransferaza pokazuje tendenciju smanjenja, a značajno je smanjena ekspresija *ST3GAL1* (Fc = 0,62).

Tretmani palmitinskom kiselinom, kao i kombinacija tretmana glukoze i palmitinske kiseline, doveli su do sličnih promjena ekspresije gena. Oba su tretmana dovela do značajnog porasta ekspresije *MGAT3* (Fc = 1,85 odnosno 1,73), kao i svih gena za α2-3 sijaliltransferaze (Slika 34b, c). Tretman palmitinskom kiselinom i kombinirani tretman glukozom i palmitinskom kiselinom imali su najizraženiji učinak na ekspresiju *ST3GAL3* (povećanje od Fc = 3,67 odnosno Fc = 3,29). Ekspresija *ST3GAL1* i S*T3GAL4* porasla je blaže, s vrijednostima Fc = 2,70 i 1,33 nakon tretmana palmitinskom kiselinom odnosno Fc = 1,93 i 1,23 nakon kombiniranog tretmana. Dok promjene ekspresije gena *MGAT3* nisu u korelaciji s izmjerenim promjenama udjela glikana s račvajućim GlcNAc, promjene transkripcije gena za sijaliltransferaze i udjela sijaliniziranih glikana djelomično koreliraju. Kombinirani tretman stanica uzrokovao je višestruki porast transkripcije gena *FUT8* (Fc = 3,67) koji je popratio porasta udjela glikanskih struktura sa sržnom fukozom (Slika 34c). Zasebni tretman palmitinskom kiselinom također je uzrokovao porast udjela sržno fukoziliranih glikana, no bez

značajne promjene ekspresije *FUT8*. Također, značajno je promjenjena ekspresija *MGAT4A* (Fc = 0,67) nakon tretmana palmitinskom kiselinom, odnosno *MGAT4B* (Fc = 0,62) nakon kombiniranog tretmana. Oba gena kodiraju za glikoziltransferaze ključne za nastanak triantenarnih glikana, no kontraintuitivno oba su tretmana dovela do porasta udjela triantenarnih glikana unatoč smanjenju transkripcije odgovarajućih gena (Slika 34b, c).



Slika 34. Nastavak i opis slike nalaze se na sljedećoj stranici

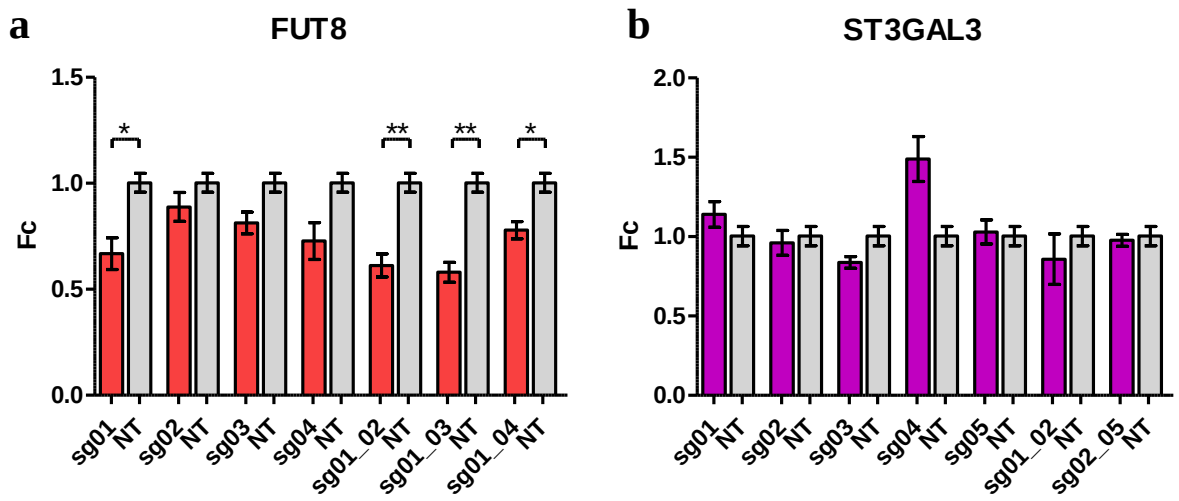


Slika 34. Utjecaj tretmana stanica EndoC-βH1 glukozom koncentracije 20 mM (a) i palmitinskom kiselinom koncentracije 1 mM (b) te kombinacijom glukoze i palmitinske kiseline (c) kroz 72 sata na ekspresiju gena od interesa. Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR nakon 72 sata tretmana i prikazana kao relativna promjena ekspresije u odnosu na kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * p <0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

4.9. Ciljana aktivacija gena *FUT8* i *ST3GAL3*

Na temelju svih uočenih promjena transkripcijske aktivnosti nizvodnih gena uslijed ciljanog utišavanja *HNF1A* ili *HNF4A* te kao posljedica tretmana stanica povišenim koncentracijama glukoze i palmitinske kiseline, za ciljanu aktivaciju odabrana su dva gena: *FUT8* i *ST3GAL3*. Oba su gena u prijašnjim eksperimentima pokazala značajno povećanje ekspresije kao posljedicu utišavanja ciljanih gena, prije svega *HNF1A*, kao i prilikom tretmana stanica.

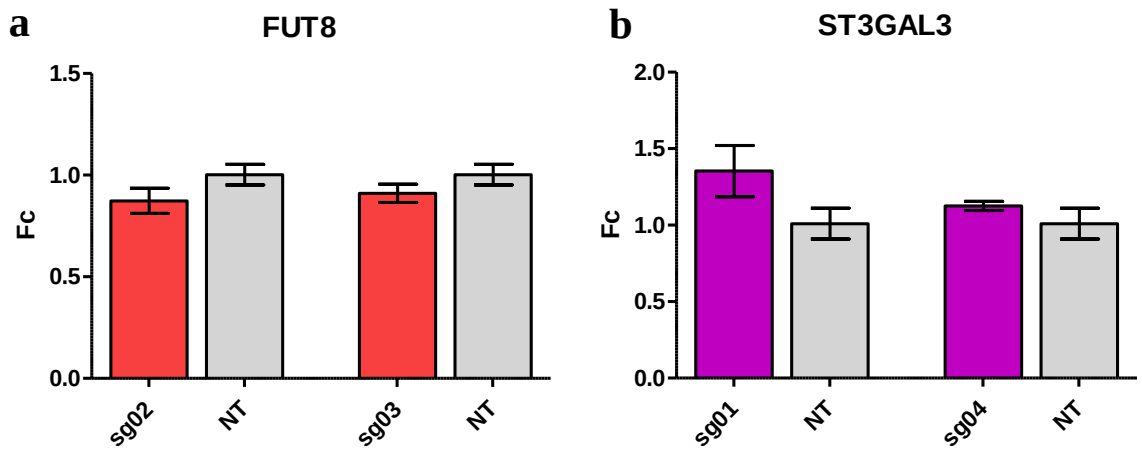
Kako bi se efikasno testirao veći broj sgRNA za aktivaciju izabranih gena fuzijom dCasMINI-VPR, i ovoga je puta veći broj sgRNA i njihovih kombinacija testiran u staničnoj liniji HEK293T (Slika 35). Niti jedna od testiranih sgRNA ili kombinacija sgRNA kojima se ciljao gen *FUT8* nije dovela do željenog povećanja genske ekspresije, već je naprotiv dovela do njezinog smanjenja, u nekim slučajevima čak i statistički značajnog (Fc u rasponu od 0,89 za sg02 do 0,58 za sg01_03; Slika 35a).



Slika 35. Promjene ekspresije gena *FUT8* (a) i *ST3GAL3* (b) nakon ciljane aktivacije fuzijom dCasMINI-VPR u C-terminalnoj orijentaciji u staničnoj liniji HEK293T. Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR petog dana nakon transfekcije i prikazana kao relativna promjena ekspresije u odnosu na *non-target* kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Aktivacija gena *ST3GAL3* s dvije odvojene sgRNA, sg01 i sg04, rezultirala je blagim povećanjem ekspresije, iako statistički ne značajnim (Fc = 1,14 odnosno 1,49), u staničnoj liniji HEK293T (Slika 35b).

Iako preliminarno testiranje u staničnoj liniji HEK293T nije rezultiralo povećanjem ekspresije nijednog od dva odabrana gena, po dvije sgRNA za oba gena testirane su i u liniji EndoC-dCasMINI-VPR kako bi se vidjelo je li uzrok ovom rezultatu stanična specifičnost. Za *FUT8* odabrane su molekule sgRNA 02 i 03 koje su dovele do najslabijeg smanjenja ekspresije u liniji HEK293T. Korištenje ovih sgRNA u liniji EndoC-dCasMINI-VPR također je dovelo do neznatnog smanjenja ekspresije *FUT8* (Slika 36a) što znači da *FUT8* nije uspješno aktiviran ni u jednom staničnom modelu. Za aktivaciju *ST3GAL3* odabrane su molekule sgRNA sg01 i sg04. Kao i prilikom testiranja u liniji HEK293T, i u liniji EndoC-dCasMINI-VPR obje sgRNA dovele su do blagog povećanja ekspresije ciljanog gena, ali to povećanje nije bilo značajno (Slika 36b). Iz tog razloga daljnje analize promjena glikoma i utjecaja aktivacije gena od interesa na GSIS nisu provedene.



Slika 36. Promjene ekspresije gena *FUT8* (a) i *ST3GAL3* (b) nakon ciljane aktivacije fuzijom dCasMINI-VPR u C-terminalnoj orijentaciji u staničnoj liniji EndoC-dCasMINI-VPR. Ekspresija je analizirana metodom RT-qPCR petog dana nakon transdukcije i prikazana kao relativna promjena ekspresije u odnosu na *non-target* kontrolu. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SEM. Rezultati su analizirani Welchovim *t*-testom; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5. Diskusija

Beta stanice gušterače jedini su fiziološki izvor inzulina u organizmu te imaju ključnu ulogu u održavanju homeostaze glukoze. Njihova obilježja i mehanizmi regulacije predmet su opsežnih istraživanja već desetljećima, s ciljem boljeg razumijevanja nastanka dijabetesa i razvoja novih pristupa njegovu liječenju [198]. Kako bi se mehanizmi koji reguliraju razvoj, identitet i funkciju beta stanica što preciznije razjasnili, suvremena istraživanja oslanjaju se na komplementarne pristupe koji obuhvaćaju genomske i epigenomske analize, funkcionalnu validaciju kandidat gena, molekularnu analizu primarnih Langerhansovih otočića, rad sa stabilnim beta-staničnim linijama čovjeka i stanične modele dobivene diferencijacijom pluripotentnih matičnih stanica [30], [89], [199]. U tom su kontekstu vjerodostojni stanični modeli koji omogućuju ciljane i kontrolirane manipulacije iznimno važni jer omogućuju povezivanje opažanja iz širokih istraživanja genoma, epigenoma, proteoma i metaboloma (*omics-analyses)* s preciznim ispitivanjem molekularnih mehanizama odgovornih za funkciju i disfunkciju beta stanica.

Primarni Langerhansovi otočići i beta stanice čovjeka predstavljaju fiziološki najrelevantniji *ex vivo* model za istraživanje njihove funkcije. Međutim, njihova ograničena dostupnost, varijabilnost između donora, heterogeni stanični sastav i otežan unos genskog materijala ograničavaju mogućnost provedbe ujednačenih i ciljanih manipulacija. Stabilne stanične linije sa sposobnošću diobe, poput linije EndoC-βH1, uvelike olakšavaju ciljane manipulacije i dragocjen su izvor informacija. Ipak, njihova proliferativna sposobnost sama po sebi ne rješava problem unosa genskog materijala. Transfekcije stanica EndoC-βH1 uspješno su provedene reagensima Lipofectamine i FuGENE, no prethodna istraživanja uglavnom unose male molekule siRNA, reporterske plazmide ili ekspresijske vektore razmjerno jednostavne građe [84], [200], [201], [202], [203]. Nasuprot tome, ciljane manipulacije sustavom CRISPR/Cas9 u stanicama EndoC-βH1 pretežno su se oslanjale na unos vektora lentivirusnom transdukcijom. Grotz i suradnici [204] koristili su lentivirusni jednovektorski sustav koji je sadržavao Cas9, sgRNA i biljeg rezistencije na puromicin, dok su Cardenas-Diaz i suradnici [205] također lentivirusno unijeli Cas9 i sgRNA te analizirali uređene poliklonske populacije.

Navedena razlika upućuje na to da osnovni problem nije mogućnost unosa bilo kojeg oblika nukleinske kiseline u staničnu liniju EndoC-βH1 već učinkovit unos velikih vektora uz očuvanje dovoljnog broja vijabilnih stanica za naknadnu selekciju i umnažanje. Vektori potrebni za ciljane manipulacije u ovom radu sadržavali su Cas9 ili dCas povezan s

efektorskom domenom, fluorescentne i selekcijske markere te, ovisno o izvedbi, ekspresijsku kazetu sgRNA, zbog čega je njihova veličina iznosila približno 10 kb. Kako bih provjerio mogu li se takvi konstrukti unijeti metodama koje ne koriste viruse, testirao sam sve u laboratoriju dostupne transfekcijske postupke koristeći vektor čija je veličina odgovarala veličini planiranih finalnih konstrukata.

Sve testirane metode rezultirale su vrlo malim udjelom stanica koje su uspješno primile vektor, dok je većina postupaka rezultirala velikom smrtnošću stanica. S obzirom na to da prethodno objavljeni radovi, koji koriste transfekciju kao metodu unosa u stanice EndoC-βH1, uglavnom unose manje RNA molekule ili jednostavnije reporterske i ekspresijske vektore, veličina konstrukta korištenog u ovom radu najvjerojatnije je bila ključan čimbenik slabe učinkovitosti transfekcije. Problem pritom nije bio ograničen na početni udio transfeciranih stanica. Nakon antibiotske selekcije preostala je vrlo mala i prostorno raspršena populacija, koja nije mogla održati gustoću potrebnu za oporavak i daljnje umnažanje. Ovo je osobito važno za stanice EndoC-βH1 koje se sporo umnažaju odnosno imaju vrijeme udvostručavanja od približno tjedan dana i ne mogu se uspješno umnažati iz pojedinačnih stanica.

Razdvajanje sustava na dva manja transfekcijska vektora ne bi uklonilo osnovno ograničenje. Vektor koji sadrži Cas9 ili dCas povezan s efektorskom domenom i dalje bi bio velik, dok bi za funkcionalnost sustava ista stanica morala istodobno primiti i zadržati oba plazmida. Svaki bi vektor uz to morao sadržavati zaseban selekcijski marker, pa bi izdvajanje dvostruko transfeciranih stanica zahtijevalo selekciju upotrebom dva različita antibiotika. U uvjetima u kojima je i nakon jednostruke selekcije ostalo svega nekoliko posto stanica početne populacije, takav bi pristup dodatno smanjio vjerojatnost dobivanja dovoljnog broja vijabilnih, potpuno modificiranih stanica.

Zbog toga je za daljnje eksperimente odabrana lentivirusna transdukcija koja omogućuje stabilnu ugradnju prvog dijela sustava, postupnu selekciju i umnažanje modificirane populacije prije unosa drugog vektora. Takav pristup nije moguć primjenom prolazne transfekcije jer se prvi plazmid tijekom vremena gubi. Lentivirusni prijenos ipak ne uklanja u potpunosti problem veličine konstrukta: učinkovitost transdukcije manjih vektora u ovom je radu nakon optimizacije iznosila 60–70 %, dok je za vektore veće od 9 kb iznosila svega nekoliko posto. Takav je rezultat u skladu s prethodno pokazanim smanjenjem funkcionalnog titra, učinkovitosti pakiranja i infektivnosti lentivirusnih čestica s porastom veličine vektorskog genoma, osobito kada se njegova veličina približava 10 kb [206]. Međutim, za razliku od

prolazne transfekcije, stabilna ugradnja omogućila je da se i početno malen broj transduciranih stanica postupno selektira i umnoži, čime su dobivene stabilne linije EndoC-βH1 potrebne za daljnje ciljane manipulacije.

Dodatni izazov predstavljala je optimizacija proizvodnje i koncentriranja lentivirusnih čestica jer u korištenom sustavu nije bila dostupna ultracentrifuga, koja se često primjenjuje za koncentriranje lentivirusnih čestica. Kao alternativni pristup korištena je precipitacija polietilen-glikolom 8000 (PEG 8000), koja se pokazala dovoljno učinkovitom za dobivanje virusnih čestica kojima su u stanice EndoC-βH1 uspješno uneseni vektori veličine do 10 kb. Time je uspostavljen funkcionalan protokol koncentriranja lentivirusnih čestica primjenjiv u uvjetima bez dostupne ultracentrifuge.

Ograničenja povezana s unosom velikih vektora u stanice EndoC-βH1 pokazala su da, uz optimizaciju same metode unosa, postoji i potreba za prilagodbom sastava i smanjenjem veličine konstrukata za ciljane manipulacije. Sustav CRISPR/Cas9 i njegove izvedenice koje se temelje na katalitički inaktivnom proteinu dCas9 omogućuju različite oblike ciljane manipulacije gena. Aktivnim proteinom Cas9 moguće je postići ciljanu inaktivaciju gena, dok povezivanje dCas9 s različitim efektorskim domenama omogućuje direktnu represiju ili aktivaciju transkripcije ili pak modificiranje epigenetičkih oznaka. Modularni sustav temeljen na sastavljanju prema principu Golden Gate, prethodno razvijen i korišten u Laboratoriju za epigenetiku Zavoda za molekularnu biologiju BO, omogućavao je izradu konstrukata za ciljanu aktivaciju i utišavanje ekspresije, ali nije sadržavao modul aktivne nukleaze potreban za potpunu inaktivaciju gena. Broj dostupnih promotorskih modula i dCas efektora također je bio ograničen. Iako to nije nužno ograničavalo primjenu sustava u drugim staničnim modelima, specifična obilježja linije EndoC-βH1 i potreba za lentivirusnim unosom velikih konstrukata nametnuli su potrebu za njegovim proširenjem.

Konstrukcijom modula s promotorom RIP2 dobivena je mogućnost ekspresije pod kontrolom promotora specifičnog za beta stanice. Ovaj je promotor znatno manji od prethodno korištenog snažnog promotora EF1A čime se smanjila ukupna veličina finalnog vektora i ostavilo se više prostora za ugradnju ostalih funkcionalnih modula. Modul aktivne nukleaze *Sp* Cas9 dodatno je proširio mogućnosti sustava jer je, uz prethodno dostupnu ciljanu aktivaciju i represiju ekspresije, omogućio i ciljanu inaktivaciju gena.

Posebno važnu nadogradnju predstavljao je modul s katalitički inaktivnom nukleazom dCasMINI. Ova varijanta proteina dCas inženjerski je optimiziran kompaktni protein izveden iz Cas12f te ima 529 aminokiselina, što ga čini oko 62 % manjim od *Sp*Cas9. Njegova kraća kodirajuća sekvenca omogućuje znatno smanjenje veličine konstrukata čak i nakon povezivanja s efektorskim domenama; primjerice, kodirajući slijed fuzije dCasMINI-VPR dugačak je približno 3,3 kb što je gotovo 800 parova baza manje od kodirajućeg slijeda samostalnog dCas9. Time se povećava raspoloživi kapacitet vektora za promotore, selekcijske i fluorescentne markere te druge funkcionalne elemente, a ujedno se olakšava pakiranje lentivirusnih čestica i unos finalnih konstrukata u stanice. Budući da se lentivirusna transdukcija pokazala najprikladnijim pristupom za stabilne manipulacije u stanicama EndoC-βH1, smanjenje veličine proteina Cas predstavljalo je izravno rješenje jednoga od glavnih tehničkih ograničenja utvrđenih u ovom radu.

Obje konstruirane orijentacije dCasMINI-VPR uspješno su aktivirale ekspresiju svih testiranih gena, ali je C-terminalna fuzija u svim pokusima rezultirala većim porastom ekspresije od N-terminalne fuzije. Xu i suradnici tijekom razvoja sustava također su ispitali više arhitektura fuzijskog proteina koje su se razlikovale položajem VPR domene, veznim sljedovima i nuklearnim lokalizacijskim signalima te su selektirali konfiguraciju s VPR domenom na C-terminalnom kraju dCasMINI [189]. Rezultati dobiveni u ovom radu stoga dodatno podupiru prikladnost C-terminalnog položaja VPR domene za ciljanu aktivaciju transkripcije. Istodobno, aktivnost obje fuzije pokazuje da prilagodbe uvedene radi uklapanja dCasMINI u modularni sustav, uključujući izmjenu veznog slijeda između dCasMINI i VPR domene, nisu narušile funkcionalnost aktivacijskog sustava.

U kombinaciji s kreiranim multi-guide modulom, koji omogućuje istodobnu uporabu do šest različitih sgRNA, uvođenje dCasMINI proširilo je funkcionalnost sustava u dva komplementarna smjera. Multi-guide modul omogućuje istodobno ciljanje većeg broja genomskih mjesta, dok manja veličina dCasMINI smanjuje ukupnu veličinu finalnih konstrukata i time olakšava njihovo lentivirusno pakiranje. Kompaktnost dCasMINI ujedno otvara mogućnost budućeg proširenja modularnog sustava za uporabu s vektorima još manjeg kapaciteta, poput AAV-a, iako bi za takvu primjenu bilo potrebno dodatno smanjiti regulatorne elemente i optimizirati način ekspresije većeg broja sgRNA.

Prva funkcionalna provjera kreiranog modula aktivne nukleaze *Sp*Cas9 provedena je u staničnoj liniji HepG2, modelu hepatocelularnog karcinoma, koji eksprimira dovoljne količine

HNF-1α i HNF-4α za izravnu analizu promjena na proteinskoj razini. U prvom je krugu lentivirusne transdukcije uspostavljena stabilna poliklonska populacija s ugrađenom ekspresijskom kazetom koja je sadržavala *Sp*Cas9 i selekcijske markere. Nakon selekcije stanice su u drugom krugu transducirane konstruktima koji su sadržavali jednu ili dvije sgRNA specifične za *HNF1A* ili *HNF4A*. Konstrukti s jednom sgRNA testirani su kako bi se identificirao najmanji funkcionalni sustav prikladan za kasnije lentivirusno pakiranje i primjenu u liniji EndoC-Cas9. Istodobno su testirani i konstrukti s parovima sgRNA, koji dovode do stvaranja dva loma DNA u relativnoj blizini što povećava vjerojatnost delecije i posljedično potpunog gubitka ciljanog proteina. U poliklonskim populacijama ljudskih stanica pokazano je da takav tandem pristup može rezultirati predvidljivijim uređivanjem alela te vrlo niskom ili nedetektabilnom količinom preostalog ciljnog proteina [207].

Učinak ciljane manipulacije analiziran je na proteinskoj razini jer je cilj bio postići gubitak transkripcijskih faktora HNF-1α ili HNF-4α. Nakon djelovanja *Sp*Cas9 transkript ciljanog gena može ostati mjerljiv, osobito kada nastala promjena ne dovodi do nestabilnosti i povećanje razgradnje same mRNA. Osim toga, insercije ili delecije koje ne mijenjaju okvir čitanja mogu dovesti do nastanka izmijenjenog, ali djelomično funkcionalnog proteina. Analiza metodom *Western blot* stoga omogućuje izravnu procjenu smanjenja količine ciljanog proteina, iako bez analize genomske DNA nije moguće razlikovati stanice s bialelnim promjenama od stanica s monoalelnim promjenama.

Tri dana nakon transdukcije svaka je testirana sgRNA dovela do smanjenja količine ciljanog proteina, ali niti jednom pojedinačnom sgRNA nije postignut njegov potpuni gubitak. Kombinacije dviju sgRNA u pravilu su imale izraženiji učinak, no nisu dovele do potpune inaktivacije *HNF1A* ili *HNF4A* u početnom testiranju. Ovi rezultati potvrđuju funkcionalnost kreiranog modula *Sp*Cas9, ali istodobno pokazuju da učinkovitost inaktivacije nije određena samo prisutnošću aktivne nukleaze već i aktivnošću pojedine sgRNA te vrstom promjena nastalih na ciljnom mjestu.

Za većinu testiranih konstrukata smanjenje količine ciljanog proteina bilo je slabije desetog nego trećeg dana nakon transdukcije. Budući da su analize provedene u poliklonskoj populaciji, dobiveni signal predstavlja prosjek stanica koje se razlikuju prema broju i mjestu integracija kazeta *Sp*Cas9 i sgRNA, razini njihove ekspresije te promjenama nastalim na pojedinim alelima. Slabljenje učinka tijekom vremena stoga može upućivati na relativno povećanje udjela stanica u kojima je uređivanje bilo slabije ili nije dovelo do gubitka funkcionalnog proteina.

Jedno od mogućih objašnjenja je različita sposobnost preživljavanja ili proliferacije pojedinih uređenih subpopulacija stanica. Ipak, u ovom slučaju to nije najvjerojatniji uzrok uzimajući u obzir rezultate ranijih radova. Naime, utišavanje *HNF1A* u HepG2 stanicama povezano je s gubitkom epitelnog fenotipa i indukcijom epitelno-mezenhimske tranzicije, dok je smanjena aktivnost *HNF4A* u hepatocelularnim modelima povezana i s pojačanom proliferacijom [208], [209]. Stoga, promjena koju sam opazio nakon provedenih eksperimenata u ovom radu vjerojatno odražava kombinaciju heterogenosti uređivanja stanica, razlika u ekspresiji dijelova sustava i mogućih promjena proliferacijskih svojstava pojedinih subpopulacija stanica, što samo analizom ukupne količine proteina nisam mogao detaljnije razlučiti.

Sljedeća funkcionalna provjera provedena je kako bi se usporedila učinkovitost prethodno korištenog promotora EFS s novokloniranim modulom promotora RIP2 u kombinaciji s aktivnom nukleazom *Sp*Cas9. Obje ekspresijske kazete najprije su lentivirusnom transdukcijom stabilno ugrađene u izvornu liniju EndoC-βH1, nakon čega su selekcijom dobivene poliklonske linije EndoC-EFS-Cas9 i EndoC-RIP2-Cas9. U drugom krugu transdukcije u obje su linije uneseni konstrukti s po dvije sgRNA specifične za *HNF1A* ili *HNF4A*, koje su se pokazale najučinkovitijima tijekom prethodnog testiranja u liniji HepG2-Cas9.

U obje stanične linije zabilježeno je smanjenje količine proteina HNF-1α odnosno HNF-4α, a smanjenje oba proteina bilo je izraženije u liniji EndoC-RIP-Cas9. Time je potvrđeno da je kreirani modul s promotorom RIP2 ne samo funkcionalan, nego rezultira i boljom efikasnošću nukleaze Cas9 u liniji EndoC-Cas9. Uz to, RIP2 je znatno manji od dosad korištenog promotora EF1A koji je bio jedina dostupna alternativa za jaču ekspresiju fuzijskih konstrukata naspram promotora EFS. Ipak, da bi se jači učinak mogao u potpunosti pripisati ovom promotoru, trebalo bi usporediti i količinu ekspresije same nukleaze Cas9 u oba sustava, kao i usporediti aktivnost u hipotetskoj monoklonskoj liniji koja ima jednak broj ugradnji unutar istih lokusa.

Unatoč primjeni dviju sgRNA, ni u jednoj liniji nije postignut potpuni gubitak proteina HNF-1α ili HNF-4α na razini cijele poliklonske stanične populacije. Takav rezultat ne isključuje postojanje pojedinačnih stanica s potpunom bialelnom inaktivacijom, nego pokazuje da njihov udio nije bio dovoljan da bi se ciljani protein prestao detektirati u ukupnom staničnom lizatu. Preostali signal mogao je potjecati od stanica u kojima nisu uređena oba alela, u kojima jedna ili obje sgRNA nisu bile dovoljno aktivne ili u kojima su popravkom DNA nastale promjene koje nisu dovele do gubitka okvira čitanja i proizvodnje funkcionalnog proteina. Također je

moguće da su uvedene promjene dovele do nastanka nefunkcionalnog proteina do čije potpune degradacije međutim ne dolazi, a poliklonsko antitijelo i dalje prepoznaje neizmijenjene proteinske dijelove.

Kako bih odabrao sgRNA koja omogućava potpuni gubitak proteina HNF-1α ili HNF-4α u liniji HepG2-Cas9 ispitao sam dodatni skup pojedinačnih sgRNA i njihovih kombinacija. Ni jedna od ispitanih sgRNA ili njihovih kombinacija ciljanih na *HNF4A* nije dovela do potpunog gubitka proteina, dok je jednom kombinacijom sgRNA za *HNF1A* postignut gotovo potpuni gubitak proteina HNF-1α. Ta je kombinacija, zajedno s prethodno testiranom kombinacijom, zatim upotrijebljena u staničnoj liniji EndoC-RIP2-Cas9. Iako su obje kombinacije smanjile količinu proteina HNF-1α, njihov je učinak bio znatno slabiji od onog postignutog u staničnoj liniji HepG2-Cas9. Pritom je prethodno testirana kombinacija sgRNA u ranijem pokusu u istoj liniji EndoC-RIP2-Cas9 dovela do gotovo potpunog gubitka HNF-1α, dok je u ovom pokusu njezin učinak bio znatno slabiji. Zbog toga se nedostatak učinka u ponovljenom pokusu ne može jednoznačno pripisati razlikama između staničnih linija HepG2 i EndoC, već upućuje na varijabilnost između neovisno dobivenih poliklonskih populacija. Takva varijabilnost može proizlaziti iz razlika u broju i mjestima integracije konstrukta sa sgRNA, razini njegove ekspresije, aktivnosti *Sp*Cas9 te udjelu stanica u kojima su funkcionalno inaktivirani svi ciljani aleli. Dobiveni rezultati potvrđuju da obje kombinacije sgRNA imaju željeni učinak u liniji EndoC-βH1, ali da on nije jednako reproducibilan između neovisnih transdukcija u poliklonskim populacijama stanica.

Stabilna stanična linija EndoC-KRAB izrađena je stabilnom ugradnjom fuzije *Sp* dCas9-KRAB za koju je potvrđena funkcionalnost u prijašnjim radovima [197], [210], [211]. Pristup je bio jednak kao u prethodnim eksperimentima: nakon stabilne ugradnje fuzije, stanice su selektirane do dobivanja čiste poliklonske linije nakon čega su u drugom krugu transdukcije unesene sgRNA specifične za gene *HNF1A* ili *HNF4A*.

Odabir sgRNA za ciljanje *HNF4A* zahtjevan je zbog velikog broja izoformi koje nastaju transkripcijom s dvaju promotora, P1 i P2. Budući da je P2 dominantan promotor u diferenciranim beta stanicama, korištene su dvije sgRNA usmjerene upravo na njegovu promotorsku regiju, a čija je učinkovitost prethodno potvrđena [29]. Gen *HNF1A* transkribira se s jednog promotora, zbog čega je odabir ciljnih mjesta bio jednostavniji. S obzirom na ključnu ulogu ovog transkripcijskog faktora u regulaciji funkcije beta stanica i razvoju

dijabetesa, testirane su pojedinačne sgRNA i njihove kombinacije u svrhu postizanja različitih razina utišavanja kako bi se ispitalo dovode li one do različitog staničnog odgovora.

Ciljano utišavanje gena *HNF4A* dovelo je do smanjenja njegove ekspresije na razini mRNA i proteina. Posljedično se smanjila i količina proteina HNF-1α, premda na razini mRNA nije bilo značajne promjene. Brojna su istraživanja potvrdila postojanje regulatorne petlje između HNF-1α i HNF-4α u stanicama gušterače, u kojoj smanjenje količine jednog faktora dovodi do smanjene ekspresije drugoga. Međutim, dobiveni rezultat u ovoj doktorskoj disertaciji nije u skladu opisanog regulatornog odnosa. Moguće je da kompenzacijski mehanizmi djelomično stabiliziraju razinu transkripta *HNF1A*. Pritom treba uzeti u obzir da je u eksperimentima u ovom radu korištena imortalizirana stanična linija koja, iako pokazuje obilježja beta stanica, nije u potpunosti istovjetna diferenciranim beta stanicama.

Ciljano utišavanje *HNF1A* također je dovelo do smanjenja njegove ekspresije na razini mRNA i proteina. Međutim, upotreba većeg broja sgRNA kojima se ciljao genski promotor nije dodatno pojačala represiju. Suprotno očekivanju, pojedinačna sgRNA dovela je do najvećeg smanjenja ekspresije i na razini mRNA i proteina, kombinacija dviju sgRNA imala je nešto slabiji učinak, dok je kombinacija triju sgRNA rezultirala najmanjim smanjenjem ekspresije na razini mRNA. Na proteinskoj razini učinak dvije i tri sgRNA bio je podjednak. Ovi rezultati sugeriraju da učinci korištenih sgRNA na lokusu *HNF1A* nisu bili aditivni. Prethodna istraživanja pokazuju da nema univerzalnog pravila u vezi broja korištenih sgRNA za utišavanje sustavom CRISPRi, odnosno da je to specifično za promotor. Dok su Replogle i sur. ciljanjem dviju sgRNA na isti promotor povećali prosječnu učinkovitost represije [212], [213], Yeo i suradnici su pak pokazali da je najučinkovitije utišavanje postignuto pojedinačnom sgRNA [214]. Jedno od mogućih objašnjenja za najveću učinkovitost pojedinačne sgRNA jest međusobna konkurencija različitih sgRNA za ograničenu količinu *Sp* dCas9-KRAB. U tom bi slučaju uvođenje dodatnih, manje učinkovitih sgRNA moglo smanjiti udio kompleksa formiranih s najučinkovitijom sgRNA. Konkurencija različitih sgRNA za raspoloživi dCas9 u multipleksnim CRISPRi sustavima prethodno je opisana [215], [216], no taj mehanizam u ovom radu nije izravno ispitan. Još jedno moguće objašnjenje jest fizička interferencija između više dCas9-KRAB kompleksa kada se njihove ciljne regije nalaze na premaloj međusobnoj udaljenosti. Međutim, korištene sgRNA ciljale su dovoljno udaljena mjesta, pa takav mehanizam u ovom slučaju nije vjerojatan. Razlog slabijem učinku konstrukata s većim brojem sgRNA na gensko utišavanje može biti i njihova veličina. Kada sam koristio jednake količine

virusnog pripravka udio stanica transduciranih virusima s tri sgRNA bio je gotovo dvostruko manji nego unosom konstrukta s dvije sgRNA, što upućuje na smanjeni funkcionalni titar većeg vektora. Posljedično je u selektiranoj poliklonskoj populaciji vjerojatno bio integriran prosječno manji broj kopija konstrukta po stanici, a time je bila i niža ukupna ekspresija sgRNA, što može objasniti zašto povećanje broja sgRNA nije pojačalo represiju *HNF1A*.

Različit stupanj utišavanja *HNF1A* rezultirao je različitim promjenama u ekspresiji nizvodnih gena koji su izravno ili neizravno regulirani ovim transkripcijskim faktorom. Iako su sve razine utišavanja *HNF1A* dovele do smanjenja količine proteina HNF-4α, smanjenje količine transkripta *HNF4A* bilo je značajno samo pri jakom i umjerenom utišavanju. Sličan nesrazmjer između promjena na razini mRNA i proteina uočen je i za *HNF1A*/HNF-1α nakon utišavanja *HNF4A*, a mogući uzrok takvog obrasca opisan je ranije. Utišavanje *HNF1A* rezultiralo je smanjenjem ekspresije gena *INS* u većini provedenih eksperimenata u ovom radu, što je u skladu s već objavljenim istraživanjima [58], [125], [217]. Ipak, izrazito utišavanje *HNF1A* upotrebom jedne sgRNA u dva neovisna eksperimenta rezultiralo je različitim promjenama transkripcijske aktivnosti *INS*: dok je u prvom eksperimentu ekspresija ostala nepromijenjena, u drugom se značajno povećala. Budući da je smanjenje razine ekspresije *HNF1A* u oba eksperimenta bilo podjednako snažno, razlika se ne može pripisati jačini utišavanja, nego vjerojatnije varijabilnosti nizvodnog staničnog odgovora. Moguće je da je izrazito smanjenje razine ekspresije *HNF1A* kratkotrajno aktiviralo kompenzacijski odgovor koji nije bio aktiviran prilikom niže razine utišavanja, ali nije moguće sa sigurnošću utvrditi da je porast ekspresije *INS* njegova izravna posljedica. Postoji hipoteza da mutacije u *HNF1A* u ranom, predijabetičkom stadiju dovode do hipersekrecije inzulina koja kasnije vodi ka zatajenju funkcije beta stanica, no nema rezultata koji bi pokazali da u tom slučaju dolazi i do porasta ekspresije samog gena *INS* [218].

Smanjenje razine ekspresije *GLUT2* podudara se s ranije opisanim promjenama nakon utišavanja *HNF1A* [58], [69]. Low i suradnici opisali su blagi porast razine ekspresije *GLUT1*, kakav je u ovom radu opažen pri slabom utišavanju *HNF1A* [69]. Jača razina utišavanja *HNF1A* rezultirala je smanjenjem ekspresije *GLUT1*, što bi moglo odražavati opsežniji poremećaj metabolizma beta stanica usred jakog smanjenja količine jednog od ključnih transkripcijskih faktora. Međutim, za potvrdu ove hipoteze potrebna su dodatna istraživanja.

Analiza ukupnog *N*-glikoma modelne stanične linije EndoC-βH1, kao i promjena glikoma u izvedenim linijama kao posljedica ciljanih manipulacija predstavljaju jedan od ključnih

doprinosa ovog rada. Dosadašnja su istraživanja bila usmjerena na promjene glikozilacije pojedinačnih proteina, poput transportera GLUT [18], [19] , no ukupni stanični *N*-glikom beta stanica i/ili neke modelne linije beta stanica čovjeka nedostaje. Ovaj rad otkriva 43 glikanska pika u *N*-glikomu stanica EndoC-βH1, jednog od najboljih modela beta stanica čovjeka. Većina pikova sadržavala je pojedinačne glikane uz iznimku nekoliko pikova koji su bili sastavljeni od dvije ili tri strukture. Ukupni stanični *N*-glikom prilično je kompleksan: sastoji se od niza struktura od oligomanoznih pa do tetraantenarnih glikana, uključujući i specifične modifikacije poput GlcNAc na antenarnim galaktozama.

Značajno je da je stabilna linija EndoC-KRAB, unatoč očuvanoj ekspresiji gena karakterističnih za beta stanice, imala znatno promijenjen ukupni *N*-glikom. Najizraženije promjene bile su smanjenje galaktozilacije i sijalinizacije, smanjenje udjela triantenarnih i tetraantenarnih glikana te porast sržne fukozilacije. Iako se promjene glikozilacije ne mogu izravno preslikavati između različitih staničnih modela, porast kompleksnosti glikoma općenito se povezuje s diferencijacijom, dok se njegovo pojednostavljenje povezuje s gubitkom diferenciranih svojstava [219], [220], [221]. Tako je dediferencijacija hepatocita povezana s porastom sržne fukozilacije, dok je tijekom diferencijacije epitelnih stanica opisan porast sijalinizacije i grananja glikana. Kada se uz promijenjeni *N*-glikom ove izvedene stanične linije uzme u obzir i značajno smanjeno lučenje inzulina pri bazalnoj i povišenoj koncentraciji glukoze, jasno je da je postupak stvaranja stabilne linije, uključujući ugradnju inserta u genom i dugotrajnu selekciju, promijenio svojstva izvornih stanica EndoC-βH1. Opažene promjene mogu upućivati na smanjeni stupanj diferenciranosti, no za potvrdu su potrebne dodatne analize. Usprkos svojim nedostatcima, ova stanična linija ima očuvane karakteristike poput sinteze inzulina i GSIS-a što je dovoljno za njezinu korisnost za bolje razumijevanje glikoma beta stanica, kao i uloga pojedinih gena u regulaciji istog.

Ciljano utišavanje *HNF1A* ili *HNF4A* dovelo je do promjena većine analiziranih deriviranih svojstava ukupnog staničnog glikoma, pri čemu su se, kao i kod ekspresije nizvodnih gena, jasno razlikovali učinci različitih razina utišavanja *HNF1A*. Zanimljivo je da je najveće promjene glikoma izazvalo umjereno utišavanje *HNF1A*, a ne izraženo utišavanje što bi se očekivalo. Značajan rezultat predstavlja i činjenica da su promjene pojedinih deriviranih glikanskih svojstava korelirale s promjenom ekspresije odgovarajućih glikoziltransferaza, dok kod drugih takva povezanost nije uočena.

Iako se udio fukoziliranih glikana nije značajno promijenio ni nakon jedne ciljane manipulacije, utišavanje *HNF1A* i *HNF4A* u svim je ispitanim uvjetima dovelo do povećanja ekspresije *FUT8*. Lauc i suradnici pokazali su da je *HNF1A* krovni regulator fukozilacije proteina plazme te da potiče antenarnu, a smanjuje sržnu fukozilaciju represijom *FUT8* [28]. Porast ekspresije *FUT8* izmjeren u ovom radu nakon utišavanja *HNF1A* stoga je u skladu s prethodno opisanim regulatornim odnosom. Slična promjena nakon utišavanja *HNF4A* može biti posljedica njegove povezanosti s *HNF1A* u regulatornu petlju, iako se na temelju dobivenih rezultata ne može utvrditi je li učinak izravan. Vičić Bočkor i suradnici pokazali su da nakon utišavanja *HNF1A* fuzijom dCas9-KRAB u stanicama HepG2 ne dolazi do značajnog porasta ekspresije *FUT8*, ali da ono rezultira porastom udjela sržne fukoze i smanjenjem udjela antenarne fukoze [29]. U ovoj doktorskoj disertaciji opazio sam suprotan nesrazmjer: ekspresija *FUT8* bila je povećana kao posljedica utišavanja *HNF1A*, ali bez mjerljive promjene udjela fukoziliranih glikana što sugerira da promjena ekspresije *FUT8* ne mora biti neposredno praćena promjenama glikozilacije. Sveukupno, rezultati u ovom radu podupiru uključenost *HNF1A* i *HNF4A* u regulaciji *FUT8* u stanicama EndoC-βH1, ali ne omogućuju procjenu u kojoj se mjeri ta regulacija prenosi na glikanski fenotip. Bitno je za napomenuti da promjena ekspresije FUT8 na proteinskoj razini nije analizirana u ovom radu, stoga nije vidljivo dolazi li do promjena u količini proteina. Postoji mogućnost da bi ciljana manipulacija gena *HNF1A* i *HNF4A* kroz duži vremenski period rezultirala i promjenom u razini proteina FUT8 što bi potencijalno utjecalo i na ukupni glikom.

Promjene udjela glikana s račvajućim GlcNAc također nisu bile jednoznačne niti su pratile promjene ekspresije *MGAT3* nakon ciljanog utišavanja *HNF1A*. Nesrazmjer je posebno izražen nakon jakog i umjerenog utišavanja *HNF1A*, pri kojem je transkripcijska aktivnost *MGAT3* bila značajno smanjena, ali promjena glikozilacije nije bila u skladu s time. Dok se očekivalo smanjenje količine glikana s račvajućim GlcNAc, zabilježen je njihov statistički značajan porast. Jedno od mogućih objašnjenja jest vremenski odmak između analize razine transkripcije i same promjene količine ili aktivnosti enzima u stanici. Ranije sintetizirani GnT-III mogao je i dalje sudjelovati u glikozilaciji, zbog čega bi bilo potrebno odrediti njegovu količinu na proteinskoj razini, dok bi glikom trebalo analizirati u kasnijoj vremenskoj točki. Sličan nesrazmjer opisali su Zhao i suradnici u stanicama tumora jajnika, u kojima smanjenje ekspresije *MGAT3* nije bilo praćeno značajnom promjenom glikana s račvajućim GlcNAc [222].

Preostala promatrana derivirana svojstva međusobno su povezana jer pojedini koraci biosinteze stvaraju prekursore za sljedeće reakcije. Povećanjem broja glikanskih grana djelovanjem N-acetilglukozaminiltransferaza nastaje više mjesta za galaktozilaciju, dok galaktozilirane antene predstavljaju prekursore za sijalinizaciju. Promjene pojedinog svojstva stoga ne moraju biti posljedica njegove izravne regulacije, nego mogu nastati kao posljedica promjena u ranijim koracima biosinteze.

Ciljano utišavanje *HNF1A* dovelo je do značajnih promjena u slučaju grananja glikana, čiji je opseg ovisio o intenzitetu genskog utišavanja. Nasuprot tome, ciljano utišavanje *HNF4A* nije značajno utjecalo na grananje glikana, kao ni na galaktozilaciju i sijalinizaciju, premda je uzrokovalo promjene u ekspresiji *HNF1A* na proteinskoj razini. Gledajući kaskadu promjena, do promjene u ekspresiji *HNF1A* dolazi tek u drugom krugu događaja nakon što se smanji ekspresija mRNA *HNF4A* i njegovog proteinskog produkta pa postoji mogućnost da bi do efekta na glikanski fenotip došlo kroz vremenski period dulji od pet dana. Sveukupno rezultati upućuju da je HNF-1α bitniji faktor u regulaciji glikozilacije ove stanične linije i da HNF-4α potencijalno djeluje na glikom preko regulacije *HNF1A*, a ne izravno.

Utišavanje *HNF1A* dovodi do specifičnog obrasca promjena razgranatih glikana koji se može povezati s promjenama preostalih deriviranih svojstava, kao i ranije opisanim promjenama ekspresije nizvodnih gena. Umjereno i slabo utišavanje dovodi do univerzalnog obrasca: udio triantenarnih glikana ne mijenja se, a značajno raste udio tetraantenarnih glikana, te galaktoziliranih i sijaliniziranih glikana. Općenito, čini se da raste kompleksnost ukupnog *N*-glikoma, no mehanizam ovih promjena opet se ne može objasniti direktnim promjenama ekspresije gliko-gena koji kodiraju za odgovarajuće glikoziltransferaze, iako neka svojstva pokazuju pozitivnu korelaciju. U slučaju razgranatih glikana i povezanih glikoziltransferaza, umjereno i slabo utišavanje *HNF1A* dovodi do suprotnih promjena ekspresije, iako promjene glikoma nalikuju.

Jedan od ključnih enzima za razgranatost glikanskih struktura je GnT-IVa, kodiran genom *MGAT4A*. Ohtsubo i suradnici pokazali su korelaciju smanjene aktivnosti HNF-1α i FOXA2 sa smanjenjem ekspresije *MGAT4A* nakon izlaganja miševa i stanični modela povećanim koncentracijama masti te posljedičnom promjenom glikozilacije transportera GLUT2 [19]. Prema njihovom modelu, smanjena količina GnT-IVa dovodi do smanjenja udjela razgranatih struktura na proteinu GLUT2 što mijenja njegovu stabilnost na membrani beta stanica te je posljedično poremećen unos glukoze. Iako sam u ovome radu pokazao da jako i umjereno

utišavanje *HNF1A* doista dovodi do smanjenja ekspresije *MGAT4A*, u ukupnom staničnom *N*-glikomu nije došlo do smanjenja razgranatih struktura, već naprotiv do porasta udjela tetraantenarnih glikana bez smanjenja triantenarnih. Važno je pritom naglasiti da su Ohtsubo i suradnici analizirali glikozilaciju pojedinačnog proteina, dok je u ovom radu analiziran ukupni stanični *N*-glikom, stoga promjene glikanskih struktura prisutnih na GLUT2 te ostalim pojedinačnim proteinima potencijalno mogu biti različite od globalnog obrasca promjena. Dosad objavljena istraživanja koja analiziraju transkriptomske i proteomske promjene nakon ciljanih manipulacija *HNF1A* u humanim beta-staničnim modelima, ne identificiraju gliko-gen *MGAT4A* kao diferencijalno eksprimiran [58], [69], [125]. Ovaj rezultat ukazuje na to da je regulatorna veza između *HNF1A* i *MGAT4A* u beta stanicama kompleksna te da vjerojatno nije jednaka u svim uvjetima. Budući da su Ohtsubo i suradnici analizirali utjecaj dva transkripcijska faktora, HNF-1α i FOXA2, na *MGAT4A* moguće je da su uočene promjene posljedica njihovog zajedničkog djelovanja u uvjetima metaboličkog opterećenja, a ne zasebne smanjene aktivnosti HNF-1α. Rezultati ovog rada pokazuju da smanjenje ekspresije *HNF1A* u stanicama EndoC-βH1 može biti praćeno smanjenjem ekspresije *MGAT4A*, ali taj odnos nije dovoljan za predviđanje promjena ukupnog N-glikoma.

Porast udjela galaktoziliranih glikana nije bio u korelaciji s promjenom ekspresije *B4GALT1*, ali se jasno podudarao s porastom udjela tetraantenarnih glikana. Povećanjem broja grana nastaje i veći broj mjesta dostupnih za galaktozilaciju, pa bi porast količine prekursora mogao dovesti do porasta galaktozilacije. Takvo objašnjenje pretpostavlja da količina ili aktivnost enzima u trenutku mjerenja nije bila ograničavajući faktor reakcije. Međutim, važno je naglasiti da je analizirana promjene samo na razini mRNA, a ne i na razini proteina što predstavlja ograničavajući faktor jer je moguće da promjene *B4GALT1* mRNA još nisu dovele do dovoljno velike promjene količine enzima. Analiza razine proteina i promjena u ukupnom staničnom *N*-glikomu u kasnijim vremenskim točkama mogla bi pokazati realniju sliku promjena galaktozilacije.

Sijalinizacija je pratila isti obrazac što upućuje na povezanost promjena. Niti jedna ciljana manipulacija *HNF1A* nije dovela do smanjenja ekspresije gliko-gena koji kodiraju za sijalintransferaze. Nakon svake manipulacije bila je povećana transkripcijska aktivnost barem jednog analiziranog gliko-gena odgovornog za sijalinizaciju. Porastu sijalinizacije mogle su pridonijeti promjene ekspresije sijaliltransferaza ili pak veća dostupnost galaktoziliranih

antena. Na temelju provedenih analiza nije moguće razdvojiti doprinos ova dva mehanizma, posebice jer nije moguće razlučiti promjene α2,6- i α2,3-sijalinizacije.

Činjenica da je tretman stanica palmitinskom kiselinom, koji predstavlja klasičan lipotoksični stres, doveo do vrlo sličnog obrasca promjena ukupnog staničnog *N*-glikoma kao i umjereno utišavanje *HNF1A,* upućuje na mogućnost da se dio učinka lipotoksičnosti ostvaruje preko deregulacije *HNF1A*/HNF-1α. Ovaj je rezultat u skladu s rezultatima Ohtsuba i suradnka koji su pokazali da masne kiseline utječu na ekspresiju i lokalizaciju HNF-1α u beta stanicama [19]. Međutim, kako bih potvrdio da su zabilježene promjene ukupnog staničnog *N*-glikoma nakon tretmana palmitinskom kiselinom doista dijelom posredovane deregulacijom *HNF-1α,* bilo bi potrebno odrediti i samu količinu transkripcijskog faktora u stanicama, kao i njegovu lokalizaciju.

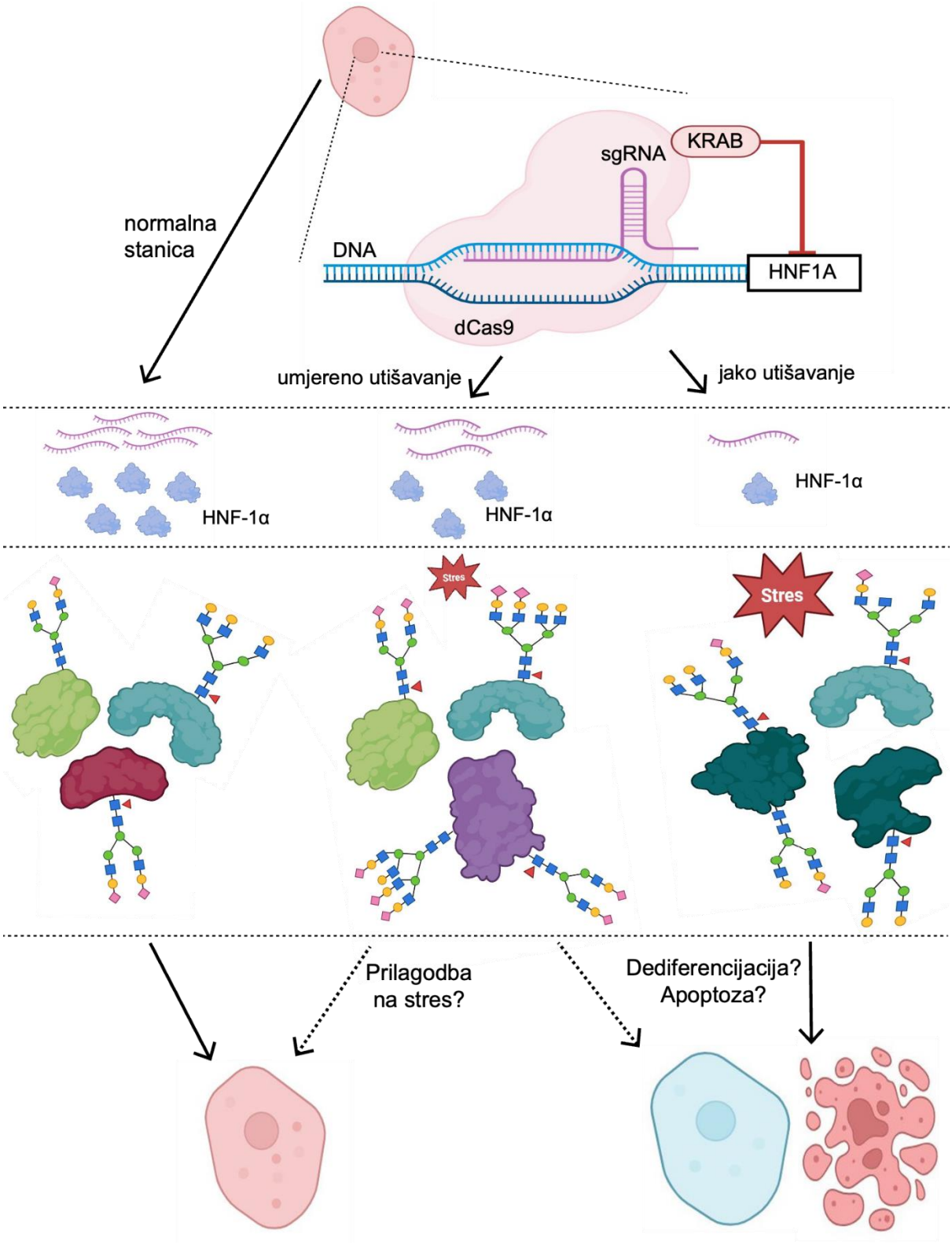
Uvjeti uzgoja također su važan čimbenik za proučavanje lipotoksičnosti. Krizhanovskii i suradnici pokazali su da palmitinska kiselina u stanicama EndoC-βH1 uzgajanim u DMEM-u ne dovodi do izražene stanične smrti, što je učinak koji izaziva u primarnim beta stanicama, dok su stanice uzgajane u DMEM/F12 znatno osjetljivije na njezino djelovanje [223]. U ovom radu korištena je mješavina DMEM-a i DMEM/F12 u omjeru 1:1 pa je moguće da su sami „blaži“ uvjeti kultiviranja stanica umanjili lipotoksičnost i doprinijeli uočenom fenotipu. To je važno i za usporedbu s utišavanjem *HNF1A* jer je upravo umjereno, a ne jako utišavanje, dovelo do obrasca glikozilacije vrlo sličnog onome nakon tretmana palmitinskom kiselinom.

Za razliku od palmitinske kiseline, povišena koncentracija glukoze dovela je do suprotnog obrasca promjena glikoma što upućuje na aktivaciju različitog staničnog odgovora. Neka prijašnja istraživanja pokazuju da povišena koncentracija glukoze rezultira promjenama puta sijalinizacije, međutim istraživanja su provedena na drugom staničnom tipu, endotelnim stanicama retine [224]. Istraživanja nekih staničnih modela također pokazuju da hipoksija, upalni podražaji, hiperglikemija i promjene ekspresije regulatornih gena mogu imati različite, pa i suprotne učinke na stanični *N*-glikom [225], [226], [227], [228]. Smjer promjena je stoga specifičan za vrstu stanice i mehanizam odgovora na pojedini stresor.

Na temelju sveukupnih rezultata može se postaviti hipoteza da slabije i umjereno smanjenje ekspresije *HNF1A,* kao i blaži lipotoksični stres, pokreću prilagodbeni odgovor stanice kojim se pokušava održati homeostaza. Takav bi odgovor mogao uključivati i opaženo povećanje grananja glikanskih struktura te galaktozilacije i sijalinizacije ukupnog staničnog *N*-glikoma.

Prijašnja su istraživanja pokazala da α2,6-sijalinizacija pojedinih receptora, poput CD95 i TNFR1, može smanjiti apoptotsko signaliziranje, pa bi općenito povećanje sijalinizacije moglo predstavljati jedan od mehanizama kojima se stanica pokušava prilagoditi stresu i održati preživljenje [229], [230]. Jako utišavanje *HNF1A* ne dovodi do istog obrasca promjena, što upućuje na aktivaciju drugačijih mehanizama kada količina HNF-1α padne na vrlo nisku razinu. Mogući odnos između razine utišavanja *HNF1A*, metaboličkog stresa i promjena ukupnog staničnog *N*-glikoma prikazan je na Slici 37. Pri tome je važno naglasiti da sličnost sastava ukupnog *N*-glikoma normalnih EndoC stanica i onog nakon jakog utišavanja *HNF1A* ne znači nužno i sličnost staničnog stanja. Naime, ograničavajući faktor analize ukupnog *N*-glikoma je nedostatak informacije na kojim se pojedinačnim proteinima nalaze pojedine glikanske strukture. Jako utišavanje *HNF1A* vrlo vjerojatno mijenja i sastav ukupnog staničnog proteoma, što znači da statistički sličan glikanski profil može biti raspoređen na drugačijem skupu proteina, a posljedično imati potpuno različite funkcionalne posljedice.

Promjene zabilježene u sintezi i lučenju inzulina dodatno idu u prilog tome da različite razine utišavanja *HNF1A* nemaju jednake funkcionalne posljedice za beta stanice. Utišavanje *HNF4A*, kao i umjereno utišavanje *HNF1A*, dovelo je do smanjenja ekspresije *INS*, što je u skladu s ranije opisanim rezultatima [58], [125], [231]. Umjereno utišavanje *HNF1A* nije dovelo do gubitka GSIS-a, ali je rezultiralo blagim, statistički značajnim smanjenjem lučenja inzulina i pri bazalnoj koncentraciji glukoze i nakon stimulacije glukozom. Slične promjene opisane su i u prethodnim istraživanjima [58], [232]. Neka pak druga istraživanja pokazuju da kratkotrajno utišavanje *HNF1A* ne dovodi do značajne promjene GSIS-a [125], vrlo slično mojem rezultatu nakon jakog utišavanja *HNF1A*. Razlike u rezultatima ovih istraživanja mogu se objasniti različitim modelima na kojima su se provodile analize, različitim metodama inaktivacije *HNF1A*, kao i razinom smanjenja ekspresije, te trajanjem eksperimenta. Stoga, različiti odgovori nakon slabog, umjerenog i jakog utišavanja *HNF1A* uočeni u ovom radu mogu predstavljati stvarna različita stanja stanice, a ne samo različit intenzitet istog fenotipa. Nastavak istraživanja trebao bi se stoga fokusirati na analizu markera staničnog i metaboličkog stresa, dediferencijacije i apoptoze te bi se trebale napraviti paralelne analize ukupnog staničnog proteoma i *N*-glikoma, a rezultati tih istraživanja mogli bi potkrijepiti hipotetski model predstavljen na Slici 37.



Slika 37. Hipotetski model povezanosti razine utišavanja gena *HNF1A* s promjenama ukupnog *N*-glikoma stanica EndoC-βH1 te mogućim krajnjim ishodom za stanicu. Umjerena razina utišavanja *HNF1A* dovodi do povećanja udjela glikanskih struktura sa sijalinskom kiselinom i razgranatih glikanskih struktura u ukupnom *N*-glikomu, kao prilagodba stanica na stresne uvjete. Jaka razina utišavanja ne dovodi do značajnih promjena ukupnog staničnog *N*-glikoma

u odnosu na normalne stanice, ali je moguće da istodobno dolazi do znatnih promjena proteoma. U tom bi slučaju pojedine glikanske strukture mogle biti raspoređene na alternativnom skupu proteina te imati drugačije funkcionalne posljedice nego u izvornim stanicama. Takvo stanje moglo bi biti povezano s gubitkom funkcionalnih obilježja beta stanica, dediferencijacijom ili apoptozom.

Naposljetku, među nizvodnim analiziranim kandidat genima odabrana su dva gena čija uloga u beta stanicama još nije dovoljno razjašnjena. Iako promjene ukupnog glikoma uglavnom nisu linearno pratile promjene ekspresije gliko-gena, *FUT8* i *ST3GAL3* odabrani su za daljnje funkcionalne analize jer su pokazali najstabilnije promjene ekspresije tijekom ciljanih manipulacija *HNF1A* i *HNF4A*. *FUT8* odabran je zbog konzistentnog porasta transkripcijske aktivnosti nakon ciljanih manipulacija *HNF1A* i *HNF4A*, iako te promjene nisu rezultirale promjenama ukupne fukozilacije u staničnom *N*-glikomu. Međutim, nije isključeno da su neke promjene sržne fukozilacije pojedinih proteina ostale nezabilježene, a koje bi mogle imati funkcionalne posljedice za stanicu. *ST3GAL3* je jedini gliko-gen, odgovoran za sijalinizaciju, čija je ekspresija porasla nakon svih ciljanih manipulacija *HNF1A* i *HNF4A* i metaboličkih tretmana, zbog čega predstavlja zanimljiv gen za ispitivanje moguće funkcionalne uloge u promjenama staničnih signalnih putova.

Problem pri ispitivanju oba gena bio je njihova relativno visoka bazalna ekspresija u stanicama EndoC-βH1 zbog čega je daljnja manipulacija u smjeru povećanja razine ekspresije bila ograničena. Ciljanje *FUT8* sa svim odabranim sgRNA rezultiralo je smanjenjem razine transkripcije što upućuje na to da se kompleks dCasMINI-VPR uspješno vezao za ciljanu regiju, ali je umjesto aktivacije interferirao s transkripcijom samog ciljanog gena. Ovaj rezultat sugerira da položaj ciljanja odabranim sgRNA nije bio pogodan za daljnju transkripcijsku aktivaciju. Iako je ciljanje *ST3GAL3* pojedinim sgRNA pokazalo trend porasta ekspresije, nije postignut statistički značajni porast transkripcijske aktivnosti. Dodatna istraživanja mogla bi pokazati ima li neka od kandidat sgRNA zaista potencijal povećanja ekspresije na razini mRNA i proteina, i samo kada bi se to postiglo imalo bi smisla analizirati *N*-glikom i funkcije stanica u kojima je *ST3GAL3* ciljano aktiviran.

U cjelini, rezultati pokazuju da oba transkripcijska faktora, HNF-4α i HNF-1α, izravno ili neizravno utječu na ekspresiju većeg broja gena uključenih u *N*-glikozilaciju te da njihovo utišavanje dovodi do značajnih promjena ukupnog *N*-glikoma. Međutim, te promjene nisu linearno povezane s razinom utišavanja *HNF4A* i *HNF1A*, a nisu ni jednostavno povezane s

nizvodnim promjenama transkripcijske aktivnosti gliko-gena koji kodiraju za odgovarajuće glikoziltransferaze. U budućim bi istraživanjima zato bilo važno odrediti funkcionalno značenje opaženih promjena glikoma, posebno njihovu moguću ulogu u prilagodbi beta stanica na metabolički stres, ali i mehanizme kojima promjene aktivnosti HNF-1α i HNF-4α dovode do određenog glikanskog fenotipa.

6. Zaključak

- Promotor RIP2 omogućio je stabilnu ekspresiju ugrađenih konstrukata u stanicama EndoC-βH1, dok je uvođenjem modula *Sp*Cas9 postojeći modularni sustav proširen mogućnošću ciljane inaktivacije gena. Uvođenjem kompaktnog dCasMINI u fuziji s domenom VPR omogućena je ciljana aktivacija gena uz značajno smanjenje veličine konstrukta što olakšava unos u stanice.
- Prilagođeni modularni CRISPR/Cas sustav može se koristiti u stanicama EndoC-βH1 za ciljanu inaktivaciju, represiju i aktivaciju gena, pri čemu je lentivirusni unos bio najprikladniji za stabilnu ugradnju većih konstrukata.
- Fuzija dCas9-KRAB omogućila je ciljano utišavanje HNF1A i HNF4A u stanicama EndoC-βH1. Primjenom različitog broja sgRNA postignuti su različiti stupnjevi utišavanja HNF1A, koji nisu doveli do razmjernih promjena ekspresije nizvodnih gena, nego do različitih obrazaca transkripcijske aktivnosti ovisnih o stupnju utišavanja.
- U ovom je radu prvi put karakteriziran ukupni N-glikom stanične linije EndoC-βH1. Pokazano je i da postupak stvaranja stabilne linije EndoC-KRAB mijenja glikanski profil i funkcionalna svojstva izvorne linije, iako su osnovna obilježja beta stanica ostala očuvana.
- Ciljano utišavanje HNF1A dovelo je do značajnih promjena grananja, galaktozilacije i sijalinizacije ukupnog N-glikoma, pri čemu smjer i intenzitet promjena nisu bili razmjerno povezani sa stupnjem utišavanja ni s promjenama ekspresije pojedinačnih glikoziltransferaza. Najizraženije promjene opažene su nakon umjerenog utišavanja, dok utišavanje HNF4A u promatranom vremenskom razdoblju nije dovelo do usporedivih promjena tih svojstava.
- Umjereno utišavanje HNF1A i tretman palmitinskom kiselinom doveli su do sličnog obrasca promjena ukupnog N-glikoma, dok je povišena koncentracija glukoze izazvala drugačiji odgovor. Dobiveni rezultati upućuju na povezanost aktivnosti HNF-1α i odgovora beta stanica na metabolički stres s promjenama ukupnog N-glikoma.
- Promjene ukupnog N-glikoma nisu se mogle jednostavno objasniti promjenama transkripcijske aktivnosti analiziranih glikoziltransferaza, što upućuje na postojanje dodatnih razina regulacije glikozilacije osim same transkripcije glikoziltransferaza.

Ciljana aktivacija FUT8 i ST3GAL3 primjenom dCasMINI-VPR nije dovela do statistički značajnog povećanja njihove ekspresije, iako je pri ciljanju ST3GAL3 opažen blagi trend povećanja transkripcijske aktivnosti.

7. Popis literature

[1] S. Lenzen, „The pancreatic beta cell: an intricate relation between anatomical structure, the signalling mechanism of glucose-induced insulin secretion, the low antioxidative defence, the high vulnerability and sensitivity to diabetic stress“, *ChemTexts*, sv. 7, izd. 2, 2021, doi: 10.1007/s40828-021-00140-3.

[2] P. P. Khin, J. H. Lee, i H.-S. Jun, „Pancreatic Beta-cell Dysfunction in Type 2 Diabetes“, *Eur. J. Inflamm.*, sv. 21, 2023, doi: 10.1177/1721727X231154152.

[3] G. C. Weir i S. Bonner-Weir, „Five Stages of Evolving Beta-Cell Dysfunction During Progression to Diabetes“, *Diabetes*, sv. 53, izd. suppl_3, 2004, doi: 10.2337/diabetes.53.suppl_3.S16.

[4] „2. Diagnosis and Classification of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2024“, *Diabetes Care*, sv. 47, izd. Suppl 1, 2023, doi: 10.2337/dc24-S002.

[5] M. A. B. Khan, M. J. Hashim, J. K. King, R. D. Govender, H. Mustafa, i J. Al Kaabi, „Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends“, *J. Epidemiol. Glob. Health*, sv. 10, izd. 1, 2020, doi: 10.2991/jegh.k.191028.001.

[6] M. J. Redondo *i sur.*, „The clinical consequences of heterogeneity within and between different diabetes types“, *Diabetologia*, sv. 63, izd. 10, 2020, doi: 10.1007/s00125-020-05211-7.

[7] X. Lu *i sur.*, „Type 2 diabetes mellitus in adults: pathogenesis, prevention and therapy“, *Signal Transduct. Target. Ther.*, sv. 9, izd. 1, 2024, doi: 10.1038/s41392-024-01951-9.

[8] I. B. Hirsch i B. P. Childs, „Acute Complications of Diabetes“, u *Complete Nurse's Guide to Diabetes Care*, B. P. Childs, M. Cypress, i G. R. Spollett, Ur., American Diabetes Association, doi: 10.2337/9781580405690.ch09.

[9] S. Shkunnikova, A. Mijakovac, L. Sironic, M. Hanic, G. Lauc, i M. M. Kavur, „IgG glycans in health and disease: Prediction, intervention, prognosis, and therapy“, *Biotechnol. Adv.*, sv. 67, 2023, doi: 10.1016/j.biotechadv.2023.108169.

[10] M. A. W. van den Boogert *i sur.*, „N-Glycosylation Defects in Humans Lower Low-Density Lipoprotein Cholesterol Through Increased Low-Density Lipoprotein Receptor Expression“, *Circulation*, sv. 140, izd. 4, 2019, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036484.

[11] N. Rudman, O. Gornik, i G. Lauc, „Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes“, *FEBS Lett.*, sv. 593, izd. 13, 2019, doi: 10.1002/1873-3468.13495.

[12] R. G. Spiro, „Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds“, *Glycobiology*, sv. 12, izd. 4, 2002, doi: 10.1093/glycob/12.4.43R.

[13] A. Varki, „Biological roles of glycans“, *Glycobiology*, sv. 27, izd. 1, 2017, doi: 10.1093/glycob/cww086.

[14] P. Stanley, K. W. Moremen, N. E. Lewis, N. Taniguchi, i M. Aebi, „N-Glycans“, u *Essentials of Glycobiology*, 4th izd., A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, i P. H. Seeberger, Ur., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022. Pristupljeno: 31. kolovoz 2026. [Na internetu]. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579964/

[15] E. Bieberich, „Synthesis, Processing, and Function of N-glycans in N-glycoproteins“, u *Glycobiology of the Nervous System*, R. K. Yu i C.-L. Schengrund, Ur., New York, NY: Springer, 2014, doi: 10.1007/978-1-4939-1154-7_3.

[16] M. He, X. Zhou, i X. Wang, „Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications“, *Signal Transduct. Target. Ther.*, sv. 9, izd. 1, 2024, doi: 10.1038/s41392-024-01886-1.

[17] B. Radovani i I. Gudelj, „N-Glycosylation and Inflammation; the Not-So-Sweet Relation“, *Front. Immunol.*, sv. 13, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.893365.

[18] K. Ohtsubo, S. Takamatsu, M. T. Minowa, A. Yoshida, M. Takeuchi, i J. D. Marth, „Dietary and Genetic Control of Glucose Transporter 2 Glycosylation Promotes Insulin Secretion in Suppressing Diabetes“, *Cell*, sv. 123, izd. 7, 2005, doi: 10.1016/j.cell.2005.09.041.

[19] K. Ohtsubo, M. Z. Chen, J. M. Olefsky, i J. D. Marth, „Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport“, *Nat. Med.*, sv. 17, izd. 9, str. 1067–1075, kol. 2011, doi: 10.1038/nm.2414.

[20] K. Ohtsubo, S. Takamatsu, C. Gao, H. Korekane, T. M. Kurosawa, i N. Taniguchi, „N-Glycosylation modulates the membrane sub-domain distribution and activity of glucose transporter 2 in pancreatic beta cells“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, sv. 434, izd. 2, 2013, doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.076.

[21] H. H. Lau, N. H. J. Ng, L. S. W. Loo, J. B. Jasmen, i A. K. K. Teo, „The molecular functions of hepatocyte nuclear factors – In and beyond the liver“, *J. Hepatol.*, sv. 68, izd. 5, 2018, doi: 10.1016/j.jhep.2017.11.026.

[22] N. H. J. Ng *i sur.*, „HNF4A and HNF1A exhibit tissue specific target gene regulation in pancreatic beta cells and hepatocytes“, *Nat. Commun.*, sv. 15, izd. 1, 2024, doi: 10.1038/s41467-024-48647-w.

[23] M. Stoffel i S. A. Duncan, „The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4α regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, sv. 94, izd. 24, 1997, doi: 10.1073/pnas.94.24.13209.

[24] L.-M. Li, B.-G. Jiang, i L.-L. Sun, „HNF1A : From Monogenic Diabetes to Type 2 Diabetes and Gestational Diabetes Mellitus“, *Front. Endocrinol.*, sv. 13, 2022, doi: 10.3389/fendo.2022.829565.

[25] Y. Miyachi, T. Miyazawa, i Y. Ogawa, „HNF1A Mutations and Beta Cell Dysfunction in Diabetes“, *Int. J. Mol. Sci.*, sv. 23, izd. 6, 2022, doi: 10.3390/ijms23063222.

[26] A. Juszczak *i sur.*, „Plasma Fucosylated Glycans and C-Reactive Protein as Biomarkers of HNF1A-MODY in Young Adult–Onset Nonautoimmune Diabetes“, *Diabetes Care*, sv. 42, izd. 1, 2018, doi: 10.2337/dc18-0422.

[27] G. Thanabalasingham *i sur.*, „Mutations in HNF1A Result in Marked Alterations of Plasma Glycan Profile“, *Diabetes*, sv. 62, izd. 4, 2013, doi: 10.2337/db12-0880.

[28] G. Lauc *i sur.*, „Genomics Meets Glycomics—The First GWAS Study of Human N-Glycome Identifies HNF1α as a Master Regulator of Plasma Protein Fucosylation“, *PLoS Genet.*, sv. 6, izd. 12, 2010, doi: 10.1371/journal.pgen.1001256.

[29] V. V. Bočkor *i sur.*, „Transcription Factors HNF1A, HNF4A, and FOXA2 Regulate Hepatic Cell Protein N-Glycosylation“, *Engineering*, sv. 32, izd. 1, 2024, doi: 10.1016/j.eng.2023.09.019.

[30] A. D. Green, S. Vasu, i P. R. Flatt, „Cellular models for beta-cell function and diabetes gene therapy“, *Acta Physiol.*, sv. 222, izd. 3, 2018, doi: 10.1111/apha.13012.

[31] B. A. Covington i W. Chen, „Animal Models for Understanding the Mechanisms of Beta Cell Death during Type 2 Diabetes Pathogenesis“, *Biomedicines*, sv. 12, izd. 3, 2024, doi: 10.3390/biomedicines12030473.

[32] C. Benner, T. van der Meulen, E. Cacéres, K. Tigyi, C. J. Donaldson, i M. O. Huising, „The transcriptional landscape of mouse beta cells compared to human beta cells reveals notable species differences in long non-coding RNA and protein-coding gene expression“, *BMC Genomics*, sv. 15, izd. 1, 2014, doi: 10.1186/1471-2164-15-620.

[33] O. Cabrera, D. M. Berman, N. S. Kenyon, C. Ricordi, P.-O. Berggren, i A. Caicedo, „The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, sv. 103, izd. 7, 2006, doi: 10.1073/pnas.0510790103.

[34] K. G. Maxwell i J. R. Millman, „Applications of iPSC-derived beta cells from patients with diabetes“, *Cell Rep. Med.*, sv. 2, izd. 4, 2021, doi: 10.1016/j.xcrm.2021.100238.

[35] P. Ravassard *i sur.*, „A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion“, *J. Clin. Invest.*, sv. 121, izd. 9, 2011, doi: 10.1172/JCI58447.

[36] V. G. Tsonkova *i sur.*, „The EndoC-βH1 cell line is a valid model of human beta cells and applicable for screenings to identify novel drug target candidates“, *Mol. Metab.*, sv. 8, 2018, doi: 10.1016/j.molmet.2017.12.007.

[37] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, i E. Charpentier, „A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity“, *Science*, sv. 337, izd. 6096, 2012, doi: 10.1126/science.1225829.

[38] R. Cai, R. Lv, X. Shi, G. Yang, i J. Jin, „CRISPR/dCas9 Tools: Epigenetic Mechanism and Application in Gene Transcriptional Regulation“, *Int. J. Mol. Sci.*, sv. 24, izd. 19, 2023, doi: 10.3390/ijms241914865.

[39] S. Konermann *i sur.*, „Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex“, *Nature*, sv. 517, izd. 7536, 2015, doi: 10.1038/nature14136.

[40] L. S. Qi *i sur.*, „Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression“, *Cell*, sv. 152, izd. 5, 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022.

[41] J. Pulecio, N. Verma, E. Mejía-Ramírez, D. Huangfu, i A. Raya, „CRISPR/Cas9-Based Engineering of the Epigenome“, *Cell Stem Cell*, sv. 21, izd. 4, 2017, doi: 10.1016/j.stem.2017.09.006.

[42] Z. Wu *i sur.*, „Programmed genome editing by a miniature CRISPR-Cas12f nuclease“, *Nat. Chem. Biol.*, sv. 17, izd. 11, 2021, doi: 10.1038/s41589-021-00868-6.

[43] D. S. Longnecker, „Anatomy and Histology of the Pancreas“, *Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowl. Base*, 2021, doi: 10.3998/panc.2021.01.

[44] A. Grapin-Botton, „Ductal cells of the pancreas“, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, sv. 37, izd. 3, 2005, doi: 10.1016/j.biocel.2004.07.010.

[45] H. H. A-Kader i F. K. Ghishan, „The Pancreas“, u *Textbook of Clinical Pediatrics*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2012, doi: 10.1007/978-3-642-02202-9_198.

[46] C. Ionescu-Tirgoviste *i sur.*, „A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas“, *Sci. Rep.*, sv. 5, izd. 1, 2015, doi: 10.1038/srep14634.

[47] M. Brissova *i sur.*, „Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy“, *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, sv. 53, izd. 9, 2005, doi: 10.1369/jhc.5C6684.2005.

[48] J. E. Gerich, „Lilly lecture 1988. Glucose counterregulation and its impact on diabetes mellitus“, *Diabetes*, sv. 37, izd. 12, 1988, doi: 10.2337/diab.37.12.1608.

[49] G. Da Silva Xavier, „The Cells of the Islets of Langerhans“, *J. Clin. Med.*, sv. 7, izd. 3, 2018, doi: 10.3390/jcm7030054.

[50] K. Moore, V. Persaud, i M. Torchia, *Keith L. Moore, T.V.N.Persaud, Mark G. Torchia: The Developing Human. Clinically Oriented Embryology. 11th edition. Elsevier, 2020.* 2020.

[51] M. F. Offield *i sur.*, „PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum“, *Development*, sv. 122, izd. 3, 1996, doi: 10.1242/dev.122.3.983.

[52] G. Gradwohl, A. Dierich, M. LeMeur, i F. Guillemot, „neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, sv. 97, izd. 4, 2000, doi: 10.1073/pnas.97.4.1607.

[53] P. Collombat *i sur.*, „Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development“, *Genes Dev.*, sv. 17, izd. 20, 2003, doi: 10.1101/gad.269003.

[54] P. Marchetti, M. Bugliani, V. De Tata, M. Suleiman, i L. Marselli, „Pancreatic Beta Cell Identity in Humans and the Role of Type 2 Diabetes“, *Front. Cell Dev. Biol.*, sv. 5, 2017, doi: 10.3389/fcell.2017.00055.

[55] B. M. Lyttle *i sur.*, „Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas“, *Diabetologia*, sv. 51, izd. 7, 2008, doi: 10.1007/s00125-008-1006-z.

[56] M. Sander *i sur.*, „Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of β-cell formation in the pancreas“, *Development*, sv. 127, izd. 24, 2000, doi: 10.1242/dev.127.24.5533.

[57] I. Artner *i sur.*, „MafA and MafB Regulate Genes Critical to β-Cells in a Unique Temporal Manner“, *Diabetes*, sv. 59, izd. 10, 2010, doi: 10.2337/db10-0190.

[58] M. F. Qian *i sur.*, „HNF1α maintains pancreatic α and β cell functions in primary human islets“, *JCI Insight*, sv. 8, izd. 24, 2023, doi: 10.1172/jci.insight.170884.

[59] R. A. Pittner *i sur.*, „Molecular physiology of amylin“, *J. Cell. Biochem.*, sv. 55, izd. S1994A, 1994, doi: 10.1002/jcb.240550004.

[60] F. Sanger i H. Tuppy, „The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates“, *Biochem. J.*, sv. 49, izd. 4, 1951, doi: 10.1042/bj0490481.

[61] S. J. Chan, P. Keim, i D. F. Steiner, „Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination.“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, sv. 73, izd. 6, 1976, doi: 10.1073/pnas.73.6.1964.

[62] D. F. Steiner i P. E. Oyer, „The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, sv. 57, izd. 2, 1967, doi: 10.1073/pnas.57.2.473.

[63] H. W. Davidson, C. J. Rhodes, i J. C. Hutton, „Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic β cell via two distinct site-specific endopeptidases“, *Nature*, sv. 333, izd. 6168, 1988, doi: 10.1038/333093a0.

[64] H. W. Davidson, M. Peshavaria, i J. C. Hutton, „Proteolytic conversion of proinsulin into insulin. Identification of a Ca2+-dependent acidic endopeptidase in isolated insulin-secretory granules“, *Biochem. J.*, sv. 246, izd. 2, 1987, doi: 10.1042/bj2460279.

[65] G. Dodson i D. Steiner, „The role of assembly in insulin’s biosynthesis“, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, sv. 8, izd. 2, 1998, doi: 10.1016/s0959-440x(98)80037-7.

[66] F. Zhuo, E. R. Gilbert, i L. Dongmin, „Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes“, *Curr. Diabetes Rev.*, sv. 9, izd. 1, 2012, doi: 10.2174/157339811309010025.

[67] A. D. Vos *i sur.*, „Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression.“, *J. Clin. Invest.*, sv. 96, izd. 5, 1995, doi: 10.1172/JCI118308.

[68] I. Caspi *i sur.*, „Glucose Transporters Are Key Components of the Human Glucostat“, *Diabetes*, sv. 73, izd. 8, 2024, doi: 10.2337/db23-0508.

[69] B. S. J. Low *i sur.*, „Decreased GLUT2 and glucose uptake contribute to insulin secretion defects in MODY3/HNF1A hiPSC-derived mutant β cells“, *Nat. Commun.*, sv. 12, izd. 1, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-22843-4.

[70] F. M. Matschinsky, „A Lesson in Metabolic Regulation Inspired by the Glucokinase Glucose Sensor Paradigm“, *Diabetes*, sv. 45, izd. 2, 1996, doi: 10.2337/diab.45.2.223.

[71] D. L. Cook i N. Hales, „Intracellular ATP directly blocks K+ channels in pancreatic B-cells“, *Nature*, sv. 311, izd. 5983, 1984, doi: 10.1038/311271a0.

[72] C. B. Wollheim i G. W. Sharp, „Regulation of insulin release by calcium.“, *Physiol. Rev.*, sv. 61, izd. 4, 1981, doi: 10.1152/physrev.1981.61.4.914.

[73] D. L. CURRY, L. L. BENNETT, i G. M. GRODSKY, „Dynamics of Insulin Secretion by the Perfused Rat Pancreas“, *Endocrinology*, sv. 83, izd. 3, 1968, doi: 10.1210/endo-83-3-572.

[74] W. Creutzfeldt, „The incretin concept today“, *Diabetologia*, sv. 16, izd. 2, 1979, doi: 10.1007/BF01225454.

[75] G. G. Holz, „Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell“, *Diabetes*, sv. 53, izd. 1, 2004, doi: 10.2337/diabetes.53.1.5.

[76] Y. Itoh *i sur.*, „Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40“, *Nature*, sv. 422, izd. 6928, 2003, doi: 10.1038/nature01478.

[77] C. P. Briscoe *i sur.*, „The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids“, *J. Biol. Chem.*, sv. 278, izd. 13, 2003, doi: 10.1074/jbc.M211495200.

[78] E. Peschke i E. Mühlbauer, „New evidence for a role of melatonin in glucose regulation“, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, sv. 24, izd. 5, 2010, doi: 10.1016/j.beem.2010.09.001.

[79] P. Alonso-Magdalena *i sur.*, „Pancreatic Insulin Content Regulation by the Estrogen Receptor ERα“, *PLOS ONE*, sv. 3, izd. 4, 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0002069.

[80] T. J. Kieffer, R. S. Heller, C. A. Leech, G. G. Holz, i J. F. Habener, „Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K+ channels in pancreatic beta-cells“, *Diabetes*, sv. 46, izd. 6, 1997, doi: 10.2337/diab.46.6.1087.

[81] M. Skelin, M. Rupnik, i A. Cencic, „Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research“, *ALTEX*, sv. 27, izd. 2, 2010, doi: 10.14573/altex.2010.2.105.

[82] T. L. Halvorsen, G. M. Beattie, A. D. Lopez, A. Hayek, i F. Levine, „Accelerated telomere shortening and senescence in human pancreatic islet cells stimulated to divide in vitro“, *J. Endocrinol.*, sv. 166, izd. 1, 2000, doi: 10.1677/joe.0.1660103.

[83] E. Gurgul-Convey, M. T. Kaminski, i S. Lenzen, „Physiological characterization of the human EndoC-βH1 β-cell line“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, sv. 464, izd. 1, 2015, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.072.

[84] B. Hastoy *i sur.*, „Electrophysiological properties of human beta-cell lines EndoC-βH1 and -βH2 conform with human beta-cells“, *Sci. Rep.*, sv. 8, izd. 1, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-34743-7.

[85] M. Ryaboshapkina *i sur.*, „Characterization of the Secretome, Transcriptome, and Proteome of Human β Cell Line EndoC-βH1“, *Mol. Cell. Proteomics MCP*, sv. 21, izd. 5, 2022, doi: 10.1016/j.mcpro.2022.100229.

[86] M. Benazra *i sur.*, „A human beta cell line with drug inducible excision of immortalizing transgenes“, *Mol. Metab.*, sv. 4, izd. 12, 2015, doi: 10.1016/j.molmet.2015.09.008.

[87] B. Blanchi *i sur.*, „EndoC-βH5 cells are storable and ready-to-use human pancreatic beta cells with physiological insulin secretion“, *Mol. Metab.*, sv. 76, 2023, doi: 10.1016/j.molmet.2023.101772.

[88] K. Takahashi i S. Yamanaka, „Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors“, *Cell*, sv. 126, izd. 4, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

[89] F. W. Pagliuca *i sur.*, „Generation of functional human pancreatic β cells in vitro“, *Cell*, sv. 159, izd. 2, 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.09.040.

[90] N. A. ElSayed *i sur.*, „2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2023“, *Diabetes Care*, sv. 46, izd. Supplement_1, 2022, doi: 10.2337/dc23-S002.

[91] B. Zhou *i sur.*, „Worldwide trends in diabetes prevalence and treatment from 1990 to 2022: a pooled analysis of 1108 population-representative studies with 141 million participants“, *The Lancet*, sv. 404, izd. 10467, 2024, doi: 10.1016/S0140-6736(24)02317-1.

[92] A. Ramachandran, „Know the signs and symptoms of diabetes“, *Indian J. Med. Res.*, sv. 140, izd. 5, 2014.

[93] A. Katsarou *i sur.*, „Type 1 diabetes mellitus“, *Nat. Rev. Dis. Primer*, sv. 3, 2017, doi: 10.1038/nrdp.2017.16.

[94] R. A. Insel *i sur.*, „Staging Presymptomatic Type 1 Diabetes: A Scientific Statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association“, *Diabetes Care*, sv. 38, izd. 10, str. 1964–1974, ruj. 2015, doi: 10.2337/dc15-1419.

[95] R. A. DeFronzo *i sur.*, „Type 2 diabetes mellitus“, *Nat. Rev. Dis. Primer*, sv. 1, 2015, doi: 10.1038/nrdp.2015.19.

[96] C. Ling i T. Rönn, „Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes“, *Cell Metab.*, sv. 29, izd. 5, 2019, doi: 10.1016/j.cmet.2019.03.009.

[97] G. Wang *i sur.*, „Integrating genetics with single-cell multiomic measurements across disease states identifies mechanisms of beta cell dysfunction in type 2 diabetes“, *Nat. Genet.*, sv. 55, izd. 6, 2023, doi: 10.1038/s41588-023-01397-9.

[98] J. K. Ofori *i sur.*, „Cell-specific DNA methylation in human alpha and beta cells regulates gene expression in type 2 diabetes“, *Nat. Metab.*, sv. 8, izd. 4, 2026, doi: 10.1038/s42255-026-01498-9.

[99] T. Rönn *i sur.*, „Genes with epigenetic alterations in human pancreatic islets impact mitochondrial function, insulin secretion, and type 2 diabetes“, *Nat. Commun.*, sv. 14, izd. 1, 2023, doi: 10.1038/s41467-023-43719-9.

[100] P. Volkov *i sur.*, „Whole-Genome Bisulfite Sequencing of Human Pancreatic Islets Reveals Novel Differentially Methylated Regions in Type 2 Diabetes Pathogenesis“, *Diabetes*, sv. 66, izd. 4, 2017, doi: 10.2337/db16-0996.

[101] R. W. Hunter *i sur.*, „Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1-6-bisphosphatase“, *Nat. Med.*, sv. 24, izd. 9, 2018, doi: 10.1038/s41591-018-0159-7.

[102] D. J. Drucker, „GLP-1-based therapies for diabetes, obesity and beyond“, *Nat. Rev. Drug Discov.*, sv. 24, izd. 8, 2025, doi: 10.1038/s41573-025-01183-8.

[103] B. C. Simes i G. G. MacGregor, „Sodium-Glucose Cotransporter-2 (SGLT2) Inhibitors: A Clinician’s Guide“, *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.*, sv. 12, 2019, doi: 10.2147/DMSO.S212003.

[104] T. A. Zelniker *i sur.*, „SGLT2 inhibitors for primary and secondary prevention of cardiovascular and renal outcomes in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis of cardiovascular outcome trials“, *Lancet*, sv. 393, izd. 10166, 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(18)32590-X.

[105] American Diabetes Association, „Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus“, *Diabetes Care*, sv. 37, izd. Supplement_1, 2013, doi: 10.2337/dc14-S081.

[106] L. N. Sharp *i sur.*, „Population Prevalence, Penetrance, and Mortality for Genetically Confirmed MODY“, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, sv. 111, izd. 5, 2026, doi: 10.1210/clinem/dgaf599.

[107] K. Zečević *i sur.*, „Maturity-onset diabetes of the young (MODY) - in search of ideal diagnostic criteria and precise treatment“, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, sv. 85, 2024, doi: 10.1016/j.pcad.2024.03.004.

[108] T. O. Yahaya i S. B. Ufuoma, „Genetics and Pathophysiology of Maturity-onset Diabetes of the Young (MODY): A Review of Current Trends“, *Oman Med. J.*, sv. 35, izd. 3, 2020, doi: 10.5001/omj.2020.44.

[109] Y.-N. Lee i M. S. Huda, „Uncommon forms of diabetes“, *Clin. Med.*, sv. 21, izd. 4, 2021, doi: 10.7861/clinmed.2021-0369.

[110] Y. Yuyama, T. Kawamura, Y. Hotta, N. Nishikawa-Nakamura, i T. Hamazaki, „Treatment strategy for maturity-onset diabetes of the young 3 (MODY3): Experience with two sisters and their mother“, *Clin. Pediatr. Endocrinol. Case Rep. Clin. Investig. Off. J. Jpn. Soc. Pediatr. Endocrinol.*, sv. 32, izd. 4, 2023, doi: 10.1297/cpe.2022-0074.

[111] R. Naylor i L. H. Philipson, „Who should have genetic testing for maturity-onset diabetes of the young?“, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, sv. 75, izd. 4, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04049.x.

[112] B. M. Shields, S. Hicks, M. H. Shepherd, K. Colclough, A. T. Hattersley, i S. Ellard, „Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing?“, *Diabetologia*, sv. 53, izd. 12, 2010, doi: 10.1007/s00125-010-1799-4.

[113] H. D. McIntyre, P. Catalano, C. Zhang, G. Desoye, E. R. Mathiesen, i P. Damm, „Gestational diabetes mellitus“, *Nat. Rev. Dis. Primer*, sv. 5, izd. 1, 2019, doi: 10.1038/s41572-019-0098-8.

[114] American Diabetes Association Professional Practice Committee, „15. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Care in Diabetes—2024“, *Diabetes Care*, sv. 47, izd. Supplement_1, 2023, doi: 10.2337/dc24-S015.

[115] L. Bellamy, J.-P. Casas, A. D. Hingorani, i D. Williams, „Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis“, *The Lancet*, sv. 373, izd. 9677, 2009, doi: 10.1016/S0140-6736(09)60731-5.

[116] S. Cereghini, „Liver-enriched transcription factors and hepatocyte“, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, sv. 10, 1996, doi: 10.1096/fasebj.10.2.8641560.

[117] D. B. Mendel, L. P. Hansen, M. K. Graves, P. B. Conley, i G. R. Crabtree, „HNF-1 alpha and HNF-1 beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro“, *Genes Dev.*, sv. 5, izd. 6, 1991, doi: 10.1101/gad.5.6.1042.

[118] L. A. Cirillo, F. R. Lin, I. Cuesta, D. Friedman, M. Jarnik, i K. S. Zaret, „Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4“, *Mol. Cell*, sv. 9, izd. 2, 2002, doi: 10.1016/s1097-2765(02)00459-8.

[119] B. Beinsteiner, I. M. L. Billas, i D. Moras, „Structural insights into the HNF4 biology“, *Front. Endocrinol.*, sv. 14, 2023, doi: 10.3389/fendo.2023.1197063.

[120] F. P. Lemaigre, S. M. Durviaux, O. Truong, V. J. Lannoy, J. J. Hsuan, i G. G. Rousseau, „Hepatocyte nuclear factor 6, a transcription factor that contains a novel type of homeodomain and a single cut domain.“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, sv. 93, izd. 18, 1996, doi: 10.1073/pnas.93.18.9460.

[121] L. Kind *i sur.*, „Structural properties of the HNF-1A transactivation domain“, *Front. Mol. Biosci.*, sv. 10, 2023, doi: 10.3389/fmolb.2023.1249939.

[122] J. Rey-Campos, T. Chouard, M. Yaniv, i S. Cereghini, „vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1“, *EMBO J.*, sv. 10, izd. 6, 1991, doi: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb07665.x.

[123] F. Tronche i M. Yaniv, „HNF1, a homeoprotein member of the hepatic transcription regulatory network“, *BioEssays*, sv. 14, izd. 9, 1992, doi: 10.1002/bies.950140902.

[124] L. W. Harries, S. Ellard, A. Stride, N. G. Morgan, A. T. Hattersley, i The European MODY consortium, „Isomers of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes“, *Hum. Mol. Genet.*, sv. 15, izd. 14, 2006, doi: 10.1093/hmg/ddl147.

[125] F. L. Cardenas-Diaz *i sur.*, „Modeling Monogenic Diabetes using Human ESCs Reveals Developmental and Metabolic Deficiencies Caused by Mutations in HNF1A“, *Cell Stem Cell*, sv. 25, izd. 2, 2019, doi: 10.1016/j.stem.2019.07.007.

[126] A. K. Elsayed, I. Younis, G. Ali, K. Hussain, i E. M. Abdelalim, „Aberrant development of pancreatic beta cells derived from human iPSCs with FOXA2 deficiency“, *Cell Death Dis.*, sv. 12, izd. 1, 2021, doi: 10.1038/s41419-021-03390-8.

[127] L. Kind *i sur.*, „Molecular mechanism of HNF-1A–mediated *HNF4A* gene regulation and promoter-driven HNF4A-MODY diabetes“, *JCI Insight*, sv. 9, izd. 11, 2024, doi: 10.1172/jci.insight.175278.

[128] E. Bernardo *i sur.*, „HNF1A and A1CF coordinate a beta cell transcription-splicing axis that is disrupted in type 2 diabetes“, *Cell Metab.*, sv. 37, izd. 9, 2025, doi: 10.1016/j.cmet.2025.07.007.

[129] A. P. Gjesing *i sur.*, „High Prevalence of Diabetes-Predisposing Variants in MODY Genes Among Danish Women With Gestational Diabetes Mellitus“, *J. Endocr. Soc.*, sv. 1, izd. 6, 2017, doi: 10.1210/js.2017-00040.

[130] N. Shaat *i sur.*, „Common variants in MODY genes increase the risk of gestational diabetes mellitus“, *Diabetologia*, sv. 49, izd. 7, 2006, doi: 10.1007/s00125-006-0258-8.

[131] L. A. Najmi *i sur.*, „Functional Investigations of HNF1A Identify Rare Variants as Risk Factors for Type 2 Diabetes in the General Population“, *Diabetes*, sv. 66, izd. 2, 2017, doi: 10.2337/db16-0460.

[132] X. Yuan *i sur.*, „Identification of an Endogenous Ligand Bound to a Native Orphan Nuclear Receptor“, *PLOS ONE*, sv. 4, izd. 5, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0005609.

[133] S. H. Radi, K. Vemuri, J. Martinez-Lomeli, i F. M. Sladek, „HNF4α isoforms: the fraternal twin master regulators of liver function“, *Front. Endocrinol.*, sv. 14, 2023, doi: 10.3389/fendo.2023.1226173.

[134] L. W. Harries *i sur.*, „The diabetic phenotype in HNF4A mutation carriers is moderated by the expression of HNF4A isoforms from the P1 promoter during fetal development“, *Diabetes*, sv. 57, izd. 6, 2008, doi: 10.2337/db07-1742.

[135] H. L. Ko, Z. Zhuo, i E. C. Ren, „HNF4α Combinatorial Isoform Heterodimers Activate Distinct Gene Targets that Differ from Their Corresponding Homodimers“, *Cell Rep.*, sv. 26, izd. 10, 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.033.

[136] É. Lambert *i sur.*, „Human Hepatocyte Nuclear Factor 4-α Encodes Isoforms with Distinct Transcriptional Functions“, *Mol. Cell. Proteomics MCP*, sv. 19, izd. 5, 2020, doi: 10.1074/mcp.RA119.001909.

[137] S. F. Boj, D. Petrov, i J. Ferrer, „Epistasis of Transcriptomes Reveals Synergism between Transcriptional Activators Hnf1α and Hnf4α“, *PLOS Genet.*, sv. 6, izd. 5, 2010, doi: 10.1371/journal.pgen.1000970.

[138] J. Eeckhoute, P. Formstecher, i B. Laine, „Hepatocyte nuclear factor 4alpha enhances the hepatocyte nuclear factor 1alpha-mediated activation of transcription“, *Nucleic Acids Res.*, sv. 32, izd. 8, 2004, doi: 10.1093/nar/gkh581.

[139] L. Love-Gregory i M. A. Permutt, „HNF4A genetic variants: role in diabetes“, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, sv. 10, izd. 4, 2007, doi: 10.1097/MCO.0b013e3281e3888d.

[140] J. Zhang *i sur.*, „Identification and precision therapy for three maturity-onset diabetes of the young (MODY) families caused by mutations in the HNF4A gene“, *Front. Endocrinol.*, sv. 14, 2023, doi: 10.3389/fendo.2023.1237553.

[141] E. R. Pearson *i sur.*, „Macrosomia and Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia in Patients with Heterozygous Mutations in the HNF4A Gene“, *PLOS Med.*, sv. 4, izd. 4, 2007, doi: 10.1371/journal.pmed.0040118.

[142] C. Cieza-Borrella, G. Díaz-Soto, I. Martínez-Pino, M. Puig-Domingo, i R. González-Sarmiento, „Early-onset type 2 diabetes mellitus is associated to HNF4A T130I polymorphism in families of central Spain“, *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.*, sv. 62, izd. 8, 2014, doi: 10.1097/JIM.0000000000000114.

[143] K. T. Schjoldager, Y. Narimatsu, H. J. Joshi, i H. Clausen, „Global view of human protein glycosylation pathways and functions“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, sv. 21, izd. 12, 2020, doi: 10.1038/s41580-020-00294-x.

[144] R. A. Flynn *i sur.*, „Small RNAs are modified with N-glycans and displayed on the surface of living cells“, *Cell*, sv. 184, izd. 12, 2021, doi: 10.1016/j.cell.2021.04.023.

[145] E. S. Trombetta i A. Helenius, „Lectins as chaperones in glycoprotein folding“, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, sv. 8, izd. 5, 1998, doi: 10.1016/S0959-440X(98)80148-6.

[146] A. Liwosz, T. Lei, i M. A. Kukuruzinska, „N-glycosylation affects the molecular organization and stability of E-cadherin junctions“, *J. Biol. Chem.*, sv. 281, izd. 32, 2006, doi: 10.1074/jbc.M512621200.

[147] S. S. Pinho *i sur.*, „Modulation of E-cadherin function and dysfunction by N-glycosylation“, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, sv. 68, izd. 6, 2011, doi: 10.1007/s00018-010-0595-0.

[148] J. Krištić i G. Lauc, „The importance of IgG glycosylation-What did we learn after analyzing over 100,000 individuals“, *Immunol. Rev.*, sv. 328, izd. 1, 2024, doi: 10.1111/imr.13407.

[149] M. A. Stanczak *i sur.*, „Targeting cancer glycosylation repolarizes tumor-associated macrophages allowing effective immune checkpoint blockade“, *Sci. Transl. Med.*, sv. 14, izd. 669, 2022, doi: 10.1126/scitranslmed.abj1270.

[150] S. Hong *i sur.*, „In Situ Fucosylation of the Wnt Co-receptor LRP6 Increases Its Endocytosis and Reduces Wnt/β-Catenin Signaling“, *Cell Chem. Biol.*, sv. 27, izd. 9, 2020, doi: 10.1016/j.chembiol.2020.06.015.

[151] X. Sun *i sur.*, „ALG3 contributes to stemness and radioresistance through regulating glycosylation of TGF-β receptor II in breast cancer“, *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR*, sv. 40, izd. 1, 2021, doi: 10.1186/s13046-021-01932-8.

[152] K. Hamamura, M. Nagao, i K. Furukawa, „Regulation of Glycosylation in Bone Metabolism“, *Int. J. Mol. Sci.*, sv. 25, izd. 7, 2024, doi: 10.3390/ijms25073568.

[153] A. Varki *i sur.*, Ur., *Essentials of Glycobiology*, 3rd izd. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. Pristupljeno: 02. rujan 2026. [Na internetu]. Dostupno na: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/

[154] C. Xu i D. T. W. Ng, „Glycosylation-directed quality control of protein folding“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, sv. 16, izd. 12, 2015, doi: 10.1038/nrm4073.

[155] M. Aebi, „N-linked protein glycosylation in the ER“, *Biochim. Biophys. Acta*, sv. 1833, izd. 11, 2013, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.04.001.

[156] S. S. Andrali, Q. Qian, i S. Özcan, „Glucose Mediates the Translocation of NeuroD1 by *O*-Linked Glycosylation*“, *J. Biol. Chem.*, sv. 282, izd. 21, 2007, doi: 10.1074/jbc.M701762200.

[157] K. Liu, A. J. Paterson, E. Chin, i J. E. Kudlow, „Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic β cells: Linkage of O-linked GlcNAc to β cell death“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, sv. 97, izd. 6, 2000, doi: 10.1073/pnas.97.6.2820.

[158] C. D'Alessandris *i sur.*, „Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells“, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, sv. 18, izd. 9, 2004, doi: 10.1096/fj.03-0725fje.

[159] T. Keser *i sur.*, „Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes“, *Diabetologia*, sv. 60, izd. 12, 2017, doi: 10.1007/s00125-017-4426-9.

[160] A. Cvetko *i sur.*, „Plasma N-glycome shows continuous deterioration as the diagnosis of insulin resistance approaches“, *BMJ Open Diabetes Res. Care*, sv. 9, izd. 1, 2021, doi: 10.1136/bmjdrc-2021-002263.

[161] J. Niu *i sur.*, „Longitudinal study reveals plasma glycans associations with prediabetes/type 2 diabetes in KORA study“, *Cardiovasc. Diabetol.*, sv. 24, izd. 1, 2025, doi: 10.1186/s12933-025-02853-y.

[162] A. Mahajan *i sur.*, „Fine-mapping type 2 diabetes loci to single-variant resolution using high-density imputation and islet-specific epigenome maps“, *Nat. Genet.*, sv. 50, izd. 11, 2018, doi: 10.1038/s41588-018-0241-6.

[163] J. S. Kooner *i sur.*, „Genome-wide association study in individuals of South Asian ancestry identifies six new type 2 diabetes susceptibility loci“, *Nat. Genet.*, sv. 43, izd. 10, 2011, doi: 10.1038/ng.921.

[164] M. van de Bunt *i sur.*, „Transcript Expression Data from Human Islets Links Regulatory Signals from Genome-Wide Association Studies for Type 2 Diabetes and Glycemic Traits to Their Downstream Effectors“, *PLOS Genet.*, sv. 11, izd. 12, 2015, doi: 10.1371/journal.pgen.1005694.

[165] Y. Ishino, M. Krupovic, i P. Forterre, „History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology“, *J. Bacteriol.*, sv. 200, izd. 7, 2018, doi: 10.1128/JB.00580-17.

[166] C. Liao i C. L. Beisel, „The tracrRNA in CRISPR Biology and Technologies“, *Annu. Rev. Genet.*, sv. 55, 2021, doi: 10.1146/annurev-genet-071719-022559.

[167] E. R. Westra *i sur.*, „Type I-E CRISPR-Cas Systems Discriminate Target from Non-Target DNA through Base Pairing-Independent PAM Recognition“, *PLOS Genet.*, sv. 9, izd. 9, 2013, doi: 10.1371/journal.pgen.1003742.

[168] S. W. Cho, S. Kim, J. M. Kim, i J.-S. Kim, „Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease“, *Nat. Biotechnol.*, sv. 31, izd. 3, 2013, doi: 10.1038/nbt.2507.

[169] L. Cong *i sur.*, „Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems“, *Science*, sv. 339, izd. 6121, 2013, doi: 10.1126/science.1231143.

[170] P. Mali *i sur.*, „RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9“, *Science*, sv. 339, izd. 6121, 2013, doi: 10.1126/science.1232033.

[171] L. A. Gilbert *i sur.*, „CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes“, *Cell*, sv. 154, izd. 2, 2013, doi: 10.1016/j.cell.2013.06.044.

[172] H. Ma *i sur.*, „Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow“, *Nat. Biotechnol.*, sv. 34, izd. 5, 2016, doi: 10.1038/nbt.3526.

[173] I. B. Hilton *i sur.*, „Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers“, *Nat. Biotechnol.*, sv. 33, izd. 5, 2015, doi: 10.1038/nbt.3199.

[174] A. Vojta *i sur.*, „Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation“, *Nucleic Acids Res.*, sv. 44, izd. 12, 2016, doi: 10.1093/nar/gkw159.

[175] X. S. Liu *i sur.*, „Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome“, *Cell*, sv. 167, izd. 1, 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.08.056.

[176] A. C. Komor, Y. B. Kim, M. S. Packer, J. A. Zuris, i D. R. Liu, „Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage“, *Nature*, sv. 533, izd. 7603, 2016, doi: 10.1038/nature17946.

[177] S. Bodapati, T. P. Daley, X. Lin, J. Zou, i L. S. Qi, „A benchmark of algorithms for the analysis of pooled CRISPR screens“, *Genome Biol.*, sv. 21, izd. 1, 2020, doi: 10.1186/s13059-020-01972-x.

[178] P. I. Thakore *i sur.*, „Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements“, *Nat. Methods*, sv. 12, izd. 12, 2015, doi: 10.1038/nmeth.3630.

[179] S. P. Sripathy, J. Stevens, i D. C. Schultz, „The KAP1 corepressor functions to coordinate the assembly of de novo HP1-demarcated microenvironments of heterochromatin required for KRAB zinc finger protein-mediated transcriptional repression“, *Mol. Cell. Biol.*, sv. 26, izd. 22, 2006, doi: 10.1128/MCB.00487-06.

[180] D. C. Schultz, J. R. Friedman, i F. J. Rauscher, „Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD“, *Genes Dev.*, sv. 15, izd. 4, 2001, doi: 10.1101/gad.869501.

[181] D. C. Schultz, K. Ayyanathan, D. Negorev, G. G. Maul, i F. J. Rauscher, „SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins“, *Genes Dev.*, sv. 16, izd. 8, 2002, doi: 10.1101/gad.973302.

[182] N. Reynolds *i sur.*, „NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression“, *EMBO J.*, sv. 31, izd. 3, 2012, doi: 10.1038/emboj.2011.431.

[183] A. Chavez *i sur.*, „Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming“, *Nat. Methods*, sv. 12, izd. 4, 2015, doi: 10.1038/nmeth.3312.

[184] J. A. Casas-Mollano, M. H. Zinselmeier, S. E. Erickson, i M. J. Smanski, „CRISPR-Cas Activators for Engineering Gene Expression in Higher Eukaryotes“, *CRISPR J.*, sv. 3, izd. 5, 2020, doi: 10.1089/crispr.2020.0064.

[185] C. Guo, X. Ma, F. Gao, i Y. Guo, „Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing“, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, sv. 11, 2023, doi: 10.3389/fbioe.2023.1143157.

[186] G. L. Butterfield *i sur.*, „Characterization of diverse Cas9 orthologs for genome and epigenome editing“, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, sv. 122, izd. 11, 2025, doi: 10.1073/pnas.2417674122.

[187] K. Guan *i sur.*, „Comparative characterization of Cas12f orthologs reveals mechanistic features underlying enhanced genome editing efficiency“, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, sv. 33, izd. 5, 2026, doi: 10.1038/s41594-026-01788-6.

[188] O. O. Abudayyeh *i sur.*, „C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector“, *Science*, sv. 353, izd. 6299, 2016, doi: 10.1126/science.aaf5573.

[189] X. Xu *i sur.*, „Engineered miniature CRISPR-Cas system for mammalian genome regulation and editing“, *Mol. Cell*, sv. 81, izd. 20, 2021, doi: 10.1016/j.molcel.2021.08.008.

[190] S. Ma *i sur.*, „hpCasMINI: An engineered hypercompact CRISPR-Cas12f system with boosted gene editing activity“, *Nat. Commun.*, sv. 16, izd. 1, 2025, doi: 10.1038/s41467-025-60124-6.

[191] C. Chakraborty, M. Bhattacharya, A. Das, G. Agoramoorthy, i S.-S. Lee, „CRISPR-Cas9-mediated therapeutics: Current clinical trials and therapy approval landscape to treat human diseases“, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, sv. 37, izd. 1, 2026, doi: 10.1016/j.omtn.2026.102859.

[192] J. Ye, G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, i T. L. Madden, „Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction“, *BMC Bioinformatics*, sv. 13, izd. 1, 2012, doi: 10.1186/1471-2105-13-134.

[193] „casmini-tool.com“. Pristupljeno: 02. rujan 2026. [Na internetu]. Dostupno na: https://www.casmini-tool.com/

[194] J.-P. Concordet i M. Haeussler, „CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens“, *Nucleic Acids Res.*, sv. 46, izd. W1, 2018, doi: 10.1093/nar/gky354.

[195] K. Labun, T. G. Montague, M. Krause, Y. N. Torres Cleuren, H. Tjeldnes, i E. Valen, „CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing“, *Nucleic Acids Res.*, sv. 47, izd. W1, 2019, doi: 10.1093/nar/gkz365.

[196] G. Josipović *i sur.*, „Antagonistic and synergistic epigenetic modulation using orthologous CRISPR/dCas9-based modular system“, *Nucleic Acids Res.*, sv. 47, izd. 18, 2019, doi: 10.1093/nar/gkz709.

[197] A. Mijakovac *i sur.*, „Effects of Estradiol on Immunoglobulin G Glycosylation: Mapping of the Downstream Signaling Mechanism“, *Front. Immunol.*, sv. 12, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.680227.

[198] P. A. Halban, „50 years forward: beta cells“, *Diabetologia*, sv. 58, izd. 8, 2015, doi: 10.1007/s00125-015-3601-0.

[199] N. A. J. Krentz i A. L. Gloyn, „Insights into pancreatic islet cell dysfunction from type 2 diabetes mellitus genetics | Nature Reviews Endocrinology“, *Nat. Rev. Endocrinol.*, sv. 16, izd. 4, 2020, doi: 10.1038/s41574-020-0325-0.

[200] A. Viñuela *i sur.*, „Genetic variant effects on gene expression in human pancreatic islets and their implications for T2D | Nature Communications“, *Nat. Commun.*, sv. 11, izd. 1, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-18581-8.

[201] S. K. Thomsen *i sur.*, „Type 2 diabetes risk alleles in PAM impact insulin release from human pancreatic β-cells | Nature Genetics“, *Nat. Genet.*, sv. 50, izd. 8, 2018, doi: 10.1038/s41588-018-0173-1.

[202] R. S. Dos Santos, D. Guzman-Llorens, A. A. Perez-Serna, A. Nadal, i L. Marroqui, „Deucravacitinib, a tyrosine kinase 2 pseudokinase inhibitor, protects human EndoC-βH1 β-cells against proinflammatory insults“, *Front. Immunol.*, sv. 14, 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1263926.

[203] L. Zhu *i sur.*, „β-arrestin-2 is an essential regulator of pancreatic β-cell function under physiological and pathophysiological conditions | Nature Communications“, *Nat. Commun.*, sv. 8, izd. 1, 2017, doi: 10.1038/ncomms14295.

[204] A. K. Grotz, F. Abaitua, E. Navarro-Guerrero, B. Hastoy, D. Ebner, i A. L. Gloyn, „A CRISPR/Cas9 genome editing pipeline in the EndoC-βH1 cell line to study genes implicated in beta cell function“, *Wellcome Open Res.*, sv. 4, 2019, doi: 10.12688/wellcomeopenres.15447.2.

[205] F. L. Cardenas-Diaz *i sur.*, „A Dual Reporter EndoC-βH1 Human β-Cell Line for Efficient Quantification of Calcium Flux and Insulin Secretion“, *Endocrinology*, sv. 161, izd. 2, 2020, doi: 10.1210/endocr/bqaa005.

[206] N. P. Sweeney i C. A. Vink, „The impact of lentiviral vector genome size and producer cell genomic to gag-pol mRNA ratios on packaging efficiency and titre“, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, sv. 21, 2021, doi: 10.1016/j.omtm.2021.04.007.

[207] G. Joberty *i sur.*, „A Tandem Guide RNA-Based Strategy for Efficient CRISPR Gene Editing of Cell Populations with Low Heterogeneity of Edited Alleles“, *CRISPR J.*, sv. 3, izd. 2, 2020, doi: 10.1089/crispr.2019.0064.

[208] L. Pelletier, S. Rebouissou, D. Vignjevic, P. Bioulac-Sage, i J. Zucman-Rossi, „HNF1α inhibition triggers epithelial-mesenchymal transition in human liver cancer cell lines“, *BMC Cancer*, sv. 11, izd. 1, 2011, doi: 10.1186/1471-2407-11-427.

[209] S. Park *i sur.*, „Suppression of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α by Long-term Infection of Hepatitis B Virus Contributes to Tumor Cell Proliferation“, *Int. J. Mol. Sci.*, sv. 21, izd. 3, 2020, doi: 10.3390/ijms21030948.

[210] A. Mijakovac *i sur.*, „A Transient Expression System with Stably Integrated CRISPR-dCas9 Fusions for Regulation of Genes Involved in Immunoglobulin G Glycosylation“, *CRISPR J.*, sv. 5, izd. 2, 2022, doi: 10.1089/crispr.2021.0089.

[211] A. Frkatović-Hodžić *i sur.*, „Mapping of the gene network that regulates glycan clock of ageing“, *Aging*, sv. 15, izd. 24, 2023, doi: 10.18632/aging.205106.

[212] J. M. Replogle *i sur.*, „Combinatorial single-cell CRISPR screens by direct guide RNA capture and targeted sequencing“, *Nat. Biotechnol.*, sv. 38, izd. 8, 2020, doi: 10.1038/s41587-020-0470-y.

[213] J. M. Replogle *i sur.*, „Maximizing CRISPRi efficacy and accessibility with dual-sgRNA libraries and optimal effectors“, *eLife*, sv. 11, 2022, doi: 10.7554/eLife.81856.

[214] N. C. Yeo *i sur.*, „An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation“, *Nat. Methods*, sv. 15, izd. 8, 2018, doi: 10.1038/s41592-018-0048-5.

[215] H.-H. Huang *i sur.*, „dCas9 regulator to neutralize competition in CRISPRi circuits“, *Nat. Commun.*, sv. 12, izd. 1, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-21772-6.

[216] S. Zhang i C. A. Voigt, „Engineered dCas9 with reduced toxicity in bacteria: implications for genetic circuit design“, *Nucleic Acids Res.*, sv. 46, izd. 20, 2018, doi: 10.1093/nar/gky884.

[217] H. Wang, P. Maechler, K. A. Hagenfeldt, i C. B. Wollheim, „Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line“, *EMBO J.*, sv. 17, izd. 22, 1998, doi: 10.1093/emboj/17.22.6701.

[218] F. M. Hermann *i sur.*, „An insulin hypersecretion phenotype precedes pancreatic β cell failure in MODY3 patient-specific cells“, *Cell Stem Cell*, sv. 30, izd. 1, 2023, doi: 10.1016/j.stem.2022.12.001.

[219] D. Park, K. A. Brune, A. Mitra, A. I. Marusina, E. Maverakis, i C. B. Lebrilla, „Characteristic Changes in Cell Surface Glycosylation Accompany Intestinal Epithelial Cell (IEC) Differentiation: High Mannose Structures Dominate the Cell Surface Glycome of Undifferentiated Enterocytes“, *Mol. Cell. Proteomics MCP*, sv. 14, izd. 11, 2015, doi: 10.1074/mcp.M115.053983.

[220] A. Mehta *i sur.*, „Intrinsic hepatocyte dedifferentiation is accompanied by upregulation of mesenchymal markers, protein sialylation and core alpha 1,6 linked fucosylation“, *Sci. Rep.*, sv. 6, izd. 1, 2016, doi: 10.1038/srep27965.

[221] H. Montacir, K. Biskup, M. Sittinger, R. Tauber, i V. Blanchard, „The N-Glycome to Differentiate Mesenchymal Stem Cells Upon Chondrogenic Differentiation,

Dedifferentiation, and Senescence“, *PROTEOMICS*, sv. 26, izd. 7, 2026, doi: 10.1002/pmic.70124.

[222] R. Zhao *i sur.*, „Lectin array and glycogene expression analyses of ovarian cancer cell line A2780 and its cisplatin-resistant derivate cell line A2780-cp“, *Clin. Proteomics*, sv. 14, 2017, doi: 10.1186/s12014-017-9155-z.

[223] C. Krizhanovskii *i sur.*, „EndoC-βH1 cells display increased sensitivity to sodium palmitate when cultured in DMEM/F12 medium“, *Islets*, sv. 9, izd. 3, 2017, doi: 10.1080/19382014.2017.1296995.

[224] S. Inafuku *i sur.*, „Alteration of N-Glycan Profiles in Diabetic Retinopathy“, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, sv. 56, izd. 9, 2015, doi: 10.1167/iovs.15-16747.

[225] G. Greville *i sur.*, „Hypoxia Alters Epigenetic and N-Glycosylation Profiles of Ovarian and Breast Cancer Cell Lines in-vitro“, *Front. Oncol.*, sv. 10, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.01218.

[226] B. Peng, K. Bartkowiak, F. Song, P. Nissen, H. Schlüter, i B. Siebels, „Hypoxia-Induced Adaptations of N-Glycomes and Proteomes in Breast Cancer Cells and Their Secreted Extracellular Vesicles“, *Int. J. Mol. Sci.*, sv. 25, izd. 18, 2024, doi: 10.3390/ijms251810216.

[227] B. L. Parker, M. Thaysen-Andersen, D. J. Fazakerley, M. Holliday, N. H. Packer, i D. E. James, „Terminal Galactosylation and Sialylation Switching on Membrane Glycoproteins upon TNF-Alpha-Induced Insulin Resistance in Adipocytes“, *Mol. Cell. Proteomics MCP*, sv. 15, izd. 1, 2016, doi: 10.1074/mcp.M115.054221.

[228] M. Udono *i sur.*, „Impaired ATP6V0A2 expression contributes to Golgi dispersion and glycosylation changes in senescent cells“, *Sci. Rep.*, sv. 5, izd. 1, 2015, doi: 10.1038/srep17342.

[229] A. F. Swindall i S. L. Bellis, „Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells“, *J. Biol. Chem.*, sv. 286, izd. 26, 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.211375.

[230] J. Hwang *i sur.*, „Apoptotic signaling by TNFR1 is inhibited by the α2-6 sialylation, but not α2-3 sialylation, of the TNFR1 N-glycans“, *J. Biol. Chem.*, sv. 301, izd. 1, 2025, doi: 10.1016/j.jbc.2024.108043.

[231] H. Wang, P. Maechler, P. A. Antinozzi, K. A. Hagenfeldt, i C. B. Wollheim, „Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion“, *J. Biol. Chem.*, sv. 275, izd. 46, 2000, doi: 10.1074/jbc.M006612200.

[232] C. Weng *i sur.*, „Single cell multiomic analysis reveals diabetes-associated β-cell heterogeneity driven by HNF1A“, *Nat. Commun.*, sv. 14, izd. 1, 2023, doi: 10.1038/s41467-023-41228-3.

8. Životopis

Fran Lukšić rođen je 27. travnja 1997. godine u Zagrebu, a odrastao je u Samoboru, gdje je završio Osnovnu školu Samobor i Gimnaziju Antun Gustav Matoš. Godine 2016. upisao je Preddiplomski studij molekularne biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a 2019. godine na istom je fakultetu nastavio obrazovanje na Diplomskom studiju molekularne biologije. Za izniman uspjeh tijekom diplomskog studija 2021. godine nagrađen je Dekanovom nagradom.

Diplomski studij završio je 2021. godine izradom diplomskog rada pod naslovom „Utjecaj starenja stanične linije FreeStyle™ 293-F na glikozilaciju izlučenog imunoglobulina G“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš. Iste je godine upisao poslijediplomski doktorski studij Biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2021. do 2023. godine bio je zaposlen kao suradnik na projektu IRI-Cardiometabolic u Grupi za epigenetiku Zavoda za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 2024. godine zaposlen je u tvrtki Genos d.o.o., gdje je proveo istraživanja koja čine drugi dio doktorske disertacije.

Tijekom doktorskog studija sudjelovao je na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova, na kojima je rezultate istraživanja predstavio kroz tri posterska i jedno usmeno izlaganje. Sudjelovao je i u izvođenju nastave na kolegijima Genetika i Molekularna citogenetika te u radu na projektima IRI-Cardiometabolic i IgGeneNET. Do sada je objavio jedan znanstveni rad u međunarodnom znanstvenom časopisu, čiji je prvi autor.