Epigenetička manipulacija gena MGAT4A i MGAT5 upotrebom molekularnog alata VPR-dCas9 u modelnoj staničnoj liniji gušterače 1.1B4

Lalić, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:058743

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-27**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dora Lalić

Epigenetička manipulacija gena *MGAT4A* i *MGAT5* upotrebom molekularnog alata VPR-dCas9 u modelnoj staničnoj liniji gušterače 1.1B4

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Dora Lalić

Epigenetic manipulation of the *MGAT4A* i *MGAT5* genes in pancreatic model cell line 1.1B4 using VPR-dCas9 molecular tool

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš, te neposrednim voditeljstvom dr. sc. Vedrane Vičić Bočkor. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš na pruženoj prilici i iskustvima te posebno hvala za divan pristup prema meni i drugim studentima.

Veliko hvala dr. sc. Vedrani Vičić Bočkor na strpljenju, pomoći i uloženom trudu koji me je pripremio za samostalan rad u laboratoriju. Također hvala na divnom pristupu i razumijevanju.

Naposlijetku, hvala svim kolegama iz grupe, posebice Karlu Miškecu, na pomoći kada je zatrebalo i na odgovaranju na moja mnoga pitanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Epigenetička manipulacija gena *MGAT4A* i *MGAT5* upotrebom molekularnog alata VPR-dCas9 u modelnoj staničnoj liniji gušterače

Dora Lalić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Transporteri GLUT (engl. *Glucose Transporter)* nalaze se na membranama beta-stanica gušterače te su odgovorni za unos glukoze iz krvotoka, što u konačnici dovodi do ispuštanja inzulina koji regulira razinu glukoze u krvi. U miševa je dokazano da nedostatak glikoziltransferaza GnT-4a i GnT-V, kodiranih genima *MGAT4A* i *MGAT5*, uzrokuje nepravilnu glikozilaciju transportera GLUT i smanjenje njihove količine u membranama, što posljedično dovodi do razvitka dijabetesa tipa 2. Čini se da isti mehanizam postoji i u ljudima, ali mreža molekularnih događaja uključenih u nepravilnu regulaciju glikoproteina GLUT nije još razjašnjena.
U ovom je istraživanju ciljano povećana ekspresija gena *MGAT4A* i *MGAT5* pomoću molekularnog sustava CRISPR/dCas9 koji na sebe ima fuzioniranu aktivacijsku domenu VPR kako bi se ispitao učinak na količinu i lokalizaciju transportera GLUT1 u stanicama 1.1B4, koje su model za ljudske beta-stanice gušterače. Ekspresija gena uspješno je povećana na razini transkripcije te je potvrđena reverznom transkripcijom i lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qPCR). Metodom Western blot analizirana je količina proteina GnT-4a i GnT-V te je uočen porast količine koji nije statistički značajan. Imunofluorescencijskim bojanjem analizirana je količina i lokalizacija transportera GLUT1 te je uočen gotovo dupli porast u količini transportera između tretiranih i kontrolnih stanica. Kako bi se istražilo na koji je način povećana količina enzima utjecala na povećanje količine transportera GLUT1, trebalo bi analizirati glikanski profil transportera.

Ključne riječi: CRISPR/dCas9, *MGAT4A*, *MGAT5*, dijabetes, GLUT1, stanična linija 1.1B4
(65 stranica, 19 slika, 11 tablica, 65 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Ocjenitelji:
Prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš
Izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković
Izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner

Rad prihvaćen: 06. listopada 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology Master thesis

Epigenetic manipulation of the *MGAT4A* i *MGAT5* genes in pancreatic model cell line 1.1B4 using VPR-dCas9 molecular tool

Dora Lalić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

GLUT transporters *(Glucose Transporters*), localized in membranes of pancreatic beta cells, are responsible for uptake of glucose from the bloodstream. That leads to release of insulin which regulates blood sugar level. It has been proven in mice that the absence of glycosytransferases GnT-4a and GnT-V, encoded by genes *MGAT4A* and *MGAT5*, leads to improper glycosylation of GLUT transporters and a decrease in their abundance, which leads to development of type 2 diabetes. It appears the same mechanism exists in people, however the network of exact molecular events that lead to impaired glycosylation of GLUT transporters has not yet been resolved.
In this study, expression of genes *MGAT4A* and *MGAT5* was upregulated using a CRISPR/dCas9 system to which an activating VPR domain was fused. Cell line 1.1B4 was used, which is a model cell line for human pancreatic beta cells, so the effect on GLUT transporters could be investigated. Gene upregulation was confirmed on a transcription level by reverse transcription and quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Protein analysis was done by Western blot and an increase in protein quantity was observed, but it was statistically unsignificant. Imunofluorescent staining was used to analyse the quantity and localization of GLUTs. Treated cells had almost double the quantity of GLUTs compared to the control group. To investigate the mechanism by which elevated levels of GnT-4a and GnT-V affected on GLUT quantity, glycan profile of transporters would have to be analysed.

Keywords: CRISPR/dCas9, *MGAT4A, MGAT5,* diabetes, GLUT1, 1.1B4 cell line
(65 pages, 19 figures, 11 tables, 65 references, original in: croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Vlatka Zoldoš

Reviewers:
Prof. Vlatka Zoldoš, PhD
Assoc. Prof. Tomislav Ivanković, PhD
Assoc. Prof. Jasna Lajtner, PhD

Thesis accepted: October 6th, 2022

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Dijabetes 1
1.1.1. Mehanizam GSIS 2
1.1.2. Transporteri GLUT 3
1.2. Glikozilacija proteina 4
1.2.1. Glikoziltransferaza GnT-4a 7
1.2.2. Glikoziltransferaza GnT-V 8
1.3. Epigenetička regulacija ekspresije 9
1.3.1. Metilacija DNA 10
1.3.2. Modifikacije histona 11
1.3.3. Varijante histona, male nekodirajuće RNA, remodeliranje kromatina i arhitektura jezgre 12
1.4. Molekularni alati CRISPR/dCas 14
1.4.1. Sustavi CRISPR u regulaciji ekspresije gena 15
2. CILJ 17
3. MATERIJAL I METODE 18
3.1. Materijal 18
3.2. Metode 21
3.2.1. Kloniranje plazmidnih vektora za ciljano povećanje ekspresije gena *MGAT4A* i *MGAT5* 21
3.2.1.1. Dizajn i kloniranje sgRNA sekvenci u vektore 21
3.2.1.2. Konstrukcija vektora N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 24
3.2.2. Održavanje stanica 1.1B4 u kulturi i transfekcija stanica plazmidnim vektorom za ciljano povećanje ekspresije gena *MGAT4A* i *MGAT5* 26
3.2.3. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR) 28
3.2.4. Metoda Western Blot 30
3.2.5. Imunofluorescencija 34

3.2.5.1 Analiza slika 35
3.2.6. Statistička analiza podataka 36
4. REZULTATI 37
4.1. Konstrukcija plazmida N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 37
4.2. Uzgoj, transfekcija i selekcija stanica 1.1B4 40
4.3. Analiza ekspresije gena metodom reverzne transkripcije i qPCR-a 43
4.4. Analiza proteina metodom Western blot 46
4.5. Vizualizacija transportera GLUT1 imunofluorescencijom 48
5. RASPRAVA 54
6. ZAKLJUČAK 59
7. LITERATURA 60
8. ŽIVOTOPIS 65

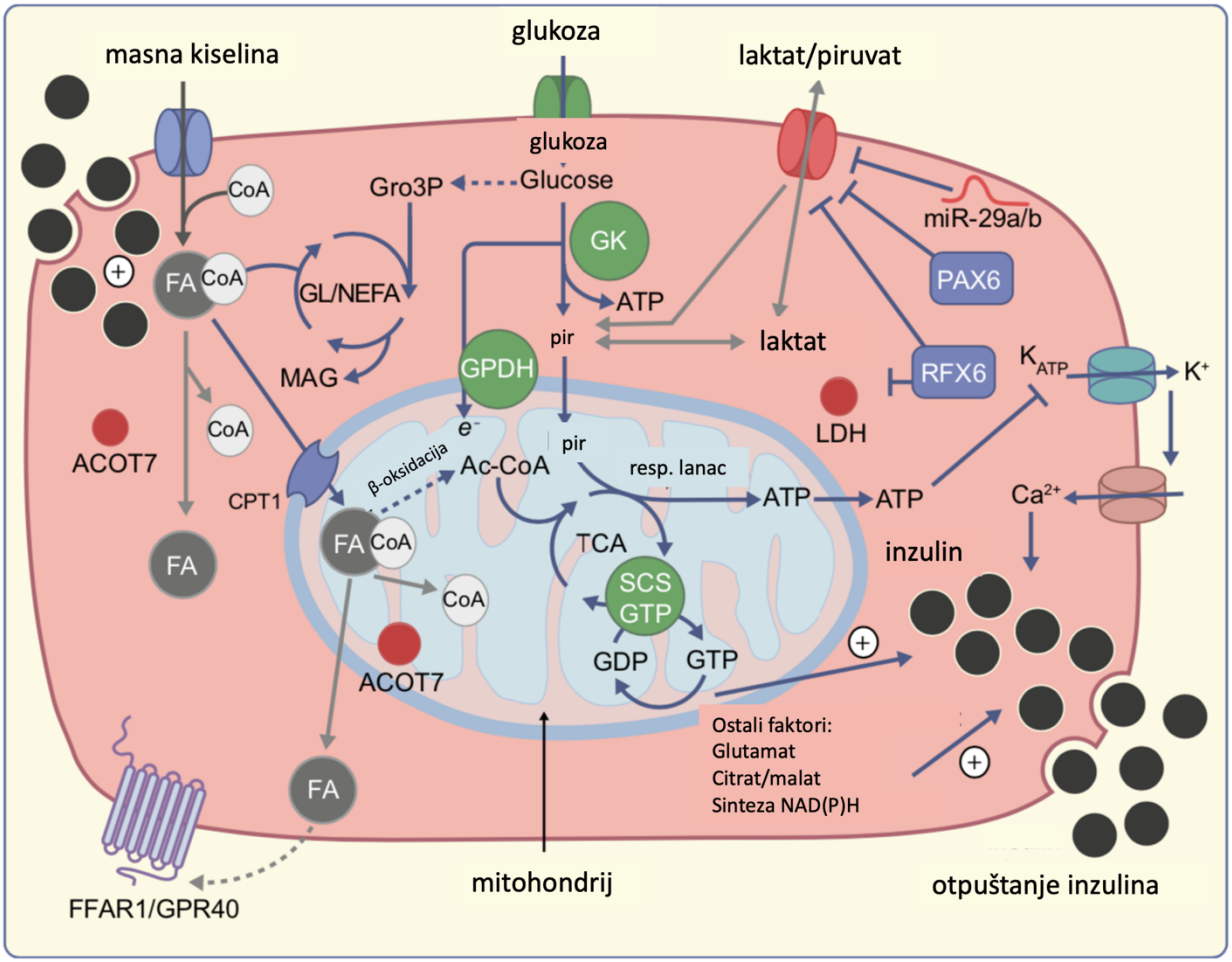
1. UVOD

1.1. Dijabetes

Dijabetes *(*lat. *diabetes mellitus)* predstavlja heterogenu skupinu bolesti koje karakterizira nepravilan metabolizam ugljikohidrata i masti (DeFronzo i sur. 2015). Glavni simptom ove bolesti je hiperglikemija, a ovisno o uzroku možemo razlikovati dijabetes tipa 1, dijabetes tipa 2, dijabetes MODY i gestacijski dijabetes, čiji se simptomi prvo javljaju u trudnoći (Coustan, 2013; Rudman, Gornik i Lauc, 2019). *Diabetes mellitus* tipa 1 se može podijeliti u dvije skupine; onu u kojoj beta-stanice Langerhansovih otočića gušterače ne proizvode dovoljno inzulina ili ga uopće ne proizvode (Li, Huang i Gao, 2017) i autoimuni oblik bolesti u kojoj organizam stvara antitijela na vlastite beta-stanice (Winter 2003). Pacijenti koji boluju od dijabetesa tipa 1 ovisni su o inzulinu te ga moraju egzogeno unositi u organizam. Dijabetes tipa MODY *(*engl. *Maturity Onset Diabetes of the Young)* je heterogena skupina bolesti koje karakterizira nepravilna funkcija beta-stanica, uzrokovana mutacijom u nekom od brojnih gena, a najčešće su to geni koji kodiraju za glukokinazu (GCK), hepatocitni nukelarni faktor 1α (HNF1A) ili hepatocitni nuklearni faktor 4α (HNF4A). Na njega otpada 1-2% ukupnih slučajeva dijabetesa te se nasljeđuje autosomalno dominantno (Thanabalasingham i Owen, 2011). Dijabetes tipa 2 je najzastupljenija varijanta ove bolesti i on čini preko 90% zabilježenih slučajeva dijabetesa (DeFronzo i sur., 2015). Karakterizira ga nedovoljno izlučivanje inzulina iz beta-stanica gušterače, rezistencija na inzulin ili kombinacija oba procesa. Zbog nezdrave prehrane, posebice namirnica koje sadrže puno masnoća, učestalost dijabetesa tipa 2 je u porastu te prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *WHO – World Health Organization*) predstavlja jedan od vodećih uzroka smrti u svijetu, s preko 420 milijuna oboljelih.

1.1.1. Mehanizam GSIS

Glukoza je primarni izvor energije za sve stanice. Razlaganjem hrane na mikro i makronutrijente, glukoza ulazi u krvotok te putuje do ciljnih stanica. Zbog važne uloge u staničnoj energetici, potreban je konstantan nadzor i regulacija razine glukoze u krvi koja se održava na ~5 mmol/l (Thorens 2015). Beta-stanice Langerhansovih otočića gušterače zadužene su za unos glukoze iz krvotoka pasivnom difuzijom kroz membranske transportere iz porodice glukoznih transportera *(*engl. *Glucose Transporter, GLUT)* i natrij-glukoznih transportera *(*engl. *Sodium-Glucose Cotransporter, SGLT).* Glukoza se nakon ulaska u citoplazmu stanice fosforilira glukokinazom te odlazi u ciklus glikolize u kojemu se metabolizira na piruvat. Piruvat se zatim iskorištava u procesu staničnog disanja koje se odvija u mitohondrijima i dovodi do akumulacije ATP-a *(*engl. *Adenosine Triphosphate)*. Nakupljeni ATP uzrokuje zatvaranje kalijevih kanala ovisnih o ATP-u (K_{ATP}) uslijed čega dolazi do depolarizacije membrane (Boyd 1992). Depolarizacija dalje potiče ulazak kalcija u stanice kroz naponom regulirane membranske kanale i egzocitozu vezikula s inzulinom (Fridlyand, Jacobson i Philipson, 2013) (Slika 1). Navedeni se mehanizam naziva izlučivanje inzulina stimulirano glukozom, GSIS (engl. *Glucose Stimulated Insulin Secretion*) te se njime regulira razina glukoze u krvotoku (Campbell i Newgard, 2021). Poremećaj ovog mehanizma jedan je od uzroka dijabetesa tipa 2.



Slika 1. Shematski prikaz molekularnih događaja tijekom izlučivanja inzulina stimuliranog glukozom. Po ulasku u beta-stanice Langerhansovih otočića, glukoza se u citoplazmi prevodi u piruvat. Nastali piruvat ulazi u mitohondrij gdje se iskorištava za proces staničnog disanja i dovodi do akumulacije ATP-a koji uzrokuje zatvaranje kalijevih kanala i ulazak kalcija u stanicu. Na kraju dolazi do izlučivanja inzulina egzocitozom. Preuzeto iz Rutter i sur. (2020).

1.1.2. Transporteri GLUT

Glukoza u beta-stanice gušterače ulazi difuzijom kroz transportere iz porodice GLUT. U čovjeka postoji 14 gena iz porodice *SLC2* koji kodiraju za različite transportere GLUT (Berger i Zdzieblo, 2020), od kojih je GLUT1 najzastupljeniji te se smatra glavnim transporterom uključenim u mehanizam GSIS kod čovjeka (Ohtsubo i sur., 2011). U miševa također postoji više vrsta transportera GLUT, od kojih je za mehanizam GSIS najvažniji GLUT2 kodiran genom *Slc2a2*. Različiti transporteri GLUT imaju specifičan ekspresijski uzorak koji često ovisi o

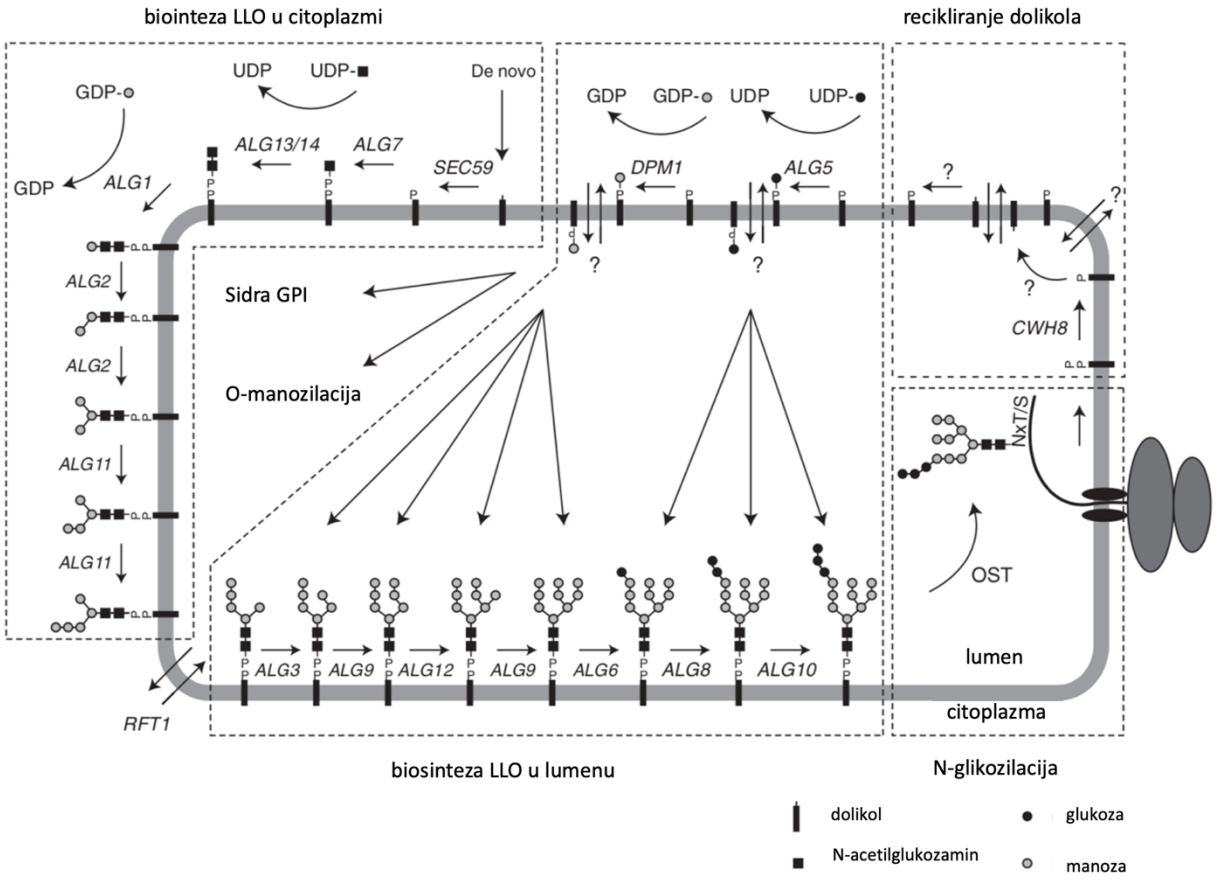
metaboličkim promjenama. Primjerice, porast glukoze u krvotoku miša potiče povećanu ekspresiju transportera GLUT2 i njihovu lokalizaciju u membrane, kako bi pasivno mogli propuštati glukozu u stanicu. Ukoliko se ovaj mehanizam poremeti u mišu ili čovjeku, dolazi do stanja hiperglikemije koje prethodi inzulinskoj rezistenciji i razvitku dijabetesa tipa 2. U miševa hranjenih prehranom bogatom masnim kiselinama, uočeno je smanjenje količine membranskih transportera GLUT2 u odnosu na miševe hranjene prehranom s normalnom količinom masnoća. Također, uočen je porast količine unutarstaničnih transportera GLUT2, uglavnom u endosomima i lizosomima, što ukazuje na to da prehrana bogata masnim kiselinama ne utječe direktno na razinu ekspresije proteina GLUT2, već na njegovu lokalizaciju. Transporteri GLUT2 se ne recikliraju u stanici, stoga je uočena kolokalizacija sa endosomima i lizosomima neobična i ukazuje na postojanje faktora koji remeti njihovo ugrađivanje u membrane (Ohtsubo i sur., 2005). Posttranslacijske modifikacije proteina reguliraju njihovu strukturu, funkciju i lokalizaciju stoga su istraživane u kontekstu transportera GLUT kao mogući modulatori njihove ispravne lokalizacije i funkcije u beta-stanicama gušterače (Krištić i Lauc, 2017).

1.2. Glikozilacija proteina

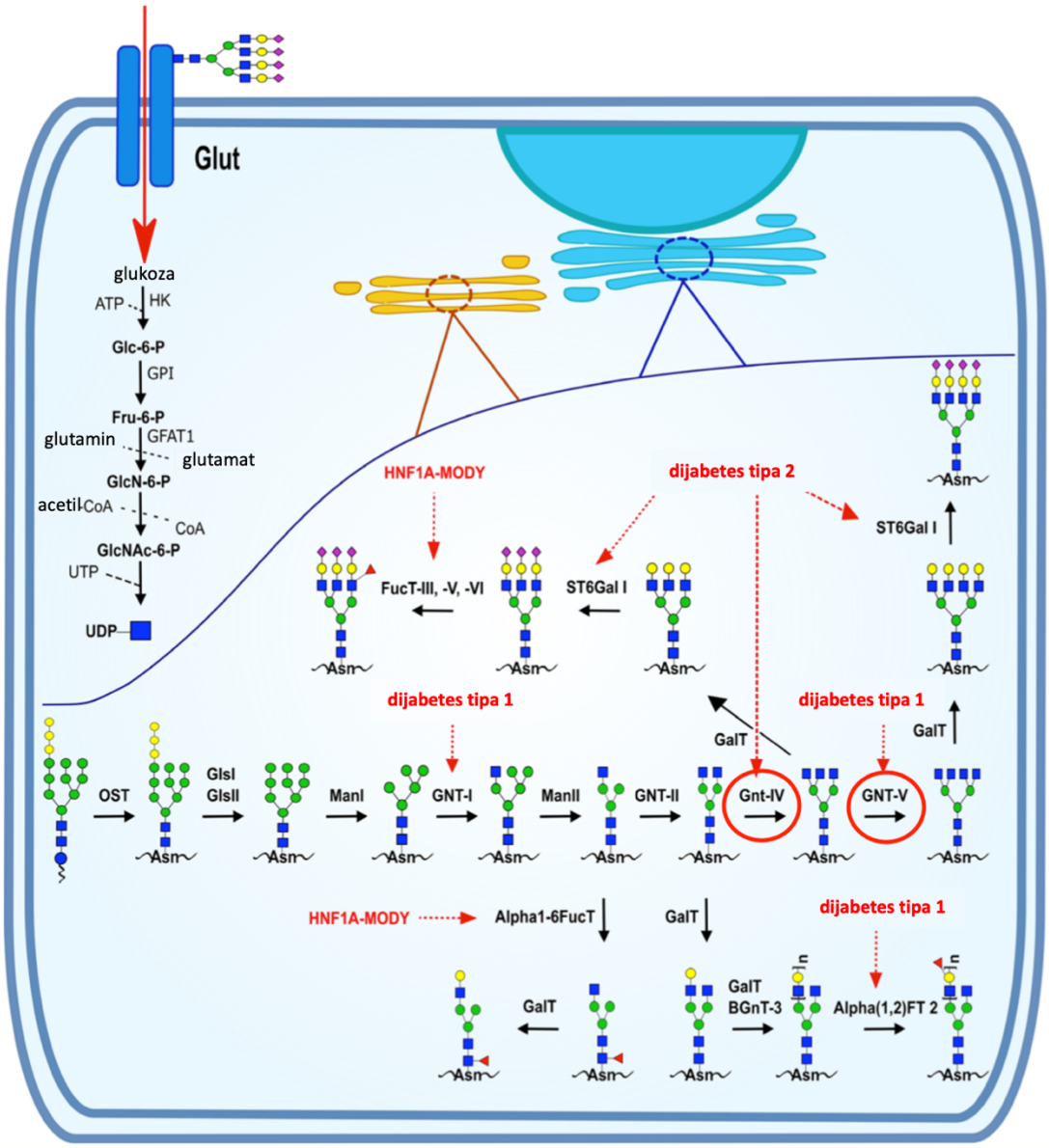
Glikozilacija proteina jedna je od najvažnijih i najzastupljenijih posttranslacijskih modifikacija proteina koja podrazumijeva kovalentno vezanje šećernih skupina na aminokiselinske ostatke u proteinu. Glikozilacija utječe na pravilno smatanje, funkciju i transport proteina te im omogućuje interakcije s drugim molekulama i utječe na poluživot samih glikoproteina (Moremen, Tiemeyer i Nairn, 2012; Hirata i sur., 2020). Većina proteina je glikozilirana, a posebice izvanstanični i membranski proteini, uključujući transportere GLUT. Poznato je više vrsta glikozilacije proteina, a najzastupljenije su N- i O-glikozilacija. Kod N-glikozilacije šećeri se kovalentno vežu za dušikov atom asparagina u sklopu motiva Asn-X-Ser/Thr pri čemu je X bilo koja aminokiselina osim prolina. Kod O-glikozilacije šećer se veže na atom kisika u serinu ili treoninu (Krištić i Lauc, 2017). Kombinatornim slaganjem monosaharida može nastati veliki broj raznolikih šećernih struktura koje nisu direktno određene genomom (Gornik, Pavić i Lauc, 2012). Kako će izgledati glikan nekog glikoproteina ovisi o staničnom tipu te aktivnosti enzima i njihovih kofaktora unutar stanice. U genomu čovjeka gotovo 200 gena kodira za glikoziltransferaze čijim međudjelovanjem

nastaju različite glikanske strukture što glikozilaciju čini najraznolikijom posttranslacijskom modifikacijom proteina (Lis i Sharon, 1993; Schjoldager i sur., 2020).

Biosintetski put glikana započinje u endoplazmatskm retikulumu (ER) gdje se odvija sinteza šećernog prekursora dugog 7 do 17 monosaharida. Taj prekursor je vezan na lipidnu molekulu dolikol-fosfat (Dol-P) i s njega se kao blok prebacuje na protein. Šećerni prekursor sastoji se od tri građevne jedinice, a to su N-acetilglukozamin (GlcNAc), manoza (Man) i glukoza (Glc). Glikoziltransferaze koje kataliziraju dodavanje šećernih jedinica kao supstrat koriste topive, šećerom aktivirane nukleotide ili šećere koji su vezani za Dol-P. Dolikol-fosfat nalazi se u membranama ER-a te se može prebacivati s citosolne na luminalnu stranu. Sinteza šećernog prekursora započinje na citosolnoj strani gdje enzimi iz porodice ALG *(*engl. *Aasparagine-Linked Glycosylation)* postepeno nadodaju monosaharide na Dol-P. Djelovanjem enzima ALG7, ALG13, ALG14, ALG1, ALG2 i ALG11 nastaje Dol-PP-$GlcNAc_2Man_5$. Čitav lipidno-šećerni kompleks prebacuje se na luminalnu stranu ER-a gdje enzimi ALG3, ALG9, ALG12, ALG6, ALG8 i ALG10 nadograđuju prekursor i stvaraju Dol-PP-$GlcNAc_2Man_9Glc_3$. Zatim oligosahariltransferaza (OST) kotranslacijski prebacuje glikanski dio prekursora na protein unutar odgovarajućeg Asn-X-Ser/Thr motiva (Slika 2) (Aebi, 2013; Breitling i Aebi, 2013). Nastali glikoproteini nastavljaju sazrijevanje prelaskom u Golgijev aparat gdje se djelovanjem brojnih glikoziltransferaza, glikozidaza i transportera modificira glikanski dio. Najprije se uklanjaju glukoze i dio manoza, a zatim se stvaraju razgranate strukture. Zreli glikani u glikoproteinima mogu imati jednu ili više grana N-acetilglukozamina od kojih svaka može sadržavati različite monosaharide. Promjena u broju ili sastavu grana utječe na strukturu i djelovanje čitavog glikoproteina (Gornik, Pavić i Lauc, 2012). Transporteri GLUT su N-glikozilirani pri čemu je glikanska struktura razgranata na četiri dijela (Rudman, Gornik i Lauc, 2019) (Slika 3).



Slika 2. Glikozilacija proteina u endoplazmatskom retikulumu. Enzimi iz porodice ALG postepeno nadodaju šećerne komponente na membransku molekulu dolikol-fosfat stvarajući šećerni prekursor koji se kao blok kotranslacijski prenosi na protein pomoću proteina OST. Oslobođena molekula dolikol-fosfata se reciklira. Preuzeto i prilagođeno iz Breitling i Aebi (2013).



Slika 3. Glikozilacijski put transportera GLUT. Na slici je prikazana stanica sa glikoziliranim transmembranskim transporterom GLUT kroz kojega ulazi glukoza. Unutar stanice prikazan je put N-glikozilacije transportera GLUT. Crveno su zaokružene glikoziltransferaze GnT-4a i GnT-V. Preuzeto i prilagođeno iz Rudman, Gornik i Lauc (2019).

1.2.1. Glikoziltransferaza GnT-4a

Ljudski gen *MGAT4A* velik je 112,027 baza, nalazi se na kromosomu 2 (2q11) i sastoji se od 17 eksona (NCBI, Gene ID: 11320). Eksprimira se u mnogim tkivima, a najviše u crijevima i bubregu te kodira za alfa-1,3-manozil-glikoprotein 4-beta-N-acetilglukozaminiltransferazu

(glikoziltransferaza GnT-4a). Protein GnT-4a sastoji se od 535 aminokiselina i masa mu iznosi 61,5 kDa (UniProtKB, Q9UM21). Primarno se nalazi u membrani Golgijevog aparata (Oguri i sur., 2006). Sastoji se od katalitičke i lektin-vezujuće domene pri čemu je lektin-vezujuća domena neophodna za specifičnost i aktivnost enzima. Ona preferencijalno veže produkt katalizirane reakcije GlcNAcβ1-2[GlcNAcβ1-4]Man, ali nije poznato kojim mehanizmom to utječe na aktivnost enzima (Mgata i sur., 2022). Ovaj enzim kao supstrat za stvaranje nove grane u glikanu putem beta1-4 veze koristi UDP-GlcNAc *(*engl. *Uridine Diphosphate-GlcNAc)* pri čemu nastaju tri-antenarne glikanske strukture (Slika 2). Homolozi GnT-4a postoje u drugim eukariotima te ljudska i mišja glikoziltransferaza GnT-4a dijele preko 90% aminokiselinskog sastava.

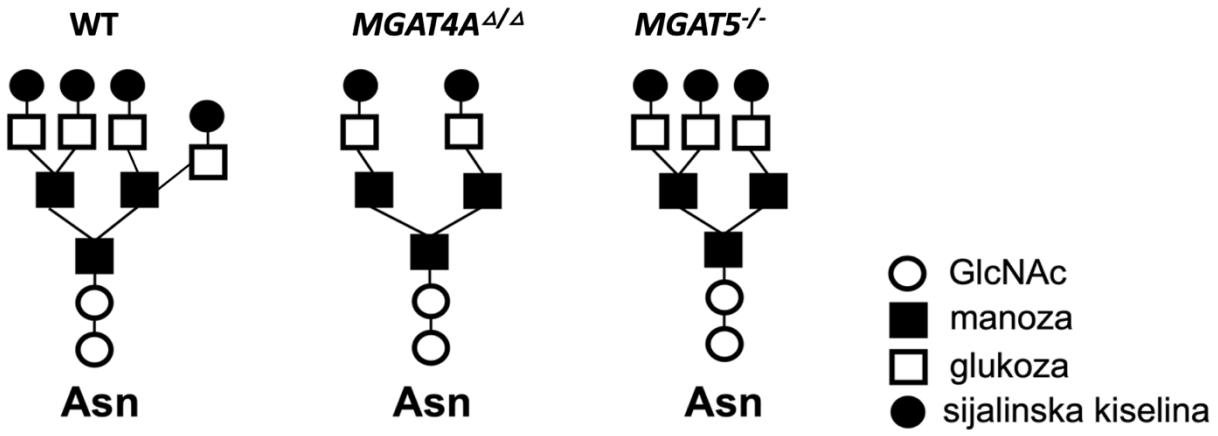
Kod miševa koji su zbog prehrane bogate masnoćama razvili dijabetes tipa 2, uočen je nedostatak membranskih transportera GLUT2 i homologne glikoziltransferaze GnT-4a (Ohtsubo i sur., 2011) što ukazuje na povezanost djelovanja GnT-4a s ispravnom funkcijom i lokalizacijom transportera GLUT2. Daljnjim eksperimentima potvrđeno je da je djelovanje glikoziltransferaze GnT-4a uključeno u regulaciju poluživota transportera GLUT2 (Berger i Zdzieblo, 2020). U miševa divljeg tipa, za sintezu i transport glikoproteina GLUT2 do membrane beta-stanica gušterače potrebno je oko sat vremena. U miševa deficijentnih za GnT-4a nije uočena promjena u trajanju ovog biosintetskog puta, ali je vrijeme poluživota transportera GLUT2 na membranama smanjeno 4 puta (Ohtsubo i sur., 2005). Dokazano je da zbog nedostatka Gnt-4a, glikanski dio GLUT2 ima samo dvije grane (Slika 4) te se mehanizam vezanja lektina, koji stabilizira transporter, narušava (Ohtsubo i sur., 2005). Stoga se broj funkcionalnih transportera u membrani smanjuje i stanica ne može normalno unositi glukozu i lučiti inzulin. Do narušavanja mehanizma GSIS može doći zbog smanjene ekspresije GnT-4a ili promjene u ekspresiji transkripcijskih faktora koji reguliraju ekspresiju glikoziltransferaze kao što su FOXA2 i HNF1A (Ohtsubo i sur., 2011).

1.2.2. Glikoziltransferaza GnT-V

Ljudski gen *MGAT5* velik je 334,687 baza, nalazi se na kromosomu 2 (2q21.2-q21.3) i sastoji se od 24 eksona (NCBI, GeneID: 4249). Eksprimira se u gotovo svim tkivima, najviše u mozgu, mišićima i srcu, te kodira za alfa-1,6-manozilglikoprotein 6-beta-N-acetilglukozaminiltransferazu (glikoziltransferaza GnT-V). GnT-V koristi UDP-GlcNAc kao supstrat za stvaranje visoko razgranatih glikana preko beta-1,6 veze, što rezultira nastankom tetra-antenarnih glikanskih

struktura (Slika 3). Protein GnT-V sastoji se od 741 aminokiseline, masa mu iznosi 84,5 kDa, N-glikoziliran je te je primarno lokaliziran u membrani Golgijevog aparata (UniProtKB, Q09328). Homolozi ovog enzima postoje u mnogim eukariotima, aminokiselinski slijed je visoko konzerviran te glikoziltransferaze GnT-V čovjeka i miša dijele preko 97% aminokiselinskog sastava.

U miševa koji nose mutaciju gena *MGAT5* uočeno je da transporteri GLUT2 primarno sadrže tri-antenarne glikanske strukture (Slika 4) (Dennis i sur., 2002; Rudman, Gornik i Lauc, 2019). Također je uočeno da kod jedinki koje nemaju funkcionalnu GnT-4a, a imaju GnT-V, ne dolazi do stvaranja antenarnih struktura za koje je zadužena GnT-V. To znači da je nadodavanje šećera pomoću GnT-4a predispozicija za djelovanje GnT-V (Ohtsubo i sur., 2005).



Slika 4. Shematski prikaz glikanske strukture transportera GLUT2 u/na stanicama miševa divljeg tipa (WT) i mutanata za gene *MGAT4A* i *MGAT5*. Preuzeto i prilagođeno iz Ohtsubo i sur. (2005).

1.3. Epigenetička regulacija ekspresije gena

Epigenetički mehanizmi odnose se na promjene ekspresije gena koje ne podrazumijevaju promjenu u slijedu nukleotida. One utječu na stupanj kondenzacije kromatina i njegovu interakciju s transkripcijskim faktorima te posljedično reguliraju ekspresiju gena. Sve stanice organizma sadrže istu DNA, ali epigenetičkim se modifikacijama određuje specifičan uzorak ekspresije gena koji omogućuje diferencijaciju. Takvi su epigenetički mehanizmi stabilni jer oni određuju tip stanice, ali postoje i reverzibilne promjene koje se javljaju kao odgovor na utjecaje iz okoliša

(Jaenisch i Bird, 2003). U epigenetičke mehanizme ubrajaju se histonske varijante i histonske modifikacije, metilacija DNA, remodeliranje kromatina, male nekodirajuće RNA i arhitektura jezgre.

1.3.1. Metilacija DNA

Metilacija DNA najpoznatiji je epigenetički mehanizam koji koriste prokarioti i eukarioti. Osim za regulaciju genske ekspresije, metilacija služi za obranu od virusa i utišavanje aktivnih transpozona (Singal i Ginder, 1999; Wan i sur., 2015). Enzimi iz porodice metiltransferaza *(*engl. *DNA Methyltransferase, DNMT)* kataliziraju prijenos metilne skupine sa S-adenozil-metionina (SAM) na peti dušikov atom u citozinu, čime nastaje 5-metilcitozin (5mC). Razlikuju se dvije vrste metilacije, ona koja je stabilna i prenosi se diobama na novo-repliciranu DNA pomoću enzima DNMT1 i ona koja nastaje *de novo* pomoću enzima DNMT3a i DNMT3b (Moore, Le i Fan, 2013). Metilacija DNA može biti oznaka koja aktivno utišava gen koji se prepisivao, što je na primjer slučaj kod diferencijacije stanica, ili može biti samo dodatna oznaka za „zaključavanje" utišanog stanja kao što je slučaj kod inaktivacije nekih gena na X kromosomu. Osim utišavanja gena tijekom diferencijacije i kao odgovor na okolišne promjene, metilacijom se trajno utišavaju neki geni i uspostavlja se genomski utisak još u gametogenezi (Li, Beard i Jaenisch, 1993).

Većina metilacije kod kralježnjaka događa se u sklopu CpG bogatih regija koje se nazivaju CpG otoci i koji su često prisutni u promotorima gena (Slika 5B). Metilacija je usko povezana sa represijom transkripcije gena te postoji nekoliko mehanizama koji inhibiraju transkripciju. Jedan od njih pretpostavlja da metilna skupina predstavlja steričku smetnju i onemogućuje vezanje transkripcijskih faktora (Yin i sur., 2017). Nadalje, 5mC predstavlja vezujuće mjesto za metil-vezujuće proteine koji djeluju poput represora, kao što je protein MeCP-1 koji veže metiliranu DNA i inhibira transkripciju (Tate i Bird, 1993). Treći mehanizam uključuje promjenu kromatinske strukture. Metilne skupine predstavljaju vezujuće mjesto za proteine MeCP, HP1, remodelirajuće proteinske komplekse, histonske deacetilaze i brojne druge faktore koji sabijaju heterokromatin u kompaktno stanje (Razin 1998). Ekspresija gena ovisi o njegovoj poziciji unutar opuštenijeg eukromatina koji se prepisuje ili sabijenog heterokromatina koji je utišan. Metilacija je reverzibilan proces, a može se odvijati pasivno ili aktivno. Pasivna demetilacija odvija se postepeno kroz cikluse replikacije te se na taj način briše majčin genomski utisak tijekom

oogeneze. Aktivna demetilacija vrši se djelovanjem enzima iz porodice TET *(*engl. *Ten-Eleven Translocation),* nizom reakcija koje konvertiraju metilnu skupinu do spojeva koji se mogu izrezati ekscizijom te se na taj način briše očev genomski utisak tijekom spermatogeneze (Koivunen i Laukka, 2018).

1.3.2. Modifikacije histona

Kromatin čini molekula DNA omotana oko proteinskih kompleksa koji se sastoje od četiri vrste histonskih proteina: H2A, H2B, H3 i H4. Dimeri svakog od histona zajedno čine oktamernu jezgru iz koje strše aminokiselinski „repovi“ koji se nalaze na N-kraju histona. Dodatkom malih skupina na aminokiseline unutar repova mogu se mijenjati svojstva proteina čime se direktno i indirektno utječe na transkripciju (Slika 5C). Najpoznatije histonske modifikacije su acetilacija, fosforilacija, metilacija i ubikvitinacija. Histonske acetiltransferaze (HAC) dodaju acetilne skupine na lizin, a histonske deacetilaze (HDAC) ih uklanjaju. Acetilacijom se neutralizira pozitivan naboj lizina i smanjuje se interakcija histona s negativno nabijenom DNA. Na taj se način direktno utječe na DNA koja se „opušta“ i postaje dostupna za transkripcijske faktore, stoga se acetilacija povezuje sa transkripcijskom aktivnošću (Struhl 1998). Kinaze dodaju fosfatne skupine na serin, čime se povećava negativan naboj histona i oslabljuje veza sa negativno nabijenom DNA. Ova je modifikacija važna za aktivaciju transkripcije, ali i za kompakciju kromatina tijekom mitoze (Berger 2002). Dodatak proteina ubikvitina na lizin može utjecati na gensku ekspresiju u oba smjera, ovisno o histonu na kojemu se nalazi (Zhang 2003). Histonske metiltransferaze (HMT) dodaju 1, 2 ili 3 metilne skupine na arginin ili lizin, a demetilaze ih uklanjaju. Ovisno o poziciji i broju metilnih skupina, metilacija može utjecati na aktivaciju gena ili na njegovo utišavanje. Tako su di-i tri- metilacija lizina u histonu H3 na pozicijama 4, 36 i 79 povezane sa aktivacijom gena, a mono- , di- i tri- metilacija lizina u H3 na poziciji 9 i 27 sa represijom gena (Jambhekar, Dhall i Shi, 2019). Modifikacije mogu postojati samo na nekim histonima, pri čemu najraznolikije modifikacije imaju histoni H3 i H4 jer su smješteni na površini oktamera. Iako se pojedinačne modifikacije povezuju sa aktivacijom ili represijom transkripcije, one na njih ne utječu direktno te nikada ne dolaze samostalno već su histonski repovi modificirani na više mjesta. Kombinacija različitih modifikacija u oktameru čini „histonski kod“ koji određuje hoće li doći do transkripcije ili ne. Spomenute skupine, osim što mijenjaju naboj histona i tako

utječu na jačinu interakcije s DNA, predstavljaju vezno mjesto za enzime i remodelirajuće komplekse koji mijenjaju strukturu kromatina (Jenuwein i Allis, 2001). Osim za regulaciju ekspresije gena, histonske modifikacije su važne za organizaciju čitavog kromatina unutar jezgre; omogućuju pravilno omatanje DNA oko histonskih oktamera čime se ona kondenzira te reguliraju interakcije različitih dijelova kromatina regrutacijom enzima i njihovih kofaktora (Suganuma i Workman, 2011).

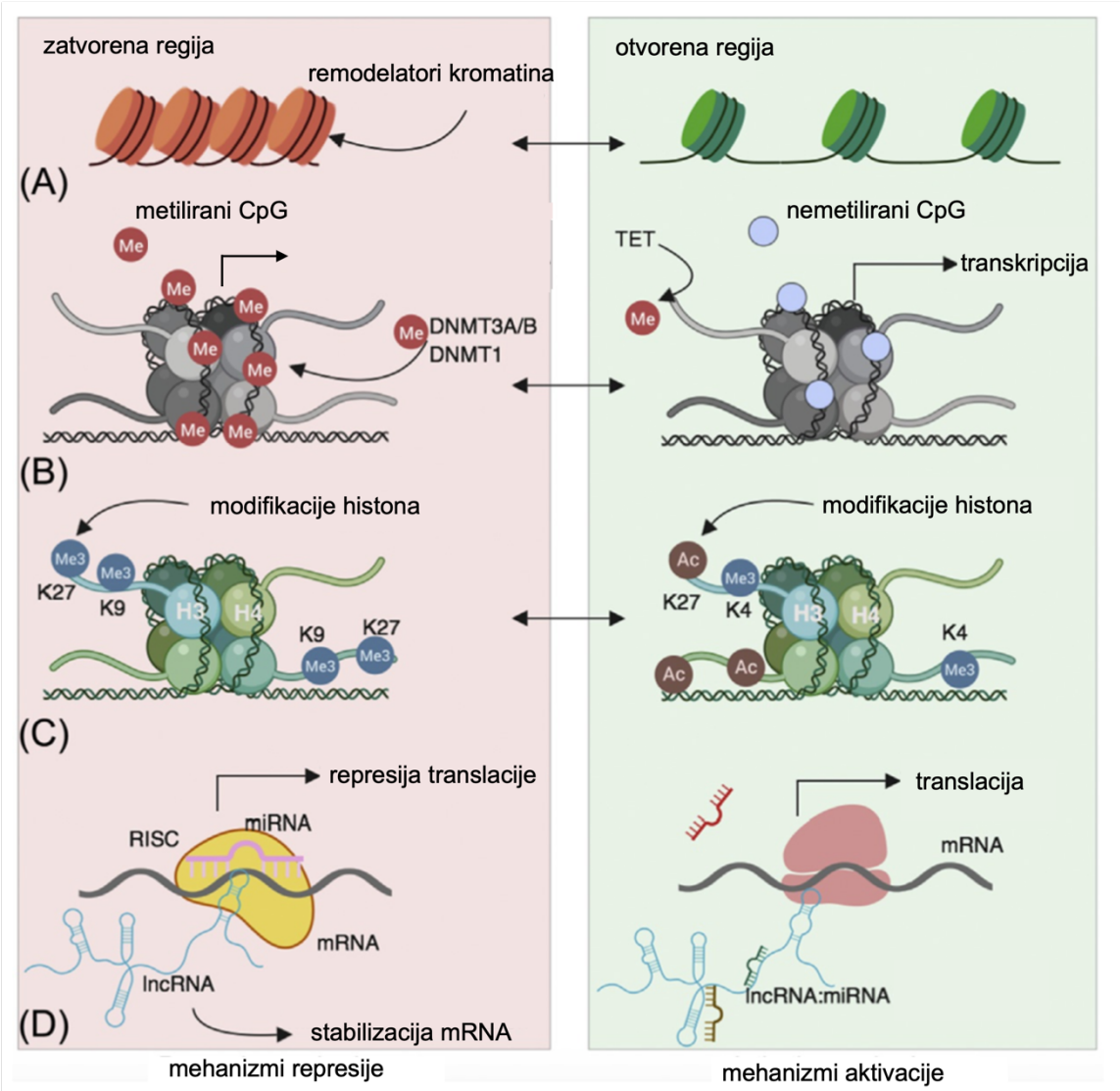
1.3.3. Varijante histona, male nekodirajuće RNA, remodeliranje kromatin i arhitektura jezgre

Histoni H2A, H2B, H3 i H4 su kanonički histoni te se u DNA ugrađuju već tijekom replikacije. Osim njih, postoje histonske varijantne, nekanonički histoni, koji imaju ulogu u regulaciji transkripcije, popravku DNA, segregaciji kromosoma i drugim procesima. Oni se od kanoničkih histona razlikuju u aminokiselinskom slijedu zbog čega se mogu drugačije modificirati te se u DNA ugrađuju neovisno o replikaciji, zamjenjujući kanoničke histone na mjestima gdje je potrebno. Poznate su dvije varijante histona H3, a to su H3.3 i CenH3. Histon CenH3 nalazi se u oktamerima centromernog područja gdje zbog svojeg dugačkog repa omogućuje vezanje proteina koji pomažu u formaciji centromernog heterokromatina, a varijanta H3.3 se ugrađuje u područja aktivne transkripcije. Histon H2A također ima dvije varijante, a to su H2AX i H2AZ. Varijanta H2AX ugrađuje se na mjesta dvostrukog loma DNA gdje signalizira staničnoj mašineriji da je potreban popravak i svojim N-terminalnim repom omogućuje vezanje potrebnih proteina. Varijanta H2AZ je povezana sa mnogim staničnim funkcijama, ali najvažnija uloga je u aktivaciji i elongaciji transkripcije (Henikoff i Smith, 2015). Za ugradnju dijela histonskih varijanti odgovorni su kromatin-remodelirajući kompleksi koji se sastoje od brojnih proteina i kofaktora te im je za aktivnost potreban ATP. Oni su epigenetički modulatori te, osim uvođenja histonskih varijanti, mogu lokalno mijenjati interakcije DNA sa histonima tako da pomiču dijelove DNA ili privremeno uklanjaju histone (Slika 5A) (Vignali i sur., 2000).

Od svih transkripata u stanici, tek se 2% njih prevodi u proteine, a ostatak čine nekodirajuće molekule RNA *(*engl. *non coding RNA, ncRNA)* koje mogu imati regulatornu ulogu u ekspresiji gena. Obzirom na veličinu, dijele se na kratke (<200 nukleotida) i dugačke ncRNA *(*engl. *long ncRNA, lncRNA)* te su klasificirane u kategorije s obzirom na funkciju. Primjerice, mikro RNA

(engl. *micro RNA, miRNA)* sudjeluju u posttranslacijskom utišavanju tako da se komplementarno sparuju s transkriptima i regrutiraju proteine koji ih cijepaju (Slika 5D). Interakcija ncRNA sa DNA onemogućuje prijepis tog područja i tako sprečava ekspresiju gena na transkripcijskoj razini, ali isto tako može regrutirati proteine kao što su Polycomb kompleks ili DNMT koji propagiraju heterokromatin i tako utišavati određena područja (Peschansky i Wahlestedt, 2014),

Posljednji epigenetički mehanizam je arhitektura jezgre koja se odnosi na položaj određenih dijelova kromatina unutar jezgre. Jezgra je podijeljena u odjeljke pri čemu svaki kromosom ima svoje područje, ali istovremeno interagira sa dijelovima drugih kromosoma. Heterokromatin je primarno lokaliziran uz jezgrinu ovojnicu dok je eukromatin orijentiran prema središtu. Jezgrine strukture kao što su jezgrica i jezgrine pjege služe funkcijama poput sastavljanja ribosoma i splicinga mRNA zbog kojih se u njihovim područjima moraju naći određeni dijelovi kromatina. Za dinamiku kromatina zaslužno je međudjelovanje svih epigenetičkih mehanizama te oni omogućuju da se iz jedne genetičke upute razviju različiti tipovi stanica u kojima se ekspresija gena mijenja tokom životnog ciklusa (Espada i Esteller, 2007).



Slika 5. Epigenetički mehanizmi uključeni u regulaciju ekspresije gena. A) pomicanje DNA i nukleosoma pomoću kromatin-remodelirajućih kompleksa; B) metilacija CpG dinukleotida u promotorima gena; C) modifikacije histona; D) interferencija ncRNA s transkriptima i njihovo utišavanje. Preuzeto i prilagođeno iz Schmolka i sur. (2020).

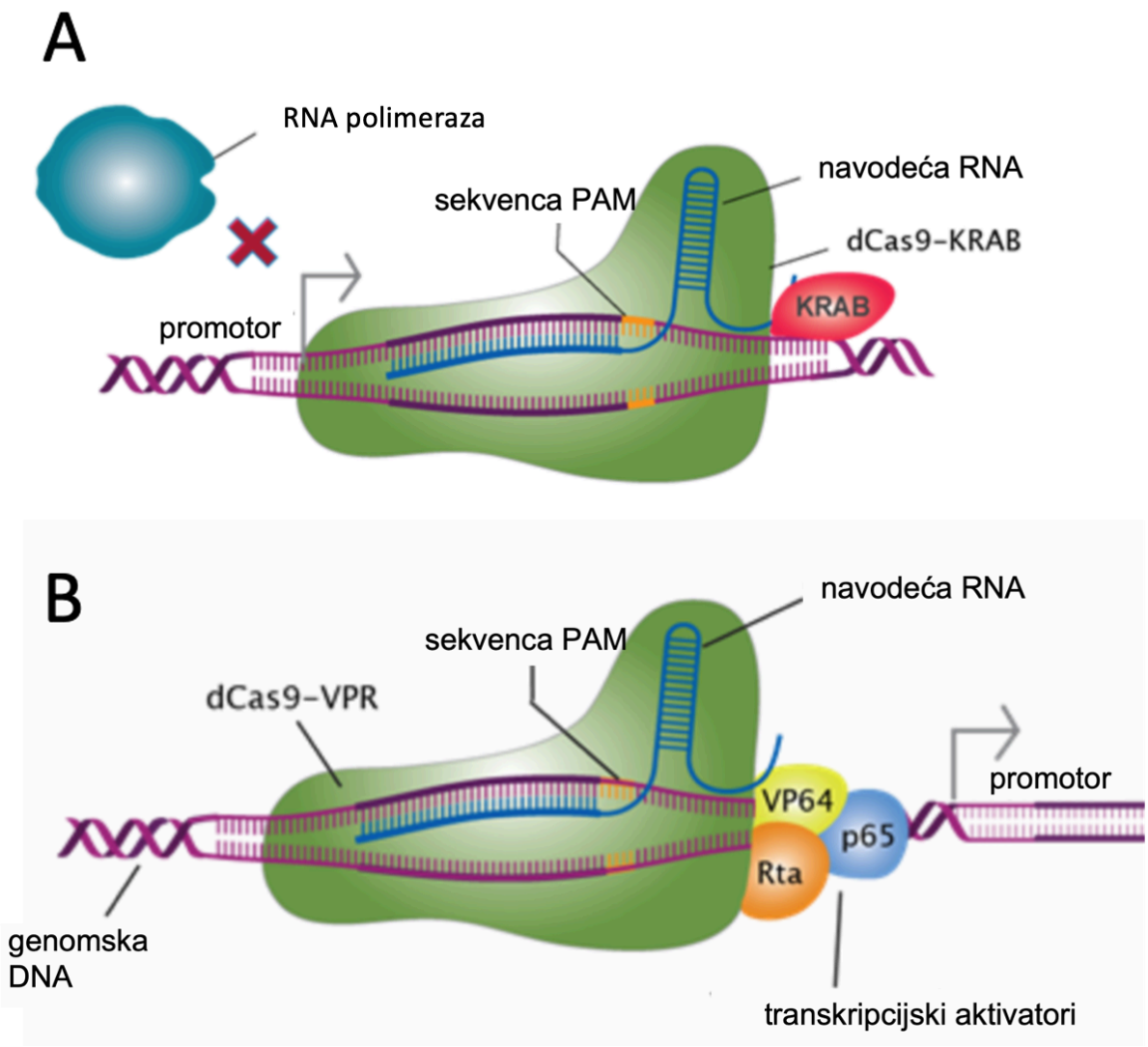
1.4. Molekularni alati CRISPR/dCas9

Sustavi CRISPR *(*engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)* izvorno potječu iz bakterija i arheja gdje djeluju poput adaptivnog imunosnog sustava i pomažu u obrani od stranih patogena (Makarova i sur., 2011; Chylinski, Le Rhun i Charpentier, 2013). Djeluju mehanizmom RNA-ovisnog cijepanja DNA tako što kratka molekula RNA navodi endonukleazu Cas do komplementarnog mjesta u genomu gdje se stvara dvolančani urez. Takvi se lomovi u DNA najčešće popravljaju nehomolognim sparivanjem krajeva *(*engl. *NHEJ – Non-Homologous End*

Joining) pri čemu nastaju male insercije ili delecije nukelotida koje, ako se nalaze unutar gena, uzrokuju njegovu inaktivaciju (Erard, Knott i Hannon, 2017). Znanstvenici su prenamijenili sustave CRISPR/Cas u molekularne alate za manipulaciju prokariotskih i eukariotskih gena. Najčešće korišten protein Cas9 u genetičkom inženjerstvu potječe iz bakterije *Streptococcus pyogenes,* SpCas9. Jedan od razloga je kratka sekvenca PAM uz ciljani slijed u DNA koji je potreban za aktivnost proteina Cas9. Za SpCas9 sekvenca PAM je slijeda NGG, gdje je N bilo koji nukleotid (Maeder i sur., 2013).

1.4.1. Sustavi CRISPR u regulaciji ekspresije gena

Različite varijante proteina Cas omogućuju ciljanu mutagenezu željenih gena, vizualizaciju specifičnih lokusa i manipulaciju genske ekspresije. Fuzijom aktivacijskih ili represijskih domena za inaktivirani protein Cas9 (dCas9) i sintezom specifične molekule RNA *(*engl. *single guide RNA, sgRNA),* može se ciljano povećati ili smanjiti ekspresija nekoga gena (Tadić i sur., 2016). Razvijeno je više fuzioniranih represijskih i aktivacijskih domena čime se omogućilo stanično reprogramiranje na razini transkripcije (Chavez i sur., 2015). Najčešće korištena represivna domena naziva se KRAB *(*engl. *Kruppel-associated box)* te se sastoji od motiva cinkovih prstiju koji vezanjem na DNA regrutiraju proteine poput histonskih metiltransferaza i deacetilaza koje uzrokuju formaciju heterokromatina (Slika 6A) (Thakore i sur., 2015). Aktivacijske domene mogu biti transkripcijski faktori kao što je VP16 ili enzimi za epigenetičku modulaciju kao što je histonska acetiltransferaza p300 te mogu imati više komponenti (Thompson i sur., 2001; Chen i Qi, 2017). Najefektivniji aktivacijski modul koji je razvijen do sada je trodijelna domena VPR koja se sastoji od manjih aktivacijskih domena VP64, p65 i Rta (Slika 6B). VP64 je prije razvitka domene VPR bila najkorisnija aktivacijska domena koja se sastoji od tetramera proteina VP16 (Beerli i sur. 1998). VP16 je protein iz virusa *Herpes simplex* tipa 1 (HSV-1) u kojemu potiče transkripciju gena IE (Triezenberg, Lamarco i Mcknight, 1988). p65 je podjedinica jezgrinog faktora kappa B koji pripada skupini transkripcijskih faktora (Schmitz i Baeuerle, 1991), kao i domena Rta iz virusa *Epstein-Barr* (EBV) (Hardwick i sur., 1992). Eksperimentalno je utvrđeno da je hibridni protein s domenama redoslijeda VP64-p65-Rta najefektivniji u aktivaciji transkripcije. Domena VPR je bolja u aktivaciji gena od domene VP64 u rasponu 22-320 puta (Chavez i sur., 2015).



Slika 6. Sustavi CRISPR/dCas9 s fuzioniranim efektorskim domenama. A) Domena KRAB uzrokuje heterokromatinizaciju DNA i onemogućuje djelovanje RNA polimeraze; B) domena VPR omogućuje transkripciju gena. Domene VP64 i Rta su najvažnije za interakciju dCas9 i VPR u fuzijama proteina. Preuzeto i prilagođeno sa https:__www.transomic.com_cms_Products_CRISPR_CRISPR-Resources_CRISPR-Activation.aspx (pristupljeno 07.08.2022.).

2. CILJ

Cilj ovog istraživanja je simultana manipulacija gena *MGAT4A* i *MGAT5* u stanicama 1.1B4, koje su model za ljudske beta-stanice gušterače, pomoću molekularnog alata VPR-dCas9. Ovaj molekularni alat je fuzija proteina dCas9 i aktivacijske domene VPR, a njegovim navođenjem na lokuse *MGAT4A* i *MGAT5* pomoću specifičnih molekula (sgRNA), cilj je povećati razinu ekspresije gena koji kodiraju za glikoziltransferaze GnT-4a i GnT-V. Posljedično, cilj je utvrditi ima li povećanje ekspresije ovih glikoziltransferaza utjecaj na lokalizaciju i promjenu u količini transportera GLUT1 na membranama stanica 1.1B4.

Specifični ciljevi:

- Odabir molekula sgRNA koje ciljaju promotore gena *MGAT4A* i *MGAT5* u genomu čovjeka
- Konstrukcija plazmidnog vektora za ekspresiju modularnog sustava CRISPR/dCas9 koji se sastoji od fuzije domene VPR s N-terminusom proteina dCas9 metodom Golden Gate
- Umnažanje plazmida u kompetentnim sojevima bakterije *Escherichia coli* i provjera uspješnosti kloniranja cijepanjem specifičnim restrikcijskim endonukleazama
- Transfekcija stanica 1.1.B4 konstruiranim plazmidima i selekcija uspješno transfeciranih stanica
- Analiza promjene ekspresije gena *MGAT4A* i *MGAT5* na razini transkripcije metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR)
- Analiza promjene ekspresije gena *MGAT4A* i *MGAT5* na razini proteina GnT-4a i GnT-V metodom Western blota
- Analiza količine i položaja transportera GLUT1 na membranama stanica 1.1B4 metodom imunofluorescencije

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Za izradu plazmida koji kodira za molekularni alat VPR-dCas9 i molekule sgRNA korišteni su plazmidi opisani u radu Josipović i sur. (2019.):

- pSgM1-6
- pSg×6
- tNS-pPro-EFS
- pN-VPR; pN_C9_SpCas9
- pUK21_FP_T2A_mRuby3
- tNS-pTer-H
- 2nd Backbone_Puro
- N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3

Za umnažanje plazmida korišteni su sojevi bakterija NEB Stable Competent *Escherichia coli* (New England BioLabs, Ipswich, SAD) i *Escherichia coli* XL10-Gold (Agilent, Santa Clara, SAD). Za manipulaciju gena *MGAT4A* i *MGAT5* korištene su stanice 1.1B4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) nastale fuzijom beta-stanica gušterače čovjeka i tumorskih stanica.

U istraživanju su korišteni sljedeći enzimi i pripadajući puferi:

BpiI (10 U/µl; New England BioLabs, Ipswich, SAD); BsaI (10 U/µl; New England BioLabs, Ipswich, SAD); Esp3I (10 U/µl; New England BioLabs, Ipswich, SAD); XhoI (10 U/µl; New England BioLabs, Ipswich, SAD); SacI (10 U/µl; New England BioLabs, Ipswich, SAD); 10× CutSmart (New Englands BioLabs, Ipswich, SAD); 10× Tango Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); 10× G Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD); T4 DNA Ligase (350 U/µl; Takara, Tokio, Japan), 10× T4 DNA Ligation Buffer (Takara, Tokio, Japan); T4 Polynucleotide Kinase (PNK) (Takara, Tokio, Japan); PrimeScript Reverse Transcriptase (200 U/µl; TaKaRa, Tokio, Japan); 5× PrimeScript buffer (TaKaRa, Tokio, Japan); Exonuclease V (RecBCD) (10 U/µl, New England Biolabs, Ipswich, SAD).

U istraživanju su korišteni sljedeći komercijalni paketi:

Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research Irvine, Kalifornija, SAD); RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka); *Power*SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); TURBO DNA-free Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

Korištene su sljedeće boje i markeri:

6× Gel Loading Purple (New England Biolabs, Ipswich, SAD); GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); Ponceau S solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); Roti-Load 2 (Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Wurttemberg, Njemačka); DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Sigma-Aldrich).

U istraživanju su korišteni sljedeći uređaji:

Spektrofotometar NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); 7500 Fast Real-Time PCR System machine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); ProFlexTM 3 × 32-well PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); Centrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka); Alliance Q9 Advanced Auto (Uvitec, Cambridge, UK); CO_2 inkubator Panasonic MCO-170AICUV-PE (Panasonic, Osaka, Japan); Microplate Reader iMARK (BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD), Mupid One set za elektroforezu (Takara, Tokio, Japan); termomikser HC (STARLAB, Hamburg, Njemačka); Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD); tresilica ROCKER 2D digital (IKA, Staufen, Njemačka); Olympus BX1, Olympus IX73.

Ostali materijal korišten u istraživanju je:

Tekući medij Luria-Bertani (LB) (5 g/l ekstrakt kvasca, 10 g/l BactoTrypton, 10 g/l NaCl); kruti medij Luria-Bertani (LB) (5 g/l ekstrakt kvasca, 10 g/l BactoTrypton, 15 g/l agar); početnice (Macrogen, Seμl, Južna Koreja); ditiotreitol (DTT) (10 mM) (Roche Diagnostics GmbH,

Manheim, Njemačka); izopropil β-D-1-tiogaalktopiranozid (IPTG) (100 mM) (Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Njemačka); X-gal (20 mg/mL) (Roche Diagnostics GmbH, Manheim, Njemačka); agaroza (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD); pufer TAE (1 mM Tris, 1 mM octena kiselina, 1 mM EDTA, pH 8.0); 10× Sodium dodecyl sulphate (SDS) running buffer (Tris 30 g/l, glicin 144 g/l, SDS 10 g/l); Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); amonijev-persulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD); 10× pufer TBS *(*engl. *Tris buffered saline)* (20 mM Tris, 150 mM NaCl); medij RPMI-1640 sa L-glutaminom i natrijevim bikarbonatom (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), spektinomicin (50 mg/ml); kanamicin (50 mg/ml); ampicilin (100 mg/ml); fetalni goveđi serum *(*engl. *fetal bovine serum, FBS)* (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD); 0,25% otopina tripsin-EDTA u 1× PBS-u *(*engl. *phosphate buffered saline)* (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD); PEI MAX (Polysciences, Warrington, Pensilvanija, SAD); 30%-tna otopina akrilamida/bisakrilamida (BioRad, Hercules, Kalifornija, SAD); SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD); Roche cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail (Emerald Scientific, San Luis Obispo, California, SAD); mlijeko u prahu (Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Wurttemberg, Njemačka); metanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska); etanol apsolutni (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska); medij za održavanje fluorescencije *(*engl. *fluorescence Mounting Medium)* (Dako, Glostrup, Danska); Clarity Max Western ECL Substrate (Luminol Enhancer Solution i Peroxide Solution) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD); RIPA pufer (50 mM TRIS pH 7,5; 0,1% Triton X; 1 mM EDTA; 135 mM NaCl; proteazni inhibitori); Nitrocellulose Blotting Membrane (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, New Jersey, SAD); Clarity Max Western ECL Substrate (BioRad, Hercules, California, SAD); Roti-Load 2 (Carl Roth, Karlsruhe, Baden-Wuttemberg, Njemačka); ab652; ab6717; sc69879; ab151750; sc18822.

3.2. Metode

3.2.1. Kloniranje plazmidnih vektora za ciljano povećanje ekspresije gena *MGAT4A* i *MGAT5*

Plazmidi su konstruirani metodom Golden Gate u 3 koraka; prvo su sgRNA uklonirane u pojedinačne vektore, zatim su složeni svi moduli sustava CRISPR/Cas9, uključujući prazni modul za ugradnju 6 sgRNA, te su u zadnjem koraku sgRNA iz pojedinačnih vektora uklonirane u finalni plazmid N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3.

3.2.1.1. Dizajn i kloniranje sgRNA sekvenci u vektore

Pomoću programa CRISPOR (RRID:SCR_015935) (http://crispor.tefor.net) odabrane su po tri molekule sgRNA za navođenje fuzijskog proteina VPR-dCas9 do promotora gena *MGAT4A* i *MGAT5* (Tablica 1). Korišten je referentni ljudski genom (GRCh37/hg19) te je pri odabiru u obzir uzeta sekvenca PAM (5'-NGG-3') koja se nalazi neposredno nakon mjesta vezanja molekule sgRNA, a potrebna je za vezanje proteina SpCas9. Sve molekule sgRNA nalaze se u promotorima gena, ali samo neke od njih unutar CpG otoka. Ukoliko sgRNA na 5'-kraju nije imala bazu gvanin, ona je nadodana te su sekvence RNA konvertirane u komplementarne lance DNA i nadodani su im odgovarajući ljepljivi krajevi koji omogućuju kloniranje u restrikcijsko mjesto BpiI prema shemi:

5' – CACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN – 3'
3' – CNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAAA – 5'

Sekvence su poslane na sintezu u Macrogen (Amsterdam, Nizozemska).

Tablica 1. Sekvence sgRNA za gene *MGAT4A* i *MGAT5*.

Ime sgRNA	Sekvenca sgRNA
MGAT4A_sg01	5'-GCGGGAGTCGGCGCTTTCGCG-3'
MGAT4A_sg02	5'-GAGATAATGACAGTCGTTCGT-3'
MGAT4A_sg03	5'-GGCTCATCGGTGTCACGGCG-3'
MGAT5_sg01	5'-GTGTAATGCGTTCTACGAAAG-3'
MGAT5_sg02	5'-GTATTTATGGCCGCGATCAGA-3'
MGAT5_sg03	5'-GCCGGATCCGGGTGATCGCGT-3'

Komplementarni lanci sgRNA su prema uputama proizvođača otopljeni u 250 µl vode u konačnoj koncentraciji od 100 pmol/µl. Lanci su komplementarno spareni metodom „oligoanneal“ uz istovremenu fosforilaciju. U reakcijsku smjesu dodano je po 1 µl priređenih oligonukleotida, 0,5 µl T4 polinukleotid kinaze, 1 µl 10 × ligacijskog pufera i 6,5 µl destilirane vode (dH_2O) te je inkubirana na 37 °C/30 min, 95 °C/5 min, 25 °C/∞. Time su dobivene dvolančane DNA molekule sa ljepljivim krajevima koji odgovaraju restrikcijskim mjestima pocijepanog plazmida.

Novonastale dvolančane molekule DNA kodirale su za 6 sgRNA. Svaki fragment ukloniran je u zaseban plazmid $pSgM_xG$, gdje x predstavlja redoslijed sgRNA (1-6), a G označava plazmid adekvatan za dSpCas9 ortolog. Koncentracije plazmida prikazane su u Tablici 2. Fragmenti su uklonirani u restrikcijsko mjesto BpiI pod regulaciju *lac* promotora reakcijom digestije i ligacije u jednom koraku. Pomoću stranice NEBioCalculator (https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation) izračunata je potrebna masa fragmenta s obzirom na njegovu veličinu ako se u reakciju ulazi sa 100 ng plazmidne okosnice te omjerom vektora i inserta 1:5. Obzirom na poznate koncentracije, izračunat je volumen uzorka koji sadrži 3,251 ng fragmenta i uzorka koji sadrži 100 ng odgovarajuće plazmidne okosnice. Osim fragmenta i plazmidne okosnice, u reakcijsku smjesu dodano je 0,5 µl enzima BpiI, 2 µl pufera G (10×), 0,5 µl T4 ligaze, 1 µl ATP-a (10 mM) i DTT-a (1 M) te dH_2O do ukupnog volumena od 20 µl. Reakcijska smjesa inkubirana je na 37 °C/5 min, 23 °C/5 min, 4 °C/∞. Za uklanjanje zaostalih dijelova DNA, neugrađenih inserata i izbačenih

dijelova plazmida, proveden je RecBCD tretman. U reakciju je stavljeno 7,5 µl produkta ligacijske reakcije, 0,5 µl enzima RecBCD i 0,5 µl ATP-a potrebnog za njegovu aktivnost te je smjesa inkubirana 30 min na 37°C.

Tablica 2. Koncentracije plazmida pSgM$_{1-6}$G.

Plazmid	Koncentracija (ng/µl)
pSgM$_1$G	248,5
pSgM$_2$G	250
pSgM$_3$G	308,5
pSgM$_4$G	244
pSgM$_5$G	232
pSgM$_6$G	304,5

Kemijski kompetentne bakterije soja *Escherichia coli* XL10-Gold transformirane su plazmidima pSgM$_x$G sa ugrađenim sgRNA metodom toplinskog šoka. Alikvoti stanica odmrznuti su na ledu te je u svaki dodano 3 µl odgovarajućeg plazmida. Nakon inkubacije na ledu 10 minuta, stanice su stavljene u termoblok na 42 °C 40 sekundi što je uzrokovalo otvaranje pora u membrani i ulazak plazmida u stanice. Uzorci su zatim stavljeni na led 2 min kako bi se pore na membranama zatvorile te su stanice oporavljene dodatkom 450 µl tekućeg medija LB i inkubacijom 30 min na 37 °C u termobloku (uz trešnju od 500 rpm). Nasađeno je 50 µl transformiranih bakterija na agarozne ploče sa spektinomicinom (100 µg/ml), uz dodatak 70 µl IPTG-a koji inducira ekspresiju gena pod *lac* promotorom. Bakterijske stanice su inkubirane na 37 °C 16 h kako bi narasle bakterijske kolonije. Sljedeći dan odabrane su po dvije bijele kolonije sa svake ploče te su prebačene sterilnim nastavkom za pipete u epruvete sa 3 ml tekućeg medija LB sa spektinomicinom (100 µg/ml). Bakterije su inkubirane na 37 °C preko noći uz stalnu trešnju.

Rekombinantni plazmidi izolirani su pomoću komercijalnog paketa ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit prema uputama proizvođača, iz čitavog volumena prenokonoćnih kultura. Koncentracija izoliranih plazmida izmjerena je pomoću uređaja NanoDROP te su pripremljeni alikvoti od 50 µl, koncentracije 100 ng/µl. U svrhu provjere ukloniranih sgRNA, uzeto je 15 µl

uzoraka koji su poslani u Macrogen (Amsterdam, Nizozemska) na sekvenciranje pomoću početnice U6_Fwd: 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC-3'.

3.2.1.2. Konstrukcija vektora N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3

U programu SnapGene dizajniran je plazmidni konstrukt sastavljen od potrebnih modula – plazmid s rezistencijom na ampicilin koji služi kao okosnica, modul za kloniranje 6 sgRNA, slabi promotor EFS, aktivacijska domena VPR, inaktivirani dCas9 iz *S. pyogenes*, fluorescentni marker mRuby3 i terminator TerH (Josipović i sur., 2019). Moduli su uklonirani u zasebne plazmide metodom Golden Gate pomoću restrikcijskog enzima BsaI. U Tablici 3 prikazani su korišteni moduli, njihove koncentracije, veličine, te duljine inserata nakon restrikcije enzimom BsaI.

Tablica 3. Moduli korišteni za konstrukciju plazmida N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby3 metodom Golden Gate.

Naziv modula	Koncentracije ng/µl	Duljina vektora u pb	Duljina inserta u pb
pSg×6	162,5	3377	1009
tNS-pPro-EFS	138,1	3342	281
pN-VPR	196,5	3635	279
pN-C9_SpCas9	332,9	6924	4290
pUK21_FP_T2A_mRuby3	183,1	3705	804
tNS-pTer-H	209,5	3299	213
2nd Backbone_Puro	237	3528	3147

U reakcijsku smjesu stavljeno je 50 ng plazmida 2nd Backbone_Puro te je odabran omjer inserta i plazmida 3:1. Uz odgovarajući volumen svih modula, u reakciju je dodan 1 µl enzima BsaI, 2 µl pufera Cut Smart (10×), 2 µl ATP-a, 1 µl T4 ligaze i dH_2O do ukupnog volumena od 20 µl. Reakcija je inkubirana na 37 °C/5 min, 16 °C/10 min, 50 °C/15 min, 80 °C/10 min, 4 °/ ∞. Nakon završetka reakcije, proveden je tretman RecBCD prema prethodno opisanom protokolu. Produkt ligacije, plazmid N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby3, umnožen je u kemijski kompetentnim bakterijama *Eschericha coli* NEB Stable u kojemu uglavnom ne dolazi do rekombinacije. Postupak odmrzavanja i transformacije opisan je prethodno za soj XL10-Gold.

Stanice su transformirane sa 3 µl plazmida N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby3 te su nasađene na agarozne ploče sa ampicilinom (100 µg/ml) uz dodatak IPTG-a i X-Gal. Ukoliko bi ugradnja u gen *lacZ* bila neuspješna, kolonije bi bile plave boje zbog razgradnje X-Gal. Sljedeći dan pripremljene su prekonoćne bakterijske kulture prema već opisanom protokolu uz dodatak ampicilina (100 µg/ml). Plazmidi su izolirani pomoću ZymoPURE Plasmid Miniprep komercijalnog paketa te su im izmjerene koncentracija na NanoDROP-u (Tablica 4).

Tablica 4. Koncentracije plazmida N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby3.

Naziv plazmida	Koncentracija plazmida ng/µl
N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby3 (1)	450,7
N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby3 (2)	123,8
N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby3 (3)	443,3
N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby3 (4)	82,2

Ispravnost slijeda konstruiranog plazmida N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby3 provjerena je restrikcijskom analizom pomoću enzima SacI i XhoI, analizom veličine dobivenih fragmenata agaroznom gel elektroforezom. Reakcijska smjesa sadržavala je 500 ng plazmida, 0,5 µl restrikcijskih enzima SacI i XhoI, 2 µl pufera Cut Smart (10×) i vode do ukupnog volumena od 20 µl te je inkubirana na 37 °C/10 h, 65 °C/20 min, 4 °C/∞. Za gel elektroforezu pripremljen je 1% agarozni gel u 1× puferu TAE. Uzorci su pomiješani s bojom 6× Purple Loading Dye te su naneseni na gel. U prvu jažicu naneseno je 5 µl markera GeneRuler DNA Ladder Mix. Elektroforeza je trajala 30 min na 100 V. Gel je bojan 5 min u otopini boje GelRed nakon čega su vrpce vizualizirane u uređaju UVITEC pod UV postavkama.

U posljednjem koraku, u ispravno konstruiran plazmid N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby3 uklonirane su sve sgRNA koje se nalaze na zasebnim plazmidima $pSgM_{1\text{-}6}G$, pomoću enzima Esp3I. U reakcijsku smjesu dodano je 0,44 µl plazmida N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby3 (γ=128,8 ng/µl), 0,69 µl plazmida $pSgM_{1\text{-}6}$ koji sadrže sgRNA (γ=100 ng/µl), 1 µl enzima Esp3I, 2 µl pufera Tango (10×), 2 µl DTT-a, 1 µl ATP-a i dH_2O do ukupnog volumena od 20 µl. Reakcija je inkubirana na 37 °C/5 min, 16 °C/10 min, 37 °C/15 min, 80 °C/10 min, 4 °C/∞, nakon čega je proveden tretman RecBCD prema prethodno opisanom protokolu. Plazmid N-

VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 umnožen je prema prethodno opisanom protokolu u soju *E. coli* NEB Stable. Uspješnost kloniranja i umnažanja plazmida provjerena je restrikcijskom analizom enzimima SacI i XhoI te agaroznom gel elektroforezom (opisano u prethodnim protokolima).

Kao negativna kontrola korišten je isti plazmid koji kodira za sgRNA koja ne cilja niti jedno mjesto u ljudskom genomu (engl. *non-target, NT*) (5'-GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC-3') (Josipović i sur. 2019). Protein dSpCas9-VPR navođen *non-target* sgRNA ne bi trebao utjecati na promjenu ekspresije gena te se koristi kao univerzalna negativna kontrola u eksperimentima manipulacije ljudskih gena pomoću sustava CRISPR. Ovaj je plazmid umnožen u soju *E. coli* NEB Stable kao i plazmid N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3. Oba su plazmida provjerena restrikcijskim enzimima SacI i XhoI te agaroznom gel elektroforezom.

3.2.2. Održavanje stanica 1.1B4 u kulturi i transfekcija stanica plazmidnim vektorom za ciljano povećanje ekspresije gena *MGAT4A* i *MGAT5*

Alikvot stanica odmrznut je inkubacijom u vodenoj kupelji na 37 °C. Kada je ostao mali komadić leda, stanice su prebačene u epruvetu Falcon sa 10 ml medija RPMI s 20% FBS-a. Stanice su oprezno resuspendirane i potom centrifugirane 8 min na 500 × g nakon čega je uklonjen supernatant. Na stanice je dodano 10 ml medija RPMI s 20% FBS-a te su prebačene u petrijevu zdjelicu (nulta pasaža). Stanice su uzgajane na 37 °C u atmosferi bogatom s 5% CO_2.

Stanice su presađivane svakih nekoliko dana, kada su dosegle konfluentnost oko 80%. Iz petrijevih zdjelica odsisan je medij, stanice su isprane s 5 ml PBS-a te tretirane s 2 ml tripsina (koncentracije 0,25%), 3 minute na 37 °C . Tripsin je inaktiviran dodatkom nekoliko ml medija RPMI s 10% FBS-a. Ovisno o omjeru presađivanja, dio stanica je prebačen u novu petrijevu zdjelicu i nadodan je medij RPMI s 10% FBS-a do 10 ml. Stanice su spremne za transfekciju nakon pete pasaže.

Stanice 1.1B4 transfecirane su plazmidima pomoću transfekcijskog reagensa PEI MAX. Transfekcija svakim plazmidom napravljena je u 6 bioloških replika. Korišteni plazmidi bili su N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 i N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3. Kao netretirana (mock) kontrola korištene su stanice kojima nije dodan plazmid već samo transfekcijski reagens i voda. Po jednoj reakciji transfekcije korišteno je 6 µg plazmida. Klonovi izoliranih

plazmida N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 su spojeni zajedno (γ=347,1 ng/µl), kao i plazmidi N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3 (γ=344,9 ng/µl). Medij RPMI bez FBS-a zagrijan je u kupelji na 37 °C. U epruvetama Falcon pripremljene su otopine odgovarajućeg plazmida i medija RPMI bez FBS-a. Jedna reakcijska smjesa iznosila je 500 µl, ali su pripremljene zajedničke matične otopine za svih 6 petrijevih zdjelica uz pola reakcijske smjese suviška. Dodano je 112,36 µl plazmida N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 u 3137,64 µl medija u jednu mikroepruvetu i 113,08 µl plazmida N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3 dodano je u 3136,92 µl medija u drugu mikroepruvetu. Za mock petrijevu zdjelicu pripremljeno je 500 µl medija. U zasebnoj mikroepruveti pripremljena je otopina medija RPMI bez FBS-a i transfekcijskog reagensa PEI MAX. Prema uputama proizvođača, preporučeni omjer reagensa PEI MAX i plazmidne DNA je 3:1 stoga je po jednoj reakciji korišteno 18 µl PEI MAX-a i 482 µl medija koji su pripremljeni u obliku matične otopine za sve reakcije. Otopine sa plazmidima i transfekcijskim reagensom pomiješane su u omjeru 1:1 te su inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi. Jedan ml otopine nakapan je u petrijeve zdjelice koje su zatim inkubirane na 37 °C.

Dvadesetčetiri sata nakon transfekcije započeta je selekcija transfeciranih stanica pomoću antibiotika puromicina. Stari medij odsisan je aspiratorom kako bi se uklonile mrtve stanice te je dodano 10 ml medija RPMI s 10% FBS-a zagrijanog na 37°C. Pipetom je dodano 4 µl matične otopine puromicina (50 mg/µl) direktno na stanice te su inkubirane na 37 °C. Sljedeća dva dana postupak selekcije je ponovljen dodatkom 5 te 6 µl matične otopine puromicina. Peti dan selekcija je prekinuta, stanicama je odsisan medij s antibiotikom te je dodano 10 ml svježeg medija RPMI s 10% FBS-a. Stanice su sakupljane osmi dan nakon transfekcije. Sa stanica je uklonjen medij, isprane su sa 5 ml PBS-a te tripsinizirane 4 min. Tripsin je neutraliziran dodatkom 3 ml medija RPMI s 10% FBS-a. Stanice su prebačene u epruvete Falcon od 15 mL, centrifugirane su 5 min na 800 × g nakon čega je talog stanica resuspendiran u 1 ml PBS-a. Tristo mikrolitara stanica odvojeno je u mikroepruvete za analizu RNA, a ostatak za analizu proteina. Uzorci za analizu RNA centrifugirani su 5 min na 800 × g, odsisan je PBS te su talozi zamrznuti na -80 °C. Uzorci za analizu proteina također su centrifugirani te još jednom isprani u 500 µl PBS-a sa inhibitorom proteaza. Ponovno su centrifugirani, odsisan je supernatant, a talozi su zamrznuti na -80 °C.

3.2.3. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR)

Molekule RNA izolirane su pomoću komercijalnog paketa Rneasy Mini Kit Qiagen prema uputama proizvođača te im je izmjerena koncentracija na NanoDROP-u. Eventualno zaostala genomska DNA uklonjena je pomoću komercijalnog paketa TURBO DNA-free. U reakciju reverzne transkripcije dodano je 800 ng RNA, 0,5 µl Turbo DNaze, 2,5 µl pufera za DNazu i dH_2O do ukupnog volumena od 25 µl te je smjesa inkubirana na 37 °C, 30 min. Nakon inkubacije dodano je 2,5 µl inaktivacijskog reagensa te su uzorci vorteksirani 5 min kako bi inaktivacijski reagens inaktivirao DNazu. Na kraju je inaktivacijski reagens uklonjen centrifugiranjem 90 s na 10 000 × g, obzirom da taloži na dno epruvete. Supernatant je prebačen u novu mikroepruvetu od 1,5 ml te je koncentracija RNA izmjerena NanoDROP-om (Tablica 5).

Tablica 5. Koncentracije izoliranih molekula RNA nakon tretmana DNazom. VPR1-5 – uzorci iz stanica transfeciranih plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3, NT1-5 – uzorci iz stanica transfeciranih plazmidom N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3

Uzorak	Koncentracija RNA ng/µl
VPR1	58,13
VPR2	58,10
VPR3	44,81
VPR4	30,98
VPR5	56,20
NT1	30,37
NT2	41,39
NT3	40,64
NT4	38,15
NT5	36,48

Izolirana RNA konvertirana je u komplementarnu DNA (cDNA) kako bi se mogla amplificirati reakcijom PCR. U jednu reakciju stavljeno je 300 ng RNA, 1 µl nasumičnih heksamera (50 µM) i 1 µl dNTP-ova. U ovom prvom koraku, koji je proveden na 65 °C 5 min,

nasumični heksameri koji služe kao početnice sjedaju na nasumična mjesta RNA čime ju pripremaju za drugi korak, reverznu transkripciju. Nakon završetka reakcije, uzorci su prebačeni na led kako se heksameri ne bi odvojili od RNA. U drugom koraku je u reakcije dodano 4 µl pufera Prime Script, 0,5 µl reverzne transkriptaze Prime Script i 0,5 µl inhibitora RNaza. Uzorci su inkubirani 30 °/10 min, 42 °C/60 min, 70 °C/15 min, 4 °C/∞. Negativna kontrola reverzne transkripcije bio je uzorak u koji nije dodana RNA (RNA-).

Za određivanje promjene ekspresije gena *MGAT4A* i *MGAT5* korištena je metoda qPCR uz upotrebnu tehnologije fluorescentnih interkalirajućih boja „SYBRGreen“. Komplementarna DNA dobivena reverznom transkripcijom umnožena je reakcijom qPCR-a u uređaju 7500 Fast Real-Time PCR System machine pomoću specifičnih početnica. Ugradnjom interkalirajuće boje SYBR Green u nastale dvolančane PCR produkte, omogućena je njihova kvantifikacija u stvarnom vremenu nastanka.

Reakcijska smjesa sastojala se od 10 µl smjese „Power SYBR™ Green PCR Master Mix“, 0,1 µl forward početnice (10 µM) i 0,1 µl reverse početnice (10 µM) za ciljani gen, 8,8 µl dH2O te 1 µl cDNA (15 ng). Kao endogena kontrola korišten je gen *HMBS* koji kodira hidroksimetilbilan sintazu. Početnice korištene za umnažanje gena od interesa i endogene kontrola navedene su u Tablici 6. U svaku je jažicu pločice najprije ispipetirano 19 µl odgovarajuće matične otopine, a zatim je dodan 1 µl cDNA. Također su pripremljene negativne kontrole za reakciju qPCR-a koje su sadržavale 20 µl odgovarajuće reakcijske smjese, ali sa dodatkom vode umjesto cDNA. Pločica je prekrivena folijom te su uzorci inkubirani 50 °C/20 s, 95 °C/10 min, 95 °C/15 s 60 °C/30 s. Negativne kontrole provjerene su početnicama ZEB2_qRT-Fw i ZEB2_qRT-Rev. Ukupno je analizirana cDNA iz 5 bioloških replika svake transfekcije, a za svaki uzorak su analizirane tehničke replike.

Tablica 6. Početnice za reakciju qPCR za gene *MGAT4A, MGAT5, HMBS i ZEB2*.

Naziv početnice	Sekvenca početnice
MGAT4A_qRT-Fw	5'-AAAATCCATGTAAACCCACCTGC-3'
MGAT4A_qRT-Rev	5'-AGTCTCCAGTCATCGGTGTGA-3'
MGAT5_qRT-Fw	5'-AGCGCATTGGCAAGTTGGA-3'
MGAT5_qRT-Rev	5'-AGTGGAGTTGGTTGAGTTTGTT-3'
HMBS_qRT-Fw	5'-AGCTTGCTCGCATACAGAGC-3'
HMBS_qRT-Rev	5'-AGCTCCTTGGTAAACAGGCTT-3'
ZEB2_qRT-Fw	5'-GATGATGAATGCGAGTCAGATGC-3'
ZEB2_qRT-Rev	5'-ACAGCAGTGTCTTGTTGTTGT-3'

Rezultati analize qPCR obrađeni su metodom ΔΔCt (Livak i Schmittgen, 2001), a kao referentni uzorak korišteni su uzorci iz transfekcije plazmidom N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3. Kako su za svaku biološku repliku rađene dvije tehničke replike, prvo je izračunata srednja vrijednost Ct za svaku biološku repliku. Dobivene srednje vrijednosti Ct za gene *MGAT4A* i *MGAT5* normalizirane su u odnosu na srednju vrijednost Ct endogene kontrole odgovarajuće biološke replike, da bi se dobila vrijednost ΔCt. Potom je izračunata srednja vrijednost ΔCt za svaku biološku skupinu, koja je normalizirana u odnosu na srednju vrijednost ΔCt referentne skupine. Dobivene vrijednosti ΔΔCt korištene su za izračunavanje faktora promjene ekspresije gena FC *(*engl. *Fold Change).*

3.2.4. Metoda Western blot

Stanični talozi postepeno su odmrznuti držanjem na ledu. Na stanice je dodano 50 µl pufera RIPA te su inkubirane 30 min na +4 °C uz trešnju. Uzorci su sonicirani 4 × 8 s te su centrifugirani 20 min na 12 000 rpm pri čemu su razbijeni stanični dijelovi taložili na dno, a proteini su ostali u

supernatantu. Supernatanti su prebačeni u nove mikroepruvete. Za mjerenje koncentracije proteina korišten je Pierce BCA Protein Assay Kit prema uputama proizvođača. Koncentracije su prikazane u Tablici 7.

Tablica 7. Koncentracije izoliranih proteina. VPR1-5 – uzorci iz stanica transfeciranih plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3, NT1-5 – uzorci iz stanica transfeciranih plazmidom N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3

Uzorak	Koncentracija proteina ng/µl
VPR1	1179,24
VPR2	1380,17
VPR3	1020,16
VPR4	1062,03
VPR5	1371,60
NT1	2929,05
NT2	3774,65
NT3	2041,59
NT4	3071,38
NT5	3297,43

SDS-PAGE *(*engl. *SDS Polyacilamide Gel Electrophoresis)* je metoda kojom se odvajaju proteini na temelju njihove molekulske mase u poliakrilamidnom gelu. Pripremljena su 2 poliakrilamidna gela za analizu proteinskih produkata gena *MGAT4A* i *MGAT5*. Obzirom da su količine ukupnih izoliranih proteina bile niske zbog malog broja uspješno transfeciranih stanica, odabrane su po 3 biološke replike svake transfekcije koje su imale najveću koncentraciju proteina te su daljnje analize provedene na njima. Sastav 10% gela za razdvajanje prikazan je u Tablici 8, a sastav 4% gela za sabijanje u Tablici 9. Gel za razdvajanje nadslojio se otopinom izopropanola koji sprječava oksidaciju gela kako bi brže polimerizirao. Elektroforeza je provedena u 1 × elektrodnom puferu (*SDS running buffer*) u uređaju za vertikalnu elektroforezu. Na gel je naneseno 5 µl markera i 25 µl prethodno pripremljenih uzoraka proteina. Uzorci su pripremljeni miješanjem 15 µg proteina sa 6 µl otopine RotiLoad, koja spušta uzorke na dno jažice zbog veće viskoznosti i vizualizira frontu kretanja proteina u elektroforezi, i 2,5 µl DTT u puferu RIPA do ukupnog

volumena od 25 µl. Na gel su nanesene po 3 biološke replike tretmana i kontrole. Elektroforeza je provedena na sobnoj temperaturi 90 min na 100 V.

Tablica 8. Sastav 10% poliakrilamidnog gela za razdvajanje. Prikazani su volumeni za dva gela.

Kemikalija	Volumen / µl
30 % akrilamid-bisakrilamid	5000
1 M Tris-HCl pH 8,8	5630
10 % SDS	150
dH_2O	4137,5
TEMED	7,5
10 % APS	75
Ukupno	15 ml

Tablica 9. Sastav 4% poliakrilamidnog gela za sabijanje. Prikazani su volumeni za dva gela.

Kemikalija	Volumen / µl
30 % akrilamid-bisakrilamid	990
1 M Tris-HCl pH 6,8	950
10 % SDS	75
dH_2O	5440
TEMED	7,5
10 % APS	37,5
Ukupno	7,5 ml

Proteini razdvojeni SDS-PAGE elektroforezom preneseni su na nitroceluloznu membranu. U pripremljenom puferu za transfer namočene su kazete, spužvice, membrane i Whatman papiri. Gelovi su izvađeni iz kadice za elektroforezu te su prebačeni u pufer na nekoliko minuta kako bi se ekvilibrirali. Zatim su složene kazete slijedećim redoslijedom – crna strana kazete, spužva, tri

Whatman papira, gel, membrana, tri Whatman papira, spužva, bijela strana kazete. Nakon slaganja sendvič-kazete, mjehurići zraka koji bi smetali kod prijenosa proteina uklonjeni su istiskivanjem staklenom epruvetom. Kazete su stavljene u kadicu napunjenu puferom za transfer. Kadica je stavljena u veću posudu napunjenu vodom i ledom sa magnetskom mješalicom na dnu posude. Transfer je proveden u frižideru na +4 °C, 60 min na 100 V. Nakon završetka, membrane su izvađene iz kazeta te su kratko obojane bojom Rouge Ponceau koja boji proteine kako bi se vizualizirali proteini i odredila uspješnost prijenosa. Na kraju su membrane isprane nekoliko puta u dH_2O.

U svrhu blokiranja nespecifičnog vezanja antitijela za membranu, membrane su inkubirane 1h na tresilici pri sobnoj temperaturi u 5%-tnoj otopini mlijeka u puferu TBST *(*engl. *TRIS buffered saline + Tween, TBST*) te potom isprane u nekoliko ml pufera TBST-a po 2 min na miješalici. Primarno antitijelo za GnT-4a iz zeca pripremljeno je u epruveti Falcon u razrjeđenju 1:1000 u 5% mlijeku u puferu TBST dok je antitijelo za GnT-V iz miša pripremljeno u razrjeđenju 1:500 u 5% mlijeku u TBST-u. Kako bi se mogla usporediti količina proteina GnT-4a sa GnT-V, potrebno je analizirati endogenu kontrolu tj. protein koji je prisutan u svim uzorcima u istoj količini. Kao endogeni protein, odabran je β-aktin čije je antitijelo porijeklom iz miša te je pripremljeno u razrjeđenju 1:10 000 u 0,5% mlijeku u TBST-u. Membrane su izrezane na dva dijela, tako da je jedan dio sadržavao proteine GnT-4a ili GnT-V, a drugi dio β-aktin. Otopine antitijela su stavljene na odgovarajuće membrane u posudama te su ostavljene na miješalici u frižideru na +4 °C uz prekonoćnu inkubaciju. Sekundarna antitijela (obilježena peroksidazom iz hrena) za GnT-4a bila su anti-mouse te su pripremljena u razrjeđenju 1:2000, a za GnT-V i β-aktin su bila anti-rabbit te su pripremljena u razrjeđenjima 1:2000 u 5% mlijeku u TBST-u za GnT-V i 1:200 000 u 0,5% mlijeku u TBST-u za β-aktin. Otopine sekundarnih antitijela dodane su na membrane koje su inkubirane 60 min na miješalici, na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, membrane su ispirane u TBST-u, 3 × 10 min na miješalici pri sobnoj temperaturi.

Detekcija signala na membranama provedena je pomoću kita Clarity™ Western ECL Substrate prema uputama proizvođača. U mikroepruveti od 2 ml pomiješani su luminol i peroksidaza te su nakapani na membrane. Nakon inkubacije od 5 min pri sobnoj temperaturi signali su detektirani u uređaju za detekciju membrana UVITEC pod kemiluminiscentnom opcijom uz ekspoziciju od nekoliko sekundi, ovisno o membrani. Peroksidaze na sekundarnim antitijelima u

prisutnosti peroksida oksidirale su luminol i dovele do emisije svjetla koje se može detektirati kamerom CCD. Intenzitet svjetla proporcionalan je količini proteina na membrani.

Za analizu intenziteta signala proteina GnT-4a i GnT-V na membranama, slike su analizirane prema protokolu za analizu signala u programu ImageJ (https://imagej.nih.gov) dostupnom na poveznici http:__www.yorku.ca_yisheng_Internal_Protocols_ImageJ.pdf. Ukratko, nakon konverzije slika u format grayscale, izmjereni su intenziteti za svaku vrpcu i pozadinu vrpce za proteine GnT-4a i GnT-V te za β-aktin. Podaci dobiveni u programu ImageJ obrađeni su u programima Microsoft Excel i GraphPad.

3.2.5. Imunofluorescencija

Kod sakupljanja transfeciranih stanica 1.1B4 za analizu proteina i RNA, 200 µl resuspendiranih stanica pipetom je uzeto iz petrijeve zdjelice i nasađeno na pokrovna stakalca u jažicama pločice sa 6 bunarića. Pokrovna stakalca su prethodno očišćena etanolom i tretirana UV svjetlom. Kada su stanice adherirale za staklo, dodano im je 2 ml svježeg medija RPMI s 10% FBS-a. Sljedeći dan stanice su fiksirane dodatkom 1 ml hladnog metanola uz inkubaciju od 2 min na sobnoj temperaturi. Tekućina je odsisana aspiratorom, dodana su 2 ml ledeno hladnog metanola te je slijedila inkubacija 2 min na sobnoj temperaturi. Metanol je uklonjen i stanice su isprane dva puta s 2 ml PBS-a. Stanicama je dodan 1 ml novog PBS-a kako bi se mogle skladištiti na +4°C do korištenja.

Za detekciju lokalizacije proteina GLUT1 i njegove kolokalizacije s lizosomima u stanicama 1.1B4 primjenjena je metoda imunofluorescencije. Korištena su primarna antitijela anti-GLUT1 podrijetlom iz zeca i Alexa594-direktno obilježeno anti-LAMP1 antitijelo podrijetlom iz miša, koje veže proteine lizosoma LAMP1. Antitijelo anti-GLUT1 detektirano je sekundarnim antitijelom Goat Anti-Rabbit IgG H&L (FITC). Kako bi se spriječilo nespecifično vezanje antitijela anti-GLUT1 stakalca su inkubirana u 5% otopini BSA u PBST-u (PBS + *Tween*). Otopina je nakapana na stakalca, pokrivena pokrovnicom i inkubirana na sobnoj temperaturi 60 min. Stakalca su zatim isprana u PBS-u i potom inkubirana 16 h na +4°C u primarnom anti-GLUT1 antitijelu razrijeđenom 1:100 u 1% otopini BSA u PBST-u. Slijedećeg dana stakalca su isprana u 2 ml PBS-a, 2 × 5 min. Sekundarno antitijelo obilježeno FITC-om (engl. *fluorescein*

isothiocyanate) pripremljeno je u omjeru 1:100 u 1% otopini BSA u PBST-u. U istoj otopini pripremljeno je primarno antitijelo anti-LAMP1, u omjeru 1:250. Otopina s antitijelima nakapana je na stakalca i inkubirana je 60 min na 37 °C. Stakalca su potom isprana u 2 ml PBS-a, 2 × 5 min te je na njih nakapano 50 µl boje DAPI. DAPI je molekula koja interkalira u mali utor DNA i pobuđena svjetlošću iz UV dijela spektra emitira svjetlost valne duljine 457 nm čime omogućava vizualizaciju DNA molekula. Nakon inkubacije od 5 min, stakalca su isprana u PBS-a i dH_2O te je na njih nakapana otopina za očuvanje fluorescencije DAKO Fluorescence Mounting Medium. Stakalca su pažljivo pincetom prebačena na predmetno stakalce kako bi se omogućilo mikroskopiranje. Stanice su gledane na mikroskopu Olympus BX51 koristeći filtere za zeleno, crveno i plavo svjetlo te su fotografirane CCD kamerom.

3.2.5.1. Analiza slika

Ukupno je analizirano 20 stanica u kojima se ciljano povećala ekspresija gena *MGAT4A* i *MGAT5* i 20 stanica sa „non-target“ sustavom. Svaka od analiziranih stanica fotografirana je koristeći 3 zasebna filtra kako bi se vizualizirali različiti dijelovi stanice. Pod zelenim filterom vizualizirani su transporteri GLUT1 jer, uslijed izlaganja svjetlosti iz UV spektra, FITC emitira svjetlost valne duljine 519 nm. Lizosomi su vizualizirani pod crvenim filterom zbog emisije svjetlosti boje Alexa 594 od 618 nm i DNA je vizualizirana pod plavim filterom zbog emisije svjetlosti boje DAPI od 457 nm. Slike su zatim obrađene i analizirane u programu ImageJ. Slikama je prilagođen intenzitet plavog kanala zbog prejake fluorescencije jezgara te su sva tri kanala preklopljena u jedinstvenu sliku. Za analizu intenziteta signala anti-GLUT1 antitijela, u programu ImageJ izmjerene su površina i fluorescencija stanice te pozadinski šum (engl. *background*). Također je izmjerena vrijednost „Integrated Density“ (IntDen) koja predstavlja zbroj svih piksela u slici. U programu Microsoft Excel izračunate su vrijednosti CTCF (engl. *Corrected Total Cell Fluorescence*) koje predstavljaju količinu fluorescencije stanice.

Kako bi se utvrdilo postoji li kolokalizacija signala proteina GLUT1 sa lizosomima, bilo je potrebno fotografirati stanice na način da se u istoj ravnini zabilježi signal antitijela za lizosome, LAMP-1, i antitijela za protein GLUT1. Stoga su prilikom fotografiranja prvo fokusirani lizosomi i zabilježen je njihov signal, a potom je u istoj ravnini zabilježen signal antitijela za GLUT1. U programu ImageJ svaka je slika razdvojena na zasebne kanale te su odgovarajući kanali

preklopljeni pomoću programskog dodatka Colocalization (https://imagej.nih.gov/ij/plugins/colocalization.html).

3.2.6. Statistička obrada podataka

Rezultati qPCR-a za gene *MGAT4A* i *MGAT5*, dobiveni analizom stanica transfeciranih plazmidima N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 i N-VPR_dSpCas9_NT_ Puro_mRuby3, obrađeni su t testom u programu GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Prism version 9.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com) kako bi se utvrdilo da li je došlo do statistički značajne promjene u ekspresiji gena *MGAT4A* i *MGAT5* u stanicama u kojima su oni ciljani u donosu na stanice sa „non-target“ sustavom.

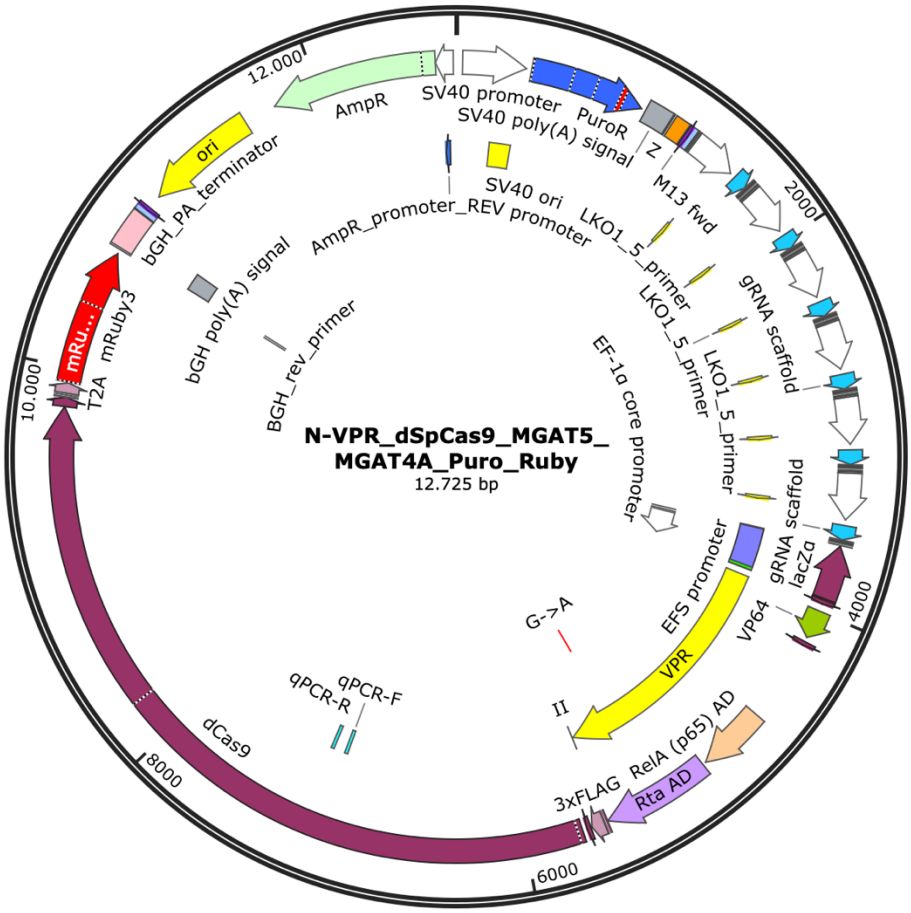
Rezultati dobiveni analizom membrana obrađeni su t testom u programu GraphPad Prism kako bi se utvrdilo da li je došlo do statistički značajne promjene u količini proteina u stanicama koje su bile transfecirane plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 u odnosu na stanice transfecirane plazmidom N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3.

Za analizu rezultata dobivenih obradom slika u programu ImageJ korišten je t test u programu GraphPad Prism kako bi se utvrdilo da je li razlika u ukupnoj količini fluorescencije stanica u kojima su ciljani geni *MGAT4A* i *MGAT5* u odnosu na stanice sa „non-targetom“ statistički značajna.

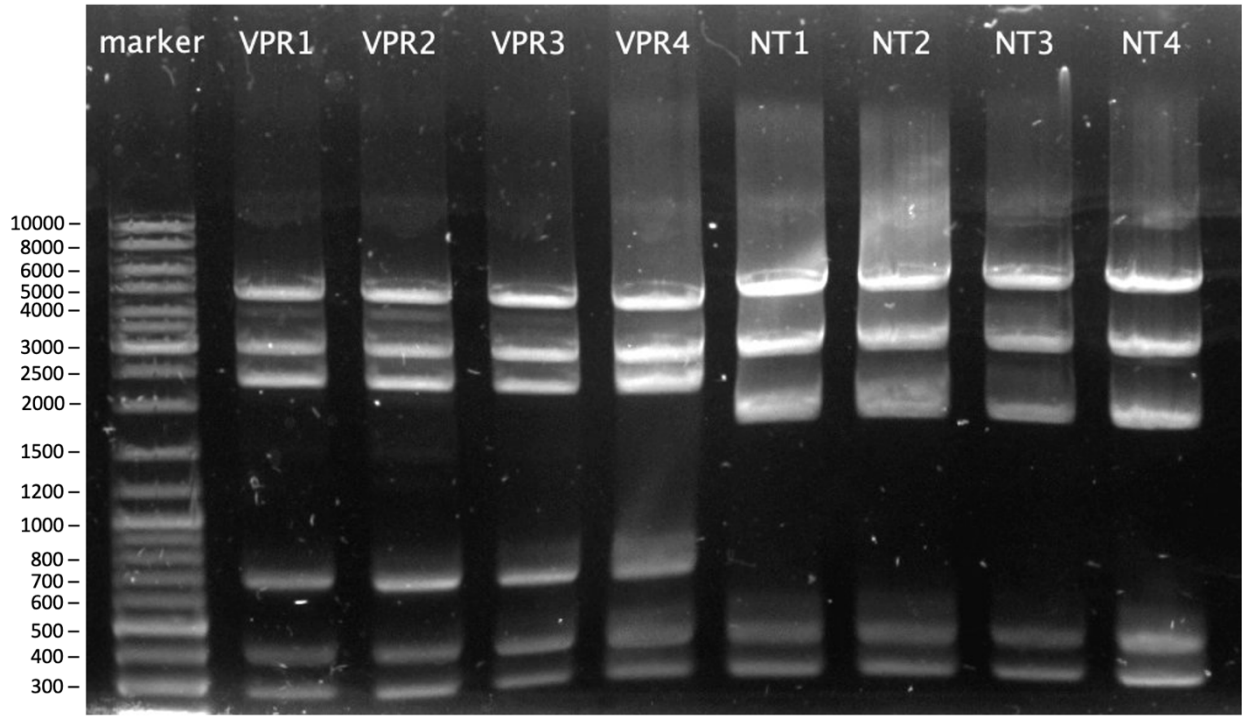
4. REZULTATI

4.1. Konstrukcija plazmida N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3

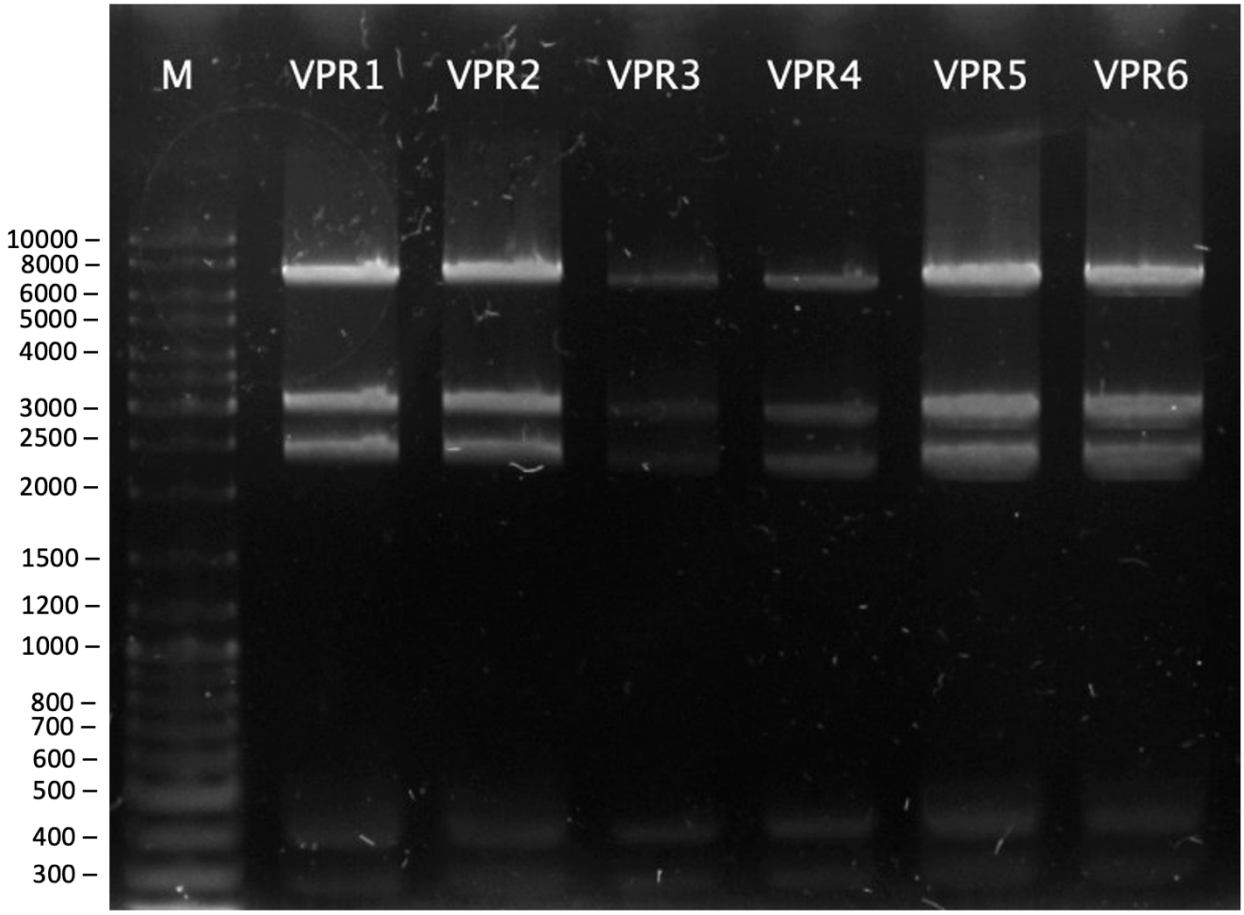
Uspješnost kloniranja sgRNA u pojedinačne vektore potvrđena je sekvenciranjem. Ugradnja modula za sustav CRISPR/dCas9 u plazmidnu okosnicu 2nd Backbone_Puro koja nosi gen za rezistenciju na ampicilin (plazmid N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby3), potvrđena je restrikcijskom analizom pomoću enzima XhoI i SacI. Očekivani produkti restrikcije, veličine 4775pb, 2984pb, 2346pb, 661pb, 371pb i 250pb vizualizirani su u 1% gelu agaroze (Slika 8). Ispravnost slijeda rezultantnog plazmidnog vektora N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro _mRuby3 (Slika 7) provjerena je restrikcijskom analizom pomoću enzima XhoI i SacI. Očekivani produkti restrikcije, veličine 6774pb, 2984pb, 2346pb, 371pb i 250pb, vizualizirani su u 1% gelu agaroze (Slika 9). Istovremeno i sa istim parom restrikcijskih enzima, provjerena je ispravnost slijeda plazmida N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3 (Slika 9).



Slika 7. Vektorska mapa plazmida VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3. EFS promotor – slabi promotor; VPR – aktivacijska domena koja se sastoji od manjih domena VP64, RelA (p65) AD i Rta AD; dCas9 – inaktivirani protein Cas9 iz *S. pyogenes*; mRuby3 – fluorescentni protein Ruby; ori – izvorište replikacije; bGH_PA_terminator – terminator; PuroR – rezistencija na puromicin; AmpR – gen za β-laktamazu koja daje otpornost na antibiotik ampicilin. Mapa plazmida je napravljena u programu SnapGene.



Slika 8. Elektroforeza u 1% gelu agaroze nakon restrikcijske analize plazmida N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby3 i VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3 enzimima XhoI i SacI. VPR1-4 – plazmidi N-VPR_dSpCas9_Sg×6_Puro_mRuby; NT1-4 – plazmidi N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3. M – GeneRuler DNA Ladder Mix. Svi analizirani klonovi obaju plazmidnih vektora su ispravni jer daju odgovarajući broj i veličinu produkata nakon restrikcijske analize. Fotografija gela nakon elektroforeze je prilagođena (kontrast, ekspozicija, oznake uzoraka) u programima ImageJ i Adobe Photoshop CC.

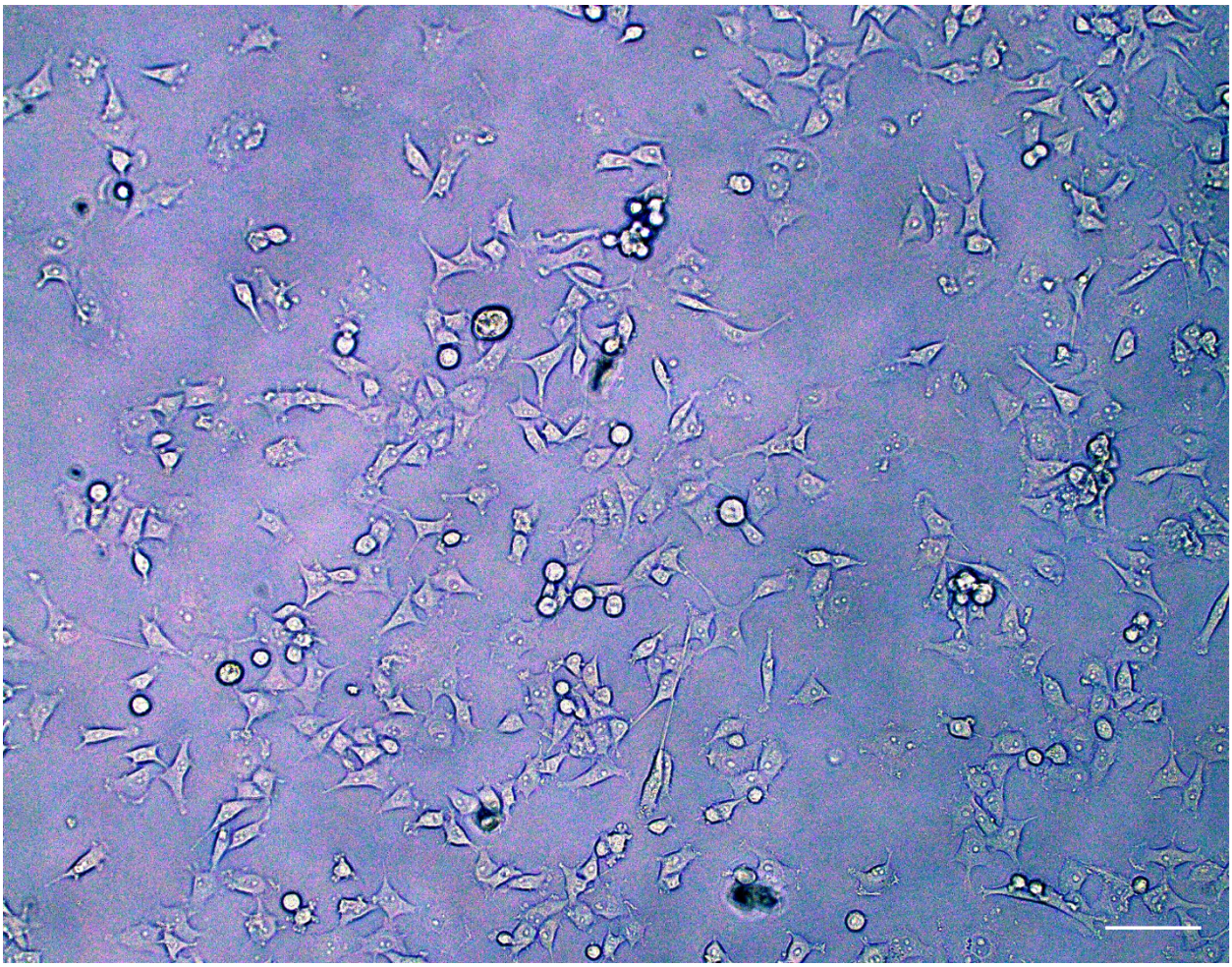


Slika 9. Elektroforeza u 1% gelu agaroze nakon restrikcijske analize plazmida N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 enzimima XhoI i SacI. VPR1-6 – biološke replike plazmida N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3. M – GeneRuler DNA Ladder Mix. Analizirani klonovi finalnog plazmidnog vektora za povećanje ekspresije gena *MGAT4A* i *MGAT5* su ispravni jer daju odgovarajući broj i veličinu produkata nakon restrikcijske analize. Fotografija gela nakon elektroforeze je prilagođena (kontrast, ekspozicija, oznake uzoraka) u programima ImageJ i Adobe Photoshop CC.

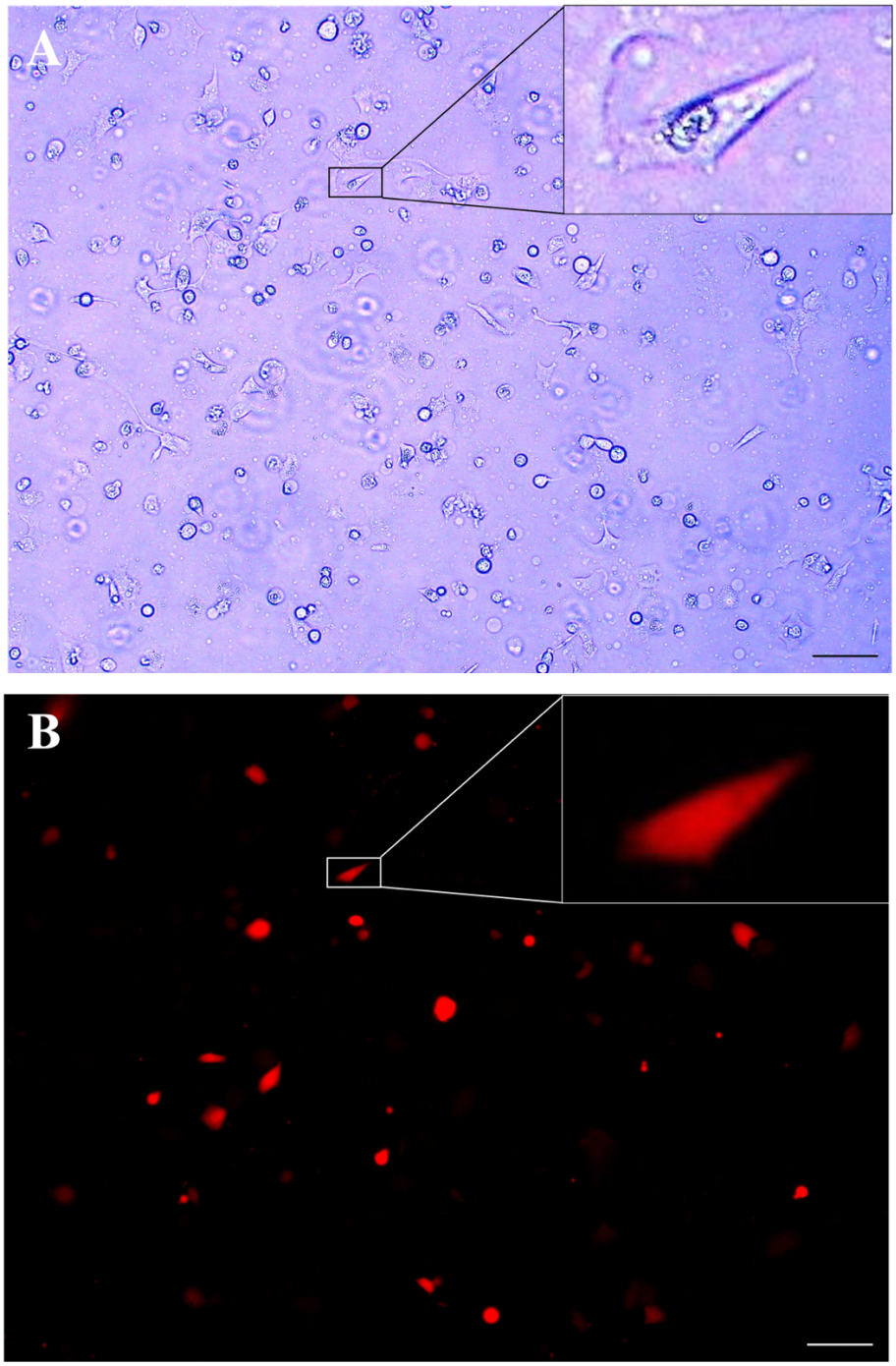
4.2. Uzgoj, transfekcija i selekcija stanica 1.1B4

Na slici 10. prikazana je normalna morfologija stanica 1.1B4. Uspješnost transfekcije plazmidima N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 i N-VPR_dSpCas9_NT_Puro _mRuby3 potvrđena je mikroskopiranjem pod UV filterom za crveno svjetlo. Uspješno transfecirane stanice su zbog ekspresije fluorescentnog proteina Ruby, koji ima ekscitaciju na 558 nm i emisiju crvene svjetlosti na 605 nm, svijetlile crveno (Slika 11). Uspješnost transfekcije nije bila velika i iznosila je 24% što je i očekivano obzirom na veličinu plazmida kojima su stanice

transfecirane (više od 12kb). Prilikom presađivanja stanica, jedna petrijevka je kontaminirana stoga su u daljnjim rezultatima obrađeni rezultati iz 5 bioloških replika umjesto 6.



Slika 10. Stanice 1.1.B4 u osmoj pasaži gledane pod svjetlosnim mikroskopom (400 ×). Stanice adherirane za dno petrijeve zdjelice su vretenastog oblika, a one koje su se odlijepile od podloge uslijed apoptoze ili mitoze su okrugle. Mjerilo iznosi 100 µm. Slika je uređena u programu ImageJ.



Slika 11. Mikroskopska slika stanica 1.1B4 transfeciranih plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 (100 ×). A) Stanice gledane pod svijetlim poljem; B) stanice gledane pod UV filterom za crveno svjetlo. Crveni signal u citoplazmi predstavlja protein mRuby, transkribiran s vektora VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3. Umetak na slici B prikazuje uvećanu jednu od uspješno transfeciranih stanica. Mjerilom na dnu slika označena je dužina od 100 µm.

4.3. Analiza ekspresije gena metodom reverzne transkripcije i qPCR-a

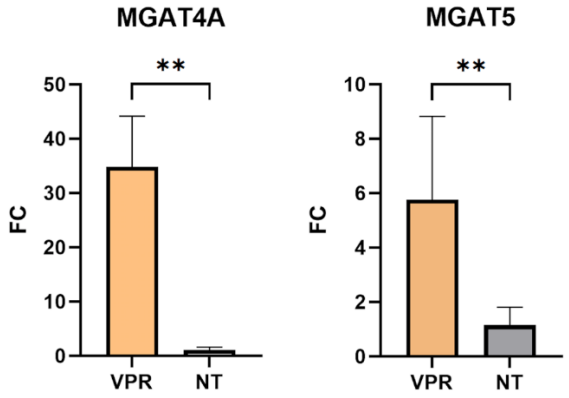
Vrijednosti Ct dobivene reakcijom qPCR-a prikazane su u tablicama 10 i 11. Statističkom obradom vrijednosti ΔCt, dobivenih normalizacijom srednje vrijednosti Ct za gene *MGAT4A* i *MGAT5* svake biološke replike u odnosu na srednje vrijednosti Ct endogene kontrole *HMBS,* utvrđeno je da je u slučaju oba gena djelovanjem sustava VPR-dCas9 došlo do statistički značajne promjene ekspresije. Ciljanje fuzijskog proteina VPR-dCas9 na promotore gena *MGAT4A* i *MGAT5* rezultiralo je povećanjem ekspresije gena *MGAT4A* za 33,95 puta, a gena *MGAT5* 5,77 puta (Slika 15). p vrijednosti dobivene uspoređivanjem uzoraka iz stanica transfeciranih plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_ mRuby3 sa onima iz stanica transfeciranih plazmidom N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3 iznosile su 0,0079 za oba gena, što je veće od granične vrijednosti 0,05 i ukazuje na statistički značajnu promjenu u ekspresiji gena.

Tablica 10. Podaci dobiveni rekacijom PCR za gen *MGAT4A*. U tablici su prikazane izračunate srednje vrijednosti C_T replika (C_T Mean) za 5 bioloških replika za gene *MGAT4A* i *HMBS*, razlika srednjih vrijednosti za *MGAT4A* i pridruženi *HMBS* (ΔC_T Mean), razlika vrijednosti ΔC_T za uzorke *MGAT4A* i non-target ($\Delta\Delta C_T$) i rata promjene ekspresije gena (*fold change*) *MGAT4A* u uzorku ($2^{-\Delta\Delta C_T}$). Plavom bojom prikazana je srednja vrijednost svih vrijednosti *fold change* koja označava konačnu ratu promjene ekspresije gena *MGAT4A* nakon djelovanja sustava N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3, a crvenom bojom označena je standardna devijacija svih vrijednost *fold change*.

	MGAT4A	**HMBS**	**Faktor promjene ekspresije gena**		
UZORAK	**C_T Mean**		**ΔC_T Mean**	**$\Delta\Delta C_T$**	**$2^{-\Delta\Delta C_T}$**
MGAT4A_1	26,16	25,007	1,154	-5,277	38,762
MGAT4A_2	27,41	26,606	0,804	-5,626	49,391
MGAT4A_3	25,055	23,376	1,679	-4,751	26,924
MGAT4A_4	23,57	22,089	1,481	-4,949	30,885
MGAT4A_5	25,845	24,239	1,606	-4,824	28,332
NON-TARGET_1	28,684	23,027	5,657	-0,773	**33,95**
NON-TARGET_2	29,246	22,047	7,199	-0,7691	**9,3244**
NON-TARGET_3	27,957	21,27	6,687	0,2567	
NON-TARGET_4	29,095	22,054	7,041	0,6103	
NON-TARGET_5	29,667	24,099	5,568	-0,8625	

Tablica 11. **Podaci dobiveni rekacijom PCR za gen *MGAT5*.** U tablici su prikazane izračunate srednje vrijednosti C_T replika (C_T Mean) za 5 bioloških replika za gene *MGAT5* i *HMBS*, razlika srednjih vrijednosti za *MGAT5* i pridruženi *HMBS* (ΔC_T Mean), razlika vrijednosti ΔC_T za uzorke *MGAT5* i non-target ($\Delta\Delta C_T$) i rata promjene ekspresije gena (*fold change*) *MGAT5* u uzorku ($2^{-\Delta\Delta C_T}$). Plavom bojom prikazana je srednja vrijednost svih vrijednosti *fold change* koja označava konačnu ratu promjene ekspresije gena *MGAT5* nakon djelovanja sustava N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3, a crvenom bojom označena je standardna devijacija svih vrijednost *fold change*.

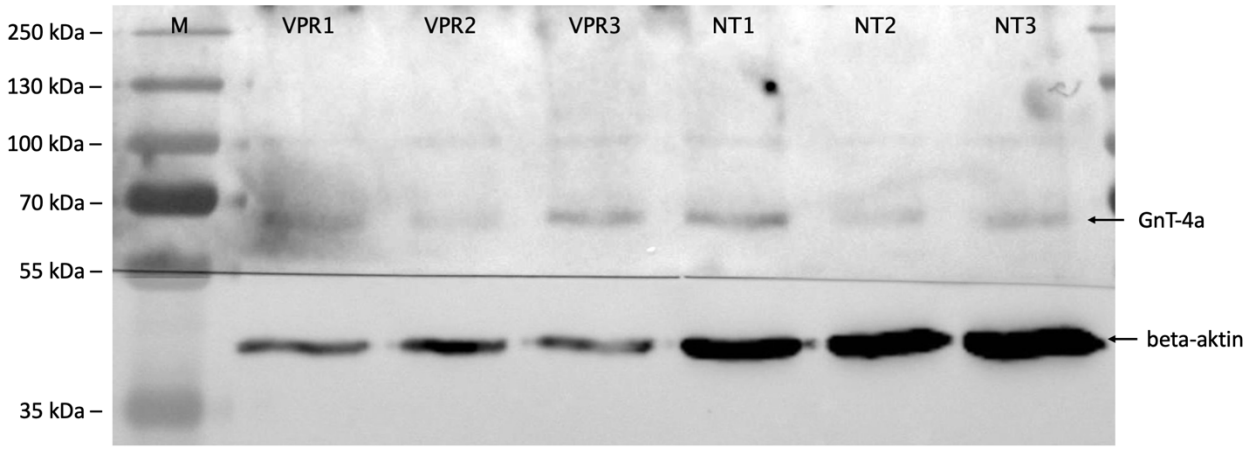
	MGAT5	**HMBS**	**Faktor promjene ekspresije gena**		
UZORAK	**C_T Mean**		**ΔC_T Mean**	**$\Delta\Delta C_T$**	**$2^{-\Delta\Delta C_T}$**
MGAT5A_1	22,931	25007	-2,076	-3,309	9,91
MGAT5A_2	24,882	26,606	-1,725	-2,957	7,767
MGAT5A_3	23,215	23,376	-0,161	-1,394	2,628
MGAT5A_4	21,62	22,089	-0,468	-1,701	3,251
MGAT5A_5	23,077	24,239	-1,162	-2,395	5,259
NON-TARGET_6	23,491	23,027	0,464	-0,7689	
NON-TARGET_7	23,844	22,047	1,797	0,5644	**5,763**
NON-TARGET_8	23,623	21,27	2,353	1,1202	**3,067**
NON-TARGET_9	23,358	22,054	1,304	0,071	
NON-TARGET_10a	24,345	24,099	0,246	-0,9867	



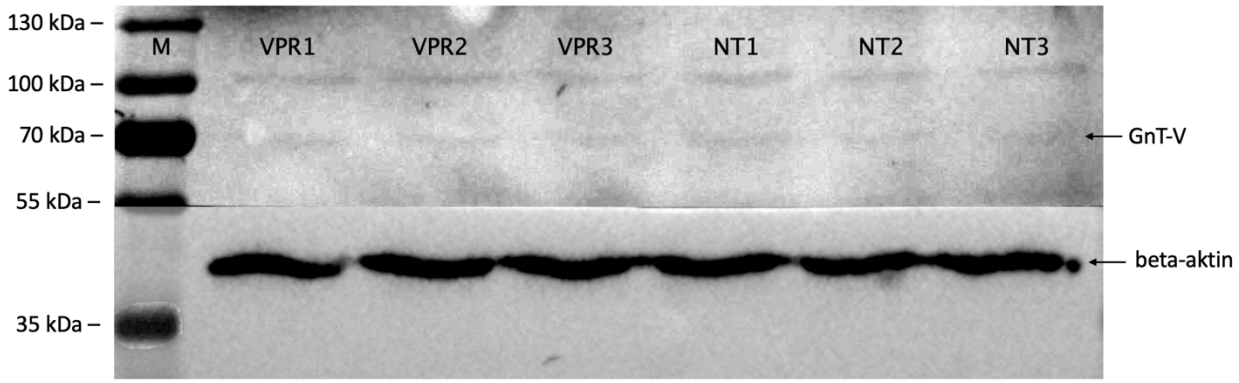
Slika 15. Relativna razina ekspresije gena *MGAT4A* i *MGAT5* u stanicama 1.1B4 8. dan nakon transfekcije. Skupina VPR transfecirana je plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3, a skupina NT plazmidom N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3**.** FC (engl. *fold change*) – faktor promjene ekspresije gena. Raspon pogreške (engl. *error bar*) prikazuje standardnu devijaciju. ** označava statističku značajnost koja proizlazi iz izračunatih p vrijednosti koja za oba proteina iznosi 0,0079.

4.4. Analiza proteina metodom Western blot

Slike membrana fotografirane uređajem za detekciju membrana UVITEC prikazane su na slikama 12 i 13. Kao kontrola nanošenja korišten je protein β-aktin čija se vrpca detektirala na visini koja odgovara veličini 42kDa. Protein GnT-4a detektiran je na visini ~62 kDa, a GnT-V na ~85 kDa.



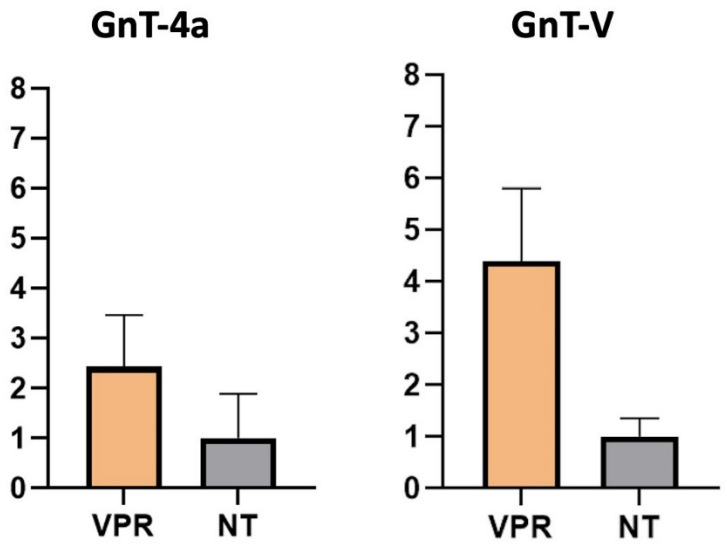
Slika 12. Membrana s proteinima GnT-4a i β-aktinom. M – PageRuler Plus Prestained Protein Ladder. VPR1-3 – proteini iz stanica transfeciranih plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3; NT1-3 – proteini iz stanica transfeciranih plazmidom N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3. Protein GnT-4a detektiran je na visini od 61,5 kDa, a β-aktin na 42 kDa. Slika je uređena u programima ImageJ i Adobe Photoshop CC.



Slika 13. Membrana s proteinima GnT-V i β-aktinom. M – PageRuler Plus Prestained Protein Ladder. VPR1-3 – proteini iz stanica transfeciranih plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3; NT1-3 – proteini iz stanica transfeciranih plazmidom N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3. Protein GnT-V detektiran je na visini od 84,5 kDa, a β-aktin na 42 kDa. Biljeg je PageRuler Plus Prestained Protein Ladder. Slika je uređena u programima ImageJ i Adobe Photoshop CC.

Iako je volumen proteinskih uzoraka izračunat s obzirom na prethodno izmjerenu koncentraciju kako bi se nanjelo 15 µg proteina na membranu, analiza signala pokazala je da su na membranu na kojoj je detektiran GnT-4a nanesene različite količine proteina za pojedine uzorke. Ova nejednaka količina nanesenih proteina bila je vidljiva kao različite debljine i intenziteti vrpca β-aktina, a koje bi trebale biti jednake u svim uzorcima. Signali sa druge membrane bili su slabo vidljivi za protein GnT-V stoga su količine proteina GnT-4a i GnT-V analizirane i relativno kvantificirane u programu ImageJ. Izmjerene vrijednosti integrirane optičke gustoće točaka (OD) za pojedine vrpce nakon uklanjanja pozadinskog signala normalizirane su u odnosu na β-aktin te je izračunata rata promjene ekspresije za proteine GnT-4a i GnT-V u uzorcima koji su transfecirani plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 u odnosu na uzorke transfecirane plazmidom N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3. Analizom podataka u Microsoft Excelu relativno je kvantificirana ekspresija proteina GnT-4a i GnT-V, a statistička obrada dobivenih podataka napravljena je pomoću programa GraphPad Prism. Rezultati analize su pokazali da je intervencija sustava VPR-dCas9 na područja gena *MGAT4A* i *MGAT5* dovela do povećanja količine proteina GnT-4a u prosjeku za 2,44 puta (raspon od 1,31-3,34) i GnT-V u prosjeku za 4,4 puta (raspon od 2,8-5,35). Grafički prikaz nalazi se na slici 14. Za oba gena dobivene su visoke p vrijednosti, što bi ukazalo na statički neznačajnu promjenu u količini

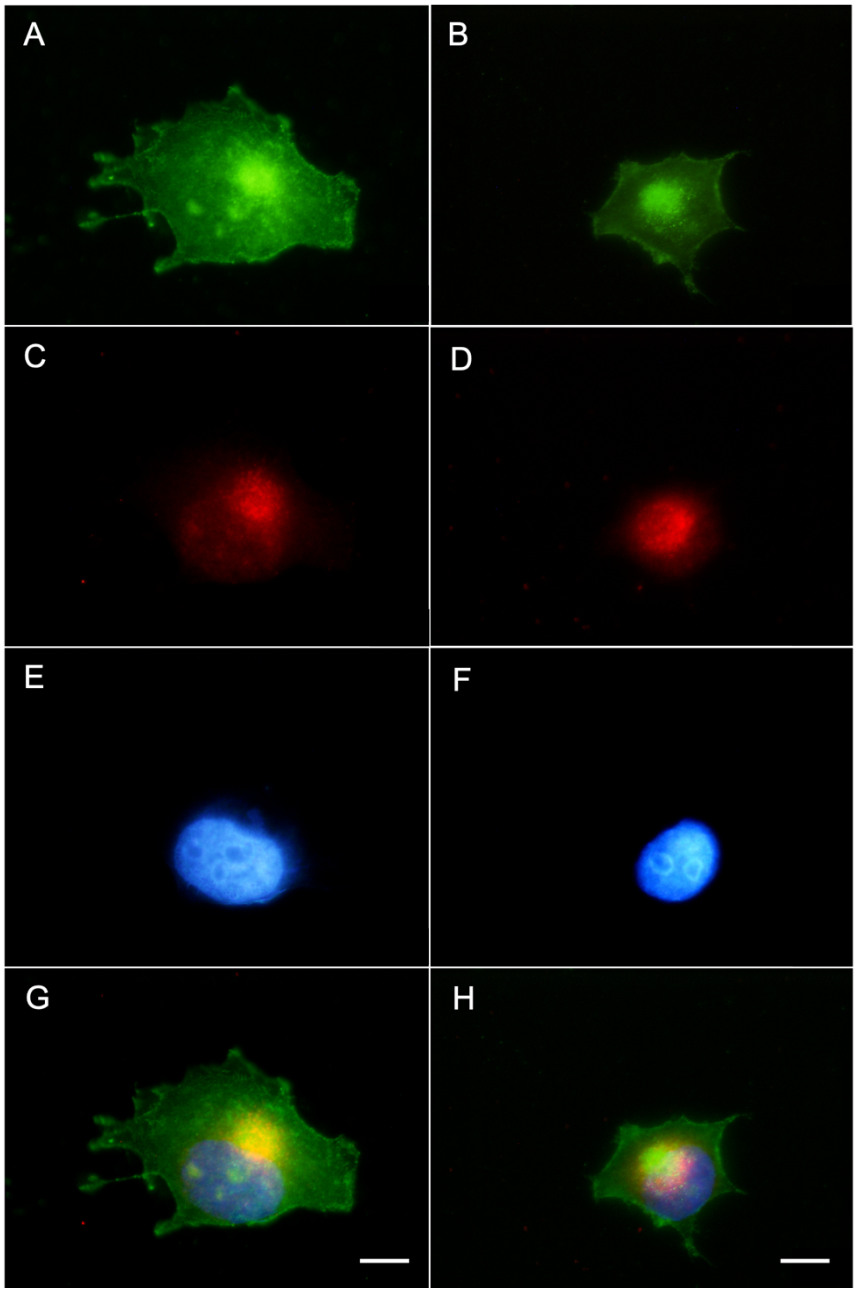
proteina, ali u ovom slučaju bi se to moglo zanemariti zbog malog broja replika i male količine analiziranih proteina.



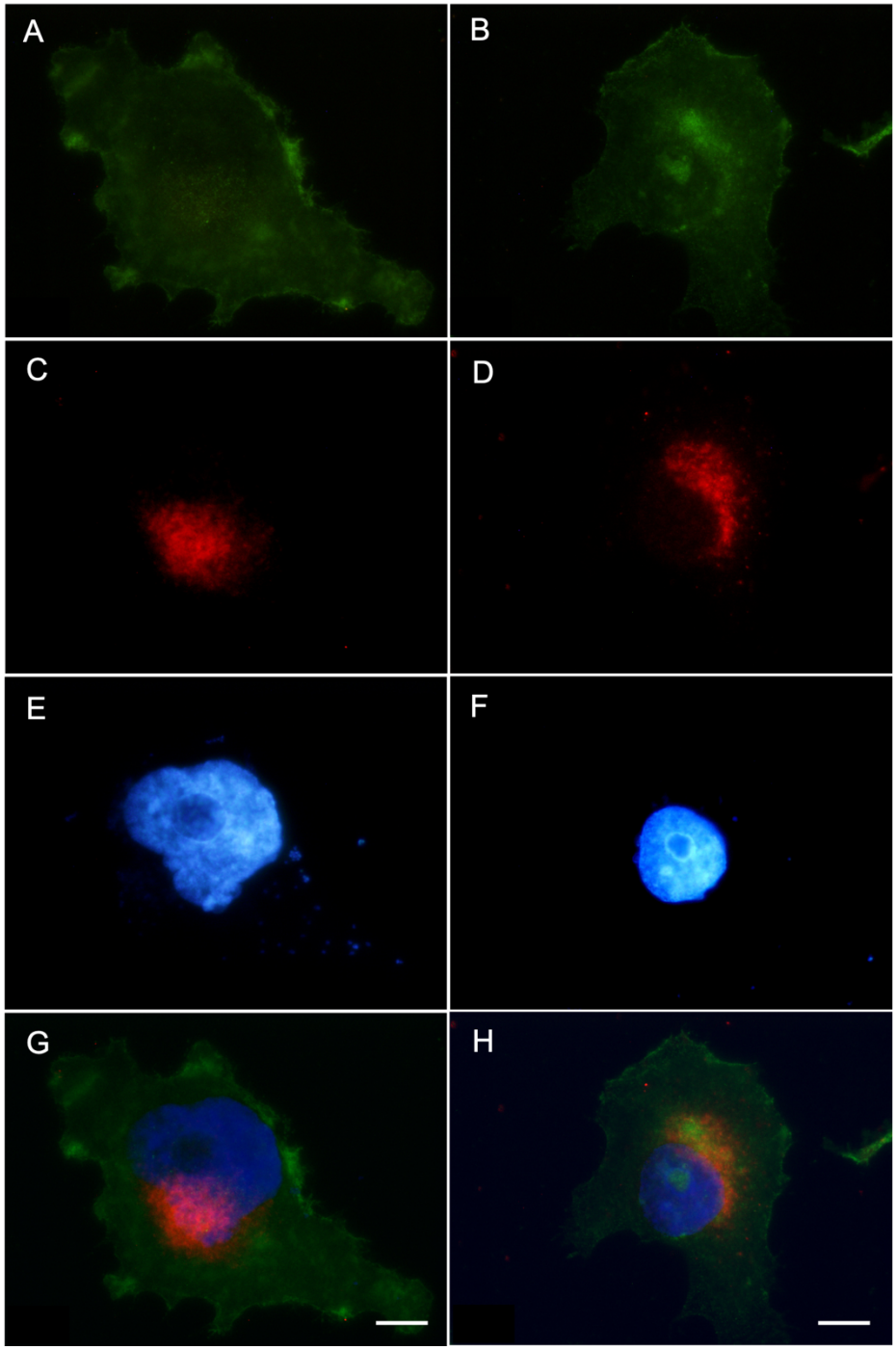
Slika 14. Grafički prikaz odnosa količine proteina GnT-4a i GnT-V u stanicama u kojima su ciljani geni *MGAT4A* i *MGAT5* (VPR) u odnosu na stanice u kojima nisu (kontrola, NT). Iako nakon intervencije sustavom VPR-Cas9 postoji povećanje količine proteina GnT-4a i GnT-V, ono nije statistički značajno.

4.5. Vizualizacija transportera GLUT1 imunofluorescencijom

Na slikama 16. i 17. prikazane su stanice 1.1B4 gledane fluorescencijskim mikroskopom pod filterima za zeleno, crveno i plavo svjetlo.

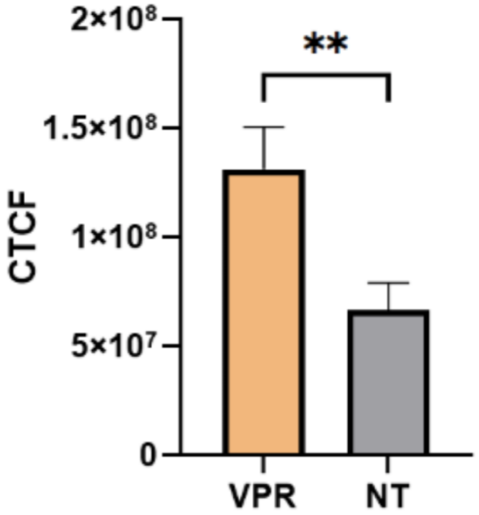


Slika 16. Imunolokalizacija proteina GLUT1 i LAMP-1 u stanicama 1.1B4 transfeciranima plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3. Glavnina signala GLUT1 lokalizirana je u staničnoj membrani, ali vidljiv je i unutar citoplazme (A i B). Signal antitijela anti-LAMP1 (C i D) vidljiv je u obliku zrnatih struktura asociranih uz jezgru obojanu bojom DAPI (E i F). Slike G i H prikazuju preklopljene kanale. Slikano pod povećanjem 1000 ×. Mjerilo je 10 µm. Slike su uređene i preklopljene u programu ImageJ.



Slika 17. Imunolokalizacija proteina GLUT1 i LAMP-1 u stanicama 1.1B4 transfeciranima plazmidom N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3. Glavnina signala GLUT1 lokalizirana je u staničnoj membrani, ali vidljiv je i unutar citoplazme (A i B). Signal antitijela anti-LAMP1 (C i D) vidljiv je u obliku zrnatih struktura asociranih uz jezgru obojanu bojom DAPI (E i F). Slike G i H prikazuju preklopljene kanale. Slikano pod povećanjem 1000 ×. Mjerilo je 10 μm. Slike su uređene i preklopljene u programu ImageJ.

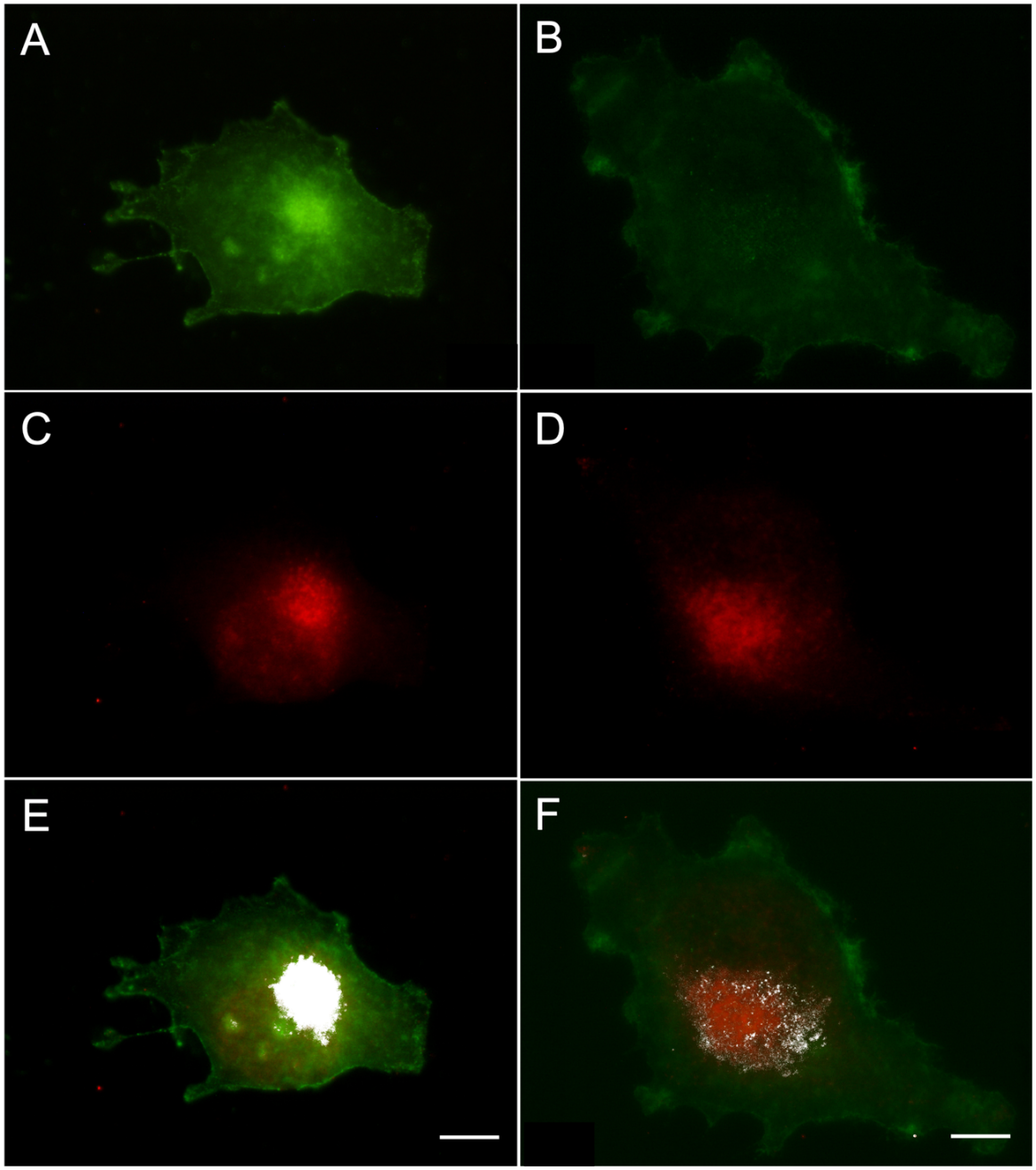
Kako je primijećeno da sve stanice ne pokazuju isti intenzitet fluorescencije signala za protein GLUT1, provedena je analiza intenziteta FITC signala na 20 stanica transfeciranih plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 i 20 stanica transfeciranih „non-target“ plazmidom. Izračunate su srednje vrijednost CTCF za obje skupine stanica te je utvrđeno da stanice transfecirane plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 imaju u prosjeku 1,97 puta jači intenzitet fluorescencije u odnosu na stanice transfecirane „non-target“ plazmidom (Slika 18.) Analizom podataka u programu GraphPad Prism dobivena je p vrijednost od 0,0024 koja ukazuje da je promjena u količini fluorescencije stanica u kojima su ciljani geni *MGAT4A* i *MGAT5* u odnosu na stanice sa sustavom „non-target“ statistički značajna.



Slika 18. Intenzitet signala proteina GLUT1 u stanicama 1.1B4 nakon ciljane aktivacije gena *MGAT4A* i *MGAT5* te u stanicama transfeciranima kontrolnim plazmidom NT. Stanice transfecirane plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 (skupina VPR) imaju prosječno 1,97 puta jači intenzitet fluorescencije antitijela GLUT1 u odnosu na stanice transfecirane kontrolnim plazmidom NT. CTCF predstavlja ukupnu količinu fluorescencije stanice te je na slici prikazan kao srednja vrijednost CTCF svih 20 analiziranih stanica. Raspon pogreške (engl. *error bar*) prikazuje standardnu devijaciju. ** označava statističku značajnost koja proizlazi iz izračunate p vrijednosti od 0,0024.

Analizom slika pomoću programskog dodatka Colocalization provjerena je kolokalizacija proteina GLUT1 sa lizosomima. U stanicama u kojima su ciljani geni *MGAT4A* i *MGAT5* uočena je kolokalizacija dvaju signala, ali zbog nedovoljno jasne razlučivosti pojedinačnih lizosoma, ne

može se potvrditi da su proteini GLUT1 lokalizirani unutar lizosoma. Moguće je da je signal preklapanja posljedica velike količine proteina GLUT1 unutar stanice zbog čega se čini da na području lizosoma oni međusobno kolokaliziraju (Slika 19). Kod stanica u kojima geni nisu bili ciljani, nije uočena kolokalizacija signala GLUT1 i lizosoma (Slika 19).



Slika 19. Imunokolokalizacija proteina GLUT1 i LAMP-1 u stanicama 1.1B4 (1000 ×). U lijevom stupcu prikazana je stanica transfecirana plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3, a u desnom stanica transfecirana kontrolnim plazmidom NT. Zeleni signal potječe od proteina GLUT1 (A i B), a crveni od lizosoma (C i D). Slike su preklopljene te je bijelom bojom označeno područnje kolokalizacije (E i F). Mjerilo je 10 µm. Slike su uređene i preklopljene u programu ImageJ.

5. RASPRAVA

Transporteri GLUT1 su transmembranski proteini u beta-stanicama gušterače čovjeka koji unose glukozu u stanicu te posljedično omogućuju ispuštanje inzulina u krvotok i pravilno održavanje mehanizma GSIS (Ohtsubo i sur., 2005, 2011). Glikanske strukture na njima sastoje se od tetra-anternarnih struktura u čijem sastavljanju sudjeluje mreža enzima (Rudman, Gornik i Lauc, 2019).

Geni *MGAT4A* i *MGAT5* u genomu čovjeka kodiraju za glikoziltransferaze GnT-4a i GnT-V koje sudjeluju u stvaranju više-antenarnih struktura u glikoproteinima te su prisutne u mnogim tkivima. Njihova pravilna ekspresija i funkcija neophodne su za homeostazu organizma. Povećane količine GnT-4a i GnT-V koreliraju s protumorskim obilježjima (Dennis i sur., 1987, 2002; Takamatsu i sur., 1999; Granovsky i sur., 2000; Saito i sur., 2002), a nedostatak glikoziltransferaze GnT-4a povezan je s razvitkom dijabetesa tipa 2 u miša i čovjeka (Ohtsubo i sur., 2005, 2011). U beta-stanicama gušterače čovjeka, GnT-4a i GnT-V glikoziliraju transportere GLUT1 stvarajući strukture potrebne za njihovu ugradnju u membrane.

Tehnologija CRISPR osniva se na inaktiviranom proteinu Cas koji na sebi može imati fuzionirane različite efektorske domene i kratkoj molekuli RNA (sgRNA) koja navodi čitavu mašineriju do ciljanog mjesta u DNA. Fuzijom trodijelne aktivacijske domene VPR na protein dCas9 i sintezom specifične molekule sgRNA, moguće je navesti sustav do željenog gena i potaknuti njegovu transkripciju (Tschaharganeh i sur., 2016; Josipović i sur., 2019).

Cilj ovog diplomskog rada bio je konstruirati epigenetički alat VPR-dCas9 za simultano ciljano povećanje ekspresije gena *MGAT4A* i *MGAT5* u staničnoj liniji 1.1B4, koja je model za beta-stanice Langerhansovih otočića gušterače. Također, željelo se utvrditi ima li ciljano povećanje ekspresije gena koji kodiraju za glikoziltransferaze GnT-4a i GnT-V utjecaj na lokalizaciju i promjenu u količini transportera GLUT1 na membranama stanica 1.1B4.

Plazmid za ciljanu aktivaciju gena izrađen je metodom Golden Gate te sadrži module za promotor, aktivacijsku domenu VPR, protein dSpCas9, fluorescentni protein mRuby, terminator, rezistenciju na puromicin i 6 molekula sgRNA (Josipović i sur., 2019). Djelovanje konstruiranog sustava uspješno je dovelo do povećanja ekspresije željenih gena. Analiza ekspresije gena *MGAT4A* i *MGAT5* nakon transfekcije stanica 1.1B4 plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 za ciljanu aktivaciju gena pokazala je da je

došlo do statistički značajnog povećanja ekspresije oba ciljana gena u odnosu na stanice transfecirane kontrolnim plazmidom „non-target“. „Non-target“ sgRNA ne sadrži homologiju niti s jednom sekvencom u genomu čovjeka, stoga se koristila kao kontrola specifičnosti ciljane aktivacije gena. Osmi dan nakon transfekcije, gen *MGAT4A* pokazao je povećanu ekspresiju (~34×) u odnosu na kontrolu „non-target“, dok je stopa povećanja ekspresije za gen *MGAT5* iznosila ~5,8×. Vrijednosti za biološke replike razlikovale su se, ali je razvidna velika promjena razine transkripcije u rasponu od 26 do 49 puta za gen *MGAT4A* te 2,6 do 9,9 puta za gen *MGAT5*. Razlog velike razlike u stopi povećanja ekspresije između gena *MGAT4A* i *MGAT5* vjerojatno je u učinkovitosti odabranih molekula sgRNA. U jednom istraživanju utvrđeno je da molekule sgRNA imaju optimalnu učinkovitost ako sadrže preko 50% citozina (C) ili gvanina (G) te ako se G nalazi u blizini sekvence PAM (Gagnon i sur., 2014). Odabirom molekula sgRNA koje imaju veći udio nukleotida CG za gen *MGAT5*, potencijalno bi se mogla povećati učinkovitost ovog sustava, ali i molekulama sgRNA odabranim u ovom radu uspješno je povećana ekspresija gena *MGAT4A* i *MGAT5* na razini transkripata.

Glikoziltransferaza GnT-4a prisutna je u mnogim tkivima, ali najviše u gušterači gdje glikozilira transportere GLUT kroz koje glukoza ulazi u stanicu. Dokazano je da nepravilna ekspresija gena *MGAT4A* u čovjeka može imati negativne posljedice na organizam te se povezuje s nekoliko patoloških stanja (Takamatsu i sur., 1999; Ide i sur., 2006). Usporedbom tkiva gušterače zdravih ljudi i onih koji imaju rak gušterače, uočena je povećana količina GnT-4b u tumorskim tkivima, dok je u zdravim tkivima više bila eksprimirana glikoziltransferaza GnT-4a. Dodatkom analoga nukleotida koji se ne mogu metilirati, u tumorskim stanicama gušterače s vremenom se povećala ekspresija glikoziltransferaze GnT-4a, što je ukazalo na to da se u tumoru epigenetičkim mehanizmom metilacije utišao gen *MGAT4A* (Ide i sur., 2006). Iako je aktivacija gena *MGAT4A* i *MGAT5* sustavom VPR-dCas9 u stanicama 1.1B4 dokazana na razini transkripcije, bilo je potrebno provjeriti je li u stanicama došlo i do promjene količine proteina kodiranih ovim genima s obzirom da je poznato da se svi transkripti ne translatiraju u proteine. Metodom Western blot ispitana je količina proteina GnT-4a i GnT-V u stanicama u kojima se VPR-dCas9 navodio odabranim sgRNA i u onima gdje je korištena „non-target“ sgRNA. Pošto se na membranu nisu nanijele identične količine proteina, protein β-aktin uzet je kao referentna kontrola. Uz pretpostavku da je β-aktin eksprimiran u svim uzorcima u jednakoj količini, pomoću njega se

mogla normalizirati količina proteina GnT-4a i GnT-V i usporediti između skupina uzoraka. Utvrđeno je da je u stanicama transfeciranima plazmidima N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A _Puro_mRuby3 došlo do porasta količine glikoziltransferaza GnT-4a u prosjeku za 2,44 puta i GnT-V za 4,04 puta u usporedbi sa stanicama transfeciranima plazmidima N-VPR_dSpCas9_NT_Puro_mRuby3, no ta razlika nije statistički značajna. Na razini proteina, sustav VPR-dCas9 imao je veći učinak na povećanje ekspresije gena *MGAT5* u usporedbi sa *MGAT4A* što je neobično obzirom da je analiza RNA pokazala veći učinak na gen *MGAT4A*. Porast količine proteina GnT-4a i GnT-V bio je manji od porasta količine transkripata gena *MGAT4A* i *MGAT5*. Jedan od razloga tome može biti nepravilna posttranskripcijska modifikacija mRNA koja sprečava translaciju u protein. Pošto je u stanicama prisutno puno više transkripata nego inače, moguće je da nema dovoljno enzima potrebnih za njihovu modifikaciju, zbog čega se one ne prevode u proteine. Također je moguće da GnT-4a i GnT-V imaju drugačiji poluživot u *in vitro* uvjetima te bi za precizno određivanje promjene njihove količine, uz stopu translacije mRNA u protein, bilo potrebno uzeti u obzir stopu degradacije proteina (Greenbaum i sur., 2003). U ovom istraživanju, za analizu membrane Western blotom, bilo je potrebno podesiti kontraste slika zbog slabo vidljivih vrpca za proteine GnT-4a i GnT-V. Bilo bi poželjno ponoviti Western blot s većom količinom ukupnih proteina koji se prenose na membranu, kako bi se sa većom sigurnošću usporedila količina željenih proteina.

Nepravilna glikozilacija proteina GLUT utječe na njihovu funkciju i položaj u stanici. Ukoliko su transporteri GLUT nepravilno glikozilirani, ne obavljaju svoju ulogu i narušava se mehanizam GSIS, što vodi razvitku dijabetesa tipa 2 (Ohtsubo i sur., 2005). Kod miševa je dokazano da prehrana bogata masnim kiselinama dovodi do ovog fenomena, tako što dolazi do epigenetičkog utišavanja transkripcijskog faktora koji regulira ekspresiju gena *MGAT4A*. Zbog toga se ne proizvodi dovoljno glikoziltransferaze GnT-4a, transporteri se ne mogu pravilno glikozilirati te se brže šalju u lizosome i endosome na razgradnju. Jedan od mehanizama nastanka dijabetesa tipa 2 (od kojeg ljudi oboljevaju zbog nezdrave prehrane) također je povezan s nedostatkom GnT-4a i nepravilnom glikozilacijom transportera GLUT, ali točni molekularni događaji koji do toga vode nisu poznati (Ohtsubo i sur., 2011). Ovim istraživanjem željelo se utvrditi na koji način prekomjerna ekspresija proteina GnT-4a i GnT-V utječe na položaj transportera GLUT1. Imunofluorescencijskim bojanjem utvrđena je njihova količina i lokalizacija u stanicama 1.1B4. Većina signala proteina GLUT1 nalazila se u staničnim membranama, ali

difuzan signal je bio vidljiv i unutar citoplazme. Razlog tome može biti taj što su stanice vizualizirane na epifluorescencijskom, a ne konfokalnom mikroskopu. I u stanicama transfeciranima plazmidom N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 i onima transfeciranima kontrolnim plazmidom NT uočeno je da postoje razlike u intenzitetu fluorescencije antitijela za protein GLUT1 između stanica. Analizom 20 stanica u kojima su ciljani geni *MGAT4A* i *MGAT5* i 20 stanica ciljanih kontrolnim plazmidom NT, utvrđeno je da su stanice u kojima su bili ciljani geni fluorescirale 2 puta jače, što ukazuje da se u njima nalazilo više proteina GLUT1. Razlog povećanja količine transportera nije se mogao direktno pripisati povećanoj količini glikoziltransferaza GnT-4a i GnT-V, ali moglo se pretpostaviti da je zbog veće količine enzima više transportera bilo pravilno modificirano i lokalizirano u membrane.

Iako nedostatak glikoziltransferaze GnT-4a korelira s povećanom količinom unutarstaničnih transportera GLUT2 u miševa i njihovom akumulacijom u endosomima i lizosomima (Ohtsubo i sur., 2005, 2011), nije bilo poznato na koji način će povećana ekspresija glikoziltransferaza GnT-4a i GnT-V utjecati na položaj proteina GLUT1. Stoga je provedena simultana imunofluorescencija za detekciju položaja transportera GLUT1 i proteina LAMP-1 lizosoma koja je omogućila analizu kolokalizacije proteina GLUT1 i lizosoma. Kolokalizacija signala obaju antitijela je uočena u stanicama u kojima je ekspresija gena *MGAT4A* i *MGAT5* ciljano povećana. Te su stanice u prosjeku fluorescirale jače od onih gdje kolokalizacija nije uočena. U staničnoj liniji 1.1B4 lizosomi su bili smješteni u gustim skupinama u blizini jezgre te ih je bilo vrlo teško razlučiti kao pojedinačne strukture. Stoga se ne može sa sigurnošću utvrditi je li došlo do kolokalizacije signala obzirom da se transporteri GLUT1 nalaze u lizosomima ili do poklapanja signala dolazi zbog toga što stanice fluoresciraju cijelom površinom. Za detaljnu analizu kolokalizacije bilo bi potrebno mikroskopirati stanice konfokalnim mikroskopom koji bi omogućio bolje razlučivanje struktura unutar stanice.

U ovom istraživanju uspješno je povećana ekspresija gena *MGAT4A* i *MGAT5* u stanicama 1.1B4 pomoću molekularnog alata VPR-dCas9, a na razini proteina primijećen je blagi porast količine glikoziltransferaza GnT-4a i GnT-V. U nekim je stanicama, uz porast transportera GLUT1 u membranama, uočena potencijalna kolokalizacija dijela transportera s lizosomima. Pošto je nedostatak GnT-4a povezan sa smanjenom glikozilacijom transportera GLUT i utječe na njihov poluživot, moguće je da je višak glikoziltransferaza GnT-4a pojačano glikozilirao proteine GLUT1 i tako promijenio njihovu stabilnost. Kolokalizacija signala transportera GLUT1 i lizosoma,

moguća je posljedica pretjerane glikozilacije zbog koje su se transporteri usmjerili na razgradnju. Kako bi se to istražilo, trebao bi se analizirati glikanski profil proteina GLUT1 u manipuliranim stanicama 1.1B4. Još jedno objašnjenje za kolokalizaciju je prevelika količina transportera u stanici. Stanice u kojima je uočena ta pojava, cijelom su površinom jako fluorescirale, što znači da se u njihovim membranama nalazila velika količina transportera i višak se možda usmjerio na razgradnju. Bez obzira na navedeno, nije objašnjivo ukupno povećanje transportera GLUT1 u stanicama gdje su ciljani geni *MGAT4A* i *MGAT5*. Kako bi se to objasnilo, potrebne su daljnje analize ekspresije gena *SLA2A1* koji kodira transporter GLUT1. Istražilo bi se dolazi li do promjene na razini transkripcije gena *SLC2A1* u stanicama sa povećanom ekspresijom gena *MGAT4A* i *MGAT5* ili na razini proizvodnje proteina GLUT1. Ukoliko bi razina transkripata bila jednaka, to bi značilo da povećana ekspresija enzima GnT-4a i GnT-V uzrokuje povećanje količine transportera GLUT1 na posttranslacijskoj razini jer nije uočeno da one imaju ulogu na translacijskoj razini. Također, to bi značilo da se u stanicama s normalnom ekspresijom GnT-4a i GnT-V inicijalno proizvodi više proteina GLUT1 nego što ih završi u membranama. Povećanjem količine glikoziltransferaza više bi se transportera GLUT pravilno modificiralo i lokaliziralo u membrane.

6. ZAKLJUČAK

Uspješno je konstruiran plazmidni vektor N-VPR_dSpCas9_MGAT5_MGAT4A_Puro_mRuby3 za ekspresiju modularnog sustava CRISPR/dCas9 pomoću metode Golden Gate te su odabrane molekule sgRNA za navođenje ovog sustava do gena *MGAT4A* i *MGAT5* bile efektivne. Konstruirani je plazmid uspješno umnožen u kompetentnom soju bakterija *Escherichia coli* te su njime transfecirane stanice 1.1B4. Promjena u razini ekspresije gena *MGAT4A* i *MGAT5* potvrđena je reverznom transkripcijom i lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (RT-qPCR) te je promjena u količini proteina GnT-4a i GnT-V potvrđena metodom Western blot, iako nije statistički značajna. Imunofluorescencijskim bojanjem potvrđen je porast u ukupnoj količini transportera GLUT1 nakon intervencije sustava VPR-dCas9 te je uočena potencijalna kolokalizacija dijela transportera sa lizosomima.

7. LITERATURA

Aebi M. (2013): N-linked protein glycosylation in the ER. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. **1833**: 2430–2437.

Beerli R.R., Segal D.J., Dreier B., Barbas C.F. (1998): Toward controlling gene expression at will: Specific regulation of the erbB - 2 / HER - 2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. **95**: 14628–14633.

Berger C., Zdzieblo D. (2020): Glucose transporters in pancreatic islets. Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. **472**: 1249–1272.

Berger S.L. (2002): Histone modifications in transcriptional regulation. Curr. Opin. Genet. Dev. **12:** 142–148.

Boyd A.E. (1992): The role of ion channels in insulin secretion. J. Cell. Biochem. **48**: 234–241.

Breitling J., Aebi M. (2013): N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. **5**:a013359 .

Campbell J.E., Newgard C.B. (2021): Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **22**: 142–158.

Chavez A., Scheiman J., Vora S., Pruitt B.W., Tuttle M., P R Iyer E., Lin S., Kiani S., Guzman C.D., Wiegand D.J., Ter-Ovanesyan D., Braff J.L., Davidsohn N., Housden B.E., Perrimon N., Weiss R., Aach J., Collins J.J., Church G.M. (2015): Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. Nat. Methods **12**: 326–328.

Chen M., Qi L.S. (2017): Repurposing CRISPR System for Transcriptional Activation. 147–157.

Chylinski K., Rhun A. Le, Charpentier E. (2013): The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. RNA Biol. **10**: 726–737.

Coustan D.R. (2013): Gestational diabetes mellitus. Clin. Chem. **59**: 1310–1321.

DeFronzo R.A., Ferrannini E., Groop L., Henry R.R., Herman W.H., Holst J.J., Hu F.B., Kahn C.R., Raz I., Shulman G.I., Simonson D.C., Testa M.A., Weiss R. (2015): Type 2 diabetes mellitus. Nat. Rev. Dis. Prim. **1**: 1–23.

Dennis J.W., Laferté S., Waghorne C., Breitman M.L., Kerbel R.S. (1987): β1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. Science **236**: 582-585.582–585.

Dennis J.W., Pawling J., Cheung P., Partridge E., Demetriou M. (2002): UDP- N -acetylglucosamine : a -6- D -mannoside h 1 , 6 N -acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) deficient mice. Biochim. Biophys. Acta **1573**: 414–422.

Erard N., Knott S.R.V., Hannon G.J. (2017): A CRISPR Resource for Individual, Combinatorial, or Multiplexed Gene Knockout. Mol. Cell **67**: 348-354.e4.

Espada J., Esteller M. (2007): Epigenetic control of nuclear architecture. Cell. Mol. Life Sci. **64**: 449–457.

Fridlyand L.E., Jacobson D.A., Philipson L.H. (2013): Ion channels and regulation of insulin secretion in human β-cells :A computational systems analysis. Islets **5**: 1–15.

Gagnon J.A., Valen E., Thyme S.B., Huang P., Ahkmetova L., Pauli A., Montague T.G., Zimmerman S., Richter C., Schier A.F. (2014): Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. PLoS One **9**: 5–12.

Gornik O., Pavić T., Lauc G. (2012): Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins - Implications on evolution and disease. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. **1820**: 1318–1326.

Granovsky M., Fata J., Pawling J., Muller W.J., Khokha R., Dennis J.W. (2000): Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. Nat. Med. **6**: 306–312.

Greenbaum D., Colangelo C., Williams K., Gerstein M. (2003): Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. Genome Biol. **4**: 117.

Henikoff S., Smith M.M. (2015): Histone variants and epigenetics. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. **7**: 1–26.

Hirata T., Nagae M., Osuka R.F., Mishra S.K., Yamada M., Kizuka Y. (2020): Recognition of glycan and protein substrates by N-acetylglucosaminyltransferase-V. Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. **1864**: 129726.

Jaenisch R., Bird A. (2003): Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat. Genet. **33**: 245–254.

Jambhekar A., Dhall A., Shi Y. (2019): Roles and regulation of histone methylation in animal development. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **20**: 625–641.

Jenuwein T., Allis C.D. (2001): Translating the histone code. Science **293**: 1074–1080.

Josipović G., Tadić V., Klasić M., Zanki V., Bečeheli I., Chung F., Ghantous A., Keser T.,

Madunić J., Bošković M., Lauc G., Herceg Z., Vojta A., Zoldoš V. (2019): Antagonistic and synergistic epigenetic modulation using orthologous CRISPR/dCas9-based modular system. Nucleic Acids Res. **47**: 9637–9657.

Koivunen P., Laukka T. (2018): The TET enzymes. Cell. Mol. Life Sci. **75**: 1339–1348.

Krištić J., Lauc G. (2017): Ubiquitous Importance of Protein Glycosylation. Methods Mol. Biol. **1503**: 1-12.

Li E., Beard C., Jaenisch R. (1993): Role for DNA methylation in genomic imprinting. Nature **366**: 362–365.

Li W., Huang E., Gao S. (2017): Type 1 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairments: A Systematic Review. J. Alzheimer's Dis. **57**: 29–36.

Lis H., Sharon N. (1993): Protein glycosylation: Structural and functional aspects. Eur. J. Biochem. **218**: 1–27.

Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. Methods **25**: 402–408.

Maeder M.L., Linder S.J., Cascio V.M., Fu Y., Ho Q.H., Joung J.K. (2013): CRISPR RNA–guided activation of endogenous human genes. Nat. Methods **10**: 977–979.

Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Wolf Y.I., Yakunin A.F., Oost J. Van Der, Koonin E. V. (2011): Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nat. Rev. Microbiol. **9**: 467–477.

Mgata I., Nagae M., Hirata T., Tateno H., Mishra S.K., Manabe N., Osada N., Tokoro Y., Yamaguchi Y., Doerksen R.J., Shimizu T., Kizuka Y. (2022): Discovery of a lectin domain that regulates enzyme activity in mouse N-acetylglucosaminyltransferase-IVa (MGAT4A). Commun. Biol. **5**: 695.

Moore L.D., Le T., Fan G. (2013): DNA methylation and its basic function. Neuropsychopharmacology **38**: 23–38.

Moremen K.W., Tiemeyer M., Nairn A. V. (2012): Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **13**: 448–462.

Oguri S., Yoshida A., Minowa M.T., Takeuchi M. (2006): Kinetic properties and substrate specificities of two recombinant human N-acetylglucosaminyltransferase-IV isozymes. Glycoconj. J. **23**: 473–480.

Ohtsubo K., Chen M.Z., Olefsky J.M., Marth J.D. (2011): Pathway to diabetes through

attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport. Nat. Med. **17**: 1067–1076.

Ohtsubo K., Takamatsu S., Minowa M.T., Yoshida A., Takeuchi M., Marth J.D. (2005): Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. Cell **123**: 1307–1321.

Peschansky V.J., Wahlestedt C. (2014): Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. Epigenetics **9**: 3–12.

Razin A. (1998): CpG methylation, chromatin structure and gene silencing - A three-way connection. EMBO J. **17**: 4905–4908.

Rudman N., Gornik O., Lauc G. (2019): Altered N-glycosylation profiles as potential biomarkers and drug targets in diabetes. FEBS Lett. **593**: 1598–1615.

Saito T., Miyoshi E., Sasai K., Nakano N., Eguchi H., Honke K., Taniguchi N. (2002): A secreted type of β1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) induces tumor angiogenesis without mediation of glycosylation. A novel function of GnT-V distinct from the original glycosyltransferase activity. J. Biol. Chem. **277**: 17002–17008.

Schjoldager K.T., Narimatsu Y., Joshi H.J., Clausen H. (2020): Global view of human protein glycosylation pathways and functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **21**: 729–749.

Schmitz M.L., Baeuerle P.A. (1991): The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-xB. EMBO J. **10**: 3805–3817.

Singal R., Ginder G.D. (1999): DNA Methylation. Blood **93**: 4059–4070.

Struhl K. (1998): Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. Genes Dev. **12**: 599–606.

Suganuma T., Workman J.L. (2011): Signals and combinatorial functions of histone modifications. Annu. Rev. Biochem. **80**: 473–499.

Tadić V., Bočkor L., Vojta A., Dobrinić P., Korać P., Zoldoš V., Julg B., Klasić M. (2016): Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. Nucleic Acids Res. **44**: 5615-5628.

Tadić V., Josipović G., Zoldoš V., Vojta A. (2019): CRISPR/Cas9-based epigenome editing: An overview of dCas9-based tools with special emphasis on off-target activity. Methods **164–165**: 109–119.

Takamatsu S., Oguri S., Minowa M.T., Yoshida A., Nakamura K., Takeuchi M., Kobata A.

(1999): Unusually high expression of N-acetylglucosaminyltransferase-IVa in human choriocarcinoma cell lines: A possible enzymatic basis of the formation of abnormal biantennary sugar chain. Cancer Res. **59**: 3949–3953.

Tate P.H., Bird A.P. (1993): Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. Curr. Opin. Genet. Dev. **3**: 226–231.

Thakore P.I., D'Ippolito A.M., Song L., Safi A., Shivakumar N.K., Kabadi A.M., Reddy T.E., Crawford G.E., Gersbach C.A. (2015): Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. Nat. Methods **12**: 1143–1149.

Thanabalasingham G., Owen K.R. (2011): Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY). BMJ **343**: 1–9.

Thompson P.R., Kurooka H., Nakatani Y., Cole P.A. (2001): Transcriptional coactivator protein p300. Kinetic characterization of its histone acetyltransferase activity. J. Biol. Chem. **276**: 33721–33729.

Thorens B. (2015): GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. Diabetologia **58**: 221–232.

Triezenberg S.J., Lamarco K.L., Mcknight S.L. (1988): Evidence of DNA : protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. Genes Dev. **2**: 730–742.

Tschaharganeh D.F., Lowe S.W., Garippa R.J., Livshits G. (2016): Using CRISPR/Cas to study gene function and model disease in vivo. FEBS J. **283**: 3194–3203.

Vignali M., Hassan A.H., Neely K.E., Workman J.L. (2000): ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Complexes. Mol. Cell Biol. **20**: 1899–1910.

Wan J., Oliver V.F., Wang G., Zhu H., Zack D.J., Merbs S.L., Qian J. (2015): Characterization of tissue-specific differential DNA methylation suggests distinct modes of positive and negative gene expression regulation. BMC Genomics **16**: 1–11.

Winter W.E. (2003): Chapter 4 MA TURITY -ONSET DIABETES OF THE YOUNG : .

Yin Y., Morgunova E., Jolma A., Kaasinen E., Sahu B., Khund-Sayeed S., Das P.K., Kivioja T., Dave K., Zhong F., Nitta K.R., Taipale M., Popov A., Ginno P.A., Domcke S., Yan J., Schübeler D., Vinson C., Taipale J. (2017): Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. Science **356**: 502.

Zhang Y. (2003): Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. Genes Dev. **17**: 2733–2740.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 05. ožujka 1998. godine u Zagrebu gdje sam odrasla i završila osnovnu školu te opću gimnaziju. Godine 2016. upisala sam preddiplomski sveučilišni studij *Biologija* na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta te sam 2019. godine volontirala u utočištu za divlje životinje „Kids Saving the Rainforest“ na Kostarici i počela se više zanimati za molekularnu biologiju. Stoga sam 2020. godine upisala diplomski sveučilišni studij *Molekularna biologija*. Sudjelovala sam 2019. i 2021. u znanstveno-popularnoj manifestaciji „Dan i noć na PMF-u“ te sam odradila praksu u Laboratoriju za epigenetiku gdje sam stekla mnoge vještine koje su me pripremile za samostalan rad.