

Povezanost metilacije gena HNF1A i glikozilacije proteina u adenokarcinomu gušterače i dijabetesu

Bečeheli, Ivona

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:494683>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ivona Bečeheli

**POVEZANOST METILACIJE GENA
HNF1A I GLIKOZILACIJE PROTEINA U
ADENOKARCINOMU GUŠTERAČE I
DIJABETESU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ivona Bečeheli

**THE ASSOCIATION OF *HNF1A* GENE
METHYLATION WITH PROTEIN
GLYCOSYLATION IN PANCREATIC
ADENOCARCINOMA AND DIABETES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018.

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

ZAHVALE

Hvala mentorici, prof. Zoldoš, prof. Laucu, kolegama i obitelji na pomoći i podršci.

**POVEZANOST METILACIJE GENA *HNF1A* I GLIKOZILACIJE PROTEINA U
ADENOKARCINOMU GUŠTERAČE I DIJABETESU**

IVONA BEČEHELI

Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Protein HNF1A je transkripcijski faktor mnogih glikoziltransferaza, a njegova poremećena ekspresija povezana je s promijenjenom glikozilacijom proteina te pojavom dukalnog adenokarcinoma gušterače i dijabetesa. Potencijalnu regulaciju ekspresije gena *HNF1A* putem CpG-metilacije potvrdila sam upotrebom CRISPR/dCas9-TET1 molekularnog alata u staničnom modelu gdje sam ciljanom demetilacijom gena *HNF1A* povećala njegovu ekspresiju. Za utvrđivanje povezanosti metilacije gena *HNF1A* i glikozilacije proteina te njihove uloge u patogenezi, analizirala sam CpG-metilaciju i ekspresiju gena *HNF1A* te glikozilaciju proteina specifičnih stanica tkiva gušterače pacijenata oboljelih od adenokarcinoma gušterače i dijabetesa. CpG-metilaciju analizirala sam pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije, ekspresiju gena metodom qRT-PCR, a glikozilaciju proteina metodom HILIC-UPLC. Pokazala sam kako CpG-metilacija gena *HNF1A* regulira njegovu ekspresiju i da je povišena u adenokarcinomu gušterače i dijabetesu te da je povezana s glikozilacijom proteina što upućuje na mehanizam patogeneze koji bi mogao biti fokus terapije ovih bolesti.

(136 stranica, 38 slika, 20 tablica, 221 literaturni navod, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: gen *HNF1A*, metilacija DNA, glikozilacija, dijabetes, adenokarcinom gušterače

Mentor: Vlatka Zoldoš, prof. dr.sc.

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

Gordan Lauc, prof. dr. sc.

Slavko Gašparov, izv. prof. dr. sc.

**THE ASSOCIATION OF *HNF1A* GENE METHYLATION WITH PROTEIN
GLYCOSYLATION IN PANCREATIC ADENOCARCINOMA AND DIABETES**

IVONA BEČEHELI

Faculty of Science, University of Zagreb

HNF1A protein is a transcription factor of many glycosyltransferases and its expression is linked to protein glycosylation as well as occurrence of pancreatic adenocarcinoma and diabetes. Expression of *HNF1A* gene is most likely epigenetically regulated via CpG methylation and to confirm this, I used CRISPR/dCas9-TET1 epigenetic tool for targeted demethylation in cellular model. To determine link between *HNF1A* gene methylation and protein glycosylation, I have analysed *HNF1A* gene methylation and expression as well as protein glycosylation in specific pancreatic cells obtained from patients diagnosed with pancreatic adenocarcinoma and diabetes. For DNA methylation analysis I used method of pyrosequencing after bisulfite conversion, for gene expression analysis qRT-PCR method and for protein glycosylation analysis HILIC-UPLC method. *HNF1A* gene methylation, elevated in pancreatic adenocarcinoma and diabetes, regulates its expression and it is linked to protein glycosylation which points to possible target mechanism of pathogenesis for potential therapy of these diseases.

(136 pages, 38 figures, 20 tables, 221 references, original in croatian)

Keywords: *HNF1A* gene, DNA methylation, glycosylation, diabetes, pancreatic adenocarcinoma

Supervisor: Vlatka Zoldoš, Prof.

Reviewers: Petra Korać, Assoc. Prof.
Gordan Lauc, Prof.
Slavko Gašparov, Assoc. Prof.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1 DUKTALNI ADENOKARCINOM GUŠTERAČE	5
2.2 DIJABETES	8
2.2.1 PODTIP DIJABETESA MODY3	10
2.3 TRANSKRIPCIJSKI FAKTOR HNF1A	13
2.3.1. ULOGA TRANSKRIPCIJSKOG FAKTORA HNF1A U DUKTALNOM ADENOKARCINOMU GUŠTERAČE	15
2.3.2 ULOGA TRANSKRIPCIJSKOG FAKTORA HNF1A U DIJABETESU	17
2.3.3. POVEZANOST DUKTALNOG ADENOKARCINOMA GUŠTERAČE I DIJABETESA PUTEM TRANSKRIPCIJSKOG FAKTORA HNF1A	19
2.4 EPIGENETIČKE MODIFIKACIJE	20
2.4.1 METILACIJA DNA	21
2.4.1.1 Demetilacija DNA	23
2.4.1.2 Uloga metilacije DNA u regulaciji ekspresije gena	24
2.4.1.3 Metilacija DNA u tumoru	25
2.4.1.3.1 Metilacija DNA u duktalnom adenokarcinomu gušterače	26
2.4.1.4 Metilacija DNA u dijabetesu	27
2.4.1.4.1 Metilacija DNA u podtipu dijabetesa MODY3	30
2.4.2 OSTALE EPIGENETIČKE MODIFIKACIJE I MEHANIZMI	31
2.4.2.1 Hidroksimetilacija	31
2.4.2.2 Histonske modifikacije	31
2.4.2.3 Kromatin remodelirajući kompleksi	32
2.4.2.4 Pozicija nukleosoma	32
2.4.2.5 Nekodirajuće molekule RNA	33
2.5 CILJANA MODIFIKACIJA EPIGENOMA UPOTREBOM CRISPR/CAS9 MOLEKULARNOG ALATA	34
2.6 GLIKOZILACIJA PROTEINA	36
2.6.1 FUNKCIJA I RAZNOLIKOST GLIKANA	37
2.6.2 N-GLIKANI	40

2.6.2.1 Sinteza N-glikana	40
2.6.3 GLIKOZILACIJA U TUMORU	42
2.6.3.1 Glikozilacija u duktalnom adenokarcinomu gušterače	42
2.6.4 GLIKOZILACIJA U DIJABETESU	43
2.6.4.1 Glikozilacija u podtipu dijabetesa MODY3	43
2.7 LASERSKA MIKRODISEKCIJA	46
3. MATERIJALI I METODE	49
3.1. UZORCI PACIJENATA	50
3.1.1. OPIS UZORAKA	53
3.2 STANIČNE LINIJE	54
3.2.1 HEK 293	54
3.2.2 1.1B4	54
3.3 METODE	55
3.3.1 TRETMAN TKIVA UKLOPLJENOG U PARAFINSKI BLOK	55
3.3.1.1 UV-tretman PEN-membrane za mikrodisekciju	55
3.3.1.2 Rezanje parafinskog bloka	55
3.3.1.3 Bojanje preparata	55
3.3.1.4 Laserska mikrodisekcija	56
3.3.2 STANIČNE LINIJE HEK 293 I 1.1B4	58
3.3.2.1 Konstrukcija molekularnog alata za demetilaciju	58
3.3.2.2 Uzgoj stanica u kulturi	59
3.3.2.3 Transfekcija	59
3.3.2.4 Selekcija	60
3.3.3 ANALIZA METILACIJE DNA	61
3.3.3.1 Izolacija DNA	61
3.3.3.2 Bisulfitna konverzija	61
3.3.3.3 Lančana reakcija polimerazom	62
3.3.3.4 Pirosekvenciranje	63
3.3.4 ANALIZA EKSPRESIJE	64
3.3.4.1 Izolacija RNA	64
3.3.4.2 Reverzna transkripcija	64
3.3.4.3 Lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu	65
3.3.5 ANALIZA GLIKOZILACIJE	67

3.3.5.1 Izolacija proteina	67
3.3.5.2 Denaturacija i deglikozilacija	68
3.3.5.3 Obilježavanje glikana fluorescentnom bojom	68
3.3.5.4 Pročišćavanje glikana	68
3.3.5.5 Tekućinska kromatografija	68
3.3.6 OBRADA PODATAKA I STATISTIČKA ANALIZA	70
4. REZULTATI	71
4.1 METILACIJA DNA U PACIJENATA OBOLJELIH OD ADENOKARCINOMA GUŠTERAČE	72
4.1.1 METILACIJA PRVOG EKSONA GENA <i>HNF1A</i>	75
4.1.1.1 Usporedba različitih tipova tkiva istog pacijenta po statusu metilacije fragmenta H	77
4.1.1.2 Usporedba istih tipova tkiva između različitih skupina pacijenata po statusu metilacije fragmenta H	78
4.1.2 METILACIJA REGIJE LINE-1	79
4.2 EKSPRESIJA GENA <i>HNF1A</i> U SKUPINAMA PACIJENATA	84
4.2.1 EKSPRESIJA GENA <i>HNF1A</i> U NETUMORSKOM I TUMORSKOM TKIVU OBJE SKUPINE PACIJENATA	85
4.2.2 KORELACIJA EKSPRESIJE I METILACIJE GENA <i>HNF1A</i> U NETUMORSKOM I TUMORSKOM TKIVU OBJE SKUPINE PACIJENATA	86
4.2.3 KORELACIJA EKSPRESIJE I METILACIJE GENA <i>HNF1A</i> U LANGERHANSOVIM OTOCIMA GUŠTERAČE U PACIJENATA S ADENOKARCINOMOM GUŠTERAČE I DIJABETESOM	88
4.3 CILJANA DEMETILACIJA FRAGMENTA H U GENU <i>HNF1A</i> U STANIČNIM LINIJAMA 1.1B4 I HEK 293	89
4.3.1 ANALIZA NESPECIFIČNE DEMETILACIJE	91
4.3.2 KORELACIJA EKSPRESIJE I METILACIJE GENA <i>HNF1A</i> U STANICAMA LINIJE HEK 293 TRANSFECIRANIMA dCas9-TET1 SUSTAVOM	92
4.4 GLIKOZILACIJA PROTEINA GUŠTERAČE	94
5. RASPRAVA	101
6. ZAKLJUČCI	114

7. LITERATURA

116

8. ŽIVOTOPIS

133

1. UVOD

Sve bolesti uzrokovane poremećajem istog gena imaju neke sličnosti, ali u patologiji svake kompleksne bolesti sudjeluje više faktora po kojima se ona razlikuje od ostalih.

Iako su duktalni adenokarcinom gušterače i dijabetes tipa II suštinski različite bolesti, ipak dijele neke zajedničke karakteristike koje nisu zanemarive jer se odnose na poremećaje mehanizama veoma bitnih za funkciju gušterače. U središtu jednog od njih je gen *HNF1A*, tkivno specifičan transkripcijski faktor, koji, osim što kao gen „homeobox“ regulira pravilnu diferencijaciju, rast i razvoj stanica gušterače, također ima i važnu ulogu u glikozilaciji proteina te, posredno, u odgovoru stanice na vanjske podražaje poput glukozom stimuliranog lučenja inzulina (od engl. *Glucose Stimulated Insulin Secretion*, GSIS). Zbog uloge u regulaciji staničnog ciklusa, apoptoze i općenito transkripcije gena uključenih u tumorigenezu (npr. fibroblastni faktori rasta), deficijencija gena *HNF1A* dovodi do razvoja bolesti, poput duktalnog adenokarcinoma gušterače, u kojima su navedeni procesi teško poremećeni. Nedavna istraživanja čak nazivaju gen *HNF1A* genom koji kodira tumorski supresor jer je njegova ekspresija dokazano poremećena u duktalnom adenokarcinomu gušterače^{1,2} pri čemu isto potvrđuju i cjelogenomske studije povezanosti (od engl. *Genome Wide Association Studies*, GWAS)³.

Osim fibroblastnih faktora rasta, gen *HNF1A* regulira transkripciju i drugih gena od kojih su neki povezani s procesom glikozilacije proteina (kodiraju za razne glikoziltransferaze, glikozidaze, ali i ionske kanale te transportne proteine) i također mogu sudjelovati u onkogenim procesima. Međutim, mnogo je zanimljivija njihova uloga u glikozilaciji proteina poput transporterata GLUT2, ključnog u odgovoru stanice na glukozu (lučenjem inzulina) pri čemu poremećaj navedenog staničnog odgovora za posljedicu ima pojavu dijabetesa tipa II⁴.

Glikozilaciju proteina i ekspresiju gena *HNF1A* s dijabetesom tipa II povezalo je istraživanje u kojem je gen *HNF1A* prepoznat kao glavni regulator fukozilacije⁵, a u podtipu dijabetesa MODY3 dokazana je i povezanost polimorfizama u genu *HNF1A* s udjelom razgranatih glikana u ukupnom glikomu krvne plazme⁶. Zaključno, u cjelogenomskoj studiji povezanosti provedenoj na 800 ljudi utvrđena je povezanost CpG-metilacije gena *HNF1A* s podtipom dijabetesa MODY3 u kojem je poremećena N-glikozilacija proteina⁷.

Prema navedenim istraživanjima, procesi koji povezuju duktalni adenokarcinom gušterače i dijabetes tipa II najvjerojatnije uključuju poremećenu ekspresiju gena *HNF1A* i glikozilaciju proteina.

Ekspresija gena *HNF1A* je vjerojatno regulirana epigenetičkim modifikacijama, već zbog same činjenice da je bivalentni gen „homeobox“ za koji je nužna brza aktivacija, odnosno, utišavanje, ali i zbog ranijih istraživanja koja ukazuju na povezanost metilacije prvog eksona

gena *HNF1A* i njegove ekspresije⁷. Za konačan dokaz regulacijske uloge odabrane regije, potrebno je ciljanom promjenom CpG-metilacije te regije promijeniti ekspresiju gena, što je danas moguće putem CRISPR/dCas9 molekularnog alata za demetilaciju⁸, upotrebljenog u ovom istraživanju.

Od svih poznatih epigenetičkih modifikacija, metilacija DNA je do danas najbolje istražena i zna se da regulira transkripcijsku aktivnost genoma. Pravi metilacijski uzorak nužan je za funkcioniranje stanice i njegovo narušavanje može dovesti do nestabilnosti genoma ili aktivacije/utišavanja gena štetnih/potrebnih stanica zbog čega mogu nastati razni poremećaji.

Istraživanje se osniva na hipotezi da je regulacija ekspresije gena *HNF1A* na razini metilacije DNA povezana s glikozilacijom proteina u adenokarcinomu gušterače i dijabetesu.

Opći cilj istraživanja je analiza metilacije potencijalno regulacijske regije gena *HNF1A* i njegove ekspresije u adenokarcinomu gušterače i dijabetesu te povezanost epigenetičke promjene i glikozilacije proteina gušterače u bolesti.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Izdvajanje Langerhansovih otočića, tumorskog i netumorskog tkiva laserskom mikrodisekcijom.
2. Analiza CpG-metilacije gena *HNF1A* u stanicama Langerhansovih otočića i stanicama tumorskog te netumorskog tkiva gušterače.
3. Analiza ekspresije gena *HNF1A* u stanicama Langerhansovih otočića i stanicama tumorskog te netumorskog tkiva gušterače.
4. Analiza N-glikana u stanicama Langerhansovih otočića i stanicama tumorskog te netumorskog tkiva gušterače.
5. Korelacijska analiza podataka o CpG-metilaciji i ekspresiji gena *HNF1A* te glikozilaciji proteina u tri različita tipa stanica gušterače te s obzirom na dijagnozu pacijenata (usporedba pacijenata oboljelih od adenokarcinoma s pacijentima oboljelima od adenokarcinoma i dijabetesa).

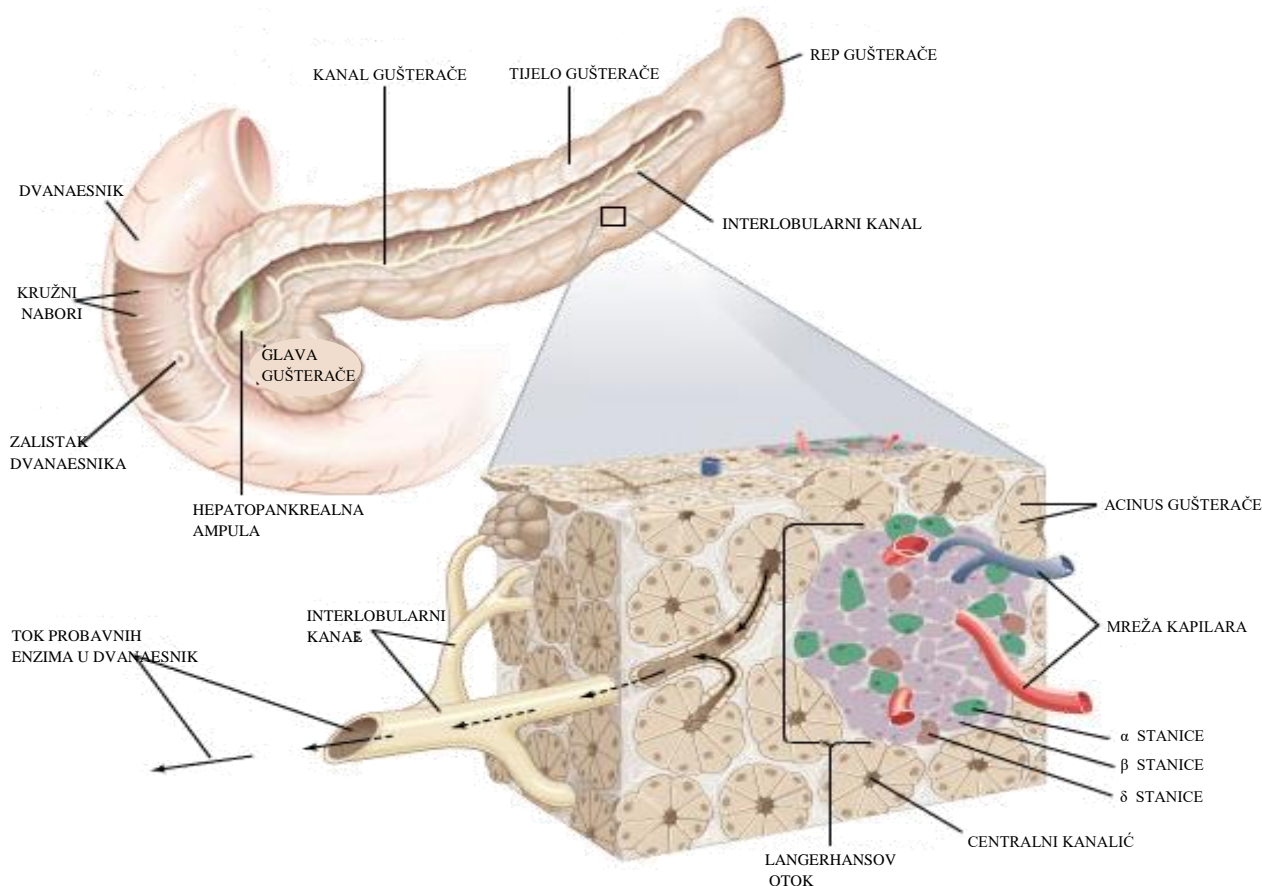
2. LITERATURNI PREGLED

2.1 DUKTALNI ADENOKARCINOM GUŠTERAČE

Duktalni adenokarcinom gušterače je tumor egzokrinog dijela gušterače i najčešći (85%) je oblik svih tumora gušterače.

Nastaje tumorskom transformacijom epitelnih stanica kanalića gušterače u koje se izlučuju probavni enzimi, ali oštećuje i endokrini dio gušterače, odnosno, Langerhansove otoke koje čine:

1. β stanice (približno 70% svih stanica u otoku, izlučuju inzulin)
2. α stanice (oko 20% svih stanica u otoku, izlučuju glukagon)
3. δ stanice (manje od 10% svih stanica u otoku, izlučuju somatostatin)
4. γ stanice (oko 5% svih stanica u otoku, izlučuju polipeptid gušterače)
5. ϵ stanice (manje od 1% svih stanica u otoku, izlučuju grelin)

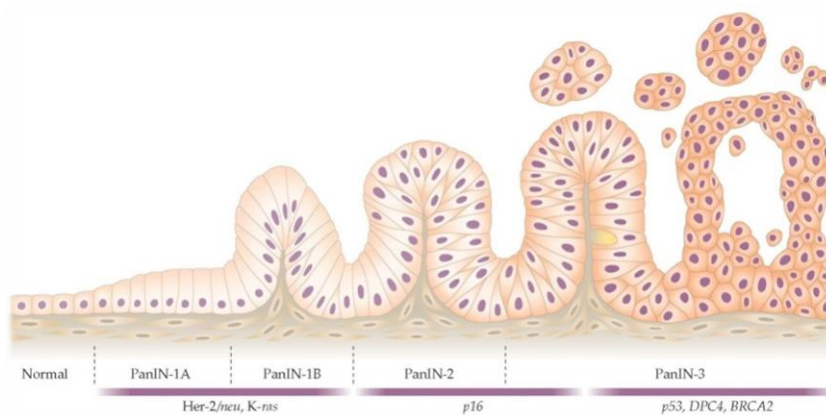


Slika 1. Shematski prikaz gušterače (preuzeto iz *Encyclopaedia Britannica, Inc.*)

Zbog relativno kasne detekcije, ova bolest ima visoku stopu smrtnosti i jedan je od vodećih uzroka smrti u razvijenim zemljama gdje je i učestalost ovog oblika tumora veća.

Rizični faktori za razvoj duktalnog adenokarcinoma gušterače su: dob (uglavnom se javlja nakon 40-e godine), rasa, pušenje, indeks tjelesne mase, način prehrane, kronični pankreatitis, **dijabetes**, a utvrđena je i iznimno jaka nasljedna komponenta⁹.

Simptomi ove bolesti su: abdominalna bol, gubitak težine, astenija, žutica, a ovisе o lokalizaciji tumora (u glavi, tijelu ili repu gušterače) koji nastaje iz specifičnih PanIN prekursorskih lezija (intraduktalne papilarne neoplazme i intraepitelne neoplazije, Slika 2) akumulacijom mutacija DNA¹⁰.



Slika 2. Razvoj tumora iz prekursorskih lezija koje nastaju uzastopnom pojavom mutacija u genima *Her-2/neu*, *KRAS*, *p16*, *p53*, *DPC4*, *BRCA* (preuzeto iz: <http://what-when-how.com/acp-medicine/pancreatic-gastric-and-other-gastrointestinal-cancers-part-3/>)

Osnovne karakteristike ovog tumora su mutacije u genu *KRAS*, rearanžmani i delecije dijelova kromosoma, invadiranje u okolno tkivo, velik metastaski potencijal, izbjegavanje imunog odgovora porastom broja imunosupresivnih stanica u tumorskom tkivu^{11,12}, poremećen stanični metabolizam i ekspresija antioksidanasa¹³ te razvoj dezmozoplazmija i stvaranje guste strome pojačanim deponiranjem kolagena, fibrinogena, elastina i hijaluronske kiseline¹⁴. Posljedica navedenog je nastanak hipovaskularnog mikrookoliša zbog čega je smanjena doprema kisika i nutrijenata što rezultira makropinocitozom serumskih proteina i lipida¹⁵ te promjenom metabolizma tumorske stanice i većim unosom glukoze i glutamina. Umjesto oksidativnom fosforilacijom, energija se dobiva glikolizom, a povećava se sinteza nukleotida te glikozilacija proteina¹⁴. Također, zbog nedostatka nutrijenata, tumorske stanice često recikliraju već postojeće unutarstanične strukture (degradacija agregiranih organela i proteina u lizosomima i ponovno iskorištavanje u biosintezi ili za dobivanje energije¹⁶).

Tumorska stroma zbog svoje iznimno guste strukture onemogućuje dopremu lijekova¹⁷, ali i inhibira rast tumora te povećava njegov metastatski potencijal¹⁸⁻²⁰.

Najčešće korištena metoda liječenja je kirurška resekcija koja se može kombinirati s kemoterapijom ili radioterapijom.

Mutacije u molekuli DNA karakteristične za duktalni adenokarcinom gušterače pojavljuju se u genima *KRAS*, *CDKN2A*, *p53* i *SMAD4*. Ipak, ove mutacije nisu dovoljno dobri biomarkeri te se danas u tu svrhu koriste molekule **CEA** (od engl. *Carcinoembryonic Antigen*) i **CA19-9** (od engl. *Carbohydrate Antigen 19-9*) koji detektira epitope antigena Sialyl Lewis A²¹ čija je ekspresija povećana u duktalnom adenokarcinomu gušterače²². Međutim, navedenim biomarkerima moguće je pratiti samo tijek bolesti pa su istraživanja, uz pronalazak lijeka i odgovarajuće terapije, također usmjerena na identifikaciju dovoljno osjetljivih biomarkera ili specifičnih bioloških karakteristika koje bi mogle poslužiti u utvrđivanju rizika od pojave bolesti te u ranoj identifikaciji.

2.2 DIJABETES

Dijabetes je složena bolest i označava skupinu metaboličkih poremećaja čija je glavna karakteristika dugotrajno **povećana razina glukoze** u krvi. S obzirom na uzrok, postoje 2 glavna tipa dijabetesa, **tip I** i **tip II**, pri čemu dijabetes tipa I (juvenilni ili inzulin-ovisni) nastaje zbog poremećene sinteze inzulina, dok se dijabetes tipa II (adultni ili inzulin-neovisni) javlja zbog rezistencije stanica na inzulin (uz koju se može pojaviti i smanjeno izlučivanje inzulina). Osim po starosti pacijenata, ova dva tipa dijabetesa razlikuju se i po učestalosti (90% svih slučajeva dijabetesa pripada tipu II) i epidemiologiji (tip II je češći u razvijenim zemljama). Ipak, dobna klasifikacija nije uvijek točna jer se i u odraslih može pojaviti dijabetes tipa I poznatiji kao LADA (od engl. *Latent Autoimmune Diabetes of Adults*), a samom dijabetesu često prethodi stanje povišene razine glukoze u krvi (nazivamo ga preddijabetesom) koje može trajati godinama.

Inzulin proizvode i izlučuju **β stanice Langerhansovih otoka** gušterače nakon stimulacije glukozom iz krvi. Glukoza se u β stanicama procesom glikolize razgrađuje do piruvata pri čemu nastaje ATP (i NADH koji se u mitohondriju oksidira do ATP-a). Porast razine ATP-a blokira kalijeve kanale zbog čega dolazi do depolarizacije stanične membrane i otvaranja kalcijevih kanala te unosa kalcija u β stanice gušterače. Ioni kalcija potiču fuziju vezikula koje sadrže inzulin sa staničnom membranom, odnosno, potiču izlučivanje inzulina iz stanice. Inzulin ima ključnu ulogu u održavanju razine glukoze jer inhibira proizvodnju glukoze u jetri, a potiče unos glukoze iz krvi u stanice jetre, mišića i masnog tkiva gdje se ona razgrađuje, odnosno, pohranjuje kao glikogen (u hepatocitima i miocitima) ili trigliceridi (u adipocitima). U dijabetesu je, zbog poremećene inzulinske signalizacije, onemogućen unos glukoze u periferne stanice kao i supresija njezinog oslobađanja iz jetre što rezultira povećanom razinom glukoze u krvi.

Uz glavne tipove, postoji mnoštvo drugih tipova dijabetesa koji se ugrubo mogu podijeliti s obzirom na uzrok: **disfunkcija β stanica uzrokovana mutacijama genomske DNA (MODY)** ili **mitohondrijske DNA, poremećaji u funkciji inzulina** (poremećeno procesiranje proinzulina te mutacije u genu za inzulin ili inzulinske receptore), **poremećaji egzokrinog dijela gušterače, endokrinopatije** ili **steroidni lijekovi**. Osim navedenog, u trudnoći se može pojaviti i **trudnički dijabetes** zbog sinteze hormona posteljice koji se kompetitivno vežu na inzulinske receptore i onemogućuju signalizaciju putem inzulina (stanje slično inzulinskoj rezistenciji). Točan uzrok dijabetesa tipa I nije u potpunosti razjašnjen, ali se pretpostavlja da ima snažnu **genetičku komponentu**^{23,24} pri čemu je za patogenezu ovog

tipa dijabetesa poznata karakteristična **autoimuna** reakcija u kojoj stanice imunološkog sustava ciljano uništavaju β stanice. Autoimunost potiču autoantigeni (proteini koje sintetiziraju same β stanice), ali je mogu potaknuti i proteini iz okoliša (gluten ili kazein iz namirnica te virusni proteini). Glavnim uzrokom dijabetesa tipa II smatra se **stil života** (povećan indeks tjelesne težine, nedostatak tjelesne aktivnosti, stres, prehrambene navike), iako je i u ovom tipu dijabetesa utvrđen značajan **utjecaj gena**²⁵. Rezistencija na inzulin može biti posljedica same **hiperglikemije** jer visoka razina glukoze uzrokuje upalne procese i oštećuje β stanice (glukozna toksičnost) te potiče akumulaciju amilina u gušterači (izlučuje se uz inzulin i sudjeluje u regulaciji razine glukoze²⁶). Također, jedan od rizičnih čimbenika u dijabetesu tipa II je i **dislipidemija** gdje povišena razina slobodnih masnih kiselina u plazmi uzrokuje poremećaj u transportu glukoze i u aktivnosti glikogen sintetaze. Danas se zna da korijeni dijabetesa sežu od **prenatalnog razvoja** i mnoga istraživanja podržavaju teoriju o „štedljivim genima“ rizičnima za pojavu dijabetesa čija se ekspresija mijenja s obzirom na uvjete razvoja u maternici. Simptomi dijabetesa tipa II su: gubitak težine, povećana žeđ i glad, često mokrenje, zamagljen vid, glavobolja, umor, hiperventilacija, miris acetona u zadahu. Ukoliko se dijabetes ne liječi, mogu se pojaviti akutne komplikacije kao što su dijabetička ketoacidoza, koma, smrt ili pak dugoročne komplikacije koje su uglavnom posljedica oštećenja krvnih žila uslijed pojačane glikacije proteina (sinteze AGE produkata, od engl. *Advanced Glycation End products*), sinteze superoksida i aktivacije protein kinaze C (povećava permeabilnost krvnih žila i uzrokuje disfunkciju endotela). Posljedica navedenih procesa je pojava proupalnih i protrombotskih učinaka hiperglikemije i hiperinzulinemije što uzrokuje nastanak **mikrovaskularnih** (retinopatije, nefropatije i neuropatije) te **makrovaskularnih** oboljenja (srčani i moždani udari, bolesti perifernih krvnih žila). Dijagnoza dijabetesa se najčešće postavlja na temelju razine glukoze ili glikoziliranog hemoglobina te testom tolerancije na glukozu. Terapija dijabetesa ovisi o tipu dijabetesa. Kod dijabetesa tipa I to podrazumijeva unos prirodnog ili sintetskog **inzulina** ili njegovih analoga, a u dijabetesu tipa II se mogu koristiti razne vrste lijekova kao što su **biguanidi** (npr. metformin) koji smanjuju proizvodnju glukoze u jetri, **tiazolidinedioni** (smanjuju perifernu rezistenciju na inzulin), **inhibitori α -glukozidaze** (usporavaju razgradnju ugljikohidrata iz hrane zbog čega u krvi sporije raste razina glukoze), **inhibitori dipeptil peptidaze-4** (sprječavaju razgradnju proteina GLP-1 koji potiče sintezu i lučenje inzulina), inhibitori **natrij-glukoznog kotransportera 2** (uloga u resorpciji glukoze u proksimalnom tubulu bubrega), **sekretagozi** koji potiču izlučivanje inzulina (sulfonilurea, meglitinidi, agonisti GLP-1 receptora) te **analози amilina**.

2.2.1 PODTIP DIJABETESA MODY3

Za razliku od dijabetesa tipa I i II, kod kojih se genetička komponenta odnosi na kombinaciju mutacija više gena, u tipu dijabetesa zvanom MODY (od engl. *Maturity Onset Diabetes of the Young*) mutacije se javljaju u **određenim genima** (monogeniski tip dijabetesa) i nasljeđuju se **autosomalno dominantno**. Karakteristike ovog tipa dijabetesa su **disfunkcija β stanica** i poremećeno **glukozom stimulirano izlučivanje inzulina** te pojava bolesti između **20 i 50 godine**. Sama bolest najčešće se manifestira blagom hiperglikemijom i tipičnim simptomima dijabetesa (nekada čak i kod novorođenčeta), ali u pojedinim slučajevima jasni simptomi se uopće ni ne pojavljuju. Također, za razliku od dijabetesa tipa I, ne dolazi do sinteze autoantitijela, dok, za razliku od dijabetesa tipa II, nije utvrđen povećan ITM (indeks tjelesne mase) kao ni rezistencija na inzulin te dijabetička ketoacidoza²⁶.

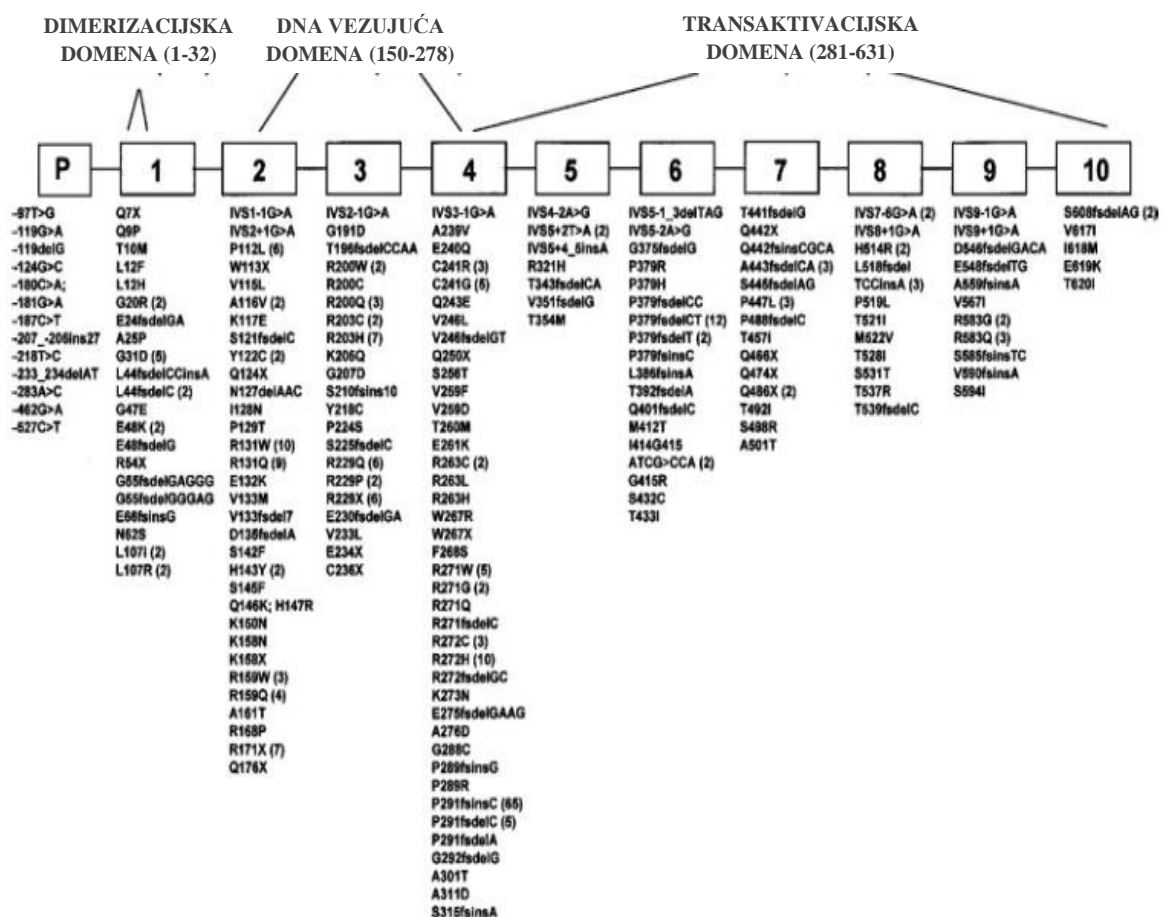
S obzirom na gen u kojem se nalaze mutacije, tip dijabetesa MODY može se podijeliti na, do danas poznatih, 13 podtipova (Tablica 1).

Tablica 1. Podtipovi MODY tipa dijabetesa

PODTIP DIJABETESA	GEN U KOJEM SE NALAZE MUTACIJE KOJE UZROKUJU BOLEST
MODY1	<i>HNF4A</i>
MODY2	<i>GCK</i>
MODY3	<i>HNF1A</i>
MODY4	<i>IPF1</i>
MODY5	<i>HNF1B</i>
MODY6	<i>NEUROD1</i>
MODY7	<i>KLF1</i>
MODY8	<i>CEL1</i>
MODY9	<i>PAX4</i>
MODY10	<i>INS</i>
MODY11	<i>BLK</i>
Trajni neonatalni dijabetes	<i>KCNJ11 i ABCC8</i>
Prolazni neonatalni dijabetes	<i>ABCC8</i>

Podtip dijabetesa MODY3 čini oko 1-2% svih slučajeva dijabetesa, a nastaje zbog mutacija u genu *HNF1A* (od engl. *Hepatocyte Nuclear Factor 1 homeobox A*) koje uzrokuju poremećaje u ključnim koracima transporta i metabolizma glukoze. Za ovaj podtip dijabetesa karakterističan je poremećen metabolizam β stanica gušterače, pojačana poliurija (zbog smanjene ekspresije natrij-glukoznog transportera 2 u bubrezima) te povišena razina HDL (od engl. *High Density Lipoprotein*) kolesterola. Prema simptomima i patologiji bolesti, vrlo je sličan podtipu MODY1 koji nastaje zbog mutacija u genu *HNF4A* (regulira ekspresiju gena

*HNFI*A), a često se pogrešno dijagnosticira kao dijabetes tipa I zbog pojave u vrlo ranoj dobi. Razlog pojave simptoma u mlađoj dobi je snažan utjecaj mutacija gena *HNFI*A na njegovu funkciju pri čemu težina simptoma ovisi o tipu i lokaciji mutacije²⁷. Do danas je poznato **193 malih nukleotidnih polimorfizama** (od engl. *Small Nucleotide Polymorphism*, SNP) u genu *HNFI*A (Slika 3) koji su povezani s pojavom podtipa dijabetesa MODY3 pri čemu se pogrešne mutacije (od engl. *missense*), koje rezultiraju zamjenom aminokiseline, uglavnom nalaze u dimerizacijskoj/DNA vezujućoj domeni, dok su besmislene mutacije (od engl. *nonsense*), koje uzrokuju sintezu nepotpunog proteina, većinom smještene u transaktivacijskoj domeni. Pri tome, besmislene mutacije imaju veći učinak od pogrešnih mutacija, dok mutacije istog tipa u dimerizacijskoj/DNA vezujućoj domeni imaju veći učinak od onih u transaktivacijskoj domeni. Također, ukoliko se mutacije nalaze u prvih 6 eksona, bolest nastupa ranije nego u slučaju pojave mutacija u eksonima od 7 do 10 (različita ekspresija izoformi *HNFI*A²⁷).



Slika 3. Pregled do danas poznatih mutacija u genu *HNFI*A koje su povezane s pojavom podtipa dijabetesa MODY3 (preuzeto iz: *Hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF-1 alpha) mutations in maturity-onset diabetes of the young*, Ellard S, 2000)

U liječenju podtipa dijabetesa MODY3 najčešće se koriste sekretagozi (sulfonilurea), ali se, s obzirom na progresiju bolesti, u kasnijoj dobi uglavnom javlja potreba za inzulinskom terapijom. Dugoročne posljedice bolesti odnose se na oštećenja mikro- i makrovaskularnog sustava, slično ostalim tipovima dijabetesa. S obzirom na vrlo čestu pogrešnu dijagnozu, postoji velika potreba za biomarkerom specifičnim za podtip dijabetesa MODY3.

Potencijalnim biomarkerima smatraju se 1,5-anhidroglucitol i CRP (C-reaktvi protein). Također, **glikozilacija proteina plazme** (preciznije, DG9 indeks ili omjer fukoziliranih i nefukoziliranih triantenarnih glikana) mogla bi poslužiti kao biomarker, pogotovo u kombinaciji s ostalim navedenim biomarkerima koji nisu dovoljno specifični^{6,28}. Zasadu se pouzdanom dijagnostičkom metodom smatra jedino **sekvenciranje gena *HNF1A***. Istraživanje mehanizma monogenetskog dijabetesa bi moglo imati znatan utjecaj na utvrđivanje patogeneze poligenских tipova dijabetesa jer se nedvojbeno radi o mutacijama u istim ključnim genima. Drugim riječima, težina ili dob pojave simptoma dijabetesa tipa I ili II mogu biti određeni upravo mutacijama u genima rizičnima za pojavu podtipova dijabetesa MODY²⁹.

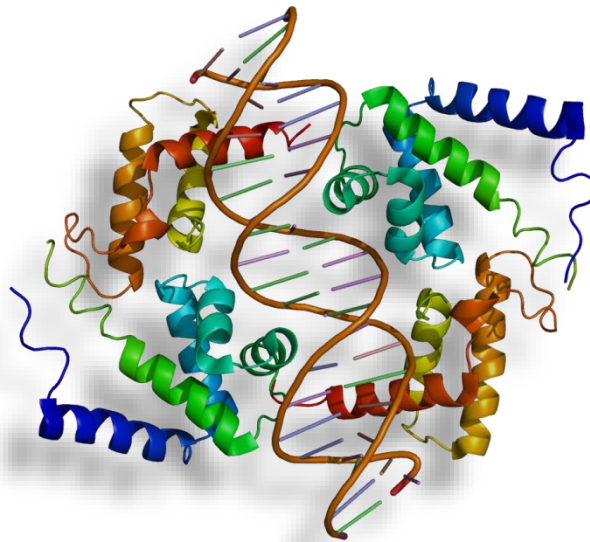
2.3 TRANSKRIPCijski FAKTOR HNF1A

Gen *HNF1A* poznat je i kao *TCF-1*, Albumin Proximal Factor, *IDDM20*, *MODY3*, *LF-B1* te Interferon Production Regulator Factor.

Nalazi se na 12 kromosomu, sastoji se od 10 eksona, a do sada je utvrđeno 8 izoformi proteina nastalih alternativnim prekrajanjem koje sadrže oko 630 aminokiselina, težine 67 kDa.

U aktivnom obliku je homodimer pri čemu se jedan monomer sastoji od:

1. N-terminalne dimerizacijske domene (1.- 32. aminokiselina)
2. vezujuće (od engl. *linker*) domene (33.-97. aminokiselina)
3. bipartitnog DNA vezujućeg motiva s POU homeodomonom (98.-280. aminokiselina)
4. C-terminalne transaktivacijske domene (281.-631. aminokiselina)



Slika 4. Tercijarna struktura homodimera HNF1A u kompleksu s DNA
(preuzeto iz: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Protein_TCF1_PDB_1ic8.png)

Ovaj protein se većinom nalazi u jezgri, a najviše je eksprimiran u stanicama jetre, bubrega, crijevnog epitela i gušterače pri čemu je jače eksprimiran u β stanicama Langerhansovih otoka nego u okolnom tkivu gušterače¹.

Pripada porodici gena „homeobox“ kao i njegov paralog *HNF1B*. Po funkciji je transkripcijski faktor i vezanjem na invertnu palindromsku regiju DNA (5'-GTTAATNATTAAC-3') regulira aktivnost RNA polimeraze II te potiče acetilaciju histona (mijenja poziciju gena unutar jezgre koja regulira i sprječava uspostavu oznaka utišanog kromatina³⁰). Na molekulu DNA se veže

u formi homodimera, ali može stvarati i heterotetramere s drugim dimerima poput PCBD1. Također, stupa u interakciju i s proteinima: CTBP1, PDX1, DYRK1B, PROX1, G6PC, CCND1 i CTNB1.

Osim tkivno specifične ekspresije, funkcija ovog transkripcijskog faktora je također tkivno specifična. Deficijencija gena *HNF1A* u hepatocitima i stanicama Langerhansovih otoka ima potpuno različite učinke, a poznato je kako neke funkcije proteina HNF1A u hepatocitima može preuzeti i njegov paralog HNF1B, dok u Langerhansovim otocima to nije slučaj³¹.

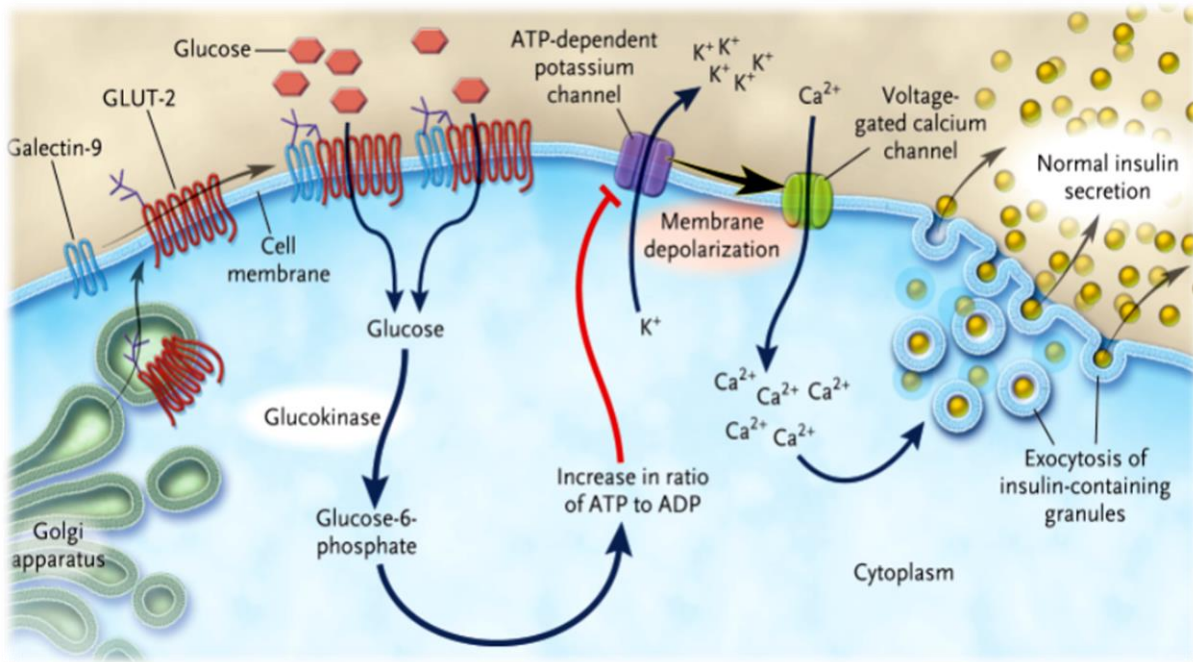
Regulacijske mreže u kojima sudjeluje su također tkivno specifične, a uključen je u velik broj staničnih procesa: stanični metabolizam (homeostaza i unos glukoze, sekrecija inzulina, apsorpcija glukoze u bubrežima, detoksikacija, metabolizam lipida i aminokiselina³², adipogenezu, FOXA2 i FOXA3 signalne putove, diferencijaciju β stanica i njihov rast i funkciju kod odraslih³³, ERK, MAPK, ILK i IL-6 signalizaciju, limfopoezu B stanica³⁴, embrionalni razvoj i regulaciju pluripotentnosti matičnih stanica i aktivnosti presenilina u Notch i Wnt signalizaciji, regulaciju funkcije egzokrinog djela gušterače³⁵ te ekspresiju gena *ACE2* u stanicama Langerhansovih otoka³⁶). Osim toga, regulira ekspresiju mikro RNA³⁷, transkripciju transportera žučne kiseline u crijevima i bubrežima³², ekspresiju proteina uključenih u upalne procese³⁸ te organskih kationskih transportera (uloga u metabolizmu lijekova³⁹), a utječe i na rani razvoj određenih linija T-stanica⁴⁰ te rast epitelnih stanica crijeva⁴¹. S obzirom na mnoštvo funkcija, poremećaji ekspresije i funkcije gena *HNF1A* mogu uzrokovati razne bolesti: **dijabetes tipa II**, hepatocelularni adenom (bialelna inaktivacija gena), bolesti koronarnih arterija⁴² ili rak jajnika⁴³. Vrlo značajna uloga gena *HNF1A* utvrđena je u pojavi **podtipa dijabetesa MODY3** i **tumora gušterače**¹ što ukazuje na znatno poremećenu regulaciju ekspresije i funkcije gena *HNF1A* u tim bolestima, pri čemu je jedan od mogućih uzroka poremećaja i promijenjena metilacija DNA^{1-4,28,44,45}.

GWAS istraživanja koja se temelje na podacima o signalnim putovima i pleiotropiji utvrdila su da poremećena funkcija ili ekspresija proteina HNF1A povećavaju rizik od razvoja adenokarcinoma gušterače^{3,44,46}. Također, potvrđena je i snižena ekspresija gena *HNF1A* u duktalnom adenokarcinomu gušterače te u raznim staničnim linijama razvijenima iz tumora gušterače što upućuje na tumor supresorsku funkciju gena *HNF1A*^{2,1}. Posljedice utišavanja gena *HNF1A* su pojačana proliferacija i smanjena apoptoza tumorskih stanica. Navedene promjene nastaju zbog poremećaja signalnih putova reguliranih genom *HNF1A*, a jedan od njih je i signalni put PI-3K/Akt/mTOR u kojem zbog snižene količine transkripcijskog faktora HNF1A dolazi do fosforilacije proteina Akt i mTOR^{47,48}. Pretpostavlja se da je inhibicija proliferacije ključna za tumor supresorsku funkciju gena *HNF1A*⁴⁸ jer se povećanjem njegove ekspresije stanice zaustavljaju u G0/G1 fazi i ulaze u apoptozu². Ipak, usprkos utvrđenoj ulozi transkripcijskog faktora HNF1A u nastanku i razvoju dukalnog adenokarcinoma gušterače, nije pronađena specifična mutacija u sekvenci tog gena koja bi bila uzrok promjeni njegove ekspresije ili funkcije u tumorskim stanicama, te se pretpostavlja da bi aberantna epigenetička regulacija mogla biti uzrok poremećene ekspresije tog gena.

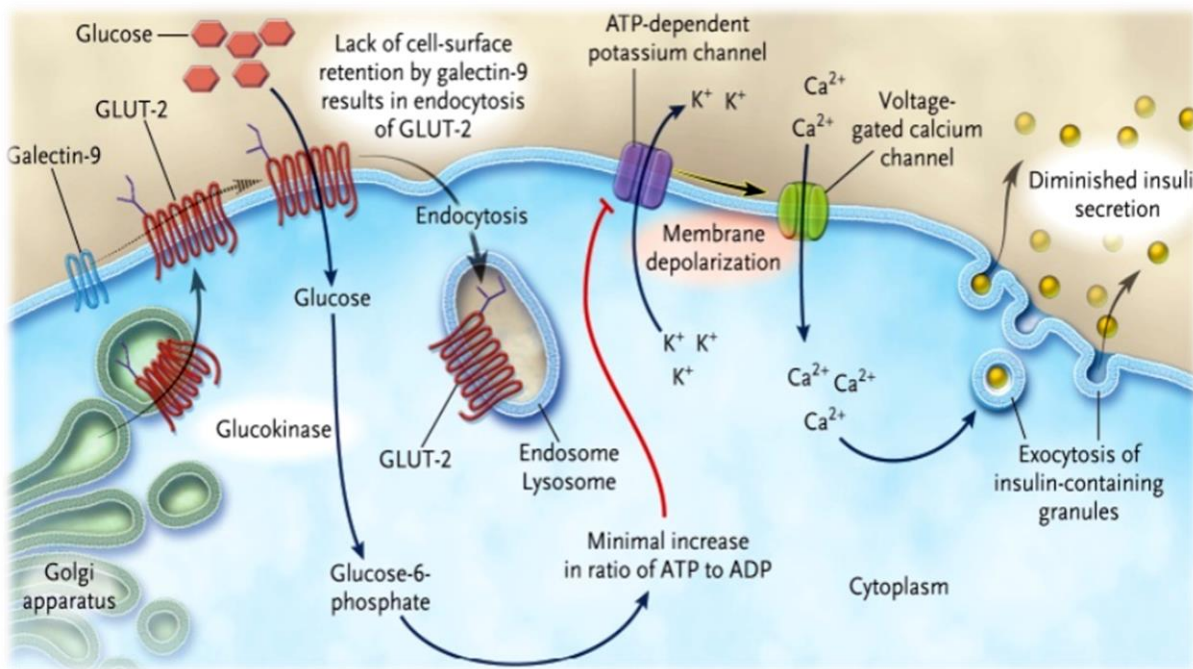
2.3.2 ULOGA TRANSKRIPCIJSKOG FAKTORA HNF1A U DIJABETESU

Iako se važnost gena *HNF1A* najjasnije očituje u pojavi podtipa dijabetesa MODY3, ovaj transkripcijski faktor ima važnu ulogu i u poligenkim oblicima dijabetesa. Razne cjelogenomske studije povezanosti kao jedan od lokusa rizičnih za pojavu dijabetesa, ističu upravo gen *HNF1A*^{25,49,50}. Iako se klinički fenotipovi podtipa dijabetesa MODY3 i dijabetesa tipa II razlikuju (dijabetes tipa II se pojavljuje kasnije, pacijenti su uglavnom pretili, a u plazmi su prisutni inzulin i C peptid), utvrđeno je da različite mutacije u genu *HNF1A* mogu uzrokovati oba tipa dijabetesa^{49,51,52}. Pri tome, u pojavi dijabetesa tipa II, uz mutacije u genu *HNF1A*, sudjeluju i mutacije u drugim genima te okolišni čimbenici poput načina prehrane, a to je u skladu s ulogom gena *HNF1A* u regulaciji metabolizma i odgovora β stanice na nutrijente (ekspresija gena reguliranih putem transkripcijskog faktora HNF1A se smanjuje u slučaju prehrane bogate masnim kiselinama⁴). Razlika u dobi pojave bolesti pripisuje se jačem utjecaju polimorfizama specifičnih za podtip dijabetesa MODY3 na funkciju proteina HNF1A od učinka mutacija gena *HNF1A* karakterističnih za dijabetes tipa II. Također, u oba tipa dijabetesa moguća je pojava poremećaja u glukozom stimuliranom izlučivanju inzulina što upućuje na sličan mehanizam patogeneze pri čemu je terapija takvih pacijenata identična (sekretagogzima poput sulfoniluree). Osim toga, kao što težina simptoma i dob pojave monogenetskog dijabetesa ovise o tipu i poziciji mutacije²⁷, isto tako i na dijabetes tipa II utječu različite kombinacije mutacija drugih gena s mutacijama gena *HNF1A* ili njegovom poremećenom epigenetičkom regulacijom. Smanjena funkcija ili ekspresija gena *HNF1A* za posljedicu ima poremećenu ekspresiju svih gena reguliranih ovim transkripcijskim faktorom. Jedan od tih gena je i *Mgat4a*, gen koji kodira protein Gnt-4a, glikoziltransferazu koja sintetizira sržnu β 1-4 GlcNAc vezu na glukoznom transporteru GLUT2. N-glikani na proteinu GLUT2 vežu galektine gušterače i formiraju glikan-galektinsku mrežu koja je nužna za stabilnu ekspresiju ovog transportera na površini β stanice. U slučaju poremećene glikozilacije transportera GLUT2, dolazi do promjena u njegovu transferu iz Golgijevog aparata (GA) na staničnu površinu te do njegove nestabilnosti na površini stanice, redistribucije u mikrodomene lipidnih splavi i unutarstanične akumulacije (u endosomima i lizosomima putem endocitoze). Također, istraživanja na mišjem modelu potvrdila su važnost glikozilacije transportera GLUT2 u unosu glukoze (Slika 6) te pojavi dijabetesa^{31,50}. S obzirom na to da o glikozilaciji transportera GLUT2 ovisi unos glukoze u stanicu^{4,53}, jasna je važna uloga gena *HNF1A* u kontroli unosa glukoze i procesa GSIS putem regulacije ekspresije glikoziltransferaze Gnt-4a i glikozilacije transportera GLUT2.

1 NORMALNA β STANICA



2 *Mgat4a*-DEFICIJENTNA β STANICA ILI NORMALNA β STANICA KOD PREHRANE BOGATE MASNIM KISELINAMA



Slika 6. Prikaz transporta glukoze u:

(1) normalnoj β stanici miša

(2) β stanici miša sa smanjenom ekspresijom gena *Mgat4a* ili normalnoj β stanici miša na prehrani bogatoj masnim kiselinama

(preuzeto iz: *Clinical implications of basic research: A Toggle for Type 2 Diabetes?* Thorens B, 2013)

2.3.3 POVEZANOST DUKTALNOG ADENOKARCINOMA GUŠTERAČE I DIJABETESA PUTEM TRANSKRIPCISKOG FAKTORA HNF1A

Povezanost dijabetesa i duktalnog adenokarcinoma gušterače uočena je još 1833.⁵⁴, ali još nije poznato postoji li između ovih bolesti i uzročno-posljedična veza. Dosadašnja istraživanja potvrđuju umjereno povećan rizik od razvoja adenokarcinoma gušterače u pacijenata oboljelih od kroničnog, dugotrajnog dijabetesa^{55,56} pri čemu se taj rizik povećava ukoliko je riječ o akutnom, kratkotrajnom dijabetesu^{57,58}. Također, povećan rizik od pojave adenokarcinoma gušterače u slučaju dijabetesa dokazuju i nedavne meta-analize koje pretpostavljaju da otpornost na inuzulin i hiperinzulinemija povisuju staničnu razinu proteina IGF-1 koji potiče proliferaciju i malignu transformaciju stanica gušterače⁵⁹. S druge strane, u čak 80% pacijenata oboljelih od adenokarcinoma gušterače utvrđena je podložnost dijabetesu⁶⁰ pri čemu se smatra da dijabetes uzrokovan tumorom uglavnom nastaje zbog inzulinske rezistencije i smanjene tolerancije na glukozu⁶¹, a ne zbog samog oštećenja endokrinog dijela gušterače⁶².

Velik broj gena, uključujući *HNF1A*, sudjeluje u tumorigenezi adenokarcinoma gušterače ali i u pojavi dijabetesa⁶³. Primjer navedenog je gen *Pdx1*^{48,64} (reguliran transkripcijskim faktorom HNF1A) koji je važan i za endokrinu funkciju β stanica (smanjena u dijabetesu tipa II) kao i za egzokrinu ulogu acinusa gušterače poremećenu u adenokarcinomu gušterače. Također, u slučaju deficijencije gena *HNF1A*, uočen je povećan broj Langerhansovih otoka, ali su oni veličinom puno manji od prosjeka. Poremećen rast β stanica Langerhansovih otoka je posljedica deregulacije većeg broja gena koji kodiraju faktore rasta, ligande, regulatore transdukcije i regulacijske proteaze³¹. Navedeni fenotip Langerhansovih otoka je vrlo česta karakteristika i adenokarcinoma gušterače i dijabetesa te je vrlo vjerojatno promjena gena *HNF1A* koja utječe na rast Langerhansovih otoka povezana s obje bolesti. U ovom istraživanju ključno je bilo izolirati specifično tkivo gušterače (Langerhansove otoke, tumorsko tkivo i netumorsko tkivo) kako bi se analizirale molekularne promjene (na razini metilacije DNA, ekspresije i glikozilacije proteina) povezane s dijabetesom tipa II, odnosno, duktalnim adenokarcinomom gušterače te kako bi se iste usporedile između navedenih bolesti. U tu svrhu korištena je metoda laserske mikrodisekcije kojom je moguće izrezati mikroskopski sitne dijelove prereza tkiva fiksiranog formalinom i uklopljenog u parafinski blok.

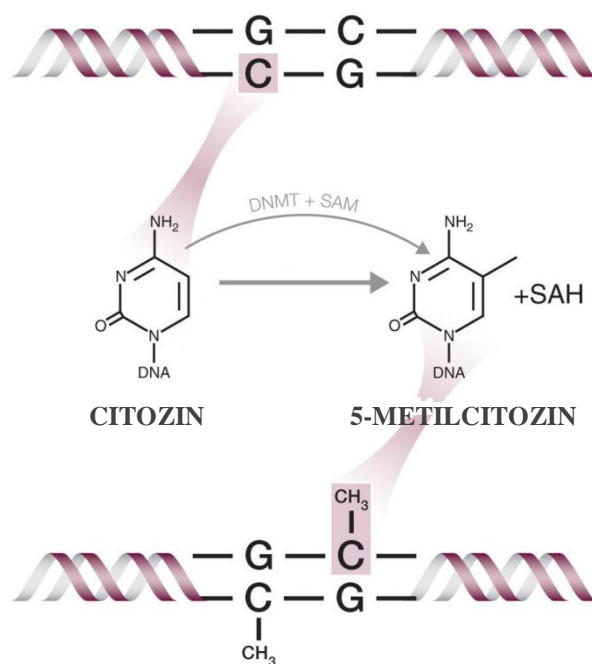
2.4 EPIGENETIČKE MODIFIKACIJE

Epigenetičke modifikacije su mitotski nasljedne promjene koje utječu na ekspresiju gena, a nisu kodirane sekvencom molekule DNA. Svojom brojnošću doprinose složenosti epigenetičke informacije, a poznato je 6 glavnih epigenetičkih mehanizama: metilacija i hidroksimetilacija DNA, kovalentne modifikacije histona i uvođenje histonskih varijanti u kromatin, remodeliranje kromatina i visoki stupanj organizacije kromatina, djelovanje nekodirajućih molekula RNA i pozicijska informacija (smještaj kromatina unutar interfazne jezgre). Iako su epigenetički mehanizmi raznoliki, gotovo uvijek su u interakciji i čine iznimno dinamičnu cjelinu varijacija koje nastaju uslijed uobičajenih staničnih procesa poput diferencijacije i apoptoze ili kao odgovor stanice na faktore iz okoliša (unutarnjeg i vanjskog). Stoga se epigenetika može podijeliti na onu vezanu uz razvoj i diferencijaciju (predeterminirana epigenetika), i na onu koja je rezultat odgovora genoma na okoliš kroz epigenetičke mehanizme (stohastička epigenetika). Epigenom pruža iznimnu plastičnost genomu te se smatra da bi metastabilne epigenetičke mutacije (transgeneracijski prenosive) mogle, zajedno s genetičkim mutacijama, biti supstrat za evoluciju^{65,66}.

U ovom istraživanju analizirana je metilacija DNA potencijalno regulacijske regije u genu *HNF1A* pri čemu je korištena metoda pirosekvenciranja nakon bisulfitne konverzije.

2.4.1 METILACIJA DNA

Metilacija DNA odnosi se na kovalentno vezanje metilne skupine (CH₃) na peti C-atom citozinske baze u molekuli DNA putem specifičnih enzima - DNA metiltransferaza.



Slika 7. Metilacija DNA

(preuzeto s <https://www.caymanchem.com/article/2153>)

Ova epigenetička modifikacija neophodna je za život i pravilnu diferencijaciju stanica te sudjeluje u brojnim procesima poput genomskog utiskivanja, inaktivaciji X kromosoma, sprječavanju homologne rekombinacije između ponavljajućih sljedova molekule DNA⁶⁷, heterokromatinizaciji, održavanju stabilnosti genoma kroz utišavanje transkripcije i transpozicije repetitivnih elemenata DNA⁶⁸.

S obzirom na to da je metilacija DNA najranije otkrivena epigenetička modifikacija⁶⁹ te da ju je najlakše analizirati, ona je ujedno i najbolje proučena epigenetička modifikacija. Metilacija DNA je uglavnom simetrična na dinukleotidima CpG (i CpHpG u biljaka) te asimetrična (u biljnim genomima u kontekstu CpHpH trinukleotida gdje je H bilo koji nukleotid). U sisavaca su također uočena oba oblika metilacije DNA, ali se u tjelesnim stanicama više od 98% metiliranih citozina nalazi u kontekstu CpG dinukleotida, dok se u embrionalnim matičnim

stanicama čak četvrtina metiliranih citozina pojavljuje izvan CpG konteksta⁷⁰. Regije genoma bogate CpG dinukleotidima zovu se CpG otoci i kod kralježnjaka su karakteristični za promotore gena. Ipak, samo manji dio CpG dinukleotida se nalazi u promotorima, dok ih je većina u inter- i intragenjskim regijama, vjerojatno zbog podložnosti metiliranog citozina spontanoj deaminaciji i tranziciji u timin (čime se povećava učestalost mutacija koje su nepoželjne u regulacijskim regijama kao što su promotori). S druge strane, sve je veći broj istraživanja koja ukazuju na regulacijsku ulogu metilacije CpG dinukleotida unutar tijela gena (od engl. *gene body*) ili na samim krajevima CpG otoka, odnosno, na CpG obalama⁷⁰⁻⁷³. Metilacija unutar gena nije u potpunosti razjašnjena, ali se pretpostavlja da regulira alternativno prekrajanje i transkripciju besmislenih (od engl. *antisense*) transkripata te sprječava ekspresiju s endogenog promotora⁷⁴.

Specifičan smještaj i stupanj metilacije CpG otoka u promotorima gena objašnjava se ulogom metilacije DNA u transkripciji. Regije promotora su u genomu sisavaca uglavnom demetilirane, za razliku od ostatka genoma (bimodalni uzorak metilacije u kojem je većina CpG dinukleotida metilirana, osim onih koji se nalaze u CpG otocima u promotorima gena).

Uspostavljanje obrasca metilacije DNA odvija se za vrijeme ranog embrionalnog razvoja, kojem prethodi brisanje metilacijskih oznaka tijekom dva ciklusa resetiranja: u gametogenezi, te odmah nakon oplodnje i formiranja zigote⁷⁵. Ovaj proces resetiranja metilacijske oznake u molekuli DNA izuzetno je važan kako se neželjene promjene u metilaciji DNA (spontane ili kao odgovor na okoliš), nakupljene tijekom života, ne bi prenijele na potomke.

Enzimi koji prenose metilnu skupinu s ključnog donora S-adenozil-L-metionina (SAM) na molekulu DNA zovu se DNA metiltransferaze. Njihovo zajedničko obilježje je 10 konzerviranih aminokiselina koje čine katalitičku C-terminalnu domenu, te velika N-terminalna domena. Eukariotske DNA metiltransferaze prenose metilnu skupinu na peti C-atom citozina. Do danas je poznato 5 članova porodice eukariotskih DNA metiltransferaza: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B i DNMT3L⁷⁶⁻⁸⁰. Enzim DNMT1 preferencijalno metilira hemimetiliranu molekulu DNA, a tijekom S faze staničnog ciklusa kolokalizira s enzimima uključenima u replikaciju molekule DNA. Zbog toga se glavnom ulogom ove metiltransferaze smatra održavanje metilacijskog uzorka tijekom replikacije molekule DNA koji je ključan za pravilno funkcioniranje stanice. U slučaju gubitka funkcije enzima DNMT1, dolazi do stanične smrti^{81,82}. Simetrična metilacija, koja se odvija tijekom semikonzervativne replikacije molekule DNA, omogućava prenošenje određenog obrasca metilacije DNA s metiliranog lanca kalupa na nascentni lanac molekule DNA. Stoga se metilacija DNA navodi

kao glavni mehanizam stanične memorije. U biljkama ovu ulogu ima klasa DNA metiltransferaza MET1, a čine ju homolozi enzima DNMT1⁸³.

DNMT2 je homologna metiltransferaza koja metilira 38. citozin u molekuli transfer RNA za aspartatnu kiselinu⁸⁴, a nedavnim istraživanjima potvrđena je i metilacija drugih molekula tRNA. Uloga metilacije RNA je stabilizacija njezine strukture i zaštita od nukleaza^{81,85}.

Enzimi DNMT3A i DNMT3B su *de novo* metilaze i metiliraju CpG dinukleotide potpuno nemetilirane molekule DNA. Poput DNMT1, neophodne su za uspostavljanje pravilnog metilacijskog obrasca i, ukoliko nisu eksprimirane, dolazi do stanične smrti^{81,86}.

DNA metiltransferaza DNMT3L je homolog proteina DNMT3A i DNMT3B i, iako nema katalitičku funkciju, važna je u procesu genomskog utiskivanja te sudjeluje u metilaciji DNA *de novo* povećavajući afinitet DNA metiltransferaza za donora metilne skupine zbog čega se ti enzimi dodatno aktiviraju. U biljkama funkciju metilacije *de novo* ima skupina enzima CMT (od engl. *Chromodomain containing MethylTransferases*) te skupina enzima DRM (od engl. *Domains Rearranged Methyltransferases*).

Usprkos preferencijalnoj metilaciji nemetilirane, odnosno, hemimetilirane molekule DNA, funkcije DNA metiltransferaza nisu strogo odvojene i njihova suradnja je neophodna u određenim dijelovima genoma (ponavljajući elementi) te je sve više dokaza o ulozi enzima DNMT1 u metilaciji DNA *de novo* kao i o funkciji enzima DNMT3A i DNMT3B u održavanju stabilnog metilacijskog uzorka tijekom replikacije molekule DNA¹⁶.

2.4.1.1 DEMETILACIJA DNA

Proces demetilacije DNA može se odvijati pasivno tijekom replikacije molekule DNA zbog nepreciznosti enzima DNMT1, ili aktivno djelovanjem enzima porodice TET (od engl. *Ten Eleven Translocation*) koji hidroksiliraju metilirani citozin koji se zatim izrezuje glikozidazama^{87,88}. Uklanjanje metilnih skupina s molekule DNA ima bitnu ulogu u razvoju stanice, ali i u raznim mehanizmima patogeneze. Poznato je da se tijekom diferencijacije stanica (u eritropoezi) i starenja odvija globalna genomska demetilacija⁸⁹.

2.4.1.2 ULOGA METILACIJE DNA U REGULACIJI EKSPRESIJE GENA

Metilacija DNA se najčešće povezuje s represivnim kromatinom i inhibicijom ekspresije gena i to na dva načina: (1) direktnim steričkim ometanjem vezanja transkripcijskih faktora⁹⁰ i (2) vezanjem MBD (od engl. *Methyl-CpG-Binding Domain*) proteina za metilnu skupinu na citozinu, regrutacijom ostalih epigenetičkih faktora te posljedičnim mijenjanjem (kompakcijom) strukture kromatina u „zatvoreno“ stanje (heterokromatinizacija). Regulacijska uloga metilacije DNA u sisavaca uglavnom se odnosi na metilaciju CpG otoka u promotoru gena pri čemu najveći utjecaj na razinu ekspresije gena ima metilacija CpG dinukleotida koji se nalaze na 3' kraju CpG otoka. U ovom istraživanju, potencijalno regulacijska 4 CpG mjesta nalaze se na samom početku gena *HNF1A* i mogla bi utjecati na vezanje proteina koji sudjeluju u transkripciji zbog čega je ista analizirana metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu. Osim CpG-metilacijom promotora, ekspresija gena može biti regulirana i metilacijom CpG mjesta unutar gena. Dok su CpG dinukleotidi unutar promotora gena uglavnom nemetilirani (hipometilirani), unutar tijela gena su jako metilirani (hipermetilirani). Za sada se smatra da je razlog hipermetilacije unutar tijela gena sprječavanje pogrešne inicijacije transkripcije s kriptičkih promotora⁷⁴. Usporedba profila metilacije DNA i ekspresije proteina ukazuje na snažnu korelaciju CpG-metilacije promotora i utišavanja ekspresije gena pri čemu povišena metilacija DNA uzrokuje sniženje ekspresije proteina. Ipak, sama metilacija CpG otoka u promotoru nije ni dovoljna ni neophodna za represiju gena. U slučaju najmanje 21% nemetiliranih promotora ne dolazi do vezanja RNA polimeraze II i sinteze potpunog proteina, dok, s druge strane, postoje i eksprimirani geni čiji su promotori potpuno metilirani. Poznata je i metilacija u CpG otocima za duge nekodirajuće RNA koje inhibiraju ekspresiju gena te je u tom slučaju posljedica povišene metilacije DNA povećana ekspresija gena. Osim toga, metilacija DNA je tkivno specifična pa stupanj metilacije određene regije DNA može imati različite učinke u različitom tipu stanica što ukazuje na to da metilacija DNA vjerojatno nije toliko bitna u inicijaciji i uspostavi represivnog kromatina, koliko u održavanju istog. Pokazano je da se CpG dinukleotidi u promotoru metiliraju kada je gen već utišan te se smatra da metilacija DNA zapravo „zaključava“ već utišane gene⁸¹. Sama metilacija DNA vjerojatno nije početni događaj i uzrok represiji gena, već jedan od sljedećih koraka u procesu utišavanja ekspresije u kojem, uz metilaciju DNA, sudjeluju i drugi čimbenici. Zbog toga, današnja istraživanja, umjesto fokusiranja na samo jednu epigenetičku oznaku, proučavaju složene regulacijske mreže kao cjelinu sastavljenu od velikog broja faktora.

2.4.1.3 METILACIJA DNA U TUMORU

Glavni uzrok pojave tumora je akumulacija genetičkih, ali i epigenetičkih mutacija. Iako se profil metilacije DNA razlikuje s obzirom na tip tumora, zajedničke karakteristike tumorskih stanica su hipometilacija i hipermetilacija određenih regija DNA koje se odvijaju neovisno jedna o drugoj^{91,92}. Globalna genomska hipometilacija u tumorskim stanicama najčešće zahvaća uzastopno ponavljajuće sekvence kao što su satelitna DNA centromernog i pericentromernog područja kromosoma, mini- i mikrosateliti ili pak raspršeni mobilni elementi kao što su LINE-1 (od engl. *Long Interspersed Nuclear Elements*) i SINE (od engl. *Short Interspersed Nuclear Elements*) elementi, te segmentalne duplikacije pri čemu se navedene regije razlikuju u stupnju demetilacije DNA. Osim ponavljajućih regija, u tumoru su hipometilirane i intragenske regije⁹³⁻⁹⁵, a hipometilacija je najštetnija unutar promotora onkogena jer dovodi do njihove pojačane ekspresije.

Glavna posljedica hipometilacije DNA je nestabilnost genoma uzrokovana učestalijom rekombinacijom ili povećanim premještanjem mobilnih elemenata⁹⁶⁻⁹⁹, a moguća je i aktivacija endogenih retroviralnih elemenata^{100,101}. Nestabilnost genoma vodi kromosomskim aberacijama i rearanžmanima koji su karakteristika tumora.

Najčešće se objašnjava pojačanom proliferacijom tumorske stanice bržom od procesa metilacije DNA zbog čega se spontano gube metilacijske oznake (tijekom replikacije molekule DNA). Ipak, taj proces nije nasumičan i za određene tipove tumora uočen je karakterističan uzorak hipometilacije¹⁰¹⁻¹⁰⁵ te se pretpostavlja da nije posljedica unaprijed određene hipometilacije DNA u matičnim tumorskim stanicama (klonovi tumorskih stanica nemaju isti uzorak hipometilacije), već je najčešće uzrokovana aktivnom demetilacijom DNA koja se zatim, zbog nemogućnosti popravka putem glikozidaza ili održavanja putem enzima DNMT1, spontano širi interakcijom susjednih CpG otoka te recipročnim utjecajem na histonske modifikacije. Na taj način, hipometilacijom DNA se može mijenjati i sama struktura kromatina te transkripcija susjednih gena^{106,107}.

Hipermetilacija DNA je karakteristična za promotore (ali i za kodirajuće regije) tumor-supresorskih gena uključenih u procese povezane s regulacijom staničnog ciklusa, popravkom DNA, apoptozom, otpornošću na lijekove, detoksifikacijom, diferencijacijom, angiogenezom i metastaziranjem^{102,108,109}. Promotori nekih od tih gena su nespecifično hipermetilirani u velikom broju različitih tumora, dok su u određenim tipovima tumora pojačano metilirani samo specifični geni. Hipermetilacija DNA je uglavnom povezana s utišavanjem ekspresije gena, ali u nekim slučajevima rezultira i povišenjem ekspresije (pri

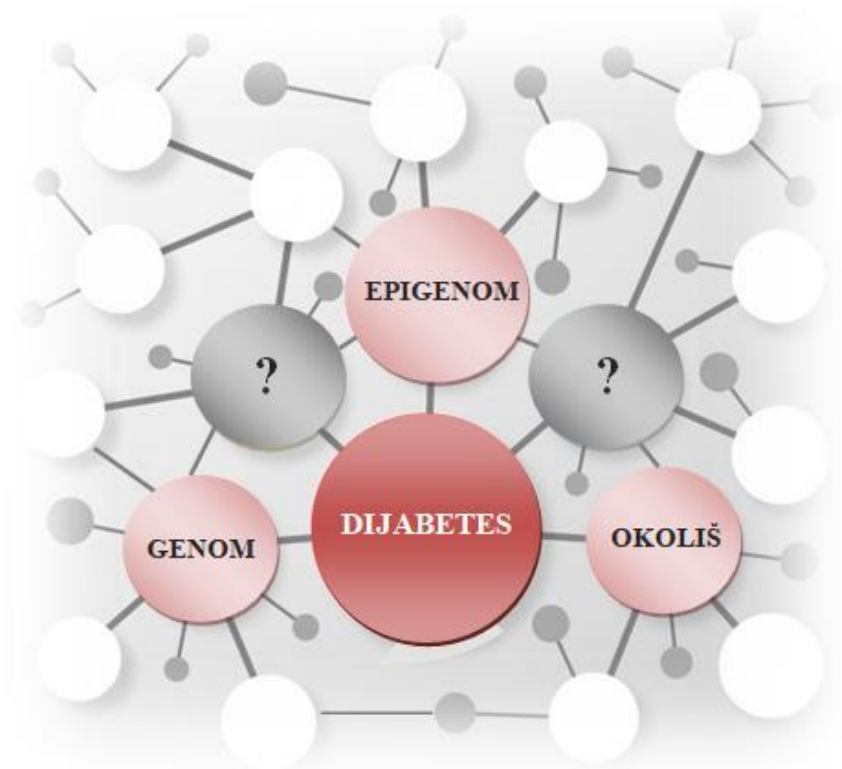
spriječavanju vezanja inhibitora transkripcije). S obzirom na specifične promjene u tumoru, metilacija DNA ima veliki potencijal kao biomarker u određivanju dijagnoze, ali i prognoze te razvoja bolesti. Također, u mnogim tumorima uočena je promjena metilacije DNA određenih gena (geni kandidati), puno prije pojave simptoma (do nekoliko godina)¹¹⁰ te se u tim tumorima metilacija promotora može koristiti i kao prognostički biomarker. Epigenetički inhibitori metilacije DNA koriste se u terapiji raka (primjerice Zebularin, Vidaza, Decitabin), a djeluju tako da se kovalentno vežu za molekulu DNA (analozi baza) i inhibiraju djelovanje DNA metiltransferaza *de novo*.

2.4.1.3.1 METILACIJA DNA U DUKTALNOM ADENOKARCINOMU GUŠTERAČE

U duktalnom adenokarcinomu gušterače poznate su mutacije u genima *KRAS*, *CDKN2A*, *P53*, *SMAD4*^{111–113} te brojne epigenetičke promjene. Pri tome su najčešće hipometilirani geni *DNMT1*, *claudin4*, *S100A4*, *hipocalin2*, *14-3-3 sigma*, *stratifin*, *trefoil factor 2*, *mesothelin*, *PSCA*, *S100P*, *maspin*, a hipermetilacija i posljedično utišavanje karakteristični su za gene: *CDKN1A*, *SPARC*, *ppENK*, *TFPI2*, *BNIP3*, *TSLC1*, *HHIP*, *MUC2*, *hMLH*, *CDKN1E/p57KIP2*, geni porodice GATA, *reprim0*, *CXCR4*, *SOCS1*¹¹⁴. Ovi su geni uključeni u adheziju stanica, apoptozu, proliferaciju, navođenje aksona te metastaziranje, a posebno je zanimljiv mehanizam aktivacije zvjezdastih stanica¹¹⁵ koje u interakciji s tumorskim stanicama izlučuju proteine odgovorne za pojačanu angiogenezu, proliferaciju i rast tumorskih stanica. Također, uz poremećaj metilacije DNA javljaju se i promjene u histonskim modifikacijama (u slučaju regulacije ekspresije gena za mucin) te pojačana ekspresija miR29, molekule miRNA koja posreduje u utišavanju gena. Nedavnim analizama na razini transkriptoma i proteoma je pokazano da je u duktalnom adenokarcinomu gušterače utišan gen *HNF1A*¹, a mnoge GWAS analize podataka ukazuju na povezanost tog gena s povećanim rizikom od pojave duktalnog adenokarcinoma gušterače^{3,44,46}.

2.4.1.4 METILACIJA DNA U DIJABETESU

U dijabetesu tipa II uočena je poremećena metilacija DNA u stanicama Langerhansovih otoka gušterače, skeletnih mišića i adipocitima pri čemu su promjenom metilacije uglavnom zahvaćeni geni važni u sekreciji i otpornosti na inzulin, a povezani su s metabolizmom i gojaznošću^{112,113}. S obzirom na važan utjecaj okoliša u razvoju dijabetesa i na to da GWAS istraživanja objašnjavaju samo 10% rizika za pojavu dijabetesa, brze i reverzibilne epigenetičke promjene mogle bi biti jedan od važnijih međusobno povezanih elemenata koji su uključeni u razvoj bolesti pri čemu neki od čimbenika tog kompleksnog mehanizma još nisu ni poznati (Slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz čimbenika u pojavi dijabetesa.

Nedavno je opisan profil metilacije DNA β stanica Langerhansovih otočića gušterače¹¹⁴ te je utvrđena veza između SNP-ova povezanih s dijabetesom tipa II i poremećene metilacije DNA što ukazuje na interakciju genetičkih i epigenetičkih mehanizama u razvoju dijabetesa. Uočene epigenetičke modifikacije za posljedicu imaju aberantnu ekspresiju gena te posljedično sekreciju inzulina, a više od 60% diferencijalno metiliranih regija pronađeno je u

slučaju CpG dinukleotida koji nisu u kontekstu CpG otoka, dok ih je 25% smješteno na granicama CpG otoka, a samo 7% unutar CpG otoka.

Najnovija GWAS istraživanja identificirala su čak 850 gena s promijenjenom metilacijom DNA u dijabetesu pri čemu je u slučaju 100 gena promijenjena i ekspresija, što ukazuje na to da promjena metilacije gena povezana s dijabetesom ima funkcionalno važnu ulogu¹¹⁴.

Razina globalne genomske metilacije DNA u dijabetesu je generalno smanjena¹¹⁶, a pretpostavlja se da je takva hipometilacija posljedica poremećenog metabolizma donora metilne skupine - folata, homocisteina i kolina, što je posljedica povišene aktivnosti gena *GNMT*, *PEMT*, *BHMT*, *CBS* i snižene aktivnosti gena *MS*. Iako je poremećena aktivnost navedenih gena zajednička različitim patološkim procesima, za dijabetes je karakteristična povišena ekspresija gena *DNMT1* koja predstavlja kompenzacijski mehanizam uzrokovan nedostatkom donora metilne skupine¹¹⁶. Najnovija istraživanja otkrivaju sniženu metilaciju gena *Mkl1*, *Tnfaip81* i *Plekho1*¹¹⁷ koji sudjeluju u signalizaciji putem inzulina, dok je hiperglikemijom uzrokovana hipometilacija gena *TXNIP*, regulatora perifernog unosa glukoze koji inhibira unos glukoze u masno tkivo i mišiće¹¹⁸.

Povišena metilacija DNA (i posljedično snižena ekspresija) uočena je u slučaju gena uključenih u stanični metabolizam: *TCF7L2*, *THADA*, *KCNQ1*, *FTO*, *IRSI* (sudjeluju u proizvodnji inzulina), *CDKN1A*, *PDE7B*, *EXOC3L2* (povezani s izlučivanjem inzulina), *PPARGC1A* (potiče oksidativnu fosforilaciju i proizvodnju ATP-a u mitohondriju koja je važna za pravilno funkcioniranje β stanica i odgovor perifernih tkiva na inzulin¹¹⁹), *GYS2*, *ELOVL6*, *FADS1* (važni za unos glukoze i pohranu lipida¹¹²) te *TFAM* (važan za održavanje stabilnosti mitohondrija¹²⁰).

Za razliku od toga, snižena metilacija DNA uzrokovana hiperglikemijom karakteristična je za gene uključene u upalni odgovor stanice (poput gena koji kodira protein UNC13B odgovornog za vezanje diacilglicerola štetnog za bubrege¹²¹) te za gene koji sudjeluju u biosintezi i metabolizmu glikana, a važni su za pravilan smještaj glukoznih transportera¹¹².

Osim na izlučivanje inzulina putem GSIS mehanizma, razina glukoze u stanici djeluje i na ekspresiju inzulina putem transkripcijskog faktora Pdx1 čija je metilacija DNA također poremećena u dijabetesu. U slučaju optimalne razine glukoze, Pdx1 reagira s ko-aktivatorom p300 i histonskom metiltransferazom SET D7/9 te potiče acetilaciju i dimetilaciju H3K4 na poziciji promotora gena za inzulin, dok, u situaciji nedostatka glukoze, Pdx1 stupa u interakciju s histonskim deacetilazama koje djeluju na histone u blizini promotora gena za inzulin te inhibira transkripciju inzulina¹¹⁹. Također, i poremećena metilacija DNA i mutacije

transkripcijskog faktora NEUROD utječu na njegovo vezanje s kromatin remodelirajućim proteinima na poziciji promotora gena za inzulin čime se mijenja ekspresija inzulina.

Uz metilaciju DNA, važan čimbenik u patogenezi su i miRNA koje posreduju u upalnim procesima: miR-9, miR-29a, miR-34a, miR-103, miR-107, miR-126, miR-132, miR-142-3p, miR-143, miR-144, miR-146a, miR-192, miR-375¹²², pri čemu je za miR-375 i miR-9 dokazan direktan utjecaj na izlučivanje inzulina (u slučaju miR-375 utišavanjem gena koji kodira miotropin¹²³, a u slučaju miR-9, utišavanjem gena *Onecut2*, transkripcijskog faktora za granufilin koji potiče lučenje inzulina¹²⁴). Osim miRNA i metilacije DNA, epigenetičke promjene u dijabetesu obuhvaćaju i histonske modifikacije (povišena acetilacija histona H4, te metilacija H3K4), a utvrđena je i ovisnost transkripcije inzulina o aktivnosti kromatin-remodelirajućih kompleksa HATp300 i SET7/9. Pri tome je za regulaciju metabolizma, adipogeneze i izlučivanje inzulina važna histonska deacilaza SIRT1 koja utječe na ekspresiju mnogih gena uključenih u pojavi dijabetesa⁷. Također, na lokusu gena *Ink4a/Arf* je smanjena trimetilacija H3K27, ubikvitinilacija H2A te vezanje represivnih proteina Ezh2 i Bmi-1 što za posljedicu ima povišenu ekspresiju proteina *Ink4a/Arf* bitnog za pojačanu proliferaciju β stanica u dijabetesu do koje dolazi zbog povećane potrebe za inzulinom¹¹⁹.

Zajedničko obilježje komplikacija izazvanih dijabetesom (nefropatija, retinopatija, neuropatija, ishemija srčanog mišića, periferne vaskularne bolesti) je disfunkcija endotela uzrokovana hiperglikemijom koja se, zbog metaboličke memorije omogućene epigenetičkim modifikacijama (najvjerojatnije H3K9 trimetilacijom uzrokovanom povišenom ekspresijom SUV39H1), ne smanjuje ni nakon normalizacije razine glukoze¹²⁵. S obzirom na procese u kojima sudjeluju geni čija se metilacija mijenja u dijabetesu, očita je uska povezanost metabolizma i imunološkog odgovora¹¹². Štoviše, hiperglikemija u dijabetesu predstavlja konstantan proupalni signal zbog kojeg se u monocitima povisuje ekspresija proteina NF κ B i citokina što za posljedicu ima acetilaciju i dimetilaciju H3K9 i H3K14 u blizini gena koji sudjeluju u upali¹²⁶. Iako je bolest rezultat međusobnog djelovanja različitih epigenetičkih promjena, one su ipak specifične s obzirom na posljedične patogene procese, ali i tip dijabetesa. Primjerice, u neonatalnom dijabetesu uočena je hipermetilacija kromosoma 6q24¹¹⁹, a podtip dijabetesa MODY3 moguće je, po uzorku metilacije i glikozilacije, razlikovati od ostalih tipova dijabetesa⁷.

2.4.1.4.1 METILACIJA DNA U PODTIPU DIJABETESA MODY3

Protein HNF1A utječe na transkripciju putem različitih mehanizama: (1) direktno interakcijom s molekulom DNA, (2) indirektno vežući histonske acetiltransferaze koje acetiliraju histone u blizini specifičnih promotora gena koji kodiraju proteine GLUT2 i piruvat kinazu. Štoviše, najčešće mutacije unutar gena *HNF1A* nalaze se u regijama koje predstavljaju vezna mjesta za kromatin-remodulirajuće proteine. Na temelju ovih mutacija moguće je utvrditi podtip dijabetesa MODY3. Osim toga, u ovom podtipu dijabetesa zabilježena je i poremećena metilacija DNA u genu *HNF1A* koji je, uz *FOXA2* gen, važan regulator odgovora β stanica na nutrijente tj., metaboličkih puteva koji uključuju izlučivanje inzulina¹¹.

Nedavno istraživanje u grupi prof. Zoldoš ukazalo je na nekoliko CpG mjesta unutar prvog eksona gena *HNF1A* koja bi mogla imati regulacijsku ulogu u transkripciji ovoga gena. Analiza ekspresije i CpG-metilacije specifične regije gena *HNF1A* u 7 staničnih linija pokazala je korelaciju metilacije DNA i ekspresije. Također, promjena metilacije DNA potencijalno regulacijske regije gena *HNF1A* u perifernim krvnim stanicama povezana je s porastom visoko razgranatih glikanskih struktura u podtipu dijabetesa MODY3 što upućuje na to da bi jedan od uzroka nastanka podtipa dijabetesa MODY3 moglo biti i njegovo epigenetičko utišavanje⁷.

Nedavnim istraživanjima otkriveno je kako profil ekspresije gena u stanicama Langerhansovih otoka gušterače ovisi o ekspresiji transkripcijskog faktora *HNF1A*. Mnoštvo gena reguliranih genom *HNF1A* i sami imaju regulacijsku ulogu te sudjeluju u glikozilaciji, oksidativnoj fosforilaciji, metabolizmu, glukoneogenezi i metabolizmu mitohondrija, odnosno, procesima povezanim s GSIS odgovorom³⁰. U skladu s navedenim, patogeneza monogenetskog dijabetesa je iznimno složena jer je isti posljedica poremećaja više mehanizama i staničnih procesa.

2.4.2 OSTALE EPIGENETIČKE MODIFIKACIJE I MEHANIZMI

2.4.2.1 HIDROKSIMETILACIJA

Osim metilne skupine, na peti C-atom citozina molekule DNA može biti vezana i hidrosimetilna skupina, pri čemu je takva epigenetička oznaka najčešća u embrionalnim matičnim stanicama i neuronima. Kao i kod metilacije, profil hidrosimetilacije DNA ovisi o tipu stanice, a uočena je samo u kontekstu CpG dinukleotida, uglavnom u distalnim regijama (odgovaraju pojačivačima, CTCF vezujućim regijama i regijama osjetljivima na DNazu I). Također, navedene regije su najčešće demetilirane što je u skladu s pretpostavljenom ulogom hidrosimetilacije u aktivnoj demetilaciji pri čemu je 5-hmC prijelazni oblik u toj reakciji. S druge strane, hidrosimetilacija bi mogla biti i samostalna epigenetička oznaka koja regulira ekspresiju (na veznom mjestu za transkripcijski faktor) što rasvjetljava njenu ulogu u diferencijaciji i razvoju stanice, a također i u pojavi patogenih procesa u kojima je poremećen profil hidrosimetilacije DNA¹²⁷.

2.4.2.2 HISTONSKE VARIJANTE I MODIFIKACIJE (acetilacija, metilacija, fosforilacija, ubikvitinilacija, sumoilacija, deiminacija, O-glikozilacija, ADP-ribozilacija, biotinilacija, gubljenje kraja histona, izomerizacija histonskog prolina)

Metilacija DNA i modifikacije histona su u međusobnoj interakciji, odnosno, određen obrazac metilacije DNA regulira histonske modifikacije i obrnuto. Veza metilacije DNA i histonskih modifikacija ostvaruje se putem interakcije histonskih metiltransferaza (SUV 39H1/2, EZH2, G9A, PRMT5, SET7, LSD1), acetilaza (HATs, od engl. *Histone AcetylTransferases*) i deacetilaza (HDACs, od engl. *Histone DeAcetylases*) s DNA metiltransferazama. Također, i histonski proteini poput H1 mogu stupiti u interakciju s DNA metiltransferazama i tako potaknuti metilaciju DNA, a posebno važnu ulogu u interakciji histona i histonskih deacetilaza s metiliranom molekulom DNA imaju proteini MBD kao što su MeCP1 i MeCP2⁹⁰. Histonskim kodom nazivamo informaciju sadržanu u modifikacijama na repovima histona koja regulira ekspresiju gena, a u Tablici 2 prikazane su najpoznatije histonske modifikacije. Demetilacija DNA se najčešće povezuje s aktivirajućim histonskim oznakama, a metilacija DNA s represivnim histonskim oznakama. Pri tome, neke histonske metiltransferaze (poput SET7) čak metiliraju sam protein DNMT1 (smanjuju njegovu aktivnost te posljedično inhibiraju metilaciju DNA), dok histonska metiltransferaza LSD1 ima potpuno suprotan učinak jer demetilira enzim DNMT1^{128,129}.

Tablica 2. Prikaz do danas poznatih histonskih modifikacija i njihov utjecaj na ekspresiju gena;
A = aktivacija, R = represija.

MODIFIKACIJA	HISTON							
	H3K4	H3K9	H3K14	H3K27	H3K79	H3K122	H4K20	H2BK5
MONO-METILACIJA	A	A		A	A		A	AA
DI-METILACIJA	A	R		R	A			
TRI-METILACIJA	A	R		R	A/R			R
ACETILACIJA		A	A	A		A		

Najpoznatije histonske varijante su H3.3 i centromerni H3 (cenH3, CENPA u ljudi), H2A.X i H2A.Z, a važne su za održavanje genomske stabilnosti, u popravku DNA, remodeliranju kromatina i mnogim drugim procesima.

2.4.2.3 KROMATIN-REMODULIRAJUĆI KOMPLEKSI

Veliki proteinski kompleksi koji energiju dobivenu hidrolizom ATP-a koriste za modifikaciju kromatinske strukture mogu se svrstati u različite porodice: SWI/SNF, ISWI, NURD/Mi-2/CHD, INO80 i SWR1, a na metilaciju DNA utječu na više načina: vezanjem metiliranog citozina¹³⁰ ili regulacijom pakiranja nukleosoma¹³¹. Prema aktivnosti se dijele na dvije osnovne skupine – one koji mobiliziraju nukleosome bez mijenjanja aranžmana molekule DNA i histona u nukleosomu i one koji mobiliziraju nukleosome tako da uklanjaju i ponovo stavljaju histone na molekulu DNA.

2.4.2.4 POZICIJA NUKLEOSOMA

Nukleosomi su osnovne ponavljajuće jedinice eukariotskog kromatina koje čine dimeri histona H2A, H2B, H3 i H4 ovijeni molekulom DNA duljine 147 pb koja čini dva navoja oko oktamerne jezgre. Susjedni nukleosomi povezani su putem histona H1, a utječu na ekspresiju putem kompakcije kromatina do forme vlakna od 30 nm (solenoid) o čemu ovisi dostupnost molekule DNA transkripcijskim faktorima, ali i drugim proteinima. Veza metilacije DNA i nukleosoma općenito je posljedica interakcije DNA metiltransferaza s molekulom DNA pri čemu vezanje DNA metiltransferaza ovisi o više faktora: sekvenci molekule DNA (preferencijalno se vežu na CpG bogate regije i ponavljajuće elemente), histonskim oznakama (DNA metiltransferaze *de novo* prepoznaju nemetilirani H3K4 i trimetilirani H3K36), varijanti histona (za varijantu histona H2A.Z se vežu puno slabije nego za histon H2A¹³²⁻¹³⁵), duljini ponavljanja nukleosoma (periodička metilacija DNA gdje je ona proporcionalna broju

nukleosoma¹³⁶⁻¹³⁹) i poziciji nukleotida u nukleosomu (preferencijalna metilacija CpG dinukleotida koji se ponavlja svakih 10 parova baza zbog povećane izloženosti CpG dinukleotida na mjestu oštrijeg zavoja molekule DNA¹⁴⁰).

2.4.2.5 NEKODIRAJUĆE MOLEKULE RNA

Nekodirajuće molekule RNA su funkcionalne molekule RNA koje nastaju prepisivanjem iz molekule DNA, ali se ne prevode u proteinsku sekvencu. Njihova funkcija je regulacija ekspresije gena koja može biti na razini transkripcije (od engl. *Transcriptional Gene Silencing*, TGS) te na posttranskripcijskoj razini (od engl. *Post-Transcriptional Gene Silencing*, PTGS). Pri tome se samo regulacija na razini TGS smatra epigenetičkim mehanizmom, a obuhvaća mijenjanje kromatinske strukture (poticanje heterokromatinizacije), histonskih modifikacija te metilacije molekule DNA (inhibicija metilacije molekule DNA vezanjem za DNA metiltransferaze¹⁴¹). Nekodirajuće molekule RNA mogu se ugrubo podijeliti na kratke (od engl. *short ncRNA*) i dugačke (od engl. *long ncRNA*, lncRNA), a kratke RNA mogu se još podijeliti na kratke interferirajuće RNA (od engl. *short interfering RNA*, siRNA), Piwi-interagirajuće RNA (od engl. *Piwi interacting RNA*, piRNA) i mikroRNA (od engl. *microRNA*, miRNA).

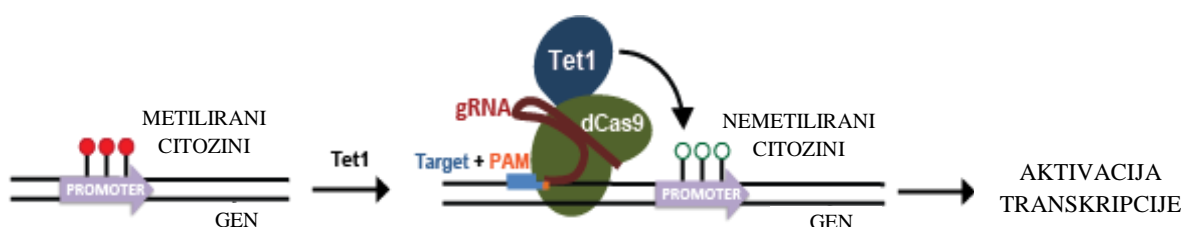
U kontekstu PTGS mehanizma regulacije, molekule miRNA i siRNA vežu se na specifičnu, komplementarnu molekulu glasničke RNA (od engl. *messenger RNA*, mRNA) i uzrokuju njeno rezanje, degradaciju ili steričku inhibiciju translacije.

U TGS mehanizmu regulacije, nekodirajuće molekule RNA (uz izuzetak piRNA) sudjeluju kao posrednici u utišavanju putem drugih epigenetičkih mehanizama. U slučaju molekula miRNA, utišavanje gena može se spriječiti metilacijom regija koje kodiraju miRNA³⁷, a molekule siRNA, putem RITS kompleksa (od engl. *RNA Induced Transcriptional Silencing*)¹⁴², mogu potaknuti metilaciju H3K9 i heterokromatinizaciju. U slučaju molekula piRNA, dominantna uloga je sprječavanje aktivnosti transpozona putem vezanja na isti¹⁴³. Transkripcijsko utišavanje pomoću molekula lncRNA odnosi se na njihovo stvaranje kompleksa s kromatin-remodulirajućim proteinima i navođenjem istih na ciljno mjesto u genomu¹⁴⁴. Jedan od najpoznatijih mehanizama posredovanih molekulom lncRNA je utišavanje X kromosoma molekulom lncRNA zvanom Xist koja se veže na X kromosom, potiče metilaciju histona i inaktivaciju kromosoma¹⁴⁵.

2.5 CILJANA MODIFIKACIJA EPIGENOMA UPOTREBOM CRISPR/Cas9 MOLEKULARNOG ALATA

Razvojem metoda molekularne biologije, danas je moguće promijeniti ciljane dijelove genoma, ali i odabrane epigenetičke oznake. Osim sustava CRISPR/Cas9 (od engl. *CRISPR-associated protein 9*) korištenog u ovom istraživanju, danas se najčešće koriste alati za molekularnu modifikaciju TALEN (od engl. *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) te ZFN (od engl. *Zinc-Finger Nucleases*). Oba navedena sustava moguće je navesti na ciljnu regiju putem manipulacije određenog aminokiselinskog slijeda na način da isti specifično prepoznaje ciljnu regiju molekule DNA. Promjene koje navedeni proteini uvode u genom temelje se na njihovoj nukleaznoj aktivnosti, ali mogu se vezati s drugim proteinima i funkciju nukleaza zamijeniti funkcijom svojeg fuzijskog proteina.

Kao i kod opisanih molekularnih alata, funkcija CRISPR/Cas9 sustava može se mijenjati s obzirom na funkciju proteina vezanih na protein Cas9, ali za razliku od njih, CRISPR/Cas9 alat navođen je molekulom sgRNA (od engl. *single guide RNA*) pri čemu je vezanje na specifično mjestu u genomu omogućeno mijenjanjem redoslijeda nukleotida sekvence sgRNA. Ona ima više uloga: crRNA (CRISPR-RNA) koja pronalazi komplementarnu sekvencu DNA, proto-razmaknice (od engl. *proto-spacer*) te tracrRNA (od engl. *trans-activating crRNA*) potrebne za aktivaciju proteina Cas9. Prije vezanja molekule sgRNA i ciljne DNA, protein Cas9 mora prepoznati sekvencu od 3 nukleotida (NGG pri čemu je N bilo koji nukleotid), tkzv. sekvencu PAM (od engl. *Protospacer-Adjacent Motif*), koja se nalazi nizvodno od proto-razmaknice. S obzirom na to da je nativnom obliku Cas9 DNA endonukleaza, njena aktivna mjesta su mutirana (oblik dCas9) prije vezanja drugih proteina (uglavnom njihovih katalitičkih domena).



Slika 9. Shematski prikaz ciljne demetilacije genoma putem fuzijskog proteina dCas9-TET1 (preuzeto iz: <http://blog.addgene.org/crispr-101-editing-the-epigenome>)

U ovom istraživanju, u ulozi fuzijskog proteina je katalitička podjedinica DNA vezujućeg proteina TET1 koji sudjeluje u aktivnoj demetilaciji DNA tako što katalizira konverziju 5-metilcitozina u (5mC) u 5-hidroksimetilcitozin koji kasnije prelazi u 5-formilcitozin (5fC) te 5-karboksilcitozin (5caC). Funkcija opisanog fuzijskog proteina bila je ciljana demetilacija 4 CpG mjesta u prvom eksonu gena *HNF1A* u staničnom modelu te naknadna analiza ekspresije kako bi se nedvojbeno dokazala regulacijska uloga metilacije navedena 4 CpG mjesta u ekspresiji tog gena. Plazmid s ugrađenim fuzijskim proteinom u stanice je ubačen putem transfekcije, nakon čega je, metodom pirosekvenciranja nakon bisulfitne konverzije, analizirana metilacija DNA, a ekspresija gena *HNF1A* određena je metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu.

2.6 GLIKOZILACIJA PROTEINA

Glikozilacija proteina je specifičan i strogo reguliran kotranslacijski i posttranslacijski proces kovalentnog vezanja mono- i oligosaharida na proteine i lipide pri čemu nastaju glikoproteini i glikolipidi. Gotovo sve vrste stanica, bez obzira na evolucijsku starost, imaju sposobnost glikozilacije proteina što upućuje na njenu važnu ulogu u životu stanice. Iako postoje sličnosti u glikozilaciji između bakterija, gljiva, biljaka i životinja, još je više znatnih razlika u sastavu i strukturi glikana koje se dijelom mogu objasniti ekspresijom različitih glikoziltransferaza i glikozidaza, a posljedica su potrebe stanice za sintezom glikoproteina sa specifičnim svojstvima koja su usko povezana s različitim staničnim funkcijama i njihovom prilagodbom. Precizna regulacija i prilagođavanje važnih staničnih procesa omogućeni su velikom raznolikošću glikanskih struktura i prisutnošću glikoproteina u gotovo svim dijelovima stanice: membranama, endoplazmatskom retikulumu (ER), GA, lizosomima, izvanstaničnim tekućinama i matriksu¹⁴⁶ pa čak i u citoplazmi te staničnoj jezgri¹⁴⁷⁻¹⁵⁰. Nepravilna glikozilacija u embrionalno i fetalno doba najčešće je letalna ili je uzrok kongenitalnih bolesti. Poremećaji u glikozilaciji u odrasloj dobi čovjeka neizostavni su dio tumorigeneze, ali i metaboličkih poremećaja poput dijabetesa¹⁵⁰⁻¹⁵², upalnih i autoimunih bolesti, kardiovaskularnih i ostalih multifaktorijskih bolesti. Promjene glikozilacije moguće je utvrditi određivanjem udjela pojedine glikanske strukture u ukupnom glikomu stanice, što se u ovom istraživanju pokušalo utvrditi metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koja se temelji na hidrofilnim interakcijama (od engl. *Hydrophilic Interaction Ultra Performance Liquid Chromatography*, HILIC-UPLC).

2.6.1 FUNKCIJA I RAZNOLIKOST GLIKANA

S obzirom na to da je većina membranskih¹⁵³, citoplazmatskih^{146,147} te sekretornih¹⁵³ proteina glikozilirana, očita je važna uloga glikana u strukturi i funkciji proteina kao i njihova regulacijska uloga u različitim biološkim procesima poput transkripcije, smatanja, izlučivanja, stabilizacije, degradacije i fosforilacije proteina (regulacija njihove aktivnosti putem O-GlcNAc-a), stanične signalizacije te imunog odgovora^{148,149,154}.

U ekstracelularnom matriksu, glikokonjugati mogu poslužiti za skladištenje važnih biomolekula (npr. faktora rasta)¹⁵⁴, a veoma važni u očuvanju integriteta tkiva su proteoglikani (zbog mogućnosti vezanja velike količine vode), dok mucini mogu predstavljati fizičke barijere koje sprječavaju infekcije¹⁵⁵. Jedan od najpoznatijih primjera važnosti oligosaharidne skupine glikoproteina je glikozilacija imunoglobulina G čija upalna aktivnost ovisi upravo o promjeni samo jednog monosaharida na njegovom Fc fragmentu (od engl. *core Fragment*)¹⁵⁶. Štoviše, gotovo sve interakcije stanice s okolišem (prijenos signala, endocitoza, imuni odgovor, oplodnja) posredovane su glikanima na staničnoj površini jer su upravo oni primarno mjesto prepoznavanja većine mikroorganizama što omogućuje iznimna raznolikost glikana^{146,154,157-162}.

Veliki broj glikanskih struktura je posljedica: razlika u sastavu monosaharida, različitih anomernih stanja te veza između monosaharida međusobno ili s proteinom (lipidom)^{163,164}. Pri tome, postoji više načina na koje glikani mogu biti vezani s proteinskom ili lipidnom osnovom:

- a) N-glikozilacija
- b) O-glikozilacija
- c) C-glikozilacija
- d) P-glikozilacija
- d) glikanska veza u GPI-sidrima
- e) glikanska veza u glikozaminglikanima

N-glikozilacija podrazumijeva vezanje glikana na dušikov atom aminokiseline asparagin u slijedu Asn-X-Ser/Thr/Cys (X može biti bilo koja aminokiselina osim Pro¹⁶⁴⁻¹⁶⁶). Najčešće je riječ o β-glikozidnoj vezi N-acetilglukoamina, ali, osim N-acetilglukoamina, na asparagin može biti vezana i glukoza (laminini sisavaca i arheja), N-acetilgalaktozamin (arheje), ramnoza (bakterije), a moguća je i veza između glukoze i Arg (slatki kukuruz).

U **O-glikozilaciji** glikan se veže na kisikov atom serina ili treonina pri čemu je na aminokiselinu najčešće vezan GalNAc (α -glikozidnom vezom kod mucina), ali može biti vezana i fukoza ili manoza (α -glikozidnom vezom), ksiloza (β -glikozidom vezom) te GlcNAc, galaktoza ili glukoza (α - ili β -glikozidnom vezom¹⁵⁴).

C-glikozilacijom nazivamo C-C glikozidnu vezu između manoze i ugljika prvog triptofana u aminokiselinskom slijedu Trp-X-X-Trp (X je bilo koja aminokiselina)¹⁵⁴.

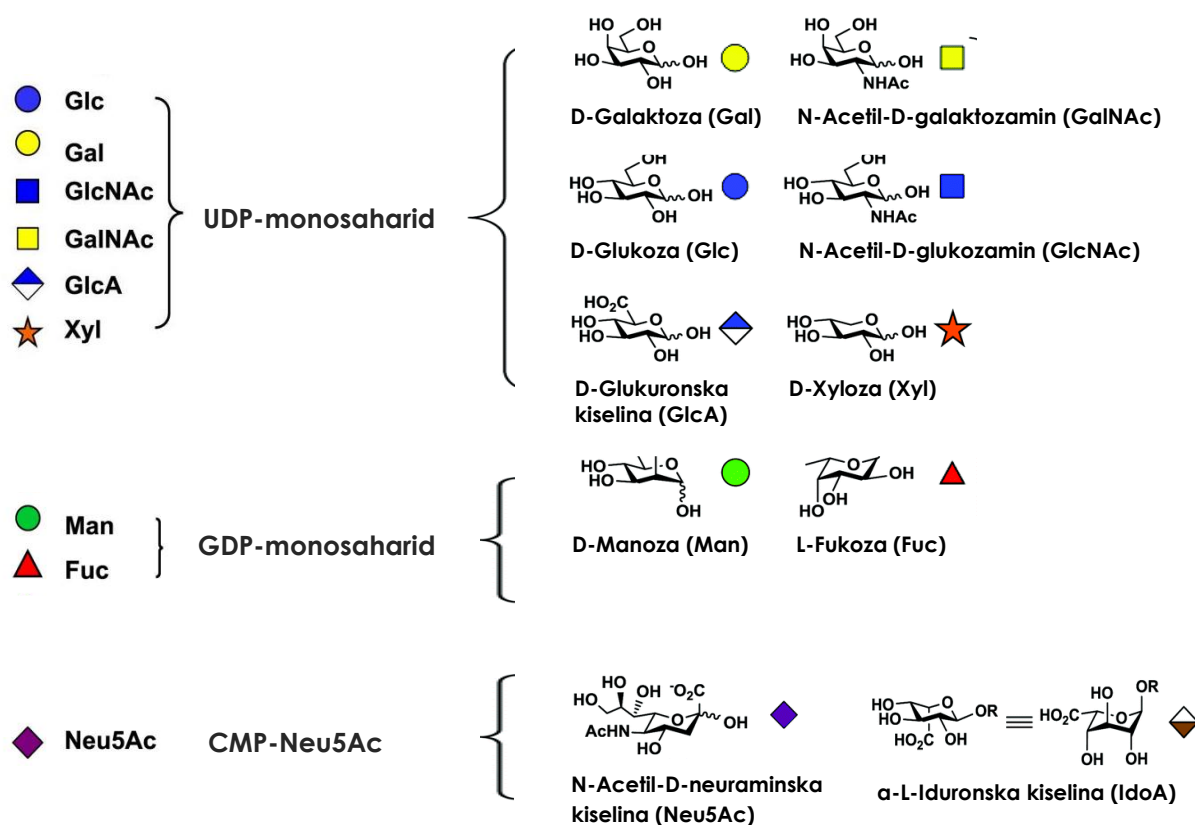
U **P-glikozilaciji** glikani su vezani na kisik fosfatne skupine fosfoserina¹⁶⁷, a u **glikozaminglikanima** na proteine su vezane linearne ponavljajuće disaharidne jedinice (heksozamin, heksoza ili heksuronska kiselina), dok je u **GPI sidru** glikan u ulozi poveznice između proteina i membranskog lipida¹⁵⁴.

Osim spomenutih razlika koje se odnose na glikanski dio, raznolikosti glikoproteina doprinosi heterogenost glikana kojom je definirana pojava različitih glikanskih struktura na različitim potencijalnim veznim mjestima istog glikoproteina pri čemu je glikoforma jedinstveni oblik proteina s obzirom na vezane glikane.

Također, na različitost glikana utječu i aminokiselinski slijed u proteinu¹⁶⁵, njegova konformacija¹⁶³, metabolizam glikana vezanih na nukleotid, brzina transporta glikoproteina te vremensko-prostorna organizacija glikozil-transferaza i glikozidaza¹⁵⁴.

Sastav glikoma, odnosno, vrste glikanskih struktura vezanih na određeni protein ili skupinu proteina, je relativno stabilan u jedinci, ali je interindividualna varijabilnost veoma velika¹⁶⁶ i najčešće je posljedica brojnih genetičkih polimorfizama važnih u biosintezi glikana te interakcija s okolišem. Najpoznatiji primjer takve varijabilnosti je ABO sustav krvnih grupa koji je posljedica tri različite varijante alela u genu koji kodira za glikoziltransferazu¹⁵⁴. Za razliku od letalnih mutacija koje utječu na osnovne korake u procesu glikozilacije¹⁶⁸, mutacije koje zahvaćaju gene uključene u modifikaciju završnih ogranaka glikanskih struktura su vrlo česte i vjerojatno su uzrok velikom broju interindividualnih fenotipskih varijacija koje se pojavljuju kod ljudi, ali i drugih vrsta.

Osnovne građevne jedinice svih glikanskih struktura kod sisavaca se mogu naći u sastavu 9 različitih nukleotidnih donora (Slika 10) što znači da se teorijski mogu posložiti u 10^{12} različitih struktura^{154,169}. Ipak, tek ih se manji broj sintetizira jer je ekspresija glikoma strogo regulirana, a uključuje kontrolu unutarstanične lokalizacije, katalitičke aktivnosti enzima, kompeticije supstrata te prijenosa između ER i GA^{170,171}.



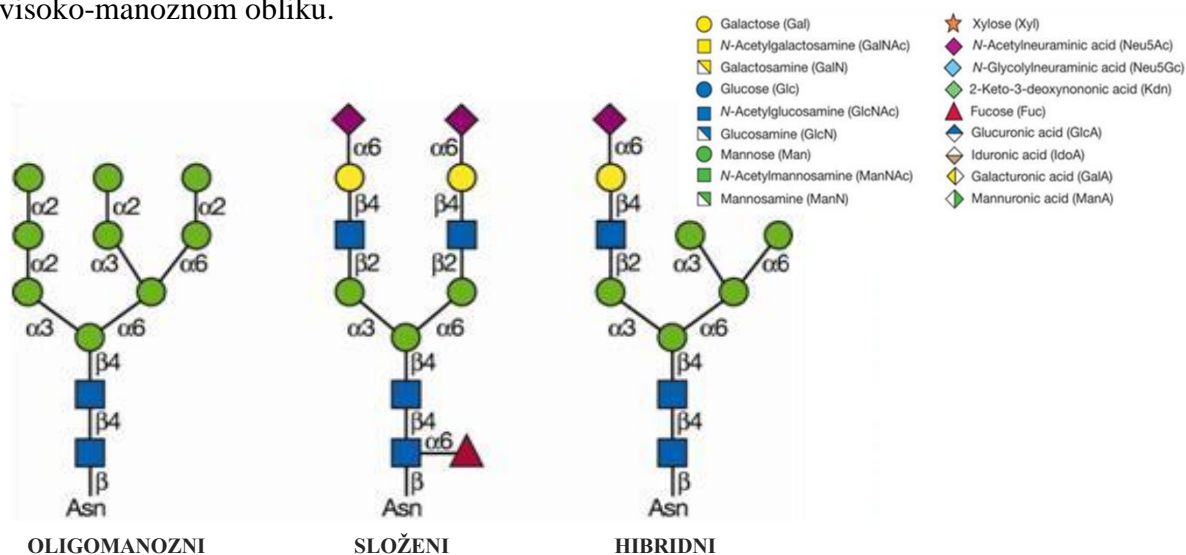
Slika 10. Najčešći monosaharidi u sastavu glikana sisavaca i njihovi nukleotidni donori
 (preuzeto iz: *One-pot multienzyme (OPME) systems for chemoenzymatic synthesis of carbohydrates*,
 Yu H, Chen X, 2016)

S obzirom na to da za sintezu glikana ne postoji kalup ili nasljedna uputa, kao u slučaju polipeptidnog dijela glikoproteina definiranog sekvencom nukleotida odgovarajućeg gena, ona je rezultat interakcije između stotina gena, njihovih proteinskih produkata i okolišnih faktora¹⁵⁴. Kompleksna mreža gena kontrolira proces glikozilacije proteina jer uz tkzv. „gliko-gene“, koji kodiraju glikoziltransferaze i glikozidaze, u glikozilaciji proteina sudjeluju i brojni transkripcijski faktori, protonske pumpe, transporteri, organizatori GA i drugi proteini¹⁵³.

2.6.2 N-GLIKANI

Glikani nastali N-glikozilacijom (Slika 11) mogu se podijeliti u tri skupine sa zajedničkom glikanskom osnovom $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$: **oligomanozni** (na glikansku osnovicu vezani su samo manozni monomeri), **složeni** (na glikansku osnovu su putem N-acetilglukozamina (GlcNAc) vezana dva ili više glikanskih ogranaka) i **hibridni** (s manoznim monomerima vezanima na $\text{Man } \alpha 1-6$ kraj i s jednim ili dva ogranka vezanima na $\text{Man } \alpha 1-3$ kraj).

Pristupačnost sržne glikanske strukture određuje koji će tip N-glikana nastati. Izloženijim strukturama enzimi lakše odcjepljuju manozu zbog čega mogu biti dodani ostali monosaharidi pri čemu nastaju složeni i hibridni N-glikani, dok manje pristupačne strukture ostaju u visoko-manoznom obliku.

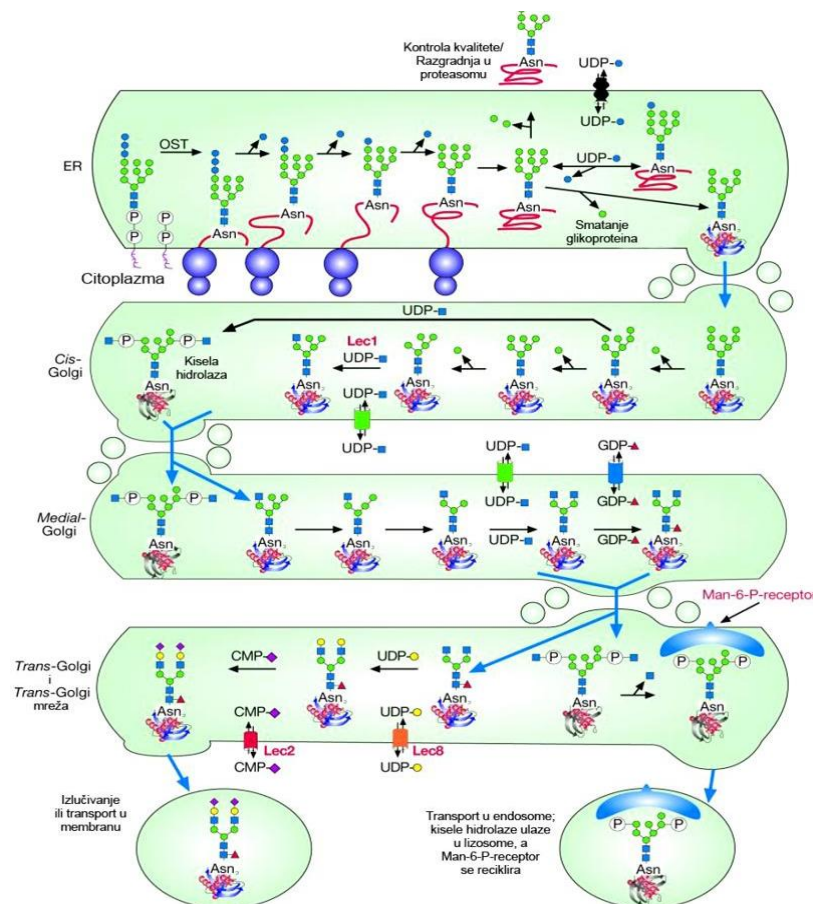


Slika 11. Prikaz simbola najčešćih monosaharida i njihovog značenja te tri osnovna tipa N-vezanih glikana, od kojih svaki sadrži jednaku sržnu strukturu $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ (preuzeto iz: *Essentials of Glycobiology*, Varki A et al, 2009)

2.6.2.1 SINTEZA N-GLIKANA

Eukariotski N-glikani nastaju prijenosom N-acetilglukozamin fosfata (GlcNAc-P) s uridin-5'-difosfat-N-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) na prekursor dolikol fosfat (Dol-P) s citoplazmatske strane strane ER pri čemu nastaje dolikol pirofosfat-N-acetilglukozamin (Dol-P-P-GlcNAc). Na prekursor se zatim veže 14 monosaharida pri čemu se, nakon dodavanja prvih 7, prekursor putem flipaza prenosi u lumen ER gdje se dodaju ostali monosaharidi. Zatim se cijela glikanska struktura oligosaharil transferazom (OST) kotranslacijski prenosi s Dol-P-P prekursora na protein koji se istovremeno translocira kroz membranu ER-a. Daljnja sinteza glikana odvija se putem glikozidaza i glikozil-transferaza

vezanih na membranu ER-a pri čemu je prvi korak uklanjanje glukoza putem α -glukozidaza I i II, a zatim slijedi uklanjanje terminalne α 1-2 manoze putem α -manozidaze I pri čemu nastaje oligomanozni tip N-glikana. Daljnjim uklanjanjem α 1-2 manoze u *cis*-GA putem enzima α 1-2 manozidaza IA, IB, IC, nastaju prekursori složenih i hibridnih oblika glikana na koje u medijalnom GA djeluju N-acetilglukozaminil-transferaza I (GlcNAc-T-I) koja dodaje GlcNAc i α -manozidaza II koja uklanja terminalne α 1-3 i α 1-6 vezane manoze. Nakon toga, GlcNAc-T-II dodaje GlcNAc pri čemu nastaje prekursor za biantenarne složene glikane, a ako u prethodnom koraku α -manozidaza II nije uklonila sve manoze, nastaje prekursor za hibridne glikane. Aktivnošću GlcNAc-T-IV i vezanjem GlcNAc-a nastaje prekursor tri- i tetraantenarnih glikana, a računajući GlcNAc dodaje enzim GlcNAc-T-III i to u pravilu nakon djelovanja manozidaza i ostalih N-acetilglukozaminil-transferaza jer inhibira njihovu aktivnost. U *trans*-GA glikani se modificiraju na 3 glavna načina: vezanjem monosaharida na sržni dio strukture, produžavanjem ogranaka vezanjem šećera na terminalni GlcNAc i završavanjem ogranaka α -glikozidnom vezom¹⁵⁴. Glikoziltransferaze i glikozidaze su iznimno osjetljive na promjene uvjeta u stanici. Stoga, konačan oblik glikana ovisi o fiziološkom i biokemijskom stanju stanice te se često mijenja u raznim patološkim procesima.



Slika 12. Sinteza N-glikana (preuzeto iz: *Essentials of Glycobiology*, Varki A et al, 2009)

2.6.3 GLIKOZILACIJA U TUMORU

Nepravilna glikozilacija u tumorskim stanicama je specifična s obzirom na stanicu (tip tumora), protein ili dio proteina i najčešće je posljedica nepotpune sinteze^{172,173} ili neosinteze koje su rezultat promjene u ekspresiji¹⁷³⁻¹⁷⁵ ili lokalizaciji^{170,171} glikoziltransferaza, promjena u tercijarnoj strukturi proteina¹⁷⁶ te dostupnosti nukleotidnih donora i akceptora monosharida¹⁷⁷. Poremećaji glikozilacije povezani s onkogenom transformacijom su najčešće promjene u: sijalinizaciji, fukozilaciji, sintezi O-glikana (sinteza T ili Tn antigena) te u grananju glikana^{168,178}.

Porast razine sijalinske kiseline u tumoru je posljedica povišene razine polisijalinske kiseline^{179,180} te povišene ekspresije antigena SLe A/X (povećavaju rizik od pojave metastaza zbog porasta negativnog naboja na površini stanice i zbog interakcija između SLe X i selektina važnih za adheziju tumorskih stanica na vaskularni endotel pri metastaziranju^{151,152,181}).

Povišene razine razgranatih N-glikana s vezanim N-acetilaktozaminom u tumoru uzrokuju pojačano vezanje galektina i stvaranja rešetkastih struktura¹⁶² koje potiču neoplastičnu transformaciju, angiogenezu i stvaranje metastaza¹⁸².

2.6.3.1 GLIKOZILACIJA U DUKTALNOM ADENOKARCINOMU GUŠTERAČE

Neki od navedenih poremećaja glikozilacije u tumoru karakteristični su i za duktalni adenokarcinom gušterače pri čemu je trenutno najpoznatiji serološki biomarker za ovaj tip tumora upravo ugljikohidratni antigen 19-9 (CA19-9) koji prepoznaje epitope SLe A²¹, sijaliziranog antigena čija je razina znatno povišena u duktalnom adenokarcinomu gušterače²¹.

Ostale promjene glikozilacije povezane s ovim tipom tumora su:

- a) **povišena razina fukozilacije:** haptoglobina²¹, određenih tumorskih antigena (od engl. *CarcinoEmbryonic Antigen related Cell Adhesion Molecule*, CEACAM) i mucina¹⁸³
- b) **povišena razina N-glikoproteina**¹⁸⁴
- c) **pojava egzosoma s vezanim proteoglikanom 1**¹⁸⁵
- d) **povišena ekspresija ST3Gal III**^{176,186} zbog čega raste razina glikana s α 1-3 vezanom sijalinskom kiselinom, a smanjuje se razina glikana s α 1-6 vezanom sijalinskom kiselinom što rezultira slabijom vezom između tumorske stanice i ekstracelularnog matriksa, odnosno, povećanim metastatskim potencijalom.

2.6.4 GLIKOZILACIJA U DIJABETESU

Glavne karakteristike dijabetesa (poput neosjetljivosti na inzulin, poremećaja izlučivanja inzulina i hiperglikemije) znatno utječu na glikozilaciju proteina¹⁸⁷.

Dva glavna mehanizma kojima se mijenja glikozilacija u dijabetesu su: ne-enzimski i enzimski. Ne-enzimski put potiče visoka razina glukoze u tjelesnim tekućinama pri čemu glukoza reagira s aminokiselinom lizin nakon čega dolazi do sinteze štetnih produkata glikacije (od engl. *Advanced Glycation End products*, AGE) obično povezanih s procesima starenja. Enzimskim putem glikozilacija se može mijenjati na razini poremećaja O-glikozilacije¹⁸⁸, N-glikozilacije α 1 kiselog glikoproteina ili na razini vezanja GlcNAc monosaharida β 1,4 glikozidnom vezom¹⁸⁹.

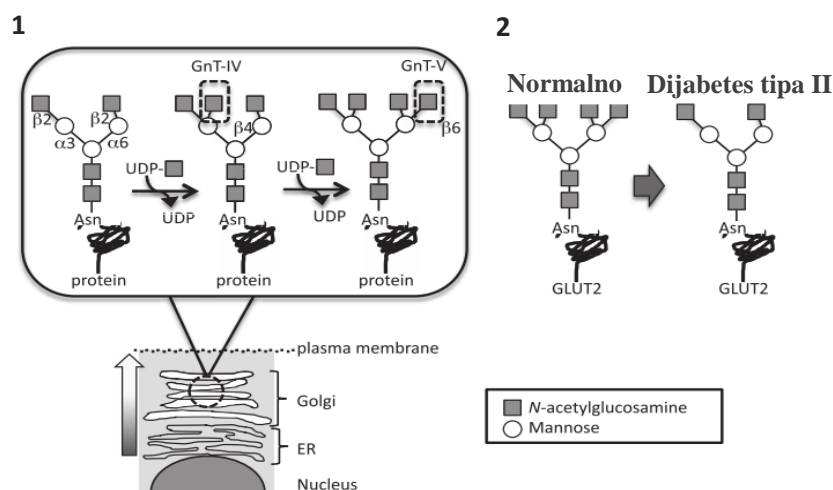
Također, u enzimске putove ubrajamo i sniženje razine α 1,6 monogalaktoziliranih sržno fukoziliranih diantenarnih N-glikana¹⁹⁰ gdje zbog smanjene aktivnosti enzima α 1-6 fukoziltransferaze (FUT 8), kompetitivni enzim β 1-4 galaktoziltransferaza (β GalT) pojačano dodaje terminalnu galaktozu na monogalaktozilirane glikane pri čemu u serumu nastaju digalaktozilirani diantenarni glikani, a smanjuje se razina monogalaktoziliranih¹⁹¹. Povećana aktivnost β GalT enzima u dijabetesu¹⁹², osim zbog snižene razine enzima s kojima je u kompeticiji, rezultat je i povećane razine njegovog supstrata, donora monosaharida UDP-galaktoze nastale od UDP-glukoze (povišene razine u dijabetesu) djelovanjem epimeraze UDP-galaktoze¹⁹³. Višak glukoze se može prevesti i u UDP-GlcNAc koji je glavni donor šećera za enzim O-GlcNAc transferazu (OGT) koji katalizira reverzibilnu posttranslacijsku O-glikozilaciju i doprinosi povišenju razine O-GlcNAc monosaharida na proteinima jezgre i citoplazme¹⁹⁴. Također, visoka razina glukoze utječe na promjenu transkripcijske aktivnosti Sp1 proteina čime se povisuje ekspresija inhibitora plazminogenog aktivatora-1 (PAI-1) u stanicama glomerula bubrega zbog čega dolazi do smanjene sinteze heparan sulfata u bazalnoj membrani glomerula što rezultira proteinurijom¹⁴⁶. Osim proteinurije, jedna od čestih posljedica dijabetesa je i retinopatija pri čemu je u očnoj vodici u dijabetesu povišena sijalinizacija i općenito razina N-glikana¹⁹⁵.

2.6.4.1. GLIKOZILACIJA U PODTIPU DIJABETESA MODY3

Promjene glikozilacije u dijabetesu su različite i brojne te mogu biti karakteristične za pojedini tip dijabetesa. Podtip dijabetesa MODY3 se značajno razlikuje po glikanskom profilu od ostalih tipova dijabetesa, posebno u razini sržne fukozilacije. Nedavno provedeno GWAS istraživanje N-glikoma plazme u ljudi pokazalo je da je gen *HNF1A* važan regulator

fukozilacije proteina te je također utvrđena povezanost malih nukleotidnih polimorfizama gena *HNF1A* s razgranatošću glikanskih struktura⁵. Osim toga, analiza glikozilacije proteina plazme provedena na 800 ljudi prosječne populacije, kod kojih je u 200 ljudi utvrđen podtip dijabetesa MODY3, jasno je razdvojila oboljele (od navedenog podtipa dijabetesa) od zdravih ljudi na temelju statistički značajno smanjene količine glikanskih struktura s antenarnom fukozom⁶. Načini na koji protein HNF1A regulira fukozilaciju su kontrola sinteze prekursora (gvanozin difosfat fukoze) te regulacija ekspresije fukoziltransferaza 3, 6 i 8^{5,196}.

S obzirom na to da prehrana bogata masnim kiselinama uzrokuje sniženje ekspresije gena *HNF1A*, očita je njegova važna uloga u regulaciji metaboličkih putova koji uključuju odgovor β stanica Langerhansovih otoka gušterače na nutrijente. U predloženom mehanizmu kontrole metaboličkih putova, protein HNF1A regulira ekspresiju gena *Mgat4a* koji sadrži čak četiri vezna mjesta za transkripcijski faktor HNF1A. Gen *Mgat4a* kodira glikoziltransferazu Gnt-4a koja katalizira vezanje GlcNAc-a β 1,4 glikozidnom vezom na mnoge proteine u koje se ubraja i GLUT2, transporter glukoze na površini β stanica. Na pravilno glikoziliran GLUT2 transporter vezan je složeni tetraantenarni N-glikan koji najčešće nije sijaliniziran, a sadrži terminalne galaktoze vezane na GlcNAc i glavna uloga mu je vezanje galektina gušterače pri čemu nastaje mreža povezanih glikana i galektina koja stabilizira glukozni transporter GLUT2 na površini β stanice. U slučaju smanjene ekspresije gena Gnt-4a dolazi do nepravilne glikozilacije GLUT2 i, umjesto tetraantenarnog, sintetizira se biantenarni N-glikan (Slika 13).



Slika13. Struktura N-glikana na transporteru GLUT2 u β stanicama gušterače

(1) Transport nascentnog proteina GLUT2 do plazma membrane kroz ER i GA gdje je isti glikoziliran putem Gnt-4a glikoziltransferaze

(2) U normalnim stanicama gušterače na transporter GLUT2 je vezan tetraantenarni N-glikan, a u dijabetesu tipa II na transporter GLUT2 vezan je biantenarni N-glikan

(preuzeto iz: *Sugar chains: decoding the functions of glycans*, Group of authors, 2015)

Zbog poremećene glikozilacije dolazi do promjena u prijenosu proteina GLUT2 kroz GA te se skraćuje poluživot tog transportera na staničnoj površini pri čemu se on premješta u mikrodomene lipidnih splavi. Osim toga, nepravilna glikozilacija transportera GLUT2 uzrokuje akumulaciju GLUT2 u stanici, odnosno, u endosomima i lizosomima gdje dopijeva putem endocitoze uzokovane promjenama citoskeleta β stanica¹⁹⁷.

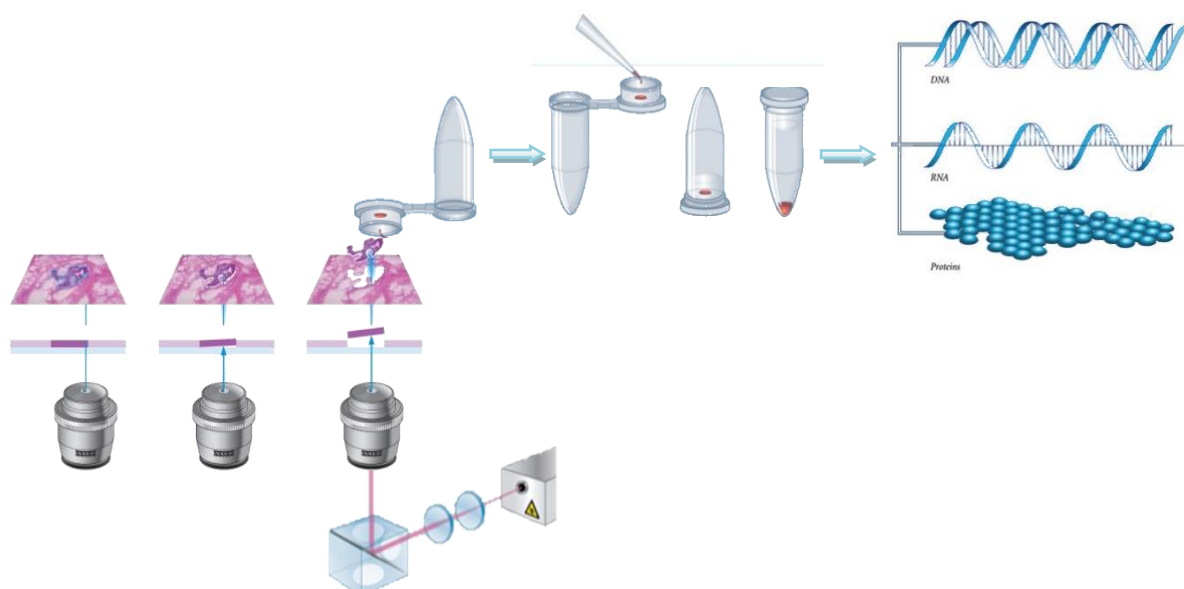
Budući da ovisi o glikoziltransferazi Gnt-4a, čija je ekspresija utišana u slučaju prehrane bogate masnim kiselinama¹⁴⁶, glikozilacija transportera GLUT2 je još jedan od procesa koji povezuje proizvodnju inzulina i način prehrane koji predstavlja povećan rizik od pojave dijabetesa tipa II.

Korelacija CpG-metilacije gena *HNF1A* i N-glikana plazme sugerira da bi i epigenetičko utišavanje moglo biti uzrokom pojave podtipa dijabetesa MODY3⁷. S obzirom na to da mutacije u genu *HNF1A* uzrokuju podtip dijabetesa MODY3, te da su u plazmi pacijenata oboljelih od tog podtipa dijabetesa promijenjene iste glikanske strukture koje koreliraju s promjenom metilacije gena *HNF1A*, hipoteza je da bi epigenetičko utišavanje gena *HNF1A* također moglo dovesti do razvoja ove bolesti. Poremećaji u glikozilaciji proteina te epigenetička deregulacija i mali nukleotidni polimorfizmi gena *HNF1A* uočeni su u oba tipa dijabetesa - dijabetesu tipa II i podtipu dijabetesa MODY3 što sugerira da sličan mehanizam patogeneze sudjeluje u razvoju oba tipa dijabetesa.

2.7 LASERSKA MIKRODISEKCIJA

Laserska mikrodisekcija je metoda izolacije specifičnih tkiva, stanica, kromosoma, organela ili mikroskopski sitnih čestica iz heterogenog biološkog uzorka upotrebom mikroskopa (za identifikaciju željenog uzorka) i lasera (za mikrodisekciju).

S obzirom na valnu duljinu laserskog zračenja, najčešće se koriste automatizirani (robotski) IR i UV laserski mikrodisektori. Osnovni dijelovi laserskog mikrodisektora su mikroskop, izvor usmjerenog elektromagnetskog zračenja, laserska kontrolna jedinica, pomično postolje mikroskopa, kamera, pokretač tubice i kompjuter za upravljanje svim funkcijama mikrodisektora. Uzorak se promatra putem mikroskopa te se odabire željeni dio koji se zatim izrezuje putem lasera.



Slika 14. Prikaz laserske mikrodisekcije i bezkontaktnog prijenosa mikrodisektiranog tkiva laserskim pulsom

Oštećenje tkiva svedeno je na najmanju moguću mjeru upotrebom usmjerenog snopa svjetlosti valne duljine 337 nm koja pripada UV dijelu vidljivog spektra koju ne apsorbiraju biološke makromolekule. Ovaj tip mikrodisekcije naziva se hladna ablacija tkiva u kojoj ne dolazi do oštećenja biološkog uzorka toplinom. Visokoj razlučivosti (selektivnosti) doprinosi i mogućnost disekcije vrlo malih površina ($1 \mu\text{m}^2$) što je posljedica malog promjera laserskog fokusa ($1 \mu\text{m}$). Uži laserski snop velike gustoće fotona (koncentriranih na malu površinu) smanjuje oštećenje uzorka jer se reducira površina izložena mikrodisekciji, a posebna PEN (polietilen naftalat) membrana na koju se nanosi uzorak dodatno apsorbira energiju elektromagnetskog zračenja zbog čega je smanjen učinak fotokemijskog efekta na molekule u

uzorku te ne dolazi do porasta njihove kinetičke energije i oslobađanja topline. Također, laserski puls traje samo 1 ns te je izlaganje tkiva štetnom djelovanju zračenja iznimno kratko i onemogućen je porast temperature uzorka (za razvoj maksimalne temperature od 90°C potrebno je tek nekoliko milisekundi) što osigurava očuvanje vijabilnosti živog uzorka, a prikupljena količina homogenog (čistog) biološkog materijala dovoljna je za detaljnu molekularnu analizu.

U skladu s navedenim, moguće je izolirati molekule DNA, RNA, proteine ali i metabolite što omogućava upotrebu širokog raspona metoda za analizu izoliranih molekula (PCR, analize mutacija i polimorfizama, LOH, FISH, epigenetičke analize, masena spektrometrija, analize putem antitijela, hibridizacija na mikročipovima...). Na taj način, moguće je analizirati biološki uzorak na razini sekvence DNA, epigenetičkih modifikacija, transkripcije, translacije pa čak i posttranskripcijskih i posttranslacijskih modifikacija te metaboličkih funkcija stanice. Laserska mikrodisekcija nalazi primjenu u velikom broju različitih znanstvenih područja jer omogućuje analizu raznovrsnih animalnih i biljnih uzoraka (histološki preparati, žive stanice i stanične kulture, razmazi, forenzički preparati). Širokoj primjeni ove metode pridonosi i njena prilagodljivost s obzirom na pripremu biološkog uzorka koji, osim što može biti živ ili fiksiran, također može biti i smrznut, uklopljen u parafin, obojen te fluorescentno obilježen.

S druge strane, zbog visoke razlučivosti, koristi se i u usko specijaliziranim područjima poput mikrokirurgije na substaničnoj razini ili u fertilizaciji *in vitro* (uloga u kontroli pokretanja spermija, otvaranju *zone pellucide*, embrijskom uklapanju te u biopsiji embrija za preimplantacijsku dijagnozu). Također, izolacija fetalnih stanica iz heterogenog tkiva ili cervikalnog brisa omogućuje analizu kromosomskih aberacija, genskih mutacija ili individualnog genotipa (putem mikrosatelitnih ponavljanja). Osim u reproduktivnoj biologiji i prenatalnoj dijagnostici¹⁹⁸, laserska mikrodisekcija koristi se i u istraživanju tumora (selekcija specifičnih tumorskih stanica i molekularna analiza na razini njihove sekvence omogućuju mutacijsko kartiranje te analizu kancerogeneze^{199–202}), u neuroznanosti (izolacija pojedinačnih neurona²⁰³), patologiji²⁰⁴, regenerativnoj medicini²⁰⁵, transplantaciji organa^{206,207}, ali i u botanici te zoologiji (izolacija staničnih organela, fuzija citoplazmi jednostaničnih praživotinja, disekcija mikroskopski sitnih organizama i njihovih dijelova) te općenito u citogenetici (izolacija pojedinačnih kromosoma ili kromosomskih regija u svrhu proizvodnje specifičnih sonda ili za analizu kromosomskih lomova i translokacija).

Također, iznimno je važna u genetičkom inženjerstvu gdje omogućuje bezkontaktni prijenos genetičkog materijala u žive stanice ili između stanica, a koristi se i u forenzici (izolacija

mikroskopski sitnih čestica s adhezivne forenzičke vrpce ili specifičnih stanica iz heterogenog uzorka i genetičko profiliranje u svrhu identifikacije).

S obzirom na njen značaj u raznim znanstvenim područjima, laserska mikrodisekcija postala je nezamjenjiva metoda u analizi na razini mikroskopski sitnih uzoraka što je još uvijek prepreka u velikom broju istraživanja te će se u budućnosti područje njene primjene sigurno još i povećati.

3. MATERIJALI I METODE

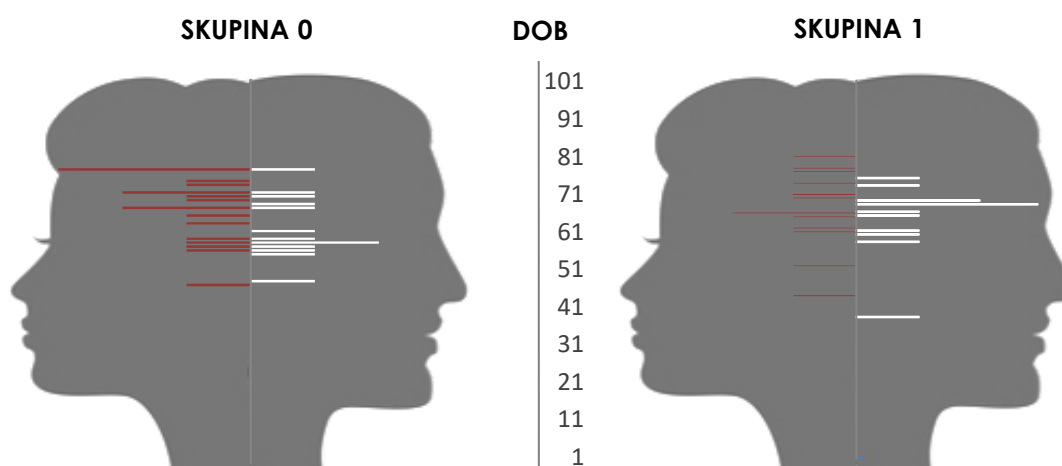
3.1 UZORCI PACIJENATA

Istraživanje sam provela na pacijentima oboljelima od dukalnog adenokarcinoma gušterače pri čemu je dijelu pacijenata utvrđen dijabetes te sam prema tome podijelila pacijente na skupinu s dijabetesom (skupina 1) i na skupinu bez dijabetesa (skupina 0). Kriteriji za uključivanje bili su postavljena dijagnoza dijabetesa te dostupnost i kvaliteta biološkog materijala. Odobrenje za analizu ljudskih uzoraka dobiveno je od Etičkog povjerenstva Kliničke bolnice Merkur u sklopu istraživanja „Epigenetička regulacija ekspresije gena *HNF1A* i *MGAT3* u β stanicama gušterače dijabetičara“ u sklopu FP7 projekta IBD-BIOM (Seventh Framework Programme, Grant agreement No. 305479, Collaborative project *Diagnostic and prognostic biomarkers for inflammatory bowel disease IBD-BIOM*). Za potrebe istraživanja koristila sam samo uzorke prikupljene pri standardnom medicinskom postupku postoperativne histopatološke analize i nisam provela dodatna uzorkovanja isključivo u svrhu znanstvenog istraživanja. U Tablici 3 navedeni su opći podaci o pacijentima uključenima u ovo istraživanje: spol, dob i prisutnost/odsutnost dijabetesa. Detaljni podaci o tipu dijabetesa, povijesti šećerne bolesti, antitumorskoj terapiji kao i vrijednosti rezultata laboratorijskih pretraga, nisu bili dostupni.

Prosječna dob svih pacijenata je 64 godine, udio žena je 53%, a muškaraca 47%.

U skupini 1 prosječna dob je 65 godina, a udio žena i muškaraca je 50% (Slika 15).

U skupini 0 prosječna dob je 64 godine, udio žena je 56%, a muškaraca 44% (Slika 15). Dobno-spolne razlike između skupina 1 i 0 su neznčajne i ne utječu na razliku metilacije i ekspresije gena *HNF1A* između navedenih skupina.



Slika 15. Prikaz dobno-spolne raspodjele pacijenata s obzirom na skupinu

Tablica 3. Opći podatci pacijenata oboljelih od adenokarcinoma gušterače.

IDENTIFIKACIJSKA OZNAKA*	DOB	SPOL	DIJABETES	PROSJEČNA DOB	UDIO ŽENA (%)	UDIO MUŠKARACA (%)			
1492	60	F	UTVRĐEN	65	50%	50%			
1578	57	M	UTVRĐEN						
1616	77	F	UTVRĐEN						
2024	65	F	UTVRĐEN						
2125	37	M	UTVRĐEN						
3611	65	F	UTVRĐEN						
3689	65	M	UTVRĐEN						
3969	60	M	UTVRĐEN						
4020	70	F	UTVRĐEN						
4518	80	F	UTVRĐEN						
4707	43	F	UTVRĐEN						
4748	51	F	UTVRĐEN						
5443	73	F	UTVRĐEN						
5493	67	M	UTVRĐEN						
5706	72	M	UTVRĐEN						
5926	68	M	UTVRĐEN						
5933	68	M	UTVRĐEN						
5977	74	M	UTVRĐEN						
6503	69	F	UTVRĐEN						
7137	59	M	UTVRĐEN						
7268	64	M	UTVRĐEN						
7269	64	F	UTVRĐEN						
7992	61	F	UTVRĐEN						
8428	67	M	UTVRĐEN						
8732	67	M	UTVRĐEN						
8855	76	F	UTVRĐEN						
93	55	M	NEUTVRĐEN				64	56%	44%
898	57	M	NEUTVRĐEN						
1285	58	M	NEUTVRĐEN						
2077	77	M	NEUTVRĐEN						
2628	56	M	NEUTVRĐEN						
3504	58	M	NEUTVRĐEN						
3790	73	F	NEUTVRĐEN						
4653	77	F	NEUTVRĐEN						
4976	69	F	NEUTVRĐEN						
5119	77	F	NEUTVRĐEN						
5246	71	F	NEUTVRĐEN						
5570	57	F	NEUTVRĐEN						
6761	70	F	NEUTVRĐEN						
7550	63	F	NEUTVRĐEN						
8269	71	M	NEUTVRĐEN						
8603	59	M	NEUTVRĐEN						
8674	77	F	NEUTVRĐEN						
8739	67	M	NEUTVRĐEN						
8882	47	F	NEUTVRĐEN						
8945	74	F	NEUTVRĐEN						
9005	67	F	NEUTVRĐEN						
9398	56	F	NEUTVRĐEN						
9615	48	M	NEUTVRĐEN						
10026	58	F	NEUTVRĐEN						
10060	70	M	NEUTVRĐEN						
10257	71	F	NEUTVRĐEN						
10432	67	F	NEUTVRĐEN						
10822	61	M	NEUTVRĐEN						
10865	59	F	NEUTVRĐEN						
11657	65	F	NEUTVRĐEN						
SVI ISPITANICI				64	53%	47%			

* Identifikacijska oznaka pacijenta dodijeljena je od strane Kliničke bolnice Merkur.

Zbog nedovoljne količine tkiva, analiza glikozilacije bila je moguća samo u slučaju ispitanika navedenih u Tablici 4.

Tablica 4. Uzorci uključeni u analizu glikozilacije

IDENTIFIKACIJSKA OZNAKA	TIP TKIVA
1492	NETUMORSKO I TUMORSKO
1578	TUMORSKO
1616	NETUMORSKO I TUMORSKO
2024	NETUMORSKO I TUMORSKO
2125	NETUMORSKO I TUMORSKO
3611	TUMORSKO
3689	TUMORSKO
3969	TUMORSKO
4020	TUMORSKO
4748	NETUMORSKO I TUMORSKO
5443	NETUMORSKO I TUMORSKO
5493	NETUMORSKO I TUMORSKO
5706	TUMORSKO
5926	NETUMORSKO I TUMORSKO
5933	NETUMORSKO I TUMORSKO
5977	NETUMORSKO I TUMORSKO
6503	TUMORSKO
7992	NETUMORSKO I TUMORSKO
8428	NETUMORSKO I TUMORSKO
93	NETUMORSKO
898	TUMORSKO
1285	NETUMORSKO
2077	TUMORSKO
2628	NETUMORSKO I TUMORSKO
3790	TUMORSKO
4653	NETUMORSKO I TUMORSKO
4976	TUMORSKO
5246	NETUMORSKO I TUMORSKO
5570	TUMORSKO
6761	NETUMORSKO I TUMORSKO
8603	NETUMORSKO I TUMORSKO
8674	TUMORSKO
9005	TUMORSKO
9398	NETUMORSKO I TUMORSKO
9615	NETUMORSKO I TUMORSKO
10026	TUMORSKO
10060	TUMORSKO
10257	NETUMORSKO I TUMORSKO
10432	NETUMORSKO I TUMORSKO
10865	NETUMORSKO I TUMORSKO

3.1.1. OPIS UZORAKA

U svim provedenim analizama (metilacije DNA, ekspresije gena i glikozilacije proteina) koristila sam isti biološki uzorak, tkivo gušterače prikupljeno pri operativnom uklanjanju tumorskog tkiva gušterače pacijenata oboljelih od dukalnog adenokarcinoma gušterače (najčešće putem Whippleove operacije, ovisno o lokalizaciji tumora).

Vremenski period unutar kojeg su prikupljeni uzorci trajao je od 2009. do 2016., a uzorkovanje (operativni zahvati) je provedeno u Kliničkoj bolnici Merkur.

Tkivo je nakon operacije fiksirano formalinom, uklopljeno u parafinske blokove te pohranjeno pri -20°C .

Za potrebe laserske mikrodisekcije, napravljeni su prerezi kocaka koji su naneseni na predmetna stakalca prevučena PEN membranama koje omogućuju bezkontaktni prijenos mikrodisektiranog tkiva (Slika 14).

Analizirala sam tri različita tipa tkiva iz prikupljenog tkiva gušterače:

- 1.) Langerhansovi otoci gušterače, LO (Slika 20)
- 2.) tumorsko tkivo gušterače, T (Slika 20)
- 3.) netumorsko tkivo gušterače, NT (Slika 20)

Kriteriji pri odabiru bioloških uzoraka (parafinskih blokova) bili su kvaliteta uklopljenog tkiva i dovoljna količina svih analiziranih tipova tkiva gušterače. Broj pacijenata oboljelih od adenokarcinoma gušterače bio je 30, a od adenokarcinoma gušterače i dijabetesa tipa II iznosio je 26. U slučaju svih pacijenata odabrala sam veći broj parafinskih blokova zbog neodgovarajuće zastupljenosti svih tipova tkiva u parafinskom bloku (primjerice, parafinski blokovi koji sadrže uglavnom tumorsko, odnosno, netumorsko tkivo gušterače).

Zbog male količine tkiva, analiza glikozilacije proteina bila je moguća samo u slučaju tumorskog i netumorskog tkiva ispitanika navedenih u Tablici 4. Iz istog razloga analiza ekspresije gena *HNF1A* nije bila moguća u slučaju Langerhansovih otoka gušterače, ali sam za 5 pacijenata ipak prikupila dovoljan broj prereza za mikrodisekciju (prosječno 200 Langerhansovih otoka po pacijentu).

3.2 STANIČNE LINIJE

3.2.1 HEK 293 (ATCC)

Stanice linije HEK 293 potječu od ljudskih embrionalnih stanica bubrega, hipotriploidne su ($2n=64$), adherentne, po morfologiji epitelne te transformirane ljudskim adenovirusom tipa 5. Vrijeme udvostručavanja im je otprilike 20 sati, a u trenutku transfekcije koristila sam 6. pasažu stanica.

3.2.2 1.1B4 (ECACC)

Stanice linije 1.1B4 potječu od ljudskih β stanica Langerhansovih otočića gušterače fuzioniranih sa stanicama linije PANC-1. Adherentne su, po morfologiji epitelne, promjera $35 \mu\text{m}$ te imaju sposobnost glukozom stimuliranog lučenja inzulina. Vrijeme udvostručavanja im je otprilike 32 sata, a u trenutku transfekcije koristila sam 7. pasažu stanica.

3.3 METODE

3.3.1 TRETMAN TKIVA UKLOPLJENOG U PARAFINSKI BLOK *ULOGA GENA HNF1A U ADENOKARCINOMU GUŠTERAČE I DIJABETESU*

3.3.1.1 UV-TRETMAN PEN MEMBRANE ZA MIKRODISEKCIJU

Neposredno prije nanošenja tkiva, predmetnice prevučene PEN membranom (Carl Zeiss) izložila sam tretmanu UV zračenjem valne duljine 254 nm na 45 min čime se povećava adhezivnost i omogućava prijanjanje tkiva na membranu.

3.3.1.2 REZANJE PARAFINSKOG BLOKA*

Prezezi tkiva debljine 2-4 μm dobiveni su upotrebom standardnog ručnog mikrotoma (Microm). Izrezani preparat je prebačen na zagrijanu destiliranu vodu, razvučen i postavljen na PEN membranu.

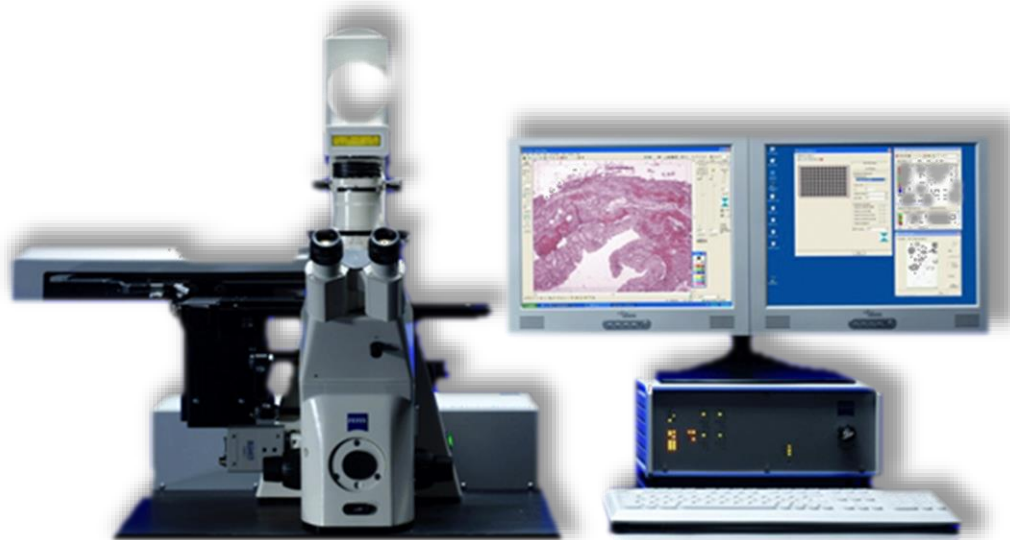
3.3.1.3. BOJANJE PREPARATA*

Prez tkiva je deparafiniziran trima inkubacijama od 2 minute u otopini za deparafinizaciju zagrijanoj na 56°C te inkubacijama od 1 minute u otopinama 100%-tnog, 96%-tnog i 70%-tnog etanola (navedenim redoslijedom) nakon čega su slijedila 2 ispiranja vodom. Bojanje prereza izvedeno je inkubacijom od 1 minute u otopini hematoksilina te inkubacijom od 10 sekundi u otopini eozina nakon čega su slijedile inkubacije od 1 minute u otopinama 70%-tnog, 96%-tnog i 100%-nog etanola (navedenim redoslijedom) i sušenje prereza na sobnoj temperaturi, nekoliko minuta. Nakon sušenja, obojeni preparati su pohranjeni na 4°C i odmah podvrgnuti laserskoj mikrodisekciji (vrijeme skladištenja membrana bilo je maksimalno 2 tjedna).

**Tretman tkiva nakon operacije, rezanje parafinskih blokova i bojanje tkiva napravila sam u suradnji s dr. S. Gašparovom i S. Hančić, bacc. med. lab. diagn., u Kliničkoj bolnici „Merkur“ u Zagrebu.*

3.3.1.4. LASERSKA MIKRODISEKCIJA

U ovom istraživanju koristila sam laserski mikrodisektor „PALM MicroBeam microdissector“ proizvođača Carl Zeiss GmbH (Slika 16) s invertnim fluorescencijskim mikroskopom Axiovert 200M i s mogućnošću fotoaktivirajuće lokalizacijske mikroskopije (od engl. *Photoactivated Localization Microscopy*, PALM) te izvedbe napredne verzije LCM (od engl. *Laser Capture Microdissection*) metode, LMPC (od engl. *Laser Microdissection Pressure Catapulting*) u kojoj se, osim za mikrodisekciju, laserski puls koristi i za prebacivanje mikrodisektiranog uzorka na čep tubice čime je omogućena bezkontaktna izolacija uzorka uz minimalan rizik od kontaminacije. Za upravljanje mikrodisektorom i vizualizaciju prereza koristila sam odgovarajući program PALM RoboSoftware.



Slika 16. PALM MicroBeam laserski mikrodisektor

(preuzeto iz: <https://www.businesswire.com/news/home/20060125006060/en/Carl-Zeiss-Contributes-100000-Barrow-Neurological-Foundation>)

Kao izvor UV-zračenja koristila sam pasivno Q-izmjenični Nd:YAG tip lasera s krutom jezgrom koja se sastoji od štapića itrij aluminijevog granata (YAG) dopiranog atomima neodimija u kojem se svjetlost emitira u kratkim pulsevima čime se povisuje energija usmjerenog zračenja fokusiranog objektivom visoke numeričke aperture (povećava razlučivost u sustavu invertnog mikroskopa gdje ona ovisi samo o difrakciji svjetlosti pri prolasku kroz leće).

Mikrodisekciju i katapultiranje dijelova prereza izvela sam pri povećanju od 10 x i jakosti halogenskog osvjetljenja od 50%. Pri tome je jakost lasera za mikrodisekciju bila u rasponu vrijednosti od 51 do 57, a dubina fokusa od 56 do 57, ovisno o debljini preparata. Jakost

lasera pri katapultiranju kretala se u rasponu vrijednosti od 70 do 100, a dubina fokusa od 56 do 57.

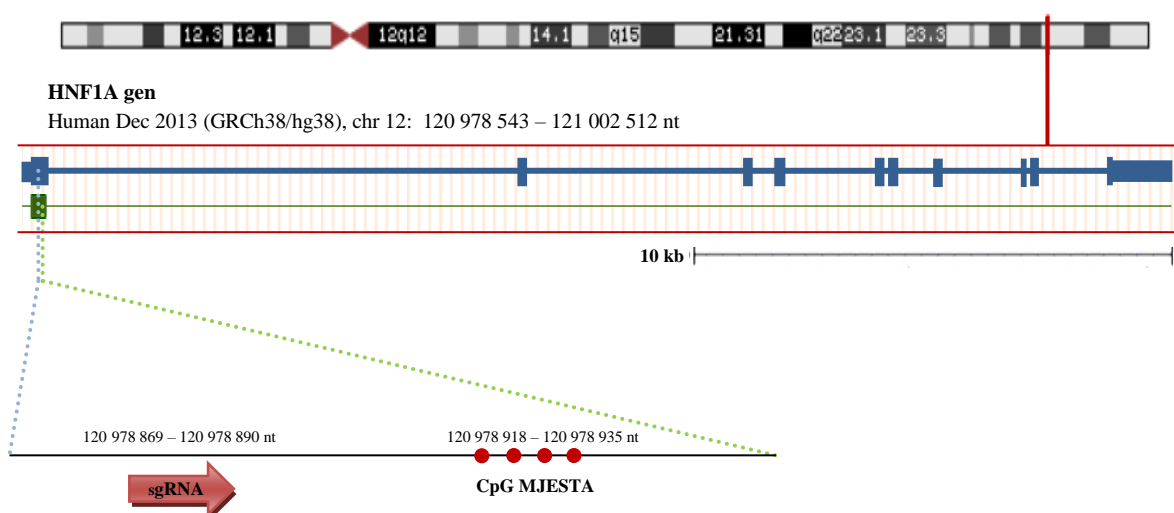
Mikrodisektirala sam tri tipa tkiva: Langerhansove otoke, tumorsko tkivo i netumorsko tkivo gušterače (Slika 20). Broj mikrodisektiranih dijelova u slučaju tumorskog i netumorskog tkiva iznosio je prosječno 120, a u slučaju Langerhansovih otoka ovisio je o njihovom broju u preparatu, a iznosio je od 20 do 70 pri čemu sam iz prereza mikrodisektirala sve Langerhansove otoke. Jedina iznimka su uzorci Langerhansovih otoka koje sam koristila u analizi ekspresije u slučaju kojih sam mikrodisektirala puno veći broj prereza (oko 200). Mikrodisektirana površina u slučaju tumorskog i netumorskog tkiva iznosila je prosječno 2 000 000 μm^2 , dok je u slučaju Langerhansovih otoka ovisila o broju i veličini otoka te je njena prosječna vrijednost 800 000 μm^2 (u slučaju analize ekspresije gena *HNF1A*, oko 2 000 000 μm^2). S obzirom na to da je površina β stanica Langerhansovih otoka i ostalih stanica gušterače otprilike 500 μm^2 , moguća je gruba procjena broja mikrodisektiranih stanica koji u slučaju tumorskog i netumorskog tkiva iznosi oko 4000 stanica po uzorku, a u slučaju Langerhansovih otoka oko 1500 stanica po uzorku (u slučaju analize ekspresije, oko 4000 stanica po uzorku).

3.3.2 STANIČNE LINIJE HEK 293 I 1.1B4

REGULACIJSKA ULOGA METILACIJE GENA *HNF1A* U NJEGOVOJ EKSPRESIJI

3.3.2.1 KONSTRUKCIJA MOLEKULARNOG ALATA ZA DEMETILACIJU

Konstrukcija, optimizacija i validacija aktivnosti molekularnog alata napravljeni su u laboratoriju grupe za epigenetiku pod vodstvom prof. Vlatke Zoldoš od strane mag. biol. mol. Vanje Tadić. Pri tome je kao okosnica korišten mutirani plazmid pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462 V2.0; Addgene br. 62987) bez nukleazne aktivnosti koji kodira za protein za rezistenciju na antibiotik puromicin te za protein Cas9 na čiji je kraj dodan peptidni linker Gly₄Ser, a C-terminalno od peptidnog linkera ubačena je katalitička domena TET1 enzima (konstruirane su varijante s aktivnom i inaktivnom podjedinicom TET1 proteina). Na kraju je u plazmid uklonirana sgRNA koja odgovara u genomu jedinstvenoj regiji DNA dugačkoj 21 nukleotid koja koja na svom 3' kraju završava sa sekvencom PAM (NGG), a od potencijalno regulatorne regije udaljena je 28 nukleotida.



Slika 17. Prikaz smještaja gena *HNF1A* na 12-om kromosomu te rasporeda njegovih eksona (tamnoplavi pravokutnici), introna (tamnoplave linije) te CpG otoka (zeleni pravokutnik) od 5' do 3' kraja (smjer transkripcije). Uvećano je prikazana regija u prvom eksonu u kojem se nalaze 4 potencijalno regulacijska CpG mjesta te vezno mjesto molekule sgRNA za navođenje konstrukta za demetilaciju DNA pri čemu se na vrhu strelice nalazi PAM sekvenca.

3.3.2.2 UZGOJ STANICA U KULTURI

Stanice linije 1.1B4 uzgajala sam pri 37°C i 5% CO₂, u mediju RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640*, Sigma Aldrich) koji sadrži L-glutamin, a naknadno su mu dodani FBS (od engl. *Fetal Bovine Serum*, Sigma Aldrich) u konačnom udjelu od 10% te antibiotici penicilin (100 U/ml, Lonza) i streptomycin (100 µg/ml, Lonza). Stanice linije HEK 293 uzgajala sam u istim uvjetima, ali u mediju DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Sigma Aldrich) u koji je, uz FBS i antibiotike, dodan i L-glutamin (Lonza) do konačne koncentracije od 10 mM. Za ispiranje stanica koristila sam otopinu 1 x PBS (od engl. *Phosphate Buffered Saline*), a za tripsinizaciju pri presađivanju koristila sam 0,25%-tnu otopinu tripsina u EDTA (Sigma Aldrich) u omjeru 1:5 s obzirom na odgovarajući volumen medija u jažici. Tripsinizaciju stanica izvodila sam pri temperaturi od 37°C, na otprilike 3 min, a istu sam prekidala medijem u barem dvostrukom volumenu s obzirom na volumen tripsina.

3.3.2.3 TRANSFEKCIJA

U slučaju obje stanične linije transfekciju sam izvela komercijalno dostupnim reagensom (Lipofectamine 3000, Thermo Fisher Scientific) koji se temelji na fuziji micela lipidnih kationa (koji okružuju plazmidnu DNA) s membranom stanica u trenutku njihove diobe. Koristila sam protokol proizvođača, varijantu za pločicu od 6 jažica. Stanice sam nasadivala dan prije transfekcije tako da u trenutku transfekcije konfluentnost bude 70-90% (oko 700 000 stanica). Masa plazmidne DNA za transfekciju jedne jažice iznosila je 800 ng, a za razrjeđivanje plazmidne DNA koristila sam medij OptiMEM (Gibco).

Koristila sam 3 različita plazmida za transfekciju:

1. plazmid s aktivnom TET1 podjedinicom i specifičnom sgRNA – u svrhu specifične demetilacije
2. plazmid s neaktivnom TET1 podjedinicom i specifičnom sgRNA – u svrhu potvrde da je demetilacija posljedica samo aktivnosti dCas9-TET1 fuzijskog proteina
3. plazmid s aktivnom TET1 podjedinicom i nespecifičnom sgRNA – u svrhu kontrole specifične aktivnosti dCas9-TET1 fuzijskog proteina

Također, u svakoj transfekciji prisutna su 2 uzorka kontrolnih stanica podvrgnutih transfekciji bez plazmidne DNA pri čemu je jedan od njih služio kao kontrola selekcije. U slučaju obje stanične linije, transfekciju sam izvela u dvije replike, ali sam kod stanica linije 1.1B4, zbog male efikasnosti transfekcije, replike spojila u isti uzorak. 6 sati nakon transfekcije, isprala sam stanice i promijenila im medij zbog toksičnosti reagenasa za transfekciju.

3.3.2.4 SELEKCIJA

Svi korišteni plazmidi imali su ugrađen gen za rezistenciju na antibiotik puromicin čime je omogućena selekcija, tj., povećanje broja transfeciranih stanica u odnosu na netransfecirane. Selekciju transfeciranih stanica započela sam 24 sata nakon transfekcije, dodavanjem puromcina u medij do konačne koncentracije od 1 µg/ml (Life Technologies). U slučaju stanica linije HEK 293 transfekcija je trajala 48 sati, a u slučaju stanica linije 1.1B4 96 sati nakon čega sam isprala stanice otopinom 1 x PBS (Lonza) te ih oporavljala u odgovarajućem mediju. Pri tome su u slučaju stanica linije 1.1B4 i nakon 96 sati u kontroli selekcije bile prisutne netransfecirane stanice, dok je stanica podvrgnutih transfekciji plazmidima bilo jako malo zbog čega sam prekinula selekciju prije samog kraja (prije smrti svih stanica iz kontrole selekcije) te je u slučaju stanica linije 1.1B4 ona nepotpuna.

3.3.3 ANALIZA METILACIJE DNA

Većina metoda analize metilacije DNA zahtijeva predtretman molekule DNA prije daljnjih analitičkih postupaka pri čemu su najčešći postupci: restrikcija endonukleazama osjetljivima na metilnu skupinu, obogaćenje uzorka metiliranom DNA i bisulfitna konverzija.

Kombinacija predtretmana i različitih naknadnih analitičkih postupaka rezultirala je velikim brojem metoda, a u ovom istraživanju globalnu genomsku metilaciju te metilaciju specifične regije u genu *HNF1A* (fragment H) odredila sam metodom pirosekvenciranja bisulfitno konvertirane molekule DNA. Kako bih provjerila je li proces metilacije u uzorcima poremećen, analizirala sam metilaciju regije LINE1 (fragment L) koja čini 17% ljudskog genoma i predstavlja najveću skupinu dugih retrotranspozona s ponavljajućim krajevima¹⁰³.

3.3.3.1 IZOLACIJA DNA

Ukupnu DNA izolirala sam odmah nakon mikrodisekcije, tj., 8. dan nakon transfekcije u slučaju staničnih linija, blagom digestijom proteazom K. Mikrodisektirano tkivo sam nastavkom pipete i digestijskim puferom isprala s adhezivne površine čepa tubice za mikrodisekciju i prebacila u tubicu za mikrocentrifugiranje te inkubirala preko noći u 50 µl digestijskog pufera (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,5% Tween 20) i 2 µl proteaze K (Protease K, Qiagen) na 37°C, uz protresanje od 450 rpm. Stanice sam, nakon tripsinizacije, prebacila u tubice, centrifugirala 5 min pri 1500 rpm nakon čega sam odstranila supernatant te isprala stanice u 200 µl pufera 1 x PBS. Zatim sam stanice ponovno centrifugirala 5 min pri 1500 rpm nakon čega sam odstranila supernatant te sam ih resuspendirala u 100 µl digestijskog pufera i 2 µl proteaze K i inkubirala preko noći na 37°C, uz protresanje od 450 rpm. Proteazu K sam inaktivirala sljedeći dan, inkubacijom digestijske smjese na 95°C od 8 min koju sam zatim centrifugirala pri 13 000 rpm na 30 s. Supernatant u kojem se nalazi izolat DNA sam prebacila u novu tubicu za mikrocentrifugiranje i pohranila na -20°C.

3.3.3.2 BISULFITNA KONVERZIJA

Od ukupnog volumena izolirane DNA, u slučaju FFPE tkiva, 40 µl podvrgnula sam tretmanu natrijevim bisulfitom primjenom standardiziranog kompleta reagensa (EpiTect Bisulfite Kit, Qiagen) prema uputama proizvođača prilagođenima za formalinom fiksirano tkivo uklopljeno u parafin, dok sam u slučaju staničnih linija koristila volumen od 10 µl izolirane DNA te komplet reagenasa (EZ DNA methylation Kit, Zymo Research) pri čemu sam slijedila upute proizvođača.

3.3.3.3 PCR (od engl. *Polymerase Chain Reaction*)

Bisulfitno konvertiranu DNA umnožila sam komercijalnim kompletom reagenasa (PyroMark PCR Kit, Qiagen) po uputama proizvođača. Razlika između PCR reakcije u svrhu pirosekvenciranja i standardne PCR reakcije je u upotrebi biotiniziranih početnica koje omogućuju vezanje PCR produkta na kuglice sefaroze obložene streptavidinom (GE Healthcare). Volumen bisulfitno konvertirane DNA pri umnažanju fragmenta H iznosio je 4 µl u slučaju mikrodisektiranog tkiva te 2 µl u slučaju stanične DNA, a pri umnažanju fragmenta L isti je iznosio 2 µl za oba tipa uzorka pri čemu sam umnažala po 2 replike uzoraka. Uvjeti PCR reakcije prikazani su u Tablici 5, a u Tablici 6 prikazane su sekvence početnica za umnažanje i pirosekvenciranje. Kao standarde reproducibilnosti PCR reakcije koristila sam bisulfitno konvertirane izolate DNA staničnih linija PANC-1 i 1.1B4 (u kojima je analizirana regija gena *HNF1A* visoko metilirana) te CaCo2, CoLo-205 i HepG2 (s niskom metilacijom fragmenta H).

Tablica 5.

UVJETI ODVIJANJA PCR REAKCIJA						
Korak	T (°C)	„Assay“ HNF1A	T (°C)	„Assay“ LINE1	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95		95		15 min	1
Denaturacija	95		95		30 s	
Prijanjanje	54,4		58		30 s	50
Elongacija	72		72		30 s	
Završna elongacija	72		72		10 min	1
Zadržavanje	4		4		∞	1

Tablica 6.

OLGONUKLEOTIDI	SEKVENCA	MODIFIKACIJA 5' KRAJA	MODIFIKACIJA 3' KRAJA	PROIZVOĐAČ
HNF1A_F početnica	5'-GGA TAA GGG GGA GTT TTG-3'			Metabion, Njemačka
HNF1A_R početnica	5'-AAG GGG GAG TTT-3'	biotin		Metabion, Njemačka
HNF1A_S početnica	5'-GGA TAA GGG GGA GTT TTG-3'			Metabion, Njemačka
LINE1_F početnica	5'-TAG GGA GTG TTA GAT AGTGG-3'	biotin		Metabion, Njemačka
LINE1_R početnica	5'-AAC TCC CTA ACC CCT TAC-3'			Metabion, Njemačka
LINE1_S početnica	5'-CAA ATA AAA CAA TAC CTC-3'			Metabion, Njemačka

Provjeru specifičnosti i uspješnosti umnažanja provela sam putem 3%-tne agarozne gel elektroforeze pri čemu sam koristila 4 µl PCR produkta te standarda 50 bp DNA-Ladder (Carl Roth).

Gelove sam obojila u u 1%- tnoj otopini Sybr Green boje za gel (Life Technologies) ili otopini EtBr (0,5 µg/ml) u trajanju od 20 min, pri 4°C. Za vizualizaciju fragmenata DNA koristila sam UV-transiluminator s emisijom UV zračenja valne duljine 254 nm, a gelove sam fotografirala Kodak kamerom povezanom s računalom i analizirala Kodak programom za obradu fotografija (verzija 3.6). U slučaju umnažanja fragmenta H očekivani specifični fragment DNA je duljine 67 pb, a u slučaju fragmenta L 108 pb.

3.3.3.4. PIROSEKVENCIJANJE

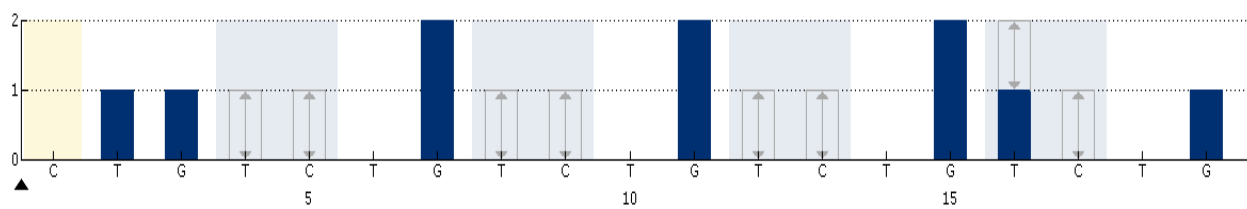
Za analizu pirosekvenciranjem koristila sam uređaj PyroMark Q24 Advanced (Qiagen) uz korištenje odgovarajućih reagenasa PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents (Qiagen), Pyromark pufera za denaturaciju i ispiranje (Qiagen) te odgovarajućih programa PyroMark Assay Design Software (verzija 2.0) i PyroMark Software (verzija 2.0.6) pomoću kojih sam kreirala i analizirala pirosekvencijske testove za fragment H i fragment L pri čemu sam koristila postavke prikazane u Tablici 7 preuzete iz Zoldoš i sur⁷.

Od ukupnog volumena produkta PCR reakcije (25 µl), 4 µl sam koristila za provjeru umnažanja putem 3%-tne agarozne gel elektroforeze, a ostatak sam koristila za analizu pirosekvenciranjem po uputama proizvođača PyroMark Q24 Advanced uređaja.

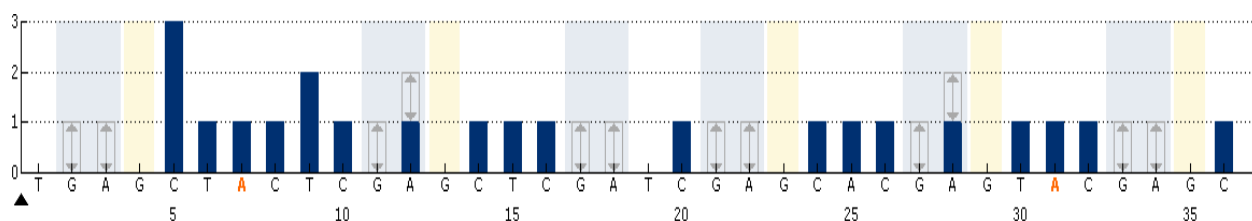
Tablica 7.

TEST	POSTAVKA	SEKVENCA
FRAGMENT H	Sekvenca za analizu	TG T/C GG T/C GG T/C GGT T/C GAGG
	Redosljed izbacivanja nukleotida	CTGTCTGTCTGTCTGTCTG
FRAGMENT L	Sekvenca za analizu	G/A CCCTACTTC G/A ACTC G/A C G/A CAC G/A ATAC G/A CACA CACACTAACCTAC G/A CC
	Redosljed izbacivanja nukleotida	TGAGCTACTCGAGCTCGATCGAGCACGAGTACGAGC

Pirosekvencijski test za fragment H sadrži 4 varijabilne pozicije, dok onaj za fragment L sadrži 6 varijabilnih pozicija (u Tablici 7 crveno označeni nukleotidi) pri čemu oba testa sadrže i pozicije za kontrolu bisulfitne konverzije te negativne kontrole nespecifične ugradnje nukleotida (Slike 18 i 19).



Slika 18. Histogram pirosekvencijskog testa za fragment H



Slika 19. Histogram pirosekvencijskog testa za fragment L

3.3.4 ANALIZA EKSPRESIJE

Razinu mRNA gena *HNF1A* odredila sam metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu korištenjem reverzno transkribirane cDNA (od engl. *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR) u uzorcima netumorskog i tumorskog tkiva pacijenata te kod transfeciranih stanica linije HEK 293.

3.3.4.1. IZOLACIJA RNA

Ukupnu RNA iz mikrodisektiranih dijelova prereza izolirala sam komercijalnim kompletom reagenasa (RNeasy FFPE Kit, Qiagen) prema uputama proizvođača uz preinake u trajanju inkubacije (produljena za 16 sati), dodavanju RNA nosača (od engl. *carrier RNA*) te volumenu elucijskog pufera (povećan na 16 μ L). Ukupnu RNA iz staničnih taloga prikupljenih 8. dan nakon transfekcije izolirala sam komercijalnim kompletom reagenasa (RNeasy Mini Kit, Qiagen), prema uputama proizvođača.

3.3.4.2. REVERZNA TRANSKRIPCIJA

Ukupan volumen izolirane RNA iz mikrodisektiranih dijelova tkiva gušterače (16 μ l) podvrgnula sam reakciji reverzne transkripcije odmah nakon izolacije. S obzirom na kvalitetu uzorka i potencijalnu degradaciju RNA nakon koje ona gubi svoj polyA rep, u reakciji sam, umjesto timinskih oligonukleotida, koristila nasumične heksamere (Life Technologies). U slučaju ukupne RNA izolirane iz stanica, koristila sam 1000 ng izolata i dvostruko manje volumene reagenasa (navedeni u Tablicama 8 i 9). U prvom koraku (prijanjanje početnica)

uzorke sam inkubirala pri 65°C na 5 min nakon čega je uslijedila inkubacija pri 4°C na 5 min pri čemu je sastav reakcijske smjese naveden u Tablici 8.

Tablica 8.

REAGENS	VOLUMEN PO UZORKU (μL)
Nasumični heksameri, 5 nmol (Life Technologies)	2
Smjesa deoksiribonukleotida pojedinačne koncentracije 10 mM (Sigma Aldrich)	2
RNA	16

U drugom koraku (sinteza cDNA) uzorke sam inkubirala pri 42°C na 60 min te pri 75°C na 15 min pri čemu je sastav reakcijske smjese naveden u Tablici 9.

Tablica 9.

REAGENS	VOLUMEN PO UZORKU (μL)
Prime Script reverzna transkriptaza, 100 U/μl (TaKaRa)	1
RRI inhibitor RNaza, 20 U/μl (TaKaRa)	1
5x PSRT pufer(TaKaRa)	8
Voda	10
Reakcijska smjesa prve faze reverzne transkripcije	20

3.3.4.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM U REALNOM VREMENU

Za analizu ekspresije kvantitativnim PCR-om u stvarnom vremenu koristila sam Taqman[®] komercijalno dostupne setove za analizu ekspresije (Life Technologies) i odgovarajući pufer TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies) u volumenima navedenima u Tablici 10 te po 9 μl produkta reverzne transkripcije u slučaju FFPE tkiva i 1 μl u slučaju cDNA staničnih linija.

Tablica 10.

KOMPONENTE qRT PCR SMJESE	VOLUMEN PO UZORKU (μl)	
	„Assay“ HMBS	„Assay“ HNF1A
TaqMan Gene Expression Master Mix	10	20
TaqMan Gene Expression Assay Hs00609297_m1 - HMBS	1	0
TaqMan Gene Expression Assay Hs00167041_m1 - HNF1a	0	1
Voda	0 ili 8	0 ili 8
cDNA	9 ili 1	9 ili 1

Sve reakcije pripremila sam u dvije tehničke replike pri čemu su u analizu bili uključeni i standardni uzorci cDNA staničnih linija CaCo-2 (visoka ekspresija gena *HNFI1A*) i 1.1B4 (niska ekspresija gena *HNFI1A*). Reakcija se odvijala u uređaju „7500 Fast Real-Time PCR System“ (Life Technologies) pri standardnim uvjetima proizvođača određenih putem odgovarajućeg programa „7500 Fast Real-Time PCR Software“ (verzija 2.0.6.), uz preinaku trajanja prve inkubacije (produljena na 2 min). Pomoću istog programa sam i analizirala rezultate, a dobivene Ct (od engl. *threshold Cycle*) vrijednosti normalizirala sam s obzirom na ekspresiju endogene kontrole, gena *HMBS* (stabilne ekspresije u tumorskim i netumorskim stanicama gušterače²⁰⁸). Rezultati analize ekspresije prikazani su kao FC ($\Delta\Delta Ct$) (od engl. *Fold Change*) vrijednosti dobivene pomoću komparativne Ct metode²⁰⁹ pri čemu su korištene ΔCt vrijednosti dobivene normalizacijom s obzirom na endogenu kontrolu, a za izračun $\Delta\Delta Ct$ vrijednosti koristila sam ΔCt vrijednosti stanične linije CaCo-2 korištene kao standard:

$$\begin{aligned} \Delta Ct_{HNFI1A_UZORAK} &= Ct_{HNFI1A_UZORAK} - Ct_{HMBS_UZORAK} \\ \Delta Ct_{HNFI1A_CaCo-2} &= Ct_{HNFI1A_CaCo-2} - Ct_{HMBS_CaCo-2} \\ \Delta\Delta Ct_{HNFI1A_UZORAK} &= \Delta Ct_{HNFI1A_UZORAK} - \Delta Ct_{HNFI1A_CaCo-2} \\ FC\Delta\Delta Ct_{HNFI1A_UZORAK} &= 2^{-\Delta\Delta Ct_{HNFI1A_UZORAK}} \end{aligned}$$

gdje je $FC\Delta\Delta Ct_{HNFI1A_UZORAK}$ vrijednost promjene normalizirane Ct vrijednosti uzorka u usporedbi sa standardnom cDNA stanične linije CaCo-2. U slučaju stanične linije HEK 293, za izračun $\Delta\Delta Ct$ vrijednosti, umjesto standardne cDNA stanične linije CaCo-2, koristila sam kontrolni uzorak stanica (KONTROLA).

3.3.5 ANALIZA GLIKOZILACIJE

Najčešće metode analize glikana temelje se na njihovoj različitoj polarnosti (npr. tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s fluorescentnim detektorom) i masi (npr. kapilarna elektroforeza s fluorescencijom induciranom laserom ili masena spektrometrija s laserskom ionizacijom potpomognutom matricom). Ipak, nijedna od metoda ne pruža potpunu informaciju o strukturi, kvantiteti ili mjesno specifičnoj glikozilaciji (u slučaju analize glikopeptida) zbog čega se danas najčešće koriste kombinacije navedenih metoda (npr. tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa).

U uvom istraživanju glikozilaciju proteina analizirala sam metodom HILIC-UPLC uz detekciju glikana putem fluorescencije. Spojevi u smjesi se razdvajaju na temelju njihove različite interakcije sa stacionarnom, odnosno, mobilnom fazom pri čemu je stacionarna faza polarna, a mobilnu fazu čini nepolaro otapalo s rastućim volumnim udjelom polarnog otapala.

3.3.5.1 IZOLACIJA PROTEINA

Iz prereza tkiva gušterače, putem mikroskopa sam definirala tumorske, odnosno, netumorske dijelove prereza te sam iste, putem skalpela, izrezala od ostatka prereza pri čemu sam zapravo izrezala PEN membranu na koju je tkivo bilo naneseo.

Izolaciju proteina iz dijelova prereza izvela sam blagom digestijom u 400 µl pufera za lizu (4% SDS, 0,1M Tris-HCl, 0,1M DTT, pH 8) pri čemu se u prvih 30 min digestije dijelovi prereza odljepljuju s PEN membrane, nakon čega slijedi sonikacija u trajanju od 10 sekundi (Bandelin, Sonorex, HF-peak output max. W/per. = 2×160) te inkubacija pri 99°C na 60 min uz protresanje od 350 rpm. Dobivenu suspenziju sam zatim 5 min inkubirala na sobnoj temperaturi i centrifugirala pri 2000 g na 20 min. U supernatant sam zatim dodala 800 µl metanola (JT Baker), 200 µl kloroforma (Sigma Aldrich) i 600 µl vode nakon čega sam isti centrifugirala pri 14 000 g, na 15 min. Zatim sam odstranila gornji sloj (metanol i voda) a u ostatak lizata (interfaza u kojoj se nalaze proteini i donja faza koju čine uglavnom kloroform i lipidi) sam dodala još 300 µl hladnog metanola ($\varphi = 50\%$) nakon čega sam protresla smjesu i centrifugirala ju pri 14 000 g na 10 min. Gornji sloj lizata sam ponovno odstranila te ostatku dodala još 300 µl hladnog metanola nakon čega sam protresla smjesu i centrifugirala ju pri 14 000 g na 10 min. Zatim sam odstranila supernatant, dodala 1 ml hladnog metanola, protresla smjesu i centrifugirala ju pri 14 000 g na 10 min nakon čega sam ponovila postupak ispiranja s 1 ml metanola te sam otklopljene tubice inkubirala na sobnoj temperaturi do potpunog isparavanja metanola (30 min).

3.3.5.2 DENATURACIJA I DEGLIKOZILACIJA

Nakon sušenja, uzorke sam 10 min inkubirala u 20 μl SDS-a ($\gamma = 2\%$) pri 65°C . Nakon toga su ohlađeni (30 min na sobnoj temperaturi uz lagano protresanje) te sam im dodala 10 μl Igepal CA-630 (Sigma Aldrich) otopine ($\varphi = 4\%$) nakon čega je uslijedila inkubacija od 10 min na sobnoj temperaturi uz lagano protresanje. Zatim sam u svaki uzorak dodala 10 μl otopine 5 x PBS i 0,12 μl otopine enzima PNGase F (Promega) nakon čega sam ih 18 h inkubirala pri 37°C .

3.3.5.3 OBILJEŽAVANJE GLIKANA FLUORESCENTNOM BOJOM

U svrhu obilježavanja N-glikana prokainamid hidrokloridom (Sigma Aldrich), uzorke sam inkubirala prvo na 10 min pri sobnoj temperaturi, a zatim 2 h pri 65°C , u 25 μl otopine prokainamida ($\gamma = 43 \text{ mg/L}$) i pikolin borana (Sigma Aldrich, $\gamma = 44,8 \text{ mg/L}$) u DMSO-u (Sigma Aldrich, $\varphi = 70\%$) i octenoj kiselini (Sigma Aldrich, $\varphi = 30\%$).

3.3.5.4 PROČIŠĆAVANJE GLIKANA

Nakon obilježavanja, uzorke sam na 30 min inkubirala na sobnoj temperaturi te ih resuspendirala u 700 μl ACN (Sigma Aldrich, $\varphi = 100\%$, $t = 4^\circ\text{C}$) i prenjela na 0,2 μm GHP filter pločicu (Pall) kroz koju je prethodno filtrirano redom: 200 μl EtOH (Sigma Aldrich, $\varphi = 70\%$), 200 μl H_2O i 200 μl ACN ($\varphi = 96\%$, $t = 4^\circ\text{C}$) uz pomoć vakuum sustava za filtraciju. Nakon nanošenja na GHP pločicu, uzorke sam inkubirala 2 min na sobnoj temperaturi te ih filtrirala uz maksimalan tlak od 2 inHg i dodatno 5 puta (zadnji put centrifugiranjem 5 min, 1000 rpm) isprala s 200 μl ACN ($\varphi = 96\%$, $t = 4^\circ\text{C}$) te eluirala u ukupno 180 μl H_2O (2 puta po 90 μl H_2O) centrifugiranjem pri 1000 rpm na 5 min pri čemu sam prije centrifugiranja uzorke inkubirala u vodi 15 min ($t = 24^\circ\text{C}$) uz protresanje.

3.3.5.5 TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA

Za analizu glikana obilježenih prokainamidom koristila sam instrument Acquity UPLC (Waters) kojeg čine moduli za upravljanje otapalima i uzorcima te fluorescencijski detektor pri čemu sam koristila kolonu za razdvajanje *Acquity BEH glycan* (Waters) s unutarnjim promjerom 2,1 mm, duljine 150 mm i veličine čestica 1,7 μm . Za obradu prikupljenih podataka i upravljanje UPLC sustavom koristila sam program Empower2, verzija 2415 (Waters). Uvjeti razdvajanja navedeni su u Tablici 11 pri čemu je otapalo A amonijev formijat (100 mm/L, pH 4,4), otapalo B je ACN ($\varphi = 100\%$), dok je otopina za ispiranje ACN ($\varphi = 75\%$).

Tablica 11. Uvjeti razdvajanja glikana

VRIJEME	PROTOK	OTAPALO A (%)	OTAPALO B (%)
0,00	0,561	27,0	73,0
1,47	0,561	27,0	73,0
15,00	0,561	29,5	70,5
95,00	0,561	38,0	62,0
97,00	0,400	70,0	30,0
99,00	0,400	70,0	30,0
101,00	0,400	30,0	70,0
103,00	0,561	30,0	70,0
125,00	0,400	0,0	100,0
135,00	0,000	0,0	100,0
Temperatura kolone		60°C	
Temperatura uzoraka		5°C	
Valna duljina pobudne svjetlosti		310 nm	
Valna duljina emisijske svjetlosti		370 nm	
Ukupna duljina analize 1 uzorka		95 min	

Uzorke sam analizirala u setovima od 12 pri čemu je na početku i na kraju svakog seta analiziran po jedan uzorak vode i jedan standardni uzorak glikana krvne plazme obilježenih prokainamidom. Prije analize, 18 µl svakog uzorka razrijedila sam s 42 µl acetonitrila, pri čemu sam 10 µl standardnog uzorka razrijedila s 30 µl acetonitrila. Volumen injektiranja u slučaju uzoraka pacijenata iznosio je 50 µl, u slučaju standardnog uzorka 13 µl, a u slučaju uzorka vode 10 µl.

Usprkos automatskoj integraciji, sve kromatograme sam ručno ispravila pri čemu je površina kromatografskog vrška ujedno i zastupljenost određene glikanske strukture u ukupnom glikomu.

Kromatogram glikana tkiva gušterače usporedila sam s kromatogramom glikana tkiva mozga (analiziranog po istoj metodi²¹⁰ u grupi prof. Lauca) te sam, s obzirom na preklapanje kromatografskih vršaka, pretpostavila glikanske strukture (Slika 38).

3.3.6 OBRADA PODATAKA I STATISTIČKA ANALIZA

Za deskriptivnu statističku analizu kojom sam analizirala raspodjelu podataka i regresijsku analizu koristila sam programe GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc) i Microsoft®Office Excel®2007 (12.0.4518.1014) kojim sam izradila grafove s prikazom distribucije postotaka metilacije analiziranih regija i FC vrijednosti ekspresije.

Kromatografski vršci normalizirani su dijeljenjem površine vrška s ukupnom površinom kromatograma (od engl. *total area normalization*) programom Empower2, verzija 2415 (Waters).

Sve dobivene podatke o metilaciji testirala sam na normalnost razdiobe putem „Shapiro-Wilk Normality“ testa.

U usporedbi različitih tkiva unutar iste skupine pacijenata koristila sam neparametrijski „Wilcoxon paired signed-rank“ test uz pretpostavku korelacije u oba smjera.

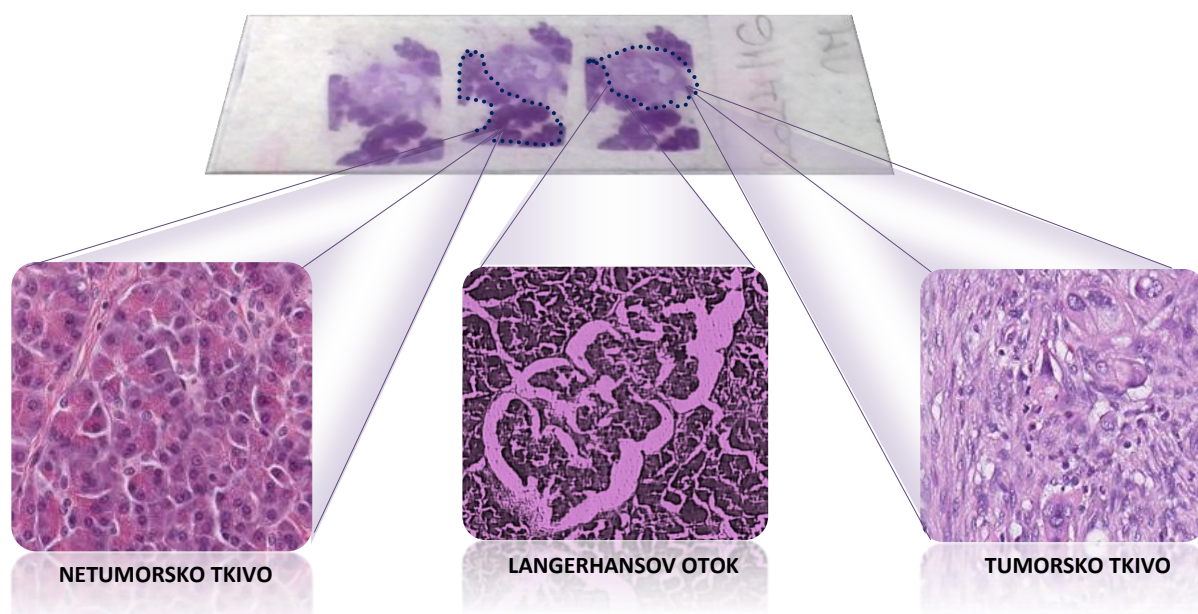
U usporedbi istih tkiva između dvije različite skupine pacijenata koristila sam neparametrijski „Mann-Whitney U“ test uz pretpostavku korelacije u oba smjera. U izračunu sam koristila srednje vrijednosti replika, a u svim rezultatima p vrijednost manju od 0,05 sam smatrala značajnom.

4. REZULTATI

4.1 METILACIJA DNA U PACIJENATA OBOLJELIH OD ADENOKARCINOMA GUŠTERAČE

U provedenom istraživanju analizirala sam ukupno 56 uzoraka tkiva gušterače fiksiranog formalinom i uklopljenog u parafinsku kocku. Svi uzorci pripadaju pacijentima oboljelima od dukalnog adenokarcinoma gušterače pri čemu sam podijelila pacijente na dvije skupine (1 i 0) s obzirom na postavljenu dijagnozu dijabetesa (1= adenokarcinom s dijabetesom, 0 = adenokarcinom bez dijabetesa).

Iz prereza parafinske kocke svakog pacijenta mikrodisektorom sam izdvojila dijelove prereza koji odgovaraju netumorskom tkivu, tumorskom tkivu i Langerhansovim otocima gušterače (Slika 20). U slučaju svakog pacijenta analizirala sam više uzoraka koji obuhvaćaju ove tri vrste tkiva.

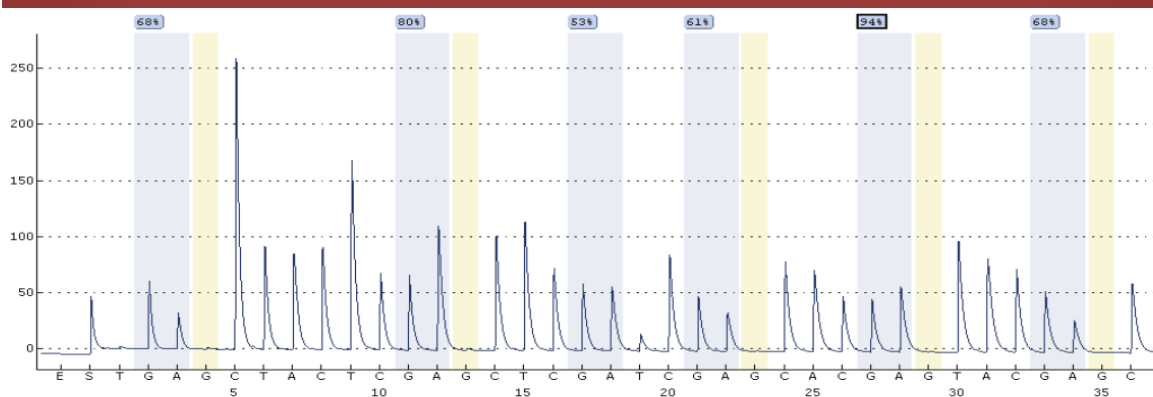


Slika 20. Prikaz tri prereza nanesenih na PEN membranu na predmetnom stakalcu i tri različita tipa tkiva na jednom prerezu: Langerhansov otok, netumorsko tkivo i tumorsko tkivo gušterače.

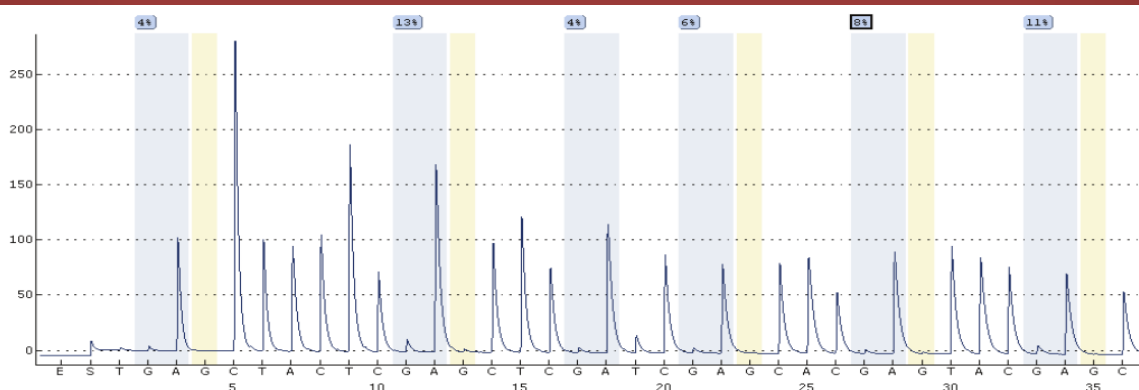
Analizu metilacije provela sam pirosekvenciranjem umnožene DNA (Slika 21; agarozna gel elektroforeza PCR produkata) nakon bisulfitne konverzije DNA.

Metilacija varijabilnih pozicija prikazana je kao postotni udio molekula DNA koje na analiziranoj poziciji sadrže nukleotid s citozinskom/gvaninskom bazom u ukupnom produktu umnažanja molekule DNA (Slike 22 i 23).

POTPUNO METILIRANA DNA



POTPUNO NEMETILIRANA DNA



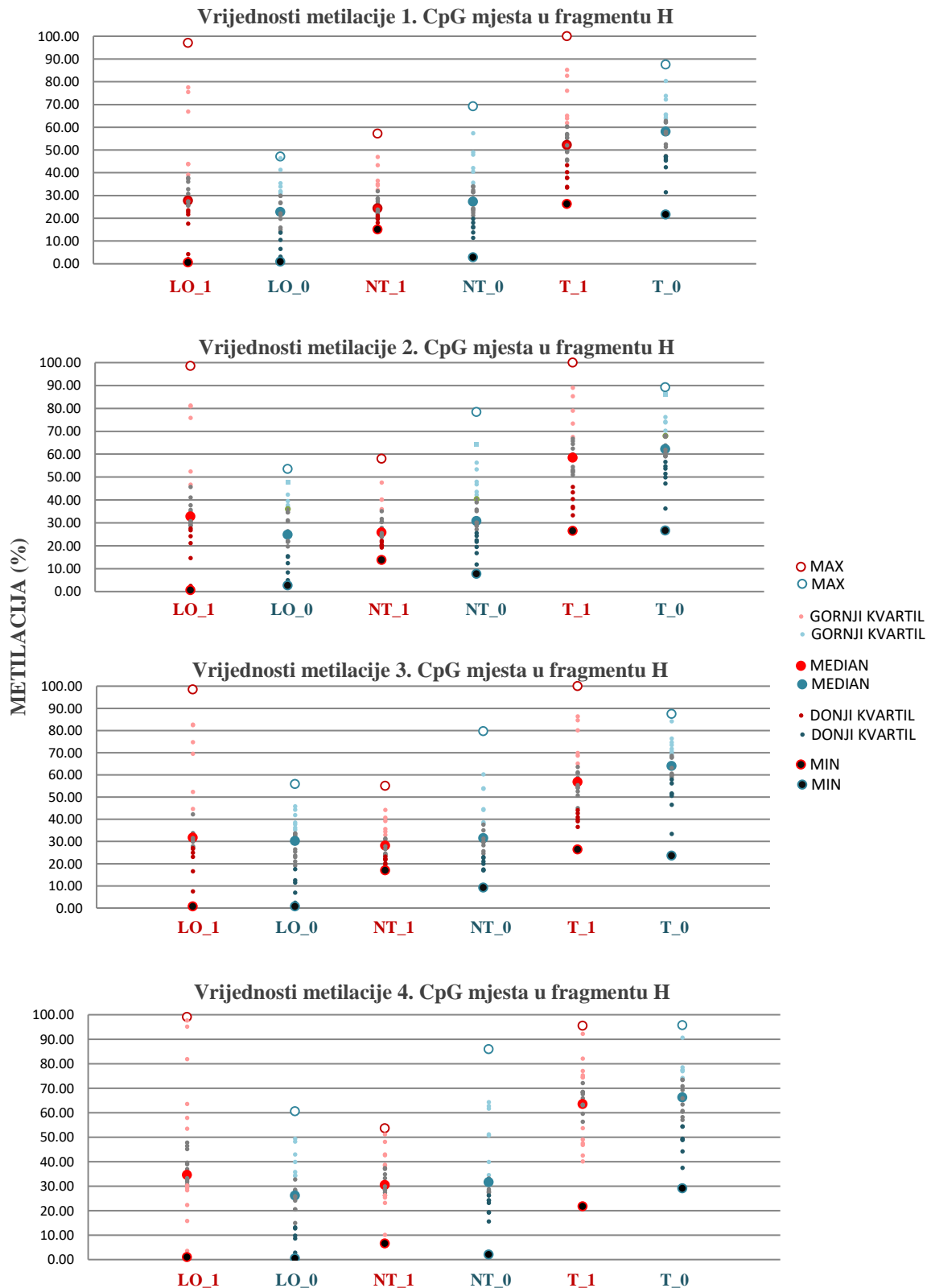
Slika 23. Pirogrami pirosekvencijskog testa za fragment L uzoraka potpuno metilirane (gornji pirogram) i nemetilirane (donji pirogram) molekule DNA.

4.1.1 METILACIJA PRVOG EKSONA GENA *HNF1A*

Metodom pirosekvenciranja nakon bisulfitne konverzije utvrdila sam status metilacije 4 varijabilna CpG mjesta u prvom eksonu gena *HNF1A* (fragment H). Status metilacije DNA izražen je u postocima pri čemu vrijednost od 100% označava potpuno metiliranu molekulu DNA, a vrijednost od 0% odnosi se na potpuno nemetiliranu molekulu DNA. U Tablici 12 prikazane su vrijednosti medijana, raspona (od minimalne do maksimalne vrijednosti) i koeficijenta varijacije postotaka metilacije DNA za svako analizirano CpG mjesto s obzirom na tip tkiva i skupinu pacijenata. Na Slici 24, za svako CpG mjesto zasebno, prikazana je usporedba vrijednosti medijana, minimuma, maksimuma te gornjih i donjih kvartila postotaka metilacije DNA uzoraka s obzirom na tip tkiva i skupinu pacijenata.

Tablica 12. Prikaz rezultata deskriptivne statističke analize metilacije 4 varijabilna CpG mjesta (fragment H) u prvom eksonu gena *HNF1A* u dvije skupine pacijenata s adenokarcinomom gušterače (0 = pacijenti bez dijabetesa; 1= pacijenti s dijabetesom).

CpG MJESTO	SKUPINA	TIP TKIVA	DESKRIPTIVNI PARAMETAR		
			MEDIJAN	RASPON	KOEFICIJENT VARIJACIJE (%)
1	1	LANGERHANSOVI OTOCI	28,36	0,53 – 97,04	65,80
		NETUMORSKO TKIVO	24,65	15,07 – 57,11	35,64
		TUMORSKO TKIVO	53,68	26,29 – 100,00	31,33
	0	LANGERHANSOVI OTOCI	22,66	0,59 – 46,73	38,41
		NETUMORSKO TKIVO	28,27	2,56 – 68,73	28,80
		TUMORSKO TKIVO	57,74	21,26 – 86,91	24,04
2	1	LANGERHANSOVI OTOCI	31,81	0,57 – 98,59	60,80
		NETUMORSKO TKIVO	25,75	13,77 – 57,98	33,75
		TUMORSKO TKIVO	56,49	26,54 – 100,00	30,39
	0	LANGERHANSOVI OTOCI	23,90	0,49 – 52,48	40,15
		NETUMORSKO TKIVO	29,64	5,65 – 77,86	28,20
		TUMORSKO TKIVO	61,84	24,92 – 88,86	21,87
3	1	LANGERHANSOVI OTOCI	31,60	0,67 – 98,46	60,83
		NETUMORSKO TKIVO	27,95	16,93 – 55,06	29,54
		TUMORSKO TKIVO	56,08	26,35 – 100,00	30,41
	0	LANGERHANSOVI OTOCI	25,85	0,26 – 53,38	38,66
		NETUMORSKO TKIVO	30,95	8,67 – 79,17	26,02
		TUMORSKO TKIVO	63,12	23,09 – 87,03	21,95
4	1	LANGERHANSOVI OTOCI	35,77	1,07 – 99,08	59,76
		NETUMORSKO TKIVO	30,76	6,61 – 53,68	33,56
		TUMORSKO TKIVO	64,75	21,71 – 95,51	25,48
	0	LANGERHANSOVI OTOCI	26,02	0,73 – 60,13	51,55
		NETUMORSKO TKIVO	30,17	2,32 – 85,26	28,87
		TUMORSKO TKIVO	65,66	28,99 – 95,00	23,51



Slika 24. Prikaz metilacije četiri CpG mjesta u fragmentu H gena *HNF1A* u različitim tkivima i skupinama pacijenata; LO_1 = Langerhansovi otoci dijabetičara, LO_0 = Langerhansovi otoci pacijenata bez dijabetesa, NT_1 = netumorsko tkivo dijabetičara, NT_0 = netumorsko tkivo pacijenata bez dijabetesa, T_0 = tumorsko tkivo dijabetičara, T_1 = tumorsko tkivo pacijenata bez dijabetesa.

4.1.1.1 USPOREDBA RAZLIČITIH TIPOVA TKIVA ISTOG PACIJENTA PO STATUSU METILACIJE FRAGMENTA H

Postotke metilacije sva 4 CpG mjesta fragmenta H usporedila sam između različitih tipova tkiva istog pacijenta, zasebno u svakoj skupini pacijenata, bez i s dijabetesom.

Sve uspoređivane skupine podataka testirala sam na normalnost distribucije podataka čime sam utvrdila nenormalnu raspodjelu zbog čega sam u daljnjoj analizi koristila neparametrijske statističke testove. P vrijednosti, izračunate iz srednjih vrijednosti PCR replika putem neparametrijskog Wilcoxonovog „paired signed-rank“ testa, prikazane su u Tablici 13.

Između svih tipova tkiva, na sva 4 CpG mjesta u prvom eksonu gena *HNF1A*, uočila sam statistički značajnu razliku. Na prvom CpG mjestu u skupini 1 metilacija se nije razlikovala između netumorskog tkiva i Langerhansovih otoka.

U skupini 1, razina metilacije 2., 3. i 4. CpG mjesta prvog eksona gena *HNF1A* je značajno viša u Langerhansovim otocima u odnosu na netumorsko tkivo, dok je u skupini 0 na sva 4 CpG mjesta u Langerhansovim otocima ona značajno niža.

Razina metilacije sva 4 CpG mjesta prvog eksona gena *HNF1A* je značajno povišena u tumorskom tkivu u usporedbi s ostalim tipovima tkiva, u obje skupine pacijenata.

Tablica 13. Prikaz p vrijednosti dobivenih Wilcoxonovim „paired signed-rank“ testom prilikom usporedbi metilacije fragmenta H u različitim tipovima tkiva u istoj skupini pacijenata; LO = Langerhansovi otoci, NT = netumorsko tkivo, T = tumorsko tkivo, prag p vrijednosti iznosi 0,05 i značajnima se smatraju p vrijednosti manje od 0,05.

CpG MJESTO	USPOREĐENI TIPOVI TKIVA		SKUPINA	
			1	0
1	LO	NT	0,112	0,034
	LO	T	0,001	0,000
	NT	T	0,000	0,000
2	LO	NT	0,048	0,031
	LO	T	0,001	0,000
	NT	T	0,000	0,000
3	LO	NT	0,038	0,006
	LO	T	0,003	0,000
	NT	T	0,000	0,000
4	LO	NT	0,034	0,010
	LO	T	0,001	0,000
	NT	T	0,000	0,000

4.1.1.2 USPOREDBA ISTIH TIPOVA TKIVA IZMEĐU RAZLIČITIH SKUPINA PACIJENATA PO STATUSU METILACIJE FRAGMENTA H

Vrijednosti metilacije sva 4 CpG mjesta fragmenta H usporedila sam između skupina 1 i 0 s obzirom na tip tkiva pri čemu sam koristila neparametrijski „Mann-Whitney U“ test.

Dobivene p vrijednosti prikazane su u Tablici 14, a ukazuju na statistički značajnu razliku metilacije sva 4 analizirana CpG mjesta između skupina 0 i 1 u slučaju Langerhansovih otoka, dok u slučaju netumorskog i tumorskog tkiva ne postoji značajna razlika između različitih skupina pacijenata.

Tablica 14. Prikaz p vrijednosti dobivenih „Mann-Whitneyevim U“ testom pri usporedbi metilacije fragmenta H gena *HNF1A* u istom tipu tkiva, između različitih skupina pacijenata; LO = Langerhansovi otoci, NT = netumorsko tkivo, T = tumorsko tkivo, prag p vrijednosti iznosi 0,05 i značajnima se smatraju p vrijednosti manje od 0,05.

CPG MJESTO	TIP TKIVA	p VRIJEDNOST
1	LO	0,035
	NT	0,764
	T	0,312
2	LO	0,038
	NT	0,300
	T	0,262
3	LO	0,030
	NT	0,459
	T	0,121
4	LO	0,003
	NT	0,818
	T	0,968

4.1.2 METILACIJA REGIJE LINE-1

Kako bih potvrdila da se u svim uzorcima sam proces metilacije DNA normalno odvija, kvantificirala sam metilaciju 6 CpG mjesta u fragmentu L raspršenih ponavljajućih slijedova regija LINE-1 metodom pirosekvenciranja nakon bisulfitne konverzije.

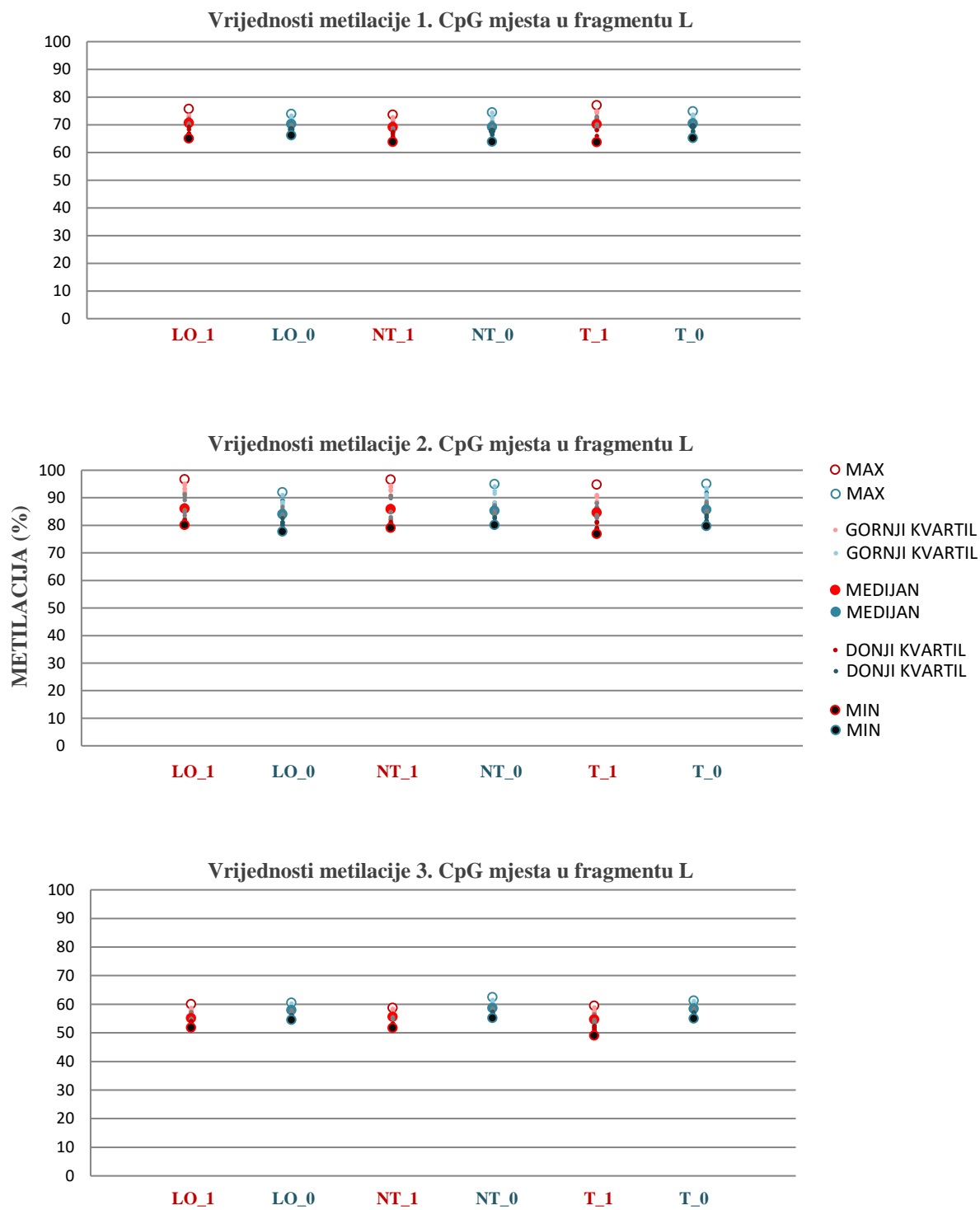
U Tablici 15 prikazane su vrijednosti raspona, medijana i koeficijenta varijacije postotaka metilacije 6 varijabilnih pozicija fragmenta L s obzirom na skupinu pacijenata i tkivo.

Na Slikama 25 i 26 je za svako CpG mjesto prikazana raspodjela postotaka metilacije DNA s istaknutim vrijednostima medijana, gornjih i donjih kvartila, te minimalnim i maksimalnim vrijednostima s obzirom na tip tkiva i skupinu pacijenata.

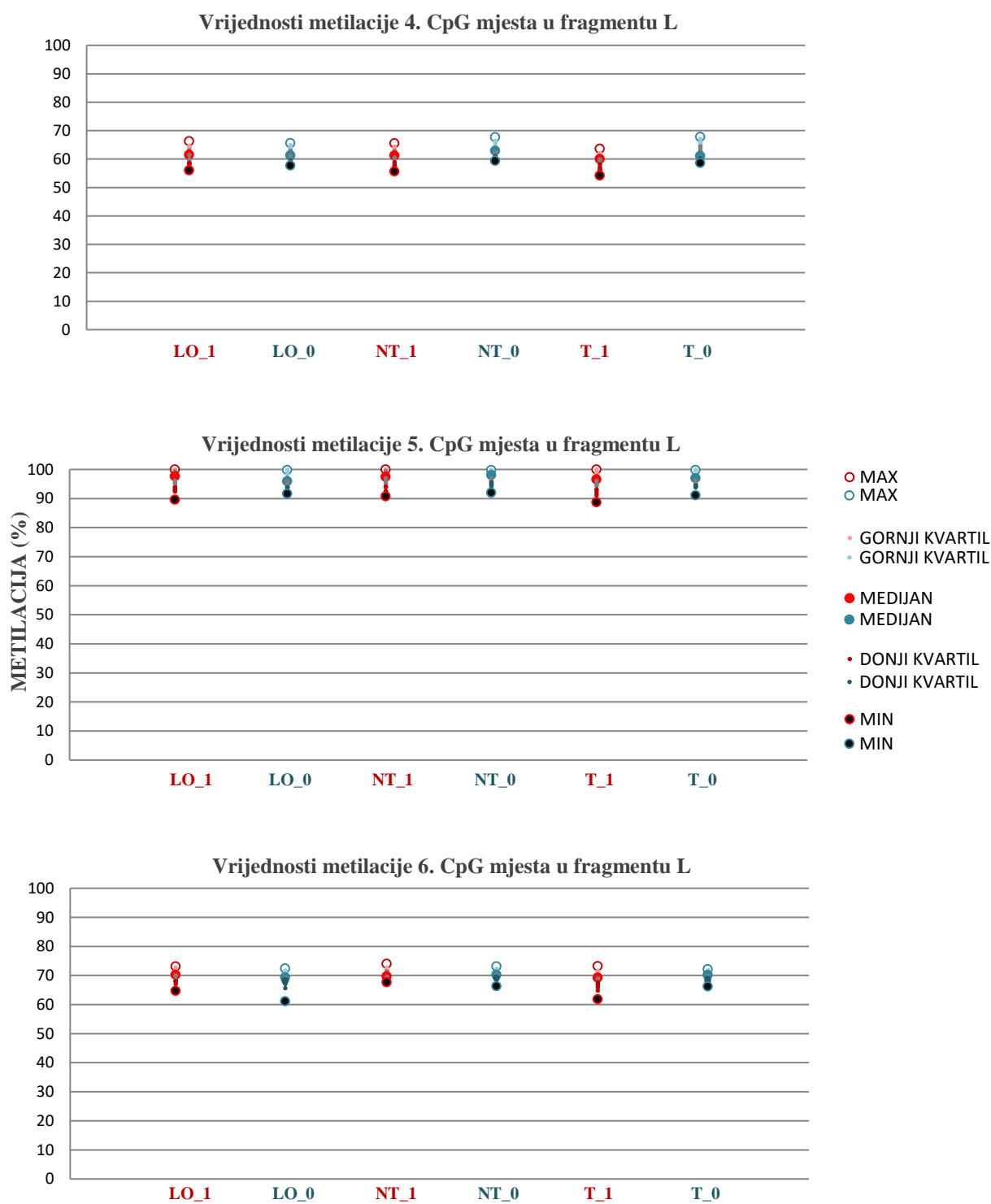
Rasponi postotaka metilacije DNA su u obje skupine i u svim tipovima tkiva vrlo mali s niskim vrijednostima koeficijenta varijacije pri čemu su navedeni parametri (za prosječnu vrijednost svih 6 CpG mjesta) najveći u tumorskom tkivu. Vrijednosti medijana svih tipova tkiva su vrlo slične (maksimalnu razliku od 2,09% utvrdila sam na 2. CpG mjestu, između tumorskog tkiva skupine 1 i netumorskog tkiva skupine 0). Sva tri tipa tkiva usporedila sam zasebno u svakoj skupini putem neparametrijskog Wilcoxonovog „paired signed-rank“ testa (p vrijednosti navedene u Tablici 16), a i usporedila sam skupine 1 i 0 s obzirom na tip tkiva neparametrijskim „Mann-Whitney U“ testom (p vrijednosti navedene u Tablici 17). Nisam utvrdila statistički značajne razlike niti između različitih tipova tkiva unutar iste skupine pacijenata, niti između istih tipova tkiva u različitim skupinama pacijenata što ukazuje na nepromijenjenu metilaciju fragmenta L te mogućnost usporedbe CpG-metilacije specifičnih regija genoma.

Tablica 15. Prikaz rezultata deskriptivne statističke analize CpG-metilacije fragmenta L u dvije skupine pacijenata s adenokarcinomom gušterače; 0 = pacijenti bez dijabetesa; 1= pacijenti s dijabetesom.

CpG MJESTO	SKUPINA	TIP TKIVA	DESKRIPTIVNI PARAMETAR		
			MEDIJAN	RASPON	KOEFICIJENT VARIJACIJE (%)
1	1	LANGERHANSOVI OTOCI	70,53	64,99 – 75,64	3,84
		NETUMORSKO TKIVO	69,10	63,78 – 73,59	3,83
		TUMORSKO TKIVO	70,19	63,64 – 77,06	5,38
	0	LANGERHANSOVI OTOCI	70,23	65,93 – 74,52	3,06
		NETUMORSKO TKIVO	69,39	64,73 – 75,08	3,81
		TUMORSKO TKIVO	70,60	64,92 – 79,54	3,10
2	1	LANGERHANSOVI OTOCI	86,11	75,54 – 96,74	6,55
		NETUMORSKO TKIVO	85,94	76,14 – 96,64	6,83
		TUMORSKO TKIVO	84,69	74,81 – 94,86	5,79
	0	LANGERHANSOVI OTOCI	85,62	80,42 – 92,63	3,88
		NETUMORSKO TKIVO	86,78	78,69 – 95,45	4,67
		TUMORSKO TKIVO	86,53	80,13 – 95,49	5,05
3	1	LANGERHANSOVI OTOCI	55,11	51,80 – 60,00	3,83
		NETUMORSKO TKIVO	55,60	51,68 – 58,72	3,93
		TUMORSKO TKIVO	54,64	49,05 – 59,47	4,92
	0	LANGERHANSOVI OTOCI	55,03	51,25 – 57,86	3,53
		NETUMORSKO TKIVO	55,62	52,04 – 59,98	3,07
		TUMORSKO TKIVO	55,58	51,76 – 58,70	2,99
4	1	LANGERHANSOVI OTOCI	61,49	56,02 – 64,73	4,15
		NETUMORSKO TKIVO	61,26	55,63 – 65,51	4,28
		TUMORSKO TKIVO	60,21	56,21 – 63,65	3,55
	0	LANGERHANSOVI OTOCI	60,66	57,18 – 64,87	3,66
		NETUMORSKO TKIVO	61,54	58,79 – 65,27	2,54
		TUMORSKO TKIVO	60,15	56,95 – 65,28	3,82
5	1	LANGERHANSOVI OTOCI	97,66	89,62 – 100,00	3,32
		NETUMORSKO TKIVO	97,04	90,77 – 100,00	3,21
		TUMORSKO TKIVO	96,14	77,90 – 100,00	5,52
	0	LANGERHANSOVI OTOCI	96,26	91,66 – 100,00	2,83
		NETUMORSKO TKIVO	97,63	92,05 – 100,00	2,35
		TUMORSKO TKIVO	96,78	91,09 – 100,00	2,75
6	1	LANGERHANSOVI OTOCI	70,24	57,93 – 73,04	4,55
		NETUMORSKO TKIVO	69,71	67,60 – 73,99	2,38
		TUMORSKO TKIVO	69,38	64,83 – 73,21	2,66
	0	LANGERHANSOVI OTOCI	70,16	61,68 – 83,65	4,84
		NETUMORSKO TKIVO	71,08	67,01 – 74,04	2,11
		TUMORSKO TKIVO	70,22	66,92 – 73,02	2,36



Slika 25. Prikaz metilacije 1.-3. CpG mjesta u fragmentu L u različitim tkivima i skupinama pacijenata; LO_1 = Langerhansovi otoci dijabetičara, LO_0 = Langerhansovi otoci pacijenata bez dijabetesa, NT_1 = netumorsko tkivo dijabetičara, NT_0 = netumorsko tkivo pacijenata bez dijabetesa, T_0 = tumorsko tkivo dijabetičara, T_1 = tumorsko tkivo pacijenata bez dijabetesa.



Slika 26. Prikaz metilacije 4.-6. CpG mjesta u fragmentu L u različitim tkivima i skupinama pacijenata; LO_1 = Langerhansovi otoci dijabetičara, LO_0 = Langerhansovi otoci pacijenata bez dijabetesa, NT_1 = netumorsko tkivo dijabetičara, NT_0 = netumorsko tkivo pacijenata bez dijabetesa, T_0 = tumorsko tkivo dijabetičara, T_1 = tumorsko tkivo pacijenata bez dijabetesa.

Tablica 16. Prikaz p vrijednosti dobivenih Wilcoxonovim „paired signed-rank“ testom prilikom usporedbe CpG-metilacije fragmenta L u različitim tipovima tkiva u istoj skupini pacijenata; LO = Langerhansovi otoci, NT = netumorsko tkivo, T = tumorsko tkivo, prag p vrijednosti iznosi 0,05 i značajnima se smatraju p vrijednosti manje od 0,05.

CpG MJESTO	USPOREĐENI TIPOVI TKIVA		SKUPINA	
			1	0
1	LO	NT	0,13	0,55
	LO	T	0,58	0,08
	NT	T	0,09	0,07
2	LO	NT	0,46	0,26
	LO	T	0,06	0,12
	NT	T	0,24	0,88
3	LO	NT	0,70	0,06
	LO	T	0,12	0,06
	NT	T	0,11	0,81
4	LO	NT	0,67	0,09
	LO	T	0,15	0,10
	NT	T	0,06	0,73
5	LO	NT	0,98	0,06
	LO	T	0,09	0,41
	NT	T	0,18	0,23
6	LO	NT	0,77	0,06
	LO	T	0,48	0,46
	NT	T	0,13	0,07

Tablica 17. Prikaz p vrijednosti dobivenih „Mann-Whitney U“ testom prilikom usporedbe metilacije u istom tipu tkiva između različitih skupina pacijenata; LO = Langerhansovi otoci, NT = netumorsko tkivo, T = tumorsko tkivo, prag p vrijednosti iznosi 0,05 i značajnima se smatraju p vrijednosti manje od 0,05.

CpG MJESTO	TIP TKIVA	p VRIJEDNOST
1	LO	0,77
	NT	0,46
	T	0,67
2	LO	0,49
	NT	0,74
	T	0,06
3	LO	0,234
	NT	0,95
	T	0,21
4	LO	0,84
	NT	0,65
	T	0,15
5	LO	0,65
	NT	0,52
	T	0,27
6	LO	0,91
	NT	0,08
	T	0,07

4.2 EKSPRESIJA GENA *HNFI1A* U SKUPINAMA PACIJENATA

Ekspresiju gena *HNFI1A* analizirala sam metodom kvantitativnog PCR-a u stvarnom vremenu uz korištenje Taqman® sonđi (Life Technologies, USA) u 48 uzoraka mikrodisektiranog tumorskog i netumorskog tkiva te 5 uzoraka Langerhansovih otočića gušterače kod odabranih pacijenata iz skupine s dijabetesom. Rezultati su prikazani u obliku FC vrijednosti pri čemu sam kao endogenu kontrolu za izračun ΔC_t vrijednosti koristila gen *HMBS*, a kao referentni uzorak za izračun $\Delta\Delta C_t$ vrijednosti koristila sam cDNA stanične linije CaCo2 u kojoj je gen *HNFI1A* stabilno eksprimiran.

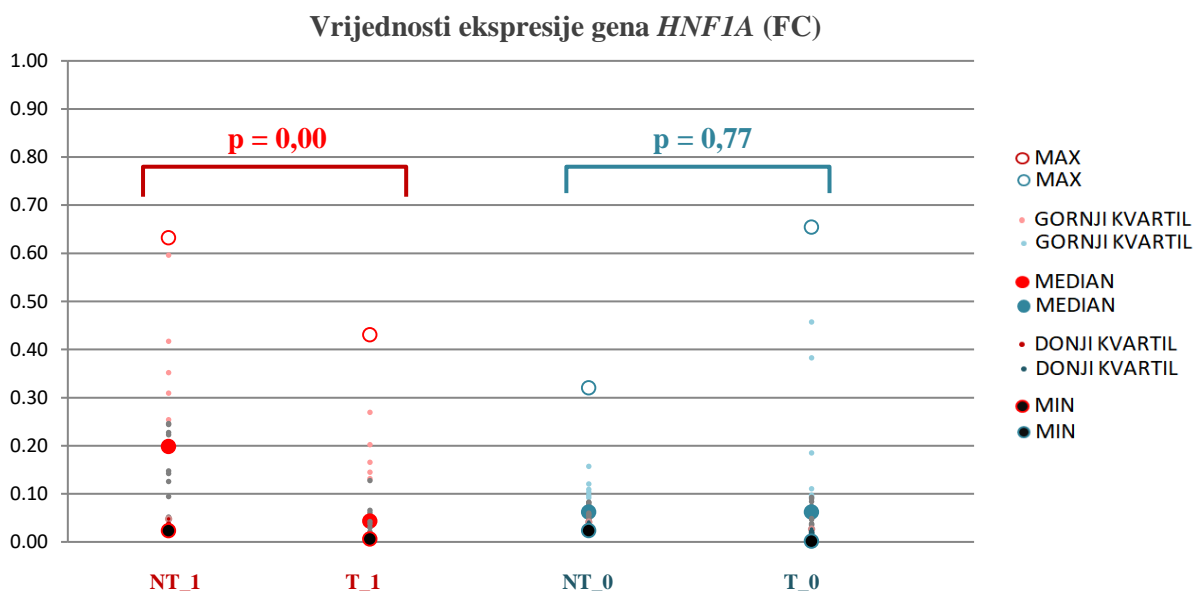
U uzorcima u kojima je ekspresija bila utišana do razine da je bilo nemoguće detektirati signal umnažanja, uzela sam vrijednost C_t u 40-om ciklusu umnažanja (zadnji ciklus u reakciji metodom qRT-PCR nakon kojeg se ne očekuje umnažanje cDNA).

4.2.1 EKSPRESIJA GENA *HNFI*A U NETUMORSKOM I TUMORSKOM TKIVU OBJE SKUPINE PACIJENATA

Razina ekspresije gena *HNFI*A u netumorskom i tumorskom tkivu u svakoj skupini pacijenata zasebno prikazana je na Slici 27 i u Tablici 18. Samo u skupini 1 uočila sam značajnu razliku ekspresije gena *HNFI*A između netumorskog i tumorskog tkiva ($p = 0,00$).

Tablica 18. Prikaz rezultata deskriptivne statističke analize FC („fold change“) vrijednosti ekspresije gena *HNFI*A u različitim tkivima i skupinama pacijenata; prikazane su vrijednosti raspona i medijana s obzirom na tip tkiva i skupinu pacijenata.

SKUPINA	TIP TKIVA	DESKRIPTIVNI PARAMETAR	
		MEDIJAN	RASPON
1	NETUMORSKO TKIVO	0,17	0,02 – 0,63
	TUMORSKO TKIVO	0,04	0,01 – 0,43
0	NETUMORSKO TKIVO	0,06	0,02 – 0,31
	TUMORSKO TKIVO	0,06	0,00 – 0,64

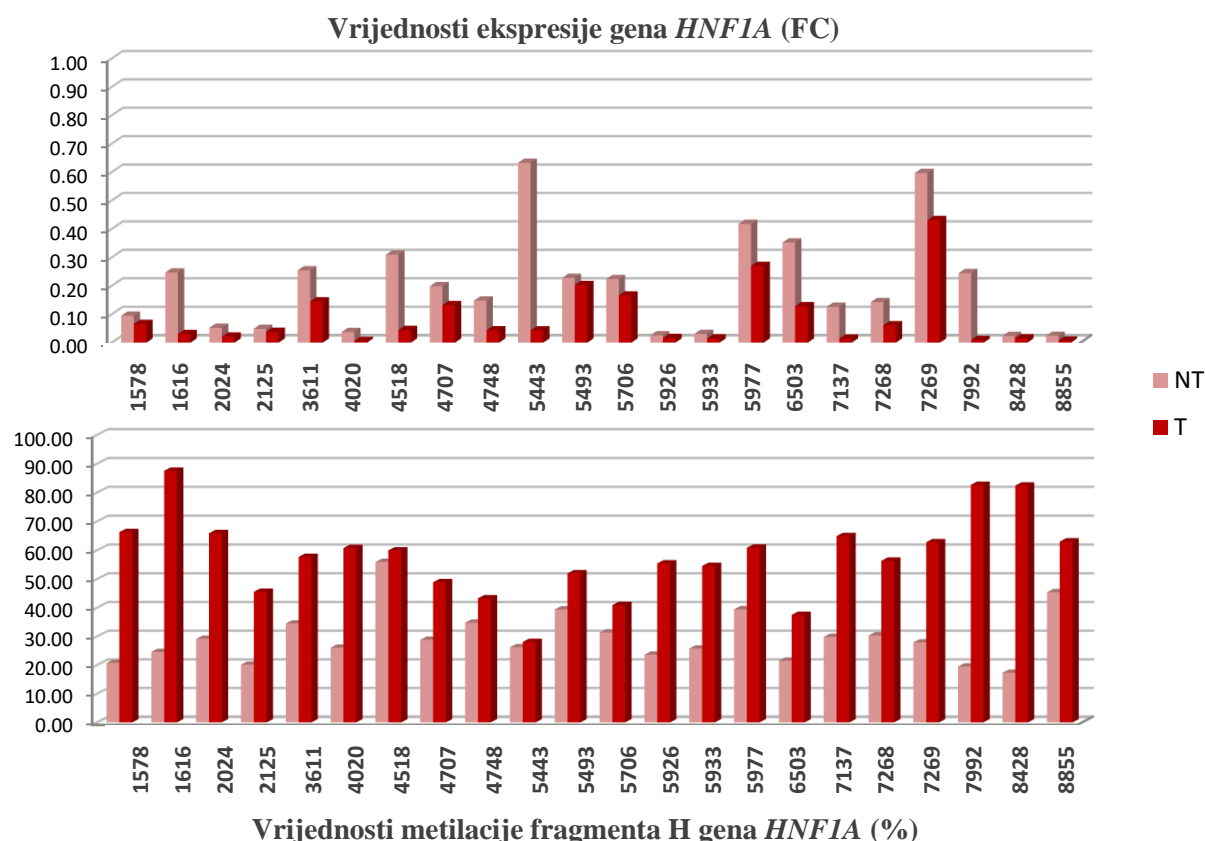


Slika 27. Prikaz ekspresije gena *HNFI*A u različitim tkivima i skupinama pacijenata s istaknutim granicama gornjeg i donjeg kvartila te navedenom p vrijednošću dobivenom Wilcoxonovim „paired signed-rank“ testom u usporedbi ekspresije gena *HNFI*A između netumorskog i tumorskog tkiva u svakoj skupini pacijenata zasebno; NT_1 = netumorsko tkivo dijabetičara, NT_0 = netumorsko tkivo pacijenata bez dijabetesa, T_0 = tumorsko tkivo dijabetičara, T_1 = tumorsko tkivo pacijenata bez dijabetesa, FC = „fold change“.

4.2.2 KORELACIJA EKSPRESIJE I METILACIJE GENA *HNF1A* U NETUMORSKOM I TUMORSKOM TKIVU OBJE SKUPINE PACIJENATA

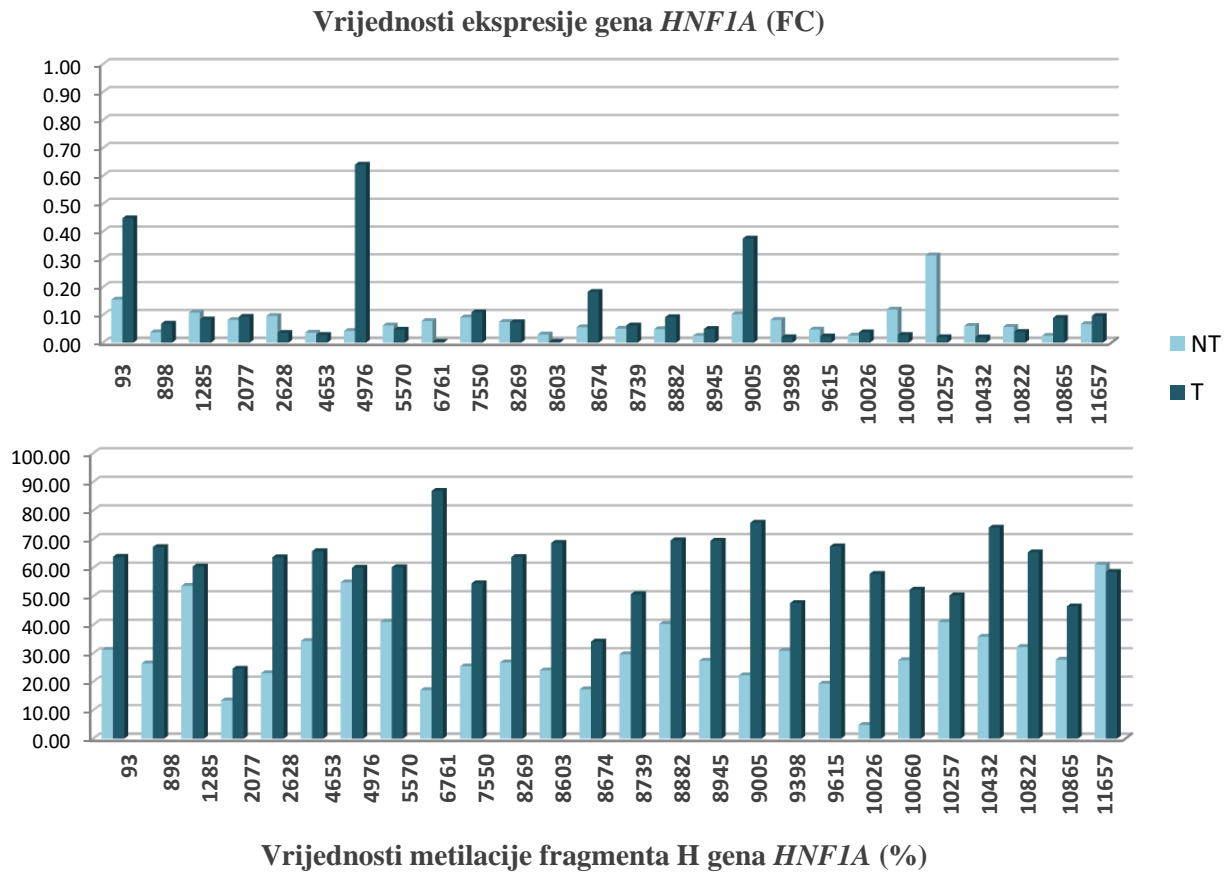
FC vrijednosti ekspresije gena *HNF1A* u netumorskom i tumorskom tkivu usporedila sam s postocima metilacije 4 CpG mjesta u prvom eksonu gena *HNF1A* između netumorskog i tumorskog tkiva, te u svakoj skupini pacijenata zasebno.

S obzirom na to da su se upotrebom svih statističkih analiza statusa metilacije p vrijednosti podudarale za sva 4 CpG mjesta unutar fragmenta H, u ovoj sam analizi koristila srednju vrijednost metilacije (kao prosječnu metilaciju fragmenta H). Rezultati metilacije fragmenta H na Slikama 28 i 29 izraženi su kao postotni udjeli metiliranih molekula DNA u ukupnom uzorku, a ekspresije kao FC vrijednosti. Poredak pacijenata pojedine skupine na prikazima vrijednosti metilacije jednak je onome na prikazu vrijednosti ekspresije. U skupini 1, u svim uzorcima tumorskog tkiva ekspresija gena *HNF1A* bila je snižena u usporedbi s netumorskim tkivom istog pacijenta, dok je metilacija gena *HNF1A* u stanicama tumorskog tkiva bila viša u odnosu na netumorsko tkivo (Slika 28).



Slika 28. Prikaz ekspresije i metilacije gena *HNF1A* u različitim tkivima pacijenata skupine 1; na osi y navedene su FC vrijednosti ekspresije i postoci metilacije fragmenta H, a različito obojeni parovi stupaca predstavljaju različita tkiva jednog pacijenta; NT = netumorsko tkivo, T = tumorsko tkivo, FC = „fold change“.

U skupini 0 je također u svim uzorcima tumorskog tkiva metilacija gena *HNF1A* bila viša u odnosu na netumorsko tkivo istog pacijenta, ali ekspresija gena *HNF1A* u tumorskom tkivu je, u odnosu na netumorsko, bila snižena samo kod 50% pacijenata (Slika 29).



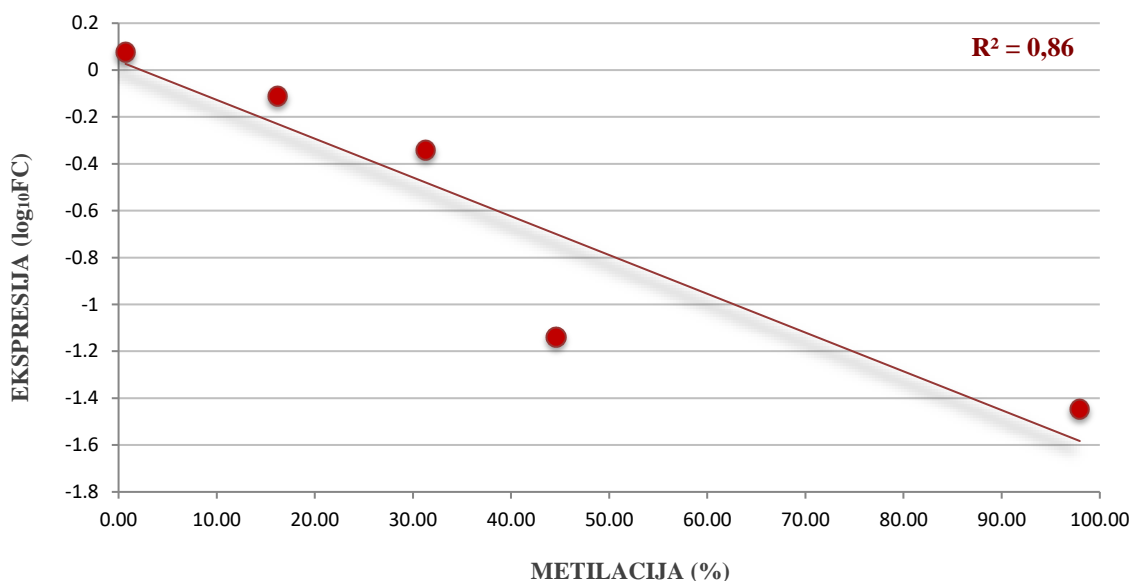
Slika 29. Prikaz ekspresije i metilacije gena *HNF1A* u različitim tkivima pacijenata skupine 0; na osi y navedene su FC vrijednosti ekspresije i postoci metilacije fragmenta H, a različito obojeni parovi stupaca predstavljaju različita tkiva jednog pacijenta; NT = netumorsko tkivo, T = tumorsko tkivo, FC = „fold change“.

4.2.3 KORELACIJA EKSPRESIJE I METILACIJE GENA *HNF1A* U LANGERHANSOVIM OTOCIMA GUŠTERAČE U PACIJENATA S ADENOKARCINOMOM GUŠTERAČE I DIJABETESOM

Vrijednosti ekspresije (FC) gena *HNF1A* u Langerhansovim otočićima gušterače 5 pacijenata iz skupine 1 korelirala sam s postocima metilacije fragmenta H gena *HNF1A* pri čemu sam, iz ranije navedenih razloga, koristila srednju vrijednost sva 4 CpG mjesta. Na Slici 30 prikazano je raspršenje točaka oko linije regresije pri čemu točke predstavljaju uzorak (Langerhansov otočić jednog pacijenta) određene ekspresije i metilacije gena *HNF1A*.

Razina metilacije izražena je kao postotni udio metiliranih molekula DNA u ukupnom uzorku, a razina ekspresije kao logaritam FC vrijednosti.

Koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,86 što ukazuje na snažnu povezanost metilacije fragmenta H u genu *HNF1A* i ekspresije gena *HNF1A* u Langerhansovim otocima gušterače pacijenata s dijabetesom.

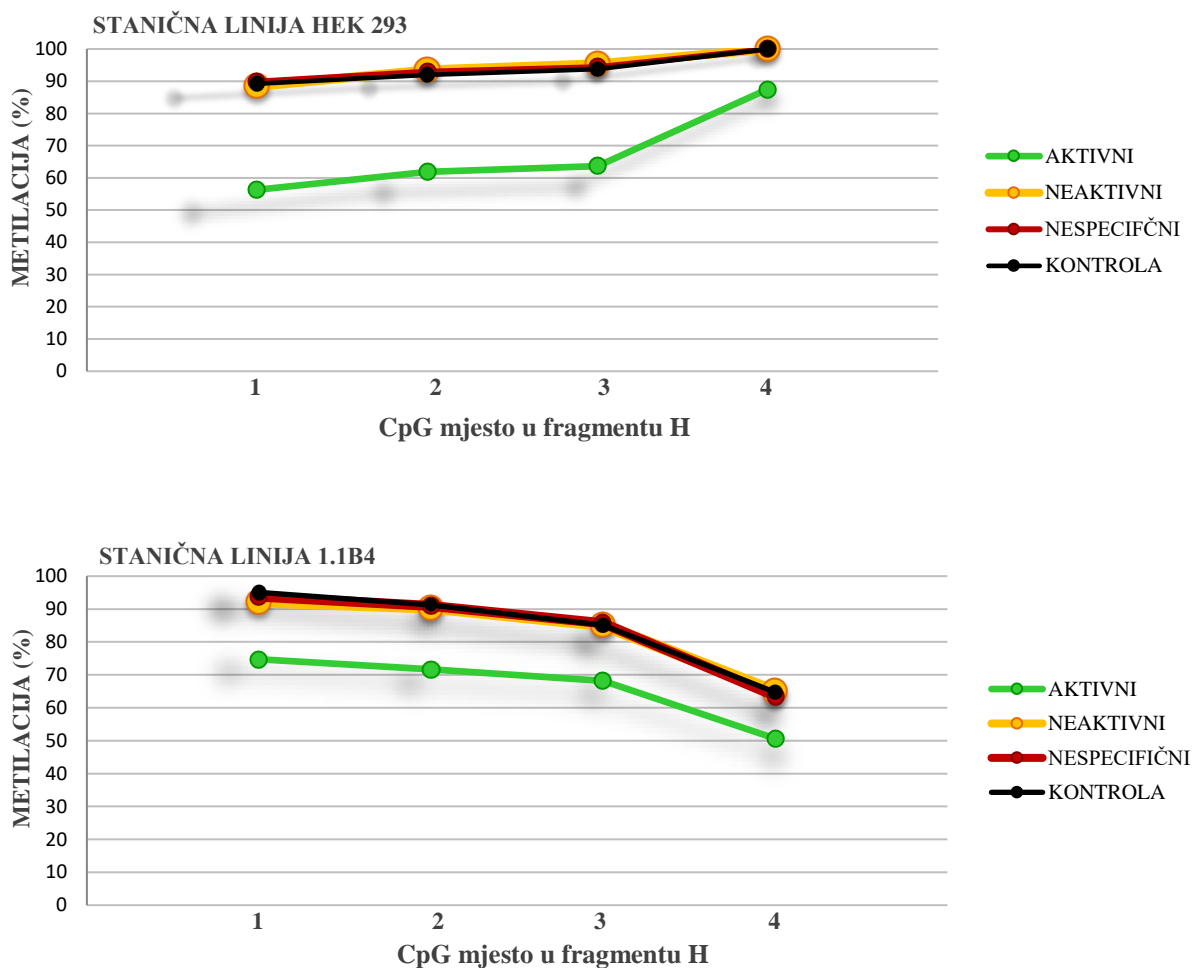


Slika 30. Korelacija ekspresije i metilacije gena *HNF1A* u Langerhansovim otocima gušterače u 5 pacijenata iz skupine 1, na osi y navedene su logaritmirane FC vrijednosti ekspresije, na osi x postoci metilacije fragmenta H u genu *HNF1A*, dok točke na grafu prikazuju pacijente skupine 1 kod kojih su analizirane ekspresija i metilacija gena *HNF1A* u Langerhansovim otočićima gušterače; FC = „fold change“.

4.3 CILJANA DEMETILACIJA FRAGMENTA H U GENU *HNFI1A* U STANIČNIM LINIJAMA 1.1B4 I HEK 293

Kako bih utvrdila direktnu vezu između metilacije 4 CpG mjesta u prvom eksonu gena *HNFI1A* te ekspresije ovog gena, upotrijebila sam pristup koji se osniva na metodologiji CRISPR/Cas9. Direktnom manipulacijom specifičnih CpG mjesta u promotoru određenog gena moguće je utvrditi njihovu potencijalnu regulacijsku važnost za transkripcijsku aktivnost. U tu svrhu odabrala sam stanične linije HEK 293 i 1.1B4. Liniju HEK 293 odabrala sam jer se u nju najlakše ubacuju veliki konstrukti, dok sam staničnu liniju 1.1B4 odabrala jer odgovara β stanicama Langerhansovih otočića (u njoj je aktivan GSIS mehanizam). Upotrijebila sam konstrukt dCas9-TET1 koji ima aktivnu katalitičku domenu dioksigenaze uključenu u aktivnu demetilaciju molekule DNA. Konstrukt dCas9-TET1 navođen je pomoću molekule sgRNA koja je dizajnirana na način da cilja željena 4 CpG mjesta koja su u ovim staničnim linijama hipermetilirana. Stanice su prikupljene 8. dan nakon transfekcije te je dio njih upotrijebljen za analizu CpG-metilacije. U stanicama transfeciranim dCas9-TET1 konstruktom, u kojem je katalitička domena TET1 aktivna (AKTIVNI), uočila sam sniženje metilacije u odnosu na kontrolne, netransfecirane stanice (KONTROLA) s najvećim sniženjem razine metilacije na 1. CpG mjestu u obje stanične linije (Slika 31). U stanicama koje su transfecirane nespecifičnim aktivnim (NESPECIFIČNI) ili specifičnim neaktivnim konstruktom (NEAKTIVNI) nisam uočila promjenu razine metilacije na 4 ciljane CpG mjesta u odnosu na kontrolne stanice (Slika 31).

METILACIJA FRAGMENTA H U GENU *HNFI1A* U STANIČNIM LINIJAMA

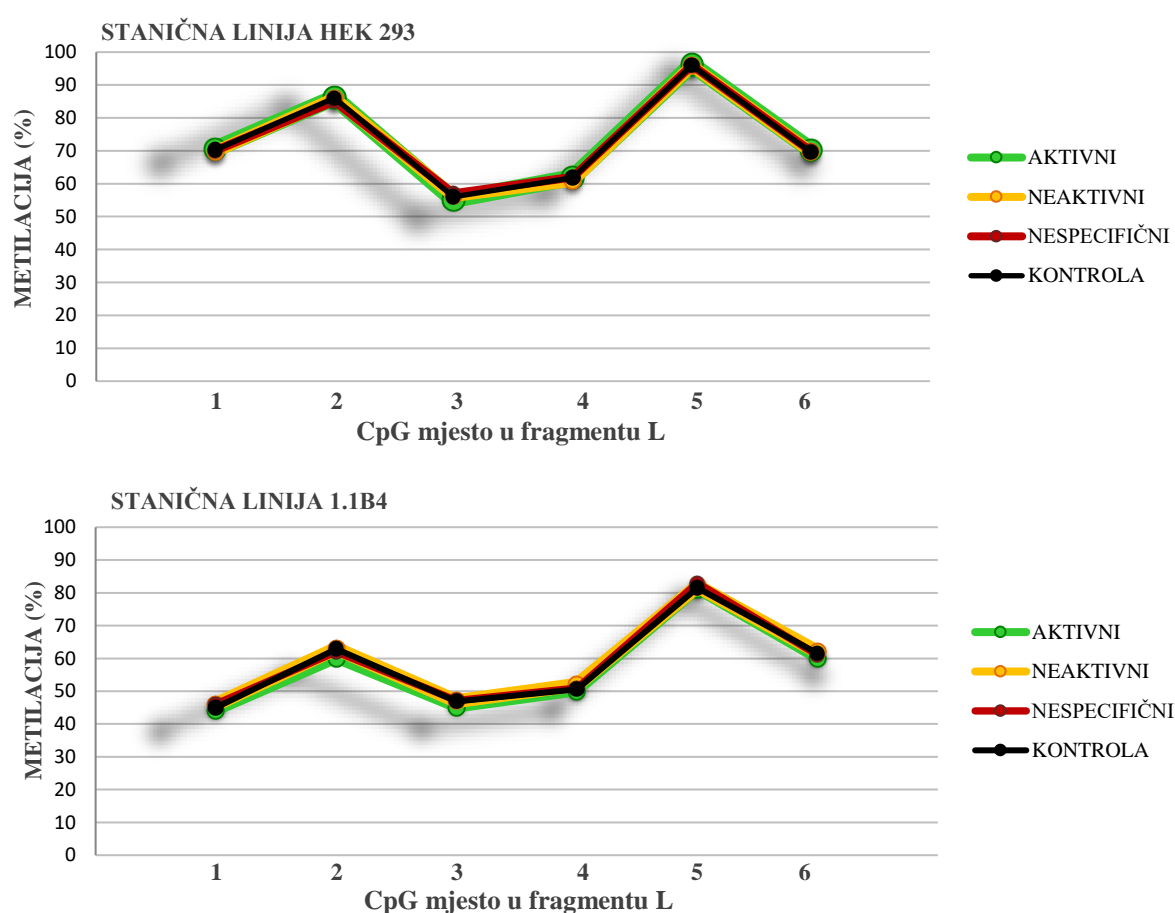


Slika 31. Prikaz promjene metilacije fragmenta H u genu *HNFI1A* u staničnim linijama HEK 293 i 1.1B4 transfeciranimi specifično navođenim aktivnim (zeleno) ili neaktivnim (žuto) dCas9-TET1 konstruktom te aktivnim, nespecifičnim (crveno) dCas9-TET1 konstruktom u odnosu na kontrolne stanice (crno). Na osi y navedeni su postoci metilacije, na osi x CpG mjesta u fragmentu H, a svaka točka predstavlja aritmetičku sredinu dviju tehničkih replika.

4.3.1 ANALIZA NESPECIFIČNE DEMETILACIJE

Osim ciljane aktivnosti konstrukta dCas9-TET1 navođenog specifičnom sgRNA za 4 CpG mjesta unutar fragmenta H, analizirala sam i njegovu aktivnost na nespecifičnom lokusu (fragment L u regiji LINE-1) u obje stanične linije. Rezultati pirosekvenciranja nakon bisulfitne konverzije prikazani su na Slici 32 te ukazuju na izostanak značajne promjene metilacije fragmenta L zbog povećane ekspresije katalitičke domene proteina TET1 u stanicama transfeciranim aktivnim specifičnim konstruktom u odnosu na kontrolni uzorak. Također, ni u slučaju stanica transfeciranih nespecifičnim aktivnim ili specifičnim neaktivnim dCas9-TET1 konstruktom nisam uočila promjenu metilacije CpG mjesta unutar fragmenta L u odnosu na kontrolne stanice.

METILACIJA FRAGMENTA L U REGIJI LINE-1 U STANIČNIM LINIJAMA



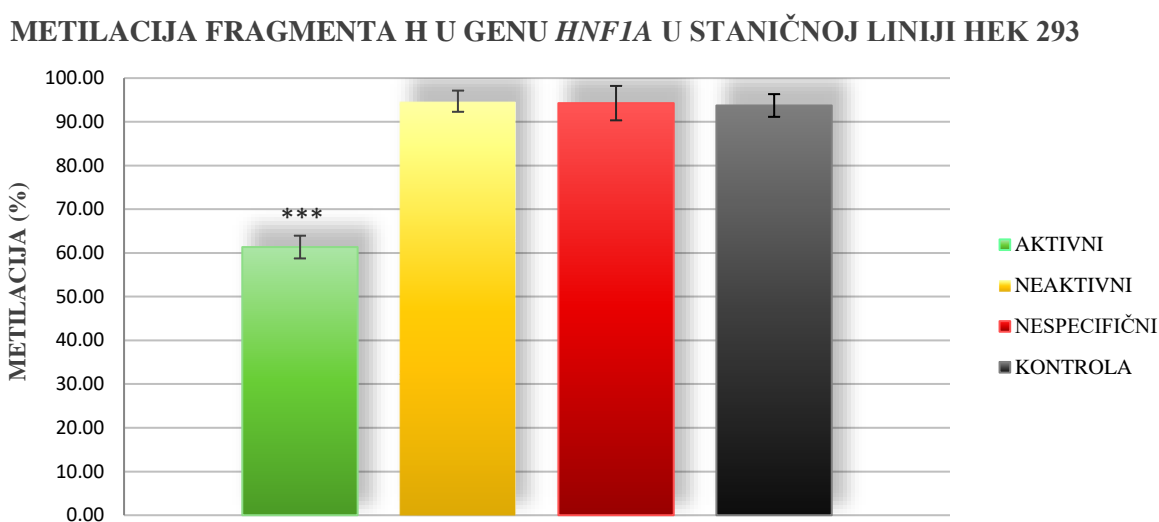
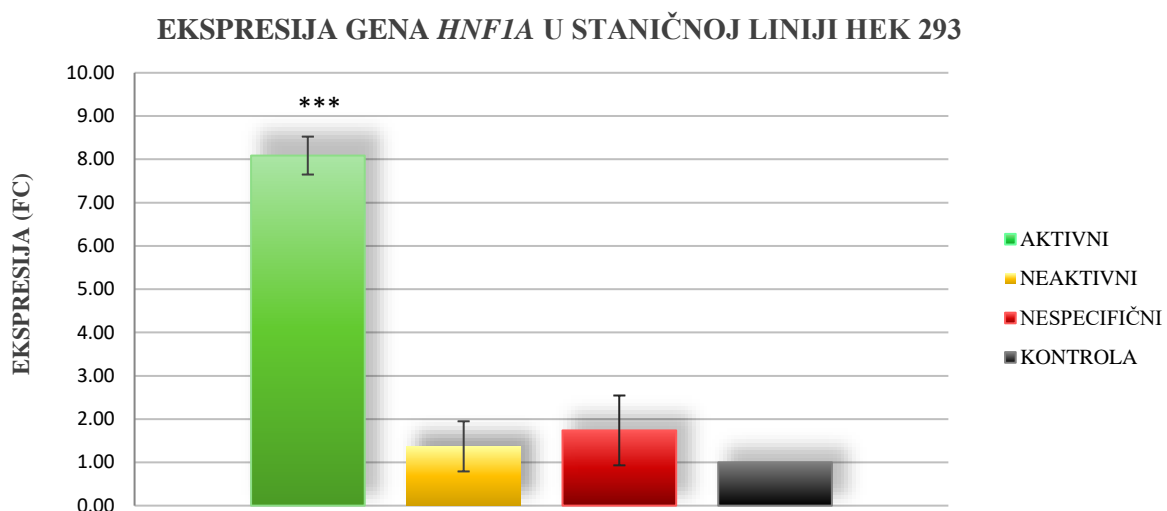
Slika 32. Prikaz promjene metilacije fragmenta L u regiji LINE-1 u staničnim linijama HEK 293 i 1.1B4 transfeciranimi specifično navođenim aktivnim (zeleno) ili neaktivnim (žuto) dCas9-TET1 konstruktom te aktivnim, nespecifičnim (crveno) dCas9-TET1 konstruktom u odnosu na kontrolne stanice (crno). Na osi y navedeni su postoci metilacije, na osi x CpG mjesta u fragmentu L, a svaka točka predstavlja aritmetičku sredinu dviju tehničkih replika.

4.3.2 KORELACIJA EKSPRESIJE I METILACIJE GENA *HNFI*A U STANICAMA LINIJE HEK 293 TRANSFECIRANIMA dCas9-TET1 SUSTAVOM

Efekt ciljane promjene metilacije 4 CpG mjesta u fragmentu H gena *HNFI*A na njegovu transkripcijsku aktivnost analizirala sam u stanicama linije HEK 293 transfeciranim dCas9-TET1 konstruktima. Dio stanica prikupljenih 8. dan nakon transfekcije iskoristila sam za izolaciju RNA pomoću koje sam analizirala razinu transkripata gena *HNFI*A. Rezultati su prikazani u obliku FC vrijednosti (Slika 33) pri čemu sam kao endogenu kontrolu za izračun Δ Ct vrijednosti koristila gen *HMBS*, a za izračun $\Delta\Delta$ Ct vrijednosti koristila sam uzorak kontrolnih stanica (KONTROLA).

Razina metilacije fragmenta H u genu *HNFI*A (Slika 33) izražena je kao postotni udio metiliranih molekula DNA u ukupnom uzorku, a prikazana je srednja vrijednost metilacije sva 4 CpG mjesta.

U stanicama transfeciranim aktivnim, specifičnim dCas9-TET1 konstruktom, u kojima je snižena metilacija fragmenta H (Slika 33, zeleni stupac), ekspresija gena *HNFI*A povišena je 8 puta u odnosu na kontrolne, netransfecirane stanice ($p < 0,0001$). Također, oko 1,5 puta povećanu ekspresiju gena *HNFI*A uočila sam i u stanicama transfeciranim aktivnim nespecifičnim (Slika 33, crveni stupac), ili neaktivnim (Slika 33, žuti stupac) dCas9-TET1 konstruktom u kojima je metilacija fragmenta H jednako visoka kao u kontrolnim stanicama. Ipak, u slučaju ta dva konstrukta navedena promjena nije značajna ($p > 0,05$).

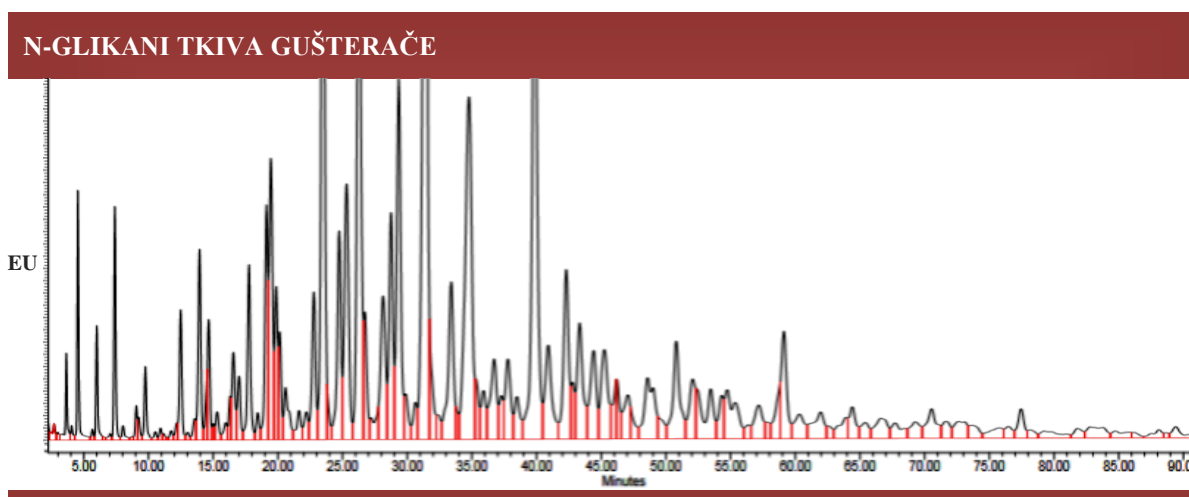


Slika 33. Prikaz promjene ekspresije i metilacije ciljane 4 CpG mjesta u prvom eksonu gena *HNFI*A u staničnoj liniji HEK 293 transfeciranoj specifično navođenim aktivnim (zeleno) ili neaktivnim (žuto) dCas9-TET1 konstruktima te aktivnim, nespecifičnim (crveno) dCas9-TET1 konstruktom u odnosu na kontrolne stanice (crno). Na osi y navedene su FC vrijednosti ekspresije (gornji graf) i metilacije (donji graf), dok su navedeni podatci poredani u stupce s obzirom na odgovarajući konstrukt. Visina svakog stupca jednaka je srednjoj vrijednosti dviju tehničkih replika dobivenih analizom stanica transfeciranih određenim konstruktom. P vrijednosti dobivene su neparametrijskim „Mann-Whitney U“ testom (***) = $p < 0,001$), FC= „fold change“.

4.4 GLIKOZILACIJA PROTEINA GUŠTERAČE U SKUPINAMA PACIJENATA

Fluorescentno obilježene N-glikane svih proteina tkiva gušterače analizirala sam putem HILIC-UPLC kromatografske metode. Zbog nedovoljne količine tkiva u slučaju pojedinih uzoraka, analizirala sam 38 uzoraka tumorskog i 24 uzorka netumorskog tkiva od ukupno 56 (Tablica 4).

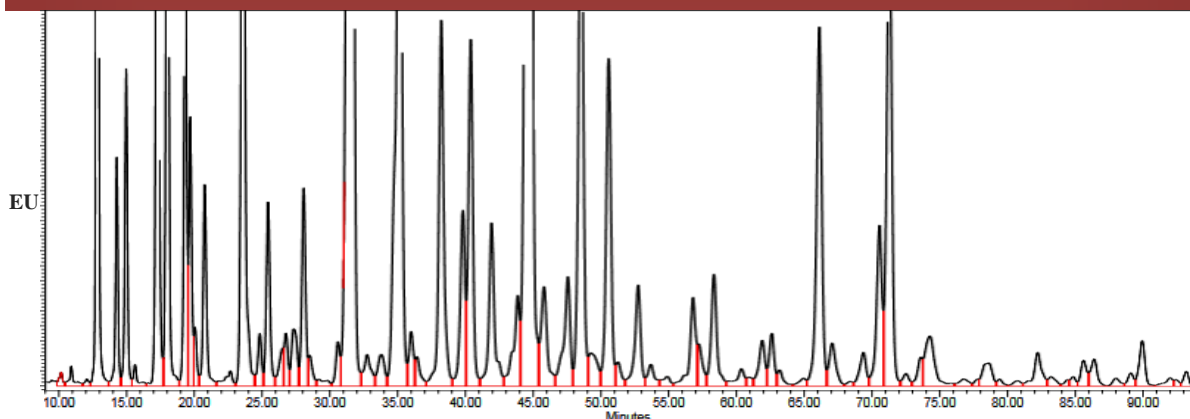
Potencijalnu nereproducibilnost kromatografskog razdvajanja minimalizirala sam korištenjem samo jednog kromatografskog sustava pri čemu sam sve uzorke analizirala u neprekinutom vremenskom periodu. Ručno sam odredila početak i kraj svakog kromatografskog vrška te je ukupan broj razdvojenih vršaka u slučaju N-glikana tkiva gušterače bio 115 (Slika 34). Za svaki kromatografski vršak izračunat je udio u ukupnoj površini ispod kromatograma koji sam koristila u naknadnim analizama.



Slika 34. Kromatogram N-glikana netumorskog tkiva gušterače s razdvojenim glikanskim strukturama; na osi y navedene su EU jedinice (jedinice emisije proporcionalne količini glikanske strukture, „emission unit“), na osi x vrijeme retencije glikana na kromatografskoj koloni.

Kao kontrolu kvalitete kromatografske analize upotrijebila sam standardne uzorke N-glikana plazme obilježene prokainamid hidrokloridom (Slika 35) koji su perpetuirano analizirani nakon svakog 12-og uzorka. Ukupan broj kromatografskih vršaka koje sam mogla razdvojiti u standardnim uzorcima je 80. Za svaku glikansku strukturu, svih analiziranih standarda (ukupno 16) izračunala sam koeficijent varijacije koji je u slučaju samo 3 kromatografska vrška bio veći od 10%, ali još uvijek manji od 15% (uvriježeni prag koeficijenta varijacije u kontekstu kontrole kvalitete analize).

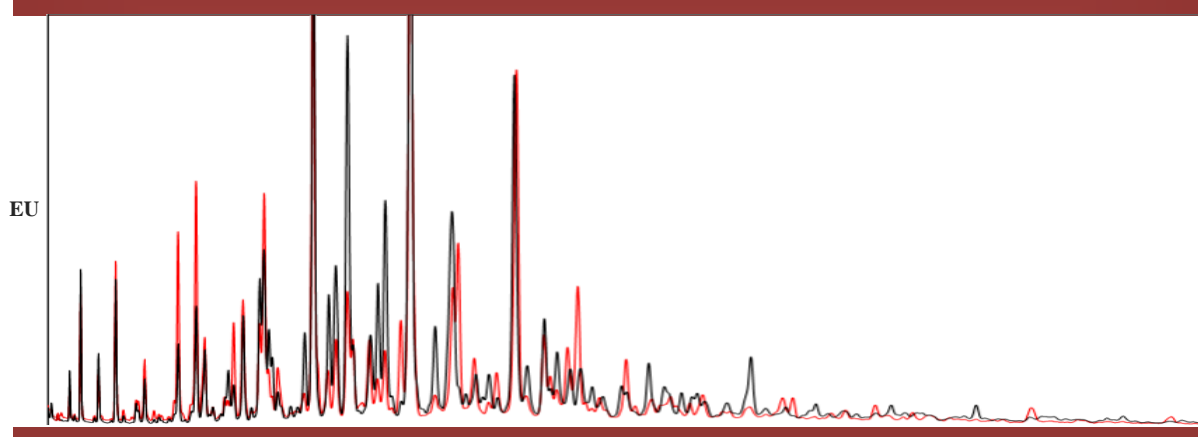
STANDARD N-GLIKANA KRVNE PLAZME



Slika 35. Kromatogram N-glikana krvne plazme, na osi y navedene su EU jedinice, na osi x vrijeme retencije glikana na kromatografskoj koloni, EU = „emission unit“ .

Kao kontrolu kvalitete cijelog postupka (izolacija, obilježavanje, pročišćavanje, kromatografska analiza) koristila sam 3 ista uzorka prereza tkiva gušterače fiksiranog formalinom i uklopljenog u parafin koje sam analizirala na isti način kao ostale uzorke, u 3 različite serije s obzirom na izolaciju proteina. Koeficijenti varijacije u slučaju 26 kromatografskih vršaka bili su veći od 15% te su isti, zbog nedovoljne reproducibilnosti, izuzeti iz naknadnih statističkih analiza. Isključeni kromatografski vršci su: 2, 4, 7, 10, 14, 15, 17, 22, 27, 28, 41, 58, 66, 75, 76, 84, 86, 89, 93, 95, 98, 106, 107, 110, 114, 115.

N-GLIKANI TUMORSKOG I NETUMORSKOG TKIVA GUŠTERAČE ISTOG PACIJENTA



Slika 36. Prikaz preklapljenih kromatograma N-glikana netumorskog i tumorskog (crveno) tkiva gušterače; na osi y navedene su EU jedinice, a os x predstavlja vrijeme retencije N-glikana na kromatografskoj koloni (jedinice nisu navedene jer između uzoraka postoji mali vremenski pomak), EU= “emission unit“.

Pri usporedbi kromatografskih profila N-glikana tumorskog i netumorskog tkiva u istom pacijentu, uočila sam razliku u obliku kromatografskih krivulja (Slika 36).

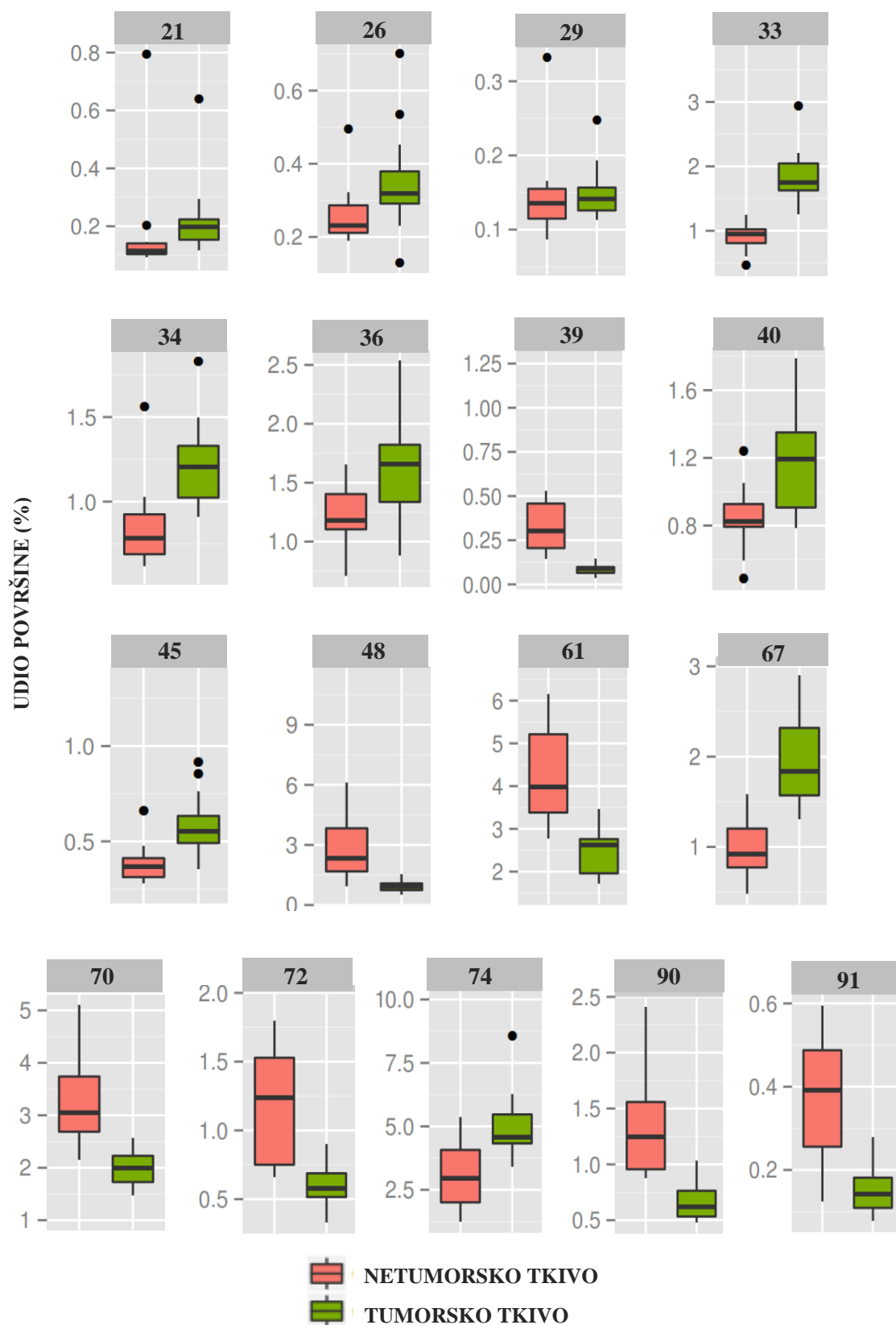
Kako bih utvrdila koji se kromatografski vršci statistički značajno razlikuju između netumorskog i tumorskog tkiva, usporedila sam zastupljenosti pojedinih kromatografskih vršaka između različitih tkiva neparametrijskim „Mann-Whitney U“ testom.

Statistički značajnu razliku uočila sam u slučaju kromatografskih vršaka: 21, 26, 29, 33, 34, 36, 39, 40, 45, 48, 61, 67, 70, 72, 74, 90, 91.

U Tablici 19 navedene su p vrijednosti za značajne kromatografske vrške te odnos između uspoređivanih tipova tkiva s obzirom na zastupljenost navedene glikanske strukture. Za iste kromatografske vrške, na Slici 37 prikazani su udjeli koje pojedini kromatografski vršci zauzimaju u ukupnom glikomu, zasebno za tumorsko i netumorsko tkivo.

Tablica 19. Prikaz statistički značajnih p vrijednosti dobivenih usporedbom zastupljenosti kromatografskih vršaka između netumorskog i tumorskog tkiva neparametrijskim „Mann-Whitney U“ testom; strelice okrenute prema dolje označavaju smanjenu zastupljenost kromatografskog vrška, a prema gore povećanu, prag p vrijednosti iznosi 0,05 i značajnima se smatraju p vrijednosti manje od 0,05.

KROMATOGRAFSKI VRŠAK	p VRIJEDNOST (<0,05)	NETUMORSKO TKIVO (NISKOMETILIRANO)	TUMORSKO TKIVO (VISOKOMETILIRANO)
21	0,02	↓	↑
26	0,02	↓	↑
29	0,001	↓	↑
33	0,01	↓	↑
34	0,0004	↓	↑
36	0,01	↓	↑
39	0,01	↑	↓
40	0,0007	↓	↑
45	0,02	↑	↓
48	0,01	↑	↓
61	0,03	↑	↓
67	0,03	↓	↑
70	0,03	↑	↓
72	0,0009	↑	↓
74	0,02	↓	↑
90	0,01	↑	↓
91	0,02	↑	↓



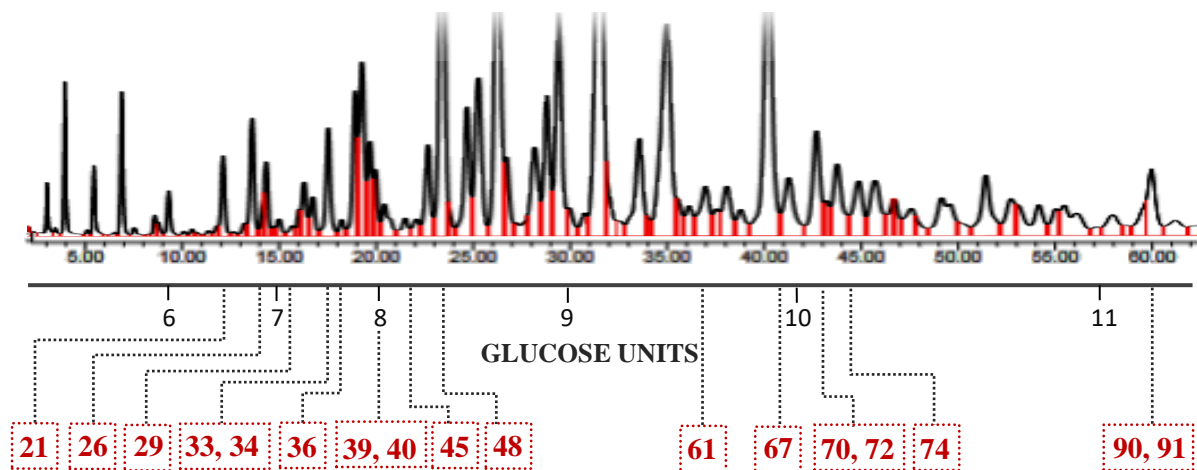
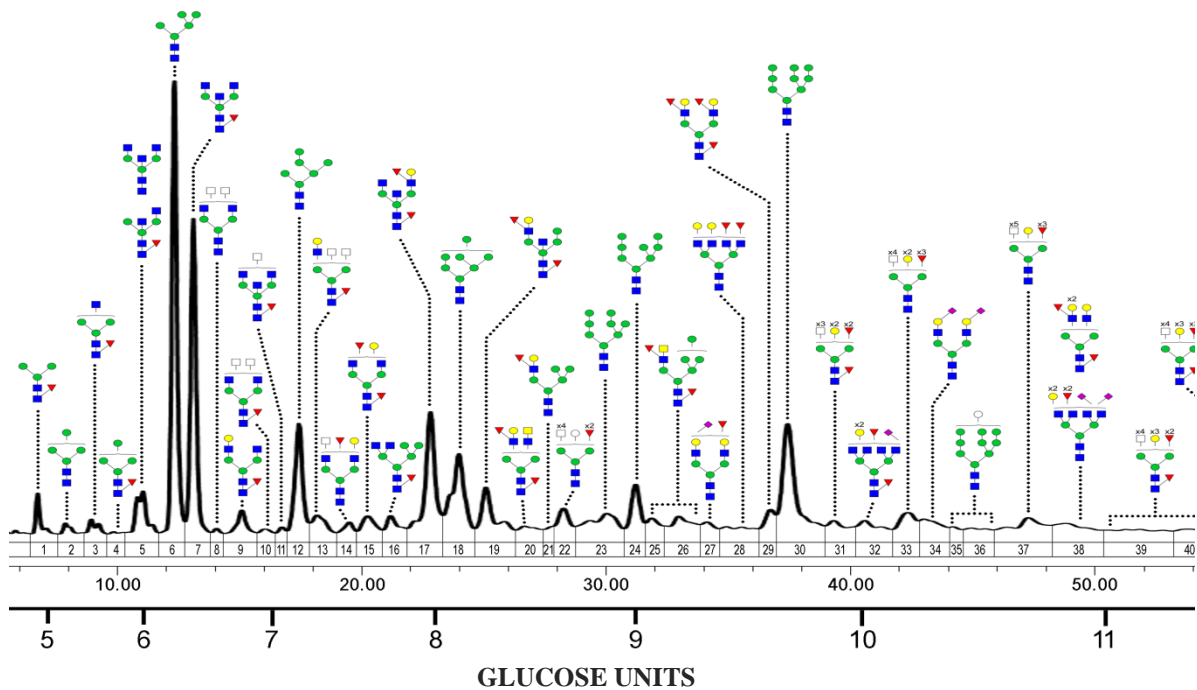
Slika 37. Značajno različiti kromatografski vršci u tumorskom i netumorskom tkivu; na osi y prikazana je raspodjela udjela kromatografskog vrška u tumorskom (zeleno) i netumorskom (ružičasto) tkivu s izraženim interkvartilnim vrijednostima, medijanima te odstupajućim vrijednostima (od engl. *outlier*).

Kod određenih pacijenata bilo je dostupno samo tumorsko ili netumorsko tkivo pa se spolna raspodjela razlikovala u odnosu na cijeli uzorak pacijenata (s uniformnom raspodjelom). Zbog mogućnosti ovisnosti glikozilacije o spolu, za kromatografske vrške u Tablici 20 usporedila sam udjele kromatografskih vršaka s obzirom na spol te nisam utvrdila statistički značajnu razliku što znači da povećanje ili sniženje udjela tih kromatografskih vršaka ovisi samo o tipu tkiva. Strukture N-glikana koje odgovaraju pojedinom kromatografskom vršku još nisu poznate pa sam ih pokušala usporediti s kromatogramom N-glikana tkiva mozga (iz grupe prof. Lauca) s obzirom na broj jedinica glukoze (od engl. *Glucose Units*, GU).

Tablica 20. GU vrijednosti kromatografskih vršaka koji se značajno razlikuju između netumorskog i tumorskog tkiva i odgovarajućih N-glikana tkiva mozga; F=fukoza (kad je na početku imena tada je sržna), A= osnovna strukutra glikana od 2 N-acetilglukozamina i 3 manoze, M= manosa, G= galaktoza, B= računajući N-acetilglukozamin, S= sijalinska kiselina, H= heksoza, N= N-acetilheksozamin, LacDiNAc= N-acetilgalaktozaminil-1-4-N-acetilglukozamin, GU = “glucose unit“.

KROMATOGRAFSKI VRŠAK	GU JEDINICE	STRUKTURE N-GLIKANA U TKIVU MOZGA
21	6,5	FA2B, A2[6]BG1
26	6,9	M6D3, FA2BG1, FA4, FA3SulfG1
29	7,1	M6D1, A2G2, FA3G1, FA3B
33	7,5	A3F1G1
34	7,5	A3F1G1
36	7,6	FA2F1G1, H6N4, A3F1G1, FA4G1
39	8	FA1F1G1LacDiNAc
40	8	FA1F1G1LacDiNAc
45	8,2	FA1G1S[3]1M4, FA1F1G1BM4
48	8,4	FA2G1S[6]1, A1F1G1M5, FA1F1G1BM1, FA2G1M5, FA1F1G1LacDiNAc, H4N6F2
61	9,6	FA2F1G2S[3]1, FA2G3S[3]1, M9, FA2F2G2
67	9,9	FA2G2S[3,3]2, FA3F1G2S[3]1, FA4F1G2S[3]1, M9, FA3F2G2, H6N5F2, H5N6F3, FA4F1G3
70	10,1	FA3F1G3, FA3F1G2S[3]1,
72	10,1	FA3F1G3, FA3F1G2S[3]1, FA4F2G2, FA4F1G2S[3]1, H6N6F1, FA4F1G3, FA4G3B
74	10,2	FA3F1G3, FA3F1G2S[3]1, FA4F2G2, FA4F1G2S[3]1, H6N6F1, FA4F1G3, FA4G3B
90	11,2	FA4F2G3
91	11,2	FA4F2G3

GU vrijednosti značajnih vršaka utvrdila sam prema standardu u kojem su one poznate te sam po njima odredila odgovarajuće strukture u tkivu mozga (Slika 38, Tablica 20).



Slika 38. Prikaz kromatograma N-glikana tkiva mozga s utvrđenim glikanskim strukturama (gornji kromatogram) i kromatograma N-glikana netumorskog tkiva gušterače s istaknutim vršcima koji se značajno razlikuju između tumorskog i netumorskog tkiva (donji kromatogram); visina kromatografskih vršaka proporcionalna je zastupljenosti pojedine glikanske strukture u ukupnom glikomu, poredak glikana odgovara njihovom vremenu retencije na kromatografskoj koloni, a istaknuti značajni kromatografski vršci na donjem grafu povezani su s odgovarajućim GU vrijednostima, GU= “glucose unit“.

Usporedbom N-glikana tkiva gušterače s N-glikanima tkiva mozga pokušala sam identificirati zajedničko obilježje nepoznatih N-glikana gušterače čiji se udio povećava, odnosno smanjuje u slučaju hipermetilacije gena *HNF1A* (tumorsko tkivo). Za pojedine kromatografske vrške broj pronađenih strukutra u N-glikomu tkiva mozga je čak 8, a u slučaju kromatografskih vršaka bliskih GU vrijednosti, nemoguće je razlučiti o kojim je glikanskim strukturama mozga riječ. Zbog toga za kromatografske vrške 72 i 74, od kojih se 72 povećava, a 74 smanjuje u slučaju hipermetilacije, nije bilo moguće definirati koje se odgovarajuće glikanske strukture mozga smanjuju, odnosno, rastu. Ostale glikanske strukture, za koje sam mogla pretpostaviti smjer promjene, usporedila sam po glikanskom sastavu (broju struktura s fukozom, manozom, galaktozom, sijalinskom kiselinom i račvajućim N-acetilglukozaminom), ali nisam utvrdila razliku koja bi sugerirala promijenjenu specifičnu glikozilaciju povezanu s hipermetiliranim tumorskim tkivom.

Bez poznavanja glikanskih strukutra, jedino što sam mogla uočiti je porast udjela glikana manjih GU vrijednosti i pad udjela glikana većih GU vrijednosti u slučaju tumorskog tkiva zbog čega je moguće utvrditi poremećenu (nedovršenu) sintezu glikana zbog koje nastaju krnje strukture te smanjen udio visokorazgranatih glikanskih struktura.

5. RASPRAVA

Transkripcijski faktor HNF1A visoko je eksprimiran u gušterači gdje je uključen u metabolizam glukoze i razvoj dijabetesa, uključujući pravilnu ekspresiju glukoznih transportera GLUT1 i GLUT2 u β stanicama Langerhansovih otočića³¹. Ovaj transkripcijski faktor, zajedno s FOXA2, uključen je u kontrolu sekrecije inzulina stimulirane glukozom (od engl. *Glucose Stimulated Insulin Secretion*, GSIS) kroz ispravnu glikozilaciju transportera GLUT2. Prethodnim istraživanjima provedenima u grupi u kojoj sam radila doktorsku disertaciju pokazano je da se u podtipu dijabetesa MODY3 (od engl. *Maturity Onset Diabetes of the Young*), koji je uzrokovan mutacijama u genu *HNF1A*, događaju i promjene glikozilacije cirkulirajućih proteina plazme. Naime, u plazmi pacijenata koji boluju od ovog tipa dijabetesa, smanjene su sržna fukozilacija i razina visokorazgranatih glikanskih struktura⁶. Osim toga, indeks DG9, koji označava odnos između fukoziliranih i nefukoziliranih triantenarnih glikana, ima potencijal kliničkog markera za identifikaciju disfunkcije, odnosno mutacije, gena *HNF1A*. Zanimljivo je da je u istim pacijentima pokazana korelacija ovih glikanskih struktura i promjene metilacije u prvom eksonu gena *HNF1A* što sugerira da bi epigenetičko utišavanje moglo imati isti efekt kao i mutacija u genu *HNF1A*, odnosno, uzrokovati dijabetes tipa MODY3.

Deregulacija ekspresije gena *HNF1A*, ili mutacijom ili epigenetičkim promjenama u genu, povezuje dijabetes tipa II i duktalni adenokarcinom gušterače²⁷. Osim toga, prijašnje studije ukazuju i na mnoge druge sličnosti molekularnih promjena u razvoju ove dvije bolesti što bi moglo objasniti komorbiditet dijabetesa tipa II i duktalnog adenokarcinoma gušterače²¹¹. Svrha ovog istraživanja bila je utvrditi vezu između epigenetičke deregulacije gena *HNF1A* te promjena glikanskog fenotipa u dijabetesu tipa II i duktalnom adenokarcinomu gušterače.

Kako bih utvrdila imali li metilacija promotora gena *HNF1A* isti učinak na ekspresiju (i posljedično glikozilaciju proteina plazme) kao i mutacija u tom genu, demetilirala sam 4 CpG mjesta u prvom eksonu ovog gena, a za koje postoji indikacija da bi mogli biti uključeni u regulaciju ekspresije ovog gena. Naime, odabir ova 4 CpG mjesta temelji se na njihovoj korelaciji s ekspresijom gena *HNF1A* u staničnim linijama. U 9 staničnih linija pokazana je obrnuta korelacija metilacije 4 CpG mjesta i razine transkripcije gena *HNF1A* – u staničnim linijama u kojima su 4 CpG mjesta bila visoko metilirana, razina ekspresije je bila niska ili transkripcije uopće nije bilo, a u staničnim linijama gdje su 4 CpG mjesta bila nisko metilirana, ekspresija je bila visoka (Zoldoš i sur. 2012)⁷ i rezultati prikazani u ovoj disertaciji, Slika 33.

Iako korelacijske analize ukazuju da bi ova 4 CpG mjesta mogla biti regulacijska, pravi dokaz bi bila analiza ekspresije gena *HNF1A* u istim stanicama u kojima se ciljano promijenila metilacija. U tu svrhu upotrijebila sam molekularni alat CRISPR/dCas9-TET1 za ciljanu demetilaciju u staničnim linijama - 1.1B4, koja odgovara β stanicama Langerhansovih otoka gušterače čovjeka, te HEK 293, modelnoj staničnoj liniji u kojoj su već ranije testirani molekularni alati CRISPR/dCas9 izrađeni u laboratoriju prof. Zoldoš (Vojta, Dobrinić et al. 2016)⁸.

Umjesto metiltransferaze DNMT3A, na inaktivirani protein Cas9 (*dead* Cas9, dCas9) fuzionirana je katalitička podjedinica proteina TET1, dioksigenaze uključene u proces aktivne demetilacije DNA u čovjeka. Ovaj fuzijski protein je navođen molekulom sgRNA na ciljna 4 CpG mjesta u 1. eksonu gena *HNF1A*. Pri tome sam koristila samo jednu molekulu sgRNA, provjerene aktivnosti, dizajnirane s obzirom na udaljenost od ciljnog mjesta, prisutnost sekvence PAM (potrebne za vezanje fuzijskog proteina na ciljani lokus) te s obzirom na homologiju sa samo jednim (specifičnim) dijelom DNA.

Uz pomoć konstrukta CRISPR/dCas9-TET1, stupanj metilacije na odabrana 4 CpG mjesta snizila sam za 20% u stanicama 1.1B4, te 30% u stanicama HEK 293. Stupanj metilacije je bio najviše snižen na prvom, a najmanje na četvrtom CpG mjestu. Razlika u efektu sniženja metilacije može ovisiti o udaljenosti veznog mjesta fuzijskog proteina od ciljnog CpG mjesta ili o njegovoj dostupnosti s obzirom na nukleosomnu strukturu kromatina. Razlika u sniženju stupnja metilacije na ista 4 CpG mjesta između dvije različite stanične linije vjerojatno je posljedica manje učinkovite transfekcije stanica 1.1B4.

Zbog malog broja transfeciranih stanica u slučaju stanične linije 1.1B4, selekcija nije mogla biti provedena do kraja zbog čega su u uzorku transfeciranih stanica bile prisutne i netransfecirane stanice te je ukupan efekt sniženja metilacije bio relativno manji.

Kao kontrole specifične aktivnosti fuzijskog proteina dCas9-TET1 koristila sam, ili konstrukt u kojem je katalitička podjedinica TET1 bila neaktivna, ili konstrukt koji je navođen molekulom sgRNA za koju ne postoji ciljno mjesto u genomu (od engl. *non-targeting RNA*). Također, analizom metilacije raspršenih ponavljajućih elemenata LINE-1 testirala sam potencijalnu nespecifičnu aktivnost (od engl. *off-target*) fuzijskog proteina dCas9-TET1. Oba tipa kontrola pokazala su u obje stanične linije da je za sniženje metilacije ciljanih CpG mjesta neophodna katalitička aktivnost podjedinice proteina TET1 te da ista djeluje samo na ciljnoj regiji u genomu. Međutim, metoda koju sam koristila za provjeru nespecifičnog djelovanja alata CRISPR/dCas9-TET1 nije dovoljno osjetljiva i njome je moguće analizirati samo vrlo mali dio genoma. Za točniju provjeru specifičnosti djelovanja ovog alata bilo bi

potrebno upotrijebiti neku od metoda za cjelogenomsku analizu metilacije, poput bisulfitnog sekvenciranja, ili analizu metilacije reprezentativnih regija u genomu, kao što su primjerice hibridizacijski čipovi za analizu metilacije DNA (Infinium Methylation EPIC BeadChip 750K) i RRBS (od engl. *Reduced Representation Bisulfite Sequencing*).

Razinu ekspresije gena *HNF1A* nakon ciljane demetilacije CpG mjesta odredila sam samo u staničnoj liniji HEK 293. Naime, efikasnost transfekcije stanične linije 1.1B4 bila je vrlo mala pa nije bilo dovoljno stanica za analizu količine transkripata gena *HNF1A*. Sniženje metilacije od 30% u staničnoj liniji HEK 293 rezultiralo je povišenom ekspresijom gena *HNF1A*. Ovaj rezultat nedvojbeno ukazuje na to da su 4 CpG mjesta u prvom eksonu gena *HNF1A* važna za regulaciju njegove transkripcijske aktivnosti. Mehanizam kojim je ekspresija inhibirana dodavanjem metilne skupine na citozin vjerojatno je povezan s položajem analizirana 4 CpG mjesta na početku 1. eksona, u blizini mjesta inicijacije transkripcije. Ovdje metilacija citozina predstavlja steričku smetnju transkripcijskoj mašineriji pri vezanju ili inicijaciji transkripcije gena, a moguće je i da onemogućava kontakt s pojačivačima.

Utjecaj metilacije na ekspresiju gena *HNF1A* potvrdila sam i u Langerhansovim otocima gušterače, ali u svega 5 uzoraka zbog nedovoljne količine i kvalitete RNA izolirane iz parafinskog tkiva. Za korelaciju razine metilacije i ekspresije gena *HNF1A* odabrala sam uzorke Langerhansovih otoka koji su pokazali širok raspon vrijednosti metilacije na analizirana 4 CpG mjesta u prvom eksonu. Rezultati korelacijske analize pokazuju da je ekspresija gena *HNF1A* u Langerhansovim otočićima pacijenata s adenokarcinomom i dijabetesom negativno korelirana sa stupnjem metilacije 4 CpG mjesta. Međutim, u skupini pacijenata s adenokarcinomom bez dijabetesa, razina ekspresije gena *HNF1A* u tumorskom tkivu je kod 13 od 26 pacijenata bila povišena i u slučaju hipermetiliranosti 4 analizirana CpG mjesta u 1. eksonu. Zanimljivo je da je ovakav efekt pokazan za tumor-supresorske gene (poput p53) gdje je u pojedinim slučajevima njihova ekspresija neočekivano stabilna usprkos hipermetilaciji njihovih regulatornih regija koja u većini tumora rezultira njihovim utišavanjem²¹². Postoji mogućnost da se sličan mehanizam održavanja ekspresije može pojaviti i u slučaju gena *HNF1A*, iako je riječ o potencijalno tumor-supresorskom genu čija je ekspresija dokazano snižena u duktalnom adenokarcinomu gušterače^{1,2}.

Ipak, zbog relativno malog broja uzoraka i nedovoljne kvalitete i količine tkiva, ne može se sa sigurnošću izvesti zaključak o korelaciji metilacije i ekspresije u tkivu gušterače.

U ovom istraživanju pokazano je da je stupanj metilacije na sva 4 analizirana CpG mjesta gena *HNF1A* u različitim tipovima tkiva gušterače (Langerhansovi otoci, netumorsko,

tumorsko tkivo) istog pacijenta različit s izuzetkom u skupini 1 (pacijenti s adenokarcinomom i dijabetesom) gdje je stupanj metilacije na 1. CpG mjestu netumorskog tkiva isti kao u Langerhansovim otocima. U tumorskom tkivu svih pacijenata obje skupine metilacija 4 CpG mjesta značajno je povišena u odnosu na netumorsko tkivo i Langerhansove otoke gušterače. Razliku u stupnju CpG-metilacije između različitih tkiva je moguće objasniti činjenicom o tkivno specifičnoj metilaciji genomskih regija gdje profil metilacije DNA ovisi o tipu stanice i njenom razvojnem stadiju. Međutim, razlike u metilaciji mogu reflektirati i patološke promjene koje se zbivaju u tumorskom tkivu te preteći tumorskog tkiva. Iako je uvidom patologa u dijelove parafinskih prereza identificirano tumorsko i netumorsko tkivo, ne možemo biti sigurni da u tkivu kojeg smo nazvali netumorsko ne postoje promjene metilacije određenih genomskih regija. Naime, poznato je da metilacija promotora nekih gena može biti promijenjena i nekoliko godina prije nego što se sa sigurnošću dijagnosticira tumor, odnosno, prije nego tumor postane „vidljiv“ na razini tkiva²¹³.

Iako je stupanj metilacije u Langerhansovim otocima pacijenata s dijabetesom značajno viši, a u skupini bez dijabetesa značajno niži u odnosu na netumorsko tkivo, vrijednost te razlike nije velika. Mala vrijednost promjene mogla bi se objasniti činjenicom da je netumorsko tkivo potencijalno sadržavalo i duktalne i acinarne stanice koje se razlikuju u profilu metilacije²¹⁴ te ranije navedenom mogućnošću onkogene promjene statusa metilacije koja nije vidljiva na razini tkiva²¹³.

S druge strane, kada sam usporedila stupanj metilacije tumorskog tkiva s ostalim tkivima (netumorsko tkivo i Langerhansovi otoci), uz statističku značajnost, uočila sam i znatno veću vrijednost povišenja, u obje skupine pacijenata.

S obzirom na to da sam izravno potvrdila regulacijsku ulogu metilacije na 4 CpG mjesta smještena u 1. eksonu gena *HNF1A* na njegovu transkripcijsku aktivnost pomoću epigenetičkih CRISPR/dCas9 alata, hipermetilacija na tim CpG mjestima podrazumijeva utišavanje ekspresije ovoga gena. S druge strane, iako je metilacija tumor-supresora *HNF1A* povišena i u Langerhansovim otocima skupine s dijabetesom u odnosu na netumorsko tkivo, u njima nije bio zabilježen tumorski fenotip stanica (odnosno, nijednom od pacijenata nije bio dijagnosticiran inzulinom).

Moguće objašnjenje je da je razlog razlike u posljedicama hipermetilacije gena *HNF1A* između Langerhansovih otoka i tumorskih stanica gušterače u različitoj ulozi *HNF1A* u različitim tipovima stanica³¹. Također, u razvoju tumora sudjeluje veći broj gena i vjerojatno sama deregulacija gena *HNF1A* nije dovoljna za onkogenezu⁴⁶.

Najveći raspon vrijednosti postotaka metilacije gena *HNF1A* te koeficijenti varijacije na sva 4 analizirana CpG mjesta zabilježeni su u Langerhansovim otocima pacijenata s adenokarcinomom gušterače i dijabetesom (skupina 1), dok netumorsko i tumorsko tkivo obje skupine pacijenata pokazuju niži koeficijent varijacije. Razlog navedenoj velikoj varijabilnosti stupnja metilacije gena *HNF1A* u skupini 1 (u prosjeku za 30% veći od koeficijenta varijacije stupnja metilacije gena *HNF1A* u netumorskom tkivu) bi mogao biti građa Langerhansovih otoka koji, osim β stanica, sadrže i druge tipove stanica (α , δ , γ , ϵ), iako u manjem broju. S druge strane, razlog bi mogao biti i metodološke prirode. Naime, mikrodisekcijom se dobiva mali broj Langerhansovih otočića te prinos DNA iz male količine prikupljenog tkiva može utjecati na reproducibilnost rezultata. Ipak, kako bih riješila ovaj metodološki problem, prilikom mikrodisekcije sam izuzela sve Langerhansove otoke prisutne u uzorku te sam koristila maksimalnu količinu DNA kao kalup u reakciji PCR.

Koeficijent varijabilnosti je također veći i u Langerhansovim otocima pacijenata skupine bez dijabetesa u odnosu na netumorsko tkivo, ali je ta razlika manja u usporedbi s varijabilnošću Langerhansovih otoka skupine s dijabetesom. Stoga se raznolikom građom Langerhansovih otoka može objasniti tek manji dio varijabilnosti, a na nju vjerojatno najviše utječu molekularni procesi u Langerhansovim otocima pacijenata s dijabetesom zbog kojih se mijenja status metilacije gena *HNF1A* i koji su povezani s razvojem dijabetesa.

S druge strane, u tumorskim stanicama gušterače također dolazi do aberantne promjene metilacije gena *HNF1A*, ali varijabilnost statusa metilacije nije toliko velika kao u slučaju Langerhansovih otočića skupine s dijabetesom. Razlog tome mogla bi biti homogenost tumorskih stanica koja se može objasniti teorijom klonalne evolucije ili tumorskim matičnim stanicama što posljedično rezultira sličnim stupnjem metilacije DNA između stanica.

Prema tome, mala varijabilnost stupnja metilacije gena *HNF1A* u tumoru je vjerojatno posljedica homogenosti tumorskog tkiva, dok je varijabilnost u Langerhansovim otocima gušterače povećana zbog interindividualnih razlika u građi Langerhansovih otoka i zbog molekularnih procesa povezanih s dijabetesom koji se odvijaju samo u slučajnom postotku stanica.

Stupanj metilacije 4 CpG mjesta gena *HNF1A* u Langerhansovim otocima u dvije različite skupine pacijenata je različit - viši je u pacijenata s adenokarcinomom i dijabetesom nego u pacijenata samo s adenokarcinomom gušterače. Kako se skupine pacijenata nisu razlikovale po stupnju metilacije na ova 4 CpG u tumorskom i netumorskom tkivu, ovaj rezultat sugerira

da je razlika metilacije zabilježena u 2 skupine pacijenata povezana s promjenama koje se odvijaju samo u β stanicama Langerhansovih otoka pacijenata s dijabetesom.

Analiza CpG-metilacije ponavljajućih elemenata LINE-1, koja je poslužila kao kontrola promjene metilacije na globalnoj genomske razini, pokazala je uniformnost u svih uzoraka u obje skupine pacijenata što dodatno ukazuje na specifičnost promjena metilacije u genu *HNF1A* u adenokarcinomu i dijabetesu tipa II. Međutim, danas postoje puno osjetljivije i bolje metode za procjenu globalne metilacije genoma. Analiza koja je korištena kao kontrola za stupanj metilacije ima značajan nedostatak, a to je da se stupanj metilacije procjenjuje tek za 6 CpG mjesta unutar ponavljajuće regije LINE-1, što je nedovoljan broj za donošenje zaključka o eventualnoj promjeni metilacije na globalnoj razini genoma.

Za potpunu informaciju o globalnoj hipometilaciji ili hipermetilaciji genoma potrebna je analiza metodama koju obuhvaćaju cijeli genom poput bisulfitnog sekvenciranja genoma i sl.

Iako ekspresiju gena *HNF1A* u Langerhansovim otocima nije bilo moguće analizirati za svaki uzorak skupine 1 zbog nedostatne količine i kvalitete tkiva, snažna korelacija metilacije i ekspresije tog gena u pacijentima s adenokarcinomom gušterače i dijabetesom sugerira povezanost gena *HNF1A* i dijabetesa. Istraživanja na mišjem modelu su također utvrdila sniženu ekspresiju gena *HNF1A* u miševa s poremećenim metabolizmom glukoze izazvanim prehranom bogatom mastima⁴. Povišena razina slobodnih masnih kiselina u krvi uzrokuje stanje slično inzulinskoj rezistenciji koje potiče rast tumora gušterače i rezultira kompenzacijskom proliferacijom stanica gušterače te pojavom malignih lezija²¹¹. S obzirom na to da je poremećena ekspresija gena *HNF1A* uočena i u duktalnom adenokarcinomu gušterače, jedan od molekularnih procesa zajednički ovim dvjema bolestima koji bi mogao objasniti visoki komorbiditet dijabetesa i ovog tipa tumora²¹¹ jest deregulacija ekspresije gena *HNF1A*.

Činjenica da je u 80% ljudi oboljelih od duktalnog adenokarcinoma gušterače dijagnosticiran i dijabetes ili intolerancija na glukozu potvrđuje kompleksnu vezu između ovog tipa tumora i metabolizma glukoze. Ipak, još nije posve jasno postoji li između navedenih bolesti uzročno-posljedična veza te koja je od bolesti uzrok, a koja posljedica. Rezultati dosadašnjih istraživanja se ne podudaraju i najvjerojatnije komorbiditet adenokarcinoma gušterače i dijabetesa ovisi o pojedinačnom slučaju. Većina ljudi koji se oporave nakon uklanjanja tumora gušterače, uglavnom se oporavi i od dijabetesa, dok je, s druge strane, meta-analizom 20 epidemioloških studija utvrđeno da je duktalni adenokarcinom gušterače jedna od komplikacija dijabetesa²¹¹. Veliki problem kod epidemioloških istraživanja povezanosti

duktalnog adenokarcinoma gušterače i dijabetesa je izostanak diskriminacije između tipova dijabetesa, a oni mogu imati potpuno različitu patofiziologiju. Primjerice, za dijabetes tipa I nikad nije dokazana veza s tumorom gušterače²¹⁵.

Gotovo u svakom slučaju duktalnog adenokarcinoma gušterače dolazi do oštećenja tkiva koje rezultira gubitkom manjeg dijela Langerhansovih otoka, ali optimalno lučenje inzulina u odgovoru na glukozu, očuvano je i nakon većeg gubitka Langerhansovih otoka²¹⁶. Stoga, poremećena sekrecija inzulina u ovom tipu tumora nije posljedica oštećenja tkiva gušterače, ali bi mogla biti rezultat poremećene epigenetičke regulacije ekspresije gena koji sudjeluju u pojavi i razvoju oba tipa bolesti. U skladu s navedenim, u ovom istraživanju nije bilo moguće izvesti nedvojbeni zaključak o isključivoj povezanosti epigenetičke promjene u genu *HNF1A* samo s dijabetesom ili tumorom jer su tkiva izuzeta iz pacijenata koji su svi oboljeli od duktalnog adenokarcinoma gušterače.

Zbog razlike u metilaciji gena *HNF1A* u Langerhansovim otocima između skupina, pri čemu su u skupni pacijenata s dijabetesom (1) vrijednosti CpG-metilacije bile povišene, moguće je zaključiti kako postoji povezanost metilacije gena *HNF1A* s dijabetesom tipa II. Ipak, ta veza nije isključiva i ne može se definirati bez uzimanja u obzir utjecaj molekularnih procesa povezanih s tumorom. Naime, jednako je vjerojatan scenarij u kojem bi promjena metilacije promotora *HNF1A* te posljedična deregulacija njegove transkripcije u Langerhansovim otocima mogle biti povezane uz tumorske promjene u okolnom tkivu koje, u konačnici, za posljedicu imaju poremećen metabolizam glukoze.

Veza između različitih tipova dijabetesa i gena *HNF1A* je već dugo poznata, a sekvenca tog gena čak se koristi za postavljanje dijagnoze podtipa dijabetesa MODY3. Promjena u jednom nukleotidu (od engl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) u genu *HNF1A* uzrokuje razvoj podtipa dijabetesa MODY3, a težina simptoma bolesti ovisi o poziciji polimorfizma^{6,27–29,45}. U dijabetesu tipa II također su uočene mutacije u genu *HNF1A*^{25,52,64,114,217} ali, za razliku od podtipa dijabetesa MODY3, nisu smještene u regijama važnima za funkcioniranje gena te je njihov efekt stoga manji.

Također, pozicija mutacije u genu *HNF1A* povezana je s tkzv. indeksom DG9 koji označava odnos između fukoziliranih i nefukoziliranih triantenarnih glikanskih struktura na proteinima plazme. Studija provedena na 800 ljudi iz opće populacije, od kojih je više od 200 bolovalo od podtipa dijabetesa MODY3⁶, pokazala je da je indeks DG9 niži u slučaju mutacija koje imaju jači efekt na funkciju proteina (u dimerizacijskoj i DNA vezujućoj domeni). U izračunu DG-9 indeksa koriste se glikanske strukture FA3BG3 i A3F1G3 koje se

izvode iz N-glikana plazme uklanjanjem sijalinske kiseline, a on je niži u slučaju mutacija gena *HNF1A*. Uloga gena *HNF1A* u regulaciji glikozilacije opisana je i u istraživanju provedenom u grupi u kojoj je ovaj transkripcijski faktor prepoznat kao glavni regulator antenarne i sržne fukozilacije glikana na proteinima plazme. Osim što kontrolira transkripciju fukoziltransferaza koje dodaju fukozu na glikoprotein, on regulira i transkripciju fukokinaza koje reguliraju puteve sinteze fukoze⁵.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da epigenetičke promjene sudjeluju u razvoju, pa i u predispoziciji za razvoj dijabetesa^{7,112,119,218}. Analiza metiloma Langerhansovih otočića 5 pacijenata oboljelih od dijabetesa tipa II potvrdila je generalno poremećenu metilaciju i ekspresiju velikog broja gena u dijabetesu te je gen *HNF1A* identificiran kao gen kandidat koji je uključen u regulaciju lučenja inzulina u β stanicama Langerhansovih otočića¹¹⁴. Ako je funkcija gena *HNF1A* trajno poremećena zbog njegove aberantne metilacije (epimutacija), mogli bismo očekivati isti efekt kao i u genetičkom podtipu dijabetesa MODY3 uzrokovanom mutacijama u genu *HNF1A*. U tom slučaju fenotip bi bio isti te bi jedino sekvenciranje moglo potvrditi radi li se o genetičkoj ili epigenetičkoj mutaciji koja je inaktivirala ovaj gen. Korelacijska analiza metilacije promotora gena *HNF1A* i N-glikana proteina plazme sugerira da bi epigenetičko utišavanje moglo biti uzrokom pojave podtipa dijabetesa MODY3⁷. S obzirom na to da mutacija u genu *HNF1A* uzrokuje podtip dijabetesa MODY3, te da su u plazmi tih pacijenata promijenjene iste glikanske strukture koje koreliraju s promjenom metilacije u promotoru *HNF1A*, hipoteza je da je epigenetičko utišavanje gena *HNF1A* jedan od mogućih mehanizama koji vode ka razvoju ove bolesti.

Zanimljivo je da je i u istraživanju provedenom na miševima čija je prehrana bila bogata mastima pokazano kako je gen *HNF1A* uključen u kontrolu sekrecije inzulina stimulirane glukozom kroz nepravilnu glikozilaciju membranskog proteina, glukoznog transportera GLUT2. Nepravilna glikozilacija transportera GLUT2 posljedica je deregulacije gena *Mgat4a* koji kodira glikoziltransferazu Gnt-4a uključenu u stvaranje visokorazgranatih glikanskih struktura. Pretpostavlja se da razgranati glikani stabiliziraju glikoprotein GLUT2 na staničnoj površini tako da se povezuju s proteinom galektin-9 koji reorganizira grupiranje transportera GLUT2 u membranskim domenama i tako onemogućava invaginaciju membrane na mjestima bogatima proteinima GLUT2 te posljedično utječe na unos glukoze (Slika 6). Na taj način modulira i lučenje inzulina stimulirano visokim razinama glukoze u krvi, odnosno odgovor β stanica na glukozu koji je najčešće poremećen u dijabetesu^{53,219}. Osim u dijabetesu, u adenokarcinomu gušterače je također zabilježena aberantna N-glikozilacija proteina^{172,184} što je još jedna od poveznica ovih patoloških poremećaja.

N-glikozilaciju proteina analizirala sam samo u tumorskom i netumorskom tkivu gušterače jer metoda HILIC-UPLC nije bila dovoljno osjetljiva za analizu glikana u malom broju Langerhansovih otoka. Osjetljivijim metodama kao što su MALDI-*imaging* ili PGC-nanoLC-ESI-MS/MS mogle bi se odrediti glikanske strukture u vrlo maloj količini tkiva, ali takva analiza glikozilacije proteina ima i nedostatke kao što su gubitak sijalinske kiseline (jedna od podjedinica u složenim glikanskim strukturama), zahtjevnost izvedbe i cijena same analize.

Korelacijom metilacije gena *HNF1A* te N-glikozilacije u tumorskom i netumorskom tkivu u obje skupine pacijenata nije bilo moguće utvrditi uzročno-posljedičnu vezu. Iako je u tumorskom tkivu zabilježeno povećanje, odnosno sniženje, udjela određenih glikanskih struktura te slaba korelacija s hipermetilacijom gena *HNF1A*, ipak nije bilo moguće dovesti u direktnu vezu ove dvije promjene s obzirom na to da se u tumorskim stanicama odvijaju i promjene u metilaciji i ekspresiji mnogih drugih gena, a time i složenih molekularnih procesa. Jedan od budućih pristupa bio bi analiza glikanskog fenotipa stanica u kojima je modulirana metilacija gena *HNF1A* upotrebom CRISPR/Cas9 molekularnih alata.

Metodom HILIC-UPLC nije bilo moguće identificirati glikanske strukture unutar pojedinih kromatografskih vršaka pa je jedan od budućih ciljeva također i strukturalna analiza masenom spektrometrijom. Kromatograme N-glikana tkiva gušterače usporedila sam s kromatogramima N-glikana tkiva mozga (po broju glukoznih jedinica). Na taj način sam pokušala pretpostaviti neke općenite karakteristike glikanskih struktura u kromatografskim vršcima koji su se razlikovali između tumorskog (hipermetiliranog) i netumorskog (hipometiliranog) tkiva gušterače. U svim kromatografskim vršcima N-glikoma gušterače identificirano je više različitih glikanskih struktura N-glikoma mozga te nije bilo moguće utvrditi povećanje/smanjenje udjela pojedinih specifičnih glikanskih struktura. S druge strane, može se pretpostaviti da se na kraju kromatograma nalaze veće, razgranate strukture čiji se udio u ukupnom N-glikomu gušterače smanjuje u slučaju tumorskog tkiva gdje je gen *HNF1A* hipermetiliran.

Iako iz formalinom fiksiranog tkiva uklopljenog u parafin ovom metodom nije bilo moguće analizirati sve uzorke, analiza metilacije i glikozilacije proteina iz lako dostupnog tkiva poput krvi nije dovoljno pouzdana jer može dati lažno negativan rezultat. Idealno bi bilo provesti sve analize na onom tipu tkiva koje je zahvaćeno bolešću. S obzirom na to da je u dijabetesu tipa II poremećeno lučenje inzulina iz β stanica Langerhansovih otoka¹¹⁴ oni su bili logičan odabir ciljnog tkiva za analize metilacije gena *HNF1A* i glikozilacije proteina. Stoga sam upravo ovaj tip stanica laserskom mikrodisekcijom izolirala iz prereza tkiva gušterače. Osim

možnosti analize određenog tipa tkiva, formalinom fiksirano tkivo uklopljeno u parafin ima i druge prednosti: dugotrajno skladištenje koje ne iziskuje posebne okolišne uvjete (sobna temperatura), mogućnost vizualizacije stanica pomoću mikroskopa, izostanak dodatnih uzorkovanja (izuzimanje tkiva i njegova fiksacija te uklapanje u parafin su dio rutinskog postupka u dijagnostičkoj obradi pri kojem se ne uništava cijeli uzorak). Također, napretkom metoda molekularne biologije, količina tkiva potrebna za analizu se neprestano smanjuje što ide u prilog potencijalnoj upotrebi FFPE tkiva u svrhu pronalaska biomarkera jer minimalizira količinu tkiva koja se izuzima²²⁰.

Neke od mana ovakvog tipa uzorka su njegova nedostupnost, često nedovoljna količina i kvaliteta tkiva te nedostatak pravih kontrolnih uzoraka. U ovom istraživanju sam kao kontrolni uzorak analizirala netumorsko tkivo gušterače istih onih ispitanika oboljelih od adenokarcinoma gušterače. Tjelesne tekućine, zbog lake dostupnosti, još su uvijek u prednosti prilikom razvijanja biomarkera i jedna od pretpostavki je bila i da bi se prema profilu N-glikana proteina koje izlučuju duktalne stanice gušterače mogao detektirati podtip dijabetesa MODY3 iz krvi kao što je to pokazano za DG-9 glikanski indeks⁶.

U svrhu dijagnoze tumora gušterače danas se u krvi uvriježeno analiziraju razine CA 19-9, ugljikohidratnog antigena koji nastaje u tumorskim (duktalnim) stanicama gušterače. Primjer glikoproteina duktalnih stanica čija je glikozilacija promijenjena u patološkom poremećaju, a koji se također može detektirati u krvi, je ribonukleaza 1 (RNaza1). U slučaju da je promjena metilacije gena *HNF1A* (koja uzrokuje dijabetes) slična u Langerhansovim otocima i okolnom tkivu gušterače, prema profilu glikozilacije RNaze1 iz krvi mogao bi se izvesti zaključak o glikozilaciji proteina u Langerhansovim otocima te postaviti dijagnoza dijabetesa. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da se stupanj metilacije gena *HNF1A* razlikuje između Langerhansovih otoka i okolnog netumorskog tkiva. Drugim riječima, proteini koje izlučuju duktalne stanice u ovom slučaju nisu dobar „proxy“. Ipak, potencijalni proteini koje luče β stanice gušterače, a kod kojih bi se mogla analizirati glikozilacija (u svrhu pronalaska biomarkera iz krvi) su proteini poput amilina (od engl. *Islet Amyloid Polypeptide*, IAPP). Istraživanje tumora gušterače povezanog s dijabetesom pokazalo je da su povišene razine amilina povezane s disfunkcijom Langerhansovih otoka i smanjenim lučenjem inzulina²¹¹. Potencijalan nedostatak su male količine izlučenog amilina tj., nedovoljna osjetljivost metoda kojima se može analizirati glikozilacija jednog proteina. Ipak, u usporedbi sa sekvenciranjem gena *HNF1A*, kojim se detektira podtip dijabetesa MODY3, taj bi dijagnostički postupak mogao biti brži i precizniji. Također, poznato je kako su specifični glikofenotipovi povezani s različitim patološkim poremećajima, a razlučivanje podtipova dijabetesa je važno jer svaki od

njih zahtijeva različitu terapiju. Bio bi veliki napredak kada bi se mogli izdvojiti pacijenti s podtipom dijabetesa MODY3 iz skupine pacijenata s dijabetesom tipa II (obje skupine pokazuju iste simptome) jer se podtip dijabetesa MODY3 liječi jednostavnom oralnom primjenom sulfoniluree, dok se dijabetes tipa II najčešće doživotno liječi injekcijama inzulina što narušava kvalitetu života pacijenta.

U svrhu identifikacije potencijalnog biomarkera, potrebno je analizirati veći broj uzoraka od ukupno 56 iz ovog istraživanja. Da bi taj biomarker bio specifičan, pacijenti bi se trebali stratificirati samo na one koji imaju dijabetes, no u slučaju takvih pacijenata teško je dobiti relevantan uzorak gušterače. Svim pacijentima koji su bili uključeni u ovo istraživanje dijagnoza dijabetesa je postavljena u kasnijoj životnoj dobi te je pretpostavka da je riječ o dijabetesu tipa II. U budućim istraživanjima, bilo bi neophodno točno ustanoviti o kojem se tipu dijabetesa radi, ali i parametre koji bi mogli imati utjecaj na rezultate (točno vrijeme pojave dijabetesa, razina glukoze u krvi, ITM i sl.). Za potpunu informaciju o ulozi gena *HNF1A* na glikozilaciju proteina u dijabetesu, istraživanje bi svakako trebalo obuhvatiti i ispitanike oboljele od podtipa dijabetesa MODY3.

U svrhu rasvjetljavanja mehanizma regulacije glikozilacije putem epigenetičke regulacije bilo bi zanimljivo produljiti analiziranu regiju ili istražiti status metilacije susjednih regija DNA koje bi mogle sudjelovati u regulaciji. Potencijalno regulacijske regije ne moraju biti u neposrednoj blizini gena *HNF1A* (s obzirom na trodimenzionalnu strukturu DNA) pa bi se one mogle detektirati nekom od analiza konformacije kromosoma (3C, 4C, 5C). Precizno (vremenski i prostorno) uređene regulacijske cjeline su karakteristične za gene „homeobox“ poput *HNF1A*²²¹, a signalna mreža u koju su uključeni je iznimno kompleksna. Od svih proteina s kojima gen *HNF1A* stupa u interakciju, posebno se ističu geni *FOXA2* i *Mgat4a* zbog svoje uloge u disfunkciji Langerhansovih otoka u dijabetesu izazvanom prehranom bogatom masnim kiselinama. Stoga bi analize ekspresije gena i poremećenog odgovora na glukozu svakako trebale obuhvatiti i te gene.

U kontekstu funkcionalne analize, potrebno je poboljšati učinkovitost transfekcije stanica linije 1.1B4 koje imaju mogućnost lučenja inzulina kao odgovor na glukozu. Jedna od metoda transfekcije koja se pokazala uspješnom na stanicama koje je teško transfecirati je nukleoporacija i mogla bi riješiti ovaj problem. Zbog premale količine stanica u ovom istraživanju, nisam mogla izolirati dovoljnu količinu RNA za analizu ekspresije gena *HNF1A*, te sam ovisnost ekspresije o metilaciji dokazala samo u stanicama linije HEK 293. Povećana efikasnost transfekcije omogućila bi analizu ekspresije gena nakon ciljane demetilacije CRISPR/dCas9-TET1 molekularnim alatom. Također, omogućila bi i testiranje količine

inzulina koji stanice izlučuju nakon dodavanja glukoze u medij (testiranje mehanizma GSIS), a iz većeg broja stanica mogla bi se izolirati i dovoljna količina glukoznog transportera GLUT2 i analizirati njegova glikozilacija. Na taj način mogla bi se potvrditi pretpostavka o oporavljenom odgovoru stanica na glukozu nakon povišenja ekspresije gena *HNF1A* i uspostave pravilne glikozilacije transportera GLUT2. S obzirom na to da glikozilacija proteina GLUT2 zapravo utječe na razmještaj tog transportera na površini stanice, bilo bi zanimljivo provjeriti (imunohistokemijskim metodama) utječe li ciljana promjena metilacije gena *HNF1A* na poziciju proteina GLUT2 na površini stanice. Rasvjetljavanje mehanizma regulacije lučenja inzulina putem gena *HNF1A* je vrlo značajno jer potencijalno poboljšanje funkcije Langerhansovih otoka gušterače ukazuje na mogućnost primjene opisanih molekularnih alata u liječenju dijabetesa.

6. ZAKLJUČCI

1. Sniženje CpG-metilacije u prvom eksonu gena *HNF1A* u staničnom modelu HEK 293 bilo je popraćeno povišenjem transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* u istim stanicama što pokazuje da su ova mjesta uključena u regulaciju transkripcije gena *HNF1A*.
2. 4 regulacijska CpG mjesta u prvom eksonu gena *HNF1A* su različito metilirana u različitim tipovima tkiva gušterače (Langerhansovim otocima, netumorskom i tumorskom tkivu gušterače).
3. U tumorskom tkivu gušterače status metilacije regulacijske regije gena *HNF1A* je povišen u odnosu na netumorsko tkivo.
4. Status metilacije 4 regulacijska CpG mjesta gena *HNF1A* je viši u Langerhansovim otocima pacijenata s dijabetesom u odnosu na skupinu pacijenata bez dijabetesa.
5. Povišenje metilacije gena *HNF1A* u Langerhansovim otocima gušterače povezano je s dijabetesom, a u okolnom tkivu gušterače s tumorom.
6. U Langerhansovim otocima gušterače profil metilacije gena *HNF1A* nije isti niti se ne mijenja na isti način kao u okolnom tkivu gušterače.
7. Povišena metilacija 4 CpG mjesta u prvom eksonu gena *HNF1A* je povezana sa smanjenim udjelom složenih i visokorazgranatih N-glikana te s povećanim udjelom jednostavnih N-glikana s manjim brojem ogranaka.

7. LITERATURA

1. Luo, Z. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 1A (HNF1A) as a possible tumor suppressor in pancreatic cancer. *PLoS One* **10**, e0121082 (2015).
2. Hoskins, J. W. *et al.* Transcriptome analysis of pancreatic cancer reveals a tumor suppressor function for HNF1A. *Carcinogenesis* **35**, 2670–8 (2014).
3. Pierce, B. L. & Ahsan, H. Genome-wide “pleiotropy scan” identifies HNF1A region as a novel pancreatic cancer susceptibility locus. *Cancer Res.* **71**, 4352–8 (2011).
4. Ohtsubo, K., Chen, M. Z., Olefsky, J. M. & Marth, J. D. Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport. *Nat. Med.* **17**, 1067–79 (2011).
5. Lauc, G. *et al.* Genomics Meets Glycomics—The First GWAS Study of Human N-Glycome Identifies HNF1a as a Master Regulator of Plasma Protein Fucosylation. *PLoS Genet* **6**, e1001256 (2010).
6. Thanabalasingham, G. *et al.* Mutations in HNF1A Result in Marked Alterations of Plasma Glycan Profile. *Diabetes* **62**, 1329–37 (2013).
7. Zoldoš, V. *et al.* Epigenetic silencing of HNF1A associates with changes in the composition of the human plasma N-glycome. *Epigenetics* **7**, 164–72 (2012).
8. Vojta, A. *et al.* Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **44**, 5615–28 (2016).
9. Becker, A. E., Hernandez, Y. G., Frucht, H. & Lucas, A. L. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J. Gastroenterol.* **20**, 11182–98 (2014).
10. Modolell, I., Guarner, L. & Malagelada, J. R. Vagaries of clinical presentation of pancreatic and biliary tract cancer. *Ann. Oncol.* **10**, 82–84 (1999).
11. Pylayeva-Gupta, Y., Lee, K. E., Hajdu, C. H., Miller, G. & Bar-Sagi, D. Oncogenic Kras-induced GM-CSF production promotes the development of pancreatic neoplasia. *Cancer Cell* **21**, 836–47 (2012).
12. Neesse, A. *et al.* CTGF antagonism with mAb FG-3019 enhances chemotherapy response without increasing drug delivery in murine ductal pancreas cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 12325–30 (2013).
13. DeNicola, G. M. *et al.* Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **475**, 106–9 (2011).
14. Ying, H. *et al.* Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* **149**, 656–70 (2012).

15. Commisso, C. *et al.* Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* **497**, 633–7 (2013).
16. Yang, S. *et al.* Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev.* **25**, 717–29 (2011).
17. Provenzano, P. P. *et al.* Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **21**, 418–29 (2012).
18. Özdemir, B. C. *et al.* Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Diminished Survival. *Cancer Cell* **25**, 719–34 (2014).
19. Rhim, A. D. *et al.* Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **25**, 735–47 (2014).
20. Lee, J. J. *et al.* Stromal response to Hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 91–100 (2014).
21. Goonetilleke, K. S. & Siriwardena, A. K. Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* **33**, 266–70 (2007).
22. Bassagañas, S. *et al.* Pancreatic cancer cell glycosylation regulates cell adhesion and invasion through the modulation of $\alpha 2\beta 1$ integrin and E-cadherin function. *PLoS One* **9**, e98595 (2014).
23. Scacheri, C. A. & Scacheri, P. C. Mutations in the non-coding genome. *Curr. Opin. Pediatr.* **27**, 659–664 (2015).
24. Hrdlickova, B., de Almeida, R. C., Borek, Z. & Withoff, S. Genetic variation in the non-coding genome: Involvement of micro-RNAs and long non-coding RNAs in disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1842**, 1910–1922 (2014).
25. Voight, B. F. *et al.* Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat. Genet.* **42**, 579–89 (2010).
26. Kishore, P. Diabetes Mellitus (DM) - Endocrine and Metabolic Disorders - MSD Manual Professional Edition. *Merck Manual, professional version* (2015). Available at: <http://www.msdmanuals.com/professional/endocrine-and-metabolic-disorders/diabetes-mellitus-and-disorders-of-carbohydrate-metabolism/diabetes-mellitus-dm>. (Accessed: 9th November 2017)
27. Bellanné-Chantelot, C. *et al.* The Type and the Position of HNF1A Mutation Modulate Age at Diagnosis of Diabetes in Patients with Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY)-3. *Diabetes* 503–8 (2008). doi:10.2337/db07-0859

28. Ellard, S. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF-1 alpha) mutations in maturity-onset diabetes of the young. *Hum Mutat.* **16**, 377–85 (2000).
29. Yamagata, K. et al. Mutations in hepatocyte nuclear factor 1 α gene in maturity onset diabetes of the young. *Nature* **384**, 455–58 (1996).
30. Luco, R. F., Maestro, M. A., Sadoni, N., Zink, D. & Ferrer, J. Targeted deficiency of the transcriptional activator Hnf1alpha alters subnuclear positioning of its genomic targets. *PLoS Genet.* **4**, e1000079 (2008).
31. Servitja, J.-M. et al. Hnf1alpha (MODY3) controls tissue-specific transcriptional programs and exerts opposed effects on cell growth in pancreatic islets and liver. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 2945–59 (2009).
32. Shih, D. Q. et al. Hepatocyte nuclear factor-1 α is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat. Genet.* **27**, 375–82 (2001).
33. Cerf, M. E. Transcription factors regulating b-cell function. *Eur. J. Endocrinol.* **155**, 671–9 (2006).
34. von Wnuck Lipinski, K. et al. Hepatocyte Nuclear Factor 1A Is a Cell-Intrinsic Transcription Factor Required for B Cell Differentiation and Development in Mice. *J. Immunol.* **196**, 1655–65 (2016).
35. Ohtsubo, K. & Taniguchi, N. Physiological relevance of protein-glycosylation to pathogenesis of diabetes Failure of glucose sensor function of pancreatic β cells in the pathogenesis of type 2 diabetes. *J Phys Fit. Sport. Med* **3**, 223–8 (2014).
36. Pedersen, K. B., Chhabra, K. H., Nguyen, V. K., Xia, H. & Lazartigues, E. The transcription factor HNF1 α induces expression of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in pancreatic islets from evolutionarily conserved promoter motifs. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 1225–35 (2013).
37. Cui, X.-S., Zhang, D.-X., Ko, Y.-G. & Kim, N.-H. Aberrant epigenetic reprogramming of imprinted microRNA-127 and Rtl1 in cloned mouse embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 390–394 (2009).
38. Armendariz, A. D. & Krauss, R. M. Hepatic nuclear factor 1- α : inflammation, genetics, and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 106–11 (2009).
39. O'Brien, V. P. et al. Hepatocyte Nuclear Factor 1 Regulates the Expression of the Organic Cation Transporter 1 via Binding to an Evolutionary Conserved Region in Intron 1 of the OCT1 Gene s. *J. Pharmacol. Exp. Ther. J Pharmacol Exp Ther* **347**, 181–92 (2013).
40. Lee, S. & Jeong, S. In vitro selection and characterization of TCF-1 binding RNA

- aptamers. *Mol. Cells* **17**, 174–9 (2004).
41. Lussier, C. R. *et al.* Loss of hepatocyte-nuclear-factor-1alpha impacts on adult mouse intestinal epithelial cell growth and cell lineages differentiation. *PLoS One* **5**, e12378 (2010).
 42. Mega, J. L. *et al.* Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: An analysis of primary and secondary prevention trials. *Lancet* **385**, 2264–71 (2015).
 43. Köbel, M. *et al.* A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary. *Am. J. Surg. Pathol.* **33**, 14–21 (2009).
 44. Li, D. *et al.* Pathway analysis of genome-wide association study data highlights pancreatic development genes as susceptibility factors for pancreatic cancer. *Carcinogenesis* **33**, 1384–90 (2012).
 45. Ellard, S. & Colclough, K. Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) and 4 alpha (HNF4A) in maturity-onset diabetes of the young. *Hum. Mutat.* **27**, 854–69 (2006).
 46. Wei, P., Tang, H. & Li, D. Insights into pancreatic cancer etiology from pathway analysis of genome-wide association study data. *PLoS One* **7**, e46887 (2012).
 47. Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y. & Mills, G. B. Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 988–1004 (2005).
 48. Molero, X. *et al.* Gene expression dynamics after murine pancreatitis unveils novel roles for Hnf1a in acinar cell homeostasis. *Gut* 1187–96 (2012). doi:10.1136/gutjnl-2011-300360
 49. Triggs-Raine, B. L. *et al.* HNF-1alpha G319S, a transactivation-deficient mutant, is associated with altered dynamics of diabetes onset in an Oji-Cree community. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 4614–9 (2002).
 50. Hertel, J., Johansson, S. & Midthjell, K. Type 2 diabetes genes—Present status and data from Norwegian studies. *Nor. Epidemiol.* **23**, 9–22 (2013).
 51. Ley, S. H. *et al.* HNF1A G319S variant, active cigarette smoking and incident type 2 diabetes in Aboriginal Canadians: a population-based epidemiological study. *BMC Med. Genet.* **12**, 1 (2011).
 52. Horová, E., Prázný, M., Kaňková, K., Brismar, K. & Gu, H. F. Genetic and Functional Analyses of MRAS and HNF1A Genes in Diabetes and Diabetic Nephropathy. *Folia*

- Biol. (Praha)*. **58**, 121–127 (2012).
53. Group of authors. *Sugar chains: decoding the functions of glycans*. (Springer Japan, 2015). doi:10.1007/978-4-431-55381-6
 54. Bright, R. & Arnquist, J. CASES AND OBSERVATIONS connected with disease of the pancreas and duodenum. *Med. Chir. Trans.* 1–56 (1833).
 55. Huxley, R., Ansary-Moghaddam, A., Berrington de González, A., Barzi, F. & Woodward, M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br. J. Cancer* **92**, 2076–83 (2005).
 56. Everhart, J. & Wright, D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *Jama* **273**, 1605–9 (1995).
 57. Chari, S. T. *et al.* Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology* **129**, 504–11 (2005).
 58. Gupta, S. *et al.* New-Onset Diabetes and Pancreatic Cancer. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 1366–72 (2006).
 59. Ulanet, D. B., Ludwig, D. L., Kahn, C. R. & Hanahan, D. Insulin receptor functionally enhances multistage tumor progression and conveys intrinsic resistance to IGF-1R targeted therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10791–8 (2010).
 60. Pannala, R. *et al.* Prevalence and clinical profile of pancreatic cancer-associated diabetes mellitus. *Gastroenterology* **134**, 981–7 (2008).
 61. Permert, J. *et al.* Improved glucose metabolism after subtotal pancreatectomy for pancreatic cancer. *Br. J. Surg.* **80**, 1047–50 (1993).
 62. Basso, D. *et al.* Altered glucose metabolism and proteolysis in pancreatic cancer cell conditioned myoblasts: searching for a gene expression pattern with a microarray analysis of 5000 skeletal muscle genes. *Gut* **53**, 1159–66 (2004).
 63. Ben, Q. *et al.* The relationship between new-onset diabetes mellitus and pancreatic cancer risk: A case-control study. *Eur. J. Cancer* **47**, 248–54 (2011).
 64. Ferrer, J. A genetic switch in pancreatic beta-cells: implications for differentiation and haploinsufficiency. *Diabetes* **51**, 2355–62 (2002).
 65. Burggren, W. Epigenetic Inheritance and Its Role in Evolutionary Biology: Re-Evaluation and New Perspectives. *Biology (Basel)*. **5**, (2016).
 66. Jablonka, E. & Lamb, M. J. Epigenetic inheritance in evolution. *J. Evol. Biol.* **11**, 159–183 (1998).
 67. Mohandas, T., Sparkes, R. & Shapiro, L. Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science (80-)*. **211**,

- 393–6 (1981).
68. Allis, C., Jenuwein, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 487-500 (2016) .
 69. Adams, R. & Burdon, R. *Molecular Biology of DNA Methylation*. (Springer-Verlag, 1985).
 70. Lister, R. *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* **462**, 315–22 (2009).
 71. Jones, P. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 484–92 (2012).
 72. Zemach, A., McDaniel, I. E., Silva, P. & Zilberman, D. Genome-Wide Evolutionary Analysis of Eukaryotic DNA Methylation. *Science* **328**, 916–9 (2010).
 73. Feng, S. *et al.* Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8689–94 (2010).
 74. Maunakea, A. K. *et al.* Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* **466**, 253–7 (2010).
 75. Zhu, J.-K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 143–66 (2009).
 76. Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. & Ingram, V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J. Mol. Biol.* **203**, 971–983 (1988).
 77. Cheng, X. & Blumenthal, R. M. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* **16**, 341–50 (2008).
 78. Yoder, J. A. & Bestor, T. H. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 279–84 (1998).
 79. Okano M; Xie S; Lie E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat. Genet.* **19**, 219–220 (1998).
 80. Bestor, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet. Rev.* **9**, 2395–402 (2000).
 81. Li, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 662–73 (2002).
 82. Li, E., Bestor, T. H. & Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**, 915–26 (1992).
 83. Allis, C., Jenuwein, T., Reinberg, D. & Caparros, M. *Epigenetics*. (Cold Spring Harbor

- Laboratory Press, 2007).
84. Goll, M. G. *et al.* Methylation of tRNA Asp by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2. *Science* (80-.). **311**, 395–8 (2006).
 85. Schaefer, M. *et al.* RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev.* **24**, 1590–5 (2010).
 86. Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* **99**, 247–57 (1999).
 87. Cannon, S. V., Cummings, A. & Teebor, G. W. 5-hydroxymethylcytosine DNA glycosylase activity in mammalian tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**, 1173–9 (1988).
 88. Valinluck, V. & Sowers, L. C. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res.* **67**, 946–50 (2007).
 89. Fraga, M. F. *et al.* Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 10604–9 (2005).
 90. Wade, P. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *BioEssays* **23**, 1131–7 (2001).
 91. Ehrlich, M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* **1**, 239–59 (2009).
 92. Ehrlich, M. *et al.* Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. *Oncogene* **21**, 6694–702 (2002).
 93. Shing, D. C. *et al.* Overexpression of sPRDM16 coupled with loss of p53 induces myeloid leukemias in mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 3696–707 (2007).
 94. Chu, D. *et al.* Notch1 and Notch2 have opposite prognostic effects on patients with colorectal cancer. *Ann. Oncol.* **22**, 2440–7 (2011).
 95. Figueroa, J. D. *et al.* Expression of TGF-beta signaling factors in invasive breast cancers: relationships with age at diagnosis and tumor characteristics. *Breast Cancer Res. Treat.* **121**, 727–35 (2010).
 96. Qu, G.-Z., Grundy, P. E., Narayan, A. & Ehrlich, M. Frequent Hypomethylation in Wilms Tumors of Pericentromeric DNA in Chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* **98**, 143–534 (1999).
 97. Eden, A. Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation. *Science* (80-.). **300**, 455–455 (2003).
 98. Yamada, Y. *et al.* Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver

- carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13580–5 (2005).
99. Cadieux, B., Ching, T.-T., VandenBerg, S. R. & Costello, J. F. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Res.* **66**, 8469–76 (2006).
 100. Trejbalová, K. *et al.* Epigenetic regulation of transcription and splicing of syncytins, fusogenic glycoproteins of retroviral origin. *Nucleic Acids Res.* **39**, 8728–39 (2011).
 101. Goering, W., Ribarska, T. & Schulz, W. A. Selective changes of retroelement expression in human prostate cancer. *Carcinogenesis* **32**, 1484–92 (2011).
 102. Ehrlich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21**, 5400–13 (2002).
 103. Yang, A. S. *et al.* A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res.* **32**, e38 (2004).
 104. Weisenberger, D. J. *et al.* Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res.* **33**, 6823–36 (2005).
 105. Rie, N. A DNA repeat, NBL2, is hypermethylated in some cancers but hypomethylated in others. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 440–8 (2005).
 106. Román, A. C. *et al.* Dioxin receptor and SLUG transcription factors regulate the insulator activity of B1 SINE retrotransposons via an RNA polymerase switch. *Genome Res.* **21**, 422–32 (2011).
 107. Wang, J., Lunyak, V. V. & Jordan, I. K. Genome-wide prediction and analysis of human chromatin boundary elements. *Nucleic Acids Res.* **40**, 511–29 (2012).
 108. Pfeifer, G. P. & Rauch, T. A. DNA methylation patterns in lung carcinomas. *Semin. Cancer Biol.* **19**, 181–7 (2009).
 109. Park, S.-Y., Yoo, E. J., Cho, N.-Y., Kim, N. & Kang, G. H. Comparison of CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in premalignant stages of gastric cancer, stratified for *Helicobacter pylori* infection. *J. Pathol.* **219**, 410–16 (2009).
 110. Palmisano, W. A. *et al.* Predicting Lung Cancer by Detecting Aberrant Promoter Methylation in Sputum. *CANCER Res.* **60**, 5954–5958 (2000).
 111. Omura, N. & Goggins, M. Epigenetics and epigenetic alterations in pancreatic cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2**, 310–26 (2009).
 112. Nilsson, E. *et al.* Altered DNA Methylation and Differential Expression of Genes Influencing Metabolism and Inflammation in Adipose Tissue From Subjects With Type

- 2 Diabetes. *Diabetes* 2962–76 (2014). doi:10.2337/db13-1459
113. Rönn, T. & Ling, C. DNA methylation as a diagnostic and therapeutic target in the battle against Type 2 diabetes. *Epigenomics* **7**, 451–60 (2015).
 114. Dayeh, T. *et al.* Genome-Wide DNA Methylation Analysis of Human Pancreatic Islets from Type 2 Diabetic and Non-Diabetic Donors Identifies Candidate Genes That Influence Insulin Secretion. *PLoS Genet* **10**, e1004160 (2014).
 115. Jones, S. *et al.* Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* **321**, 1801–6 (2008).
 116. Martín-Núñez, G. M. *et al.* Type 2 diabetes mellitus in relation to global LINE-1 DNA methylation in peripheral blood: a cohort study. *Epigenetics* **9**, 1322–8 (2014).
 117. Multhaup, M. L. *et al.* Mouse-human experimental epigenetic analysis unmask dietary targets and genetic liability for diabetic phenotypes. *Cell Metab.* **21**, 138–49 (2015).
 118. Soriano-Tárraga, C. *et al.* Epigenome-wide association study identifies TXNIP gene associated with type 2 diabetes mellitus and sustained hyperglycemia. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 609–19 (2016).
 119. Ling, C. & Groop, L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes* **58**, 2718–25 (2009).
 120. Zhao, Y. *et al.* Reversal of type 1 diabetes via islet β cell regeneration following immune modulation by cord blood-derived multipotent stem cells. *BMC Med.* **10**, 3 (2012).
 121. Reddy, M. A. & Natarajan, R. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications. *Cardiovasc. Res.* **90**, 421–9 (2011).
 122. Olivieri, F., Rippo, M. R., Procopio, A. D. & Fazioli, F. Circulating inflamma-miRNAs in aging and age-related diseases. *Front. Genet.* **4**, 121 (2013).
 123. Poy, M. N. *et al.* A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion
MicroRNAs (miRNAs) constitute a growing class of non-coding RNAs that are thought to regulate gene expression by translational repression. *Lett. to Nat.* **432**, 226–30 (2004).
 124. Muhonen, P. & Holthofer, H. Epigenetic and microRNA-mediated regulation in diabetes. *Nephrol. Dial. Transplant* **24**, 1088–96 (2009).
 125. Prattichizzo, F. *et al.* Epigenetic mechanisms of endothelial dysfunction in type 2 diabetes. *Clin. Epigenetics* **7**, 56 (2015).
 126. Miao, F., Gonzalo, I. G., Lanting, L. & Natarajan, R. In Vivo Chromatin Remodeling Events Leading to Inflammatory Gene Transcription under Diabetic Conditions*. *J.*

- Biol. Chem.* **279**, 18091–7 (2004).
127. Richa, R. & Sinha, R. P. HYDROXYMETHYLATION OF DNA: AN EPIGENETIC MARKER. *EXCLI J.* **13**, 592–610 (2014).
 128. Estève, P.-O. *et al.* Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 5076–81 (2009).
 129. Wang, J. *et al.* The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat. Genet.* **41**, 125–129 (2009).
 130. Wade, P. A. *et al.* Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat. Genet.* **23**, 62–6 (1999).
 131. Ren, B. & Dixon, J. R. A CRISPR Connection between Chromatin Topology and Genetic Disorders. *Cell* **161**, 955–957 (2015).
 132. Lukens, L. N., Zhan, S., Chapple, C. & Campbell, M. M. The plant genome's methylation status and response to stress: implications for plant improvement This review comes from a themed issue on Physiology and metabolism Edited. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**, 317–322 (2007).
 133. Raisner, R. M. *et al.* Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell* **123**, 233–48 (2005).
 134. Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T. & Henikoff, S. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* **456**, 125–9 (2008).
 135. Zemach, A., McDaniel, I., Silva, P. & Zilberman, D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Scienceexpress* **328**, 916–9 (2010).
 136. Chodavarapu, R. K. *et al.* Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature* **466**, 388–392 (2010).
 137. Fan, Y. *et al.* Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* **123**, 1199–1212 (2005).
 138. Widom, J. Role of DNA sequence in nucleosome stability and dynamics. *Q. Rev. Biophys.* **34**, 269–324 (2001).
 139. Segal, E. & Widom, J. What controls nucleosome positions? *Trends Genet.* **25**, 335–43 (2009).
 140. Jin, B., Li, Y. & Robertson, K. D. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer* **2**, 607–17 (2011).
 141. Merry, C. R. *et al.* DNMT1-associated long non-coding RNAs regulate global gene expression and DNA methylation in colon cancer. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 6240–53

- (2015).
142. Carthew, R. W., Sontheimer, E. J., Malone, D. & Hannon, G. J. Leading Edge Review Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642–655 (2009).
 143. Yamanaka, S., Siomi, M. C. & Siomi, H. piRNA clusters and open chromatin structure. *Mob. DNA* **5**, 1–12 (2014).
 144. Mercer, T. R. & Mattick, J. S. Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat. Publ. Gr.* **20**, 300–7 (2013).
 145. Chow, J. C., Yen, Z., Ziesche, S. M. & Brown, C. J. SILENCING OF THE MAMMALIAN X CHROMOSOME. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **6**, 69–92 (2005).
 146. Ohtsubo, K. & Marth, J. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* 855–67 (2006). doi:10.1016/j.cell.2006.08.019
 147. Hart, G. W., Housley, M. P. & Slawson, C. Cycling of O-linked β -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* **446**, 1017–22 (2007).
 148. Wells, L., Vosseler, K. & Hart, G. Glycosylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Signal Transduction and O-GlcNAc. *Science (80-.)*. **291**, 2376–2378 (2001).
 149. Moremen, K. W., Tiemeyer, M. & Nairn, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 448–62 (2012).
 150. Arnold, J. N., Saldova, R., Abd Hamid, U. M. & Rudd, P. M. Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. *Proteomics* **8**, 3284–3293 (2008).
 151. Amado, M. *et al.* Dimeric Sialyl-Le x Expression in Gastric Carcinoma Correlates With Venous Invasion and Poor Outcome. *Gastroenterology* **114**, 462–70 (1998).
 152. Baldus, S. E. *et al.* Histopathological Subtypes and Prognosis of Gastric Cancer Are Correlated with the Expression of Mucin-Associated Sialylated Antigens: Sialosyl-Lewis a , Sialosyl-Lewis x and Sialosyl-Tn. *Tumor Biol* **19**, 445–453 (1998).
 153. Apweiler, R., Hermjakob, H. & Sharon, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**, 4–8 (1999).
 154. Varki, A. *et al.* *Essentials of Glycobiology*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
 155. Johansson, M. E. V, Larsson, J. M. H. & Hansson, G. C. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4659–65 (2011).

156. Kaneko, Y., Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science (80-.)*. **313**, 670–673 (2006).
157. Wassarman, P. Sperm receptors and fertilization in mammals. *Mt Sinai J Med* **69**, 148–55 (2002).
158. Johnson, J. L., Jones, M. B., Ryan, S. O. & Cobb, B. A. The regulatory power of glycans and their binding partners in immunity. *Trends Immunol.* **34**, 290–8 (2013).
159. Kleene, R. & Schachner, M. Glycans and neural cell interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 195–208 (2004).
160. Sauerzapfe, B. *et al.* Chemo-enzymatic synthesis of poly-N-acetylglucosamine (poly-LacNAc) structures and their characterization for CGL2-galectin-mediated binding of ECM glycoproteins to biomaterial surfaces. *Glycoconj. J.* **26**, 141–59 (2009).
161. Grigorian, A., Torossian, S. & Demetriou, M. T-cell growth, cell surface organization, and the galectin-glycoprotein lattice. *Immunol. Rev.* **230**, 232–46 (2009).
162. Di Lella, S. *et al.* When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry* **50**, 7842–57 (2011).
163. Bause, E. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. *Biochem. J* **209**, 331–336 (1983).
164. Shakin-Eshleman, S. H., Spitalnik, S. L. & Kasturi, L. The Amino Acid at the X Position of an Asn-X-Ser Sequon Is an Important Determinant of N-Linked Core-glycosylation Efficiency*. *J. Biol. Chem.* **271**, 6363–66 (1996).
165. Mellquist, J. L., Kasturi, L., Spitalnik, S. L. & Shakin-Eshleman, S. H. The amino acid following an Asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry* **37**, 6833–6837 (1998).
166. Cummings, R. D. & Biosystems, M. Systems biology meets synthetic biology: a case study of the metabolic effects of synthetic rewiring The repertoire of glycan determinants in the human glycome www.rsc.org/journals. *Mol. Biosyst.* **5**, 1087–1104 (2009).
167. Haynes, P. Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiology* **8**, 1–5 (1998).
168. Hakomori, S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10231–3 (2002).
169. Yu, H. & Chen, X. One-pot multienzyme (OPME) systems for chemoenzymatic synthesis of carbohydrates. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 2809–2818 (2016).
170. Gill, D. J., Chia, J., Senewiratne, J. & Bard, F. Regulation of O-glycosylation through

- Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. *J. Cell Biol.* **189**, 843–58 (2010).
171. Kellokumpu, S., Sormunen, R. & Kellokumpu, I. Abnormal glycosylation and altered Golgi structure in colorectal cancer: dependence on intra-Golgi pH. *FEBS Lett.* **516**, 217–24 (2002).
172. Pinho, S. S. *et al.* Loss and Recovery of Mgat3 and GnT-III Mediated E-cadherin N-glycosylation Is a Mechanism Involved in Epithelial-Mesenchymal-Epithelial Transitions. *PLoS One* **7**, e33191 (2012).
173. Kannagi, R., Yin, J., Miyazaki, K. & Izawa, M. Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants—Hakomori's concepts revisited. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 525–31 (2007).
174. Buckhaults, P., Chen, L., Fregien, N. & Pierce, M. Transcriptional Regulation of N-Acetylglucosaminyltransferase V by the src Oncogene*. *J. Biol. Chem.* **272**, 19575–81 (1997).
175. Hatano, K., Miyamoto, Y., Nonomura, N. & Kaneda, Y. Expression of gangliosides, GD1a, and sialyl paragalactoside is regulated by NF- κ B-dependent transcriptional control of α 2,3-sialyltransferase I, II, and VI in human castration-resistant prostate cancer cells. *Int. J. Cancer* **129**, 1838–47 (2011).
176. Pé Rez-Garay, M. *et al.* α 2,3-Sialyltransferase ST3Gal III Modulates Pancreatic Cancer Cell Motility and Adhesion In Vitro and Enhances Its Metastatic Potential In Vivo. *PLoS One* **5**, e12524 (2010).
177. Kumamoto, K. *et al.* Increased Expression of UDP-Galactose Transporter Messenger RNA in Human Colon Cancer Tissues and Its Implication in Synthesis of Thomsen-Friedenreich Antigen and Sialyl Lewis A/X Determinants. *CANCER Res.* **61**, 4620–27 (2001).
178. Christiansen, M. N. *et al.* Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics* **14**, 525–46 (2014).
179. Tanaka, F. *et al.* Prognostic Significance of Polysialic Acid Expression in Resected Non-Small Cell Lung Cancer 1. *CANCER Res.* **61**, 1666–70 (2001).
180. Falconer, A., J. Errington, R., D. Shnyder, S., J. Smith, P. & H. Patterson, L. Polysialyltransferase: A New Target in Metastatic Cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* **12**, 925–39 (2012).
181. Nakamori, S. *et al.* Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and

- immunohistochemical study. *Cancer Res.* **53**, 3632–7 (1993).
182. Croci, D. O. *et al.* Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell* **156**, 744–58 (2014).
 183. Chaturvedi, P. *et al.* MUC4 mucin interacts with and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* **68**, 2065–70 (2008).
 184. Pan, S. *et al.* Quantitative Glycoproteomics Analysis Reveals Changes in N-Glycosylation Level Associated with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Proteome Res.* **13**, 1293–1306 (2014).
 185. Melo, S. A. *et al.* Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* **523**, 177–82 (2015).
 186. Bassaganas, S., Perez-Garay, M. & Peracaula, R. Cell surface sialic acid modulates extracellular matrix adhesion and migration in pancreatic adenocarcinoma cells. *Pancreas* **43**, 109–117 (2014).
 187. Testa, R., Vanhooren, V., Bonfigli, A. R. & Boemi, M. N-Glycomic Changes in Serum Proteins in Type 2 Diabetes Mellitus Correlate with Complications and with Metabolic Syndrome Parameters. *PLoS One* **10**, e0119983 (2015).
 188. Dias, W. B. & Hart, G. W. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol. Biosyst.* **3**, 766–72 (2007).
 189. Higai, K., Azuma, Y., Aoki, Y. & Matsumoto, K. Altered glycosylation of a 1 -acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta* **329**, 117–25 (2003).
 190. McMillan, D. Elevation of glycoprotein fucose in diabetes mellitus. *Diabetes* **21**, 863–71 (1972).
 191. Yarema, K. J. & Bertozzi, C. R. Characterizing glycosylation pathways. *Genome Biol.* **2**, 0004.1-0004.10 (2001).
 192. Lee, L. P. K., Prasad, A., Bolton, K. J., McKendry, J. B. R. & Hynie, I. Serum UDP-galactose: glycoprotein galactosyltransferase in diabetics with microangiopathy. *Clin. Biochem.* **10**, 111–17 (1977).
 193. Spiro, M. Effect of diabetes on the sugar nucleotides in several tissues of the rat. *Diabetologia* **26**, 70–5 (1984).
 194. Lunde, I. G. *et al.* Cardiac O-GlcNAc signaling is increased in hypertrophy and heart failure. *Physiological Genomics* **40**, 162–72 (2012).
 195. Marshall, S., Bacote, V. & Traxinger, R. R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system: Role of

- hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **266**, 4706–12 (1991).
196. Trinchera, M. *et al.* The biosynthesis of the selectin-ligand sialyl Lewis x in colorectal cancer tissues is regulated by fucosyltransferase VI and can be inhibited by an RNA interference-based approach. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 130–9 (2010).
 197. Ohtsubo, K. *et al.* Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell* **123**, 1307–21 (2005).
 198. Matsuzaki, S. *et al.* DNA microarray analysis of gene expression profiles in deep endometriosis using laser capture microdissection. *Mol. Hum. Reprod.* **10**, 719–28 (2004).
 199. Gjerdrum, L., Lielpetere, I., Rasmussen, L., Bendix, K. & Hamilton-Dutoit, S. Laser-assisted microdissection of membrane-mounted paraffin sections for polymerase chain reaction analysis: identification of cell populations using immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Mol. Diagn.* **3**, 105–10 (2001).
 200. Becker, I. *et al.* Single-cell mutation analysis of tumors from stained histologic slides. *Lab. Investig.* **75**, 801–7 (1996).
 201. Curran, S., McKay, J. A., McLeod, H. L. & Murray, G. I. Laser capture microscopy. *Mol. Pathol.* **53**, 64–8 (2000).
 202. Luzzi, V., Holtschlag, V. & Watson, M. A. Expression profiling of ductal carcinoma in situ by laser capture microdissection and high-density oligonucleotide arrays. *Am. J. Pathol.* **158**, 2005–10 (2001).
 203. Bonner, R. F. *et al.* Laser Capture Microdissection: Molecular Analysis of Tissue. *Science (80-.)*. **278**, 1481–1483 (1997).
 204. Fend, F. & Raveld, M. Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol* **53**, 666–72 (2000).
 205. Chung, S. & Shen, W. Laser capture microdissection: from its principle to applications in research on neurodegeneration. *Neural Regen. Res.* **10**, 897–8 (2015).
 206. Ahn, Y. *et al.* Changes in gene expression in beta cells after islet isolation and transplantation using laser-capture microdissection. *Diabetologia* **50**, 334–42 (2007).
 207. Marselli, L. *et al.* Gene Expression of Purified Beta Cell Tissue Obtained from Human Pancreas with Laser Capture Microdissection. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 1046–53 (2008).
 208. Mohelnikova-Duchonova, B., Oliverius, M., Honsova, E. & Soucek, P. Evaluation of reference genes and normalization strategy for quantitative real-time PCR in human

- pancreatic carcinoma. *Dis. Markers* **32**, 203–10 (2012).
209. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-delta delta} Ct Method. *METHODS* **25**, 402–8 (2001).
210. Klarić, T. & Gudelj, I. HILIC-UPLC Analysis of Brain Tissue N-Glycans. in *High Throughput Glycomics and Glycoproteomics* 207–216 (2017). doi:10.1007/978-1-4939-6493-2_16
211. Wang, F., Herrington, M., Larsson, J. & Permert, J. The relationship between diabetes and pancreatic cancer. *Mol. Cancer* **2**, 1–5 (2003).
212. Oshiro, M. M. *et al.* Mutant p53 and aberrant cytosine methylation cooperate to silence gene expression. *Oncogene* **22**, 3624–34 (2003).
213. Kratzke, R. A. *et al.* Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer Res.* **56**, 3415–20 (1996).
214. Janky, R. *et al.* Prognostic relevance of molecular subtypes and master regulators in pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Cancer* **16**, 632–47 (2016).
215. Hjalgrim ", H. *et al.* Cancer and diabetes -a follow-up study .of two population- based cohorts of diabetic patients. *J. Internal Med.* **241**, 471–475 (1997).
216. Nakamori, S. *et al.* Increased blood proinsulin and decreased C-peptide levels in patients with pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology.* **46**, 16–24 (1999).
217. Estrada, K. *et al.* Association of a low-frequency variant in HNF1A with type 2 diabetes in a Latino population. *JAMA* **311**, 2305–14 (2014).
218. Ng, S. F. *et al.* Chronic high-fat diet in fathers programs β 2-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* **467**, 963–966 (2010).
219. Ohtsubo, K. *et al.* N-glycosylation modulates the membrane sub-domain distribution and activity of glucose transporter 2 in pancreatic beta cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**, 346–51 (2013).
220. Hinneburg, H. *et al.* Unlocking Cancer Glycomes from Histopathological Formalin-fixed and Paraffin- embedded (FFPE) Tissue Microdissections* □ S. *Mol. Cell. Proteomics* **16**, 524–36 (2017).
221. Montavon, T. *et al.* A Regulatory Archipelago Controls Hox Genes Transcription in Digits. *Cell* **147**, 1132–1145 (2011).

8. ŽIVOTOPIS

Ivona Bečeheli, mag. biol. mol., rođena je 7. listopada 1986. godine u Zagrebu gdje je završila opću gimnaziju i diplomski studij molekularne biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2011. sa završnim radom na temu: „Utjecaj abiotičkog stresa na ukupnu genomsku i specifičnu metilaciju rDNA vrste *Quercus robur* L. i *Lilium bosniacum* (Beck) Fritsch“ pod vodstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš.

Od veljače do rujna 2011. volontirala je na Institutu „Ruđer Bošković“ u Laboratoriju za evolucijsku genetiku pod vodstvom prof. dr. sc. Đurđice Ugarković u sklopu projekta na temu uloge mikrosatelitnih ponavljanja u evoluciji vrste *Tribolium Castaneum* (Herbst).

Od rujna 2011. zaposlena je kao znanstvenik istraživač u Laboratoriju za glikobiologiju tvrtke Genos d.o.o.

Doktorski studij biologije upisala je 2012. pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš.

ZNANSTVENO USAVRŠAVANJE

1. Epigenesys Workshop: „Epigenetics and the environment“, 2012., München, Njemačka, sudjelovanje bez usmenog priopćenja ili poster prezentacije
2. FEBS Workshop: „Translating Epigenomes into Function“, 2013., Capri, Italija, sudjelovanje s poster prezentacijom
3. EMBO Workshop: “Cancer stem cells 20 years later: Achievements, controversies, emerging concepts and technologies”, 2014., Catanzaro, Italija, sudjelovanje s poster prezentacijom
4. EMBO Workshop: “Epigenetic plasticity: implications in neural (dys)function”, 2014., Braga, Portugal, sudjelovanje bez usmenog priopćenja ili poster prezentacije
5. GLYCO23, 23rd International Symposium on Glycoconjugates, 2015., Split, Hrvatska,

sudjelovanje s poster prezentacijom

6. Epigenesys Workshop: „The Non-Coding Genome“, 2015., Rim, Italija, sudjelovanje bez usmenog priopćenja ili poster prezentacije

7. “Simpozij studenata doktorskih studija PMF”, 2016., Zagreb, Hrvatska, sudjelovanje s poster prezentacijom

8. SEM-EDS Radionica, 2016., Zagreb, Hrvatska, sudjelovanje bez usmenog priopćenja ili poster prezentacije

9. “ Dynamics of Genome Structure-ERC Synergy Project 4DGenome Workshop“, 2016., Barcelona, Španjolska, sudjelovanje s poster prezentacijom

10. “12th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium TRANSLATIONAL GLYCOBIOLOGY from Bench to Bedside“, 2017., Dubrovnik, Hrvatska, sudjelovanje s poster prezentacijom

11. “Simpozij studenata doktorskih studija PMF”, 2018., Zagreb, Hrvatska, sudjelovanje s poster prezentacijom

ZNANSTVENI RADOVI U ČASOPISIMA

1. Krištić J, Vučković F, Menni Cristina, Klarić L, Keser T, **Beccheli I**, Pučić-Baković M, Novokmet M, Mangino M, Thaqi K, Rudan P, Novokmet N, Šarac J, Missoni S, Kolčić I, Polašek O, Rudan I, Campbell H, Hayward C, Aulchenko Y, Valdes A, Wilson JF, Gornik O, Primorac D, Zoldoš V, Spector T, Lauc G. Glycans are a novel biomarker of chronological and biological age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 69 (7):779-789 (2014)

2. Zoldoš V, Novokmet M, **Beccheli I**, Lauc G. Genomics and epigenomics of the human glycome. *Glycoconj J* 1:41-50 (2013).

3. Markulin D, Vojta A, Samaržija I, Gamulin M, **Bečeheli I**, Jukić I, Maglov Č, Zoldoš V, Fučić A. Association Between RASSF1A Promoter Methylation and Testicular Germ Cell Tumor: A Meta-analysis and a Cohort Study. *Cancer Genomics Proteomics* 14: 363-372 (2017).

SAŽECI U ZBORNICIMA SKUPOVA

1. Biruš I, **Bečeheli I**, Šatović Z, Vičić V, Muratović E, Pustahija F, Šiljak-Yakovlev S, Zoldoš V. Epigenetic variation in the absence of genetic variation contribute to adaptation to specific ecogeographical conditions in endemic *Lilium bosniacum*. 3rd Congress of Croatian geneticists with international participation : Book of abstracts / Franekić, Jasna ; Garaj-Vrhovac, Verica, editor(s). Zelina, 66-66 (2012)

2. Zoldoš V, Biruš I, Redžić I, Muratović E, Šatović Z, **Bečeheli I**, Robin O, Pustahija F, Bogunić F, Vičić V, Lauc G, Šiljak-Yakovlev S. Putative progenitor and derivative populations of endemic *Lilium bosniacum*: Adaptation to serpentine soil as a key isolating factor. 3rd Congress of Croatian geneticists with international participation : Book of abstracts / Franekić, Jasna ; Garaj-Vrhovac, Verica, editor(s). Zelina,. 120-120 (2012).

NAGRADE

2010. Nagrada PMF-a za izvrsnost