

# Ciljana modulacija CpG metilacije gena HNF1A upotrebom molekularnog alata CRISPR/dCas9- TET1 i utjecaj na njegovu transkripciju

---

Barberić, Tomislav

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:218306>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Tomislav Barberić

Ciljana modulacija CpG metilacije gena *HNF1A* upotrebom  
molekularnog alata CRISPR/dCas9-TET1 i utjecaj na njegovu  
transkripciju

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Ivone Bečeheli. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Vlatki Zoldoš što mi je ukazala povjerenje da budem dio istraživačke grupe Laboratorija za epigenetiku. Neizmjerne hvala za pruženu podršku, strpljenje i korisne savjete tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Veliko hvala dr. sc. Ivoni Bečeheli uz čije sam vodstvo stekao praktična znanja potrebna za samostalan rad u laboratoriju. Neizmjerne hvala za svo strpljenje u radu sa mnom, nezamjenjive savjete i ogroman doprinos u izradi ovog rada.

Hvala dr. sc. Mariji Klasić, mag. biol. mol. Goranu Josipoviću te mag. biol. mol. Samiri Smajlović koji su uvijek bili spremni pomoći, dati savjete i odgovoriti na moja pitanja.

Hvala svim mojim profesorima tijekom mog cijelog školovanja, a posebno hvala osnovnoškolskoj profesorici biologije Nataliji Ivanković. Od srca hvala što ste me svojim trudom motivirali i usmjerili putem biologije.

Od srca se zahvaljujem svim svojim prijateljima koji su bili sa mnom u svim dobrim i lošim trenucima moga života.

Posebno hvala mojim roditeljima Ljiljani i Stjepanu. Hvala vam na bezuvjetnoj ljubavi, što ste uvijek bili uz mene, kako u dobrim, tako i u lošim trenucima mog života, te što ste mi svojom žrtvom omogućili da danas budem ono što jesam.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ciljana modulacija CpG metilacije gena *HNF1A* upotrebom molekularnog alata  
CRISPR/dCas9-TET1 i utjecaj na njegovu transkripciju

Tomislav Barberić  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*HNF1 $\alpha$*  je transkripcijski faktor koji sudjeluje u regulaciji ekspresije mreže gena uključenih u niz molekularnih i metaboličkih procesa u jetri, gušterači, crijevima i bubrezima. U  $\beta$  stanicama gušterače, mutacije u genu *HNF1A* vode do poremećaja otpuštanja inzulina uslijed stimulacije glukozom, a fenotip u ljudi je dijabetes tip MODY3. Pretpostavlja se da bi epigenetičko utišavanje gena *HNF1A* metilacijom moglo imati isti efekt na ekspresiju gena te fenotip kao i genska mutacija. Ovo istraživanje imalo je za cilj transfecirati staničnu liniju 1.1B4, model za istraživanje  $\beta$  stanica gušterače, fuzijskim proteinom TET1-dCas9 te istražiti dolazi li do promjene metilacije na 4 CpG mjesta koja su prijašnjim korelacijskim analizama otkrivena kao kandidat regulatorna mjesta za transkripcijsku aktivnost gena *HNF1A*. U tu svrhu naveo sam fuzijski protein TET1-dCas9 pomoću jedne molekule sgRNA na 4 kandidat CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A*. Nakon uspješne transfekcije analizirao sam metilaciju citozina pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije molekule DNA te sam potvrdio smanjenje stupnja metilacije na sva 4 CpG mjesta u periodu od 30 dana nakon transfekcije stanica 1.1B4. Također sam analizirao razinu transkripcije pomoću metode RT-qPCR upotrebom proba *TaqMan* te utvrdio povećanu razinu transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* u uspješno transfeciranim stanicama. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da epigenetička manipulacija 4 kandidat CpG mjesta dovodi do povećanja transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* što ukazuje na regulatornu ulogu ova 4 CpG mjesta u stanicama 1.1B4.

(59 stranica, 17 slika, 1 tablica, 147 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: gen *HNF1A*, CRISPR-dCas9, TET1, demetilacija DNA, stanice 1.1B4

Voditelj: Dr. sc. Vlatka Zoldoš, red. prof.

Neposredni voditelj: Dr. sc. Ivona Bečeheli

Ocjenitelji: Dr. sc. Vlatka Zoldoš, red. prof.

Dr. sc. Domagoj Đikić, red. prof.

Dr. sc. Ana Previšić, izv. prof.

Dr. sc. Mirta Tkalec, izv. prof. (zamjena)

Rad prihvaćen: 19. veljače 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

Targeted modulation of *HNF1A* gene's CpG methylation using CRISPR/dCas9-TET1  
molecular tool and effect on its transcription

Tomislav Barberić  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

HNF1 $\alpha$  is a transcription factor involved in regulating the expression of a network of genes involved in a number of molecular and metabolic processes in the liver, pancreas, intestines and kidneys. Mutations in the *HNF1A* gene lead to impaired glucose stimulated insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells, and the resulting phenotype in humans is MODY3 type diabetes. It is hypothesized that epigenetic silencing of the *HNF1A* gene could have the same effect on gene expression and phenotype as the gene mutation. The aim of this study was to transfect 1.1B4 cells, which serve as a model for pancreatic  $\beta$  cells, with a TET1-dCas9 fusion protein in order to change methylation level on the 4 CpG sites that previous correlation studies identified as candidate regulatory sites for the transcription activity of the *HNF1A* gene. To achieve this, TET1-dCas9 fusion protein was targeted to the 4 candidate CpG sites in the 1st exon of the *HNF1A* gene by using a single sgRNA. Analysis of DNA methylation by pirosequencing after bisulphate DNA conversion confirmed a decrease in the methylation levels at all 4 CpG sites during the 30 day period following transfection. RT-qPCR method using *TaqMan* probes revealed an increase of *HNF1A* transcriptional activity following the epigenetic manipulation with TET1-dCas9. The results of this study showed that epigenetic manipulation of the 4 candidate CpG sites leads to an increase in the *HNF1A* gene transcriptional activity, which confirms a regulatory role of these 4 CpG sites for *HNF1A* expression in 1.1B4 cells.

(59 pages, 17 figures, 1 table, 147 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central Biological Library

Key words: *HNF1A* gene, CRISPR-dCas9, TET1, DNA demethylation, 1.1B4 cells

Supervisor: Dr. Vlatka Zoldoš, Prof.

Assistant supervisor: Dr. Ivona Bečeheli

Reviewers: Dr. Vlatka Zoldoš, Prof.

Dr. Domagoj Đikić, Prof.

Dr. Ana Previšić, Assoc. Prof.

Dr. Mirta Tkalec, Assoc. Prof. (substitution)

Thesis accepted: February 19th, 2020

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Transkripcijski faktor HNF1 $\alpha$ .....	1
1.1.1. Uloga transkripcijskog faktora HNF1 $\alpha$ u fiziološkim i patološkim procesima ...	4
1.1.2. Uloga transkripcijskog faktora HNF1 $\alpha$ u dijabetesu tipa MODY3.....	8
1.2. Epigenetičke modifikacije.....	10
1.2.1. Metilacija molekule DNA .....	10
1.2.2. Demetilacija molekule DNA .....	15
1.2.3. Metode analize stupnja metilacije molekule DNA .....	17
1.3. Sustav CRISPR/Cas9 i njegovi derivati .....	18
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	20
3. MATERIJALI I METODE .....	21
3.1. Stanična linija 1.1B4 i kultura stanica.....	21
3.2. Transfekcija i selekcija transfeciranih stanica 1.1B4.....	22
3.3. Skupljanje stanica 1.1B4 i izolacija DNA i RNA .....	25
3.4. Bisulfitna konverzija ukupne genomske DNA .....	26
3.5. PCR koji prethodi pirosekvenciranju .....	26
3.6. Pirosekvenciranje nakon bisulfitne konverzije .....	28
3.7. Reverzna transkripcija.....	29
3.8. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR) .....	29
4. REZULTATI.....	32
4.1. Transfekcija i selekcija stanica 1.1B4.....	32
4.2. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata.....	32
4.3. Stupanj metilacije 4 CpG mjesta u 1. egzonu gena HNF1A nakon manipulacije fuzijskim proteinom TET1-dCas9.....	33
4.4. Razina transkripcijske aktivnosti gena HNF1A nakon epigenetičke manipulacije fuzijskim proteinom TET1-dCas9.....	36

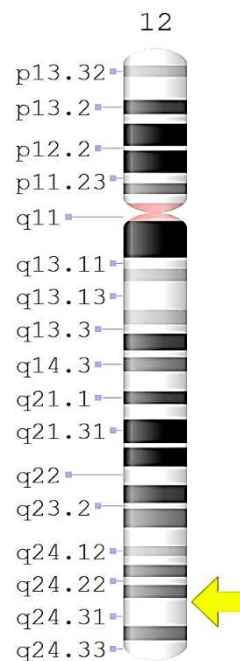
5. RASPRAVA .....	39
6. ZAKLJUČAK .....	43
7. REFERENCE.....	44
8. ŽIVOTOPIS .....	59



# 1. UVOD

## 1.1. Transkripcijski faktor HNF1 $\alpha$

Gen *HNF1A* (NG\_011731.2), službenog imena *HNF1 homeobox A*, u literaturi je također poznat kao proksimalni faktor albumina (engl. *Albumin Proximal Factor*), *IDDM20*, faktor regulator proizvodnje interferona (engl. *Interferon Production Regulator Factor*), *LFBI*, *MODY3* te *TCF1* [1]. Smješten je na plus lancu dugog kraka kromosoma 12 na položaju 24,31 (12q24,31) [2–4], točnije, prema verziji ljudskog genoma GRCh38.p13 [5], zauzima parove baza od položaja 120977683 do 121002512 na kromosomu 12. Karta kromosoma 12 na kojoj je žutom strjelicom označen položaj gena *HNF1A* prikazana je na Slici 1-1.

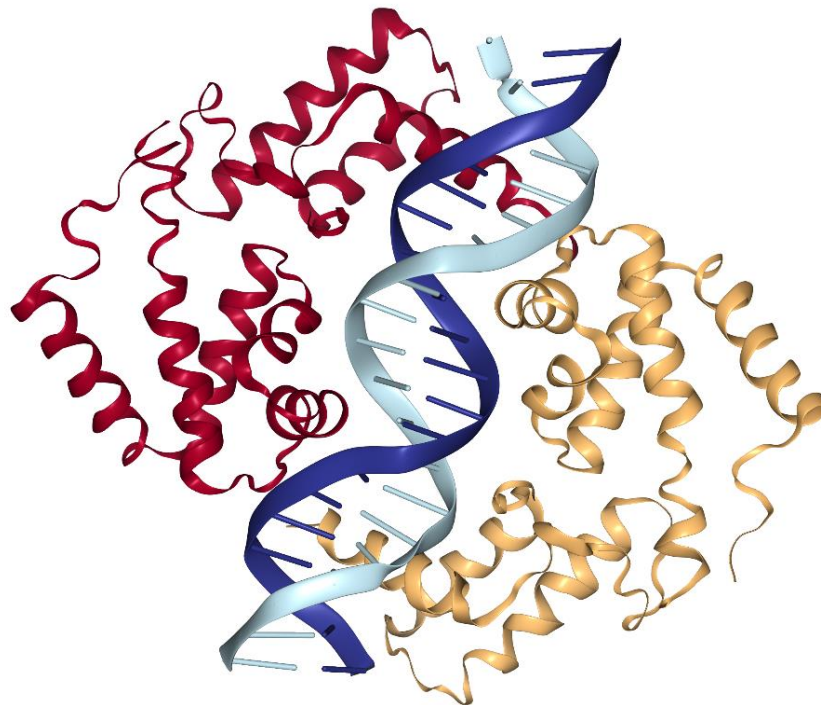


Slika 1-1: Položaj gena *HNF1A* na kromosomu 12 prikazan je žutom strelicom. Slika je napravljena pomoću alata za označavanje genoma (*Genome Decoration Page*) [6] uz postavke „*Homo sapiens*“ u izborniku „*Organism*“ i „*Cytogenetic | GRCh38.p12 | 850*“ u izborniku „*Representation*“.

Sam gen sastoji se od 10 egzona, a prema verziji ljudskog genoma GRCh38.p13 poznato je 7 izoformi nastalih alternativnim prekrajanjem i poliadenilacijom primarnog transkripta [5]. Tri od 7 izoformi, izoforme A, B i C, opisali su Harries i sur. [7]. Izoforma A, veličine 10 egzona, ima oko 5 puta slabiju aktivnost od izoformi B i C, uglavnom se eksprimira u jetri, bubrezima i gušterači fetusa, a slabije u gušterači odrasle osobe i njenim otočićima. Izoforma B, veličine 7 egzona, uglavnom se eksprimira u gušterači odrasle osobe i njenim otočićima, a slabije u jetri

i bubrežima. Izoforma C, veličine 6 egzona, najslabije je eksprimirana izoforma od spomenute tri i niske razine ekspresije izmjerene su uglavnom u gušterači odrasle osobe i njenim otočićima.

Proteinski produkt HNF1 $\alpha$  (od engl. *hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$* ), tkivno je specifični transkripcijski faktor koji se sastoji od tri domene. Na N-terminusu nalazi se dimerizacijska domena (aminokiseline 1-32) koja omogućava nastanak homo- i heterodimera [8–11]. Interakcija s molekulom DNA ostvaruje se preko DNA-vezujuće domene koja veže invertni palindrom 5'-GTTAATNATTAAC-3' [12,13], a koja je građena od dviju subdomena – POU<sub>S</sub> i POU<sub>H</sub> [14,15]. Subdomena POU<sub>S</sub> (aminokiseline 82-172) ključna je za stabilnost proteina, dok je subdomena POU<sub>H</sub> (aminokiseline 198-281) ključna za interakciju proteina i molekule DNA [7,16]. Interakcija molekule DNA i homodimera HNF1 $\alpha$  prikazana je na Slici 1-2.

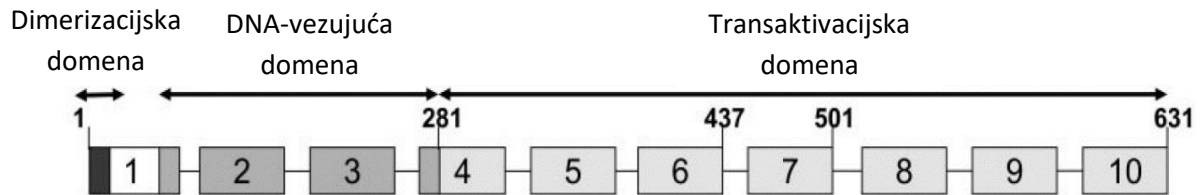


Slika 1-2: Interakcija homodimera HNF1 $\alpha$  s molekulom DNA. Monomeri proteina HNF1 $\alpha$  prikazani su crvenom, odnosno žutom bojom. Molekula DNA je prikazana plavom bojom. Na slici je PDB ID: 1IC8 [13] prikazan pomoću alata za vizualizaciju molekula (*NGL viewer*) [17].

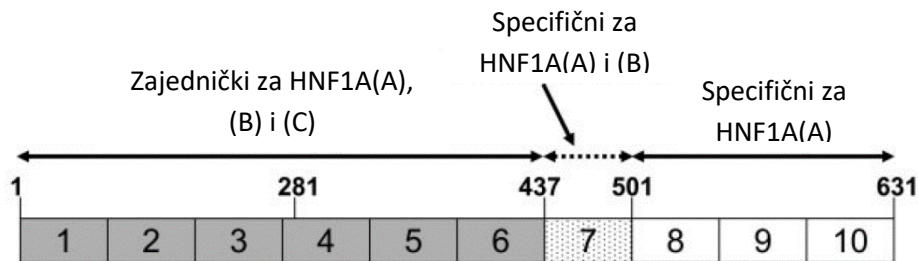
Na C-terminusu nalazi se transaktivacijska domena (aminokiseline 282-631) koja omogućava interakciju HNF1 $\alpha$  i drugih proteina [7,13,18,19]. Neki od interakcijskih partnera proteinu HNF1 $\alpha$  su histonske acetiltransferaze, kao što su CBP, P/CAF i Src-1, te male GTPaze kao što je RAC3 [20]. *In silico* analize predviđaju čak do 56 interakcijskih partnera proteina HNF1 $\alpha$  u gušterači čovjeka [21]. S obzirom da je HNF1 $\alpha$  transkripcijski faktor koji se nalazi u jezgri, on mora posjedovati jezgrin lokalizacijski signal (NLS, od engl. *nuclear localization signal*) koji

će ga lokalizirati u jezgru stanice. Pretpostavlja se da jezgrin lokalizacijski signal predstavljaju aminokiseline 197-205, ali su zbog visoke sličnosti sa konsenzusnom sekvencom jezgrinog lokalizacijskog signala također moguće aminokiseline 158-171 i 271-282 [13,22]. Shematski prikaz strukture gena *HNF1A*, transkripta mRNA i samog proteina HNF1 $\alpha$  prikazan je na Slici 1-3.

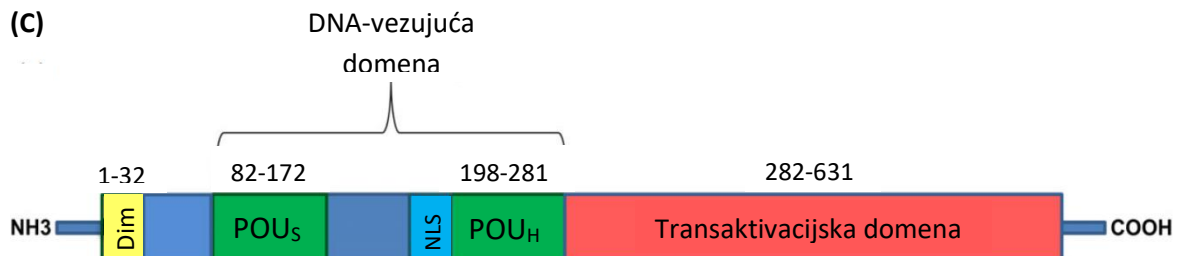
(A)



(B)



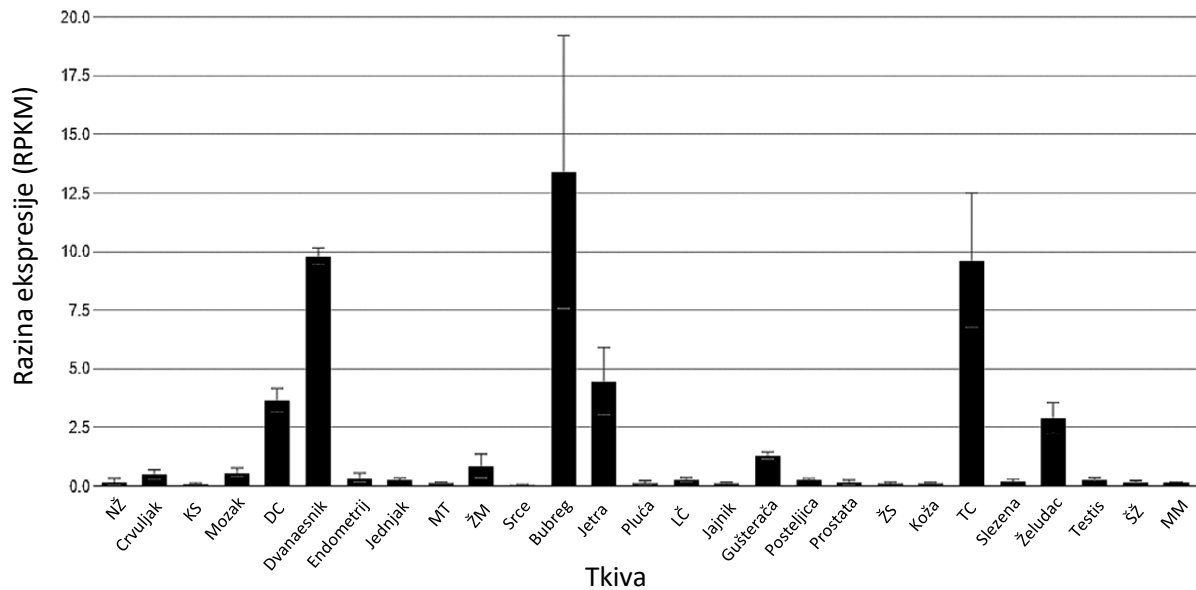
(C)



Slika 1-3: (A) Prikaz strukture gena *HNF1A*. Deset egzona gena *HNF1A* prikazani su kao pravokutnici s odgovarajućim brojem, dok su funkcionalne domene prikazane u tri nijanse sive boje. Tamno sivom bojom prikazana je dimerizacijska domena, sivom bojom prikazana je DNA-vezujuća domena, a svjetlo sivom bojom prikazana je transaktivacijska domena. (B) Prikaz strukture transkripta mRNA tri izoforme *HNF1A*. Egzoni su prikazani kao pravokutnici s odgovarajućim brojem i bojom ovisno u kojoj izoformi su prisutni. Egzoni 1-6, prikazani sivom bojom, prisutni su u sve tri izoforme *HNF1A* (A, B i C), egzoni 1-7, od kojih je egzon 7 prikazan istočkan, prisutni su u izoformama A i B, dok su svih 10 egzona, od kojih su egzoni 8-10 prikazani bijelom bojom, prisutni samo u izoformi C. (C) Prikaz strukture proteina HNF1 $\alpha$ . Žuto je označena dimerizacijska domena (Dim), zeleno su označene domene POU<sub>S</sub> i POU<sub>H</sub>, svjetlo plavo je označen jezgrin lokalizacijski signal (NLS), a crveno je označena transaktivacijska domena. Slike (A) i (B) su preuzete iz i adaptirane prema Bellanné-Chantelot i sur. [23]. Slika (C) preuzeta je iz Balamurugan i sur. [24] i adaptirana prema Valkovicova i sur. [21].

### 1.1.1. Uloga transkripcijskog faktora HNF1 $\alpha$ u fiziološkim i patološkim procesima

Transkripcijski faktor HNF1 $\alpha$  eksprimiran je u većini organa probavnog sustava i bubrezima [25] (Slika 1-4) gdje regulira ekspresiju velikog broja različitih gena povezanih s nizom procesa navedenim u Tablici 1-1. Protein HNF1 $\alpha$  sudjeluje u regulaciji ekspresije gena uglavnom u diferenciranim stanicama, ali ima ulogu i tijekom embriogeneze [26]. Otkriveno je kako se protein HNF1 $\alpha$  veže na najmanje 222 promotora gena u jetri te na najmanje 106 promotora gena u Langerhansovim otočićima [27] čime igra važnu ulogu u regulaciji metabolizma (Tablica 1-1). Protein HNF1 $\alpha$  također sudjeluje u metaboličkim procesima izvan jetre i gušterače kao primjerice u metabolizmu mitohondrija regulirajući transkripciju angiotensin-konvertirajućeg enzima 2 [28] te u metabolizmu lipoproteina HDL-a (od engl. *high density lipoprotein*) regulirajući ekspresiju transportera žučnih soli u crijevima i bubrezima [29]. Osim u metaboličkim procesima, protein HNF1 $\alpha$  sudjeluje i u procesima apsorpcije malih, pozitivno nabijenih, hidrofilnih organskih molekula u jetri tako što regulira transkripciju transportera OCT1 (od engl. *organic cation transporter 1*) [30] i reapsorpciju glukoze u bubrezima regulirajući transkripciju kotransportera SGLT2 (od engl. *sodium-glucose transport protein 2*) [31]. Poremećaj ekspresije/mutacije proteina HNF1 $\alpha$  dovodi do smanjenja ekspresije kotransportera SGLT2 zbog čega dolazi do pojave glikozurije. Zanimljivo, protein HNF1 $\alpha$  je uključen u proces akutne faze upale tako što regulira transkripciju proteina kao što su fibrinogen, C-reaktivni protein i receptor interleukina 1 [32], te je možda povezan s procesom tumorigeneze jer potencijalno djeluje kao tumor supresor [33]. Naime, primijećena je značajno smanjena razina ekspresije u tumorima gušterače [34] i hepatocelularnim adenomima [35,36]. Mutacije u proteinu HNF1 $\alpha$  su također povezane s tumorima bubrega [37], a poremećaj ekspresije antisense RNA 1 gena *HNF1A* (HNF1A-AS1) povezan je s adenokarcinomom jednjaka [38] i pluća [39]. Transkripcijski faktor HNF1 $\alpha$  također je povezan s glikozilacijom proteina. Naime, otkriveno je kako igra važnu ulogu u regulaciji ekspresije niza gena uključenih u proces fukozilacije proteina [40].



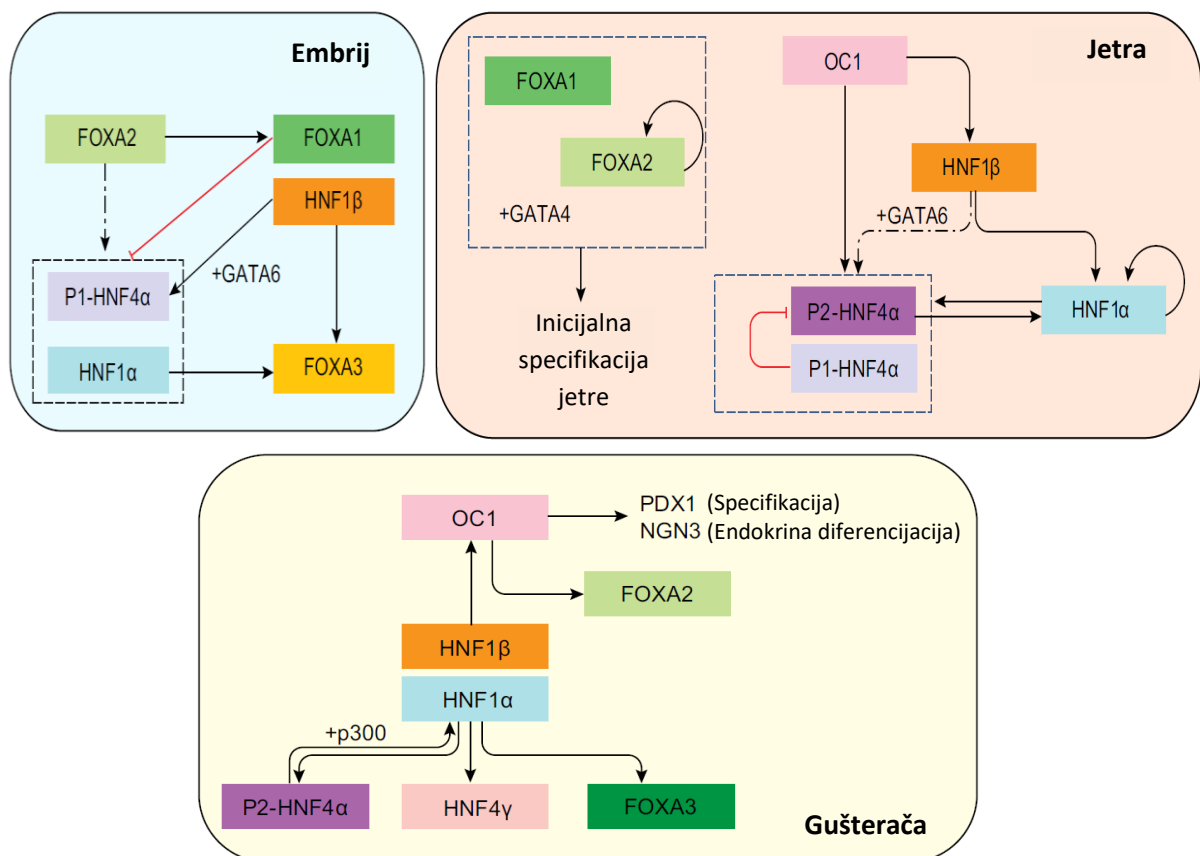
Slika 1-4: Razine ekspresije gena *HNF1A* u različitim tkivima čovjeka. Razina ekspresije prikazana je kao broj čitanja po kilobazi po milijun mapiranih čitanja (RPKM, od engl. *reads per kilo base per million mapped reads*). NŽ – nadbubrežna žlijezda, KS – koštana srž, DC – debelo crijevo, MT – masno tkivo, ŽM – žučni mjehur, LČ – limfni čvor, ŽS – žlijezda slinovnica, TC – tanko crijevo, ŠŽ – štitna žlijezda i MM – mokraćni mjehur. Slika preuzeta iz i adaptirana prema Fagerberg i sur. [25] i Valkovicova i sur. [21].

Tablica 1-1: Procesi u gušterači, crijevima, jetri i bubrezima u kojima protein HNF1 $\alpha$  sudjeluje kao transkripcijski faktor. Tablica preuzeta iz i adaptirana prema Valkovicova i sur. [21].

Tkivo	Uloga
Gušterača	Metabolizam glukoze
	Dijabetes
	Sinteza GLUT1 i GLUT2 transportera
	Sinteza L-protein kinaze
	Sinteza inzulina
	Aktivnost promotora inzulina
	Detekcija glukoze i leucina u $\beta$ stanicama
	Postprandijalno stvaranje ATP-a
	Transport Ca <sup>2+</sup>
Crijevo	Rast i razvoj stanica crijeva
	Sinteza transportera žučnih soli
Jetra	Glukoneogeneza
	Sinteza i pohrana ugljikohidrata
	Sinteza kolesterola
	Sinteza apolipoproteina
	Sinteza CYP450 monooksigenaza
	Sinteza proteina seruma
	Poticanje jetrenih transportera organskih kationa
Bubrezi	Reapsorbiranje glukoze iz primarnog filtrata

Transkripcijski faktor HNF1 $\alpha$  zajedno s transkripcijskim faktorima HNF1 $\beta$ , FOXA1/2/3 (HNF3 $\alpha/\beta/\gamma$ ), HNF4 $\alpha/\gamma$  i OC1 (HNF6) tvori složene razvojno i tkivno specifične transkripcijske mreže koje su opisane u preglednom članku Lau i sur. [26], a prikazane na Slici 1-5. Ekspresija proteina HNF1 $\alpha$  javlja se relativno kasno tijekom razvoja gušterače, gdje se ekspresija zadržava u acinarnim i stanicama otočića, i bubrega te je ograničena na proksimalne i distalne tubule nefrona. Pretpostavlja se da protein HNF1 $\alpha$  sudjeluje u održavanju statusa diferenciranih stanica otočića gušterače. Tijekom rane embriogeneze transkripcijski faktori iz porodice FOXA djeluju uzvodno od HNF-ova pa tako FOXA1 negativno regulira ekspresiju proteina HNF1 $\alpha$  i HNF4 $\alpha$ , a FOXA2 pozitivno. Ekspresija proteina FOXA3 javlja se kasnije tijekom razvoja te je pozitivno regulirana od strane proteina HNF1 $\alpha$  i HNF1 $\beta$ . Smatra se da protein HNF1 $\beta$  regulira ekspresiju proteina FOXA3 u endodermu iz kojeg će se razviti probavni sustav i primordiju jetre prije nego što se protein HNF1 $\alpha$  uključuje u regulaciju razvoja jetre. Protein HNF4 $\alpha$ , za kojeg se smatra da je prvotno pozitivno reguliran od strane proteina HNF1 $\beta$ , također se eksprimira tijekom razvoja jetre prije proteina HNF1 $\alpha$ . U procesu razvoja jetre ekspresija proteina HNF1 $\alpha$  javlja se kasno, nakon što je otpočeo proces diferencije jetre prvotno pod kontrolom proteina FOXA1 i FOXA2, a zatim i HNF1 $\beta$ . Postupno dolazi do zamjene proteina HNF1 $\beta$  sa proteinom HNF1 $\alpha$ , da bi ekspresija proteina HNF1 $\beta$  potpuno iščezla. U odraslih jedinki gotovo da i nema ekspresije proteina HNF1 $\beta$  u jetri, a proteini HNF1 $\alpha$  i HNF4 $\alpha$  zajedno s proteinima FOXA2 i OC1 tvore regulatornu mrežu odgovornu za transkripcijski program hepatocita. Tako, proteini HNF1 $\alpha$ , FOXA2 i OC1 pozitivno reguliraju ekspresiju proteina HNF4 $\alpha$  koji se veže na više od 40 % promotora aktivnih gena u hepatocitima zbog čega se smatra da je protein HNF4 $\alpha$  glavni transkripcijski faktor odgovoran za transkripcijski program hepatocita. U jetri, proteini HNF4 $\alpha$  i HNF1 $\alpha$  pozitivno reguliraju ekspresiju proteina HNF1 $\alpha$ . U gušterači, protein HNF1 $\alpha$  regulira ekspresiju proteina HNF4 $\alpha$  i to s promotora P2, za razliku od jetre i bubrega u kojima je glavni promotor P1. Mutacije u P2 promotoru gena *HNF4 $\alpha$*  povezane su s oblikom dijabetesa MODY1, a fenotip takvih mutacija veoma je sličan onome koji je uzrokovan mutacijama u genu *HNF1 $\alpha$* . Osim toga, protein HNF4 $\alpha$  djeluje kao ključni aktivator ekspresije samog proteina HNF1 $\alpha$ , a zajedno s njim stupa u interakciju i sinergistički regulira ekspresiju ciljnih gena. Ovakva diferencijalna kontrola ekspresije gena u jetri i gušterači temelj je razlika u ponašanju stanica jetre/gušterače ovisno o mutiranom genu. Tako, proteini HNF1 $\alpha$  i HNF4 $\alpha$  u jetri i gušterači čine transkripcijske petlje koje se međusobno razlikuju zbog čega poremećena ekspresija/mutacija proteina HNF1 $\alpha$  ima negativan utjecaj na  $\beta$  stanice, dok nema negativan utjecaj na druga tkiva [41]. Usljed smanjenja ekspresije/mutacija proteina HNF1 $\alpha$  dolazi do abnormalnosti u strukturi Langerhansovih

otočića i rastu  $\beta$  stanica te dolazi do poremećenog odgovora na nutrijente i otpuštanja inzulina stimuliranog glukozom (GSIS, od engl. *glucose stimulated insulin secretion*) što dovodi do dijabetesa tipa MODY3 [21]. Osim što sudjeluju u patogenezi ovog tipa dijabetesa, određene varijante proteina HNF1 $\alpha$  također su povezane s povećanim rizikom razvoja dijabetesa tip 2 [42,43]. U bubrezima protein HNF1 $\alpha$  također igra razvojnu ulogu, ali manju naspram proteina HNF1 $\beta$ . U odraslih, protein HNF1 $\alpha$  uključen je u proces reapsorpcije glukoze. No, treba imati na umu kako je većina otkrića vezanih uz transkripcijske mreže u kojima HNF1 $\alpha$  sudjeluje kao transkripcijski faktor otkriveno na miševima. Naime, miševi koji imaju heterozigotne mutacije prethodno spomenutih transkripcijskih faktora fenotipski se ne razlikuju od divljeg tipa stoga se u istraživanjima koriste homozigotni mutanti. U čovjeka je pak situacija drugačija - osobe koje su heterozigotne mutante za ove ključne gene fenotipski se razlikuju od zdravih ljudi. Stoga je upitno koliko se dobro mogu otkrića na miševima preslikati na čovjeka.



Slika 1-5: Prikaz transkripcijskih mreža koje tvore transkripcijski faktori HNF1 $\alpha/\beta$ , FOXA1/2/3 (HNF3 $\alpha/\beta/\gamma$ ), HNF4 $\alpha/\gamma$  i OC1 (HNF6) tijekom embriogeneze te u jetri i gušterači odrasle jedinke. Slika je preuzeta iz i adaptirana prema Lau i sur. [26].

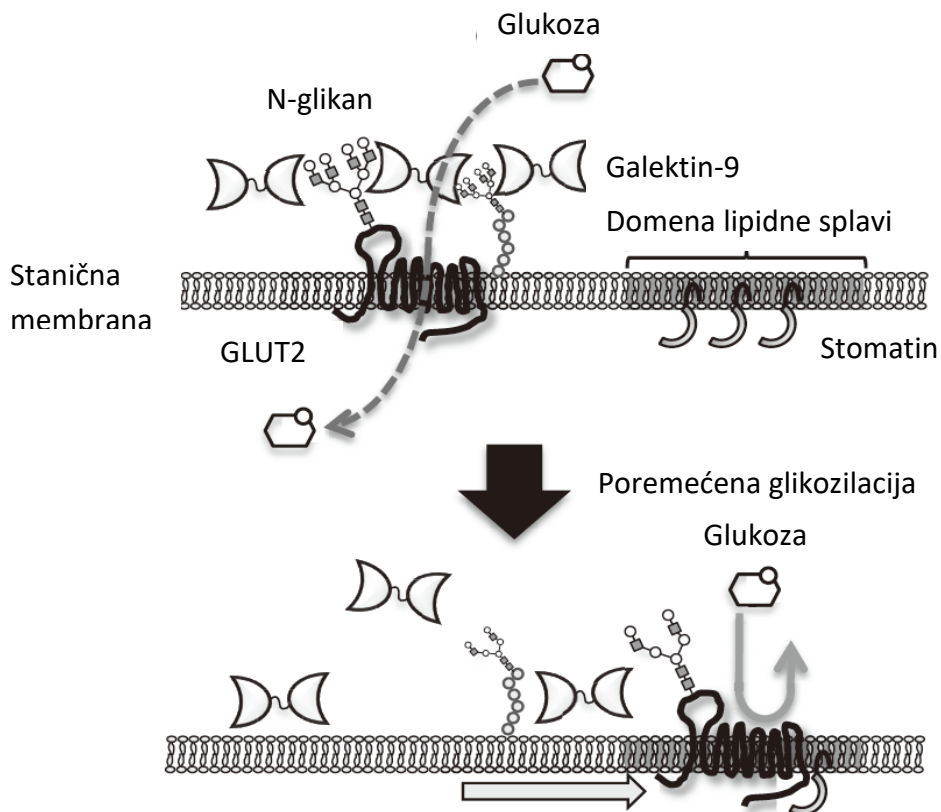
### 1.1.2. Uloga transkripcijskog faktora *HNF1α* u dijabetesu tipa *MODY3*

Uloga  $\beta$  stanica gušterače u regulaciji razine glukoze u krvi ovisi o njihovoj sposobnosti da osjete glukozu (engl. *glucose sensing*). Ljudske  $\beta$  stanice na svojoj površini pretežno eksprimiraju glukozne transportere GLUT1 (*SLC2A1*) i GLUT3 (*SLC2A3*), a u manjoj mjeri i GLUT2 (*SLC2A2*) za kojeg je utvrđeno da nije glavni glukozni transporter u ljudskim  $\beta$  stanicama [44,45]. Dotični glukozni transporteri omogućavaju ulazak glukoze u  $\beta$  stanice olakšanom difuzijom što daje  $\beta$  stanicama mogućnost odgovora na porast koncentracije glukoze u krvi (GSIS). Slijed događaja u GSIS opisali su u preglednom članku Komatsu i sur. [46]. Nakon što glukozna molekula uđe u stanicu enzim glukokinaza ju fosforilira, a nastala glukozna-6-fosfat kroz procese glikolize i ciklusa limunske kiseline daje molekulu ATP. ATP je važna signalna molekula u  $\beta$  stanicama jer uzrokuje depolarizaciju stanice uslijed zatvaranja ATP-ovisnih  $K^+$  kanala ( $K_{ATP}$  kanali). Depolarizacija stanice pak uzrokuje otvaranje naponom reguliranih  $Ca^{2+}$  kanala uslijed čega raste koncentracija  $Ca^{2+}$  u citoplazmi i time pojačanu egzocitozu vezikula s inzulinom.

Transkripcijski faktor *HNF1α* zajedno s transkripcijskim faktorom *FOXA2* igra važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena uključenih u GSIS. U ljudi transkripcijski faktori *HNF1α* i *FOXA2* reguliraju ekspresiju gena *SLC2A1*, *SLC2A2* i *MGAT4A* (*GnT-4a*) [47,48]. Gen *MGAT4A* kodira za glikoziltransferazu *GnT-4a* koja katalizira transfer N-acetilglukozamina (*GlcNAc*), koristeći molekulu *UDP-GlcNAc* kao supstrat, na osnovnu strukturu N-vezanih glikana ( $Man_3GlcNAc_2-Asn$ ) preko  $\beta$ 1-4 glikozidne veze [49,50]. Glikoziltransferaza *GnT-4a* stoga igra ključnu ulogu pri nastanku multiantenarnih (tri- i tetraantenarnih) složenih N-vezanih glikana u  $\beta$  stanicama gušterače, tankom i debelom crijevu, bubrezima i mozgu gdje se pojačano eksprimira [50,51]. U kontekstu GSIS-a, primijećeno je kako poremećena glikozilacija glukoznih transportera GLUT1 i GLUT2 mijenja njihov poluživot na površini stanice [51,52] te direktno utječe na aktivnost samog transportera u slučaju GLUT1 [53], ali ne na aktivnost samog transportera u slučaju GLUT2 [51]. U slučaju transportera GLUT2 poznat je mehanizam djelovanja N-glikozilacije na stabilnost proteina, a koji je opisan u preglednom članku Ohtsubo i Taniguchi (2014) [54]. Galektin-9, protein iz porodice lektina, na površini stanice preferentno veže multiantenarne N-glikane na transporteru GLUT2 čime mu produljuje poluživot na staničnoj membrani. Uslijed poremećene glikozilacije transportera GLUT2, galektin-9 se ne veže za njega zbog čega dolazi do njegove pojačane endocitoze te posljedično smanjene količine na površini stanične membrane. Transporter GLUT2 koji je preostao na staničnoj membrani u velikoj mjeri nalazi se u domenama lipidnih splavi gdje asocira sa stomatinom. Za



transporter GLUT1 se zna da je njegova aktivnost negativno regulirana interakcijom sa stomatinom, a zbog sličnosti transportera GLUT1 i GLUT2 pretpostavlja se da je aktivnost transportera GLUT2 također negativno regulirana interakcijom sa stomatinom (Slika 1-6). Stoga, poremećaj glikozilacije transportera GLUT1 i GLUT2 dvojako utječe na njihovu aktivnost detektora glukoze: 1) smanjuje im poluživot na staničnoj membrani (uglavnom se nalaze u endosomima) i 2) indirektno inhibira njihovu aktivnost uslijed interakcija sa stomatinom. U  $\beta$  stanicama oboljelih od dijabetesa tipa 2 primijećena je promjena lokalizacije proteina HNF1 $\alpha$  i FOXA2 iz jezgre u citoplazmu uz smanjenje ekspresije gena *SLC2A1*, *SLC2A2* i *MGAT4A* što pak dovodi do smanjenja količine transportera GLUT1 i GLUT2 na površini stanice i njihove poremećene glikozilacije [48]. Najvjerojatnije je vrlo sličan poremećaj molekularnog puta prisutan u osoba oboljelih od dijabetesa tipa MODY3 u kojem je gen *HNF1A* mutiran.



Slika 1-6: Utjecaj poremećene glikozilacije glukoznog transportera GLUT2 na njegovu sposobnost transporta glukoze. U slučaju normalne glikozilacije transportera GLUT2 od strane glikoziltransferaze GnT-IVa, galektin-9 ostvaruje interakcije s multiantenarnim N-glikanima na transporteru GLUT2 čime mu produljuje poluživot na površini membrane. U slučaju aberantne glikozilacije, galektin-9 ne ostvaruje interakcije s transporterom GLUT2 koji se s jedne strane pojačano internalizira endocitozom (nije prikazano), a s druge strane premješta u domene lipidnih splavi gdje stupa u interakciju sa stomatinom što pak inhibira njegovu sposobnost da transportira glukozu u stanicu. Slika preuzeta iz i adaptirana prema Ohtsubo i Taniguchi (2014) [54].

## 1.2. Epigenetičke modifikacije

Pojam epigenetike javlja se početkom 50-ih godina prošloga stoljeća u kontekstu razvojne biologije. Sam izraz „epigenetika“ uveo je C. H. Waddington koji ju je definirao kao nasljedne promjene fenotipa koje nisu uzrokovane promjenom genotipa [55]. Poznato je 6 mehanizama odnosno slojeva epigenetičkih oznaka: kovalentne modifikacije histona, histonske varijante, remodeliranje kromatina i visok stupanj organizacije kromatina, metilacija i hidrosimetilacija DNA, djelovanje malih nekodirajućih molekula RNA (ncRNA, od engl. *non-coding RNA*) i pozicijska informacija (položaj sekvence DNA u jezgri). Epigenetički mehanizmi su međusobno povezani i tvore složenu mrežu epigenetičke informacije koju još nazivamo „epigenetički ili histonski kod“ te je on svojevrsno proširenje genetičkog koda ili genetičke informacije [56]. Histonski (epigenetički) kod vremenski i mjesno specifično regulira ekspresiju gena. Epigenetičke oznake uključene su u čitav niz fizioloških i patoloških procesa kao što su inaktivacija X kromosoma u ženki sisavaca, stabilnost kromatina, genomski utisak, regulacija ekspresije gena, razvojni procesi, tumorigeneza i ostali poremećaji i bolesti u ljudi. Epigenetički sustav kontrole ekspresije gena omogućava stanicama da zadrže svoj identitet kroz diobe dajući im pritom dovoljno prostora za odgovor na okolišne i razvojne signale.

### 1.2.1. Metilacija molekule DNA

Metilacija molekule DNA uglavnom se odnosi na dodatak metilne skupine na 5. ugljikovom atomu citozina pri čemu nastaje 5-metilcitozin (5-mC). Biološke uloge metilacije molekule DNA tkivno su specifične, a sama metilacija molekule DNA povezana je sa nizom fizioloških i patoloških procesa. Metilacija molekule DNA iznimno je važna tijekom embrionalnog razvoja i diferencijacije stanica, a pogreške u uspostavljanju uzorka metilacije dovode do maligne transformacije stanica i nepravilnog genomskog utiska [57]. Metilacija molekule DNA u kralježnjaka uglavnom se odvija na simetričnim CpG dinukleotidima, dok se u biljaka i nekih gljiva još odvija i u kontekstu motiva CpHpG i CpHpH (gdje H predstavlja A, C ili T) [58–60]. Riggs [61] i Holiday i Pugh [62] ustvrdili su još 1975. kako je upravo metilacija CpG dinukleotida jedan od epigenetičkih biljega u kralježnjaka te su u svojim radovima predložili da: 1) sekvence DNA mogu biti metilirane *de novo*; 2) se uzorak metilacije može nasljeđivati kroz diobe mehanizmom koji podrazumijeva djelovanje enzima koji prepoznaje i veže hemimetilirane CpG dinukleotide; 3) metilnu skupinu na citozinu mogu prepoznati DNA-vezujući proteini i 4) metilacija molekule DNA direktno utišava ekspresiju gena. Iako regije bogate CpG dinukleotidima (tzv. CpG otoci) čine manje od 1 % genoma čovjeka, oko dvije

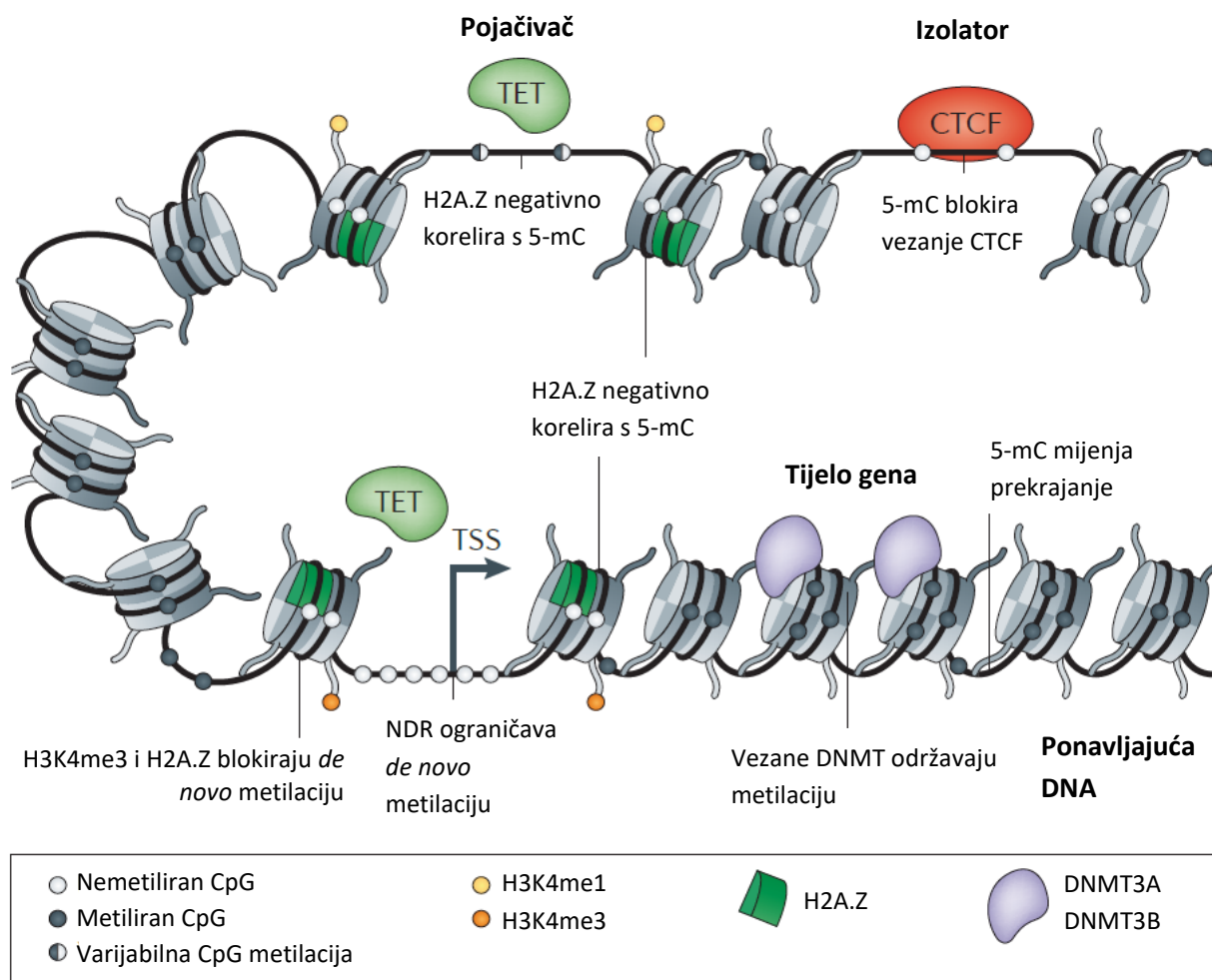
trećine gena sadrži CpG otoke [63,64]. Unatoč tome, većina CpG otoka u somatskim stanicama nije metilirana neovisno o transkripcijskom statusu gena [65], dok je između 60 i 70 % svih CpG dinukleotida metilirano [66]. Sam mehanizam kako metilacija molekule DNA utišava ekspresiju gena nije do kraja objašnjen, ali najvjerojatnija su dva modela predložena u preglednom članku Greenberg i Bourc'his (2019) [67]. Prvi model opisuje kako metilacija CpG dinukleotida onemogućava vezanje transkripcijskih faktora, što u slučaju promotora onemogućava inicijaciju transkripcije. Drugi model opisuje kako metilacija molekule DNA sudjeluje u nastanku heterokromatina. Jedna opcija je da DNA metiltransferaze prilikom metiliranja molekule DNA na sebe vežu kromatin-remodelirajuće i kromatin-modificirajuće efektore, dok je druga opcija da se spomenuti efektori vežu na metiliranu molekulu DNA preko proteina s vezujućom domenom za 5-mC (MBD, od engl. *methyl-CpG-binding domain*) ili proteina s cinkovim prstom. U oba slučaja efektori su histonske metiltransferaze i deacetilaze koje uvode histonske oznake karakteristične za heterokromatin.

Proces metilacije molekule DNA posredovan je djelovanjem DNA metiltransferaza koje kataliziraju prijenos metilne skupine s S-adenozil-L-metionina (SAM) na 5. C atom citozina pri čemu nastaje 5-mC. U sisavaca poznate su tri obitelji DNA metiltransferaza: DNMT1, DNMT2 i DNMT3 (od engl. *DNA nucleotide methyltransferase*), a koje su detaljno opisane u preglednim člancima Hermann i sur. [68] i Xu i sur. [69]. DNA metiltransferaze u sisavaca generalno su građene od N-terminalne regulatorne i C-terminalne katalitičke domene uz iznimku metiltransferaza DNMT2, koja ne posjeduje N-terminalnu regulatornu domenu i koja metilira tRNA, ali ne i molekulu DNA, te DNMT3L, čija katalitička domena nema enzimatsku ulogu. Još od prvih radova [61,62] koji predlažu modele uspostave i nasljeđivanja metilacije citozina spominje se metiltransferaza DNMT1 kao ona koja je odgovorna za održavanje uzorka metilacije molekule DNA, dok su metiltransferaze DNMT3A i 3B odgovorne za metilaciju molekule DNA *de novo*. Metiltransferaza DNMT1 konstitutivno je eksprimirana u proliferirajućim stanicama i somatskim tkivima [70], ima velik afinitet za hemi-metiliranu DNA [71,72], premda ova metiltransferaza posjeduje i aktivnost metilacije *de novo* [73]. Metiltransferaza DNMT1 sadrži domenu s kojom stupa u interakciju s proteinom PCNA u području replikacijskih rašlji [74] zbog čega se smatra glavnom metiltransferazom za održavanje prethodno uspostavljenog uzorka metilacije. Metiltransferaze DNMT3A i DNMT3B visoko su eksprimirane u embrionalnim matičnim stanicama, a slabo u somatskim stanicama, imaju podjednak afinitet za hemi-metiliranu i nemetiliranu DNA te se smatra da im je glavna aktivnost metilacija *de novo* [70]. Niz problema koje su u svom preglednom članku naveli Jones i Liang (2009) [70] zajedno s novim otkrićima dovela su do proširenja ovog

osnovnog modela uspostave i održavanja uzorka metilacije. Prvo proširenje temelji se na otkriću da metiltransferaza DNMT1 stupa u interakciju s proteinom UHRF1 (poznat i kao NP95) koji veže hemi-metiliranu DNA [75–78]. Pretpostavlja se da protein UHRF1 ima veći značaj od proteina PCNA, jer su neka istraživanja pokazala da protein PCNA nije ključan u održavanju metilacije DNA [79], pri navođenju metiltransferaze DNMT1 na hemi-metiliranu DNA u području replikacijskih rašlji [76,78]. Također, pretpostavlja se kako bi protein UHRF1 mogao omogućiti vezanje metiltransferaze DNMT1 na hemi-metiliranu DNA i izvan replikacijskih rašlji te time omogućiti potpunu metilaciju eventualno zaostalih hemi-metiliranih CpG mjesta [70]. Drugo proširenje temelji se na otkriću kako metiltransferaze DNMT3A i DNMT3B nisu slobode u jezgri već su vezane za kromatin, točnije nukleosome [80]. Pretpostavlja se kako takva lokalizacija omogućava dovršetak metilacije eventualno zaostalih hemi-metiliranih CpG mjesta (koje je metiltransferaza DNMT1 propustila metilirati) te održavanje statusa, ali ne nužno i točnog uzorka, metilacije određene genomske regije [70]. Ovo ukazuje na to kako ne postoji oštra granica između metiltransferaza DNMT1 i DNMT3A/3B u njihovim funkcijama, te da i *de novo* DNA metiltransferaze sudjeluju i u održavanju metilacije molekule DNA.

Lokalizacija 5-mC u genomu igra važnu ulogu u određivanju njegove biološke uloge pa tako razlikujemo metilaciju citozina u području promotora, području tijela gena te u području regulatornih elemenata (pojačivači i izolatori). Za pregled utjecaja položaja metilacije molekule DNA u genomu vidi pregledne članke Jones (2012) [81] i Greenberg i Bourc'his (2019) [67]. Većina gena koji u svojim promotorima imaju CpG otoke imaju nemetilirane citozine [82]. Regulacija ekspresije takvih gena pod kontrolom je transkripcijskih faktora [83], a u njihovom utišavanju djeluju razni mehanizmi, od kojih je najčešće utišavanje posredovano proteinima Polycomb. U manjem broju gena CpG otoci su metilirani i ova metilacije povezana je sa stabilnim i dugotrajnim utišavanjem ekspresije, kao što je u slučaju gena na inaktiviranom X kromosomu, utisnutih gena i gena specifičnih za stanice germinativne linije. Pretpostavlja se da metilacija molekule DNA u slučaju gena koji imaju CpG otoke u svojim promotorima samo „zaključava“ prethodno uspostavljeno utišano stanje mehanizmima koji su prethodno opisani [84,85]. Geni koji nemaju CpG otoke u svojim promotorima imaju varijabilne razine metilacije za koju se još ne zna sa sigurnošću kako sudjeluje u regulaciji ekspresije tih gena. Istraživanja pokazuju oprečne rezultate te neki radovi ukazuju na to da metilacija promotora nema utjecaj na ekspresiju određenog gena [86], dok drugi pokazuju da metilacija ima utjecaj na ekspresiju analiziranih gena [87]. Tijela gena, koja su generalno siromašna CpG dinukleotidima, ali mogu sadržavati CpG otoke [88], također su mjesta metilacije. Za razliku od metilacije u području

promotora, metilacija u tijelu gena pozitivno korelira s razinom ekspresije gena [58,89–92] što pokazuje kako u sisavaca metilacija molekule DNA utječe na inicijaciju, ali ne i na elongaciju transkripcije. Metilacija tijela gena važna je u utišavanju intragenskih ponavljajućih DNA elemenata, kao što su retrovirusi, elementi LINE-1 i *Alu*, čime metilacija molekule DNA sudjeluje u održavanju stabilnosti genoma [93], a smatra se da također igra ulogu u alternativnom prekrajanju [94,95] i reguliranju korištenja promotora gena (reguliranje mjesta početka transkripcije) bez remećenja ekspresije gena s uzvodnog mjesta početka transkripcije [96,97]. Pojačivači i izolatori su također mjesta metilacije. U slučaju pojačivača, koji su uglavnom siromašni CpG dinukleotidima, metilacija je varijabilna i dinamična te negativno korelira s funkcijom pojačivača [98]. Metilacija molekule DNA u izolatorima negativno korelira s njihovom funkcijom. Najbolji primjer kako metilacija molekule DNA djeluje na funkciju izolatora je regulacija ekspresije utisnutog lokusa *IGF2-H19* [99]. Mjesta i utjecaj metilacije molekule DNA prikazana su na Slici 1-7. Analizama korelacije stupnja CpG metilacije i ekspresije gena *HNF1A* u različitim staničnim linijama otkrivena su 4 CpG mjesta u njegovom 1. egzonu koja bi mogla sudjelovati u regulaciji njegove ekspresije [100]. Ova pretpostavka potvrđena je korištenjem molekularnog alata CRISPR/dCas9-TET1 kojim su se ciljale 4 CpG mjesta u stanicama HEK293 i BG1 što je imalo za posljedicu povećanje razine transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* [101].

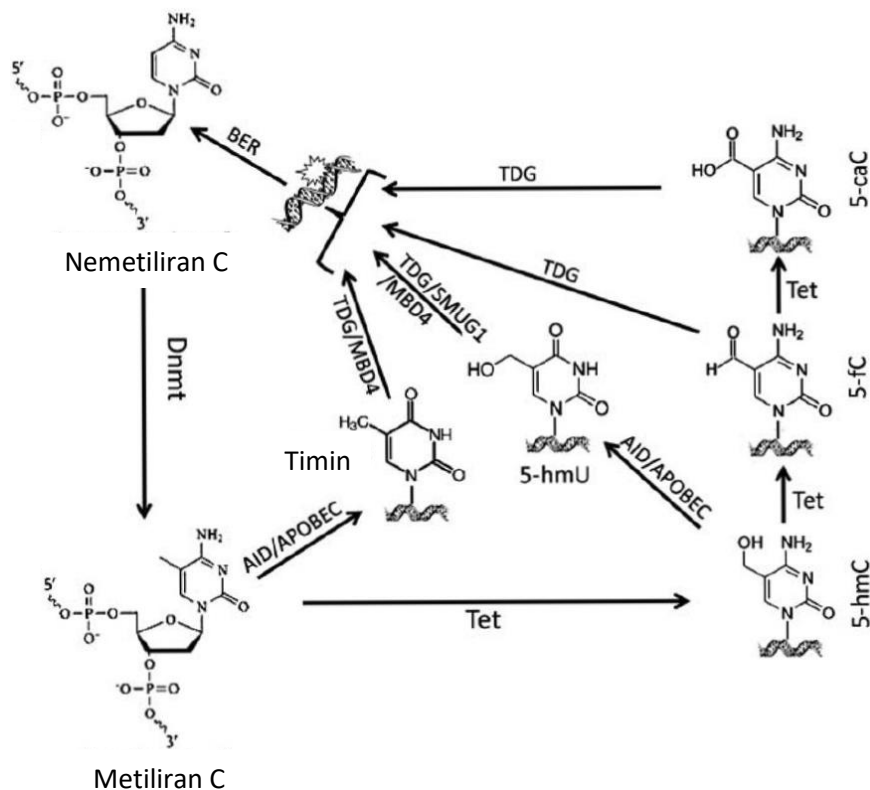


Slika 1-7: Građa i položaj CpG mjesta u genomu i njihova uloga na ekspresiju gena. Mjesto početka transkripcije (TSS, od engl. *transcription start site*) u većine aktivnih gena okružena je regijom bez nukleosoma (NDR, od engl. *nucleosome-depleted region*) koja je pak okružena nukleosomima s oznakama H3K4me3 (oznaka aktivnog kromatina) i nukleosomima koji imaju ugrađenu histonsku varijantu H2A.Z. Ubacivanje varijante H2A.Z te oznake H3K4me3, kao i nedostatak nukleosoma u NDR, onemogućavaju vezanje DNA metiltransferaza, a time i metilaciju *de novo*. Demetilirano stanje oko TSS aktivno održavaju DNA demetilaze (TET). Tijelo gena posjeduje manje CpG dinukleotida od promotora te je uglavnom metilirano na ponavljajućim sekvencama i jače u području egzona naspram introna. Metilacija u tijelu gena povezana je s represijom ponavljajućih DNA elemenata, alternativnim prekradanjem i regulacijom korištenja promotora. Metilaciju aktivno održavaju DNA metiltransferaze (DNMT) vežući se na nukleosome. Pojačivače, kao i TSS, okružuje NDR, koju pak okružuju nukleosomi s oznakom H3K4me1 i histonskom varijantom H2A.Z. Pojačivači, koji su generalno siromašni CpG dinukleotidima, pokazuju varijabilnu razinu metilacije što ukazuje na dinamičan proces metilacije i demetilacije. Izolatori, kao i pojačivači, oko sebe imaju NDR i njihova metilacija sprječava vezanje transkripcijskog faktora (CTCF). Slika preuzeta iz i adaptirana prema Jones (2012) [81].

### 1.2.2. Demetilacija molekule DNA

Razina i distribucija metilacije molekule DNA ovisi o procesima metilacije i demetilacije. Demetilacija molekule DNA može biti pasivna ili aktivna. Pasivna demetilacija odvija se spontano tijekom replikacije molekule DNA ukoliko DNA metiltransferaza napravi pogriješku te ne metilira novonastali lanac molekule DNA uslijed čega se, kroz diobe, gubi metilacijski status. Aktivna demetilacija odvija se posredstvom jednog ili više enzima neovisno o replikaciji. Postoji više modela koji objašnjavaju proces aktivne demetilacije u sisavaca (detaljno objašnjeni u Zhang i Zhu (2012) [102]), a dva glavna su direktno izrezivanje 5-mC i izrezivanje nakon modifikacija. Prvi model podrazumijeva popravak izrezivanjem baze (BER, od engl. *base excision repair*) u kojem DNA glikozilaze TDG (od engl. *thymine DNA glycosylase*) i MBD4 (od engl. *methyl-CpG-binding domain protein 4*) direktno prepoznaju 5-mC te cijepaju vezu između baze i deoksiriboze u 5-mC uslijed čega nastaje apurinsko (abazično) mjesto [103–105]. Apurinsko mjesto prepoznaje endonukleaza AP i izrezuje ostatak nukleotida, a nastali prekid u sekvenci popravljaju DNA polimeraza i DNA ligaza. Problem s ovim modelom je što se pokazalo da *in vitro* proteini TDG i MBD4 imaju slabu 5-mC glikozilaznu aktivnost naspram njihove aktivnosti u popravku krivo sparenih baza G/T (engl. *G/T mismatch repair*) [106,107]. Doduše, smatra se da bi 5-mC glikozilazna aktivnost proteina TDG i MBD4 mogla biti jača *in vivo* zbog interakcije s drugim proteinima [103], no ipak se vjeruje da ovaj model nije glavni način demetilacije molekule DNA u sisavaca. Drugi model demetilacije molekule DNA podrazumijeva enzimatsku promjenu 5-mC oksidativnim i/ili deaminacijskim procesima prije izrezivanja. Oksidativne modifikacije uvode dioksidogenaze porodice TET (od engl. *ten-eleven translocation*) koja uključuje enzime TET1, TET2 i TET3. One kataliziraju iterativnu oksidaciju 5-mC prvo u 5-hidroksimetilcitozin (5-hmC), zatim u 5-formilcitozin (5-fC) i u konačnici u 5-karboksilcitozin (5-caC) [108–111]. Deaminaciju kataliziraju proteini porodice AID/APOBEC (od engl. *activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptides*) koji deaminiranjem 5-mC daju T, a deaminiranjem 5-hmC daju 5-hmU [104,112]. 5-hmC ne izrezuju enzimi TDG i MBD4 [110], a pošto ga DNA metiltransferaze ne mogu prepoznati i na temelju njega održati uzorak metilacije [113], smatra se da 5-hmC sudjeluje u pasivnoj demetilaciji. Daljnje oksidativne produkte, 5-fC i 5-caC, uspješno prepoznaje i izrezuje protein TDG svojom DNA glikozilaznom aktivnošću [110,114,115]. S druge pak strane, deaminacijski produkti, T i 5-hmU, pokreću put popravka krivo sparenih baza u kojem ih proteinski kompleks MBD4/TDG uz pomoć GADD45 (od engl. *growth arrest and dna damage*) izrezuje svojom DNA

glikozilaznom aktivnošću [103,104]. U oba slučaja, nakon izrezivanja baze pokreće se popravak BER kao što je prikazano na Slici 1-8.



Slika 1-8: Aktivna demetilacija 5-metilcitozina. Tri su moguća puta aktivne demetilacije 5-mC: 1) deaminacija 5-mC u T, što će pokrenuti popravak krivo sparenih baza, 2) oksidacija 5-mC u 5-hmC koji će deaminacijom dati 5-hmU te pokrenuti popravak krivo sparenih baza, i 3) oksidacija 5-mC preko 5-hmC u 5-fC i 5-caC, što će pokrenuti njihovo izrezivanje pomoću glikozilaze TDG. Sva tri puta završavaju popravkom BER koji će završiti ugradnjom nemetiliranog citozina na mjesto prijašnjeg 5-mC. Slika preuzeta iz i adaptirana prema Zhang i Zhu (2012) [102].

Aktivna demetilacija molekule DNA uključena je u uspostavu i održavanje odgovarajućih uzoraka metilacije tijekom razvoja, ali i u somatskim stanicama odraslog organizma. Tijekom embriogeneze sisavaca odvijaju se dva vala aktivne globalne demetilacije. Prvi val demetilacije dešava se u zigoti, točnije u muškom pronukleusu [116,117]. Pretpostavlja se da ova aktivna demetilacija služi kako bi se obrisali biljezi očevog genoma u svrhu uspostave novih metilacijskih uzoraka. Drugi val demetilacije dešava se u primordijalnim germinativnim stanicama [118,119] što priprema genom za uspostavu novih metilacijskih uzoraka specifičnih za spol u budućim gametama. Globalna demetilacija također se odvija tijekom reprogramiranja jezgre somatske stanice prilikom kloniranja te se pretpostavlja da je visoka stopa neuspjeha u kloniranju uzrokovana upravo nepravilnim reprogramiranjem jezgre somatske stanice [120]. U većine tumora primijećeno je globalno smanjenje metilacije molekule DNA, a najviše su



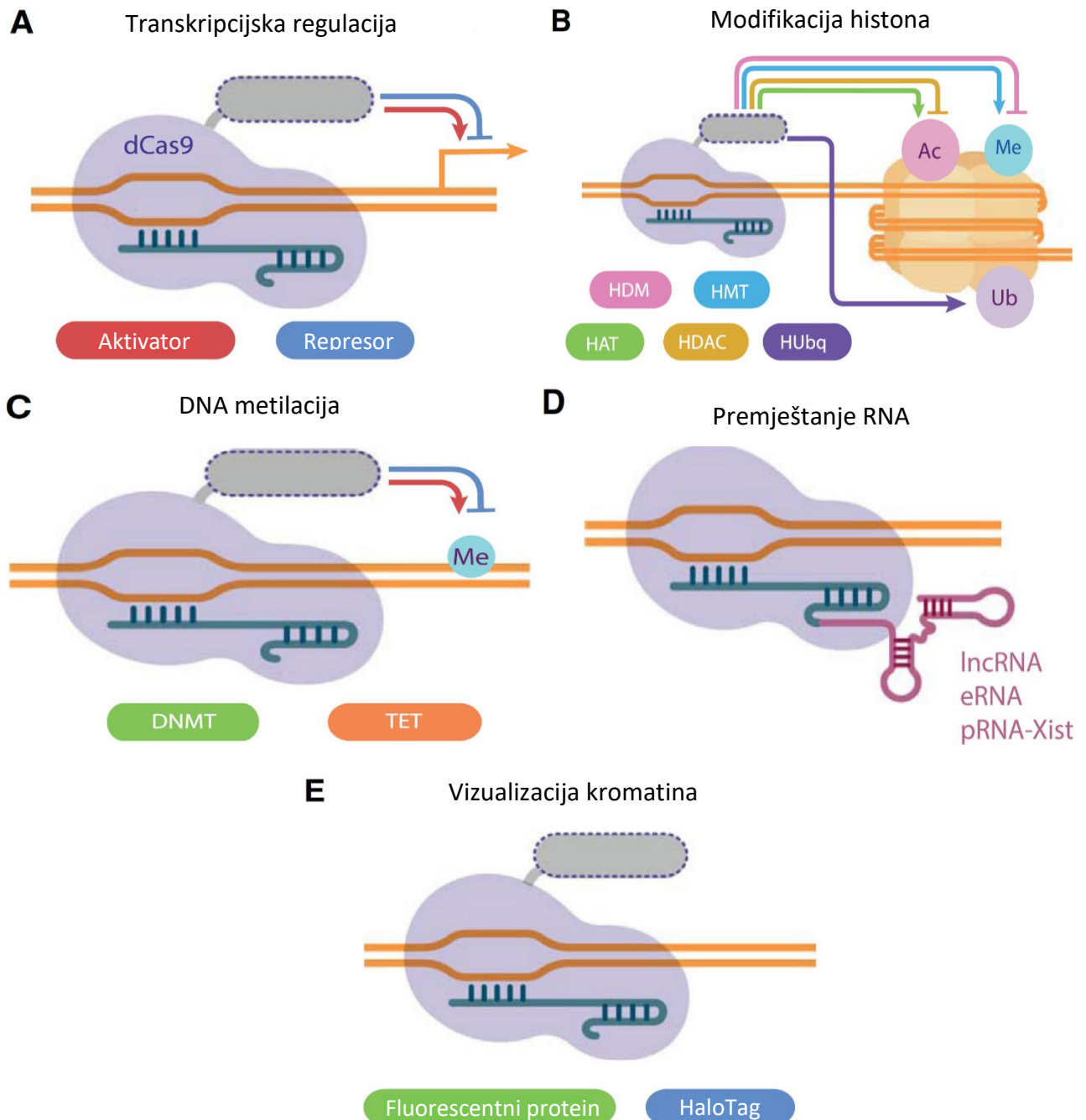
zahvaćene ponavljajuće sekvence, utisnuti geni, tkivno specifični geni, onkogeni i geni povezani s invazivnošću i metastaziranjem [121,122]. Unatoč globalnoj demetilaciji, u tumora je primijećena hipermetilacija određenih dijelova genoma, poglavito tumor supresorskih gena [121]. Sam mehanizam ovakvog poremećaja metilacije u tumora nije poznat. Ograničena (lokalna) demetilacija regulira razinu ekspresije pojedinih gena te je uključena u procese pamćenja [58] i neurogeneze [123] te u procesu odgovora stanica CD8+ T na antigen [124]. Sam mehanizam ciljanja demetilacijske mašinerije nije do kraja objašnjen, no pretpostavlja se da u tom procesu sudjeluju male nekodirajuće RNA (miRNA) i DNA-vezujući proteini koji specifično vežu ciljanu sekvencu te time navode demetilacijsku mašineriju, karakteristike okolnog kromatina (npr. histonske modifikacije) i lokalizacija demetilacijske mašinerije u jezgri [125].

### 1.2.3. Metode analize stupnja metilacije molekule DNA

U ovom diplomskom radu je u svrhu analize stupnja metilacije u promotoru gena *HNFI A* korištena metoda pirosekvenciranja nakon bisulfitne konverzije molekule DNA. Bisulfitna konverzija bazira se na tretmanu molekule DNA natrijevim bisulfitom koji uzrokuje deaminaciju C u U koji će se kasnije, tijekom pirosekvenciranja, prikazati kao T. U slučaju 5-mC ne dolazi do deaminacije tako da će se oni tijekom pirosekvenciranja prikazati kao C [126]. Tako konvertirana molekule DNA koristi se za PCR kako bi se dobili specifični ampliconi unutar kojih se nalaze željena CpG mjesta. Pirosekvenciranje je sintetska metoda sekvenciranja koja omogućava određivanje stupnja metilacije na pojedinačnom citozinu te se koristi za određivanje stupnja metilacije poznatih sekvenci, ali i cijeloga genoma. Osim pirosekvenciranja, za određivanje stupnja metilacije poznatih sekvenci koriste se metoda *bead array*, bisulfitno sekvenciranje, PCR specifičan za metilacijski status (engl. *methylation-specific PCR*) i mnoge druge metode. Za određivanje stupnja metilacije cijelog genoma koriste se metode HPLC-UV (engl. *high performance liquid chromatography – ultraviolet*), LC-MS/MS (engl. *liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*), LUMA (engl. *luminometric methylation assay*) i pirosekvenciranje ponavljajućih elemenata LINE-1 nakon bisulfitne konverzije. Naime, pokazalo se da stupanj metilacije ponavljajućih elemenata LINE-1 dobro odražava globalni stupanj metilacije genoma. Većina modernih metoda za analizu stupnja metilacije molekule DNA baziraju se na bisulfitnoj konverziji koja ne može razlikovati 5-mC i 5-hmC. Za pregled većine dostupnih metoda određivanja stupnja metilacije molekule DNA vidi pregledni članak Kurdyukov i Martyn Bullock (2016) [126].

### 1.3. Sustav CRISPR/Cas9 i njegovi derivati

Sustav CRISPR/Cas (od engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated*) otkriven je kao nasljedni adaptivni oblik imuniteta u većine bakterija i arheja koji im služi za obranu od stranih DNA elemenata [127,128]. Najjednostavniji tip sustava CRISPR/Cas je tip II u kojeg spada sustav CRISPR/Cas9. U prokariota, sustav CRISPR/Cas9 sastoji se od Cas9 proteina, koji djelovanjem dviju endonukleaznih domena (HNH i RuvC) uvodi dvolančani lom u molekulu DNA, CRISPR RNA (crRNA), koja navodi endonukleazu Cas9 na ciljnu sekvencu, i transaktivirajuće RNA (tracrRNA), koja je odgovorna za sazrijevanje i nastanak kompleksa Cas9 [129–132]. Ubrzo je otkriveno kako je ovaj sustav moguće iskoristiti za ciljano cijepanje molekule DNA te je sam sustav pojednostavljen spajajući funkciju molekula crRNA i tracrRNA u jednu, kimernu sgRNA (od engl. *single guide RNA*) [131,132]. Sustav CRISPR/Cas9 je stoga unaprijedio ciljanu modifikaciju genoma (uvođenje indel mutacija i transgena) svojom jednostavnošću naspram sustava koji koriste za DNA specifične proteine kao što su ZFP (od engl. *zinc finger proteins*) i TALEN (od engl. *transcription activator-like effector nucleases*) na koje je vezana endonukleaza (najčešće FokI). Naime, sustavi ZFP i TALEN zahtijevaju promjenu proteina za svaku ciljanu sekvencu, dok sustav CRISPR/Cas9 zahtijeva promjenu samo molekule sgRNA što je uvelike jednostavnije. Mutiranjem endonukleaznih domena HNH i RuvC dobiven je katalitički neaktivan dCas9 (od engl. *dead*) koji je upotrijebljen za ciljanu inhibiciju ekspresije gena tzv. CRISPR interferencijom (CRISPRi) [133]. Tako inaktivan dCas9 prepoznat je kao platforma za vezanje čitavog niza efektorskih proteina/funkcionalnih domena s ciljem ciljane modifikacije epigenoma, čime je revolucionirao istraživanja na području epigenetike. Mnogobrojne modifikacije i primjene ovog molekularnog alata opisane su u preglednom članku Pulecio i sur. [134], a neke od njih prikazane su na Slici 1-9. Prvotno su na dCas9 vezani transkripcijski regulatori poput VP16, KRAB, SID, p65, HSF1 i MyoD koji na ciljne sekvence regrutiraju elemente nalik na transkripcijske faktore i kromatin-modificirajuće efekte, čime indirektno reguliraju stanje kromatina, a time i razinu ekspresije gena. Vezanje epigenetičkih „pisača“ i „brisača“ za uspostavljanje i brisanje epigenetičkih modifikacija poput histonskih metiltransferaza, histonskih acetiltransferaza, histonskih demetilaza i deacetilaza, te DNA metiltransferaza i demetilaza, omogućilo je i otkrivanje točne uloge pojedinih epigenetičkih oznaka u regulaciji ekspresije gena, ali i reaktivaciju epigenetički utišanih gena u nekim sindroma i bolesti [135–142].



Slika 1-9: Primjene molekularnih alata CRISPR/dCas9 u manipulaciji epigenoma. (A) Vežanjem transkripcijskih regulatora (aktivatora i represora) na dCas9 moguće je regrutirati koefektore (koaktivatore i korepresore) na ciljnu sekvencu. Dotični koefektori uzrokuju promjenu konformacije kromatina, a time i promjenu genske ekspresije. (B) Vežanjem epigenetičkih pisača i brisača na dCas9 moguće je ciljano mijenjati specifične modifikacije na histonskim repovima. HDM – histonska demetilaza, HMT – histonska metiltransferaza, HAT – histonska acetiltransferaza, HDAC – histonska deacetilaza, HUBq – histonska ubikvitin ligaza. (C) Vežanjem katalitičkih domena koje uvode ili uklanjaju metilnu skupinu s citozina na dCas9 moguće je ciljano mijenjati metilacijski status DNA. DNMT – DNA metiltransferaza, TET – DNA demetilaza (*ten eleven translocation*). (D) Korištenjem molekula sgRNA koje vežu molekule ncRNA moguće je mijenjati njihovu lokalizaciju u genomu. (E) Vežanjem oznaka koje je moguće pratiti moguće je vizualizirati ciljne sekvence na kromatinu. Slika preuzeta iz i adaptirana prema Pulecio i sur. [134].

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je transfecirati staničnu liniju 1.1B4, model za istraživanje  $\beta$  stanica gušterače, fuzijskim proteinom TET1-dCas9 te istražiti dolazi li do promjene stupnja metilacije na 4 CpG mjesta koja su prijašnjim korelacijskim analizama otkrivena kao kandidat regulatorna mjesta za transkripcijsku aktivnost gena *HNF1A*. Stoga je i cilj bio utvrditi hoće li ciljana demetilacija ova 4 kandidat CpG mjesta dovesti do promjene transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* što bi potvrdilo njihovu regulatornu ulogu u stanicama 1.1B4.

Specifični ciljevi istraživanja su:

- Uspješna transfekcija stanica 1.1B4 plazmidnim konstruktom koji kodira za fuzijski protein TET1-dCas9
- Izolacija i bisulfitna konverzija ukupne genomske DNA iz transfeciranih stanica 1.1B4
- Izolacija i reverzna transkripcija ukupne RNA iz transfeciranih stanica 1.1B4
- Analiza stupnja metilacije 4 CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A* pirosekvenciranjem
- Analiza transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* metodom qPCR korištenjem specifičnih proba *TaqMan*.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Stanična linija 1.1B4 i kultura stanica

Korištene su stanice stanične linije 1.1B4 (ECACC) koja je dobivena fuzijom ljudskih  $\beta$  stanica gušterače i tumorskih stanica PANC-1 (ECACC 87092802). Stanice linije 1.1B4 karakterizira epitelna morfologija, adherentnog su tipa te pokazuju otpuštanje inzulina stimulirano glukozom (GSIS) zbog čega se koriste kao model  $\beta$  stanica gušterače čovjeka.

Stanice su do 8. pasaže uzgajane u Petrijevim zdjelicama veličine 10 cm kako bi se priviknule na medij. Stanice su pasažirane kada im je konfluentnost dosegla vrijednost između 80 i 90 %. Do trenutka transfekcije stanice su uzgajane u hranjivom mediju RPMI-1640 (od engl. *Roswell Park Memorial Institute*) s L-glutaminom bez antibiotika (*RPMI-1640 Medium, with L-glutamine and sodium bicarbonate; Sigma-Aldrich*) obogaćenim serumom goveđeg fetusa (FBS, od engl. *fetal bovine serum; Sigma-Aldrich*) konačne koncentracije 10 % i antibioticima penicilinom (*Lonza*), konačne koncentracije 100 U/mL, i streptomycinom (*Lonza*), konačne koncentracije 100  $\mu$ g/mL. Nakon transfekcije stanice su uzgajane u RPMI-1640 mediju s L-glutaminom bez antibiotika obogaćenim s 10 % FBS-a. Za uzgoj stanica korišten je inkubator za staničnu kulturu (*Panasonic*), a uvjeti uzgoja bili su 37 °C i atmosfera s 5 % CO<sub>2</sub>.

Pri sakupljanju ili presađivanju stanicama je uklonjen medij, isprane su otopinom pufera PBS (od engl. *phosphate-buffered saline*; sastav: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) te su odvojene od podloge pomoću 0,25 %-tnog tripsina (*Trypsin-EDTA solution; Sigma-Aldrich*). Za tripsinizaciju stanica u Petrijevim zdjelicama veličine 10 cm korišteno je 2 mL tripsina, a za tripsinizaciju stanica u pločicama sa 6 jažica korišteno je 0,5 mL tripsina. Inkubacija u tripsinu odvijala se u inkubatoru (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) u trajanju oko 3 min. Djelovanje tripsina zaustavljeno je dodatkom dvostrukog volumena medija RPMI-1640 s L-glutaminom bez antibiotika obogaćenim s 10 % FBS-a. Za prebrojavanje stanica prije nasadivanja korištena je komorica Bürker-Türk i epifluorescencijski mikroskop. Dan prije transfekcije nasadeno je po 300 000 stanica po jažici pločice sa 6 jažica za prve 4 vremenske točke sakupljanja stanica (8., 10., 13. i 16. dan nakon transfekcije).

### 3.2. Transfekcija i selekcija transfeciranih stanica 1.1B4

Stanice 1.1B4 transfecirane su metodom PEI-MAX (od engl. *Polyethylenimine Max*) koju su opisali Longo i sur. [143]. Za transfekciju su korišteni prethodno konstruirani plazmidi:

1. N-TET1\_SaCas9\_Puro\_Clover\_sekundarna kazeta+HNF1a\_sg03 – konstrukt koji kodira za fuzijski protein TET1-dCas9 u kojem je aktivna katalitička domena TET1 te molekulu sgRNA koja ga navodi na ciljna CpG mjesta u genu *HNF1A*
2. N-DED1\_SaCas9\_Puro\_Clover\_sekundarna kazeta+HNF1a\_sg03 – konstrukt koji kodira za fuzijski protein TET1-dCas9 u kojem je inaktivna katalitička domena TET1 te molekulu sgRNA koja g< navodi na ciljna CpG mjesta u genu *HNF1A*
3. N-TET1\_SaCas9\_Puro\_Clover\_sekundarna kazeta+NT-sgRNA – konstrukt koji kodira za fuzijski protein TET1-dCas9 u kojem je aktivna katalitička domena TET1 te molekulu sgRNA koja nije komplementarna ni jednoj regiji u ljudskom genomu.

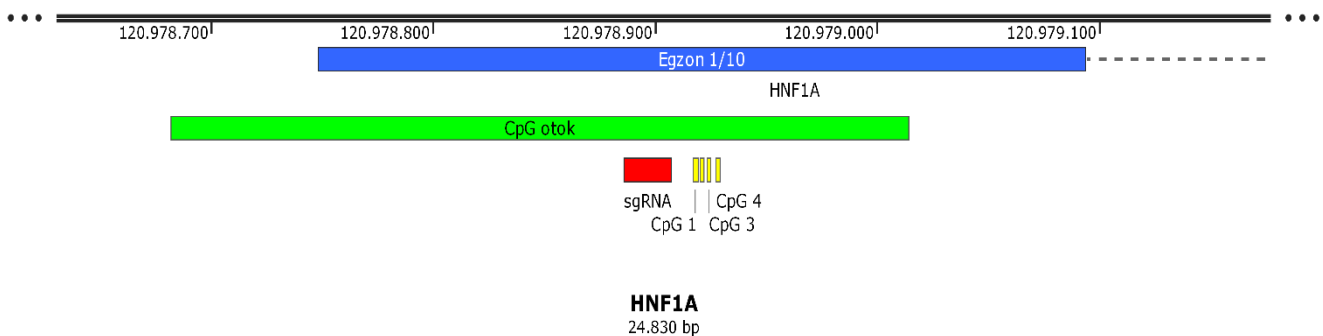
Vežno mjesto molekule sgRNA HNF1a\_sg03 u genu *HNF1A* kao i 4 CpG mjesta na koja navodi fuzijski protein TET1-dCas9 prikazani su na Slici 3-1, a mape transfeciranih plazmida prikazane su na Slici 3-2. Na dan transfekcije stanice 1.1B4 bile su u 8. pasaži, a konfluentnost im je bila oko 60 %. Za pripremu transfekcijske smjese korišteni su reagens PEI-MAX (1000 ng/μL; *Polysciences, Inc.*), medij Opti-MEM (od engl. *Minimum Essential Medium; Gibco*) i odgovarajući plazmidni konstrukt. Prvo je 3 μL reagensa PEI-MAX, što odgovara 3000 ng reagensa, razrijeđeno u 122 μL medija Opti-MEM. Potom je pomiješan volumen koji odgovara 1000 ng odgovarajućeg plazmidnog konstrukta i medij Opti-MEM do konačnog volumena od 125 μL. Spajanjem prvog i drugog volumena dobivena je transfekcijska smjesa u kojoj je maseni omjer reagensa PEI-MAX i plazmida 3:1. Kao negativna kontrola transfekcije korišten je medij Opti-MEM. Priređene smjese inkubirane su kroz 30 min na sobnoj temperaturi. Stanicama se prije transfekcije ukloni medij, isperu se otopinom pufera PBS te im se doda 3 mL medija RPMI-1640 s L-glutaminom bez antibiotika obogaćenog s 10 % FBS-a. U odgovarajuću jažicu pločice sa 6 jažica dodano je 250 μL odgovarajuće transfekcijske smjese. Za svaku transfekciju rađene su četiri biološke replike. Na ovaj način napravljeno je ukupno 4 različitih transfekcija stanica 1.1B4:

1. Stanice transfecirane plazmidnim konstruktom N-TET1\_SaCas9\_Puro\_Clover\_sekundarna kazeta+HNF1a\_sg03 (naziv: **stanice TET1**)
2. Stanice transfecirane plazmidnim konstruktom N-DED1\_SaCas9\_Puro\_Clover\_sekundarna kazeta+HNF1a\_sg03 (naziv: **stanice DED**)

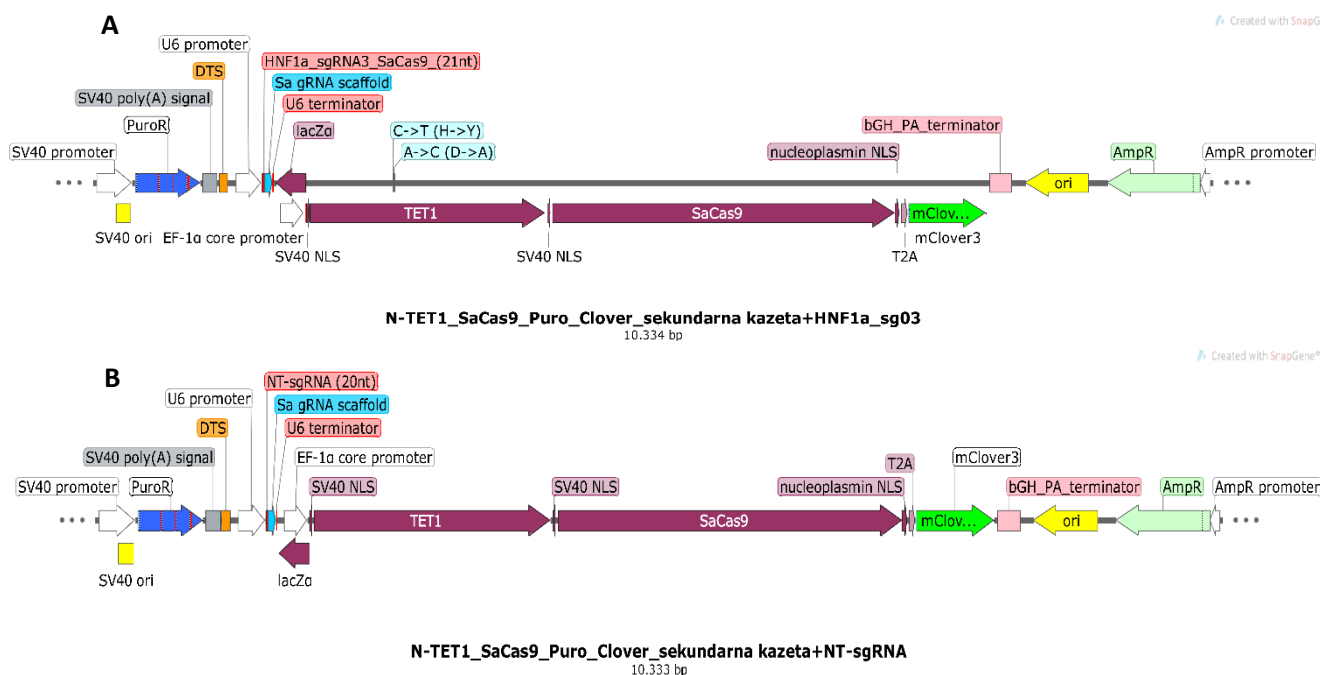
3. Stanice transfecirane plazmidnim kontruktom N-TET1\_SaCas9\_Puro\_Clover\_sekundarna kazeta+NT-sgRNA (naziv: **stanice NT**)
4. Stanice u koje je dodan samo transfekcijski reagens bez dodavanja plazmida, a koje služe kao negativna kontrola (engl. *Mock*; naziv: **stanice Mock**).

Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije stanica provjerena je efikasnost transfekcije epifluorescencijskim mikroskopom, kontrolne stanice *Mock* su presađene, a stanice TET1, DED i *NT* podvrgnute su selekciji puromicinom. Iz jažica koje sadrže kontrolne stanice *Mock*, stanice su presađene u Petrijeve zdjelice veličine 10 cm u razrjeđenju 1:42. Iz jažica koje sadrže stanice TET1, DED i *NT* ukloni se medij, stanice se isperu otopinom pufera PBS te im se doda 2 mL medija RPMI-1640 s L-glutaminom obogaćenog s 10 % FBS-a, bez antibiotika. Potom je u jažice dodan antibiotik puromicin (10 mg/mL; *Gibco*) u konačnoj koncentraciji 4 ng/μL. Medij se stanicama u jažicama zatim mijenja 48 i 72 h od transfekcije uz ispiranje stanica otopinom pufera PBS te uz pojačanje selekcije tako da je konačna koncentracija antibiotika puromicina iznosila 5 ng/μL, odnosno 6 ng/μL. Nakon 96 h od transfekcije prekine se selekcija – stanicama se odsiše medij, dvaput se isperu otopinom pufera PBS te im se doda 2 mL medija RPMI-1640 s L-glutaminom obogaćenog s 10 % FBS-a, bez antibiotika.

Created with SnapGene®



Slika 3-1: Mapa regije gena *HNF1A* unutar koje su smještena 4 analizirana CpG mjesta i vezno mjesto molekule sgRNA. Veći dio egzona 1 gena *HNF1A* zauzima CpG otok unutar kojeg se nalaze 4 analizirana CpG mjesta. Fuzijski protein TET1-dCas9 navođen je od strane molekule sgRNA na sekvencu koja je smještena oko 10 pb uzvodno od prvog CpG mjesta (gledano bez PAM sekvence). Položaj CpG mjesta je +172 (CpG 1), +175 (CpG 2), +178 (CpG 3) i +182 (CpG 4) u odnosu na mjesto početka transkripcije. Skala na vrhu označava položaj na ljudskom kromosomu 12. Korištena je verzija ljudskog genoma GRCh38/hg38 [5].



Slika 3-2: Linearne mape plazmidnih konstrukata korištenih za transfekciju stanica 1.1B4. (A) Plazmidni konstrukt N-TET1\_SaCas9\_Puro\_Clover\_sekundarna kazeta+HNF1a\_sg03 koji kodira za fuzijski protein TET1-dCas9 u kojem je katalitička domena TET1 aktivna i molekulu sgRNA koja navodi TET1-dCas9 na 4 ciljna CpG mjesta u genu *HNF1A* (HNF1a\_sgRNA3\_SaCas9). Ova slika također prikazuje plazmidni konstrukt N-DED1\_SaCas9\_Puro\_Clover\_sekundarna kazeta+HNF1a\_sg03 koji se od prethodno spomenutog konstrukta razlikuje isključivo po tome što kodira za fuzijski protein TET1-dCas9 u kojem je katalitička domena TET1 inaktivna. Inaktivacija katalitičke domene TET1 postignuta je uvođenjem točkastih mutacija H1671Y i D1673A u aktivnom mjestu katalitičke domene. (B) Plazmidni konstrukt N-TET1\_SaCas9\_Puro\_Clover\_sekundarna kazeta+NT-sgRNA koji kodira za fuzijski protein TET1-dCas9 u kojem je katalitička domena TET1 aktivna i molekulu sgRNA koja nije komplementarna ni jednoj regiji u ljudskom genomu (NT-sgRNA). (A) i (B) Po redu pojavljivanja, s lijeva na desno: SV40 promotor – pojačivač i rani promotor virusa SV40 (od engl. *Simian virus 40*), SV40 ori – ishodište replikacije virusa SV40, PuroR – N-acetiltransferaza puromicina, SV40 *poly(A) signal* – poliadenilacijski signal virusa SV40, DTS – sekvenca za unos plazmida u jezgru (od engl. *DNA nuclear targeting sequence*), U6 promotor – promotor RNA polimeraze III za U6 snRNA čovjeka, Sa gRNA *scaffold* – mjesto koje sadrži restrikcijno mjesto za ugradnju gena molekula crRNA, U6 terminator – terminacijska sekvenca U6 snRNA čovjeka, LacZα – LacZα fragment β-galaktozidaze, EF-1α *core promoter* – srž promotora elongacijskog faktora EF-1α čovjeka, SV40 NLS – jezgrin lokalizacijski signal (engl. *nuclear localisation signal*) velikog T antigena virusa SV40, TET1 – katalitička domena ljudskog enzima TET1, C->T (H->Y) i A->C (D->A) – inaktivirajuće mutacije u aktivnom mjestu katalitičke domene TET1, SaCas9 – katalitički inaktivna endonukleaza SaCas9, *nucleoplamin NLS* – dvodijelni jezgrin lokalizacijski signal nukleoplazmina, T2A – samo-cijepajući peptid 2A iz virusa *Thossea asigna*, mClover3 – monomerni oblik zeleno-žutog fluorescentnog proteina, bGH PA terminator – terminacijska sekvenca goveđeg hormona rasta s poliadenilacijskim signalom, ori – prokariotsko ishodište replikacije, AmpR i AmpR promotor – gen za β-laktamazu koja daje otpornost na antibiotik ampicilin i vezani promotor.



### 3.3. Skupljanje stanica 1.1B4 i izolacija DNA i RNA

U svrhu daljnjih analiza kao što su izolacija DNA i RNA, stanice su skupljene 8., 10., 13., 16., 20., 25. i 30. dan nakon transfekcije prethodno opisanim postupkom tripsinizacije. Zbog male količine stanica sve biološke replike određenog dana su spojene te su jažice tijekom tripsinizacije dodatno isprane medijem RPMI-1640 s L-glutaminom bez antibiotika obogaćenim s 10 % FBS-a kako bi se povećao prinos skupljenih stanica. Stanice skupljene 16. dan nakon transfekcije iskorištene su za nasadivanje stanica za skupljanje 20. dan nakon transfekcije tako što su transfecirane stanice (TET1, DED i *NT*) nasadene u nove pločice sa 6 jažica u razrjeđenju 1:5, a kontrolne stanice *Mock* u nove Petrijeve zdjelice veličine 10 cm u razrjeđenju 1:16. Stanice skupljene 20. dan nakon transfekcije iskorištene su za nasadivanje stanica za skupljanje 25. dan nakon transfekcije tako što su transfecirane stanice nasadene u razrjeđenju 1:5, a kontrolne stanice *Mock* u razrjeđenju 1:6. Stanice skupljene 25. dan nakon transfekcije iskorištene su za nasadivanje stanica za skupljanje 30. dan nakon transfekcije tako što su transfecirane stanice nasadene u razrjeđenju 1:6, a kontrolne stanice *Mock* u razrjeđenju 1:10. Stanične suspenzije centrifugirane su 5 min na 500 g pri sobnoj temperaturi. Supernatant je uklonjen, a talozi stanica resuspendirani su u otopini pufera PBS. Stanični talozi transfeciranih stanica (TET1, DED i *NT*) skupljenih 8., 10., 13., 16. i 20. dan nakon transfekcije resuspendirani su u 600  $\mu$ L otopine pufera PBS, stanični talozi transfeciranih stanica skupljenih 25. dan u 400  $\mu$ L otopine pufera PBS, a stanični talozi transfeciranih stanica skupljenih 30. dan u 2000  $\mu$ L otopine pufera PBS. Stanični talozi kontrolnih stanica *Mock* uvijek su resuspendirani u 1500  $\mu$ L otopine pufera PBS. Dio suspenzije stanica iskorišten je za izolaciju DNA, a dio za izolaciju RNA. U slučaju transfeciranih stanica skupljenih 8., 10., 13., 16. i 20. dan nakon transfekcije, za izolaciju DNA iskorišteno je 200  $\mu$ L suspenzije stanica, a za izolaciju RNA iskorišteno je 400  $\mu$ L suspenzije stanica. U slučaju transfeciranih stanica skupljenih 25. dan, za izolaciju DNA iskorišteno je 50  $\mu$ L suspenzije stanica, a za izolaciju RNA iskorišteno je 100  $\mu$ L suspenzije stanica. U slučaju transfeciranih stanica skupljenih 30. dan, za izolaciju DNA i RNA iskorišteno je po 500  $\mu$ L suspenzije stanica. U slučaju kontrolnih stanica *Mock* za izolaciju DNA uvijek je iskorišteno 100  $\mu$ L suspenzije stanica, a za izolaciju RNA 200  $\mu$ L suspenzije stanica. Eventualno preostali dio stanične suspenzije pohranjen je na -80 °C kao odgovarajuća rezerva. Stanične suspenzije ponovno su centrifugirane kroz 5 min na 500 g pri sobnoj temperaturi te je uklonjen supernatant. Tako dobiveni talozi stanica iskorišteni su za postupak izolacije DNA i RNA.

Izolacija DNA rađena je prema protokolu komercijalno dostupnog seta za izolaciju *DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)* uz odstupanja: 1) sva centrifugiranja  $\geq 8000$  rpm su izvedena na 10000 rpm; 2) za eluciju uzoraka 8., 10. i 13. dana korišteno je 50  $\mu\text{L}$  pufera AE uz ponovnu eluciju s tih istih 50  $\mu\text{L}$ , dok je za eluciju uzoraka 16., 20., 25. i 30. dana korišteno 100  $\mu\text{L}$  pufera AE. Izolacija RNA rađena je prema protokolu komercijalno dostupnog seta za izolaciju *RNeasy Micro Kit (Qiagen)* uz odstupanja: 1) korak homogenizacije te koraci koji podrazumijevaju korištenje DNaze I su preskočeni; 2) sva centrifugiranja  $\geq 8000$  g napravljena su na 10000 g, a sva centrifugiranja koja zahtijevaju punu brzinu napravljena su na 14000 g; 3) sva centrifugiranja trajala su 30 s; 4) za eluciju uzoraka 20. i 25. dana korišteno je 16  $\mu\text{L}$  vode bez RNaza, dok je za eluciju uzoraka 30. dana korišteno 20  $\mu\text{L}$  vode bez RNaza. Koncentracija i čistoća izolata DNA i RNA provjerena je spektrofotometrijski (*NanoDrop 8000; Thermo Scientific*) koristeći po 2  $\mu\text{L}$  odgovarajuće otopine.

### 3.4. Bisulfitna konverzija ukupne genomske DNA

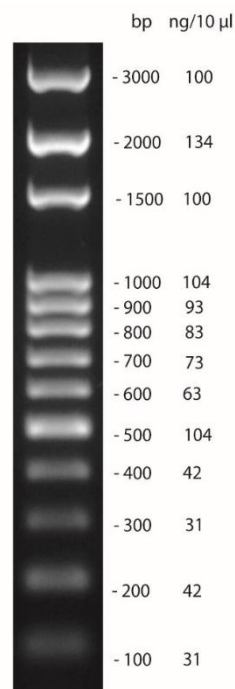
Izolirana ukupna genomska DNA podvrgnuta je bisulfitnoj konverziji pomoću komercijalno dostupnog seta za bisulfitnu konverziju *EZ DNA Methylation-Gold<sup>TM</sup> Kit (Zymo Research)*. Bisulfitna konverzija provedena je prema uputama proizvođača uz odstupanja: 1) po reakciji korišteno je 50 ng DNA; 2) volumen izolata DNA i vode iznosio je 40  $\mu\text{L}$ , stoga je za pripremu reagensa za konverziju (*CT Conversion Reagent*) korišteno 700  $\mu\text{L}$  vode; 3) u 40  $\mu\text{L}$  DNA i vode dodano je 110  $\mu\text{L}$  reagensa za konverziju (*CT Conversion Reagent*); 4) nakon koraka 8 u novoj Ependorf tubici napravljen je dodatan korak centrifugiranja na 11000 g kroz 2 min (sušenje kolone). Bisulfitna konverzija provedena je na izolatima DNA svih skupina stanica za sve vremenske točke skupljanja stanica. Kao negativna kontrola bisulfitne konverzije korištena je voda.

### 3.5. PCR koji prethodi pirosekvenciranju

Nakon bisulfitne konverzije genomske DNA potrebno je PCR-om umnožiti željenu regiju unutar koje se nalaze CpG mjesta od interesa. U slučaju analize metilacije 4 regulatorna CpG mjesta gena *HNF1A* bilo je potrebno umnožiti regiju veličine 67 pb koja je omeđena uzvodnom početnicom 5'-GGATAAGGGGAGTTTTG-3' i nizvodnom početnicom (\*)5'-CTCCCCCAACCCATTA AAA-3'. Nizvodna početnica na svom 5' kraju sadrži biotin (\*) važan za postupak pirosekvenciranja. PCR na bisulfitno konvertiranoj genomskoj DNA rađen je prema protokolu proizvođača komercijalno dostupnog seta za PCR *PyroMark PCR Kit*

(Qiagen). Reakcijska smjesa za jedan uzorak pripremljena je miješanjem 12,5  $\mu\text{L}$  otopine koja sadrži reagense potrebne za PCR (*PyroMark PCR Master Mix*, 2x), 2,5  $\mu\text{L}$  otopine boje (*CoralLoad Concentrate*, 10x), po 0,5  $\mu\text{L}$  otopine uzvodne i nizvodne početnice (10  $\mu\text{M}$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  otopine  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 2  $\mu\text{L}$  uzorka i 6,5  $\mu\text{L}$  vode bez RNaza. Umnažanje željene sekvence napravljeno je pomoću uređaja *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) uz iduće uvjete: 1 ciklus aktivacije DNA polimeraze *HotStarTaq* na 95 °C kroz 15 min; 50 ciklusa: denaturacija na 95 °C kroz 30 s, vezanje početnica na 55,4 °C kroz 30 s i elongacija na 72 °C kroz 30 s; 1 ciklus završne elongacije na 72 °C kroz 10 min i pohrana na 4 °C.

Kako bi se provjerila uspješnost umnažanja *HNFI A* DNA PCR-om napravljena je vodoravna gel elektroforeza u 1,5 %-tnom agaroznom gelu. Agarozni gel priređen je otapanjem agaroze (*Agarose BioReagent*; *Sigma-Aldrich*) u puferu TAE (sastav: 40 mM Tris, 20 mM octene kiseline i 1 mM EDTA). U prvu jažicu gela dodano je 4  $\mu\text{L}$  markera (*100 bp DNA Ladder Ready to Load*; *Solis BioDyne*) koji ima 13 fragmenata veličina prikazanih na Slici 3-3. U ostale jažice dodano je po 4  $\mu\text{L}$  uzorka (PCR produkt, negativna kontrola bisulfitne konverzije ili negativna kontrola PCR-a) te se gel vozio 30 min pri naponu od 100 V. Nakon elektroforeze gel je obojen u otopini boje (*GelRed*; *Biotium*), pruge na gelu su vizualizirane UV-transiluminatorom (*Clear View*; *Cleaver Scientific*) i fotografirane kamerom (*EOS 1300D*; *Canon*).



Slika 3-3: Fragmenti markera molekulskih masa. Marker *100 bp DNA Ladder Ready to Load* (*Solis BioDyne*) sadrži 13 DNA fragmenata veličina od 100 do 3000 pb. Slika preuzeta sa službenih stranica *Solis BioDyne* [144].

### 3.6. Pirosekvenciranje nakon bisulfitne konverzije

S ciljem analize stupnja metilacije 4 regulatorna CpG mjesta u genu *HNF1A* u stanicama I.1B4 nakon transfekcije, produkti prethodno opisanog PCR-a podvrgnuti su pirosekvenciranju. Principi na kojima se temelji pirosekvenciranje objašnjeni su na službenoj stranici proizvođača *Qiagen* [145]. Test za pirosekvenciranje prethodno je uspostavljen računalnim programom *PyroMark Q24 Advanced Software (Qiagen)* prema uputama proizvođača. Dotični test koristi sekvencu 5'-AAGGGGGAGTTT-3' kao početnicu za sekvenciranje. Ovim testom za pirosekvenciranje analizirana je sekvenca 5'-TGYGGYGGYGGTYGAGG-3' koja se nalazi na kodirajućem lancu gena *HNF1A*, a koja sadrži 4 CpG mjesta od interesa (prikazani kao YG). Postupak pirosekvenciranja odvijao se pomoću uređaja *PyroMark Q24 Advanced (Qiagen)* uz korištenje popratne vakuumske radne postaje *PyroMark Q24 Vacuum Workstation (Qiagen)* i reagensa iz seta *PyroMark Gold Q24 Reagents (Qiagen)*, a sama reakcija postavljena je prema uputama proizvođača. Prvi korak podrazumijeva vezanje i imobilizaciju PCR produkata na sefarozne kuglice obložene streptavidinom. Vezanje lanca koji će se sekvencirati na streptavidinom obložene kuglice bazira se na interakciji biotina na 5' kraju prethodno opisane nizvodne početnice i streptavidina na kuglicama. U tu svrhu pripremljena je reakcijska smjesa za imobilizaciju koja je po uzorku sadržavala 3  $\mu\text{L}$  otopine sefaroze (*Streptavidin Sefarose beads; GE Healthcare*), koja je prethodno dobro vorteksirana kako bi bila homogena, 37  $\mu\text{L}$  pufera za vezanje (*PyroMark Binding Buffer; Qiagen*), 20  $\mu\text{L}$  vode i 20  $\mu\text{L}$  odgovarajućeg uzorka. Kao negativna kontrola pirosekvenciranja korištena je voda. Tako pripremljena reakcijska smjesa inkubirana je kroz 10 min na tresilici na 14000 rpm. Drugi korak podrazumijeva vezanje početnica za sekvenciranje na imobilizirane PCR produkte. U tu svrhu pripremljena je smjesa za vezanje miješanjem 0,75  $\mu\text{L}$  početnice za sekvenciranje i 19,25  $\mu\text{L}$  pufera za vezanje (*PyroMark Annealing Buffer; Qiagen*) po uzorku. Nakon imobilizacije PCR produkata na sefaroznim kuglicama, sefarozne kuglice s imobiliziranim PCR produktom pročišćavane su redom kroz otopinu 70 %-tnog etanola, pufera za denaturaciju (*PyroMark Denaturation Solution; Qiagen*) i pufera za ispiranje (*PyroMark Wash Buffer; Qiagen*) da bi u konačnici bile ispuštene u 20  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljene smjese za vezanje početnica. Koraci pročišćavanja i ispuštanja sefaroznih kuglica s PCR produktom napravljeni su na vakuumskoj radnoj postaji. Pločica sa sefaroznim kuglicama s vezanim PCR produktom u smjesi za vezanje početnica inkubirana je u termobloku na 80°C kroz 3 min, nakon čega je postavljena u instrument za pirosekvenciranje. U spremnik uređaja dodane su odgovarajuće količine reagensa: 1) smjesa enzima koja sadrži DNA

polimerazu, ATP sulfurilazu, luciferazu i apirazu; 2) smjesa supstrata koja sadrži adenozin-5'-fosfosulfat (APS) i luciferin; 3) smjese deoksiribonukleotida koje odvojeno sadrže dTTP, dCTP, dGTP i dATP $\alpha$ S (deoksiadenozin  $\alpha$ -tio trifosfat). Metoda korištenog spremnika je 015. Tako napunjen spremnik postavljen je u uređaj i pokrenut je test za pirosekvenciranje.

Na prethodno opisan način analizirani su produkti PCR-a skupina stanica TET1, DED, *NT* i *Mock* za sve dane skupljanja stanica (8., 10., 13., 16., 20., 25. i 30. dan od transfekcije). Rezultati pirosekvenciranja predstavljaju postotak razine metilacije određenog CpG mjesta, a prikazani su u programu *PyroMark Q24 Advanced Software*. Dobiveni rezultati prebačeni su u program *Microsoft Excel* u kojem su priređeni grafički prikazi rezultata. S obzirom da je pri analizi stupnja metilacije za svaki uzorak pripremljena samo jedna tehnička replika, statistička obrada nije mogla biti napravljena zbog nedostatka podataka.

### 3.7. Reverzna transkripcija

Izolirana ukupna RNA pretvorena je u cDNA metodom reverzne transkripcije koristeći nasumične heksamere. Za reverznu transkripciju pripremljena je 1. reakcijska smjesa miješanjem 1  $\mu$ L otopine nasumičnih heksamera (*Random Hexamers*, 50  $\mu$ M; *Invitrogen*), 1  $\mu$ L smjese deoksiribonukleotida (*Deoxynucleotide Mix*, 10 mM; *Sigma Aldrich*) i volumena izolata RNA koji odgovara 1000 ng RNA ili je dodan čitav volumen izolata RNA u slučaju da je koncentracija RNA premala. Kao negativna kontrola reverzne transkripcije korištena je voda. Tako pripremljena 1. reakcijska smjesa dobro se vorteksira i potom inkubira na 65 °C kroz 5 min na termobloku (*Veriti 96-Well Thermal Cycler*; *Applied Biosystems*), a zatim na ledu na 4 °C kroz 5 min. U 1. reakcijsku smjesu zatim se dodaje 0,5  $\mu$ L otopine reverzne transkriptaze (*RTase Prime Script*; *TaKaRa*), 0,5  $\mu$ L otopine inhibitora RNaza (*RRI RNaseInhibitor*; *TaKaRa*), 4  $\mu$ L pufera za reverznu transkripciju (*5x PSRT Buffer*; *TaKaRa*) i 2  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. Konačna reakcijska smjesa se prvo dobro vorteksira, a zatim inkubira u termobloku: 1) na 30 °C kroz 10 min; 2) na 42 °C kroz 60 min; 3) na 70 °C kroz 15 min. Nakon inkubacije, cDNA pohranjena je na -20 °C.

### 3.8. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qPCR)

Kako bi se analizirala razina ekspresije gena *HNF1A* u stanicama 1.1B4 nakon transfekcije, cDNA sintetizirana reverznom transkripcijom analizirana je metodom kvantitativnog PCR-a (qPCR-a). Ova metoda omogućava kvantifikaciju umnažanja specifičnih molekula DNA prateći njihovo umnažanje PCR-om u stvarnom vremenu. Za analizu je korišten

uređaj 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), a reagensi korišteni za detekciju amplifikacije bile su probe *TaqMan* specifične za *HNF1A* (*TaqMan Gene Expression Assay Hs00167041\_m1*; Applied Biosystems) i *HMBS* (*TaqMan Gene Expression Assay Hs00609297\_m1*; Applied Biosystems), koji je korišten kao endogena kontrola. Ove probe obuhvaćaju granice egzona što omogućava specifično umnažanje cDNA. Na ovaj način isključuje se eventualna kontaminacija. Za pripremu reakcijske smjese za qPCR korištena je komercijalno dostupna smjesa koja sadrži sve što je potrebno za qPCR, osim probe i kalupa cDNA (*TaqMan Gene Expression Master Mix*; Applied Biosystems). Za svaki uzorak cDNA i za svaki analizirani gen pripremljena je odgovarajuća reakcijska smjesa za qPCR miješanjem 10  $\mu$ L prethodno opisane smjese, 1  $\mu$ L otopine odgovarajuće probe *TaqMan*, 5  $\mu$ L uzorka, iako ovaj volumen može biti manji ako je koncentracija cDNA veća, i vode do konačnog volumena od 20  $\mu$ L. Na ovaj način, razina ekspresije gena *HNF1A* u stanicama 1.1B4 analizirana je 8., 10., 13., 16., 20., 25. i 30. dan nakon transfekcije. Kao negativna kontrola qPCR-a korištena je voda, a svaka reakcija napravljena je u dvije tehničke replike. Pločica s reakcijskim smjesama (*MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate*; Applied Biosystems) prekrivena je prozirnrom folijom (*MicroAmp Optical Adhesive Film*; Applied Biosystems) i centrifugirana na sobnoj temperaturi kroz 3 min na 1500 rpm. Pločica je potom stavljena u uređaj te je pokrenut program postavljen pomoću programa 7500 Fast Real-Time PCR.

Rezultati dobiveni qPCR-om obrađeni su metodom relativne kvantifikacije  $\Delta\Delta C_t$  [146], gdje  $C_t$  (od engl. *cycle threshold*) predstavlja broj ciklusa koji je potreban da reakcija uđe u eksponencijalnu fazu, tj. da fluorescencijski signal premaši graničnu vrijednost pozadinskog signala. Kao referentni uzorak korištene su kontrolne stanice *Mock*. Vrijednosti  $C_t$ , koje bilježi sam uređaj, iskorištene su za izračun srednjih vrijednosti  $C_t$  i standardnih devijacija za gene *HNF1A* i *HMBS* u svim skupinama stanica (*TET1*, *DED*, *NT* i *Mock*). Srednje vrijednosti  $C_t$  za gen *HNF1A* zatim su normalizirane u odnosu na srednje vrijednosti  $C_t$  gena *HMBS* u svakoj skupini stanica čime su dobivene vrijednosti  $\Delta C_t$  za svaku skupinu stanica. Standardne devijacije vrijednosti  $C_t$  iskorištene su za izračun standardnih pogrešaka vrijednosti  $\Delta C_t$ . Vrijednosti  $\Delta C_t$  skupina stanica *TET1*, *DED* i *NT* normalizirane su na vrijednost  $\Delta C_t$  referentne skupine stanica *Mock* čime je dobivena vrijednost  $\Delta\Delta C_t$  za skupinu stanica *TET1*, *DED*, odnosno *NT*. Standardne pogreške preračunate su u maksimum  $\Delta\Delta C_t$ , dodavanjem vrijednosti standardne pogreške na vrijednost  $\Delta\Delta C_t$ , odnosno minimum  $\Delta\Delta C_t$ , oduzimanjem vrijednosti standardne pogreške od vrijednosti  $\Delta\Delta C_t$ . Na temelju vrijednosti  $\Delta\Delta C_t$  izračunat je faktor promjene ekspresije gena (FC, od engl. *fold change*) koji uspoređuje razinu ekspresije analiziranog gena, u ovom slučaju gen *HNF1A*, u određenoj skupini stanica s razinom

ekspresije dotičnog gena u referentnoj skupini stanica, u ovom slučaju skupina stanica *Mock*. Vrijednosti maksimum i minimum  $\Delta\Delta C_t$  preračunate su u minimum FC, odnosno maksimum te prikazane kao negativna, odnosno pozitivna grješka od FC. Kao što je prethodno spomenuto, zbog malog broja stanica sve biološke replike su spojene stoga je na rezultate bilo moguće primijeniti samo deskriptivnu statistiku. Obrada podataka i popratni grafikoni napravljeni su u programu *Microsoft Excel*.

## 4. REZULTATI

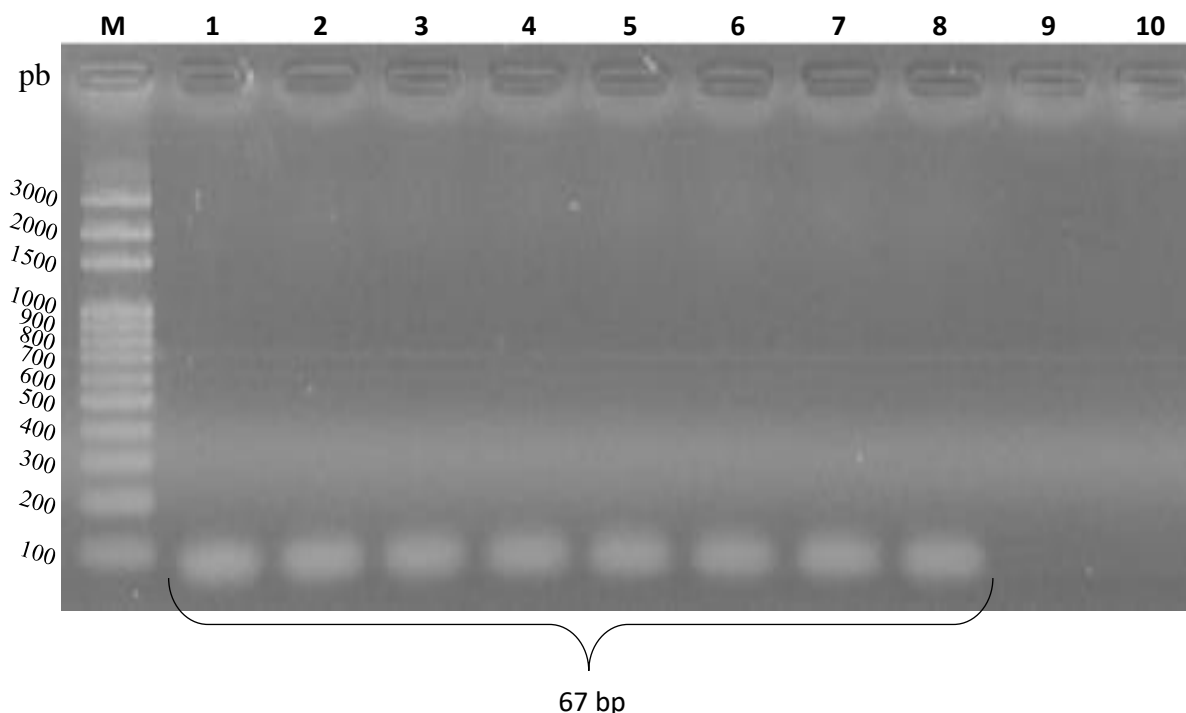
### 4.1. Transfekcija i selekcija stanica 1.1B4

Stanice 1.1B4 transfecirane su: 1) plazmidom koji kodira za fuzijski protein TET1-dCas9 u kojem je katalitička domena funkcionalna i molekulu sgRNA koja ga navodi na ciljnu sekvencu; 2) plazmidom koji kodira za fuzijski protein TET1-dCas9 u kojem je katalitička domena inaktivna i molekulu sgRNA koja ga navodi na ciljnu sekvencu (TET1-dCas9-DED); 3) plazmidom koji kodira za funkcionalan fuzijski protein TET1-dCas9 i molekulu sgRNA koja nema komplementarnu sekvencu u genomu čovjeka (kontrola *Non-target*); te 4) transfekcijskim reagensom bez plazmida (kontrola *Mock*). Dvadeset i četiri sata nakon transfekcije, efikasnost transfekcije provjerena je pod epifluorescencijskim mikroskopom te je napravljena selekcija transfeciranih stanica pomoću antibiotika puromicina. Stanice koje nisu primile plazmid tijekom transfekcije nisu rezistentne na puromicin te su uslijed selekcije umrle. Umrle stanice odlijepile su se od podloge te su tijekom izmjene medija uklonjene. Stanice koje su primile plazmid tijekom transfekcije rezistentne su na puromicin te su preživjele proces selekcije i ostale su zalijepljene za podlogu. Tako selektirane, preživjele stanice korištene su u ostatku eksperimenta. Ukupna genomska DNA i ukupna RNA uspješno su izolirane iz skupljenih stanica.

### 4.2. Agarozna gel elektroforeza PCR produkata

Kako bi se provjerila uspješnost reakcije PCR koja prethodi pirosekvenciranju, napravljena je agarozna gel elektroforeza uzoraka reakcije PCR. Primjer vizualiziranog gela nakon elektroforeze prikazan je na Slici 4-1. Rezultati ukazuju na uspješno i specifično umnažanje željenog produkta reakcije PCR.



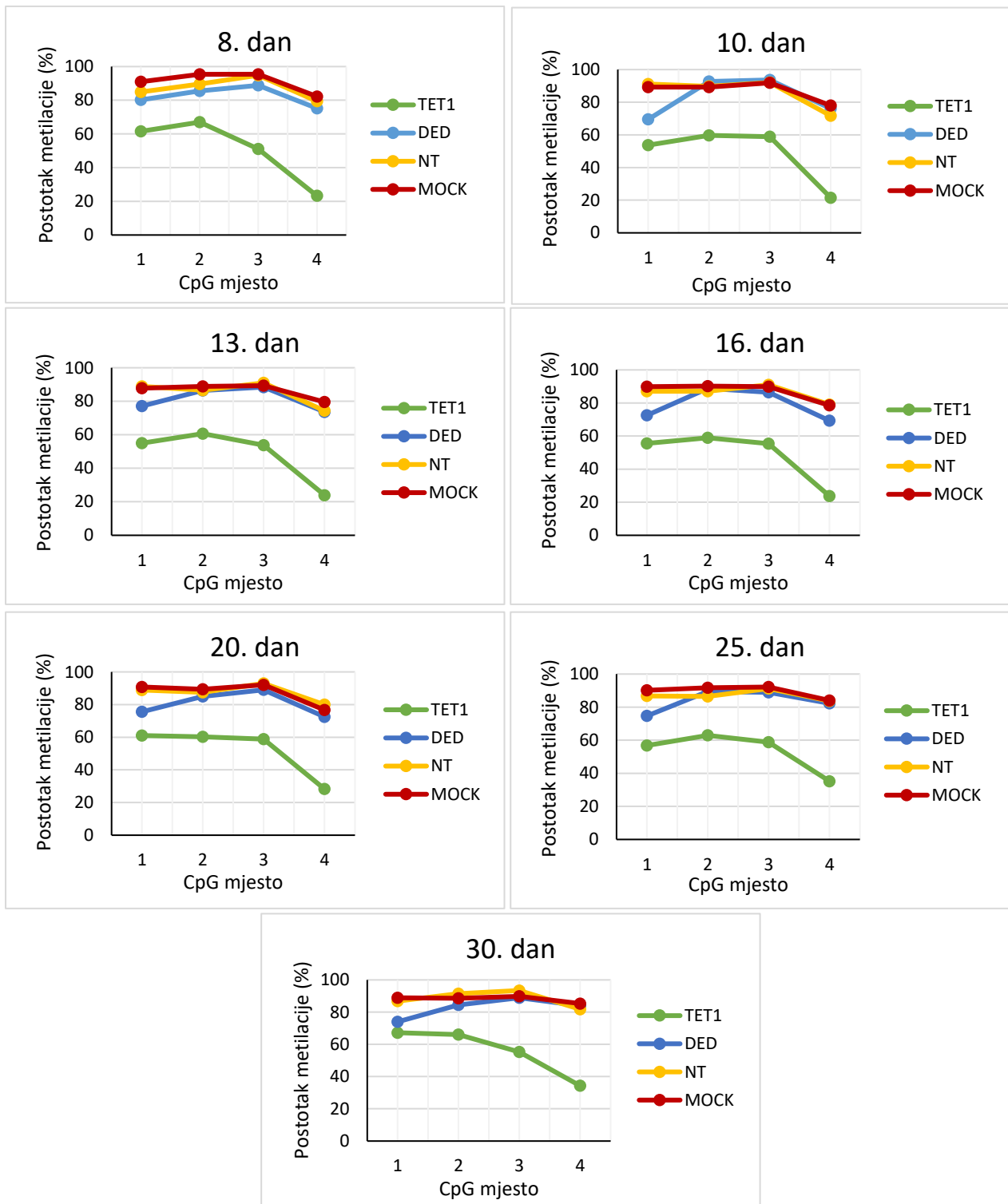


Slika 4-1: Agarozna gel elektroforeza produkata reakcije PCR koja prethodi pirosekvenciranju. Primjer vizualiziranog gela nakon elektroforeze. Linije u jažicama 1-8 veličinom odgovaraju željenom PCR produktu (67 pb), dok signal izostaje u linijama 9 (negativna kontrola bisulfitne konverzije) i 10 (negativna kontrola reakcije PCR). Rezultati ukazuju na uspješno i specifično umnažanje željenog produkta reakcije PCR. Oznake: M – marker molekulskih masa (*100 bp DNA Ladder Ready to Load*; Solis Biodyne), 1 – uzorak stanica TET1 10. dana, 2 – uzorak stanica DED 10. dana, 3 – uzorak stanica NT 10. dana, 4 – uzorak stanica *Mock* 10. dana, 5 – uzorak stanica TET1 13. dana, 6 – uzorak stanica DED 13. dana, 7 – uzorak stanica NT 13. dana, 8 – uzorak stanica *Mock* 13. dana, 9 – negativna kontrola bisulfitne konverzije, 10 – negativna kontrola reakcije PCR.

#### 4.3. Stupanj metilacije 4 CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A* nakon manipulacije fuzijskim proteinom TET1-dCas9

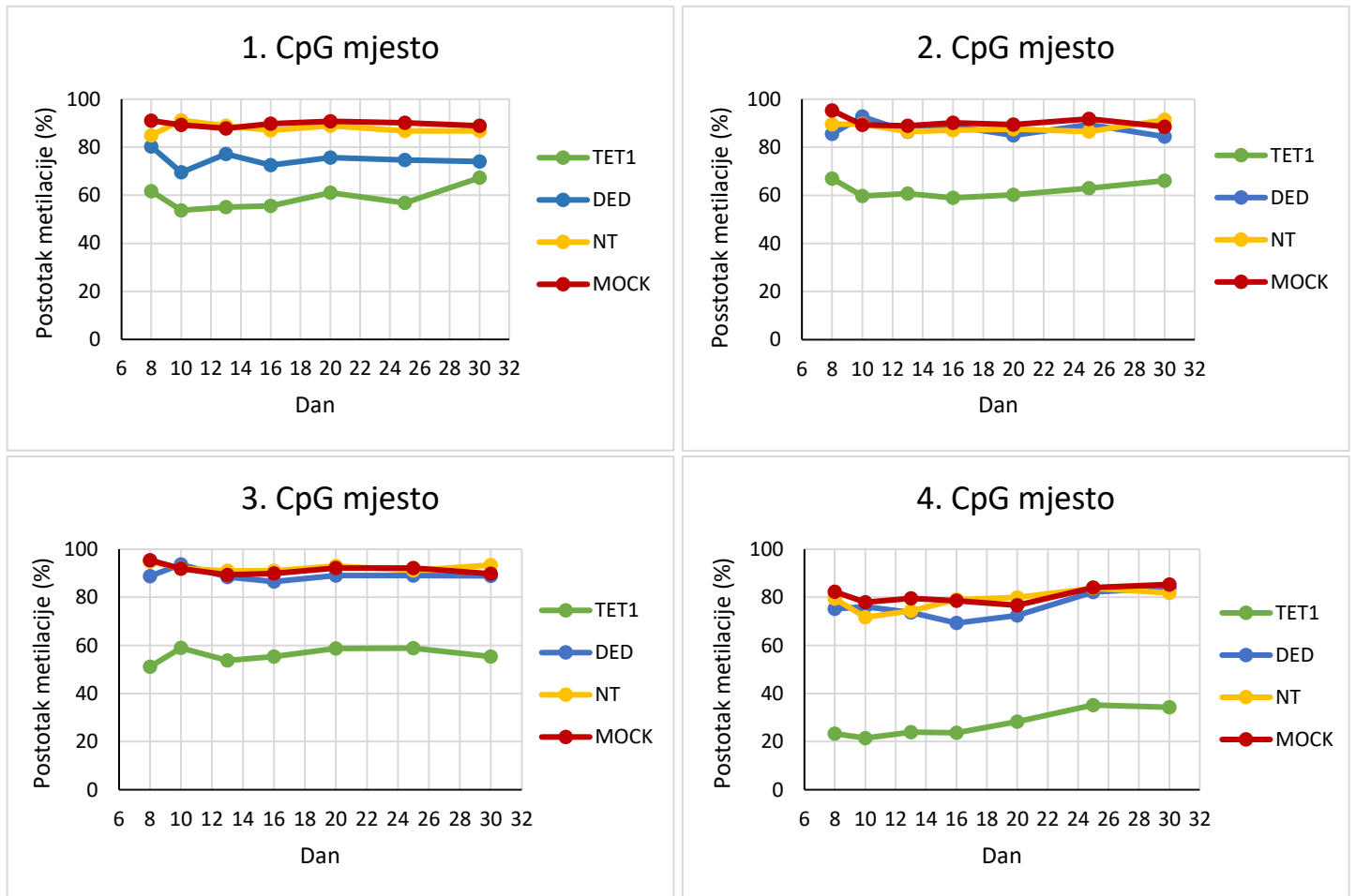
Stupanj metilacije na ciljna 4 CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A* analiziran je pirosekvenciranjem 8., 10., 13., 16., 20., 25. i 30. dan nakon transfekcije. U stanicama transfeciranim funkcionalnim fuzijskim proteinom TET1-dCas9 (stanice TET1) došlo je do pada stupnja metilacije na sva 4 CpG mjesta naspram kontrolnih stanica *Mock* te je stupanj metilacije ostao snižen kroz 30 dana. U stanicama koje su transfecirane konstruktom TET1-dCas9-DED, stupanj metilacije je u većini slučajeva identičan stupnju metilacije na ista 4 CpG mjesta u kontrolnim stanicama *Mock*. Iznimka je 1. CpG mjesto na kojem je kroz sve dane trajanja eksperimenta stupanj metilacije u stanicama DED bio niži u odnosu na kontrolne stanice *Mock*. Nije bilo razlike u stupnju metilacije na analizirana 4 CpG mjesta između stanica

koje su transfecirane kontrolnim plazmidom *NT* i kontrolnih stanica *Mock*. Rezultati stupnja metilacije kroz vrijeme prikazani su na Slici 4-2.



Slika 4-2: Stupanj metilacije 4 CpG mjesta gena *HNF1A* u stanicama TET1, DED, *NT* i *Mock* 8., 10., 13., 16., 20., 25. i 30. dan nakon transfekcije. Stupanj metilacije prikazan je kao postotak od maksimalne moguće metilacije.

Stupanj metilacije na pojedinom CpG mjestu prikazan je na Slici 4-3. Iz ovog prikaza jasnije se vide razlike u promjeni stupnja metilacije naspram kontrolnih stanica *Mock*. Stanice TET1 pokazuju smanjenje stupnja metilacije naspram kontrolnih stanica *Mock* na sva 4 CpG mjesta, a najveće smanjenje prisutno je na 4. CpG mjestu. Stanice DED imaju smanjen stupanj metilacije naspram kontrolnih stanica *Mock* samo na 1. CpG mjestu. Stupanj metilacije stanica *NT* vrlo je sličan stupnju metilacije u kontrolnim stanicama *Mock*.

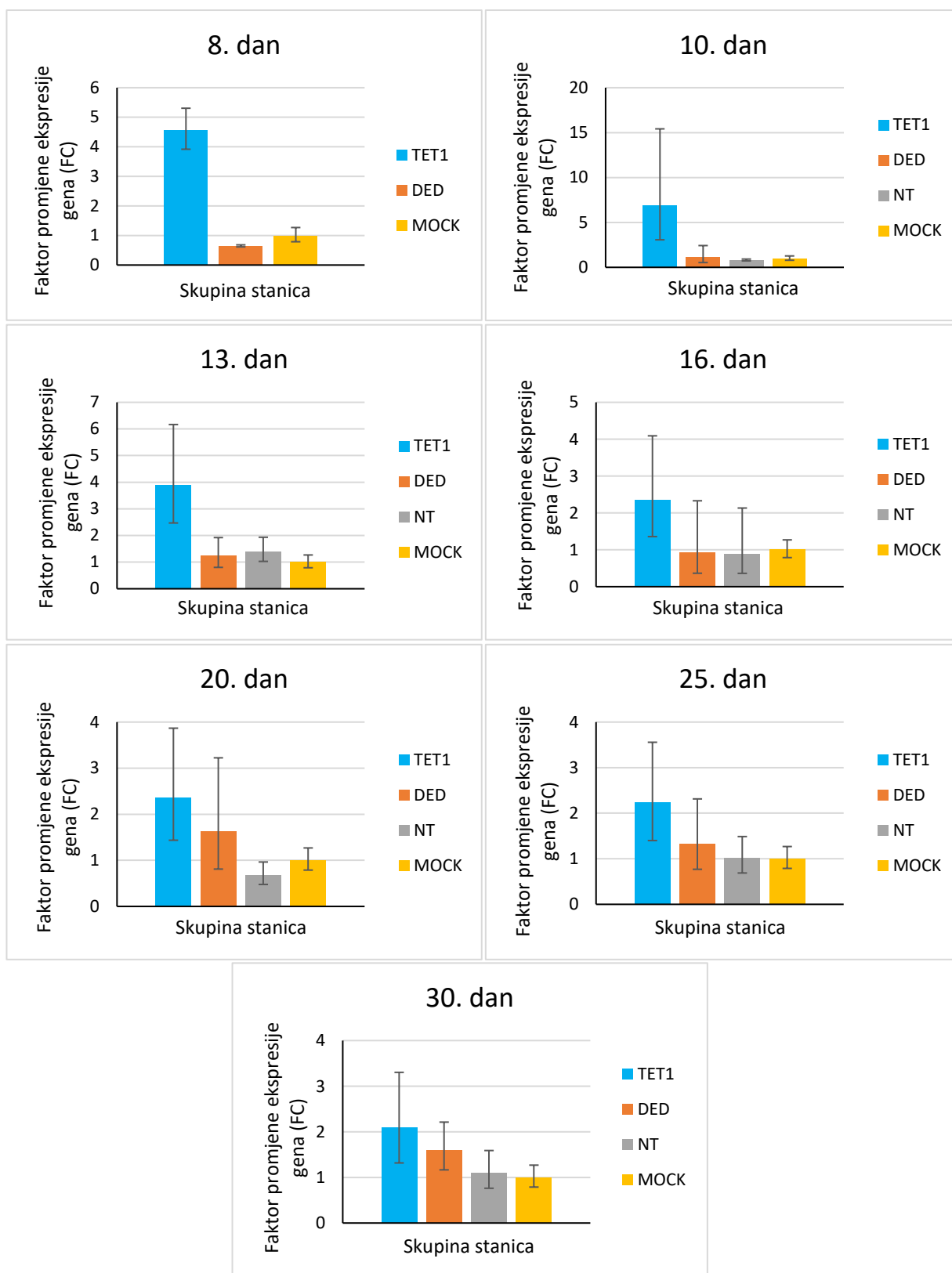


Slika 4-3: Stupanj metilacije pojedinog CpG mjesta gena *HNFI A* u stanicama TET1, DED, *NT* i *Mock* 8., 10., 13., 16., 20., 25. i 30. dan nakon transfekcije. Stupanj metilacije prikazan je kao postotak od maksimalne moguće metilacije.

#### 4.4. Razina transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* nakon epigenetičke manipulacije fuzijskim proteinom TET1-dCas9

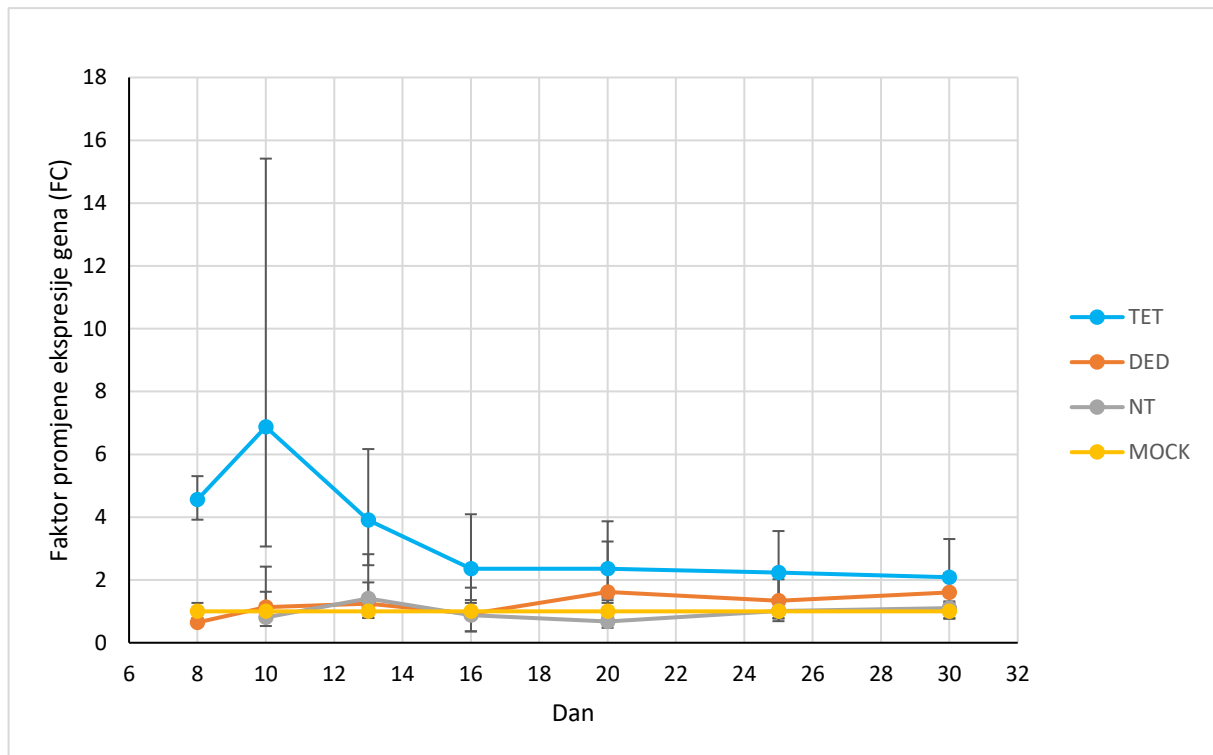
Razina ekspresije gena *HNF1A* praćena je na razini transkripcije upotrebom metode RT-qPCR i probi *TaqMan* i to 8., 10., 13., 16., 20., 25. i 30. dan nakon transfekcije stanica 1.1B4. U stanicama 1.1B4 razina transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* bila je niska što je predstavljalo metodološki problem. Ukoliko je bilo dovoljno stanica, reakcija qPCR je ponovljena, a u slučaju kada to nije bilo moguće za vrijednost  $C_t$  uzeta je maksimalna vrijednost broja ciklusa qPCR-a (40). Također, niska razina ekspresije gena *HNF1A* bila je uzrok velikih razlika u vrijednosti  $C_t$  između tehničkih replika zbog čega su prisutne velike standardne devijacije. Zbog ogromne standardne devijacije izbaćena je vrijednost razine ekspresije gena *HNF1A* u slučaju stanica *NT* 8. dana nakon transfekcije.

U stanicama u kojima je promijenjen stupanj metilacije na 4 ciljane CpG mjesta pomoću konstrukta TET1-dCas9 izmjereno je povećanje razine transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* u praćenom vremenskom periodu. U stanicama *DED* 8. dana nakon transfekcije došlo je do smanjenja razine transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* naspram kontrolnih stanica *Mock*, dok je kroz ostale dane razina transkripcijske aktivnosti bila vrlo slična onoj u kontrolnim stanicama *Mock*. U stanicama *NT* razina transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* vrlo je slična onoj u kontrolnim stanicama *Mock* kroz sve dane eksperimenta. Rezultati qPCR-a prikazani su po danima na Slici 4-4.



Slika 4-4: Razina transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* u stanicama TET1, DED, NT i Mock 8., 10., 13., 16., 20., 25. i 30. dan nakon transfekcije. Razina transkripcijske aktivnosti prikazana je kao faktor promjene ekspresije gena (FC, od engl. *fold change*).

Slika 4-5 prikazuje sumarno promjene razine transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* kroz sve dane eksperimenta.



Slika 4-5: Razine transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* u stanicama TET1, DED, NT i Mock 8., 10., 13., 16., 20., 25. i 30. dan nakon transfekcije. Razina transkripcijske aktivnosti prikazana je kao faktor promjene ekspresije gena (FC, od engl. *fold change*).

## 5. RASPRAVA

Primjena sustava CRISPR/Cas9 svojom jednostavnošću i svestranošću revolucionirala je proces modifikacije genoma. Uvođenjem mutacija u katalitičke domene proteina Cas9 (HNH i RuvC) deaktivirana mu je endonukleazna aktivnost čime je stvoren protein dCas9 [133]. Ovaj protein zadržao je sposobnost vezanja na molekulu DNA, a fuzijom proteina dCas9 i efektorskih proteina/katalitičkih domena omogućeno je njihovo ciljano vezanje na regije u genomu. Fuzijom proteina dCas9 s transkripcijskim regulatorima, kromatin-modificirajućim efektorima te funkcionalnim domenama za modifikaciju molekule DNA i histona omogućena je jednostavna manipulacija epigenomom. Kao što je originalni sustav CRISPR/Cas9 revolucionirao modifikaciju i istraživanje genoma, tako je sustav CRISPR/dCas9 sa mnoštvom svojih izvedenica revolucionirao modifikaciju i istraživanje epigenoma.

Gen *HNF1A* kodira za transkripcijski faktor HNF1 $\alpha$  eksprimiran u većini organa probavnog sustava i bubrezima [25]. HNF1 $\alpha$  kao transkripcijski faktor ima tkivno specifičnu ulogu u regulaciji ekspresije velikog broja različitih gena koji su uključeni u metaboličke procese, procese apsorpcije i reapsorpcije tvari, procese akutne faze upale, procese tumorigeneze i procese glikozilacije proteina. Upravo uključenost transkripcijskog faktora HNF1 $\alpha$  u regulaciji metabolizma i procesa glikozilacije proteina u  $\beta$  stanicama gušterače povezuje ga s dijabetesom tipa MODY3. Naime, mutacije u genu *HNF1A* uzrokuju poremećaj u ispuštanju inzulina kao odgovor  $\beta$  stanica na glukozu, a time i dijabetes tip MODY3. Istraživanja na glodavcima i ograničena istraživanja na ljudima ukazuju na poremećaj ekspresije glukoznih transportera i glikoziltransferaza koje su odgovorne za uspostavu pravilnog uzorka glikozilacije glukoznih transportera uslijed disfunkcije gena *HNF1A* [48].

Cilj ovog istraživanja bio je analizirati stupanj metilacije 4 CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A* u stanicama 1.1B4 nakon ciljanja molekularnim alatom TET1-dCas9. Također, cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj ciljane demetilacije ista 4 CpG mjesta na ekspresiju gena *HNF1A* u stanicama 1.1B4. Stupanj CpG metilacije i razina transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* praćeni su kroz 7 vremenskih točaka – 8., 10., 13., 16., 20., 25. i 30. dana nakon transfekcije stanica. Zoldoš i sur. [100] pokazali su kako je stupanj metilacije 4 CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A* obrnuto proporcionalan razini njegove ekspresije u 7 staničnih linija, zbog čega je pretpostavljeno da bi ova 4 CpG mjesta mogla imati ulogu u regulaciji transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A*. Naime, pokazalo se da stanice koje imaju visok stupanj metilacije ova 4 CpG mjesta imaju nisku razinu ekspresije gena *HNF1A* (stanice HeLa, MCF7, TE1, TE1 1 i TE1 3), dok stanice koje imaju nizak stupanj metilacije imaju visoku razinu

ekspresije (stanice Huh7 i HepG2). Na temelju svojih rezultata, i činjenice da je razina ekspresije gena *HNF1A* smanjenja u ljudi i miševa oboljelih od dijabetesa [48], Zoldoš i sur. [100] predložili su kako bi epigenetičko utišavanje gena *HNF1A* metilacijom mogao biti jedan od mehanizama koji dovodi do smanjenja ekspresije gena *HNF1A* u  $\beta$  stanicama gušterače te predstavljati jedan od mehanizama nastanka dijabetesa tipa MODY3. Pretpostavku o regulatornoj ulozi 4 CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A* potvrdili su Josipović i sur. [101]. Oni su ciljanjem molekularnog alata TET1-dCas9 na ova 4 CpG mjesta u stanicama HEK293 i BG1 postigli smanjenje stupnja metilacije što je rezultiralo povećanjem razine transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A*.

U provedenom istraživanju 4 analizirana CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A* pokazuju smanjenje stupnja metilacije u skupini stanica TET1 kroz sve dane eksperimenta. Najveća promjena stupnja metilacije u stanicama TET1 naspram kontrolnih stanica *Mock* zapažena je na 4. CpG mjestu te je iznosila prosječno 55 %. Promjene stupnja metilacije na 1., 2. i 3. CpG mjestu u stanicama TET1 bile su manje i iznosile su prosječno između 25 i 35 %. Slični rezultati u stanicama HEK293 postignuti su prethodnim istraživanjem u kojem su za navođenje fuzijskog proteina TET1-dCas9 na 4 regulatorna CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A* korištene dvije molekule sgRNA – molekula sgRNA koja je korištena u ovom istraživanju (sgRNA03) i molekula sgRNA koja se veže nizvodno od 4 CpG mjesta te je udaljena 37 pb od 4. CpG mjesta (sgRNA04) [101]. Promjene stupnja metilacije u stanicama HEK293 transfeciranim aktivnim fuzijskim proteinom TET1-dCas9 koje su opisane u tom istraživanju 8. dana nakon transfekcije iznosile su 27 %, 32 %, 49 % i 65 % za 1., 2., 3., odnosno 4. CpG mjesto u odnosu na kontrolne stanice *Mock*. Nešto niži rezultati promjene stupnja metilacije u ovom istraživanju mogli bi se objasniti korištenjem samo jedne molekule sgRNA za navođenje fuzijskog proteina na ciljnu sekvencu. Sam profil aktivnosti korištenog molekularnog alata TET1-dCas9 mogao bi pružiti objašnjenje rezultata koji pokazuju najveću promjenu stupnja metilacije na 4. CpG mjestu. Naime, Josipović i sur. [101] pokazali su da je maksimum aktivnosti molekularnog alata TET1-dCas9 oko 30 pb nizvodno od mjesta vezanja molekule sgRNA uz dodatnu aktivnost 180-200 pb uzvodno i nizvodno od mjesta vezanja molekule sgRNA, što oni objašnjavaju potencijalnim interakcijama fuzijskog proteina TET1-dCas9 i susjednih nukleosoma. U ovom istraživanju korištena je molekula sgRNA koja navodi fuzijski protein TET1-dCas9 na udaljenost samo 4 pb od 1. CpG mjesta, dok je 4. CpG mjesto udaljeno 15 pb od mjesta vezanja alata (gledano od kraja PAM sekvence). Stoga bi manja udaljenost 4. CpG mjesta od optimalne udaljenosti pri kojoj molekularni alat TET1-dCas9 ima najveću efikasnost mogla biti razlog za veću promjenu stupnja metilacije 4. CpG mjesta naspram ostalih CpG mjesta. Promjene stupnja metilacije 4



analizirana CpG mjesta u stanicama DED su kroz sve dane eksperimenta vrlo male naspram kontrolnih stanica *Mock*. Izuzetak je 1. CpG mjesto gdje je kroz sve dane eksperimenta primijećen pad stupnja metilacije od oko 25 %. Ova pojava mogla bi se objasniti steričkim smetnjama koje izaziva vezanje fuzijskog proteina TET1-dCas9. Kao što je prethodno spomenuto, 1. CpG mjesto vrlo je blizu mjestu vezanja samog fuzijskog proteina što bi moglo onemogućiti pristup endogenim enzimima za održavanje metilacije molekule DNA. Nemogućnost vezanja enzima kao što je metiltransferaza DNMT1 tijekom replikacije onemogućilo bi održavanje uzorka metilacije što bi dovelo do pada stupnja metilacije. Vrijednosti stupnja metilacije u stanicama *NT* vrlo su slične onima u kontrolnim stanicama *Mock*. Prosječna vrijednost stupnja metilacije sva 4 CpG mjesta u stanicama TET1 je nakon prvotnog sniženja porasla za otprilike 5 % od 16. dana od transfekcije do kraja eksperimenta, dok su prosječne vrijednosti stupnja metilacije sva 4 CpG mjesta u stanicama DED i *NT* te kontrolnim stanicama *Mock* ostale nepromijenjeno snižene kroz čitav eksperiment. Uspješna primjena fuzijskog proteina dCas9-TET1 već je pokazana u stanicama HEK293-FT i SH-SY5Y u kojima je demetiliran promotor gena *RANKL*, u stanicama HeLa u kojima je demetiliran promotor gena *MAGEB2* te u stanicama HEK293-FT u kojima je demetiliran promotor gena *MMP2* [147]. Morita i sur. [142] postigli su značajnu demetilaciju u promotoru gena *Gfap* koristeći ovaj molekularni alat u diferencijalno metiliranoj regiji utisnutog gena *H19* u mišjim embrionalnim matičnim stanicama. Liu i sur. [139] demetilirali su promotor gena *FMRI* u induciranim pluripotentnim matičnim stanicama dobivenim iz pacijenata sa sindromom fragilnog X kromosoma te su na miševima pokazali revertirani fenotip u divlji. Choudhury i sur. [141] postigli su značajnu demetilaciju u promotoru tumor supresor gena *BRCA1* u stanicama HeLa i MCF-7 uz pomoć dCa9-TET1.

Razina transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* u ovom radu analizirana je metodom qPCR pri čemu su korištene probe *TaqMan* za specifičnu detekciju amplifikacije. Dobiveni rezultati upućuju na povećanje razine transkripcije gena *HNF1A* u stanicama koje su epigenetički manipulirane alatom TET1-dCas9 kroz praćeni vremenski period. U stanicama TET1 razina ekspresije gena *HNF1A* rasla je do 10. dana nakon transfekcije kada je poprimila maksimalnu vrijednost koja je bila 6,9 puta veća od vrijednosti u kontrolnim stanicama *Mock*. Nakon 10. dana od transfekcije, razina ekspresije gena *HNF1A* pada na vrijednost oko 2 puta veću od vrijednosti u kontrolnim stanicama *Mock* te se ova razina ekspresije održala do kraja eksperimenta. Slični rezultati dobiveni su na stanicama HEK293 transfeciranim aktivnim fuzijskim proteinom TET1-dCas9 u kojima je utvrđeno kako je razina ekspresije gena *HNF1A* 8. dana nakon transfekcije bila 5,6 puta veća naspram ekspresije u kontrolnim stanicama *Mock*

[101]. U ovom eksperimentu razina ekspresije gena *HNF1A* prati razinu metilacije 4 CpG mjesta u njegovom 1. egzonu. Razine ekspresije imaju veću vrijednost 8., 10. i 13. dan nakon transfekcije, kada je stupanj metilacije bio niži, da bi od 16. dana od transfekcije pa do kraja eksperimenta došlo do porasta stupnja metilacije što je rezultiralo smanjenjem razine ekspresije gena *HNF1A*. Slični rezultati dobiveni su na HEK293 stanicama transfeciranim aktivnim fuzijskim proteinom TET1-dCas9 u kojima je povećanje ekspresije gena *HNF1A* povezano s padom stupnja metilacije na 4 prethodno spomenuta CpG mjesta [101]. Ovaj eksperiment pokazao je kako primjena molekularnog alata TET1-dCas9 u stanicama 1.1B4, koje služe kao model za istraživanje  $\beta$  stanica gušterače, može dugotrajno promijeniti stupanj metilacije 4 regulatorna CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A*, a time i razinu ekspresije gena *HNF1A*. Kako je promjena metilacije citozina postojana kroz vrijeme od barem 20 dana, bilo bi zanimljivo istražiti koji se epigenetički slojevi mijenjaju u regiji koja je ciljana alatom TET1-dCas9.

Iako ovo istraživanje pokazuje kako su razina ekspresije gena *HNF1A* i razina metilacije njegova 4 regulatorna CpG mjesta obrnuto proporcionalne, treba imati na umu kako su biološke replike stanica spajane zbog malog broja stanica zbog čega nedostaje pravilna statistička obrada podataka. Ovo je pogotovo izraženo pri analizi stupnja metilacije gdje nisu korištene tehničke replike. Stoga, prije donošenja ikakvih konačnih zaključaka, eksperiment bi trebalo ponoviti uz povećanje broja bioloških i tehničkih replika. S obzirom da su analizirana samo 4 CpG mjesta, bilo bi korisno proširiti analizu na okolna CpG mjesta koja bi mogla imati utjecaj na ekspresiju. Također, kako bi se eliminirao eventualni nespecifični efekt djelovanja alata TET1-dCas9 (engl. *off-target* efekt), bilo bi korisno analizirati stupanj metilacije sekvenci u ostatku genoma koje su slične onoj na koju se veže korištena molekula sgRNA, ali i elemenata LINE-1 kako bi se utvrdio eventualni utjecaj na razinu globalne metilacije genoma. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju na potencijal korištenja molekularnog alata TET1-dCas9 u svrhu istraživanja povezanosti epigenetičkog utišavanja gena *HNF1A* u  $\beta$  stanicama gušterače i fenotipa poremećenog GSIS-a, što u konačnici dovodi do dijabetesa.

## 6. ZAKLJUČAK

- Stanice 1.1B4 uspješno su transfecirane plazmidnim konstruktom N-TET1\_SaCas9\_Puro\_Clover\_sekundarna kazeta+HNF1a\_sg03 za ciljanu demetilaciju gena *HNF1A*.
- Ciljanje fuzijskog proteina TET1-dCas9 na ciljnu sekvencu u 1. egzonu gena *HNF1A* upotrebom jedne molekule sgRNA dovelo je do smanjenja stupnja metilacije na sva 4 CpG mjesta.
- Smanjenje stupnja metilacije na 4 CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A* pomoću fuzijskog proteina TET1-dCas9 održava se kroz vrijeme od 30 dana nakon transfekcije.
- Epigenetička manipulacija 4 CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A* pomoću fuzijskog proteina TET1-dCas9 posljedično je promijenila transkripcijsku aktivnost gena *HNF1A*.
- Povećanje razine transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* zadržava se do 30. dana nakon transfekcije stanica 1.1B4.
- Ciljana demetilacija 4 CpG mjesta u 1. egzonu gena *HNF1A* fuzijskim proteinom TET1-dCas9 dovela je do povećanja transkripcijske aktivnosti gena *HNF1A* što ukazuje na regulatornu ulogu ova 4 CpG mjesta.

## 7. REFERENCE

1. HNF1A HNF1 homeobox A [*Homo sapiens* (human)] - Gene - NCBI. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6927>. (Accessed: 27th January 2020)
2. Bach I., Galcheva-Gargova Z., Mattei M.G., Simon-Chazottes D., Guénet J.L., Cereghini S., *et al.* Cloning of human hepatic nuclear factor 1 (HNF1) and chromosomal localization of its gene in man and mouse. *Genomics* **8**, 155–164 (1990).
3. Scherer S.E., Muzny D.M., Buhay C.J., Chen R., Cree A., Ding Y., *et al.* The finished DNA sequence of human chromosome 12. *Nature* **440**, 346–351 (2006).
4. Szpirer J., Pedoutour F., Kesti T., Riviere M., Syväoja J.E., Turc-Carel C., *et al.* Localization of the gene for DNA polymerase epsilon (POLE) to human chromosome 12q24.3 and rat chromosome 12 by somatic cell hybrid panels and fluorescence in situ hybridization. *Genomics* **20**, 223–226 (1994).
5. O’Leary N.A., Wright M.W., Brister J.R., Ciufo S., Haddad D., McVeigh R., *et al.* Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* **44**, D733–D745 (2016).
6. Genome Decoration Page. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp>. (Accessed: 27th January 2020)
7. Harries L.W., Ellard S., Stride A., Morgan N.G., Hattersley A.T., Vaxillaire M., *et al.* Isomers of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2216–2224 (2006).
8. Rose R.B., Endrizzi J.A., Cronk J.D., Holton J., Alber T. High-resolution structure of the HNF-1alpha dimerization domain. *Biochemistry* **39**, 15062–15070 (2000).
9. Narayana N., Hua Q., Weiss M.A. The dimerization domain of HNF-1alpha: structure and plasticity of an intertwined four-helix bundle with application to diabetes mellitus. *J. Mol. Biol.* **310**, 635–658 (2001).
10. De Simone V., De Magistris L., Lazzaro D., Gerstner J., Monaci P., Nicosia A., *et al.* LFB3, a heterodimer-forming homeoprotein of the LFB1 family, is expressed in

- specialized epithelia. *EMBO J.* **10**, 1435–1443 (1991).
11. Rey-Campos J., Chouard T., Yaniv M., Cereghini S. vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *EMBO J.* **10**, 1445–1457 (1991).
  12. Rose R.B., Bayle J.H., Endrizzi J.A., Cronk J.D., Crabtree G.R., Alber T. Structural basis of dimerization, coactivator recognition and MODY3 mutations in HNF-1alpha. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 744–748 (2000).
  13. Chi Y.-I., Frantz J.D., Oh B.-C., Hansen L., Dhe-Paganon S., Shoelson S.E. Diabetes mutations delineate an atypical POU domain in HNF-1alpha. *Mol. Cell* **10**, 1129–1137 (2002).
  14. Vaxillaire M., Abderrahmani A., Boutin P., Bailleul B., Froguel P., Yaniv M., *et al.* Anatomy of a homeoprotein revealed by the analysis of human MODY3 mutations. *J. Biol. Chem.* **274**, 35639–35646 (1999).
  15. Ryffel G.U. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J. Mol. Endocrinol.* **27**, 11–29 (2001).
  16. Cleary M.A., Pendergrast P.S., Herr W. Structural flexibility in transcription complex formation revealed by protein-DNA photocrosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8450–8455 (1997).
  17. Rose A.S., Bradley A.R., Valasatava Y., Duarte J.M., Prlić A., Rose P.W. NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics* **34**, 3755–3758 (2018).
  18. Baumhueter S., Mendel D.B., Conley P.B., Kuo C.J., Turk C., Graves M.K., *et al.* HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF. *Genes Dev.* **4**, 372–379 (1990).
  19. Mendel D.B., Crabtree G.R. HNF-1, a member of a novel class of dimerizing homeodomain proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 677–680 (1991).
  20. Soutoglou E., Papafotiou G., Katrakili N., Talianidis I. Transcriptional activation by hepatocyte nuclear factor-1 requires synergism between multiple coactivator proteins.

- J. Biol. Chem.* **275**, 12515–12520 (2000).
21. Valkovicova T., Skopkova M., Stanik J., Gasperikova D. Novel insights into genetics and clinics of the HNF1A-MODY. *Endocr. Regul.* **53**, 110–134 (2019).
  22. Bjørkhaug L., Sagen J. V, Thorsby P., Søvik O., Molven A., Njølstad P.R. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene mutations and diabetes in Norway. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 920–931 (2003).
  23. Bellanne C., ' -Chantelot 1, Claire Carette 2, Jean-Pierre Riveline 3, Rene ' Vale 'ro 4, Jean-Franc, *et al.* The Type and the Position of HNF1A Mutation Modulate. *Diabetes* **57**, 503–508 (2008).
  24. Balamurugan K., Bjørkhaug L., Mahajan S., Kanthimathi S., Njølstad P.R., Srinivasan N., *et al.* Structure–function studies of HNF1A (MODY3) gene mutations in South Indian patients with monogenic diabetes. *Clin. Genet.* **90**, 486–495 (2016).
  25. Fagerberg L., Hallstrom B.M., Oksvold P., Kampf C., Djureinovic D., Odeberg J., *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 397–406 (2014).
  26. Lau H.H., Ng N.H.J., Loo L.S.W., Jasmen J.B., Teo A.K.K. The molecular functions of hepatocyte nuclear factors – In and beyond the liver. *J. Hepatol.* **68**, 1033–1048 (2018).
  27. Odom D.T., Zizlsperger N., Gordon D.B., Bell G.W., Rinaldi N.J., Murray H.L., *et al.* Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* **303**, 1378–1381 (2004).
  28. Shi T.-T., Yang F.-Y., Liu C., Cao X., Lu J., Zhang X.-L., *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 regulates mitochondrial function in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **495**, 860–866 (2018).
  29. Shih D.Q., Bussen M., Sehayek E., Ananthanarayanan M., Shneider B.L., Suchy F.J., *et al.* Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. *Nat. Genet.* **27**, 375–382 (2001).
  30. Koepsell H., Lips K., Volk C. Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm. Res.* **24**,

- 1227–1251 (2007).
31. Pontoglio M., Prié D., Cheret C., Doyen A., Leroy C., Froguel P., *et al.* HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man. *EMBO Rep.* **1**, 359–365 (2000).
  32. Armendariz A.D., Krauss R.M. Hepatic nuclear factor 1- $\alpha$ : Inflammation, genetics, and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 106–111 (2009).
  33. Hoskins J.W., Jia J., Flandez M., Parikh H., Xiao W., Collins I., *et al.* Transcriptome analysis of pancreatic cancer reveals a tumor suppressor function for HNF1A. *Carcinogenesis* **35**, 2670–2678 (2014).
  34. Luo Z., Li Y., Wang H., Fleming J., Li M., Kang Y., *et al.* Hepatocyte Nuclear Factor 1A (HNF1A) as a possible tumor suppressor in pancreatic cancer. *PLoS One* **10**, 1–13 (2015).
  35. Bluteau O., Jeannot E., Bioulac-Sage P., Marqués J.M., Blanc J.-F., Bui H., *et al.* Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat. Genet.* **32**, 312–315 (2002).
  36. Jeannot E., Mellottee L., Bioulac-Sage P., Balabaud C., Scoazec J.-Y., Tran Van Nhieu J., *et al.* Spectrum of HNF1A somatic mutations in hepatocellular adenoma differs from that in patients with MODY3 and suggests genotoxic damage. *Diabetes* **59**, 1836–1844 (2010).
  37. Rebouissou S., Vasiliu V., Thomas C., Bellanné-Chantelot C., Bui H., Chrétien Y., *et al.* Germline hepatocyte nuclear factor 1alpha and 1beta mutations in renal cell carcinomas. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 603–614 (2005).
  38. Yang X., Song J.H., Cheng Y., Wu W., Bhagat T., Yu Y., *et al.* Long non-coding RNA HNF1A-AS1 regulates proliferation and migration in oesophageal adenocarcinoma cells. *Gut* **63**, 881–890 (2014).
  39. Wu Y., Liu H., Shi X., Yao Y., Yang W., Song Y. The long non-coding RNA HNF1A-AS1 regulates proliferation and metastasis in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* **6**, 9160–9172 (2015).
  40. Lauc G., Essafi A., Huffman J.E., Hayward C., Knežević A., Kattla J.J., *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**, 1–14

- (2010).
41. Servitja J.-M., Pignatelli M., Maestro M.A., Cardalda C., Boj S.F., Lozano J., *et al.* Hnf1 (MODY3) Controls Tissue-Specific Transcriptional Programs and Exerts Opposed Effects on Cell Growth in Pancreatic Islets and Liver. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 2945–2959 (2009).
  42. Hegele R.A., Cao H., Harris S.B., Hanley A.J., Zinman B. The hepatic nuclear factor-1alpha G319S variant is associated with early-onset type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 1077–1082 (1999).
  43. Consortium S.T. 2 D., Estrada K., Aukrust I., Bjørkhaug L., Burt N.P., Mercader J.M., *et al.* Association of a low-frequency variant in HNF1A with type 2 diabetes in a Latino population. *JAMA* **311**, 2305–2314 (2014).
  44. McCulloch L.J., van de Bunt M., Braun M., Frayn K.N., Clark A., Gloyn A.L. GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: Implications for understanding genetic association signals at this locus. *Mol. Genet. Metab.* **104**, 648–653 (2011).
  45. De Vos A., Heimberg H., Quartier E., Huypens P., Bouwens L., Pipeleers D., *et al.* Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J. Clin. Invest.* **96**, 2489–2495 (1995).
  46. Komatsu M., Takei M., Ishii H., Sato Y. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *J. Diabetes Investig.* **4**, 511–516 (2013).
  47. Cha J.Y., Kim H., Kim K.S., Hur M.W., Ahn Y. Identification of transacting factors responsible for the tissue-specific expression of human glucose transporter type 2 isoform gene. Cooperative role of hepatocyte nuclear factors 1alpha and 3beta. *J. Biol. Chem.* **275**, 18358–18365 (2000).
  48. 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**, 1067–1076 (2011).
  49. Minowa M.T., Oguri S., Yoshida A., Hara T., Iwamatsu A., Ikenaga H., *et al.* cDNA cloning and expression of bovine UDP-N-acetylglucosamine:  $\alpha$ 1,3-D- mannoside  $\beta$ 1,4-



- N-acetylglucosaminyltransferase IV. *J. Biol. Chem.* **273**, 11556–11562 (1998).
50. Yoshida A., Minowa M.T., Takamatsu S., Hara T., Oguri S., Ikenaga H., *et al.* Tissue specific expression and chromosomal mapping of a human UDP-N-acetylglucosamine:α1,3-d-mannoside β1,4-N-acetylglucosaminyltransferase. *Glycobiology* **9**, 303–310 (1999).
  51. Ohtsubo K., Takamatsu S., Minowa M.T., Yoshida A., Takeuchi M., Marth J.D. Dietary and genetic control of glucose transporter 2 glycosylation promotes insulin secretion in suppressing diabetes. *Cell* **123**, 1307–1321 (2005).
  52. Asano T., Takata K., Katagiri H., Ishihara H., Inukai K., Anai M., *et al.* The role of N-glycosylation in the targeting and stability of GLUT1 glucose transporter. *FEBS Lett.* **324**, 258–261 (1993).
  53. Asano T., Katagiri H., Takata K., Lin J.L., Ishihara H., Inukai K., *et al.* The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* **266**, 24632–24636 (1991).
  54. Ohtsubo K., Taniguchi N. Physiological relevance of protein-glycosylation to pathogenesis of diabetes. *J. Phys. Fit. Sport. Med.* **3**, 223–228 (2014).
  55. Waddington C.H. The epigenotype. 1942. *Int. J. Epidemiol.* **41**, 10–13 (2012).
  56. Allis C.D., Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* **17**, 487–500 (2016).
  57. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6–21 (2002).
  58. Lister R., Pelizzola M., Dowen R.H., Hawkins R.D., Hon G., Tonti-Filippini J., *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* **462**, 315–322 (2009).
  59. Cokus S.J., Feng S., Zhang X., Chen Z., Merriman B., Haudenschild C.D., *et al.* Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* **452**, 215–219 (2008).
  60. Rountree M.R., Selker E.U. DNA methylation inhibits elongation but not initiation of

- transcription in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* **11**, 2383–2395 (1997).
61. Riggs A.D. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet. Cell Genet.* **14**, 9–25 (1975).
  62. Holliday R., Pugh J.E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**, 226–232 (1975).
  63. Gardiner-Garden M., Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* **196**, 261–282 (1987).
  64. Larsen F., Gundersen G., Lopez R., Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* **13**, 1095–1107 (1992).
  65. Illingworth R.S., Bird A.P. CpG islands - ‘A rough guide’. *FEBS Lett.* **583**, 1713–1720 (2009).
  66. Rottach A., Leonhardt H., Spada F. DNA methylation-mediated epigenetic control. *J. Cell. Biochem.* **108**, 43–51 (2009).
  67. Greenberg M.V.C., Bourc’his D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 590–607 (2019).
  68. Hermann A., Gowher H., Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 2571–2587 (2004).
  69. Xu F., Mao C., Ding Y., Rui C., Wu L., Shi A., *et al.* Molecular and Enzymatic Profiles of Mammalian DNA Methyltransferases: Structures and Targets for Drugs. *Curr. Med. Chem.* **17**, 4052–4071 (2010).
  70. Jones P.A., Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature Reviews Genetics* **10**, 805–811 (2009).
  71. Bestor T.H., Ingram V.M. Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 5559–5563 (1983).
  72. Hermann A., Goyal R., Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J. Biol. Chem.* **279**, 48350–48359 (2004).

73. Pradhan S., Bacolla A., Wells R.D., Roberts R.J. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J. Biol. Chem.* **274**, 33002–33010 (1999).
74. Chuang L.S., Ian H.I., Koh T.W., Ng H.H., Xu G., Li B.F. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* **277**, 1996–2000 (1997).
75. Avvakumov G. V, Walker J.R., Xue S., Li Y., Duan S., Bronner C., *et al.* Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature* **455**, 822–825 (2008).
76. Bostick M., Kim J.K., Esteve P.-O., Clark A., Pradhan S., Jacobsen S.E. UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* **317**, 1760–1764 (2007).
77. Hashimoto H., Horton J.R., Zhang X., Bostick M., Jacobsen S.E., Cheng X. The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature* **455**, 826–829 (2008).
78. Sharif J., Muto M., Takebayashi S., Suetake I., Iwamatsu A., Endo T.A., *et al.* The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* **450**, 908–912 (2007).
79. Schermelleh L., Haemmer A., Spada F., Rösing N., Meilinger D., Rothbauer U., *et al.* Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4301–4312 (2007).
80. Jeong S., Liang G., Sharma S., Lin J.C., Choi S.H., Han H., *et al.* Selective anchoring of DNA methyltransferases 3A and 3B to nucleosomes containing methylated DNA. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 5366–5376 (2009).
81. Jones P.A. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 484–492 (2012).
82. Bird A., Taggart M., Frommer M., Miller O.J., Macleod D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* **40**, 91–99

- (1985).
83. Gal-Yam E.N., Jeong S., Tanay A., Egger G., Lee A.S., Jones P.A. Constitutive nucleosome depletion and ordered factor assembly at the GRP78 promoter revealed by single molecule footprinting. *PLoS Genet.* **2**, e160–e160 (2006).
  84. Lock L.F., Takagi N., Martin G.R. Methylation of the Hprt gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. *Cell* **48**, 39–46 (1987).
  85. Irizarry R.A., Ladd-Acosta C., Wen B., Wu Z., Montano C., Onyango P., *et al.* The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat. Genet.* **41**, 178–186 (2009).
  86. Weber M., Davies J.J., Wittig D., Oakeley E.J., Haase M., Lam W.L., *et al.* Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat. Genet.* **37**, 853–862 (2005).
  87. Gal-Yam E.N., Egger G., Iniguez L., Holster H., Einarsson S., Zhang X., *et al.* Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 12979–12984 (2008).
  88. Jones P.A. The DNA methylation paradox. *Trends Genet.* **15**, 34–37 (1999).
  89. Varley K.E., Gertz J., Bowling K.M., Parker S.L., Reddy T.E., Pauli-Behn F., *et al.* Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res.* **23**, 555–567 (2013).
  90. Hellman A., Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science* **315**, 1141–1143 (2007).
  91. Bender C.M., Gonzalzo M.L., Gonzales F.A., Nguyen C.T., Robertson K.D., Jones P.A. Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6690–6698 (1999).
  92. Feng S., Cokus S.J., Zhang X., Chen P.Y., Bostick M., Goll M.G., *et al.* Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8689–8694 (2010).
  93. Yoder J.A., Walsh C.P., Bestor T.H. Cytosine methylation and the ecology of

- intragenomic parasites. *Trends Genet.* **13**, 335–340 (1997).
94. Laurent L., Wong E., Li G., Huynh T., Tsirigos A., Ong C.T., *et al.* Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.* **20**, 320–331 (2010).
  95. Shukla S., Kavak E., Gregory M., Imashimizu M., Shutinoski B., Kashlev M., *et al.* CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* **479**, 74–79 (2011).
  96. Nguyen C.T., Gonzales F.A., Jones P.A. Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4598–4606 (2001).
  97. Maunakea A.K., Nagarajan R.P., Bilenky M., Ballinger T.J., Dsouza C., Fouse S.D., *et al.* Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* **466**, 253–257 (2010).
  98. Schmidl C., Klug M., Boeld T.J., Andreesen R., Hoffmann P., Edinger M., *et al.* Lineage-specific DNA methylation in T cells correlates with histone methylation and enhancer activity. *Genome Res.* **19**, 1165–1174 (2009).
  99. Bell A.C., Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature* **405**, 482–485 (2000).
  100. Zoldoš V., Horvat T., Novokmet M., Cuenin C., Mužinić A., Pučić M., *et al.* Epigenetic silencing of *HNF1A* associates with changes in the composition of the human plasma N-glycome. *Epigenetics* **7**, 164–172 (2012).
  101. Josipović G., Tadić V., Klasić M., Zanki V., Bečeheli I., Chung F., *et al.* Antagonistic and synergistic epigenetic modulation using orthologous CRISPR/dCas9-based modular system. *Nucleic Acids Res.* **47**, 9637–9657 (2019).
  102. Zhang H., Zhu J.-K. Active DNA demethylation in plants and animals. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **77**, 161–173 (2012).
  103. Rai K., Huggins I.J., James S.R., Karpf A.R., Jones D.A., Cairns B.R. DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and *gadd45*. *Cell* **135**, 1201–1212 (2008).

104. Cortellino S., Xu J., Sannai M., Moore R., Caretti E., Cigliano A., *et al.* Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* **146**, 67–79 (2011).
105. Thillainadesan G., Chitilian J.M., Isovich M., Ablack J.N.G., Mymryk J.S., Tini M., *et al.* TGF- $\beta$ -dependent active demethylation and expression of the p15ink4b tumor suppressor are impaired by the ZNF217/CoREST complex. *Mol. Cell* **46**, 636–649 (2012).
106. Zhu B., Zheng Y., Hess D., Angliker H., Schwarz S., Siegmann M., *et al.* 5-methylcytosine-DNA glycosylase activity is present in a cloned G/T mismatch DNA glycosylase associated with the chicken embryo DNA demethylation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5135–5139 (2000).
107. Zhu B., Zheng Y., Angliker H., Schwarz S., Thiry S., Siegmann M., *et al.* 5-Methylcytosine DNA glycosylase activity is also present in the human MBD4 (G/T mismatch glycosylase) and in a related avian sequence. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4157–4165 (2000).
108. Tahiliani M., Koh K.P., Shen Y., Pastor W.A., Bandukwala H., Brudno Y., *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930–935 (2009).
109. Ito S., D'Alessio A.C., Taranova O. V, Hong K., Sowers L.C., Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**, 1129–1133 (2010).
110. He Y.-F., Li B.-Z., Li Z., Liu P., Wang Y., Tang Q., *et al.* Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **333**, 1303–1307 (2011).
111. Ito S., Shen L., Dai Q., Wu S.C., Collins L.B., Swenberg J.A., *et al.* Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* **333**, 1300–1303 (2011).
112. Guo J.U., Su Y., Zhong C., Ming G., Song H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* **145**, 423–434 (2011).

113. Valinluck V., Sowers L.C. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res.* **67**, 946–950 (2007).
114. Maiti A., Drohat A.C. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J. Biol. Chem.* **286**, 35334–35338 (2011).
115. Zhang L., Lu X., Lu J., Liang H., Dai Q., Xu G.-L., *et al.* Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 328–330 (2012).
116. Mayer W., Niveleau A., Walter J., Fundele R., Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**, 501–502 (2000).
117. Oswald J., Engemann S., Lane N., Mayer W., Olek A., Fundele R., *et al.* Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr. Biol.* **10**, 475–478 (2000).
118. Morgan H.D., Santos F., Green K., Dean W., Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet.* **14 Spec No**, R47–R58 (2005).
119. Hajkova P., Erhardt S., Lane N., Haaf T., El-Maarri O., Reik W., *et al.* Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* **117**, 15–23 (2002).
120. Dean W., Santos F., Stojkovic M., Zakhartchenko V., Walter J., Wolf E., *et al.* Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13734–13738 (2001).
121. Feinberg A.P., Ohlsson R., Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 21–33 (2006).
122. Wilson A.S., Power B.E., Molloy P.L. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1775**, 138–162 (2007).
123. Ma D.K., Jang M.-H., Guo J.U., Kitabatake Y., Chang M.-L., Pow-Anpongkul N., *et al.* Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. *Science* **323**, 1074–1077 (2009).

124. Reiner S.L. Epigenetic control in the immune response. *Hum. Mol. Genet.* **14 Spec No**, R41–R46 (2005).
125. Zhu J.-K. Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 143–166 (2009).
126. Kurdyukov S., Bullock M. DNA methylation analysis: Choosing the right method. *Biology (Basel)*. **5**, 1–21 (2016).
127. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709–1712 (2007).
128. Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P. CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 181–186 (2008).
129. Marraffini L.A., Sontheimer E.J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* **322**, 1843–1845 (2008).
130. Garneau J.E., Dupuis M.-È., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., *et al.* The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **468**, 67–71 (2010).
131. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).
132. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2579–E2586 (2012).
133. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., Doudna J.A., Weissman J.S., Arkin A.P., *et al.* Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* **152**, 1173–1183 (2013).
134. Pulecio J., Verma N., Mejía-Ramírez E., Huangfu D., Raya A. CRISPR/Cas9-Based Engineering of the Epigenome. *Cell Stem Cell* **21**, 431–447 (2017).



135. Kearns N.A., Pham H., Tabak B., Genga R.M., Silverstein N.J., Garber M., *et al.* Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat. Methods* **12**, 401–403 (2015).
136. Klann T.S., Black J.B., Chellappan M., Safi A., Song L., Hilton I.B., *et al.* CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nat. Biotechnol.* **35**, 561–568 (2017).
137. Kim J.-M., Kim K., Schmidt T., Punj V., Tucker H., Rice J.C., *et al.* Cooperation between SMYD3 and PC4 drives a distinct transcriptional program in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **43**, 8868–8883 (2015).
138. Liu X.S., Wu H., Ji X., Stelzer Y., Wu X., Czauderna S., *et al.* Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell* **167**, 233-247.e17 (2016).
139. Liu X.S., Wu H., Krzisch M., Wu X., Graef J., Muffat J., *et al.* Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene. *Cell* **172**, 979-992.e6 (2018).
140. Vojta A., Dobrinic P., Tadic V., Bockor L., Korac P., Julg B., *et al.* Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **44**, 5615–5628 (2016).
141. Choudhury S.R., Cui Y., Lubecka K., Stefanska B., Irudayaraj J. CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget* **7**, 46545–46556 (2016).
142. Morita S., Noguchi H., Horii T., Nakabayashi K., Kimura M., Okamura K., *et al.* Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat. Biotechnol.* **34**, 1060–1065 (2016).
143. Longo P.A., Kavran J.M., Kim M., Leahy D.J. Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI). in *Methods in enzymology* **529**, 227–240 (2013).
144. Solis BioDyne - 100 bp DNA Ladder Ready to Load. Available at: [https://www.solisbiodyne.com/EN/products/dna\\_ladders/100\\_bp\\_dna\\_ladder\\_](https://www.solisbiodyne.com/EN/products/dna_ladders/100_bp_dna_ladder_). (Accessed: 4th February 2020)
145. Pyrosequencing Technology and Platform Overview - QIAGEN. Available at:

<https://www.qiagen.com/us/service-and-support/learning-hub/technologies-and-research-topics/pyrosequencing-resource-center/technology-overview/#principle>.  
(Accessed: 31st January 2020)

146. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108 (2008).
147. Xu X., Tao Y., Gao X., Zhang L., Li X., Zou W., *et al.* A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation. *Cell Discov.* **2**, 16009 (2016).

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 31.08.1995. u Zagrebu, a od svoje 3. godine živim u Velikoj Gorici gdje sam pohađao Osnovnu školu Eugena Kumičića. Srednjoškolsko obrazovanje stekao sam u XV. gimnaziji (MIOC) u Zagrebu nakon čega sam 2014. upisao Preddiplomski studij molekularne biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Po završetku preddiplomskog studija 2017. diplomirao sam s velikom pohvalom (*magna cum laude*) te sam stekao zvanje sveučilišnog prvostupnika molekularne biologije (univ. bacc. biol. mol.). Iste godine upisao sam Diplomski studij molekularne biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija odradio sam dvije laboratorijske stručne prakse u Laboratoriju za epigenetiku prof. dr. sc. Vlatke Zoldoš gdje sam stekao teorijska i praktična znanja vezana uz istraživanje epigenoma te vještine potrebne za samostalan rad u laboratoriju. Kroz srednju školu i studij bio sam aktivno uključen u popularizaciju znanosti. U sklopu Istraživačkog Centra Mladih (ICM) aktivno sam sudjelovao na znanstveno-popularizacijskim manifestacijama „Dan znanosti i tehnologije“, „Genetika Pythona“ i „1. velikogorička noć znanosti“. Također, u sklopu ICM-a djelovao sam kao recenzent radova na „Državnom turniru mladih prirodoslovaca“. Od znanstveno-popularizacijskih manifestacija na kojima sam aktivno sudjelovao još bih htio istaknuti „Noć Biologije“ i „Znanstveni piknik“. Od studentskih poslova htio bih istaknuti mjesto demonstratora na kolegijima Zoologija i Molekularna biologija stanice.