

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Marija B. Đorđević

**Transdiferencijacija alfa ćelija pankreasa
miša u ćelije koje proizvode insulin ciljanom
metilacijom DNK primenom Epi-CRISPR
sistema**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Marija B. Đorđević

**Transdifferentiation of mouse pancreatic
alpha to insulin-producing cells using Epi-
CRISPRs directed DNA methylation**

Doctoral Dissertation

Beograd, 2023

MENTORI:

dr Jelena Arambaši-Jovanović, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

dr Melita Vidaković, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Svetlana Dinić, naučni savetnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

dr Anja Tolić, naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
- Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____



Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je na Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta „Signalni molekuli u dijabetesu: identifikacija potencijalnih bioloških markera uključenih u modifikaciju i integraciju signalnih puteva u cilju predikcije i intervencije u dijabetesu”; potprojekat „Genetska predispozicija za razvoj dijabetesa tip 1 i novi pristupi u prevenciji disfunkcije β -ćelija u dijabetesu: izučavanje puteva prenosa signala posredovanih CXCL12” (O1173020), Plana i programa rada Instituta za 2020. godinu (451-03-68/2020-14/200007), 2021. godinu (451-03-9/2021-14/200007), 2022. godinu (451-03-68/2022-14/200007) i 2023. godinu (451-03-47/2023-01/200007) finansiranih od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Izrada ove doktorske disertacije je jednim delom finansirana i od strane Evropske Fondacije za istraživanja u dijabetesu (EFSD), pomoću istraživačkog granta kompanije AstraZeneca.

Izjava zahvalnosti

Veliku zahvalnost dugujem mojoj mentorki, dr Jeleni Arambašić-Jovanović, za pruženu podršku, razumevanje, uvažavanje i strpljenje u toku izrade ove doktorske disertacije. Veliko hvala za brojne savete koje mi je davala, što je verovala u mene i moje ideje. Hvala na brojnim naučnim razgovorima koji su mi pomogli da naučnoj problematici pristupim iz više različitih uglova, što je doprinelo širem sagledavanju stvari i donošenju sveobuhvatnijih zaključaka.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Meliti Vidaković na ukazanom poverenju i pruženim prilikama koje su mi omogućile i dale prostora da unapređujem svoje profesionalne sposobnosti. Veliko hvala na razumevanju i brizi, kao i na njenom ogromnom entuzijazamu i optimizmu koji su mi pružali posebno zadovoljstvo, motivaciju od prvog dana i iznova me pokretali svaki put kad je nešto delovalo nedostižno. Zahvalna sam što mi je svojim velikim zalaganjem omogućila brojne prilike za usavršavanje.

Veliko hvala dr Neveni Grdović, dr Svetlani Dinić, dr Aleksandri Uskoković, dr Mirjani Mihailović i dr Goranu Poznanović na brojnim savetima, pomoći, razumevanju i rečima podrške od samog početka boravka u našoj laboratoriji. Zahvalna sam što su učinili da se osećam kao deo jednog tima.

Veliko hvala dr Dušanki Savić-Pavićević na savetima i ukazanoj pažnji za sve vreme mojih studija na Biološkom fakultetu.

dr Anji Tolić, dr Jovani Rajić i dr Milošu Đorđeviću dugujem ogromnu zahvalnost na iskrenom prijateljstvu, brojnim savetima, pomoći, razumevanju, motivaciji koje su mi pružali i što su me bodrili i uvek bili tu za mene, što su mi olakšali i ulepšali rad u labu. Anjka, hvala za svaku reč podrške i podsterk u eksperimentalnom radu i van njega. Joksi, druže iz klupe, hvala na poverenju i sveukupnoj pomoći. Miloše, veliko hvala za podršku, smeh i dobru atmosferu u labu i van laba.

dr Tomaszu Jurkowskom, dr Peteru Stepperu, dr Renati Jurkowskoj se zahvaljujem za izdvojeno vreme, korisne savete i pomoć pri eksperimentalnom radu i analizi rezultata u toku izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Clarissi Gerhauser i dr Clarissa Feuerstein-Akgoz na nesebičnoj pomoći, izdvojenom vremenu i brojnim korisnim savetima prilikom analize podataka dobijenih sekvenciranjem transkriptoma.

Veliko hvala dr Verici Paunović, dr Ivanki Marković, dr Tanji Ćirković Veličković i dr Maji Jovanović Tucović na korisnim savetima i velikoj pomoći u eksperimentalnom radu.

Tatjani Milićević veliko hvala za svu pomoć koja je omogućila da eksperimenatalni rad bude jednostavniji i brži. Ani Sarić se zahvaljujem na prijateljstvu i rečima podrške.

Hvala koleginicama sa drugog potprojekta Odeljenja za molekularnu biologiju na lepoj saradnji, druženju i prijateljskoj atmosferi.

Zahvaljujem se i mojoj Mari, Jeleni, Ani, Izi na dugogodišnjem prijateljstvu i podršci koja mi je bila vetar u leđa sve ove godine.

Veliko hvala mojoj nastavnici biologije Anđi Marković koja me je uvela u magični svet biologije.

Beskrajnu zahvalnost dugujem mojim roditeljima Slađani i Bojanu, sestri Mirjani i mojim dečacima, Mikiju i Giji za svu ljubav, razumevanje, podršku i oslonac svih ovih godina. Hvala!

Transdiferencijacija alfa ćelija pankreasa miša u ćelije koje proizvode insulin ciljanom metilacijom DNK primenom Epi-CRISPR sistema

SAŽETAK

Ekspresija gena za *Arx* (engl. *Aristaless related homeobox*) koji ima glavnu ulogu u održavanju identiteta alfa ćelija endokrinog pankreasa regulisana je metilacijom i predstavlja glavni target za ćelijsko reprogramiranje kao jedna od strategija u terapiji dijabetesa koji u osnovi ima poremećen izvor insulina usled propadanja beta ćelija.

Cilj ove doktorske disertacije je podrazumevao ispitivanje sposobnosti transdiferencijacije alfa ćelija pankreasa miša u ćelije koje proizvode insulin nakon uvođenja metilacije u promotoru *Arx*-a. Nakon tranzijentne transfekcije α TC1-6 ćelijske linije pomoću epigenetičkog alata za ciljanu gensku represiju ispitivani su efekti uvedene metilacije na ekspresiju gena specifičnih za beta ćelije.

Optimizacijom nukleofekcije α TC1-6 ćelija uspostavljeni su uslovi pomoću kojih je dostignuta efikasnost od 71,1% pri vijabilnosti ćelija od 80%. Visoka efikasnost uvođenja metilacije *dCas9-Dnmt3a3L-KRAB* fuzionim (EpiCRISPR) konstruktom je pokazana targetovanim bisulfitnim sekvenciranjem. Utišavanje *Arx*-a praćeno pokretanjem ekspresije *Ins2* na 5. i 7. danu nakon transfekcije detektovano je metodom RT-qPCR-a i analizom transkriptoma. Proteinski nivo insulina detektovan je imunocitohemijском metodom do 12. dana, a oslobađanje iz ćelija enzimskim imunoesejem na 7. danu nakon transfekcije. Pokretanje procesa transdiferencijacije α TC1-6 ćelija ispitivano je analizom prisustva markera beta ćelija.

Rezultati su pokazali da jedna tranzijentna transfekcija može da inicira transdiferencijaciju ~1% alfa ćelija pankreasa u ćelije koje proizvode 35% više insulina u odnosu na lažno transfekovane (Mock) alfa ćelije. Delujući na plastičnu prirodu epigenoma, uspešno je iniciran proces direktnog reprogramiranja alfa ćelija pankreasa u ćelije koje proizvode insulin.

Ključne reči: *Arx*, CRISPR/Cas9, alfa ćelije pankreasa, dijabetes, editovanje epigenoma, ciljana metilacija DNK, transfekcija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

Transdifferentiation of mouse pancreatic alpha to insulin-producing cells using Epi-CRISPRs directed DNA methylation

ABSTRACT

Aristaless-related homeobox (*Arx*) gene expression level is regulated by DNA methylation, playing an important role in the maintenance of pancreatic alpha cell identity. Diabetes is characterized by a disturbed source of insulin, representing a good candidate for cell reprogramming strategy in diabetes therapy by *Arx* targeting.

The aim of this doctoral dissertation was to examine the transdifferentiation ability of murine pancreatic alpha cells into insulin-producing cells induced by the targeted DNA methylation in the *Arx* promoter. The expression of beta specific marker was analysed in transiently transfected α TC1-6 cells with a synthetic epigenetic tool for gene repression.

The optimization of α TC1-6 cells nucleofection was established conditions by which was achieved an efficiency of 71.1% with an 80% of cell viability. The high efficiency of methylation induction by the dCas9-Dnmt3a3L-KRAB fusion (EpiCRISPR) construct was confirmed by targeted bisulfite sequencing. The *Arx* silencing followed by induction of *Ins2* expression on 5 and 7 days after transfection was detected by RT-qPCR and transcriptome analysis. The insulin protein level was detected immunocytochemically until the 12th post-transfection day, and released insulin was detected by the enzyme immunoassay on the 7th post-transfection day. The initiation of the transdifferentiation process of α TC1-6 cells was examined by analyzing the presence of beta cell specific markers.

The results showed that a single transient transfection initiate the transdifferentiation of ~1% of alpha cells into cells that produce 35% more insulin compared to mock-transfected cells. Acting on the epigenome plastic nature, the direct reprogramming of pancreatic alpha cells into insulin-producing cells was successfully initiated.

Key words: ARX, CRISPR/dCas9, pancreatic alpha cells, diabetes, epigenetic editing, targeted DNA methylation, transfection

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biology

Lista skraćenica

5-aza-dC	5-aza-2'-deoksicitidin
AAV	Adeno-asocirani virus, engl. <i>Adeno-associated virus</i>
ADP	adenozin difosfat
ARX	engl. <i>Aristaless related homeobox</i>
ATP	adenozin trifostat
Brn4	engl. <i>Brain 4</i>
BSA	albumin seruma govečeta, engl. <i>bovine serum albumin</i>
Cas	CRISPR asocirane endonukleaze, engl. <i>CRISPR associated</i>
cDNK	komplementarna cDNK, engl. <i>complementary DNA</i>
ChIP	imunoprecipitacija hromatina (eng. <i>chromatin immunoprecipitation</i>)
CMV	citomegalovirus
CpG	citozin-fosfodiestarska veza-guanin
CPM	engl. <i>counts per million</i>
CRISPR	grupisani kratki palindromski ponovci na jednakim rastojanjima, engl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
crRNK	CRISPR-RNK
C _t	engl. <i>cycle threshold</i>
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
dCas9	neaktivna Cas9, engl. <i>deactivated/dead Cas9</i>
DMEM	modifikovan Dubelko medijum, engl. <i>Dubelco's Modified Eagle Medium</i>
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DNKaza	dezoksiribonukleaza
Dnmt	DNK metiltransferaza, engl. <i>DNA methyltransferase</i>
DT1	dijabetes tipa 1
DT2	dijabetes tipa 2
EpiCRISPR	dCas9-Dnmt3a3L-KRAB fuzioni konstrukt
ELISA	enzimski imunoesej, engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
FACS	sortiranje ćelija aktivirano fluprescencom, engl. <i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>
FBS	fetalni serum govečeta, engl. <i>fetal bovine serum</i>
FcoR	korepresor Foxo1, engl. <i>Foxo1 Corepressor</i>
FDR	engl. <i>false discovery rate</i>
Foxo	FoxO protein, engl. <i>forkhead box O</i>
FRE	element koji odgovara Foxo, engl. <i>Foxo responsive element</i>

GABA	gama aminobuterna kiselina; engl. <i>γ-aminobutyric acid</i>
GCG	glukagon
GFP	zeleni fluorescentni protein, engl. <i>green fluorescent protein</i>
GIP	insulintropski peptid koji je zavistan od glukoze, engl. <i>glucose-dependent insulintropic peptide</i>
GLC	glukokinaza
GLUT2	engl. <i>Glucose transporter 2</i>
GRG3	engl. <i>groucho-related gene 3</i>
gRNK	RNK vodilja, engl. <i>guide RNA</i>
GSIS	glukozom stimulirana sekrecija insulina
H3K4me3	trimetilacija histona 3 na poziciji lizina 4
H3K9me3	trimetilacija histona 3 na poziciji lizina 9
H3K27me3	trimetilacija histona 3 na poziciji lizina 27
HBSS	engl. <i>Hanks' buffered saline solution</i>
HDR	homologna matrica za reparaciju DNK, engl. <i>homology-directed repair</i>
HNF1A	engl. <i>HNF1 homeobox A</i>
HNF1B	engl. <i>HNF1 homeobox B</i>
HNF4α	engl. <i>Hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i>
HNH	HNH endonukleazni domen
HRM	analiza krive topljenja visoke rezolucije, engl. <i>high-resolution melting</i>
HRP	peroksidaza rena; engl. <i>horseradish peroxidase</i>
IBA	Imunoblot analiza proteina
ICC	Imunocitohemija
Ins1	insulin 1
Ins2	insulin 2
iRNK	informaciona RNK
Isl1	engl. <i>Isl1-1</i>
KEGG	engl. <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KRAB	engl. <i>Krüppel associated box</i>
KRB	Krebs-Ringer bikarbonat, engl. <i>Krebs-Ringer Bicarbonate</i>
LB	engl. <i>Lysogeny broth</i>
LSD1	engl. <i>lysine specific demethylase 1</i>
MafA	engl. <i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A</i>
MafB	engl. <i>V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B</i>
MAPK	mitogenom aktivirana protein kinaza, engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>

MeCP2	metil CpG vezujući protein 2, engl. <i>Methyl CpG binding protein 2</i>
NDS	normalni serum magarca; engl. <i>normal donkey serum</i>
NEUROD1	engl. <i>neurogenic differentiation 1</i>
Ngn3	engl. <i>Neuro-genin 3</i>
NHEJ	nehomologno spajanje krajeva, engl. <i>nonhomologous end-joining</i>
Nkx2-2	engl. <i>NK2 homeobox 2</i>
Nkx6-1	engl. <i>NK6 homeobox 1</i>
NO	azot oksid, engl. <i>nitric oxide</i>
NUC	Cas9 nukleazni lobus
PAM	motiv koji se nalazi uz protospajser, engl. <i>protospacer-adjacent motif</i>
Pax4	engl. <i>Paired box 4</i>
Pax6	engl. <i>Paired box protein 6</i>
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCA	analiza glavnih komponenti, engl. <i>principal component analysis</i>
Pdx1	eng. <i>pancreatic and duodenal homeobox factor-1</i>
PEI	polietilenimin
PI	PAM interagujući domen
Pou3f4	engl. <i>POU class 3 homeobox 4</i>
Prd	engl. <i>Paired</i>
Prmt6	protein arginine metiltransferaza 6, engl. <i>protein arginine methyltransferase 6</i>
REC	Cas9 lobus za prepoznavanje, engl. <i>recognition lobe</i>
REEP5	engl. <i>receptor accessory protein 5</i>
RNK	ribonukleinska kiselina
RNKaza	ribonukleaza
ROS	reaktivne vrste kiseonika, engl. <i>reactive oxygen species</i>
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RTA	engl. <i>replication and transcription activator</i>
RT-qPCR	kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu, engl. <i>realtime quantitative polymerase chain reaction</i>
SCID	Teška kombinovana imunodeficijencija, engl. <i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide</i>
Slc2a2	glukozni transporter 2, engl. <i>solute carrier family 2 member 2</i>
SN	supernatant
SpCas9	Cas9 poreklom iz <i>Streptococcus pyogenes</i>
STAT3	engl. <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>)

TALEN	efektori slični aktivatoru transkripcije, engl. <i>Transcription-activator-like effector nucleases</i>
TEMED	tetrametiletilendiamin
Tet	engl. <i>Ten Eleven Translocation</i>
TGA	targetovana aktivacija gena; engl. <i>target gene activation</i>
trcrRNK	transaktivirajuća crRNK
TSP	trostepeni protokol
TSS	mesto početka transkripcije, engl. <i>transcription start site</i>
VP	engl. <i>Virion protein</i>
ZFN	proteini sa cinkanim prstićima, engl. <i>Zinc finger nuclease</i>

SADRŽAJ

1. UVOD	- 1 -
1.1. Dijabetes	- 1 -
1.2. Endokrini pankreas	- 2 -
1.3. Identitet ćelija endokrinog pankreasa i njihovo održavanje	- 3 -
1.3.1. <i>Beta ćelije endokrinog pankreasa</i>	- 6 -
1.3.1.1. Sinteza i oslobađanje insulina.....	- 7 -
1.3.2. <i>Alfa ćelije endokrinog pankreasa</i>	- 8 -
1.3.2.1. Arx kao ključni faktor za razvoj i održavanje identiteta alfa ćelija pankreasa	- 8 -
1.3.2.2. Metilacija DNK u održavanju identiteta alfa i beta ćelija pankreasa	- 9 -
1.4. Terapija dijabetesa	- 10 -
1.5. Modeli konverzija somatskih ćelija u ćelije koje proizvode insulin	- 11 -
1.5.1. <i>Transdiferencijacija somatskih ćelija u ćelije koje proizvode insulin</i>	- 11 -
1.5.2. <i>Pokušaji transdiferencijacije alfa ćelija pankreasa</i>	- 13 -
1.5.2.1. Agensi koji promovišu transdiferencijaciju alfa u beta ćelije	- 16 -
1.6. Epigenetičko editovanje	- 16 -
1.6.1. <i>CRISPR-Cas9 sistem za dirigovano editovanje</i>	- 17 -
1.6.2. <i>Dirigovane izmene u genskoj ekspresiji indukovane epigenetičkim editovanjem</i>	- 19 -
1.6.2.1. Epigenetičko editovanje pomoću sistema za ciljano uvođenje metilacije.....	- 19 -
1.7. Transfekcija	- 20 -
2. CILJEVI	22
3. MATERIJAL I METODE	24
3.1. Ćelijska kultura	24
3.1.1. <i>Ćelijske linije</i>	24
3.1.2. <i>Transfekcija ćelija</i>	24
3.1.2.1. Hemijska transfekcija	24
3.1.2.2. Nukleofekcija	24
3.1.2.3. Plazmidi	25
3.1.2.3.1. Dizajniranje gRNK.....	25
3.1.2.3.2. Transformacija bakterija toplotnim šokom	25
3.1.2.3.3. Izolacija plazmidne DNK na velikoj skali.....	26
3.1.3. <i>Protočna citofluorimetrija i ćelijsko sortiranje</i>	26
3.1.4. <i>Fluorescentna mikroskopija</i>	27
3.2. Metode za manipulaciju nukleinskim kiselinama	27
3.2.1. <i>Izolacija genomske DNK i ukupne RNK</i>	27
3.2.2. <i>Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu</i>	27
3.2.3. <i>Analiza transkriptoma- RNK sekvenciranje</i>	29
3.2.4. <i>Metode za analizu metilacije DNK bazirane na tehnicima lančane reakcije polimeraze</i>	29
3.2.4.1. Bisulfitna konverzija DNK.....	29
3.2.4.2. Dizajniranje prajmera za bisulfitno konvertovanu DNK.....	30
3.2.4.3. Analiza kriva topljenja visoke rezolucije (HRM)	30
3.2.4.4. Bisulfitno sekvenciranje molekula DNK.....	31
3.3. Metode za manipulaciju proteinima	32
3.3.1. <i>Priprema ukupnih ćelijskih lizata</i>	32
3.3.2. <i>Određivanje koncentracije proteina</i>	32
3.3.3. <i>Elektroforetsko razdvajanje proteina</i>	32
3.3.4. <i>Prenos proteina sa gela na membranu</i>	33
3.3.5. <i>Imunoblot analiza proteina (IBA)</i>	33

3.3.6.	<i>Imunocitohemija (ICC)</i>	33
3.3.7.	<i>Sekrecija insulina stimulisana glukozom</i>	34
3.3.8.	<i>Određivanje koncentracije insulina u medijumu ELISA testom</i>	35
3.3.9.	<i>Određivanje koncentracije glukagona ELISA testom</i>	35
3.3.10.	<i>Imunoprecipitacija hromatina</i>	36
3.4.	Pravljenje shema	36
3.5.	Statistička obrada podataka	37
4.	REZULTATI	38
4.1.	Optimizacija transfekcije za αTC1-6 ćelijsku liniju	38
4.1.1.	<i>Transfekcija αTC1-6 ćelija korišćenjem polietilenimina (PEI)</i>	38
4.1.2.	<i>Optimizacija nukleofekcije αTC1-6 ćelija</i>	39
4.2.	Analiza pankreatičnih alfa i beta ćelija	45
4.2.1.	<i>Analiza transkriptoma pankreatične alfa i beta ćelijske linije miša</i>	45
4.2.2.	<i>Analiza epigenetičkog pejzaža u delu promotora gena za Arx</i>	47
4.3.	Iniciranje promene fenotipa αTC1-6 ćelija nakon ciljane metilacije pomoću EpiCRISPR sistema	50
4.3.1.	<i>Efikasno uvođenje metilacije u region promotora Arx gena u αTC1-6 ćelijama</i>	50
4.3.2.	<i>Ciljana metilacija i represija Arx-a dovodi do inicijacije sinteze insulina u αTC1-6 ćelijama</i>	52
4.3.3.	<i>Epigenetičko utišavanje Arx-a dovodi do bihormonalnog stanja αTC1-6 ćelija</i>	56
5.	DISKUSIJA	60
5.1.	Optimizacija transfekcije	62
5.2.	Editovanje epigenoma alfa ćelija u cilju dobijanja ćelija koje proizvode insulin	66
6.	ZAKLJUČCI	74
7.	LITERATURA	75
8.	PRILOZI	92

1. UVOD

1.1. Dijabetes

Dijabetes ili šećerna bolest (lat. *Diabetes mellitus*) predstavlja heterogenu grupu metaboličkih promena koje karakteriše povišena koncentracija glukoze u krvi (hronična hiperglikemija) koja nastaje kao rezultat poremećene sekrecije hormona pankreasa - insulina, njegove poremećene biološke aktivnosti ili usled postojanja oba poremećaja (Bennett i Knowler, 2005). Hronična hiperglikemija dovodi do brojnih komplikacija koje narušavaju kvalitet života obolelih tako što izaziva dugotrajna oštećenja, poremećenu funkcionalnost i otkazivanje različitih organa kao što su oči, bubrezi, periferni nervi, srce i krvni sudovi (American Diabetes Association, 2013; Dholakia i sar., 2016). Termin *diabetes* je prvi put upotrebljen pre oko 250 godina pre nove ere i potiče od grčke reči koja u prevodu znači „teče kroz“ što se odnosi na glavni simptom ove bolesti – uzimanje tečnosti u velikim količinama i prekomerna produkcija urina. Termin *mellitus* je latinskog porekla i u prevodu znači „sladak“. Godine 1922. prečišćen je hormon insulin iz pankreasa krava nakon čega je započela njegova primena u terapiji obolelih od dijabetesa (Sapra i Bhandari, 2022). Insulin je hormon koji proizvode beta ćelije pankreasa, ima ulogu u regulaciji brojnih fizioloških procesa, a njegova ključna uloga je u održavanju koncentracije glukoze u krvi.

Podaci Međunarodne federacije za dijabetes (engl. *International Diabetes Federation*, IDF) pokazuju da je 2021. godine u svetu bilo oko 537 miliona odraslih osoba (starosti od 20 do 79 godina) obolelih od dijabetesa. Broj obolelih između polova je ujednačen, a najbrojnija je grupa starosti između 75 i 79 godina. Procenjuje se da će do 2045. godine broj obolelih u svetu da poraste na 783,2 miliona, a da se najveći porast očekuje u zemljama u razvoju (Sun i sar., 2022). Dijabetes je dijagnostikovao kod oko 480.000 odraslog srpskog stanovništva a procenjuje se da kod oko 38% obolelih dijabetes još uvek nije otkriven. U Srbiji je dijabetes peti vodeći uzrok smrtnosti i peti uzrok opterećenja bolestima pri čemu od ove bolesti i njegovih komplikacija godišnje umre oko 3.357 osoba (Batut, 2021).

Američko udruženje za dijabetes (engl. *The American Diabetes Association*, ADA) preporučuje klasifikaciju dijabetesa na osnovu procesa koji se nalaze u osnovi razvoja bolesti na četiri opšte kategorije a to su: dijabetes tipa 1, dijabetes tipa 2, specifični oblici dijabetesa i gestacioni dijabetes (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2021).

Dijabetes tipa 1 (DT1) je hronična autoimunska bolest kod koje hiperglikemija nastaje kao posledica delimičnog ili potpunog odsustva insulina usled gubitka beta ćelija pankreasa. Do razaranja beta ćelija dolazi usled inflamatorne reakcije (insulitis) koja je posredovana aktiviranim makrofagima i efektorskim T limfocitima, kao i zbog oslobođenih solubilnih medijatora gde spadaju citokini, azot oksid (engl. *nitric oxide*, NO) kao i reaktivne vrste kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS) (Bending i sar., 2012). DT1 je jedan od najčešćih endokrinih i metaboličkih poremećaja koji se javljaju u detinjstvu (Katsarou i sar., 2017). Pogađa oko 5-10% obolelih od dijabetesa, pri čemu su polovi podjednako obuhvaćeni (American Diabetes Association, 2013; Maahs i sar., 2010). DT1 je poligenska bolest u čiji razvoj su uključeni faktori iz spoljašnje sredine koji još uvek nisu dovoljno razjašnjeni, a neki od njih su virusne infekcije (Beyerlein i sar., 2016), period uvođenja čvrste nemlečne ishrane kod odojčadi (Rešić Lindehammer i sar., 2012) ili gestacione infekcije u toku rane trudnoće (Katsarou i sar., 2017; Rešić Lindehammer i sar., 2012). Marker koji ukazuju na autoimunsko razaranje beta ćelija su prisustvo autoantitela na ćelije endokrinog pankreasa, insulin, dekarboksilazu glutaminske kiseline i na tirozin fosfataze IA-2 i IA-2 β koji mogu biti prisutni godinama pre nego što se otkriju prvi simptomi bolesti (American Diabetes Association,

2013). U osnovi tretmana obolelih od DT1 se nalazi uzimanje insulina kroz svakodnevno injiciranje ili pomoću insulinskih pumpi kako bi se regulisao nivo glukoze u krvi.

Dijabetes tipa 2 (DT2) nastaje kao rezultat poremećene proizvodnje i redukovane sekrecije insulina, kao i insulinske rezistencije perifernih tkiva, pri čemu dolazi do progresivnog narušavanja funkcionisanja beta ćelija pankreasa i njihovog odumiranja procesom apoptoze (Butler i sar., 2003; LeRoith, 2002). Ovaj tip dijabetesa obuhvata ~90–95% osoba obolelih od dijabetesa i predstavlja ozbiljan globalni zdravstveni problem koji je evoluirao zajedno sa brzim kulturnim, ekonomskim i društvenim promenama. Najčešće se javlja kod odraslih osoba a i su sve više pogođena deca i mladi (American Diabetes Association Professional Practice Committee, 2021). Rizik od razvoja ovog oblika dijabetesa raste sa godinama, gojaznošću i sa smanjenom fizičkom aktivnošću, i češće se javlja kod osoba sa hipertenzijom i dislipidemijom i kod ženskih osoba kod kojih je bio dijagnostikovao gestacioni dijabetes (American Diabetes Association, 2013). Tokom života, ili barem na početku razvoja bolesti, ovim osobama nije potrebno lečenje insulinom da bi preživeli. S obzirom da broj i funkcija beta ćelija pankreasa polako opadaju i da se hiperglikemija kod ovih osoba razvija polako, dijagnoza se uglavnom uspostavi kada je bolest već uznapredovala (Tabák i sar., 2012). Na insulinsku rezistenciju se može uticati smanjenjem telesne težine i/ili primenom lekova koji utiču na hiperglikemiju (American Diabetes Association, 2013).

Specifični oblici dijabetesa uključuju bolesti koje nastaju kao posledica poremećene funkcionalnosti beta ćelija ili delovanja insulina usled postojanja mutacija na jednom genu, bolesti egzokrinog pankreasa kao što su cistična fibroza ili pankreatitis kao i dijabetes koji je indukovao lekovima, hemikalijama ili infekcijama.

Gestacioni dijabetes predstavlja dijabetes koji se prvi put dijagnostikuje u toku drugog ili trećeg trimestra trudnoće. Povećana koncentracija hormona kao što su progesteron, kortizol, prolaktin i estogen mogu da utiču na funkcionisanje beta ćelija i perifernu insulinsku senzitivnost (Kühl, 1998). Neregulisani dijabetes u toku trudnoće može da dovede do komplikacija i kod majke i kod deteta.

Bez obzira na kategoriju dijabetesa, bolest se karakteriše apsolutno ili relativno narušenom sposobnošću beta ćelija da proizvode i oslobađaju insulin, do čega dolazi usled izmenjenog funkcionisanja, poremećene proliferacije beta ćelija ili autoimunske reakcije (Donath i Halban, 2004). Kao rezultat ovakvih promena, kod obolelih dolazi do redukovanja mase beta ćelija koje je praćeno nedostatkom insulina, hiperglikemijom i istim hroničnim komplikacijama.

1.2. Endokrini pankreas

Pankreas je žlezdani organ koji ima dve važne uloge za funkcionisanje celog organizma: egzokrinu i endokrinu. Egzokrini deo pankreasa se sastoji od funkcionalnih jedinica koje čine acinusi sa odvodnim kanalima. Acinusi su sastavljeni od acinarnih ćelija koje proizvode, skladište i oslobađaju hormone za varenje hrane (tripsin, himotripsin, elastaza, lipaza i amilaza) koji se kroz pankreatični kanal izlučuju u dvanaestopalačno crevo (Karpińska i Czauderna, 2022). Endokrini deo pankreasa je sačinjen od grupacije ćelija koje podsećaju na miniorgane koji se nazivaju Langerhansova ostrvca, rasuti po pankreasu, i obuhvataju 1-2% mase celog pankreasa (Barker i sar., 2013). Ostrvca su sačinjena od pet različitih tipova endokrinih ćelija koji proizvode specifične hormone i to: alfa ćelije koje proizvode i oslobađaju glukagon, beta ćelije – insulin, delta ćelije – somatostatin, pp ćelije – pankreatični polipeptid i epsilon ćelije – grelin. Ćelije unutar ostrvca selektivno interaguju jedne sa drugima i formiraju kompleksnu regulatru mrežu koja je neophodna za pravilno funkcionisanje ostrvca. Interakcije unutar ostrvca su posredovane putem parakrine i autokrine signalizacije kao i molekulskim vezama između ćelija (Langlois i sar., 2022). Ostrvca su bogato vaskularizovana

(20% od ukupne snabdevenosti pankreasa) što im omogućava adekvatnu izloženost koncentraciji glukoze u krvi (Docherty i Russ, 2019). Beta ćelije endokrinog pankreasa su najzastupljeniji tip ćelija u Langerhansovim ostrvcima kod svih vrsta dok se njihov položaj u ostrvcu veoma razlikuje. Mišija ostrvca imaju organizovanu strukturu pri čemu su beta ćelije grupisane u centralnom delu a okružene su sa ostalim tipovima ćelija endokrinog pankreasa koje zazuzimaju periferni deo Langerhansovog ostrvca (Steiner i sar., 2010). U odnosu na miševе, humana ostrvca imaju veći procenat alfa ćelija pri čemu su one, zajedno sa beta i delta ćelijama, nasumično rasute po celom ostrvcu (Cabrera i sar., 2006). Humana ostrvca su sastavljena od oko 50% beta i oko 40% alfa ćelija. Od ukupnog broja beta ćelija oko 70% je u kontaktu sa alfa ćelijama. Od ukupnog broja alfa ćelija u mišijim i humanim ostrvcima je više od 90% u direktnom kontaktu sa beta ćelijama (Cabrera i sar., 2006; Steiner i sar., 2010).

1.3. Identitet ćelija endokrinog pankreasa i njihovo održavanje

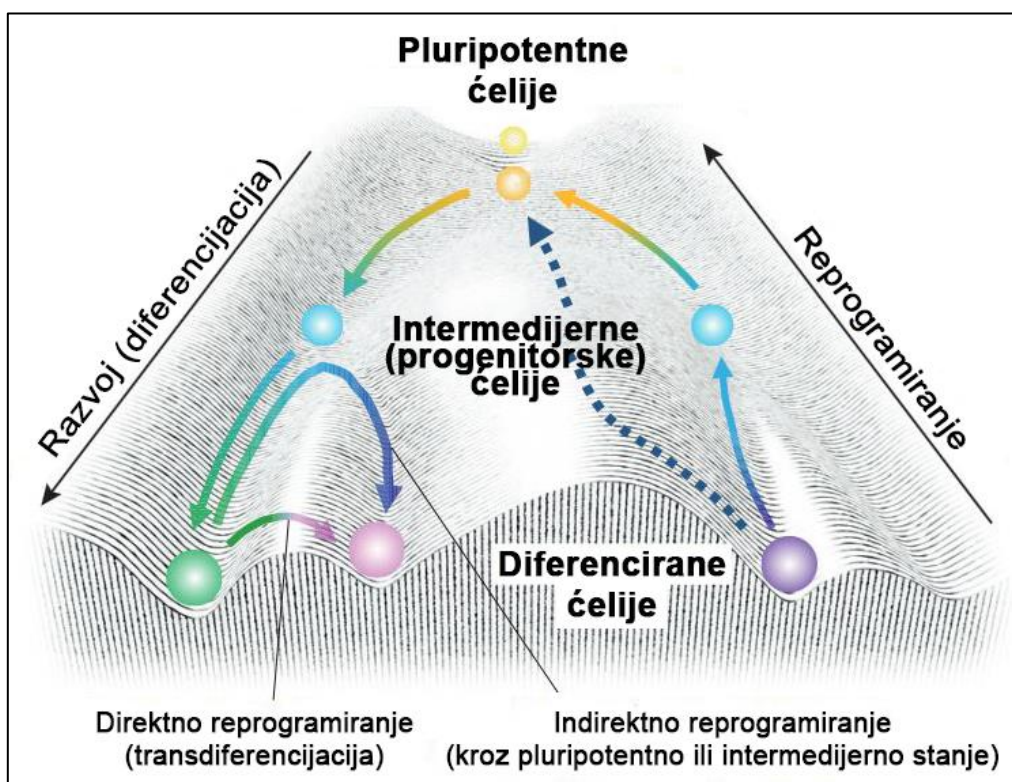
Termin „epigenetika“ je prvi put upotrebljen da bi se označila složena interakcija između genoma i životne sredine koja je uključena u razvoj i diferencijaciju organizama. Danas se ovaj termin odnosi na nasledne promene u genskoj ekspresiji koje nisu posledica promena u sekvenci molekula dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), već potiču od posttranslacionih modifikacija histona (kao što su acetilacija, fosforilacija, ubikvitinacija i sumoilacija) i metilacije molekula DNK. Takođe dugi nekodirajući molekuli ribonukleinske kiseline (RNK) imaju ulogu u iniciranju i održavanju epigenetičkih promena. Epigenom predstavlja kolekciju molekula koji mogu da se nasleđuju, a koji zajedno utiču na modulaciju strukture hromatina, funkciju genoma i obrazac ekspresije gena (Bernstein i sar., 2007). Transkripciona aktivnost je povezana sa određenim epigenetičkim oznakama. Tako su npr. reprimirani geni povezani sa metilacijom molekula DNK kao i sa posttranslacionim modifikacijama histonskih repova, a neke od njih su i trimetilacija 9og (engl. *tri-methylation of lysine 9 on histone H3*, H3K9me3) i 27og lizina na H3 histonu (engl. *tri-methylation of lysine 27 on histone H3*, H3K27me3) (O'Geen i sar., 2019).

Iako ćelije jednog višćelijskog organizma sadrže identičan genotip, tokom razvića se uspostavlja veliki broj ćelija sa različitim i stabilnim obrascem ekspresije gena koja omogućava njihovo funkcionisanje. Ćelijska diferencijacija koja se nalazi u osnovi razvoja višćelijskih organizama može se posmatrati kao epigenetički fenomen pri čemu dolazi do promena u identitetu ćelija (Goldberg i sar., 2007). U stabilnim uslovima ćelije adultnog organizma održavaju svoje diferencirano stanje, dok za vreme promena kao što su povrede ili upale dolazi do promena u identitetu ćelija (Mills i sar., 2019). Godine 1957. Waddington je opisao ćelijsku diferencijaciju definišući koncept epigenetičkog pejzaža po kojem se ćelije mogu zamisliti kao loptice koje se kotrljaju prema dnu brda po unapred definisanim razvojnim putanjama. U podnožju loptice miruju i stabilne su na pozicijama koje predstavljaju diferencirane tipove ćelija (Slika 1) (Waddington, 2014; Takahashi i Yamanaka, 2015). Međutim, sve je više dokaza da se granice između diferenciranih tipova ćelija mogu lako prevazići, od kojih veliki deo dolazi iz studija na pankreasu (Stanger i Hebrok, 2013). Naime, pluripotentne ćelije (Slika 1, žuta i narandžasta kuglica) u toku razvoja mogu da postanu bilo koje somatske ćelije (Slika 1, plava, roze i ljubičasta kuglica). Za razliku od indirektnog reprogramiranja, direktno reprogramiranje ili transdiferencijacija podrazumeva da jedan terminalno diferencirani tip ćelija (Slika 1, zelena loptica) može da se prebaci u drugi tip (Slika 1, roze kuglica), zaobilazeći pluripotentno intermedijerno stanje (Slika 1, plave kuglice). Razvoj tehnologije je omogućio i proces prebacivanja diferenciranih ćelija u pluripotentno ili progenitorsko stanje direktnim ili indirektnim putem (Slika 1) (Takahashi i Yamanaka, 2015).

Za stabilno održavanje identiteta jednog ćelijskog tipa kod višćelijskih organizama neophodna je aktivna regulacija specifičnog obrasca ekspresije ključnih transkripcionih

regulatora koji se održava kroz ćelijske deobe pomoću epigenetičkih mehanizama kao što su modifikacije hromatina i metilacija DNK molekula (Stanger i Hebrok, 2013).

Morfogeneza pankreasa započinje oko devetog embrionalnog dana (E9.5) sa pojavom dve evaginacije primitivnog endoderma creva na mesto gde se spajaju prednje i srednje crevo. Ovi tzv. pankreatični pupoljci se dalje razvijaju, rotiraju jedan ka drugome i spajajući se formiraju pankreas (Edlund, 2002). Sticanje i održavanje identiteta, kao i adekvatna funkcija ćelija koje čine zreli endokrini pankreas omogućeno je vremenskom i prostornom ekspresijom regulatornih faktora koji su specifični za ćelijski tip od kojih svaki ima specifičnu ulogu. Dominantni faktori koji određuju fenotip beta ćelija su: PAX4 (engl. *Paired box 4*), PDX1 (engl. *pancreatic and duodenal homeobox factor-1*, Pdx1), MAFA (engl. *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A*), dok su za alfa ćelije neophodni ARX i MAFB (engl. *V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*) (van der Meulen i Huising, 2015). Za rani razvoj pankreasa je od suštinskog značaja ekspresija regulatornog faktora PDX1. Gubitak funkcije PDX1 kod čoveka i miševa povezan je sa nepravilnim razvojem pankreasa, definišući njegovu ključnu ulogu u nastaku endokrinog i egzokrinog pankreasa (Jonsson i sar., 1994; Stoffers i sar., 1997). Prvi tip ćelija endokrinog pankreasa koji se javlja u toku razvića su glukagon-pozitivne alfa ćelije (Herrera i sar., 1991). Za njima slede ćelije koje proizvode insulin a koje često u isto vreme eksprimiraju i glukagon (Teitelman i sar., 1993).



Slika 1.1 Promena ćelijske sudbine po Waddington-ovom modelu epigenetičkog pejzaža. Pluripotentne stem ćelije (žuta i narandžasta kuglica) mogu da postanu bilo koja somatska ćelija (zelena, roze, ljubičasta) prolazeći kroz progenitorsko stanje (plava kuglica) ne samo u toku razvojnog procesa već i u odgovoru na signale iz okruženja u *in vitro* uslovima. Direktno reprogramiranje ili transdiferencijacija je proces koji omogućava da se terminalno diferencirani tip ćelije (zelena kuglica) prebaci u drugi terminalno diferencirani ćelijski identitet (roze loptica), bez obzira na njihovo germinativno poreklo zaobilazeći pri tom pluripotentno intermedijerno stanje. Stimulacija procesa transdiferencijacije se odvija uz pomoć transkripcionih faktora koji su specifični za neki ćelijski

identitet. Indirektno reprogramiranje podrazumeva upotrebu kombinacije malog seta faktora za reprogramiranje i optimalnih uslova za određenu ćelijski lozu pri čemu ćelije mogu da se prebace u drugi tip ćelija prolazeći kroz tranzijentno pluripotentno stanje. Nedavno razvijene tehnologije i alati mogu da budu iskorišćeni za vraćanje zrelih somatske ćelija (ljubičasta kuglica) u pluripotentne (žuta ili narandžasta) prolaskom kroz progenitorsko stanje (plava kuglica) ili direktnim putem (plava isprekidana strelica). Preuzeto i modifikovano iz (Takahashi and Yamanaka, 2015).

NGN3 (engl. *Neuro-genin 3*) je transkripcioni regulator koji pripada familiji proteina sa domenom zavojnica-petlja-zavojnica i reguliše nastanak prekursorskih ćelija endokrinog pankreasa i diferencijaciju različitih tipova ćelija endokrinog pankreasa. Odsustvo ovog faktora dovodi do toga da se endokrine ćelije pankreasa ne razvijaju (Gradwohl i sar., 2000). Kada se ciljano pojačano eksprimira u toku razvoja pankreasa miševa dovodi do prevremenog formiranja klastera koji su sačinjeni samo od alfa ćelija (Schwitzgebel i sar., 2000). Ovakav ishod je ukazao na značaj drugih faktora koji imaju važnu ulogu u kasnijem razvoju i specifikaciji ćelija endokrinog pankreasa (Saleh i sar., 2021).

PAX4 pripada familiji transkripcionih regulatora koji se vezuju za molekule DNK preko uparenog ili homeodomena i neophodan je za formiranje i održavanje fenotipa embrionalnih progenitorskih ćelija koje proizvode insulin, njihovo preživljavanje i proliferaciju, kao i kasnije sazrevanje beta i delta ćelija (Sosa-Pineda i sar., 1997). PAX4 deluje kao represor ekspresije gena za glukagon tako što je u kompeticiji sa aktivatorima za direktno vezivanje za promotor glukagona (Ritz-Laser i sar., 2002).

PDX1 je član familije proteina sa homeodomenima koji se vezuju za specifičnu sekvencu molekula DNK kako bi regulisali transkripciju ciljanih gena. Pored navedene uloge u ranom razvoju pankreasa, PDX1 je neophodan i za diferencijaciju i normalno funkcionisanje beta ćelija, kao i njihovo preživljavanje i proliferaciju. Pokazano je da se PDX1 vezuje za promotore gena koji su direktno uključeni u održavanje homeostaze glukoze kao što su *Insulin 1 (Ins1)*, *Insulin 2 (Ins2)*, *Ngn3*, glukozni transporter 2 (engl. *solute carrier family 2 member 2, Slc2a2*), glukokinaza (*Glc*) (Baumel-Alterzon i Scott, 2022).

MAFA i MAFB su transkripcioni faktori koji su važni za kasniji razvoj i sazrevanje ćelija endokrinog pankreasa. MAFA nema ulogu u specifikaciji beta ćelija ali je važan za njihovo sazrevanje. MAFA je direktno uključen u biosintezu insulina. On se vezuje za promotorski region gena za insulin i aktivira njegovu ekspresiju kao odgovor na glukoznu stimulaciju (Wang i sar., 2007). Kod miševa se detektuje rano tokom embrionalnog razvoja u ćelijama koje ekspimiraju insulin, a kasnije se ekspresija MAFA ograničava samo na zrele beta ćelije (Matsuoka i sar., 2004). MAFB je kod adultnih miševa eksprimiran isključivo u alfa ćelijama endokrinog pankreasa i deluje kao aktivator glukagonske ekspresije (Artnier i sar., 2006). Za razliku od miševa, u humanim ostrvcima se MAFB eksprimira i u alfa i u beta ćelijama i to na sličnom nivou (Dorrell i sar., 2011).

NKX2-2 (engl. *Homeobox protein NK-2 homolog B*) je član familije proteina sa homeodomenima koji ima važnu ulogu u specifikaciji endokrinih ćelija pankreasa. U zrelih beta ćelijama služi za formiranje karakteristične arhitekture Langerhansovog ostrvca i održavanje njihove funkcije što se odnosi i na optimalnu ekspresiju gena za insulin. Pretežno ima ulogu represora u diferencijaciji (Doyle i Sussel, 2007). U zrelih beta ćelijama NKX2-2 održava identitet beta ćelija delujući kao represor *Arx-a* (Papizan i sar., 2011).

NKX6-1 (engl. *NK6 homeobox 1*) kao i NKX2-2, neophodan je za pravilni embrionalni razvoj pankreasa, ima ulogu u ćelijskoj specifikaciji i insulinskoj sintezi i sekreciji. Ulogu u razvoju i funkcionisanju beta ćelija ostvaruje tako što kontroliše ekspresiju važnih transkripcionih faktora kao što je npr. *MafA*. U humanim adultnim ostrvcima ekspresija NKX6-1 je ograničena samo na beta ćelije. Usled odsustva ekspresije NKX6-1, beta ćelije dobijaju fenotipske karakteristike delta ćelija (Aigha i Abdelalim, 2020). Sa druge strane pojačana

ekspresija NKX6-1 u humanim ostrvcima dovodi do pojačane proliferacije beta ćelija (Schisler i sar., 2008). Defekti u ekspresiji NKX6-1 mogu da imaju veze sa patofiziologijom dijabetesa (Aigha i Abdelalim, 2020).

PAX6 (engl. *Paired box protein 6*) transkripcioni faktor je isto kao i prethodna dva neophodan za razvoj Langerhansovih ostrvaca pankreasa. U adultnom pankreasu PAX6 je eksprimiran u svim tipovima ćelija koje proizvode hormone. U imortalizovanim ćelijskim linijama PAX6 deluje kao aktivator gena za insulin, dok njegova delecija iz mišijih ostrvaca dovodi do hiperglikemije, redukovane ekspresije insulina, glukagona, somatostatina i pojačane ekspresije grelina. PAX6 deluje kao regulator ekspresije sledećih gena: *Ins 1 i 2, Pdx1, MafA, Slc2a2, Nkx6-1* i drugi (Gosmain i sar., 2012).

ISL1 (engl. *Islet-1*) učestvuje u preživljavanju i diferencijaciji progenitorskih ćelija endokrinog pankreasa. Ovaj transkripcioni faktor reguliše ekspresiju gena za *Ins, MafA, Pdx1* i *Slc2a2*. Rezultati nedavnih istraživanja su pokazali da ISL1 epigenetički reguliše identitet alfa ćelija, kao i sazrevanje beta ćelija. ISL1 deluje direktno ili indirektno na remodelovanje hromatina koje je u korelaciji sa promenama u genskoj ekspresiji u toku razvoja endokrinog pankreasa. Eliminacija Isl1 iz endokrinih ćelija pankreasa dovodi do izmena u H3K27me3 histonskoj modifikaciji u promotorskim regionima gena koji su esencijalni za diferencijaciju endokrinih ćelija pankreasa (Bohuslavova i sar., 2023).

POU3f4 (engl. *POU class 3 homeobox 4*) poznat i kao BRN4 (engl. *brain 4*) je član klase III velike familije proteina sa POU domenom. Eksprimira se specifično u progenitorskim ćelijama koje se kasnije diferenciraju u alfa ćelije pankreasa. Ima ulogu da direktno stimuliše ekspresiju glukagona (Hussain i sar., 2002).

Slc2a2 (engl. *solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2*) gen kodira za glukozni transporter GLUT2 (engl. *Glucose transporter 2*) koji se eksprimira u tkivima i ćelijama koji učestvuju u glukoznoj homeostazi kao što su jetra i beta ćelije pankreasa. GLUT2 ima ulogu da olakša prolaz glukoze kroz ćelijsku membranu (Thorens i sar., 1990). Takođe, on podstiče unutarćelijski metabolizam i adekvatnu sekreciju insulina (Berger i Zdziebło, 2020). U regulaciji ekspresije *Slc2a2* gena uključeni su brojni transkripcioni faktori specifični za beta ćelije, kao što su PDX1, HNF1A (engl. *HNF1 homeobox A*), HNF1B (engl. *HNF1 homeobox B*), NEUROD1 (engl. *neurogenic differentiation 1*). Nivo njegove ekspresije je povezan sa nivoom glukoze i insulina u krvi, a disfunkcionalna mutacija *Slc2a2* gena je pronađena kod obolelih od DT2 (Bae i sar., 2010).

1.3.1. Beta ćelije endokrinog pankreasa

U normalnim uslovima, beta ćelije proliferišu u maloj meri i imaju dugačak životni vek, dok se u uslovima povećane fiziološke potrebe njihovo umnožavanje povećava (Dor i sar., 2004; Teta i sar., 2005). Masa beta ćelija jednog organizma je određena ukupnim brojem i veličinom ćelija koja se progresivno povećava u toku perioda rasta i razvoja organizma, dostiže svoj maksimum tokom odraslog doba i opada sa starenjem (Ackermann i Gannon, 2007). Iako se ranije smatralo da je smanjenje broja beta ćelija u dijabetesu posledica njihovog umiranja, danas je sve više podataka koji ukazuju na to da beta ćelije gube svoj identitet i funkciju procesima dediferencijacije i transdiferencijacije (Remedi i Emfinger, 2016). Do dediferencijacije beta ćelija dolazi usled smanjene genske ekspresije ključnih markera beta ćelija kao što su geni za glavne transkripcione faktor (*MafA, NeuroD1, Nkx6-1* i *Foxo1* (engl. *Forkhead box protein O1*)) kao i do povećanja ekspresije netipičnih gena za beta ćelije (npr. *laktat dehidrogenaza*) ili tipičnih za progenitorske ćelije (*Neurog3*). Takođe, transdiferencirano stanje beta ćelija se ogleda kroz njihovu proizvodnju hormona specifičnih za druge tipove ćelija endokrinog pankreasa. Do ovih promena dolazi iz više razloga od kojih

se mogu izdvojiti ćelijski stres ili starenje, a one služe kao zaštitni mehanizmi kako bi se zaobišlo oštećenje ili ćelijska smrt (Moin i Butler, 2019).

Beta ćelije pankreasa deluju kao senzori koji oslobađaju insulin nakon porasta koncentracije glukoze u cirkulaciji nakon svakog obroka. Oslobođeni insulin dovodi do smanjenja glukoze u cirkulaciji tako što deluje direktno na ćelije tkiva koja imaju različite uloge u metaboličkoj homeostazi kao što su ćelije jetre, mišićne ćelije i beli adipociti. U skeletnim mišićima insulin promoviše skladištenje glukoze njenim uključivanjem u proces sinteze glikogena. Insulin aktivira proces sinteze glikogena i deluje tako što smanjuje ekspresiju gena koji su uključeni u proces glukoneogeneze u jetri. U belim adipocitima insulin zaustavlja lipolizu, povećava unos glukoze i pokreće lipogenezu (Petersen i Shulman, 2018). Odusutvo insulina ili rezistencija na insulin smanjuju unos glukoze u ćelije ciljnih tkiva, što dovodi do hiperglikemije. Kada hiperglikemija postane hronična dovodi do toga da glukoza, koja inače služi kao izvor energije, postane toksična, indukujući štetne efekte na stukturu i funkcionisanje ćelija u različitim organima (Robertson i sar., 2004).

1.3.1.1. Sinteza i oslobađanje insulina

Za razliku od većine sisara koji poseduju jedan gen za insulin, u genomu miševa, pacova i nekih riba postoje dva gena koji imaju 93% homologne sekvence u kodirajućem delu gena. To su *Ins1* (Gene ID: 16333) i *Ins2* (GeneID: 16334) koji kod pacova kolokalizuju na hromozomu 1, dok se kod miševa nalaze na 19. i 7. hromozomu (Melloul i sar., 2002). Oba gena su funkcionalna i ispoljavaju različit obrazac ekspresije za vreme embrionalnog razvoja što ukazuje na nezavisnost njihovih regulatornih mehanizmima (Deltour i sar., 2004). *Ins2* je strukturno i funkcionalno sličniji genu za insulin kod drugih sisara u odnosu na *Ins1* (Wentworth i sar., 1986). Pokazano je da nivo ekspresije *Ins1* opada sa porastom broja pasaža Min6 ćelijske linije, dok se u odgovoru na stimulaciju glukozom nivo ekspresije povećava. Ipak, za *Ins2* nisu primećeni takvi efekti (Roderigo-Milne i sar., 2002). Babaya i saradnici su 2006. godine pokazali da je *Ins1* funkcionalno „defektan gen” u odnosu na *Ins2*, i da on sam nije dovoljan da prevenira dijabetes (Babaya i sar., 2006). Insulin se sintetise kao prekursorski molekul preproinsulin koji se proteolitički modifikuje prolazeći kroz različite ćelijske odeljke, dostižući formu zrelog hormona. Beta ćelije pankreasa sadrže izuzetno visoku koncentraciju jona Zn^{2+} koji je neophodan za sintezu, strukturalnu stabilnost i sekreciju insulina (Fukunaka i Fujitani, 2018). Naime, insulin se skladišti kao heksamerni molekul zajedno sa dva jona Zn^{2+} i jednim molekulom Ca^{2+} u sekretornim granulama u citoplazmi beta ćelija (Tokarz i sar., 2018). Pored ove, joni Ca^{2+} imaju i veoma važnu ulogu u oslobađanju insulina u fiziološkim uslovima. Glukoza ostvaruje efekte na kontrolu koncentracije jona Ca^{2+} u endoplazmatičnom retikulumu, mitohondrijama, nukleusu i citoplazmi, a poremećaji u regulaciji koncentracije su primećeni u DT2. Porast u koncentraciji jona Ca^{2+} u citoplazmi beta ćelija direktno stimuliše egzocitozu insulinskih vezikula, a sa druge strane inicira više signalnih kaskada (Klec i sar., 2019; Sabatini i sar., 2019).

Proces oslobađanja insulina iz beta ćelija je stimulisan glukozom (engl. *glucose-stimulated insulin secretion* – GSIS), započinje njenim ulaskom u beta ćelije olakšanom difuzijom posredstvom GLUT2 transportera glukoze visokog kapaciteta i niskog afiniteta (Newgard i McGarry, 1995). Glukoza se u beta ćelijama fosforiliše od strane enzima glukokinaze koja deluje kao njen senzor, zatim se uvodi u proces glikolize pri čemu nastaju produkti koji se dalje metabolišu. Kao rezultat dolazi do porasta ATP/ADP odnosa koji dovodi do zatvaranja ATP senzitivnih K^+ kanala. Depolarizacija ćelijske membrane inicira otvaranje voltažno zavisnih kanala za Ca^{2+} , nakon čega raste koncentracija Ca^{2+} u ćeliji. To dovodi do spajanja sekretornih vezikula koje sadrže insulin sa ćelijskom membranom i oslobađanja insulina u cirkulaciju (Henquin, 2011).

1.3.2. Alfa ćelije endokrinog pankreasa

Godine 1922. u slično vreme kad i insulin, izolovan je tzv. „toksični faktor“ ili hiperglikemijska supstanca iz ekstrakta pankreasa pasa, koja je godinu dana kasnije dobila naziv glukagon (Ahrén, 2015). Alfa ćelije endokrinog pankreasa su prvenstveno definisane kao subpopulacija ćelija koja se razlikuje od ćelija koje proizvode insulin. Godine 1948. je ustanovljeno da su alfa ćelije pankreasa primarni izvor glukagona (Sutherland i De Duve, 1948). Kao najvažniji proizvod alfa ćelija pankreasa, hormon glukagon (GCG) ima bitnu ulogu u regulisanju homeostaze glukoze. On se oslobađa u uslovima kada je koncentracija glukoze u cirkulaciji smanjena (hipoglikemija) i deluje suprotno u odnosu na insulin (Gromada i sar., 2018). Ključna uloga glukagona je da poveća oslobađanje glukoze iz jetre u uslovima gladovanja i vežbanja, ostvarujući efekat na procese glikogenolize i glukoneogeneze dok inhibira proces sinteze glikogena. Alfa ćelije su u velikoj meri pozicionirane blizu beta ćelija, što je posebno izraženo u humanim ostrvcima, ukazujući na parakrinu komunikaciju između ovih tipova ćelija. Veze između njih se ostvaruju pomoću ćelijskih athezionih molekula, površinskih receptora i supstanci koje difunduju između njih (Bosco i sar., 2010; Unger i Orci, 2010). Glukagon takođe ostvaruje i autokrine efekte. S obzirom da je glukagon prvi peptidni hormon koji se javlja u toku embrionalnog razvića pankreasa, pokazano je da svojim parakrinim delovanjem ostvaruje i potencijalnu ulogu u diferencijaciji i razvoju beta ćelija (Prasadani i sar., 2002).

Alfa ćelije imaju i veoma važnu ulogu u zaštiti beta ćelija. Naime, gen za proglukagon kodira za veliki prekursor prohormona koji se iseca od strane konvertaze prohormona pri čemu nastaje glukagon kao najvažniji bioaktivni peptid i peptidi slični glukagonu kao deo glavnog neaktivnog proglukagonskog fragmenta. Kada su beta ćelije oštećene, oslobađaju parakrini signal koji aktivira pomenutu konvertazu prohormona 1/3 pri čemu nastaje peptid sličan glukagonu 1. Ovaj produkt deluje pozitivno na regeneraciju oštećenih beta ćelija (Kieffer i Habener, 1999; Sandoval i D'Alessio, 2015). Dok su ovi efekti glukagona dobro okarakterisani, celokupna uloga alfa ćelija u ostrvcima još uvek nije potpuno istražena. Kod obolelih od DT1, kod kojih gotovo da nema beta ćelija, alfa ćelije zauzimaju oko 75% od ukupnog broja ćelija ostrvacca (Orci i sar., 1976), pri čemu ne dolazi do promene u odnosu broja alfa, delta i PP ćelija (Rahier i sar., 1983). Kod obolelih od DT2 javlja se hiperplazija alfa ćelija (Rahier i sar., 1983). Proliferacija alfa ćelija kao odgovor na narušen signalni put glukagona je konzervirana pojava koja se dešava kod kičmenjaka, uključujući zebra ribice i čoveka (Dean i sar., 2017; Kim i sar., 2017).

1.3.2.1. *Arx kao ključni faktor za razvoj i održavanje identiteta alfa ćelija pankreasa*

Gen za *Arx* kodira za homeodomenski protein koji spada u grupu faktora transkripcije koji su specifični za sekvencu, i imaju važnu ulogu u toku razvoja. Smešten je na X hromozomu na poziciji Xp22.3-p21.1 (Strømme i sar., 2002). *Arx* protein sadrži dva konzervirana domena i to C-peptid (*aristaless* domen) i homeoboks domen koji je sličan Prd klasi (engl. *Paired-like*, PRD-like). *Arx* se eksprimira u testisima, skeletnim mišićima, mozgu i endokrinom pankreasu (Xu i Xu, 2019). Ima važnu ulogu u razvoju centralnog nervnog sistema, neophodan je za pravilan razvoj i migraciju interneurona koji oslobađaju gama-aminobuternu kiselinu (engl. γ -aminobutyric acid, GABA). Mutacije u genu za *Arx* dovode do poremećaja povezanih sa X hromozomom kao što su ageneza Corpus callosum-a sa abnormalnim genitalijama (Proud sindrom), lizencefalija koja nastaje zbog poremećene neuronalne migracije, razvojna i epileptička encefalopatija 1 (Friocourt i Parnavelas, 2010).

Godine 2003. je prvi put opisana uloga *Arx*-a u razvoju endokrinog pankreasa, a pokazano je da se eksprimira u svim njegovim razvojnim fazama, ograničavajući svoju

ekspresiju samo na ćelije koje proizvode glukagon u adultnom periodu (Collombat i sar., 2003). Miševi koji su imali mutirani *Arx* su pokazivali usporen rast, bili dehidrirani, razvijali su hipoglikemiju i umirali 2 dana nakon rođenja. Kod ovih životinja nisu pronađene alfa ćelije, ali je primećeno da je broj beta i delta ćelija uvećan. Na osnovu činjenice da je ukupan broj endokrinih ćelija ostao nepromenjen pretpostavljeno je da *Arx* ima ulogu u definisanju identiteta alfa ćelija. Ekspresija informacione RNK (iRNK) za *Pax4* je u ovim embrionima bila znatno povišena (Collombat i sar., 2003). Kod miševa koji su pojačano eksprimirali *Arx* u prekursorskim ćelijama i ćelijama endokrinog pankreasa primećen je zastoj u razvoju, odsustvo beta i delta ćelija, hipoplazija pankreasa i hiperglikemija. Miševi su umirali u roku od 2 do 12 nedelja nakon rođenja. Pojačana ekspresija *Arx*-a je dovela do povećanja broja ćelija koje proizvode glukagon i pp ćelija (Collombat i sar., 2009). Indukovanje ekspresije *Arx*-a u embrionalnim ili adultnim beta ćelijama dovodi do gubitka njihovog fenotipa, dok se istovremeno povećava broj ćelija koje poseduju karakteristike alfa i pp ćelija. Na osnovu rezultata ovih istraživanja zaključeno je da *Arx* ključan za specifikaciju i održavanje identiteta alfa ćelija pankreasa. Takođe, on nije samo neophodan, već je i dovoljan da bi progenitorske beta ćelije endokrinog pankreasa preuzele ulogu alfa ćelija (Collombat i sar., 2007).

PAX4 ima ulogu regulatora transkripcije gena koji kodira za ARX, delujući tako što inhibira njegovu ekspresiju. Vezuje se za cis-regulatorni element koji se nalazi ~14.2 kb nizvodno od mesta za zaustavljanje translacije. Kod miševa kod kojih su mutirani *Arx* i *Pax4* dolazi do razvoja ćelija koje imaju karakteristike delta ćelija (Collombat i sar., 2005). Oba ova faktora transkripcije imaju veoma važnu ulogu u pravilnoj raspodeli broja endokrinih ćelija pankreasa u okviru Langerhansovih ostrvaca, delujući antagonistički, pod pretpostavkom da unakrsno inhibiraju jedan drugog (Collombat i sar., 2003). Regulator transkripcije ISL-1 je aktivator *Arx*-a, vezuje se za dva različita konzervirana regiona koji se nalaze u trećem intronu (~5,6 kb nizvodno od mesta početka transkripcije (engl. *transcription start site*, TSS)) a drugi je udaljen oko 18 kb od prvog i imaju aditivni efekat (Liu i sar., 2011).

1.3.2.2. Metilacija DNK u održavanju identiteta alfa i beta ćelija pankreasa

Metilacija molekula DNK podrazumeva proces kovalentne modifikacije molekula DNK metil grupama. Predstavlja jedan od mehanizama regulacije genske ekspresije koji ima ključnu ulogu u održavanju identiteta beta ćelija pankreasa. Metilacija molekula DNK obezbeđuje stabilno nasleđivanje obrasca genske ekspresije po kome se geni drže reprimirani i zaključani, a održava se zahvaljujući enzimima metiltransferazama (engl. *DNA methyltransferase*, Dnmt) (DNMT1, DNMT3a, i DNMT3b) i enzimima koji vrše demetilaciju (engl. *Ten Eleven Translocation*, Tet) (TET1, TET2, i TET3). Takođe, metilacija ima ulogu u genomskom imprintingu, inaktivaciji X hromozoma i tumorogenezi (Smith i Meissner, 2013). Obrazac metilacije molekula DNK je specifičan za tip ćelija ili tkivo. Ova modifikacija se u ćelijama sisara uglavnom nalazi u okviru CpG dinukleotida na određenim pozicijama u DNK molekulu. (Klose i Bird, 2006). Kada je locirana u promotorskim regionima gena bogatim CpG-ovima (CpG ostrvca) i egzonu 1, povezana je sa represijom ekspresije gena (Brenet i sar., 2011; Goll i Bestor, 2005). Enzimi DNK metiltransferaze imaju različite funkcije pa je tako DNMT1 DNK metiltransferaza koja ima ulogu u održavanju obrasca već uspostavljene metilacije. Obrazac metilacije DNK molekula se uspostavlja pomoću metiltransferaza koje vrše *de novo* metilaciju a to su DNMT3a i DNMT3b, interagujući sa DNMT3L koji ima ulogu da pojačava njihovu aktivnost (Miranda i Jones, 2007).

Glavni inicijator pokretanja transkripcionog programa predstavlja različito epigenetičko obeležavanje ključnih gena koji promovisu ćelijski identitet, kao što je *Arx* u alfa ćelijama (Liu i sar., 2011). U eksperimentima u kojima je korišćena mišija pankreatična alfa ćelijska linija α TC1 i insulinoma beta ćelijska linija Min6 pokazano je da postoji razlika u obrascu metilacije u regulatornom regionu gena koji kodira za *Arx* a koji je bogat CpG

dinukleotidima. Regulatorni regioni su podeljeni u dve grupe i označeni kao UR1 region – CpG mesta koja se nalaze u okviru proksimalnog promotora i blizu su TSS-a (od -251 do -176), i UR2 region koji se nalazi oko 2 kb uzvodno od TSS-a (od -2103 do -1992 bp). Rezultati su pokazali da ne postoji razlika u metilacionom statusu u okviru UR1 regiona između ove dve ćelijske linije, ali da je najveći broj CpG dinukleotida u okviru UR2 regiona u beta ćelijama metilovan, za razliku od alfa ćelijske linije gde su oni nemetilovani. Na oko 2,5 kb uzvodno od TSS-a se nalazi region nazvan UR3 (od -2500 do -3000 bp) koji pokazuje sličan obrazac metilacije kao i UR2. Takođe je pokazano da beta ćelije pankreasa miševa kojima nedostaje Dnmt1 postepeno zadobijaju identitet alfa ćelija, što je potvrđeno i u *in vitro* studijama korišćenjem Min6 ćelijske linije. Ove promene su u korelaciji sa promenom u metilacionom statusu UR2 regiona. Za metilovani UR2 region se vezuje metil CpG vezujući protein 2 (engl. *Methyl CpG binding protein 2*, MeCP2), koji dalje regrutuje druge proteine kao što je Prmt6 (engl. *protein arginine methyltransferase 6*), enzim koji metiluje histon H3 na drugom argininu (H3R2), rezultujući supresijom ekspresije *Arx*-a (Dhawan i sar., 2011). Kada se proces metilacije molekula DNK inhibira u progenitorskim ćelijama pankreasa nakon tretmana pomoću hemijskog agensa za globalnu demetilaciju 5-azadeoksicitidina (engl. 5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC), dolazi do poremećenog odnosa broja alfa i beta ćelija, pri čemu je broj alfa ćelija povećan. Ovi rezultati naglašavaju aktivnu ulogu metilacije molekula DNK koja se može posmatrati kao okosnica za prenošenje histonskih modifikacija, doprinoseći zatvaranju hromatinske strukture oko *Arx* gena kako bi se očuvao identitet beta ćelija kroz ćelijske deobe (Dhawan i sar., 2011). Na poziciji -1502~-1483 uzvodno od TSS-a *Arx* gena nalazi se vezivno mesto za NKX2-2, koji može da regrutuje represorski kompleks zajedno sa GRG3 (engl. *groucho-related gene 3*), DNMT3a i histonskom deacetilazom HDAC1 na promotor *Arx*-a i na taj način definiše izbor pri diferencijaciji i kasnije održavanje identiteta beta ćelija (Papizan i sar., 2011). U promotoru *Arx* gena blizu mesta vezivanja NKX2-2, na poziciji -1552~-1547 uzvodno od TSS-a, se nalazi mesto vezivanja specifično za FOXO (engl. *Foxo responsive element*, FRE). Vezivanje transkripcionog regulatora FOXO1 za FRE dovodi do uklanjanja represorskog kompleksa sa promotora *Arx*-a, rezultujući u hipometilaciji i pokretanju ekspresije iRNK za *Arx*. Sa druge strane, korepresor FOXO1 (engl. *Foxo1 Corepressor*, FcoR) ima suprotan efekat. Naime, FcoR ima ulogu da acetilacije FOXO1 u citoplazmi i na taj način inhibira ulazak ovog transkripcionog faktora u jedro. Oslobođanjem vezivnog mesta za FOXO1 na promotoru *Arx* gena se pospešije vezivanje DNMT3a. Nakon toga dolazi do formiranja represorskog kompleksa na promotoru i utišavanje ekspresije gena za ARX (Kodani i sar., 2020).

1.4. Terapija dijabetesa

U tretmanu dijabetesa su uključeni farmakološki i ćelijski pristupi (Cornell, 2015). Farmakološki pristup podrazumeva upotrebu insulina i lekova koji deluju na povećanje senzitivnosti ćelija na insulin, stimulaciju insulinske sekrecije i na poboljšanje kontrole glikemije. I pored velikog napretka na polju lečenja dijabetesa, tretmani koji se trenutno koriste nisu u potpunosti efikasni u normalizaciji homeostaze glukoze. Egzogeno dodavanje insulina ne uspeva da reguliše svakodnevne nate visokog nivoa glukoze u krvi. Dugoročno gledano, neadekvatna kontrola glikemije dovodi do vaskularnih bolesti i niza komplikacija, uključujući slepilo i otkazivanje bubrega (Michels i sar., 2022). Ćelijski pristup u terapiji uključuje transplantaciju pankreasa i Langerhansovih ostrvaca poreklom od donora, najčešće u jetru pacijenata sa DT1. Transplantacija Langerhansovih ostrvaca ili celog pankreasa predstavlja jedan od pristupa u terapiji dijabetesa koji za cilj ima zamenu oštećenih ili nadomeštanje mase beta ćelija. Iako efikasan, ovakav pristup se susreće sa brojnim nedostacima koji sprečavaju široku primenu ove terapije, kao što su ograničen broj donora kao i pridruženi sporedni efekti imunosupresivnih lekova.

S obzirom na konstantan porast u broju obolelih od dijabetesa u svetu, pronalaženje novih terapijskih pristupa koji bi delovali na očuvanje preostalih i sprečavanje daljeg gubitka funkcionalnih beta ćelija predstavlja važan pravac u istraživanjima (Ackermann i Gannon, 2007; Basile i sar., 2022). Velika je pažnja usmerena ka stimulaciji replikacije i rasta novih beta ćelija od rezidualnih (preostalih) progenitorskih ćelija, kako bi se zamenile one koje su uništene od strane autoimunskog sistema ili zbog glukolipotoksičnosti (Stanojevic i Habener, 2015). U poslednje vreme istraživači su uložili veliki napor u identifikaciji alternativnih izvora beta ćelija, na tzv. terapiju zamenom ćelija (Basile i sar., 2022; Khurana i sar., 2021). Zato su se fokusirali na pokušaje diferencijacije embrionalnih i indukovanih pluripotentnih stem ćelija kao i na reprogramiranje drugih terminalno diferenciranih tipova ćelija koje su već prisutne u organizmu u ćelije koje će reagovati na glukozu i oslobađati insulin, tzv. ćelije koje će ličiti na beta ćelije pankreasa (Borowiak i Melton, 2009). Pokazano je da indukovane pluripotentne ćelije koje su izolovane iz dijabetičnih pacijenata, nakon transdiferencijacije u beta ćelije koje su imale sposobnost da odgovore na stimulaciju glukozom u *in vitro* uslovima, pozitivno utiču na hiperglikemiju nakon insertovanja u dijabetične miševе (Maxwell i sar., 2020).

Matične ćelije predstavljaju obnovljive izvore ćelija sa velikim potencijalom diferencijacije u druge tipove ćelija, kao što su npr. beta ćelije pankreasa (Chen i sar., 2020). Uprkos značajnim prednostima i njihovoj upotrebi u različitim oblastima, korišćenje matičnih ćelija u ćelijskoj terapiji kod obolelih od dijabetesa još uvek ograničavaju brojne prepreke. Adultnih matičnih ćelija ima jako malo u organizmu a i njihova izolacija je vrlo zahtevna. Nakon diferencijacije, ove ćelije mogu da budu meta autoimunskog napada koji je već uništio originalne beta ćelije pankreasa. Takođe neke od njih pokazuju tumorogenu prirodu (Ghoneim i sar., 2020).

1.5. Modeli konverzija somatskih ćelija u ćelije koje proizvode insulin

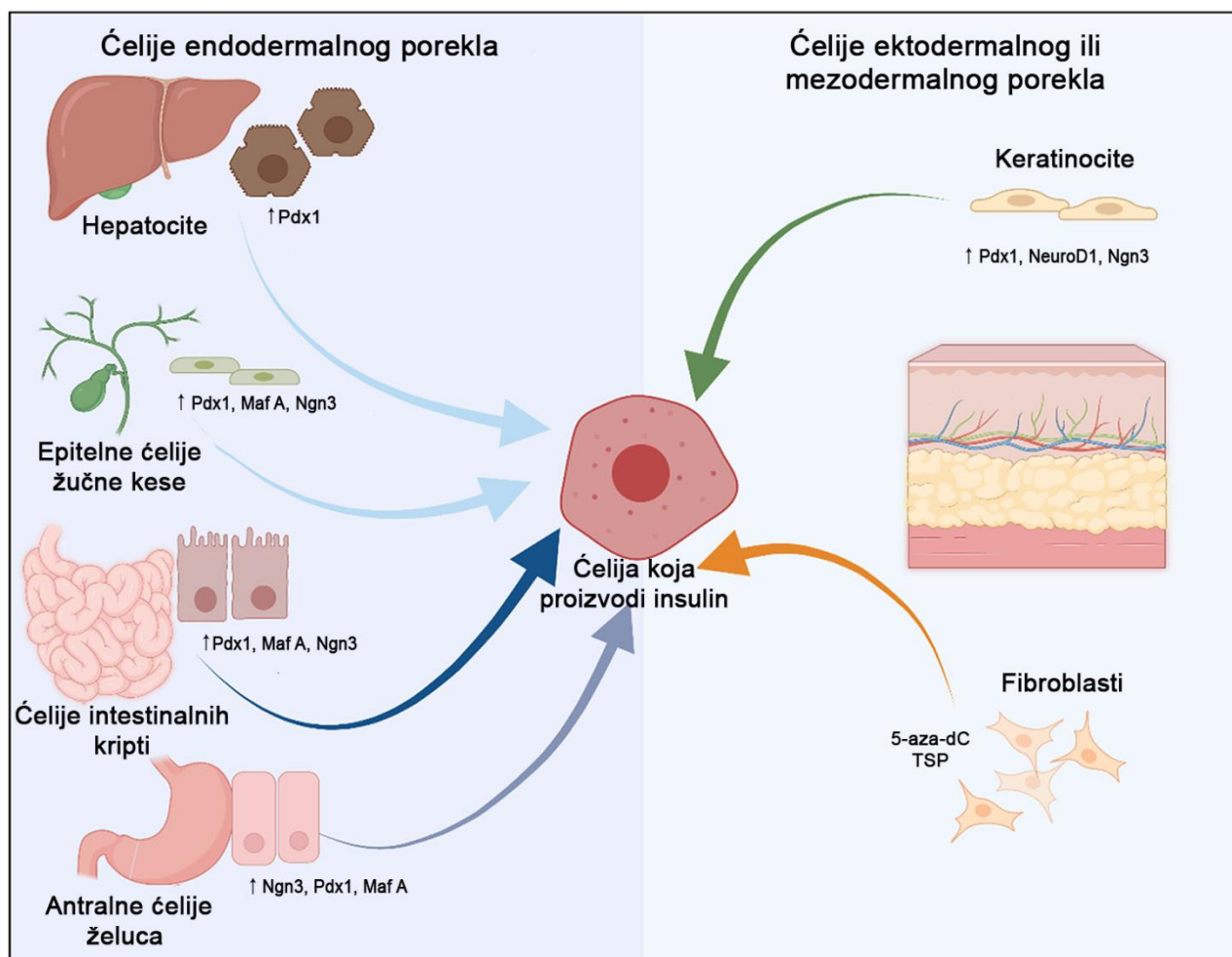
Ćelijska plastičnost predstavlja sposobnost ćelija da promene svoj fenotip kao odgovor na zahteve iz okruženja ali bez promena u genetičkom materijalu. Mogućnost nastanka novih beta ćelija procesom transdiferencijacije od drugih tipova somatskih ćelija (Habener i Stanojevic, 2012; Yang i sar., 2002) upućuje na to da buduća istraživanja treba usmeriti u pravcu pronalaženja novih faktora koji bi stimulisali ovaj proces. Istraživanja na polju diferencijacije i plastičnosti ćelija endokrinog pankreasa doprinose boljem razumevanju procesa koji bi mogli da se iskoriste za formiranje i nadomeštanje broja beta ćelija. Identifikacija i ciljana stimulacija ili supresija transkripcionih faktora koji regulišu ekspresiju gena koji učestvuju u pravilnom funkcionisanju beta ćelija bi omogućila unapređenje terapijskih pristupa u lečenju dijabetesa.

1.5.1. Transdiferencijacija somatskih ćelija u ćelije koje proizvode insulin

Transdiferencijacija je proces direktne promene jednog terminalno diferenciranog ćelijskog tipa u drugi nakon modifikacije transkripcionog profila ćelija. Brojni pokušaji transdiferencijacije pankreatičnih (Slika 1.3) i različitih tipova ćelija (Slika 1.2) koje nisu poreklom iz pankreasa u ćelije koje proizvode insulin do sada su uspešno završeni.

Ćelije jetre su interesantne pre svega zbog svog regenerativnog potencijala, ali i endodermalnog porekla koje dele sa pankreatičnim i ćelijama žučne kese. Nakon tranzijentne ekspresije Pdx1 u hepatocitima dolazi do ekspresije nekoliko gena koji su specifični za ćelije endokrinog pankreasa i do oslobađanja insulina. Ova promena u ekspresiji može da dovede do

poboljšanja hiperglikemije kod miševa kojima je dijabetes izazvan streptozotocinom, hemijskim agensom koji predstavlja citotoksični analog glukoze (Ferber i sar., 2000).



Slika 1.2 Nepankreatične ćelije kao izvor ćelija za transdiferencijaciju u ćelije koje proizvode insulin. Ćelije endodermalnog porekla koje su uspešno transdiferencirane u ćelije koje proizvode insulin spadaju hepatocite, epitelne ćelije žučne kese, ćelije intestinalnih kripti i antralne ćelije želuca. U ćelije ektodermalnog porekla spadaju keratinocite, a fibroblasti su ćelije mezodermalnog porekla. Ispod svakog tipa ćelija je dat spisak transkripcionih faktora ili tretmana koji su primenjeni u cilju transdiferencijacije. Preuzeto i modifikovano od (Kalo i sar., 2022).

Epitelne ćelije žučne kese su se takođe razmatrale kao potencijalno primamljiva ćelijska niša za transdiferencijaciju zbog činjenice da žučna kesa može da se ukloni bez ozbiljnih posledica po pacijenta. U primarnim mišijim epitelnim ćelijama žučne kese u kojima se indukuje ekspresija *Ngn3*, *Pdx1*, i *MafA* aktiviraju se geni karakteristični za beta ćelije. Proces reprogramiranja se dodatno pojačava dodavanjem retinoične kiseline ili inhibitora Notch signalnog puta. Ćelije koje su reprogramirane na ovaj način nemaju sposobnost GSIS-a, ali su sposobne da prežive i da oslobađaju insulin nakon njihove transplantacije u miša (Hickey i sar., 2013).

Kombinacija NGN3, PDX1, i MAFA transkripcionih regulatora korišćena je i za indukovanje transdiferencijacije ćelija antralnog dela želuca (Ariyachet i sar., 2016). Chen i saradnici su pokazali da ćelije intestinalnih kripti mogu da podlegnu konverziji i spajanju u „novoformirana ostrvca“ ispod baze kripte nakon indukovane ekspresije *Pdx1*, *MafA* i *Ngn3*. Ovako nastale ćelije koje podsećaju na beta ćelije pankreasa imale su sposobnost da

oslobađaju insulin, da reaguju na stimulaciju glukozom i da pozitivno utiču na glikemiju dijabetičnih miševa (Chen i sar., 2014).

Humani keratinociti koji su ektodermalnog porekla imaju sposobnost transdiferencijacije u ćelije koje proizvode i oslobađaju insulin kao odgovor na povećanu koncentraciju glukoze. Do transdiferencijacije dolazi usled indukovanja ekspresije transkripcionih faktora specifičnih za beta ćelije kao što su *Pdx1*, *NeuroD1*, *Ngn3* u kombinaciji sa visokom koncentracijom glukoze. U ovim ćelijama je proizvodnja insulina ograničena na kratak vremenski period od nekoliko dana u $12 \pm 8\%$ reprogramiranih ćelija u *in vitro* uslovima (Mauda-Havakuk i sar 2011).

Fibroblasti kože tek rođenih miševa su samo pomoću malih molekula i faktora rasta u *in vitro* uslovima efikasno prevedeni u ćelije koje proizvode insulin. Ove ćelije su u toku procesa transdiferencijacije prošle kroz tranzijentno pluripotentno stanje (Salman i sar., 2022). Pokazano je i da je kratkotrajna izloženost (18 h) humanih fibroblasta kože neselektivnom inhibitoru DNK metiltransferaza koja je praćena trostepenim protokolom (TSP) za indukovanje transdiferencijacije (36 dana) dovoljna da se oni prevedu u ćelije sa epitelnom morfologijom, da proizvode insulin i da ga aktivno oslobađaju u odgovoru na fiziološke promene glukoze u *in vitro* uslovima. Takođe, nakon isertovanja ovih ćelija u dijabetične miševе uspostavlja se normalan nivo glukoze u životinjama kod kojih nisu zapažene maligne transformacije ili migracije ovih ćelija u druge organe ili limfne čvorove (Brevini i sar., 2018).

Acinarne ćelije koje pripadaju egzokrinom delu pankreasa imaju sposobnost da se transdiferenciraju u ćelije koje proizvode insulin nakon tretmana sa adenovirusom koji nosi informacije za tri transkripciona faktora (NGN3, MAFA i PDX1) u *in vivo* uslovima. Te nove ćelije koje su slične beta ćelijama imaju sposobnost da formiraju klastere ili tzv. pseudostrvca što im obezbeđuje bolje preživljavanje i veću funkcionalnost, rezultujući u poboljšanju stanja dijabetičnih životinja (Li i sar., 2014). Takođe je pokazano i da humane acinarne ćelije poseduju sposobnost transdiferencijacije i ublažavanja dijabetesa kada se u njima aktivira MAPK (engl. *Mitogen-activated protein kinase*) i STAT3 (engl. *Signal transducer and activator of transcription 3*) put signalne transdukcije uz pomoć lentivirusa (Lemper i sar., 2015).

Duktalne ćelije pankreasa su epitelne ćelije i ulaze u sastav egzokrinog pankreasa kao ćelije koje formiraju kanal u koji acinarne ćelije izbacuju svoje enzime. Za njih je pokazano da su u prisustvu NGN3, MAFA i PAX6 sposobne da se transdiferenciraju u ćelije koje imaju sposobnost da sintetišu, obrađuju i skladište insulin, kao i da ga oslobađaju u odgovoru na glukozu ili druge agense koji izazivaju depolarizaciju ćelijske membrane (Lee i sar., 2013).

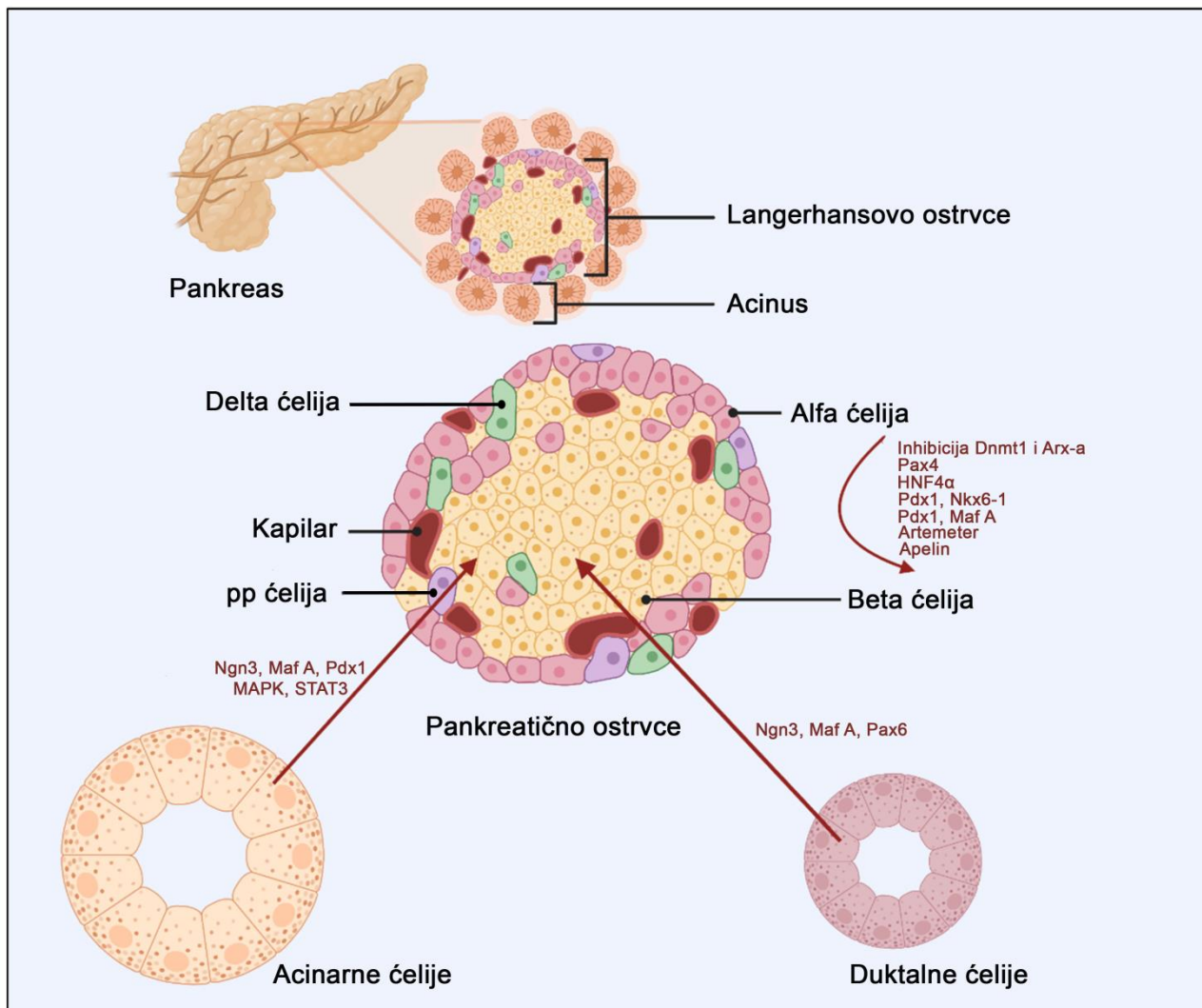
Chera i saradnici su pokazali da su i delta ćelije, slično kao alfa ćelije, sposobne da se spontano transdiferenciraju u beta ćelije nakon ablacije beta ćelija. Međutim, one gube sposobnost transdiferencijacije nakon puberteta (Chera i sar., 2014).

1.5.2. Pokušaji transdiferencijacije alfa ćelija pankreasa

Alfa ćelije endokrinog pankreasa su se izdvojile kao glavni i najatraktivniji alternativni izvor ćelija za transdiferencijaciju u odnosu na prethodno pomenute tipove ćelija (Odeljak 1.5.1) (van der Meulen i Huising, 2015). Međutim, mehanizmi koji se nalaze u osnovi transdiferencijacije alfa ćelija endokrinog pankreasa u ćelije koje proizvode insulin još uvek nisu u potpunosti poznati (Stanojevic i Habener, 2015).

Brojni eksperimenti su pokazali da alfa ćelija pankreasa pokazuju veliki potencijal za transdiferencijaciju u ćelije koje proizvode insulin i slične su beta ćelijama. Naime, alfa ćelije su, prolazeći kroz bihormonalno stanje, sposobne da se spontano transdiferenciraju u ćelije

koje proizvode insulin nekoliko meseci nakon skoro potpunog gubitka beta ćelija kod miševa koji su tretirani toksinom difterije (Thorel i sar., 2010). Kombinacija ligacije pankreatičnog kanala i tretman miševa aloksanom, koji je citotoksični analog glukoze, rezultovao je eliminacijom više od 99% beta ćelija. Nakon dve nedelje od tretmana detektovan je veliki broj beta ćelija koje nisu nastale deobom od preostalih beta ćelija niti od progenitora iz kanala već su primarno poreklom od alfa ćelija pankreasa. Nakon tretmana, alfa ćelije su proliferisale u velikoj meri obezbeđujući izvor prekursorskih ćelija. Takođe je pokazano da su neke od novonastalih beta ćelija prolazile kroz bihormonalno stanje a da su nastale direktnom konverzijom od alfa ćelija (Chung i sar., 2010). Sa druge strane, u humanim ostrvcima poreklom od obolelih od DT1 kao i iz normalnog, funkcionalnog pankreasa detektovane su ćelije koje liče na beta ćelije i pozitivne su i na insulin i na glukagon (Lam i sar., 2018).



Slika 1.3 Shematski prikaz Langerhansovog ostrvca i putevi transdiferencijacije pankreatičnih ćelija u ćelije koje proizvode insulin. Crvenim strelicama su obeleženi potencijalni izvori ćelija pankreasa za transdiferencijaciju u ćelije koje proizvode insulin, kao i upotreba transkripcionih faktora i njihove kombinacije ili hemijskih agenasa koji su korišćeni u eksperimentima za indukciju transdiferencijacije. Dati su neki od primera pokušaja transdiferencijacije ovih ćelija. Preuzeto i modifikovano od (Kalo i sar., 2022).

Esencijalna uloga transkripcionog regulatora Pax4 u nastajanju beta ćelija pankreasa koje proizvode insulin utvrđena je kod miševa koji su prekomerno ekspimirali ovaj regulator transkripcije u alfa ćeljskoj liniji. Miševi su imali značajno uvećanje mase beta ćelija, sa skoro potpunim gubitkom broja alfa ćelija u ostrvcima i posledičnim nedostatkom glukagona. Skoro

sve novoformirane ćelije koje proizvode insulin su imale marker alfa ćelija ukazujući na njihovo poreklo od progenitora ili diferenciranih alfa ćelija (Collombat i sar., 2009). Regeneracija beta ćelija koja je postignuta na ovaj način bila je dovoljna da normalizuje glikemijski status kod miševa kojima je dijabetes izazvan tretmanom streptozotocinom, čime je potvrđeno da su novonastale insulin-prodružujuće ćelije funkcionalne (Collombat i sar., 2009; Sosa-Pineda i sar., 1997). Alfa ćelije stiču sposobnost reprogramiranja u periodu puberteta i ne gube je sa starenjem. Sa druge strane, nije primećena njihova konverzija u periodu pre puberteta, iako rekonstitucija beta ćelija nakon njihovog razaranja dovodi do oporavka od dijabetesa zahvaljujući spontanom masovnom reprogramiranju delta ćelija (Chera i sar., 2014; Thorel i sar., 2010).

Sangan i saradnici su pomoću ektopične ekspresije HNF4 α (engl. *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha*) uspeli da reprogramiraju α TC1.9 ćelijsku liniju u ćelije koje proizvode insulin pri čemu je u njima suprimirana proizvodnja glukagona. Međutim, ni ova transdiferencijacija nije bila potpuna s obzirom da nisu detektovani faktori koji su specifični za beta ćelije kao što je PDX1 (Sangan i sar., 2015).

Indukovana ekspresija *Pdx1*, *Nkx6-1*, ili *Pax4* u fetalnim i neonatalnim alfa ćelijama takođe dovodi do aktiviranja karakteristika beta ćelija (Collombat i sar., 2009; Guo i sar., 2023). Povećana ekspresija *Pax4* gena koja je postignuta direktnim ubacivanjem adenovirusa 5 u pankreas dijabetičnih pacova dovela je do malog i statistički neznačajnog poboljšanja homeostaze glukoze (Zhang i sar., 2016). Transdiferencijacija alfa u beta ćelije postignuta je i aktivacijom ekspresije transkripcionih faktora MAFA i PDX1 uz pomoć virusnog vektora AAV (engl. *adeno-associated virus*, AAV) serotipa 8, kako u NGN3 pozitivnim progenitorskim tako i u adultnim alfa ćelijama. Nakon injeciranja AAV koji nosi *Mafa* i *Pdx1* u pankreatični kanal u *in vivo* uslovima nastaju ćelije koje proizvode insulin, uspešno normalizuju nivo glukoze u cirkulaciji i rezistentne su na napad autoimunskog sistema 4 meseca nakon tretmana kod miševa kojima je eksperimentalno izazvan DT1 (Xiao i sar., 2018). Kada su humana pseudoostrevca sačinjena samo od alfa ćelija inficirana sa ovim AAV došlo je do konverzije oko ~35% alfa ćelija u ćelije koje proizvode insulin. Transplantacija ovakvih imunoostrevca u imunodeficientne dijabetične NOD/SCID/Il2rg^{-/-} miševima uticala je na poboljšanje insulinske sekrecije i tolerancije na glukozu. Ipak potpuna normalizacija nivoa glukoze nije dostignuta, najverovatnije zbog neadekvatne mase transplantiranih reprogramiranih ćelija (Xiao i sar., 2018). Nakon toga su istraživači kombinovali AAV serotipa 8 koji nosi *Pdx1* i *Mafa* gene sa glukagonskim promotorom koji je specifičan za alfa ćelijsku liniju umesto CMV (engl. *cytomegalovirus promoter*) promotora. Višestrukim istraživanjima je potvrđeno da alfa ćelije proliferišu i povećavaju svoju masu neposredno nakon gubitka broja beta ćelija u centralnom delu oostrevca, kao i da nivo glukoze u krvi raste u toku razvoja dijabetesa (Bru-Tari i sar., 2019; Novikova i sar., 2013; Xiao i sar., 2018). Dramatičan gubitak broja funkcionalnih beta ćelija je praćen istovremenim relociranjem preostalih alfa ćelija u centralnom položaju u oostrevcu. Takva oostrevca su manje veličine i nepravilnog oblika (Guo i sar., 2014; Novikova i sar., 2013). Guo i saradnici su pokazali da kod dijabetičnih miševa soja C57BL/6J kod kojih je dijabetes indukovano aloksanom kao i kod miševa soja NOD/ShiLtJ koji predstavlja poligeniski model DT1 kod kojih se autoimunski dijabetes razvija spontano. U oba životinjska modela dijabetesa dolazi do korekcije hiperglikemije u *in vivo* uslovima usled specifične ekspresije *Pdx1* i *Mafa* u alfa ćelijama nakon tretmana sa izmenjenim AAV8-GCG promotorom. Zamena CMV sa GCG promotorom dovela je do održavanja normalne glikemije 7 meseci bez imunskog napada na izmenjena oostrevca u NOD miševima (Guo i sar., 2023).

Istovremena inaktivacija *Arx*-a i *Dnmt1* u adultnim alfa ćelijama miševa dovodi do efikasne direktne konverzije u ćelije koje podsećaju na beta što se ogleda u proizvodnji insulina, globalnoj ekspresiji gena, elektrofiziologiji i procesu GSIS-a (Chakravarthy i sar., 2017). S obzirom na pokrenute metaboličke puteve nakon gubitka *Arx*-a i *Dnmt1*, dodatna

spoljašnja stimulacija bi mogla da ima aditivni efekat na poboljšanje brzine i stepena konverzije alfa u beta ćelije. Takođe je pokazano da su neke alfa ćelije poreklom od pacijenata sa DT1 pozitivne na insulin i da imaju brojne izmene koje uključuju i gubitak ili smanjenu ekspresiju *Arx*-a i *Dnmt1* (Chakravarthy i sar., 2017). Ovi rezultati dodatno potvrđuju ulogu *Arx*-a u uspostavljanju i održavanju identiteta alfa ćelija.

1.5.2.1. Agensi koji promovišu transdiferencijaciju alfa u beta ćelije

S obzorom da su se alfa ćelije endokrinog pankreasa izdvojile kao najadekvatnija meta za nadomeštanje mase beta ćelija (Basile i sar., 2022) tretirane su i raznim agensima kako bi se pronašao onaj koji bi efikasno indukovao njihovu transdiferencijaciju. Velika je pažnja bila usmerena na antimalarijski lek artemeter nakon istraživanja koje je pokazalo da on može da izazove transdiferencijaciju alfa ćelija, povećanje mase beta ćelija i poboljšanje glikemijske kontrole kroz potencijalnu modulaciju signalizacije koju pokreće GABA (Li i sar., 2017). Međutim, kasnija istraživanja koja su pratila liniju ćelijske loze su opovrgla prethodne rezultate (Ackermann i sar., 2018; Sarnobat i sar., 2022; van der Meulen i sar., 2018). Neki od prekliničkih antidijabetogenih agenasa za koje je već utvrđeno da ostvaruju biološki efekat na ćelije ostrvaca, kao što su apelin i insulinotropski peptid koji je zavistan od glukoze (engl. *glucose-dependent insulinotropic peptide*, GIP), mogu da doprinesu ograničavanju viška sekrecije glukagona preko indukovanja transdiferencijacije alfa u beta ćelije (Sarnobat i sar., 2020; Tanday i sar., 2020).

1.6. Epigenetičko editovanje

Epigenetičke modifikacije molekula DNK i proteina koji se vezuju za DNK (kao što su histoni), menjaju dostupnost molekula DNK i strukturu hromatina, verno se prenose kroz replikaciju DNK i predstavljaju važne karike za regulaciju obrasca genske ekspresije (Loscalzo and Handy, 2014). Iako su pojedinačne epigenetičke modifikacije dobro okarakterisane, tek je započeto rasvetljavanje epigenetičkog koda u velikoj meri zahvaljujući razvoju moćnih alata za epigenetičko editovanje koji pružaju informacije o tome kako i koje modifikacije doprinose specifičnom transkripcionom obrascu (Gjaltema i Rots, 2020; Kungulovski i Jeltsch, 2016).

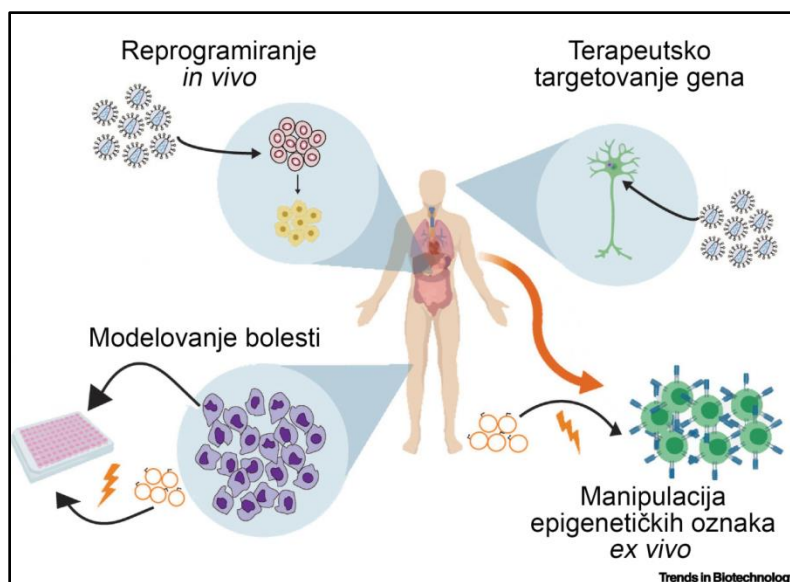
Do danas je razvijen veliki broj tzv. epilekova koji neselektivno deluju na epigenetičke oznake u svrhu terapije mnogih bolesti kao što su kancer, autoimunske bolesti i dijabetes (Heerboth i sar., 2014; Pfister i Ashworth, 2017). Sa druge strane, epigenetičko editovanje uz pomoć sintetičkih alata podrazumeva dirigovano i precizno uvođenje promena u epigenomu na specifičnim mestima, s ciljem da one dovedu do izmena u genskoj ekspresiji pri čemu primarna DNK sekvenca ostaje ista (de Groote i sar., 2012; Jurkowski i sar., 2015). Velika je pažnja usmerena na ispitivanje sistema za editovanje epigenoma s ciljem da se isporuče u ciljanim ćelijama u telu kako bi se targetovali geni koji imaju sposobnost da utiču na ćelijsko reprogramiranje i diferencijaciju (Slika 1.4) (Goell i Hilton, 2021).

Alati za ciljano epigenetičko editovanje se zasnivaju na upotrebi DNK vezujućeg domena koji omogućava precizno bazno sparivanje sa ciljanom sekvencom a time i specifično pozicioniranje elemenata koji imaju ulogu da modifikuju epigenetičke markere (Stepper i sar., 2017). DNK vezujući domen može da bude fuzionisan sa enzimima koji mogu da pišu ili brišu epigenetičke markere na molekulu DNK ili histonskim repovima u blizini ciljane sekvence. Efektorski domen ne mora nužno da dovodi do izmena epigenetičkih markera već može da regrutuje druge enzime ili komplekse koji će posledično da uvedu ili obrišu epigenetičke markere. Razlikuju se tri najvažnije grupe proteina koji imaju ulogu da pozicioniraju kompleks za editovanje epigenoma na DNK molekul, a to su: proteini sa cinkanim prstićima (engl. *Zinc finger nuclease*, ZFN), efektori slični aktivatoru transkripcije (engl. *Transcription-activator-like effector nucleases*, TALEN) i Cas9 proteini. ZFN i TALEN su modularni DNK

vezujući proteini koji mogu da se programiraju i vežu za ciljanu sekvencu prepoznajući specifične bazne parove DNK molekula unutar velikog žljeba. Njihova upotreba je doprinela važnim pionirskim istraživanjima u oblasti genetičkog i epigenetičkog editovanja. Za svako novo ciljanje regiona neophodno je ponovno dizajniranje i rekonstrukcija domena za targetovanje, što zahteva specijalizovanu stručnost i izvesno vreme. Razvoj CRISPR/Cas9 sistema je u velikoj meri pojednostavio targetovanje DNK i izdvojio ovaj sistem ispred ZFN i TALEN kao pogodniji za upotrebu zahvaljujući svojoj fleksibilnosti i modularnoj prirodi (Thakore i sar., 2016). Velika prednost ovog sistema je i što omogućava istovremeno targetovanje više ciljanih regiona bez ikakvih izmena na proteinu Cas9 što ga čini privlačnijim za potencijalne terapijske pristupe (Li i sar., 2020).

1.6.1. CRISPR-Cas9 sistem za dirigovano editovanje

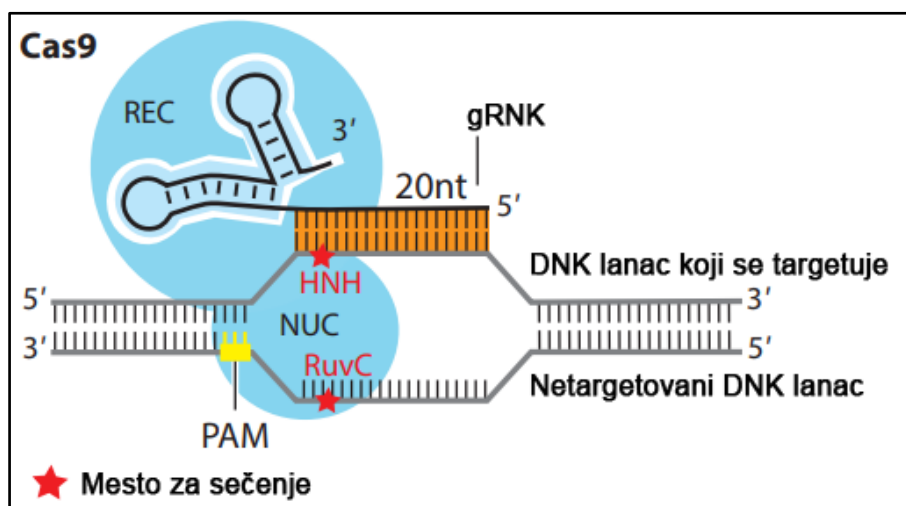
Grupisani (klasterovani) kratki palindromski ponovci na jednakim rastojanjima (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR) otkriveni su još 1987. godine kod *E. Coli*, ali je njihova uloga u stečenom imunskom sistemu bakterija otkrivena skoro 20 godina kasnije (Doudna i Charpentier, 2014; Hsu i sar., 2014; Ishino i sar., 1987). Ovaj sistem je prisutan kod mnogih bakterija i većine arhea. Prilikom prve infekcije fragmenti egzogene DNK (koja može da potiče od virusa ili plazmida) se ugrađuju u region genoma bakterije koji je označen kao „spejser“ i ovičen kratkim palindromskim ponovcima u okviru CRISPR lokusa. Genomski region sadrži niz od više spejser-ponovak struktura koje se zajedno prepisuju u jedan molekul RNK čijom obradom nastaje niz pojedinačnih CRISPR-RNK (crRNK). Asociirane endonukleaze (engl. *CRISPR associated*, Cas) formiraju komplekse (CRISPR/Cas) zajedno sa molekulima crRNK koji se na osnovu komplementarnosti sparuju sa stranim molekulima DNK i isecaju je (Barrangou i Marraffini, 2014; Wiedenheft i sar., 2012).



Slika 1.4 Primena epigenetičkog editovanja kod zdravih i obolelih ljudi. Čelije mogu da se izoluju iz pacijenta, da se kultivišu, i da im se isporuči sistem za epigenetičko editovanje u cilju modelovanja bolesti. Isporučka može da se vrši virusni vektorima. Epigenetički editori targetuju ciljane gene kako bi se obnovio zdrav fenotip unutar specifičnog tipa ćelija. Iz pacijenata mogu da se izoluju ćelije i epigenetički edituju kako bi zadobile željeni fenotip u *ex vivo* uslovima. Zatim se one ponovo ubrizgavaju pacijentu kao autologna ćelijska terapija. Preuzeto i modifikovano iz (Goell i Hilton, 2021).

Na osnovu različite arhitekture efektor, CRISPR/Cas sistemi se dele na 2 klase, koje se dalje dele na tipove i podtipove. Sistemi klase I imaju velike efektorske komplekse sastavljene od više Cas proteina, dok sistemi klase II imaju jednu multidomensku endonukleazu koja funkcioniše analogno celom efektorskom kompleksu klase I i jednostavniji su za upotrebu u genetičkom inženjerstvu (Makarova i sar., 2020). Među članovima CRISPR/Cas sistema klase II, CRISPR/Cas9 poreklom iz *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) je pronašao najširu primenu kod sisara u editovanju genoma i epigenoma zbog toga što je prvi adaptiran u ove svrhe i zato što može da funkcioniše samostalno kada je u kompleksu sa gRNK (Cong i sar., 2013).

Uobičajen CRISPR/Cas9 sistem za editovanje se sastoji od gRNK i Cas9 endonukleaze (Slika 1.5). gRNK predstavlja sintetisani RNK molekul koji je nastao od dva manja RNK molekula: crRNK i transaktivirajuće crRNK (tracrRNK). Uloga crRNK je da se specifično veže za komplementarnu sekvencu u DNK molekulu u dužini od oko 20 bp, dok tracrRNK olakšava dirigovano navođenje Cas9 (Cong i sar., 2013). Pored komplementarnog sparivanja između gRNK i molekula DNK, za endonukleaznu aktivnost Cas9 neophodna je i njegova interakcija sa motivom koji se nalazi uz protospeser (engl. *protospacer-adjacent motif*, PAM) na 3'kraju ciljane genomske sekvence, dužine 2-5 bp (5'-NGG-3', pri čemu je N bilo koja baza nukleotida) (Sternberg i Doudna, 2015; Wang i sar., 2016). Cas9 specifično prepoznaje GG dinukleotid pri čemu dolazi do blage destabilizacije dvolančane zavojnice DNK molekula koja promoviše formiranje kompleksa CRISPR/Cas9 sistema sa molekulom DNK ukoliko je sekvenca lanca koji se nalazi uzvodno i naspram PAM sekvence komplementarna sa gRNK (Nishimasu i sar., 2014). Cas9 poseduje dva endonukleazna domena koji seku po jedan lanac iz molekula DNK. One se aktiviraju nakon formiranja kompleksa sa molekulom DNK, pri čemu nastaje dvolančani prekid u genomskoj DNK. Uvođenje promena u primarnu sekvencu molekula DNK se odigrava uz pomoć ćelijskih mehanizama za reparaciju DNK molekula nakon uvođenja dvolančanih prekida kao što su nehomologno spajanje krajeva (engl. *nonhomologous end-joining*, NHEJ) ili pomoću homologne matrice za reparaciju DNK (engl. *homology-directed repair*, HDR). Kao rezultat nastaju male insercije ili delecije što dovodi do mutacija u ciljanom genu i njegove poremećene funkcionalnosti (Capecchi, 1989; Sternberg i sar., 2014). CRISPR/Cas9 sistem je u širokoj upotrebi za efikasno editovanje genoma kod velikog broja različitih vrsta model organizama, uključujući humane ćelijske linije, bakterije, zebra ribice, kvasce, voćne mušice, miševе, pacove, golubove, majmune (Sander i Joung, 2014). Ovaj sistem se može koristiti za vizuelizaciju specifičnih DNK lokusa u živim ćelijama i to kroz fuzionisanje Cas9 sa zelenim fluorescentnim proteinom. Na ovaj način se može dobiti uvid u konformaciju i dinamiku promene lokusa, kao i u kompleksnu arhitekturu hromozoma i nukleusnu organizaciju (Chen i sar., 2013).



Slika 1.5 Editovanje genoma specifično za sekvencu koje je posredovano sistemom CRISPR/Cas9. Cas9 je nukleaza koja se uz pomoć gRNK vezuje za specifičnu sekvencu u genomu u dužini od 20 nukleotida. Na osnovu komplementarnog baznog sparivanja dolazi do interakcije između gRNK i ciljane sekvence u genomu. Cas9 interaguje sa PAM motivom preko svog PAM interagujućeg domena (PI) koji se nalazi na C terminusu. Cas9 poseduje dva nukleazna domena (HNH i RuvC) koji prave dvolančani prekid na ciljanom molekulu DNK. Domeni HNH, RuvC i PI se nalaze na nukleaznom lobusu Cas9 (NUC). Cas9 lobus za prepoznavanje (engl. *recognition lobe*, REC) sadrži druge regione koji interaguju sa gRNK-DNK kompleksom. Preuzeto i modifikovano od (Wang i sar., 2016).

1.6.2. Dirigovane izmene u genskoj ekspresiji indukovane epigenetičkim editovanjem

Otkriće i primena CRISPR/Cas9 sistema za editovanje genoma je dovela do revolucije i na polju epigenetičkog editovanja. CRISPR/Cas9 sistem je poslužio kao platforma za razvoj alata za epigenetičko editovanje. Ovaj modifikovani CRISPR/Cas9 sistem podrazumeva upotrebu kompleksa koji formiraju gRNK za targetovanje sekvence u genomu i Cas9 protein kod koga je ugašena endonukleazna aktivnost (engl. *deactivated/dead Cas9*, dCas9), ali je zadržana sposobnost vezivanja za molekul DNK. Zahvaljući povezivanju dCas9 sa nekim drugim efektorskim domenom, ovaj sistem može da menja metilacioni status ciljanog lokusa, da dovodi do izmena posttranslacionih modifikacija histona ili da uvodi više tipova modifikacija istovremeno utičući na izmene arhitekture hromatina (Goell i Hilton, 2021; Thakore i sar., 2016). Efektori za editovanje epigenoma se mogu podeliti na one koji dovode do aktivacije ili represije ekspresije gena. Neki od efektorskih domena koji se koriste kao aktivatori genske ekspresije su VP64 (engl. *Virion protein 64*) kao snažan transkripcioni aktivator, VP160 (Cheng i sar., 2013) i TET1 (Choudhury i sar., 2016). Često se koristi i tripartitini transkripcioni aktivator VPR (sastavljen je od VP64, P65 i Rta (engl. *replication and transcription activator*)) (Chavez i sar., 2015). Kao aktivator se koristi i katalitička subjedinica acetiltransferaze P300 koja ima ulogu da katalizuje acetilaciju lizina 27 histona H3 na targetovanom mestu (Hilton i sar., 2015). Kao represori se koriste sledeći domeni: Dnmt3a, Dnmt3a-Dnmt3L, KRAB (engl. *Krüppel associated box*), LSD1 (engl. *lysine specific demethylase 1*). Pomoću CRISPR/Cas9 sistema se lako postiže istovremeno ciljanje više regiona u genomu istovremeno zahvaljujući prisustvu Cas9 proteina sa više različitih gRNK istovremeno (Amabile i sar., 2016; Kearns i sar., 2015; Thakore i sar., 2016).

1.6.2.1. Epigenetičko editovanje pomoću sistema za ciljano uvođenje metilacije

Jedan od načina kojim može da se postigne utišavanje i gašenje genske ekspresije je upotreba CRISPR/Cas9 sistema u kome je dCas9 fuzionisan sa efektorskim domenima koji mogu direktno da metiluju sekvencu koja se nalazi oko mesta vezivanja ovog kompleksa. U tu svrhu može da se koristi katalitički domen Dnmt3a koji ima najaktivniju ulogu u *de novo* metilaciji, dok je Dnmt3L veoma bitan za stimulaciju visokog nivoa aktivnosti Dnmt3a (Siddique i sar., 2013). Često se koristi i KRAB domen iz familije proteina sa cinkanim prstićima, kao snažan represor transkripcije. Iako on sam nema enzimatsku funkciju, njegovim pozicioniranjem na targetovanu sekvencu u genomu otpočinje kaskada regrutovanja proteina utišavača koji modifikuju histone uspostavljajući zaključavanje hromatina (Groner i sar., 2010). Ovaj kompleks regrutuje i DNMT3a/3b, koji u sprezi sa katalitički neaktivnim kodomenom DNMT3L, deponuju metil grupe na targetovani region doprinoseći njegovom zaključavanju (Amabile i sar., 2016). Takođe, ovi domeni se mogu kombinovati kako bi utišanje ekspresije ciljanog gena bilo učinkovitije (Amabile i sar., 2016; Stepper, 2020).

1.7. Transfekcija

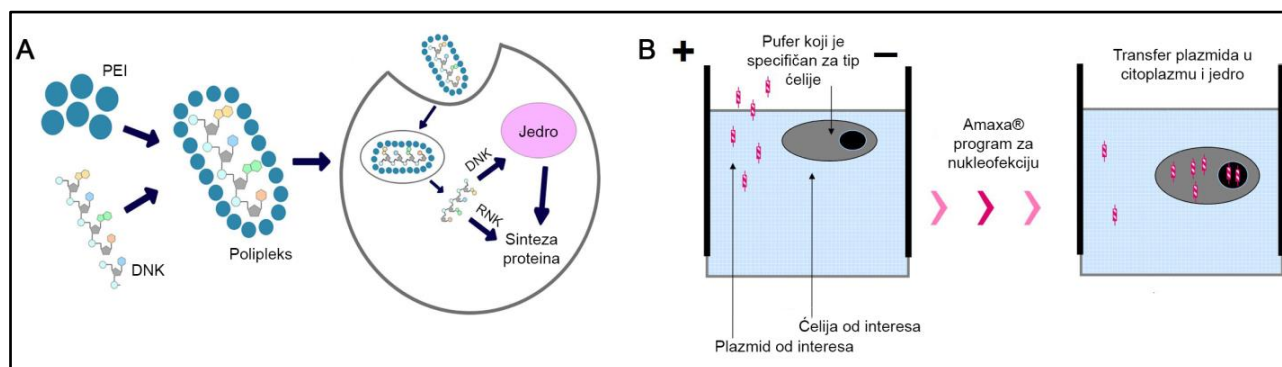
Transfekcija podrazumeva važnu laboratorijsku metodu u molekularnoj biologiji koja se koristi za unošenje stranih nukleinskih kiselina ili proteina u eukariotske ćelije u *in vitro* ili *in vivo* uslovima (Kim i Eberwine, 2010). Transfekcija se koristi kao alat za proučavanje regulacije transkripcije i/ili funkcije gena i njihovih produkata putem povećanja ili smanjenja njihove ekspresije (Kim i Eberwine, 2010; Wurm, 2004). U zavisnosti od toga da li se uneseni materijal gubi ili održava kroz ćelijske deobe razlikuju se stabilne i tranzijentne transfekcije. Pri stabilnim transfekcijama se gen od interesa ugrađuje u genom domaćina, postaje sastavni deo hromozomalne DNK i replikuje se zajedno sa njom ili se održava kao ekstrahromozomalni element koji se prenosi kroz ćelijske deobe (Glover i sar., 2005; Kim i Eberwine, 2010; Stuchbury i Münch, 2010). Pri tranzijentnim transfekcijama, nukleinske kiseline koje se ubacuju u formi plazmida ili oligonukleotida u ćelijama se ne replikuju, gube se tokom vremena usled ćelijskih deoba i degradacije enzimima ćelija domaćina (Stuchbury i Münch, 2010). Zato se genetički materijal pri ovom tipu transfekcije eksprimira samo određeni vremenski period.

Idealan model za transfekciju bi trebalo da omogućava visoku efikasnost, da citotoksičnost bude na niskom nivou, da efekti na normalnu fiziologiju ćelije budu minimalni, da bude reproducibilan i jednostavan za upotrebu (Kim i Eberwine, 2010). S obzirom da je svaki tip ćelija jednog organizma jedinstven, ne može se izdvojiti idealni metod za transfekciju već je neophodno optimizovati ovaj proces za svaki tip ćelija zasebno.

Metode za transfekciju se dele na dve kategorije, u zavisnosti od toga da li se baziraju na virusima ili ne. Metode koje ne uključuju viruse se dalje dele na hemijske i fizičke/mehaničke (Chong i sar., 2021). Svaka od ovih metoda poseduje i prednosti i nedostatke, dok metod izbora zavisi od model organizma i eksperimentalnog dizajna (Kim i Eberwine, 2010). U istraživanjima su najzastupljenije hemijske metode za transfekciju koje se baziraju na upotrebi katjonskih polimera, kalcijum fosfata i katjonskih lipida. Polietilenimin (PEI) je najpoznatiji predstavnik katjonskih polimera zahvaljujući visokoj efikasnosti isporuke DNK u ćelijama i velikog stepena reproducibilnosti. PEI dovodi do elektrostatičke kondenzacije molekula DNK i formiranja stabilnih pozitivno naelektrisanih čestica. Ove čestice interaguju sa negativno naelektrisanim delovima ćelijske membrane i formiraju endozome. Ovi polipleksi se procesom endocitoze oslobađaju u citoplazmu (Slika 1.6A) (Han i sar., 2009; Sonawane i sar., 2003). Molekuli PEI-ja unutar endozoma imaju sposobnost vezivanja slobodnih protona, doprinoseći povećanju endolizozomalne pH i inaktivaciji enzima koji imaju ulogu u degradaciji molekula DNK. Na ovaj način se omogućava oslobađanje funkcionalnih nedegradiranih nukleinskih kiselina koje ulaze u ćelijska jedra gde dolazi do transkripcije gena od interesa (González-Domínguez i sar., 2019). Na efikasnost transfekcije može da utiče količina DNK, odnos između DNK i PEI-ja, vreme za formiranje kompleksa i sastav rastvora u kome se oni nalaze, medijum za transfekciju kao i gustina ćelija u vreme transfekcije (Zakeri i sar., 2018).

U fizičke metode za transfekciju spadaju elektroporacija, sonoporacija, mikronjiciranje i isporuka pomoću biolističkih partikula (Bessis i sar., 2004; Meng i sar., 2019). Elektroporacija podrazumeva upotrebu kratkotrajnih električnih šokova visoke voltaže pomoću uređaja za elektroporaciju, kako bi se privremeno i reverzibilno povećala propustljivost ćelijske membrane. Privremeno nastale pore na ćelijskoj i jedarnoj membrani omogućavaju stranim nukleinskim kiselinama ili proteinima olakšan ulazak u ćeliju slobodnom difuzijom ili elektroforetskim prolaskom kroz membrane (Shigekawa i Dower, 1988; Young i Dean, 2015). Na ovaj način nukleinske kiseline direktno ulaze u jedro ćelije (Slika 1.6B), što direktno doprinosi povećanju efikasnosti transfekcije zbog smanjene degradacije od strane ćelijskih endonukleaza. Jedna od komercijalno dostupnih tehnologija za elektroporaciju je Amaxa™ 4D-

Nucleofektor (Lonza, Nemačka) tehnologija koja je jednostavna za upotrebu i omogućava visoku efikasnost transfekcije ćelija koje se teško transfekuju. Ova tehnologija u dobro optimizovanim uslovima obezbeđuje očuvanu funkcionalnost ćelija pri čemu su citotoksični efekti minimalni (Bessis i sar., 2004).



Slika 1.6. Shematski prikaz transfekcije pomoću PEI-ja (A) i nukleofekcije (B). Preuzeto i modifikovano sa (Fus-Kujawa i sar., 2021) i https://www.ibiss.bg.ac.rs/images/IBISS/Naucne-aktivnosti/4D-Nucleofektor_slides_features_and_benefits.pdf.

Nakon nukleofekcije fenotipski markeri ćelija se održavaju kao i njihov potencijal za diferencijaciju, što je od velikog značaja u istraživanjima hematopoetskih i stem ćelija (Hohenstein i sar., 2008; Landi i sar., 2007). Najveći nedostatak ove tehnologije je skupa oprema i potrošni materijal, kao i veliki mortalitet ako uslovi za transfekciju nisu dobro optimizovani. Sastav pufera nije poznat niti se parametri pojedinih programa mogu menjati.

Bez obzira koji metod za transfekciju ćelija se koristi u eksperimentima, za uspešnost ovog procesa neophodno je da ćelije budu zdrave i da se aktivno dele (Recillas-Targa, 2006). Parametri koji utiču na efikasnost transfekcije su i broj pasaža u kojem se ćelije nalaze u trenutku transfekcije, stepen konfluentnosti ćelija, kao i kvalitet, kvantitet i veličina DNK molekula koji treba da se unese. Sa povećanjem veličine plazmida drastično se smanjuje i efikasnost transfekcije zbog otežanog prenosa velikih plazmida kroz ćelijsku i jedarnu membranu (Lesueur i sar., 2016; Ribeiro i sar., 2012).

2. CILJEVI

U poslednjih nekoliko decenija broj obolelih od dijabetesa je u konstantnom porastu. Tretmani koji se trenutno koriste u terapiji dijabetesa nisu dovoljno efikasni u normalizaciji nivoa glukoze što dugoročno može da dovede do niza komplikacija kod obolelog. Bez obzira na različit uzrok nastanka i razvoja bolesti, dijabetes je dobar kandidat za ćelijsku terapiju zato što se u njegovoj osnovi nalazi smanjenje mase beta ćelija. Transplantacija Langerhansovih ostrvaca ili pankreasa predstavlja efikasan pristup u terapiji, međutim postoje brojna ograničenja za njegovu široku primenu. Veliki broj istraživanja u oblasti regenerativne medicine ukazao je na značaj prirodnih i spontanih procesa koji mogu da se iskoriste u terapeutske svrhe, kao što je direktna promena identiteta terminalno diferenciranih tipova ćelija ili transdiferencijacija u cilju reparacije oštećenih tkiva ili organa. Transdiferencijacija ćelija može da se ciljano izazove uz pomoć virusnih vektora, faktora rasta ili promenom u ekspresiji ključnih transkripcionih faktora koji učestvuju u održavanju ćelijskog identiteta. Ćelije endokrinog pankreasa održavaju svoj identitet pomoću epigenetičkih mehanizama koji omogućavaju prenošenje obrasca genske ekspresije specifične za ćelijski tip. Visok nivo plastičnosti koji postoji između ćelija endokrinog pankreasa je iskorišćen kao dobra osnova koja daje prednost ovim ćelijama za transdiferencijaciju u ćelije koje proizvode insulin. Posebno su se izdvojile alfa ćelije endokrinog pankreasa sa velikim potencijalom za transdiferencijaciju zbog visokog nivoa plastičnosti epigenoma, pozicioniranosti u ostrvcu i sličnosti sa beta ćelijama (Thorel i sar., 2010; van der Meulen i Huising, 2015). Isključivo alfa ćelije ekspimiraju transkripcioni faktor ARX koji se smatra specifičnim za ovaj tip ćelija. Gen za ARX je u alfa ćelijama hipometilovan, dok je u beta ćelijama hipermetilovan i neaktivan (Dhawan i sar., 2011).

Epigenetičko editovanje podrazumeva uvođenje promena u epigenomu na definisanim pozicijama pomoću sintetičkih alata, i može se koristiti kao alternativno sredstvo za ćelijsku transdiferencijaciju u cilju promene obrasca genske ekspresije i posledične promene ćelijskog identiteta. Poslednjih godina pojavili su se brojni pokušaji transdiferencijacije ćelija različitog porekla, a pre svega alfa ćelija u insulin-produkujuće ćelije, međutim mehanizmi koji se nalaze u osnovi transdiferencijacije još uvek nisu dovoljno razjašnjeni (Colarusso i Zhou, 2022). Pristupi za inicijaciju transdiferencijacije su često komplikovani i zahtevni, stoga postoji veliko interesovanje za pronalazak jednostavnijeg načina za iniciranje ovog procesa kako bi sa što manjom manipulacijom doveo do efikasnijeg ishoda u vidu ćelija koja ima karakteristike beta ćelija pankreasa. Vrlo su aktuelni pristupi koji imaju za cilj direktnu izmenu ćelijskog identiteta delovanjem na minimalni broj targeta bez izmena u sekvenci DNK molekula.

Imajući u vidu prethodno navedeno, opšti cilj ove doktorske disertacije je izazivanje transdiferencijacije alfa ćelija pankreasa miša u ćelije koje proizvode insulin uvođenjem ciljane metilacije DNK molekula u okviru promotora gena za *Arx* pomoću modifikovanog CRISPR/Cas9 sistema za epigenetičko utišavanje genske ekspresije u *in vitro* uslovima. Rezultati ovih istraživanja će doprineti boljem razumevanju uloge epigenetičkih mehanizama u održavanju identiteta alfa ćelija i poslužiti kao dobra osnova za buduću primenu sistema za dirigovanu metilaciju u *in vivo* uslovima u cilju pokretanja transdiferencijacije alfa ćelija i ublažavanja simptoma dijabetesa. Kako bi se došlo do opšteg cilja postavljeno je još nekoliko posebnih ciljeva:

- 1. Uspostavljanje i optimizacija metode za transfekciju alfa (α TC1-6) ćelijske linije pankreasa miša.** Navedeni cilj će biti ostvaren poređenjem dve metode za transfekciju: transfekcije pomoću katjonskog polimera polietilenimina i nukleoporacije. Efikasnost transfekcije obe metode će se porediti 24 h nakon

transfekcije i odabrati bolja za dalju optimizaciju uslova koja će uključivati variranje posebnih parametara. Efikasnost transfekcije biće analizirana praćenjem prisustva zelenog fluorescentnog proteina pomoću dve metode (fluorescentna mikroskopija i protočna citofluorimetirja). Uspešnost tranzijentne transfekcije biće potvrđena analizom prisustva produkata ekspresije unešenih plazmida.

- 2. Ispitivanje uspešnosti uvođenja ciljane metilacije molekula DNK na promotoru *Arx-a*.** Odabir najefikasnijeg konstrukta za gensku represiju biće izvršen nakon analize metilacionog statusa metodom ciljanog bisulfitnog sekvenciranja. Metilacioni status *Arx-a* biće analiziran iz GFP⁺ sortiranih ćelija u nekoliko vremenskih tačaka nakon transfekcije i poređen sa lažno (Mock) transfekovanim i beta (NIT-1) ćelijskom linijom pankreasa miša.
- 3. Analiza efekta uvedene ciljane metilacije na ekspresiju *Arx-a* i transdiferencijaciju α TC1-6 ćelija.** Efekat uvedene metilacije na promotoru *Arx-a* biće analiziran praćenjem ekspresije iRNK u odabranim vremenskim tačkama nakon transfekcije (5-20 dan) u GFP⁺ sortiranim ćelijama. Efekat potencijalno smanjene ekspresije *Arx-a* na proces transdiferencijacije alfa ćelija biće ispitivan praćenjem ekspresije insulina na nivou iRNK i proteina pomoću nekoliko metoda u istim vremenskim tačkama kada je analiziran i nivo *Arx-a*.
- 4. Ispitivanje stepena transdiferencijacije transfekovanih α TC1-6 ćelija.** Nakon potencijalno indukovane ekspresije insulina u α TC1-6 ćelijama analiziraće se i porediti transkriptom insulin-produkujućih sa lazno transfekovanim i netransfekovanim α TC1-6 i NIT-1 ćelijama. Ispitivaće se i porediti nivo ekspresije ključnih markera beta ćelija kao što su sledeći geni: *Pdx1*, *Pax4*, *Pax6*, *MafA*, *Pou3f4*, *NeuroD1*, *Nkx2-2*, *Nkx6-1* i *Isl1* između kompletno i lažno transfekovanih ćelija pomoću sistema za epigenetičko editovanje.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ćelijska kultura

3.1.1. Ćelijske linije

Za eksperimente u ovoj doktorskoj disertaciji korišćena je ćelijska linija alfa ćelija pankreasa miša α TC1-6 (ATCC® CRL-2934™) poreklom od adenoma transgenih miševa. To su atherentne ćelije epitelijalne morfologije koje rastu u klasterima sa pojedinačnim ćelijama u suspenziji. One aktivno proizvode i oslobadjaju glukagon. Pored ovih, korišćena je i beta ćelijska linija pankreasa miša NIT-1 ćelije (ATCC®, CRL-2055™) poreklom od insulinoma transgenih miševa. To su atherentne ćelije koje rastu u monosloju i imaju epitelijalnu morfologiju. One aktivno proizvode i oslobađaju insulin. Alfa ćelije pankreasa su gajene u DMEM medijumu (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) koji sadrži 15 mM glukozu, 12 mM HEPES, 2 mM L-glutamin. U medijum je dodavan i 10% temperaturom inaktivisan fetalni serum govečeta (engl. *fetal bovine serum*, FBS) (Sigma-Aldrich, F9665), 0,02% albumin seruma govečeta (engl. *bovine serum albumin*, BSA) i antibiotici (100 U/mL penicilina i 0,1 mg/mL streptomicina) (GE Healthcare, South Logan, UT, USA). Ćelijska linija NIT-1 je gajena u Ham's F-12K Nut Mix (1x) medijumu u koji su dodavani antibiotici i 10% FBS. Obe kulture ćelija su gajene u inkubatoru (Sanyo Electric Co., Ltd, Osaka, Japan) na temperaturi od 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i 95% vlažnosti. Promena medijuma je vršena svakog ili svakog drugog dana. Po dostizanju konfluentnosti (70-80%) ćelije su pasažirane korišćenjem pufera za ćelijsku disocijaciju bez enzima (Gibco).

3.1.2. Transfekcija ćelija

3.1.2.1. Hemijska transfekcija

Hemijska transfekcija ćelija je vršena pomoću PEI-ja koji predstavlja katjonski polimer koji kondenzuje plazmidnu DNK u stabilne pozitivno naelektrisane čestice (Boussif i sar., 1995) koje procesom endocitoze bivaju unešene u ćelije (Sonawane i sar., 2003). Rastvor PEI-ja (linearni MAX PEI, 40 kDa, Polysciences, Warrington, Pennsylvania, USA) je napravljen u vodi u koncentraciji 1 mg/ml, sterilizovan filtriranjem (filter 0,22 μ m), alikvotiran i čuvan na -80°C do upotrebe. Ćelije α TC1-6 linije su zasejavane u sterilnim pločama sa 6 bunara. Po dostizanju konfluentnosti od 60-70%, na ćelije je nalivan rastvor DNA:PEI koji je pravljen tako što su plazmidna DNK (3 μ g) i PEI (6 μ g) rastvarani u istoj zapremini DMEM medijuma bez FBS-a, pomešani i inkubirani 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon 16 h inkubacije ćelija sa rastvorom za transfekciju na 37°C, ćelije su ispirane PBS (engl. *phosphate-buffered saline*) puferom (20 mM Na₂HPO₄, 10 mM KCl, 70 mM KH₂PO₄, 340 mM NaCl, pH 7,4) i nalivane DMEM medijumom. Ćelije su propagirane još pet dana posle transfekcije i korišćene dalje u eksperimentima.

3.1.2.2. Nukleofekcija

Nukleofekcija predstavlja tip fizičke transfekcije zasnovan na nukleoporaciji. Za potrebe ove doktorske disertacije korišćena je AMAXA tehnologija za nukleofekciju. Prvi deo eksperimenata sa nukleofekcijom je podrazumevao optimizaciju ovog procesa, a drugi upotrebu optimizovanog protokola. Nakon dostizanja konfluentnosti od 70% α TC1-6 ćelije su ispirane PBS puferom, odlepljivane sa podloge pomoću pufera za ćelijsku disocijaciju, i centrifugirane na 90 x g, 10 min. Talozi ćelija su bili resuspendovani u 20 μ l SF, SG ili SE 4D-Nucleofector™ X pufera u koji je dodat komercijalni suplement u odnosu 1:4,5. U ćelijsku

suspenciju je dodato 0,4 µg pmaxGFP™ plazmidne DNK (Lonza, 1 µg/µl u 10 mM Tris-u, pH 8.0). Čelije su prebačene na pločicu sa 16 bunara i podvrgnute elektroporaciji uz pomoć X jedinice 4D-Nucleofectora™ (Lonza). Protokol za optimizaciju nukleofekcije je podrazumevao upotrebu 15 različitih predefinisanih programa za nukleofekciju u kombinaciji sa tri različita pufera. Zatim su ćelije inkubirane 10 min na 37°C u čistom RPMI medijumu, i onda su prebačene u odgovarajuću posudu u kojoj se nalazio ugrejani medijum za αTC1-6 ćelije. Nakon odabira odgovarajućeg programa i pufera za transfekciju, a zbog potrebe za većim brojem transfekovanih ćelija za dalje analize, nukleofekcija je rađena u nukleokivetama u 100 µl SF pufera sa suplementom. Procedura podrazumeva centrifugiranje alikvota sa potrebnim brojem ćelija (5x10⁶ ćelija po kiveti) na 90 x g, 10 min na sobnoj temperaturi. Na lepo osušeni talog je dodavano 100 µl SF pufera sa suplementom. Na resuspendovane ćelije su dodavani plazmidi u ukupnoj količini od 7,5 µg po uzorku. Čelije su prebacivane u nukleokivetu i izložene elektroporaciji uz pomoć X jedinice 4D-Nucleofectora™ i programa CM-156. Nakon toga, na ćelije je nalivano 300 µl čistog RPMI medijuma da bi se pospešio njihov oporavak od elektroporacije. Inkubirane su 10 min na 37°C. Nakon toga su lagano resuspendovane tri-četiri puta i zasejavane u dva bunara u sterilnoj ploči sa 6 bunarića u kojoj je već bilo naliveno i zagrejano po 1800 µl kompletnog medijuma za alfa ćelije. Čelije su propagirane nekoliko dana do analize, pri čemu im je menjan medijum svakog ili svakog drugog dana. Analiza efikasnosti ćelijske transfekcije je ispitivana pomoću fluorescentne mikroskopije i protočne citofluorimetrije. Analiza ekspresije zelenog fluorescentnog proteina (engl. *Green fluorescent protein*, GFP) je ispitivana u nekoliko vremenskih tačaka nakon transfekcije ćelija. Čelije su posmatrane i slikane pomoću kamere Axio Observer Z1 mikroskopa (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) korišćenjem odgovarajućih filtera.

3.1.2.3. Plazmidi

U okviru ove doktorske disertacije korišćeni su sledeći plazmidi koji nose informaciju za fluorescentni protein: mVenus C1 (Addgene #27794, poklon od Steven Vogel-a) i pmaxGFP™ koji je deo kita za nukleoporaciju (Lonza). Korišćeni su samostalno ili u kombinaciji sa drugim plazmidima koji su deo kompleksa za epigenetičko editovanje. Takođe je korišćen i prazan plazmid za gRNK (Addgene # 41824, gRNA_Cloning Vector, poklon od George Church-a), kao i konstrukti za epigenetičko editovanje dCas9-Dnmt3a3L, dCas9-KRAB, dCas9-Dnmt3a3L-KRAB koji su fuzionisani u laboratoriji dr Tomasz-a Jurkovskog (Stepper, 2020).

3.1.2.3.1. Dizajniranje gRNK

Za pozicioniranje modifikovanog CRISPR/Cas9 kompleksa za epigenetičko editovanje korišćene su četiri gRNA za gen *Arx* (Tabela 1.) koje je dizajnirao dr Peter Stepper pomoću E-CRISP platforme (Heigwer, Kerr i Boutros, 2014). Sve četiri gRNK za *Arx* su odabrane kao visoko specifične i visoko efikasne i napravljene su kao zasebni plazmidi (*Arx* sgRNA1-4).

3.1.2.3.2. Transformacija bakterija toplotnim šokom

Pripremljene kompetentne *Escherichia coli* ćelije DH5α soja (50 µl) koje su tek počele da se otapaju su pomešane sa 10 ng plazmida. Po dodavanju plazmida, tubice sa ćelijama su inkubirane na ledu u frižideru 30 min. Nakon toga su tubice prebačene na 42°C na 45 sec. Na ćelije je zatim nalivano 900 µl toplog LB (engl. *Lysogeny broth*) medijuma (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca), nakon čega su one inkubirane 1 h na 37°C na šejkeru (250 rpm-a). Nakon inkubacije, tubice su centrifugirane 3 min na 3000 rpm-a. Odbačen je deo supernatanta (SN), a u ostatku SN su ćelije resuspendovane i sejane na pripremljenu čvrstu podlogu sa selekcionim antibiotikom (kanamicin ili ampicilin) i inkubirane na 37°C preko

noći. Zahvaljujući selektivnosti podloge, izrastale su samo bakterije koje su primile plazmide a koje se uočavaju u vidu pojedinačnih kolonija. Ploče sa bakterijama su čuvane na +4°C. Ovi eksperimenti su urađeni na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu u istraživačkoj grupi za proteomiku koja je pod rukovodstvom dr. Tanje D. Ćirković Veličković.

Tabela 1. Sekvence koje su targetovane u promotoru Arx-a.

Sekvenca koji targetuju gRNK	
1	GCAAAGCGCAAAGCGCGAAC
2	TAACAAGTGTAGTGAGCCGC
3	AGGGTGGGAGCCCGCAACCG
4	GATGCTGTCGATGCAGTAGG

3.1.2.3.3. Izolacija plazmidne DNK na velikoj skali

Plazmidna DNK je izolovana pomoću Plasmid Plus Midi Kit (QIAGEN, #12943). Pojedinačna bakterijska kolonija sa čvrste podloge je prenetu u tečni LB medijum sa selekcionim antibiotikom i inkubirana preko noći na 37°C na šejkeru. Prekonoćne kulture su centrifugirane na 7000 x g 15 min na +4°C pomoću Beckman ultracentrifuge. Bakterijski talozi su resuspendovani u 4 ml pufera P1. Na ćelijske suspenzije je dodavano po 4 ml P2 pufera za liziranje koji je pomešan blagim invertovanjem sve dok lizati ne postanu viskozni, nakon čega su lizati inkubirani 3 min na sobnoj temperaturi. Na lizate je zatim dodavano po 4 ml P3 pufera za neutralizaciju koji je odmah pomešan energičnim invertovanjem 4-6 puta. Uzorci su prebačeni na QIAfilter i inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi. Ćelijski lizati su zatim profiltrirani kroz QIAfilter, pa je na filtrat dodavano po 2 ml BB pufera koji je pomešan invertovanjem 4-6 puta. Lizati su prebačeni na QIAGEN Plazmid Plus Midi spin kolonice na koje je primenjen vakuum od ~300 mbar sve dok sva tečnost ne prođe kroz kolonicu. Za ispiranje DNK koja je ostala na kolonici je korišćeno 700 µl pufera ETR, koji je izvučen vakuumom. Za dodatno ispiranje je korišćeno 700 µl PE pufera, koji je izvučen primenom vakuuma dok sva tečnost ne prođe kroz kolonicu. Posle toga su kolonice centrifugirane na 10000 x g na 1 min kako bi se eliminisao zaostali pufer za ispiranje. Kolonice su onda prebačene u tubice od 1,5 ml. Naliveno im je 200 µl EB pufera, inkubirane su ≥1 min na sobnoj temperaturi i centrifugirane 1 min na 10000 x g. Rastvorena plazmidna DNK je dobijena u eluatu.

3.1.3. Protočna citofluorimetrija i ćelijsko sortiranje

Nakon 24 h, 5 i 7 dana posle nukleoporacije i transfekcije posredovane PEI-em ispitivana je ekspresija zelenog fluorescentnog proteina pomoću protočne citofluorimetrije. Ćelije su analizirane pomoću Partec CyFlow Space protočnog citofluorimetra (Partec, Munster, Germany) korišćenjem FlowMax softvera i pomoću FACS (engl. *Fluorescence-activated Cell Sorting*) Aria III protočnog citofluorimetra i ćelijskog sortera (BD Biosciences, San Diego, USA), korišćenjem FACS Diva softvera. Ćelije su 5. i 7. dana nakon transfekcije podvrgnute fluorescentno aktiviranom ćelijskom sortiranju pomoću FACS Aria III protočnog citofluorimetra. Za ove analize ćelije su skinute sa atherentne podloge i resuspendovane u HBSS puferu (engl. *Hanks' buffered saline solution*) bez kalcijuma (Ca²⁺) i magnezijuma (Mg²⁺)

koji je bio obogaćen sa 2% FBS-om i 2mM EDTA na sobnoj temperaturi. Čelije su sakupljane u tubice čiji su zidovi obloženi sa kompletnim medijumom za alfa ćelije. Po završetku sortiranja ćelije su centrifugirane i zasejavane za dalju propagaciju ili podvrgnute metodama za manipulaciju nukleinskim kiselinama i proteinima.

3.1.4. Fluorescentna mikroskopija

Nakon nukleofekcije i transfekcije ćelija posredovane PEI-jem ćelije su propagirane najčešće 5-8 dana pri čemu im je proveravana efikasnost transfekcije u nekoliko vremenskih tačaka pomoću fluorescentnog mikroskopa. Mikrografije su pravljene pomoću AxioCam digitalne kamere koja je zakačena na Axio Observer Z1 mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) upotrebom odgovarajućih filtera. Za kvantifikaciju fluorescentnog signala korišćen je Image J softver. Totalna vrednost fluorescentnog signala predstavljena je inegrisanom gustinom koja sumira sve piksele unutar jednog regiona.

3.2. Metode za manipulaciju nukleinskim kiselinama

3.2.1. Izolacija genomske DNK i ukupne RNK

Za istovremeno izolovanje genomske DNK (gDNK) i ukupne RNK iz ćelija korišćen je ZR-Duet™ DNA/RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, Irvine, USA). Nakon nalivanja 400 µl pufera za liziranje na ćelijske taloge, lizati su prebacivani u Zymo-Spin IIC kolonice koje su postavljene na tubice za sakupljanje i centrifugirane na 12000 x g 1 min. Kolonice na kojima je ostala DNK su prebačene u nove tubice za sakupljanje, a na filtrat u kome se nalazi ukupna RNK je dodat 95% etanol (vol 1:1) i dobro promešan. Filtrat sa etanolom je zatim prenešen na Zymo-Spin IIC kolonice i filtriran na 12000 x g 1 min. Zatim su sve kolonice ispirane po dva puta sa puferom za ispiranje. Nakon poslednjeg centrifugiranja je na kolonice sa DNK nalivano po 50 µl prečišćene vode iz kita nakon čega su inkubirane 5 min na sobnoj temperaturi. Kolonice su zatim centrifugirane na 16000 x g pola minuta. Na kolonice sa RNK je nalivano po 25 µl prečišćene vode koje su nakon 1 min na sobnoj temperaturi centrifugirane na 10000 x g. Koncentracija i čistoća izolovanih nukleinskih kiselina proveravana je na spektrofotometru (NanoPhotometer N60, Implen GMBH, Germany) a kvalitet izolovane DNK i RNK elektroforetskim razdvajanjem na 0,7-1% agaroznom gelu.

3.2.2. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR) korišćena je za analizu ekspresije gena na nivou iRNK. Uzorci ukupne RNK u količini od 1 µg tretirani su sa 1 U DNKaze I i 10 x reakcionog pufera sa MgCl₂ u ukupnoj zapremini od 10 µl, 30 min na 37°C kako bi se eliminisala potencijalno zaostala DNK prilikom procesa izolacije. Reakcija je zaustavljena inkubacijom sa 1 µl 50 mM EDTA 10 min na 65°C, nakon čega je RNK služila kao matrica za sintezu komplementarne cDNK (engl. *complementary DNA*). Za reakciju reverzne transkripcije korišćen je RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Burlington, Canada). Reakciona smeša je sadržala uzorak RNK, nasumične heksmerne i oligo-dT prajmere, reverznu transkriptazu, inhibitor RNKaze, dNTP, reakcioni pufer i vodu. Reakciona smeša je inkubirana 5 min na 25°C a zatim 60 min na 42°C. Reakcija je zaustavljena inkubiranjem 5 min na 70°C. Uzorci reverzno transkribovane RNK čuvani su na -20°C do upotrebe.

Za kvantifikaciju nivoa iRNK pomoću RT-qPCR-a korišćen je QuantStudio Design & Analysis softver (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) i Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fischer Scientific, USA). Reakciona smeša u finalnoj zapremini od 10

ul sastojala se od 50 ng reverzno transkribovane RNK, 2x Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix reagens i 1 μ M prajmera. Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix reagens se sastojao od Maxima Hot Start Taq DNK polimeraze, dNTP, SYBR green I fluorescentne interkalirajuće boje, ROX pasivne referentne boje za normalizaciju fluorescentnog signala, i odgovarajućeg pufera. Spisak naziva i sekvenci prajmera kao i dužine amplikona korišćenih u okviru ove doktorske disertacije dat je u Tabeli 2. Za dizajniranje prajmera korišćen je program Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) na osnovu mišijih sekvenci deponovanih u GenBank. Elektroforetsko razdvajanje produkata PCR reakcije na 2% agaroznom gelu korišćeno je za proveru specifičnosti korišćenih prajmera.

PCR reakcije su uključivale sledeće faze: inicijalnu denaturaciju DNK od 10 min na 95°C, i 40 ciklusa dvostepenog PCR koji se sastojao od denaturacije DNK 15 s na 95°C i vezivanja i elongacije prajmera 60 s na 60°C. Nivo ekspresije iRNK analiziranih gena je normalizovan u odnosu na nivo iRNK za REEP 5 koji je korišćen kao referentni gen. Relativni nivo promene u ekspresiji (engl. *Fold change*) analiziranih gena izračunat je pomoću delta Ct metode ($2^{-\Delta Ct}$), a rezultati su prikazani na graficima kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (engl. *standard deviation* - SD). Relativni nivo promena u ekspresiji iRNK za *Arx* i *Ins 2* u EpiC (dCas9-Dnmt3a3L-KRAB fuzioni konstrukt, reporterski konstrukt i sve 4 gRNA za *Arx*)u odnosu na Mock (transfekovane sa dCas9-Dnmt3a3L-KRAB konstruktom ali bez gRNK) transfekovane ćelije određen je pomoću delta delta Ct metode ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Tabela 2. Spisak prajmera korišćenih za RT-qPCR analizu.

Naziv gena		Sekvenca prajmera (5'-3')	Dužina PCR produkta
REEP 5	fw rev	TCATCGGACTGGTGGCTTTG GTTGGGACTCTCGATGGCTT	116
Cas 9	fw rev	TCAGGCGGCAAGAGGATTTC AGTCATCCACGCGAATCTGG	129
ARX	fw rev	CGGAGAAGCCCATGCAAAAT TGCAGCTCAGCCTCGAAC	137
Pax4	fw rev	GCTCGAATTGCCAGCTAAAG TACTGTGGGGACTGGGAAGA	218
Ins 2	fw rev	GGAGCGTGGCTTCTTCTACA TTCATTGCAGAGGGGTAGGC	237
Slc2a2	fw rev	TGCACCATCTTCATGTCGGT ATTGCAGACCCAGTTGCTGA	207
MafA	fw rev	TTCTGGAGAGCGAGAAGTGC ACAGAAAGAAGTCGGGTGCG	219
Pax6	fw rev	TGTCTACCAGCCAATCCCAC CATTCAGTACGGGCTGGT	215
Nkx 2.2	fw rev	TTCCGGACACCAACGATGAA CCGTGCAGGGAGTATTGGA	214
Nkx 6.1	fw rev	GAGAGCACGCTTGGCCTATT TCGTCGTCATCCTCCTCATTC	180

MafB	fw rev	GGCAACTAACGCTGCAACTC TCCTCTTACTGACCCGCAGA	184
Gcg	fw rev	TTGAGAGGCATGCTGAAGGG TGGTGCTCATCTCGTCAGAG	189

3.2.3. Analiza transkriptoma- RNK sekvenciranje

Za pravljenje biblioteka za sekvenciranje korišćena je totRNK uz pomoć kita za pravljenje biblioteke (Illumina TruSeq RNA Sample Preparation v2 Kit, Illumina, USA) po uputstvu proizvođača. Biblioteke su objedinjene u ekvimolarnim količinama i sekvencionirane u jednokrakoj postavci (engl. *single-end setting*). Za sekvenciranje RNK je korišćena Illumina NextSeq 500 High output mašina sa ;itanjem dugim 75 bp, dok su podaci procesuirani uz pomoć *nf-core/rnaseq* bioinformatičkog pristupa (Ewels i sar., 2020) i podrazumevanih parametara (osim ako nije navedno drugačije). Sekvence su poravnate sa referentnim genomom miša (mm39/GRCm39, Ensemble release 105) i kvantifikovane uz pomoć softverskog paketa RSEM (engl. RNA-Seq by Expectation-Maximization), (--aligner star_rsem). Vrednosti CPM jedinice (engl. *Normalized counts per million*, CPM) koje se dobijaju deljenjem broja čitanja sa zbirom čitanja u biblioteci i množenjem sa milion, korišćene su za statističku obradu podataka korišćenjem edgeR softverskog paketa za analizu diferencijalne genske ekspresije (Robinson i sar., 2010). Za identifikaciju diferencijalno eksprimiranih gena između dve grupe primenjen je egzaktni test razlike a geni sa vrednostima $\log_2\text{CPM} > 0$, $\log_2\text{Fold change} > 0.5$ i $\text{FDR} < 0.05$ (engl. *false discovery rate*, FDR, p vrednost prilagođena za više testova), (alfa u odnosu na beta ćelijsku liniju) ili $p < 0.05$ (EpiC u odnosu na Mock transfekciju) su uzeti kao geni sa statistički značajnom razlikom. Za targetovani gen *Arx* primenjen je single-sided egzaktni test. Analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*, PCA) je urađena na $\log_2\text{CPM}$ vrednostima za 500 gena sa najvećom varijabilnošću u ekspresiji. Toplotna mapa (engl. *heatmap*) je napravljena pomoću ComplexHeatmap paketa na osnovu skaliranog nivoa ekspresije gena (z-score) koji su značajno različito eksprimirani (Gu i sar., 2016). Geni i uzorci su klasterovani pri čemu je kao mera udaljenosti korišćena Euklidska udaljenost. Analiza zastupljenosti svih značajno povišeno ili sniženo eksprimiranih gena u KEGG (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) bazi biohemijskih puteva urađena je primenom WebGestalt veb alata za funkcionalnu analizu obogaćenja (WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit, <http://www.webgestalt.org>), uz pomoć podrazumevanih podešavanja. Prikazano je deset najboljih značajno obogaćenih puteva (Liao i sar., 2019).

3.2.4. Metode za analizu metilacije DNK bazirane na tehnici lančane reakcije polimeraze

3.2.4.1. Bisulfitna konverzija DNK

Za bisulfitnu konverziju gDNK korišćen je EZ DNA Methylation™ Kit D5002 (Zymo research, Irvine, USA). Bisulfitna konverzija DNK podrazumeva tretiranje DNK sa bisulfitom koji prevodi nemetilovani citozin u uracil, dok metilovani citozin ostaje nepromenjen u toku tretmana. Prečišćena konvertovana DNK se dalje koristi za amplifikaciju u toku PCR reakcije. Nemetilovani citozin biva zamenjen sa timinom, na osnovu čega se mogu razlikovati metilovane i nemetilovane varijante istog regiona. Uzorci DNK (2 µg) su denaturisani dodavanjem pufera za rastvaranje i vode u finalnoj zapremini od 50 µl i inkubirani 15 min na 37°C. Uzorcima je zatim dodavano po 100 µl CT reagensa za konverziju, nakon čega su uzorci inkubirani 16 h na 50°C u mraku, a zatim 10 min na 4°C. Uzorci su nanešeni na Zymo-Spin

kolonice u kojima je prethodno dodato 400 μ l pufera za vezivanje. Kolonice su zatvorene i, nakon mešanja invertovanjem, centrifugirane. Nakon dodavanja 100 μ l pufera za ispiranje, kolonice su centrifugirane, posle čega im je naliveno po 200 μ l pufera za desulfonaciju sa kojim su inkubirane 20 min na sobnoj temperaturi. Posle centrifugiranja, kolonice su ispirane dva puta sa po 200 μ l pufera za ispiranje i ponovo centrifugirane, nakon čega su prebačene na čiste tubice. Na kolonice je zatim naliveno po 20 μ l pufera za eluciju i po isteku inkubacije u trajanju od 1 min na sobnoj temperaturi one su centrifugirane pri čemu je eluirana bisulfitno konvertovana DNK. Svi koraci centrifugiranja su izvedeni na 11000 x g 30 sec. bisulfitno konvertovana DNK je čuvana na -20°C do upotrebe.

3.2.4.2. Dizajniranje prajmera za bisulfitno konvertovanu DNK

Za analizu metilacionog statusa gena za ARX (NCBI referentna sekvenca NC_000086.7, na lokaciji 93286507...93298357) dizajnirana su dva seta prajmera pomoću MethPrimer bioinformatičkog alata, <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>. Prajmeri su napravljeni tako da obuhvataju region uzvodno i nizvodno od mesta početka transkripcije TSS-a. Prvi set prajmera čine dva para prajmera i to jedan komplementaran bisulfitno konvertovanoj kompletno metilovanoj DNK (M) a drugi kompletno nemetilovanoj DNK (U), pri čemu se u istu reakciju dodaju i M i U par prajmera kako bi se obuhvatile sve potencijalne kombinacije metilacionog statusa. Drugi set prajmera je komplementaran sekvenci DNK koja ne sadrži CpG dinukleotide koji mogu biti diferencijalno metilovani (Tabela 3.).

Tabela 3. Prajmeri korišćeni u analizi metilacije DNK.

Naziv prajmera		Sekvenca prajmera (5' - 3')	Dužina prajmera	Dužina PCR produkta
R1	M Fw	AATTTTAAGGATAAGAAGGAGCGATA	26	198
	Rev	CGAACTACGTAAACCTACCG	20	
	U Fw	TTTTAAGGATAAGAAGGAGTGATA	24	200
	Rev	AAACCAAACCTACATAAACCTACCAA	25	
R2	Fw	GTATTAGGAAGAGGGTTGTTTTGAG	25	287
	Rev	ATATCTCCAACCTTAACAAATCCCAA	25	

3.2.4.3. Analiza kriva topljenja visoke rezolucije (HRM)

Analizi krive topljenja visoke rezolucije (engl. *high resolution melting analysis*, HRM) prethodila je bisulfitna konverzija komercijalno dostupnog mišijeg metilovanog standarda (D5012, Zymo Research) i uzoraka gDNK izolovane iz ćelija po protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4.1. Kao nemetilovani standard korišćena je gDNK iz kontrolnih netretiranih α TC1-6 ćelija s obzirom da promotor *Arx*-a u alfa ćelijama nije metilovan (Dhawan i sar, 2011). QuantStudio 3 Real-Time PCR sistem je korišćen za PCR amplifikaciju uzoraka. Reakciona smeša u ukupnoj zapremini od 10 μ l sastojala se od 5 μ l 2x MeltDoctor HRM Master Mix reagensa (Applied Biosystems), 0,4 μ M svakog prajmera iz R1 seta prajmera ili 0,8 μ M za R2 par prajmera (Tabela 3.), i 2 μ l bisulfitno konvertovanog templata (teorijske koncentracije od 20 ng/ μ l). Za amplifikaciju je korišćen temperaturni profil koji se sastojao od inicijalne denaturacije 10 min na 95°C i 40 ciklusa PCR od tri koraka i finalne elongacije prajmera na 72°C/7 min. PCR program je podrazumevao denaturaciju na 95°C/15 s, vezivanje prajmera na

57, 59°C/30 s i elongaciju na 72°C/30 s. Nakon amplifikacije analizirana je kriva topljenja amplicona pomoću HRM programa koji je podrazumevao promenu temperature od 60-95°C brzinom od 0,025°C/s pri čemu je merena fluorescencija nakon svakog porasta temperature. HRM v3.1 program (Applied Biosystems) je upotrebljen za analizu krajnjih produkata i dobijanje HRM rezultata. Visina pikova očitana sa grafika razlika u odnosu na nemetilovani standard (0%) iskorišćena je za izračunavanje procenta metilacije analiziranih uzoraka koji je izražen u odnosu na metilovani standard (100%).

Tabela 4. Prajmeri za pravljenje biblioteke za bisulfitno sekvenciranje molekula DNK.

Primers	Sequence (5'-3')
mArx_bis_1_f	TTTTTTGTTTTTATATTTATAGGTTTTTTTT
mArx_bis_1_r	TTACTCATAACTAATACTTTTTCTTAAAC
mArx_bis_2_f	GTTTAAGGAAAAAGTATTAGTTATGAGTAA
mArx_bis_2_r	TATCTCCAACCTTAACAAATCCCA
mArx_biscg2_3_f	AGGTTGAGTTGTATTTGTTATTTAAGT
mArx_biscg2_3_r	CTAACTAATCTTAAACRTATCCCAAAC
mArx_biscg2_4_f	GTTTGGGATAYGTTTAAGATTAGTTAG
mArx_biscg2_4_r	AATACAACAACAACCTTTCCTTAA

3.2.4.4. Bisulfitno sekvenciranje molekula DNK

Za potrebe bisulfitnog sekvenciranja je izolovana gDNK bisulfitno konvertovana pomoću Zymo EZ DNA Methylation-Lightning kita po uputstvu proizvođača. Regioni od interesa u okviru promotora *Arx*-a su umnoženi korišćenjem 2,25 mM MgCl₂; 0,033 U/μl polimeraze (HotStarTaq Polymerase, Qiagen) i prajmera u finalnoj koncentraciji od 300 nM (Tabela 4). Detaljan program za Touchdown PCR reakciju dat je u Tabeli 5. Početne temperature anilinga „x“ su optimizovane za svaki par prajmera i kretale su se od 57-66°C. Kako bi se uradila provera kvaliteta produkata PCR reakcije, oni su elektroforetski razdvajani na agaroznom gelu i prečišćeni uz pomoć PCR Clean-up kit-a (Macherey-Nagel). Kit za pripremu biblioteke (SureSelect library preparation kit, Agilent Technologies) je korišćen za popravku krajeva i dodavanje A repa bisulfitnim ampliconima za svaki uzorak. Uzorci su ligirani za jedinstvene TruSeq HT dvostruko indeksirane adaptore, zatim pulovani i umnoženi PCR reakcijom uz pomoć Q5 polimeraze u trajanju od 8 ciklusa. Za kvantifikaciju biblioteke korišćen je NEBNext Library quantification kit za Illuminu. Za sekvenciranje biblioteka korišćena je MiSeq mašina sa 2x300 PE ranova. Dobijeni rezultati sekvenciranja su demultipleksovani (Qiime) (Caporaso i sar., 2010), zatim je proveren kvalitet, nakon čega su odstranjeni adapteri korišćenjem podrazumevanih parametara (Trim Galore v0.4.1, http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore, sa cut-off-om na Phred 20 i --paired,). Nakon toga su sekvence mapirane korišćenjem mišijeg genoma (GRCm39 assembly) (Bismark v0.14.4, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark>, uz pomoć --non_directional,). Procenat metilacije za svako CpG mesto je određen pomoću SeqMonk, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/seqmonk>, korišćenjem funkcija “Kvantifikacija razlike” kao i “Izveštaj o ispitivanju sa komentarima” (Annotated probe report). Završna analiza je urađena korišćenjem Microsoft Excel softvera.

Tabela 5. Touchdown PCR program za amplifikaciju bisulfitno konvertovane DNK.

PCR program		
95°C	15 min	
94°C	30 s	6x
x°C	30 s	10x
72°C	40 s	
94°C	30 s	
x-5°C	30 s	
72°C	40 s	35x
94°C	30 s	
x-10°C	30 s	
72°C	40 s	
72°C	4 min	
4°C	hold	

3.3. Metode za manipulaciju proteinima

3.3.1. Priprema ukupnih ćelijskih lizata

Ćelije α TC1-6 i NIT-1 su zasejavane u sterilne ploče sa 6 bunarića. Po dostizanju konfluentnosti od 70%, ćelije su ispirane PBS puferom i podignute sa podloge pomoću pufera za ćelijsku disocijaciju bez enyima. Nakon centrifugiranja 5 min na 500 x g, ćelijski talozi su resuspendovani u 20 zapremina reagensa za ćelijsko liziranje (ProteoJET™, Mammalian Cell Lysis Reagent, Fermentas, Life science) sa koktelima inhibitora proteaza (Mix G (Serva) (1X)) i fosfataza (Mix I (SERVA) (1X)). Ćelije su inkubirane na +4°C/30 min uz povremeno vorteksovanje. Ćelijski lizati su centrifugirani na 16000 x g, +4°C/20 min nakon čega je ćelijski SN prebačen u nove tubice, odmah korišćen ili zamrznut na -80°C do upotrebe.

3.3.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u ćelijskim lizatima određivana je kolorimetrijskom metodom po Lowry-ju (Lowry i sar., 1951). Sveže pripremljen rastvor koji je sadržao 0,01% CuSO₄; 0,02% K-Na-tartarata; 0,1 N NaOH i 2% Na₂CO₃ je pomešan sa 1 ml 100x razblaženog uzorka (1:1 v:v). Uzorci su pomešani vorteksovanjem i inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi. Uzorcima je zatim dodavano po 0,1 ml 2x razblaženog Folinovog reagensa (Institut Mol, Stara Pazova, Srbija), nakon čega su uzorci vorteksovani i inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi. Apsorbanca reakcione smeše merena je na spektrofotometru (Shimatzu UV-160) na 750 nm u odnosu na slepu probu koja nije sadržala ćelijski lizat i prošla je sve korake iz procedure. Vrednosti apsorbanca BSA poznatih koncentracija (0,1 – 0,4 mg/ml) su korišćene za dobijanje standardne krive sa koje su očitavane koncentracije proteina u uzorcima ćelijskih lizata i izražavane u mg/ml.

3.3.3. Elektroforetsko razdvajanje proteina

Za razdvajanje proteina prema molekulskim masama primenjena je jednodimenzionalna Tris-glicinska SDS-PAGE elektroforeza (engl. *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Proteini su razdvajani u poliakrilamidnom gelu koji se

sastojao iz gornjeg gela za skoncentrisavanje proteina (4% poliakrilamid; 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,05% amonijum-persulfat (AMPS) i 0,1% tetrametil-etilen-diamin (TEMED)) i donjeg gela za razdvajanje proteina (9-15% poliakrilamid; 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,05% AMPS i 0,05% TEMED). Jednaka količina lizata ćelija (20-40 µg ukupnih proteina, zavisno od proteina koji se detektuje) pomešana je sa Laemmli puferom (0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8; 1 mM EDTA; 5% β-merkaptotanol; 2% SDS; 8 M urea i 5% bromfenol plavo) u odnosu 1:1 i nanošena na gel za skoncentrisavanje proteina. Kao pufer za elektroforezu korišćen je Tris-glicinski pufer (0,195 M glicin; 25 mM Tris-HCl, pH 8,8; 0,1% SDS) u Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (BioRad) sistemu za elektroforetsko razdvajanje proteina. Uzorci proteina su putovali kroz gel za skoncentrisavanje pri naponu od 120 V a nakon toga kroz gel za razdvajanje pri naponu od 150 V. Proces elektroforeze u trajanju od 1 h je zaustavljen nakon izlaska boje iz gela (bromfenol plavo), a gel je dalje korišćen za prenos proteina na membranu.

3.3.4. Prenos proteina sa gela na membranu

Proteini su sa gelova prenošeni na PVDF (polivinilidendifluorid) membranu (Amersham Hybond P 0.45 PVDF, GE Healthcare Life Sciences) pod uticajem konstantne struje i napona od 30 V na +4°C preko noći. Gelovi su posle završene SDS-PAGE elektroforeze inkubirani u ohlađenom puferu za prenos proteina (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM glicin; 20% methanol; 0,02% SDS). PVDF membrane su aktivirane inkubiranjem u metanolu 2 min na RT, ispirane u dejonizovanoj vodi i prebačene u pufer za prenos proteina. Nakon inkubacije od 30 min, gelovi i membrane su poređani između filter papira i postavljeni u aparat za transfer (Bio-Rad, Mini TransBlot Electrophoretic Transfer Cell). Da bi se ispitala efikasnost prenosa proteina, membrane su bojene 1% rastvorom Ponceau-S u 5% sirćetnoj kiselini.

3.3.5. Imunoblot analiza proteina (IBA)

Membrane sa prenetim proteinima su ispirane u 0,05% rastvoru Tween 20 u TBS puferu (20 mM Tris-HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl) (TBS-T), a zatim inkubirane u 5% rastvoru nemasnog mleka u prahu (Santa Cruz Biotechnology) u TBS-T puferu 1 h na sobnoj temperaturi kako bi se blokiralo nespecifično vezivanje antitela. Membrane su ponovo ispirane u TBS-T puferu, a zatim inkubirane sa primarnim antitelima na +4°C preko noći. U eksperimentima u okviru ove teze su za imunoblot analizu korišćena primarna antitela prikazana u Tabeli 6. Nakon ispiranja nevezanog primarnog antitela TBS-T puferom, membrane su inkubirane sa sekundarnim antitelom obeleženim peroksidazom rena (engl. *horseradish peroxidase* - HRP) 1 h na sobnoj temperaturi. Posle ispiranja nevezanog sekundarnog antitela TBS-T puferom, na membrane je naliven luminol reagens (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnology). Proteini su vizualizovani na filmovima (Hyperfilm ECL, Santa Cruz Biotechnology, RPN 3103 K).

3.3.6. Imunocitohemija (ICC)

Ćelije su zasejavane i gajene na sterilna okrugla stakalca prečnika 13 mm u ploči sa 24 bunara. Kontrolne ćelije su fiksirane po dostizanju konfluentnosti od 70%, dok su transfekovane fiksirane pet ili sedam dana posle transfekcije. Ćelije su fiksirane inkubiranjem u 4% paraformaldehidu (Science Services GmbH, Munich, Germany) u PBS-u 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su isprane PBS-om. Permeabilizacija ćelija je postignuta inkubiranjem ćelija u 0,3% rastvoru deterdženta Triton X-100 u PBS-u 10 minuta na sobnoj temperaturi. Ćelije su ispirane po 3 x 10 min PBS-om. Inkubiranjem ćelija u 10% NDS (engl. *normal donkey serum*) (za anti-Arx i anti-insulin antitela) ili 3% rastvoru BSA (Serva) (za anti-glukagon antitelo) u PBS-u 60 min na sobnoj temperaturi postignuto je blokiranje

nespecifičnih vezujućih mesta za antitela u ćeliji. Nakon toga su ćelije isprane 0,2% rastvorom Tween-20 u PBS-u (PBST) koji je korišćen u narednim koracima ispiranja kao i za razblaživanje antitela. Ćelije na stakalcima su inkubirane preko noći na +4°C sa primarnim antitelima (anti-glukagon antitelo, anti-insulin antitelo i anti-ARX antitelo), nakon čega su ćelije ispirane po pet puta PBST-om. Inkubacija sa sekundarnim fluorescentno obeleženim antitelom je trajala 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije su ćelije ispirane pet puta sa puferom za ispiranje. Za vizualizaciju DNK molekula korišćen je 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0,1ug/mL). Ćelije su inkubirane 2 min na sobnoj temperaturi, ispirane pet puta sa PBST-om i na kraju su isprane sa destilovanom vodom. Nakon toga je na mikroskopske pločice nakapavano po 15 µl Mowiol reagensa (Calbiochem, San Diego, CA, USA) koji služi da se stakalca sa ćelijama zalepe za pločice. Ćelije su fotografisane pomoću kamere mikroskopa (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) korišćenjem odgovarajućih filtera.

Tabela 6. Spisak antitela korišćenih u imunoblot i imunocitohemijskoj analizi proteina

	Antitela	Poreklo	Razblaženja IBA / ICC	Naziv/Proizvođač
Primarna antitela	anti-glukagon	Koza	1:500 / 1:50	C-18 / Santa Cruz Biotechnology,
	anti-insulin	Zec	1:500 / 1:200	H-86 / Santa Cruz Biotechnology
	anti-ARX	Zec	1:1000 / 1:100	ab48856 / Abcam
	anti-GAPDH	Zec	1:2000 / -	FL-335 / Santa Cruz Biotechnology
	anti-beta Aktin	Zec	1:2000 / -	ab8227 / Abcam
Sekundarna antitela	anti-zečji IgG-HRP	Goveče	1:2000 / -	sc-2379 / Santa Cruz Biotechnology
	anti-kozji IgG-HRP	Magarac	1:2000 / -	sc-2020 / Santa Cruz Biotechnology
	anti-kozji IgG, F(ab') ₂ -TRITC	Magarac	1:100	sc-3855 / Santa Cruz Biotechnology
	anti-zečji IgG (H+L), Alexa Fluor 555	Magarac	1:4000	A-31572 / Invitrogen

3.3.7. Sekretija insulina stimulisana glukozom

Za potrebe ispitivanja sekrecije insulina stimulisane glukozom ćelije su zasejavane u sterilnim pločama sa 24 bunara i to α TC1-6 i NIT-1 same ili α TC1-6 ćelije pomešane sa NIT-1 ćelijama u različitom procentu (0-10%). Ćelije su rasle u kompletnom medijumu za alfa ćelije. Po dostizanju konfluentnosti od 70-80% ćelije su dva puta ispirane sa 300 µl i inkubirane 1 h u Krebs Ringerovim bikarbonatnim (KRB) puferom bez glukoze (engl. *Krebs-Ringer Bicarbonate*) (116 mM NaCl, 1,8 mM CaCl₂·2(H₂O), 0,8 mM MgSO₄·7(H₂O), 5,4 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄·2(H₂O), 26 mM NaHCO₃ i 0,5% BSA, pH 7,4) na 37°C. Po isteku inkubacije, ćelije su opet isprane dva puta sa 300 µl KRB pufera. Na ćelije je zatim naliveno po 300 µl KRB pufera sa 30 mM glukozom. Posle inkubacije od 2 h na 37°C, KRB pufer je pokupljen, centrifugiran 5 min na 120 x g kako bi se oborile ćelije. Supernatant je zatim prebačen na kolonice za skoncentrisavanje (Amicon), centrifugiran 30 min na 14000 na RT. Supernatant je čuvan na -

20°C do upotrebe. Kvantifikacija oslobođenog insulina nakon stimulacije glukozom je merena ELISA imunosej (poglavlje 3.3.8).

3.3.8. Određivanje koncentracije insulina u medijumu ELISA testom

Za određivanje koncentracije insulina koji je oslobođen u medijumu korišćen je enzimski imunosej (engl. *enzyme linked immunossorbent assay*; ELISA), (Rat/Mouse Insulin ELISA Kit, EMD Millipore, MO, USA). Uzorci su pripremani tako što je medijum u kome su ćelije rasle sakupljan i centrifugiran na 500 x g, 5 min, a SN (10 µl) je korišćen za imunosej. Procedura se zasniva na vezivanju insulina iz uzorka medijuma za monoklonalno anti-insulinsko antitelo kojim je obloženo dno bunara mikrotitar ploče. Za imobilisani insulin se vezuje biotinirovano anti-insulinsko antitelo za koje se zatim vezuje peroksidaza rena. Nakon toga je u bunare dodat supstrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) koji služi za spektrofotometrijsko određivanje enzimske aktivnosti HRP-a. Apsorbanca je merena na 450 nm korišćenjem ELISA čitača (Sunrise Basic, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). Porast u apsorbanci je direktno proporcionalan količini oslobođenog insulina u ćelijskom medijumu.

Svi rastvori su pripremani prema uputstvu proizvođača i temperirani na sobnoj temperaturi pre upotrebe. Bunari iz mikrotitar ploče su prvo ispirani sa po 300 µl pufera za ispiranje, a zatim je naliveno po 10 µl Assay Buffer-a u bunare za slepu probu i uzorke. U bunare za slepu probu, standarde insulina i uzorke za kontrolu kvaliteta eseja je dodavano po 10 µl Matrix Solution-a. Nakon toga je u odgovarajuće bunare dodavano po 10 µl standarda, uzoraka za kontrolu kvaliteta eseja i uzoraka ćelijskog medijuma. U bunare je zatim naliveno po 80 µl antitela koje je inkubirano 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga su bunari ispirani po tri puta sa po 300 µl pufera za ispiranje. Zatim im je naliveno po 100 µl Enzyme Solution-a koji je inkubiran 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga su bunari ispirani po šest puta sa po 300 µl pufera za ispiranje. Zatim je u bunare naliveno po 100 µl rastvora supstrata koji je inkubiran 15-20 min. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 100 µl rastvora za zaustavljanje reakcije, nakon čega je izmerena apsorbanca. Izmerene vrednosti apsorbance standarda insulina su korišćene za formiranje standardne krive sa koje je očitavana koncentracija insulina u analiziranim uzorcima medijuma i izražena u ng/ml.

3.3.9. Određivanje koncentracije glukagona ELISA testom

Za određivanje koncentracije glukagona koji je oslobođen u ćelijskom medijumu korišćen je ELISA test (Glucagon Quantikine ELISA Kit, R&D systems, Bio-Techne, USA). Uzorci su pripremani kao i za prethodni imunosej (Poglavlje 3.3.8.). Kao i kod prethodnog, i u osnovi ovog testa se nalazi kvantitativni enzimski imunosej. Svi rastvori i standardi glukagona su pripremljeni prema uputstvu proizvođača i temperirani na sobnu temperaturu pre upotrebe osim Konjugata koji se čuva na ledu. Bunari iz mikrotitar ploče su najpre ispirani po dva puta sa po 200 µl pufera za ispiranje nakon čega je rastvor kompletno uklonjen. U bunare je nalivano po 150 µl Assay Diluent-a i po 50 µl standarda, kontrole ili uzorka. Nakon inkubacije od 3 h na sobnoj temperaturi, bunari su ispirani po četiri puta sa po 200 µl pufera za ispiranje. Na bunare je onda nalivano po 200 µl hladnog Konjugata glukagona koji je inkubiran sat vremena na +4°C, nakon čega su usledili koraci ispiranja. Na isprane bunare je nalivano po 200 µl rastvora supstrata koji je inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi zaštićeno od svetlosti. Nakon ispiranja, na bunare je dodavano po 50 µl stop rastvora nakon čega je izmerena apsorbanca na 450 nm. Za korekciju optičke nepravilnosti mikrotitar ploče uzeto je očitavanje na talasnoj dužini od 540 nm. Apsorbanca je merena korišćenjem ELISA čitača (Sunrise Basic, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). Na osnovu standardne krive kreirane pomoću standarda poznate koncentracije, određena je koncentracija glukagona oslobođenog u medijum u analiziranim uzorcima i izražena u pg/ml.

3.3.10. Imunoprecipitacija hromatina

Za imunoprecipitaciju hromatina (engl. *chromatin immunoprecipitation*, ChIP) korišćen je Pierce™ Magnetic ChIP Kit (Thermo Scientific) prema uputstvu proizvođača. Čelije su gajene u sterilnim Petri posudama, i po dostizanju konfluentnosti od 80% tretirane su 1% rastvorom formaldehida (Zorka Pharma, Srbija) u ćelijskom medijumu bez FBS-a 10 min na sobnoj temperaturi kako bi se učvrstile veze (engl. *cross-linking*) između DNK i proteina i međusobne veze između proteina. Fiksiranje ćelija je zaustavljano dodavanjem rastvora glicina koji je inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi uz blago mućkanje. Čelije su zatim dva puta ispirane sa hladnim PBS-om i odvojene od podloge u PBS puferu u koji je dodat koktel proteaznih inhibitora. Čelijska suspenzija je centrifugirana na 3.000 x g, +4°C/5 min, SN je odliven, a ćelijski talog je resuspendovan u puferu za ekstrakciju membrane sa proteaznim i fosfataznim inhibitorima i inkubiran 10 min na ledu. Nakon centrifugiranja na 9000 x g, +4°C/3 min, SN koji je sadržao citosolnu frakciju pažljivo je odliven. Čelijska jedra koja su ostala u talogu resuspendovana su u puferu za digestiju sa mikrokoalnom nukleazom (0,01 U/μl) i inkubirana na 37°C 15 min uz kratko mešanje svakih 5 min. Reakcija je prekinuta dodavanjem rastvora za zaustavljanje aktivnosti mikrokokalne nukleaze uz inkubiranje 5 min na ledu, nakon čega su uzorci centrifugirani pri brzini od 9.000 x g, +4°C /5 min. Kako bi se razbila jedarna membrana, talozi su rastvarani u puferu za razblaživanje sa koktelom inhibitora i podvrgnuti sonifikaciji (20 s sonifikacije i 20 s pauze, u 5 ciklusa). Uzorci su centrifugirani na 9.000 x g, +4°C/5 min, nakon čega je SN koji sadrži fragmentisani hromatin pokupljen. Alikvotiran je deo SN koji je služio kao kontrolni hromatin u PCR reakciji a koji sadrži 10% početne količine hromatina. Ostatak SN je išao u reakciju imunoprecipitacije sa kontrolnim antitelima anti-RNK polimerazom II (RNK pol II) ili normalnim zečijim anti-imunoglobulin G (IgG) antitelom (koja su deo Pierce Magnetic ChIP Kit-a) ili sa 5 μg mišijeg anti-H3K4me3 (ab12209, Abcam) ili 5 μg zečijeg anti-H3K9me3 (ab8898, Abcam). Inkubacija sa antitelima je išla preko noći na rotacionoj platformi na +4°C. Zatim su uzorcima dodate magnetne kuglice kuplovane sa proteinom A/G nakon čega je smeša inkubirana 2 h na rotacionoj platformi na +4°C. Na isprane kuglice je nalivan pufer za eluciju i inkubiran na 65°C/30 min uz konstantno snažno mešanje na termomikseru. Eluirani imunoprecipitati i kontrolni hromatin su inkubirani sa proteoinazom K na 65°C/90 min kako bi se uklonili proteini hromatina. Uzorcima je dodat pufer za vezivanje DNK, nakon čega su oni prebačeni na kolonice za prečišćavanje DNK i centrifugirani na 10.000 x g, 1 min. Sa prethodno isprane kolonice eluirana je prečišćena DNK, i korišćena za RT-qPCR analizu kako bi se procenila relativna zastupljenost ciljne sekvence u imunoprecipitatima. Reakcije za RT qPCR sadržale su po 2 μL uzoraka imunoprecipitovane DNK ili kontrolnog uzorka 10% početne količine DNK, Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) reagens i 1 μM prajmere. Prajmeri korišćeni za RT-qPCR u ovoj analizi navedeni su u Tabeli 7. Serija razblaženja kontrolnih uzoraka hromatina koji nisu išli u reakciju imunoprecipitacije korišćena je za dobijanje standardne prave koja je služila za izračunavanje efikasnosti prajmera i zastupljenosti ciljanih sekvenci. Nivo prisustva analiziranih proteina na ciljanim sekvencama izračunat je normalizacijom u odnosu na imunoprecipitaciju IgG antitelom, i finalno prikazan relativno u odnosu na NIT-1 ćelijsku liniju.

3.4. Pravljenje shema

Za pravljenje shema za predstavljanje rezultata korišćen je softver SnapGene Viewer verzije 6.0.5. Na shemama je mesto početka transkripcije na *Arx*-u označeno kao +1 i predstavlja eksperimentalno potvrđen promotor koji je generisan u bazi podataka Eukariotskih promotora (engl. *Eucaryotic promoter database*, EPD) za miša (*M. musculus*) (Dreos i sar, 2013).

Tabela 7. Spisak prajmera korišćenih za ChIP analizu

		Prajmeri za ChIP	
		Sekvenca (5'-3')	Dužina amplikona (bp)
Arx I	fw	TTTGGCTCTAGTGCGTGCC	214
	rev	GCTCAGGACAAGCGGTAACA	
Arx II	fw	TTAGGGTTTGCCACCCCATCTA	208
	rev	CAATCAGCCTCCCCAAATGAAG	

3.5. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišćen je softver GraphPad Prism 5 za operativni sistem Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, www.graphpad.com). Svi eksperimenti su urađeni u tri biološke replike, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednosti \pm standarda devijacija (SD), osim ako nije drugačije naznačeno. Kolmogorov-Smirnov test je korišćen za ispitivanje da li dobijeni podaci prate normalnu raspodelu, a Studentov t - test za jedan uzorak (One Sample t - test) je korišćen za utvrđivanje postojanja statističke značajnosti između Mock transfekovane grupe i ostalih grupa. Za podatke koji ne prate normalnu raspodelu korišćen je Wilcoxon Signed Rank test. Studentov t - test je korišćen za poređenje srednjih vrednosti normalno distribuiranih varijabli između dve grupe, a One-Way ANOVA praćena post-hoc analizom u kojoj je korišćen Tukey's HSD test je korišćena za poređenje srednjih vrednosti kada su prisutne više od dve grupe. Ukoliko je p vrednost bila $<0,05$, nulta hipoteza je prihvatana, a postojanje statističke značajnosti obeležavano sa "*" u poređenju sa kontrolom ili Mock transfekovanom grupom ćelija. (*p $< 0,05$; **p $< 0,01$; ***p $< 0,0001$).

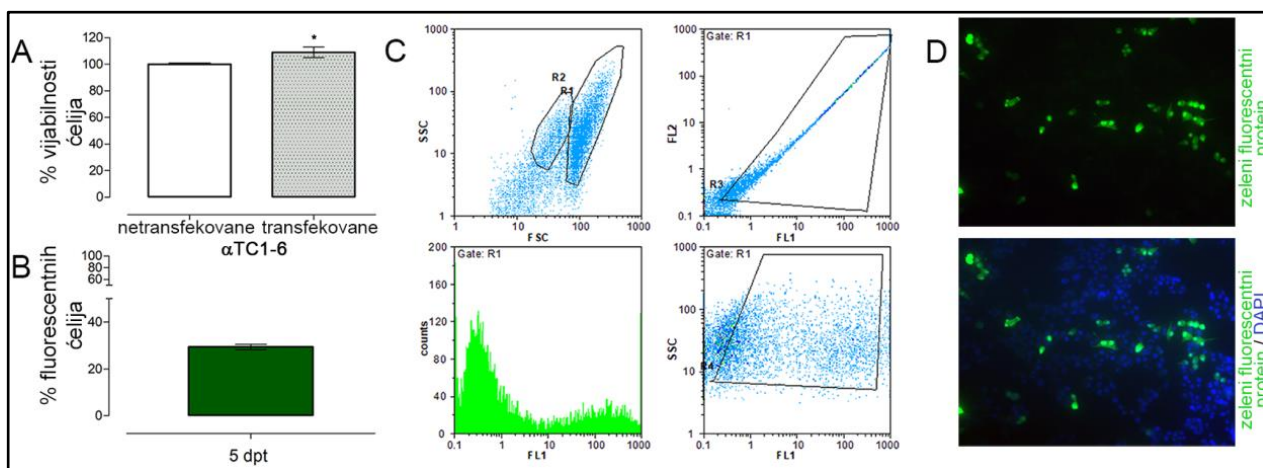
4. REZULTATI

4.1. Optimizacija transfekcije za α TC1-6 ćelijsku liniju

Prvi cilj ovog dela doktorske disertacije je bio pronalazak i optimizacija adekvatne metode za transfekciju α TC1-6 ćelijske linije kako bi se sistem za epigenetičko editovanje što efikasnije uneo u ćelije. Drugi cilj je bio da se obezbedi dovoljan broj transfekovanih ćelija u nekoliko vremenskih tačaka kako bi se ispratio efekat uvedenih epigenetičkih izmena u transfekovanim ćelijama. Analizirane su i poređene dve metode za transfekciju i to: hemijski tip transfekcije pomoću PEI-ja i fizički tip transfekcije - nukleopracijom. U svrhu optimizacije i poređenja metoda za transfekciju merena je vijabilnost ćelija i efikasnost transfekcije protočnom citofluorimetrijom i fluorescentnom mikroskopijom.

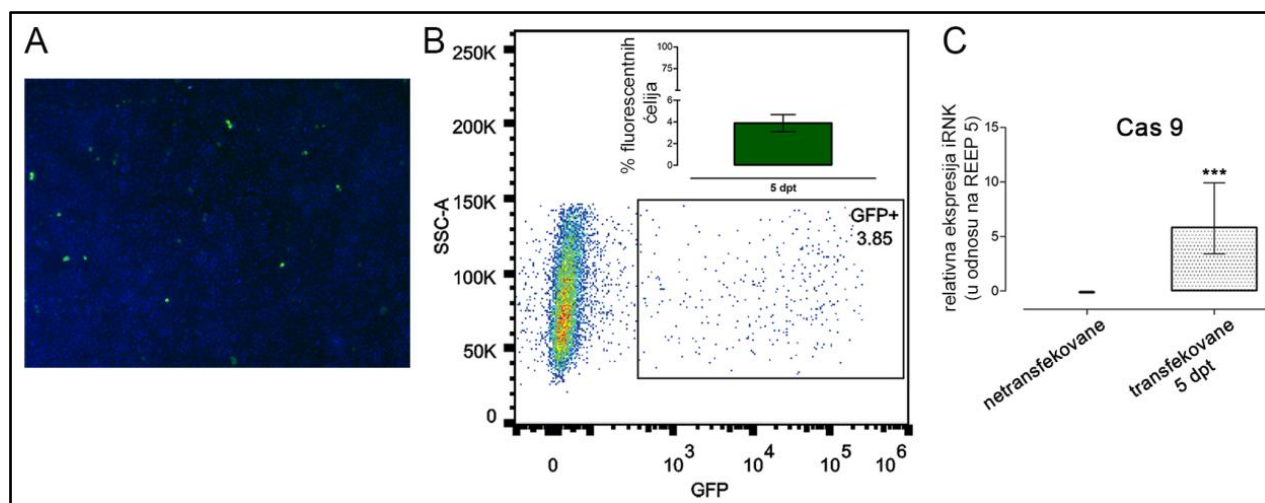
4.1.1. Transfekcija α TC1-6 ćelija korišćenjem polietilenimina (PEI)

Najpre je za transfekciju α TC1-6 ćelija pomoću PEI-ja korišćen mali reporterski mVenus C1 plazmid. Za tu svrhu su DNK i PEI pomešani u masenom odnosu 1:3. Nakon transfekcije su ćelije propagirane do 5. dana, pri čemu nije zapažen negativni efekat na vijabilnost i proliferaciju transfekovanih ćelija, koje su se ponašale i izgledale jednako dobro kao i netransfekovane ćelije (Slika 4.1A.). Efikasnost transfekcije je ispitivana na osnovu ekspresije zelenog fluorescentnog proteina (Keith i sar., 2000). Rezultati analize pomoću protočnog citofluorimetra su pokazali da je GFP bio prisutan u \sim 30% ćelija koje su podvrgnute transfekciji PEI-jem (Slika 4.1B, C.). Deo ćelija je fiksiran 5. dana posle transfekcije i pripremljen za fluorescentnu mikroskopiju. Plava boja na mikrografijama označava ćelijska jedra i daje uvid u ukupan broj analiziranih ćelija, a potiče od DAPI boje koja se vezuje za dvolančani molekul DNK u ćelijskom jedru. Zelena boja na mikrografijama potiče od zelenog fluorescentnog proteina i označava ćelije koje su uspešno transfekovane plazmidom koji nosi informaciju za reporterski gen. Prisustvo zelenog fluorescentnog proteina je vizualizovano i potvrđeno pomoću adekvatnog filtera fluorescentnog mikroskopa koji je pružio uvid u nivo efikasnosti transfekcije (Slika 4.1D.).



Slika 4.1. Transfekcija α TC1-6 ćelija PEI-jem. Ćelije su transfekovane sa mVenus plazmidom u odnosu 1:3=DNK:PEI. Prikazana je (A) vijabilnost ćelija i (B) procenat fluorescentnih ćelija na petom danu nakon transfekcije. (C) Rezultati su dobijeni pomoću protočnog citofluorimetra. (D) Detekcija zelenog fluorescentnog proteina pomoću fluorescentnog mikroskopa 5. dana nakon transfekcije. Ćelijska jedra su obojena pomoću DAPI-ja. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD, * $p \leq 0,05$.

U sledećem koraku su α TC1-6 ćelije transfekovane sa kombinacijom plazmida za epigenetičko editovanje koja uključuje 5% mVenus C1 kao reporterski plazmid, 20% plazmida koji nosi informaciju za dCas9-Dnmt3a3L-KRAB koji ima efektorsku ulogu i 75% praznog gRNA plazmida, a koji će u narednim eksperimentima nositi preciznu informaciju o tome na koji region treba da se pozicionira sistem za epigenetičko editovanje (EpiCRISPR sistem). Plazmid za dCas9-Dnmt3a3L-KRAB je odabran kao najveći od potencijalnih plazmida planiranih za editovanje epigenoma u cilju utišavanja ekspresije ciljanih gena (dCas9-Dnmt3a3L i dCas9-KRAB). Korišćen je isti maseni odnos između DNK i PEI-ja kao i za prethodni eksperiment (Slika 4.1).



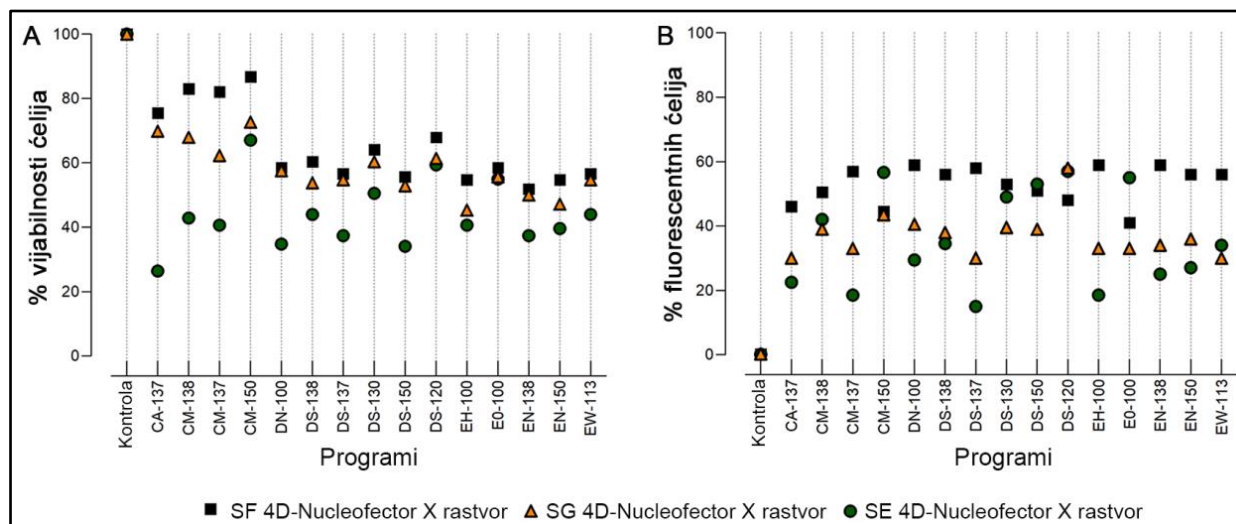
Slika 4.2. Efekat veličine plazmida na transfekciju posredovanu PEI-jem. α TC1-6 ćelije su transfekovane kombinacijom plazmida za Epi-CRISPR sistem za ciljano uvođenje metilacije koji se sastojao od 5% Venus-a C1, 20% dCas9-Dnmt3a3L-KRAB, i 75% praznog gRNA plazmida. (A) Petog dana nakon transfekcije pomoću fluorescentnog mikroskopa detektovano je samo nekoliko GFP⁺ ćelija. (B) Uz pomoć protočne citofluorimetrije izmereno je ~3,8% GFP⁺ ćelija. (C) Relativni nivo ekspresije iRNK za Cas9 meren je pomoću RT-qPCR analize u kontrolnim netransfekovanim i transfekovanim ćelijama na petom danu nakon transfekcije PEI-jem. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost između grupa je određena pomoću Studentovog t-testa, *** $p \leq 0,001$.

Petog dana posle transfekcije korišćen je protočni citofluorimetar i ćelijski sorter za merenje i sakupljanje transfekovanih ćelija. Sortiranje ćelija je urađeno na osnovu prisustva GFP-a u ćelijama. Iz sortiranih ćelija je izolovana totRNK koja je poslužila za merenje relativnog nivoa ekspresije iRNK za *Cas9* kao dokaz uspešnosti transfekcije i prisustva EpiCRISPR sistema u transfekovanim α TC1-6 ćelijama (Slika 4.2C.). Detektovani nivo GFP⁺ ćelija pomoću fluorescentne mikroskopije (Slika 4.2A.) i FACS-a je bio veoma nizak (~3,8%) (Slika 4.2B.) u odnosu na prethodno dobijene rezultate kada su ćelije transfekovane sa malim reporterskim plazmidom (Slika 4.1.). Dobijeni rezultati nisu bili zadovoljavajući s obzirom da je broj transfekovanih ćelija drastično opao sa primenom plazmida za epigenetičko editovanje. U narednom koraku se pristupilo optimizaciji nukleofekcije kao alternativnoj metodi za transfekciju α TC1-6 ćelijske linije.

4.1.2. Optimizacija nukleofekcije α TC1-6 ćelija

Specifična kombinacija od 15 predefinisanih programa i tri različita rastvora zajedno sa suplementom su korišćeni za optimizaciju uslova za nukleofekciju α TC1-6 ćelija sa pmaxGFPTM reporterskim vektorom (Slika 4.3.). Da bi se odabrao jedan od tri rastvora korišćeno je 0,4 μ g pmaxGFPTM plazmida i 2×10^5 α TC1-6 ćelija resuspendovanih u 20 μ L SF,

SG, ili SE 4D-Nucleofector X rastvora sa suplementom za jedan bunarić 16-well Nucleocuvette™ stripa. Odmah nakon primene pulsa, ćelije su zasejavane na sterilnu ploču sa 96 bunarića, pri čemu je gustina zasejavanja ćelija bila $0,5 \times 10^5$ ćelija po bunariću. Ćelije koje su bile podvrgnute nukleofekciji u SF puferu su pokazale najbolje rezultate u pogledu vijabilnosti i efikasnosti transfekcije u poređenju sa druga dva rastvora za transfekciju (Slika 4.3.). Izmereni procenat fluorescentnih ćelija koje su podvrgnute nukleofekciji u SF puferu je bio ujednačen za skoro sve primenjene programe i izdvojio se kao najbolji (~50% GFP+ ćelija) u odnosu na preostale dve grupe ćelija (Slika 4.3B.).

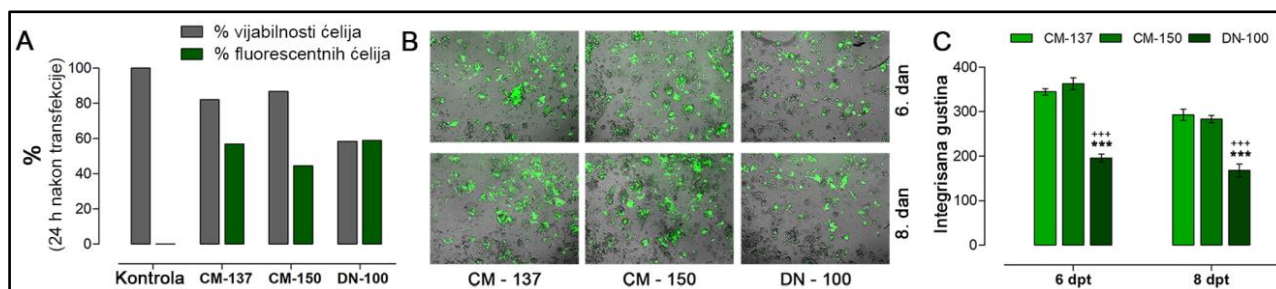


Slika 4.3. Optimizacija pufera i predefinisanih programa za nukleofekciju α TC1-6 ćelija. Poređenje tri različita 4D-Nucleofector X rastvora i 15 različitih programa za nukleofekciju pomoću Amaxa tehnologije. (A) Procenat vijabilnosti α TC1-6 ćelija i (B) efikasnosti transfekcije na osnovu prisustva GFP+ ćelija određivana je 24 h nakon nukleofekcije pomoću protočnog citofluorimetra. Ćelije koje nisu bile izložene električnom pulsima su označene kao kontrolne i 100% vijabilne. Procenat vijabilnosti ćelija nakon nukleofekcije izražen je relativno u odnosu na kontrolne ćelije.

Sa druge strane, ćelije koje su bile u SF rastvoru se mogu podeliti na dve podgrupe na osnovu preživljavanja merenog 24 h nakon nukleofekcije: prva sa visokim stepenom preživljavanja od oko 80% i druga čiji je nivo preživljavanja bio niži za ~20% u odnosu na prvu grupu (Slika 4.3A.). SE rastvor se pokazao kao najmanje efikasan za nukleofekciju α TC1-6 ćelijske linije, rezultujući u najnižem broju transfekovanih ćelija. Na osnovu dobijenih rezultata u narednim eksperimentima za optimizaciju transfekcije je korišćen isključivo SF rastvor za nukleofekciju. Na osnovu preporuka za optimizaciju transfekcije pomoću Amaxa sistema, ispitivan je efekat povećanja broja ćelija i pridodat korak oporavka ćelija nakon nukleofekcije koji podrazumeva inkubaciju ćelija 10 min na 37°C u medijumu sa niskim nivoom Ca^{2+} jona nakon primenjenog pulsa.

Od četiri programa (CA-137, CM-138, CM-137, CM-150) sa najvišim procentom preživljavanja od ~80% izabrani su CM-137 i CM-150 za dalje praćenje i analizu, pri čemu je CM-137 odabran kao program koji je obezbedio najvišu, a CM-150 najnižu efikasnost transfekcije. Od preostalih 11 programa koji su pokazali nižu vijabilnost nakon transfekcije (~58%) odabran je DN-100 kao program koji je omogućio najveću efikasnost i veoma dobro preživljavanje (Slika 4.3.). Ćelije koje su bile izložene CM-137 i CM-150 programima su pokazale sličan nivo preživljavanja 24 h nakon nukleofekcije, dok su CM-137 i DN-100 rezultovali u sličnom stepenu efikasnosti transfekcije (CM-137-57%, DN-100-59%). Program CM-150 je pokazao niži nivo efikasnosti transfekcije (44.5%) u odnosu na CM-137 (57%). Ekspresija GFP-a u ćelijama koje su podvrgnute nukleofekciji pomoću ova tri odabrana

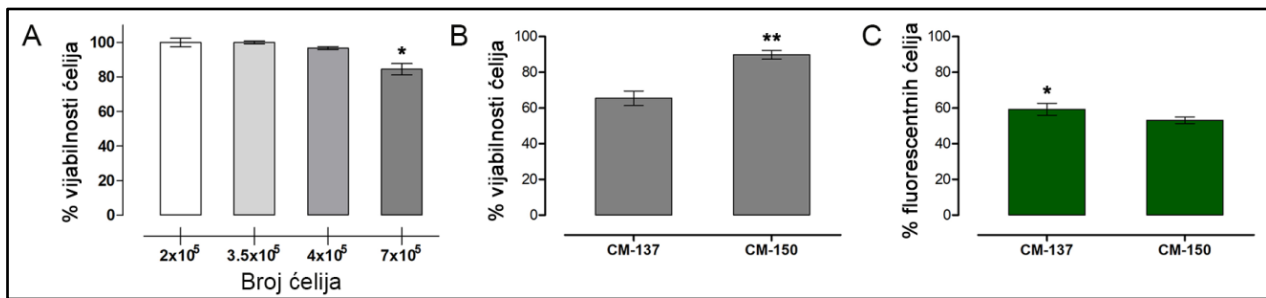
programa je ispitivana u još dve vremenske tačke: na šestom i osmom danu nakon nukleofekcije. Čelije koje su bile izložene programu CM-150 su pokazale najbolju vijabilnost 24 h nakon nukleofekcije i najbolji stepen preživljavanja i oporavka nakon stresa izazvanog nukleofekcijom (Slika 4.4A.). Programi CM-137 i CM-150 su rezultovali sa mnogo više transfekovanih ćelija u odnosu na DN-100 (Slika 4.4B, C.).



Slika 4.4. Poređenje tri najefikasnija programa u kombinaciji sa SF rastvorom za nukleofekciju α TC1-6 ćelija. (A) Tri najefikasnija programa 24 h posle nukleofekcije koji su odabrani za praćenje na 6. i 8. danu. Kontrola predstavlja ćelije koje nisu podvrgnute električnom puls. (B) Praćenje fluorescentnog signala na 6. i 8. danu nakon nukleofekcije korišćenjem fluorescentnog mikroskopa. Prikazane su reprezentativne fotografije. (C) Rezultati kvantifikacije fluorescentnog signala izraženi su kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost između grupa je određena pomoću one-way ANOVA testa. *** $p < 0,001$ u poređenju sa CM-137, +++ $p < 0,001$ u poređenju sa CM-150.

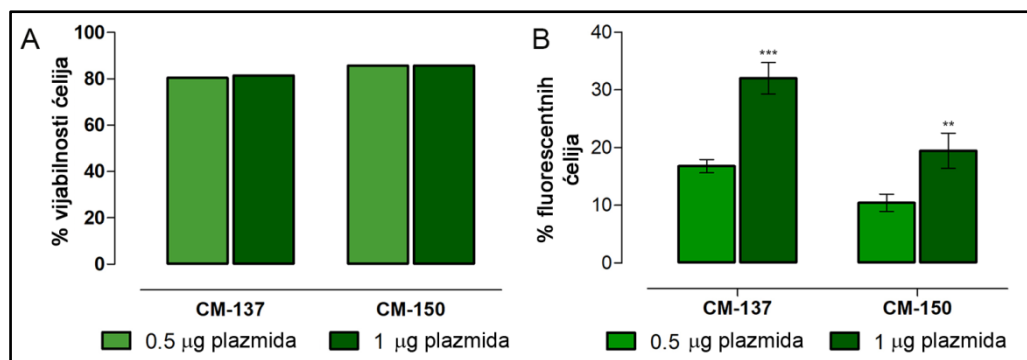
Naredni koraci u optimizaciji transfekcije su bili usmereni ka povećanju pula transfekovanih ćelija. Kako bi se to postiglo optimizovana su dva aspekta transfekcije: povećanje broja ćelija i povećanje količine plazmidne DNK za transfekciju. Kako bi se postiglo povećanje broja transfekovanih ćelija, analiziran je efekat povećanja gustine zasejavanja ćelija na njihovu vijabilnost 24 h nakon transfekcije. Vijabilnost ćelija koje su zasejane kao u prethodnim eksperimentima (2×10^5) je prikazana kao 100% (Slika 4.5A.). Rezultati eksperimenata su pokazali da dupliranje broja ćelija nema statistički značajno negativnih efekata na preživljavanje ćelija i njihovu vijabilnost 24 h nakon zasejavanja (Slika 4.5A.). Dodatno povećavanje broja ćelija i gustine zasejavanja ipak dovodi do poremećene vijabilnosti.

Dalji proces optimizacije nukleofekcije je podrazumevao poređenje dva odabrana programa CM-137 i CM-150 kako bi se definisali najoptimalniji uslovi za analiziranu ćelijsku liniju (Slika 4.5B, C.). Za transfekciju je korišćeno 75% više α TC1-6 ćelija nego u prethodnoj transfekciji ($3,5 \times 10^5$) i 0.5 μ g pmaxGFPTM plazmida u 20 μ L SF 4D-Nucleofector X rastvora. U ovom setu eksperimenata uključen je i korak oporavka ćelija u RPMI medijumu. Vijabilnost ćelija je merena 24 h nakon nukleofekcije i pokazala je da su ćelije podvrgnute programu CM-137 imale 17% nižu vrednost u odnosu na prethodni eksperiment (Slika 4.4A.). Vijabilnost ćelija pod programom CM-150 je bila skoro identična kao u prethodnom setu eksperimenata (89.9%). U poređenju sa ćelijama pod CM-137 programom, vijabilnost ćelija pod CM-150 programom pokazuje statistički značajno veći stepen preživljavanja nakon nukleofekcije (Slika 4.5B.). Korak oporavka nakon električnog pulsa je ostvario povoljne efekte na povećanje pula transfekovanih ćelija koji se ogleda kroz povećani broj GFP⁺ ćelija za 8,6% za ćelije podvrgnute CM-150 programu. Sa druge strane, kod ćelija koje su bile pod programom CM-137 nisu zabeležene statistički značajne promene u procentu transfekovanih ćelija (Slika 4.5C.) u odnosu na prethodni set eksperimenata (Slika 4.4A.).



Slika 4.5. Efekat povećanja broja ćelija na prinos transfekovanih ćelija. (A) Vijabilnost ćelija merena protočnim citofluorimetrom. Vijabilnost ćelija čiji je ukupan broj u trenutku zasejavanja bio 2×10^5 su posmatrane kao 100% vijabilne. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost između grupa je određena pomoću one-way ANOVA testa, * $p \leq 0,05$ u poređenju sa sve tri grupe ćelija. (B) Procenat vijabilnosti i (C) GFP⁺ ćelija merne su pomoću protočnog citofluorimetra. Za ispitivanje efikasnosti nukleofekcije korišćeno je $3,5 \times 10^5$ ćelija transfekovanih sa $0,5 \mu\text{g}$ pmaxGFPTM plazmida uz pomoć dva najefikasnija programa za nukleofekciju (CM-137 i CM-150). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost između grupa je određena pomoću Studentovog t-testa, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Ovi rezultati su pokazali da je nukleofekcija adekvatniji metod za transfekciju α TC1-6 ćelija u odnosu na hemijski tip transfekcije pomoću PEI-ja, pre svega zbog mnogo veće efikasnosti transfekcije. Naredni korak optimizacije nukleofekcije je podrazumevao upotrebu kombinacije plazmida za EpiCRISPR sistem koji je uključivao sledeće plazmide: 5% pmaxGFPTM kao reporterski plazmid, 20% plazmida koji nosi informaciju za dCas9-Dnmt3a3L-KRAB koji ima efektorsku ulogu i 75% praznog gRNA plazmida. Analizirane su i poredene nukleofekcije sa dve različite količine plazmidne DNK ($0,5 \mu\text{g}$ i $1 \mu\text{g}$) na $3,5 \times 10^5$ ćelija po programu. Rezultati analize protočne citofluorimetrije su pokazali da dupliranje količine plazmida za EpiCRISPR sistem za epigenetičko editovanje ne utiče na vijabilnost ćelija bez obzira na program (Slika 4.6A.). Stepenn preživljavanja ćelija je isti kao i u prethodnom setu eksperimenata (Slika 4.4A.) što potvrđuje reproducibilnost ove metodologije. Efikasnost transfekcije je bila niža za 27,3% za CM-137 program i za 33,6% za CM-150 program u odnosu na ćelije transfekovane samo sa reporterskim plazmidom. Dupliranje količine plazmidne DNK je rezultovalo u duplo većoj efikasnosti transfekcije (Slika 4.6B.).

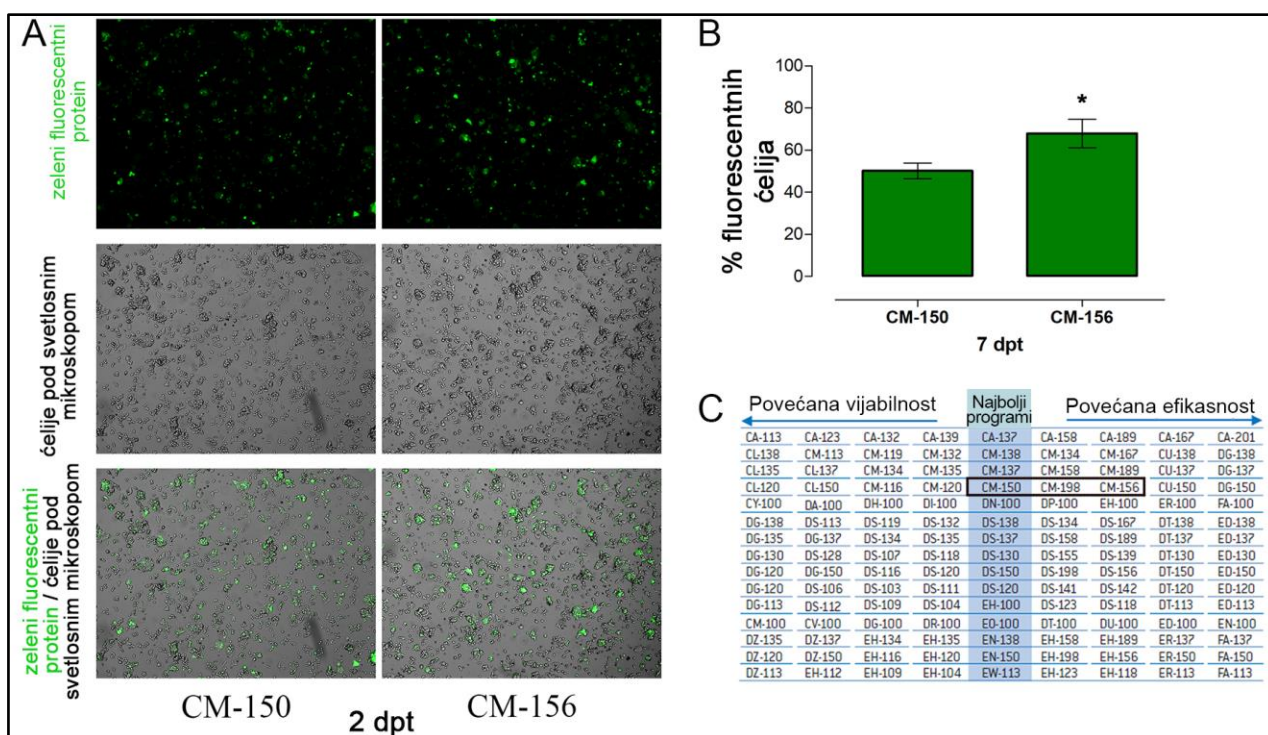


Slika 4.6. Optimizacija odabranih programa i količine DNK za nukleofekciju sa Epi CRISPR plazmidima. (A) Vijabilnost ćelija i nivo fluorescentnog signala mereni su 24 h nakon nukleofekcije. (B) Efikasnost nukleofekcije je određena na osnovu procenta fluorescentnih ćelija. Ispitivane su dve različite količine plazmidne DNK na efikasnost transfekcije. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost između grupa je određena pomoću Studentovog t-testa, ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$.

Program CM-150 je korišćen u narednim koracima optimizacije nukleofekcije zbog toga što je u prethodnim eksperimentima pokazano da obezbeđuje bolju vijabilnost ćelija

nakon nukleofekcije sa pmaxGFP™ plazmidom u odnosu na CM-137 program (Slika 4.5B.). Iako su dobijeni rezultati nukleofekcije sa plazmidima za EpiCRISPR sistem za epigenetičko editovanje bili bolji u odnosu na transfekciju pomoću PEI-ja, pristupljeno je finom podešavanju odabranog programa kako bi se dodatno poboljšala efikasnost transfekcije (Slika 4.7.). Za ovaj set eksperimenata korišćeno je 5×10^5 α TC1-6 ćelija resuspendovanih u 20 μ L SF 4D-Nucleofector X rastvora sa 2 μ g plazmida za EpiCRISPR sistem u prethodno definisanom odnosu. Iz tabele za fino podešavanje programa odabran je CM-156 kao onaj koji je pomeren u pravcu povećanja efikasnosti transfekcije (Slika 4.7C.). Drugog dana nakon nukleofekcije ćelije su analizirane fluorescentnom mikroskopijom (Slika 4.7A.), a 7. dana pomoću protočnog citofluorimetra (Slika 4.7B.).

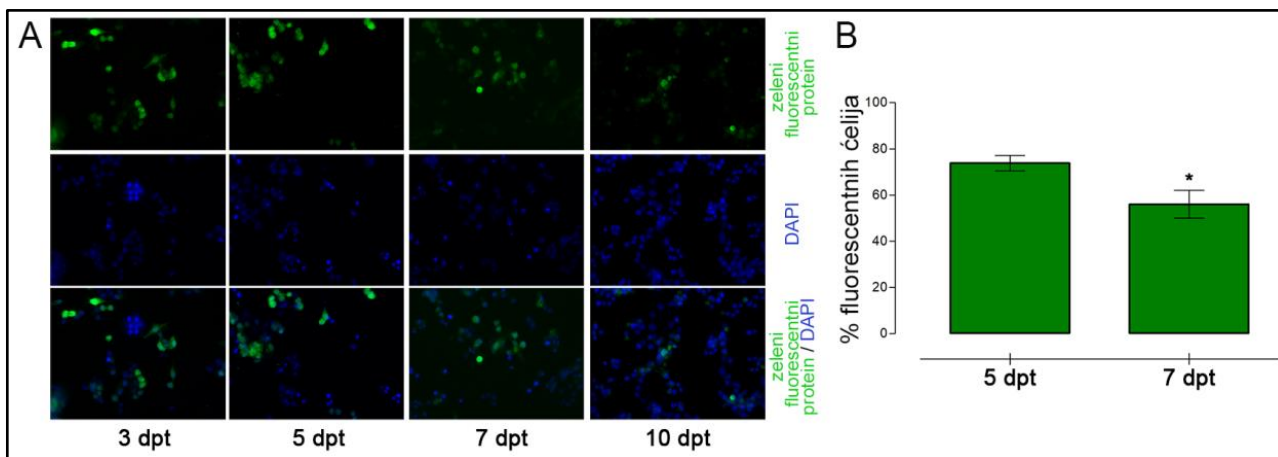
Razlika od 17,6% u efikasnosti transfekcije u korist ćelija koje su bile pod programom CM-156 u odnosu na program CM-150 je pokazala da se finim podešavanjem programa došlo do visokog procenta efikasnosti transfekcije α TC1-6 ćelija (67,8% GFP+ ćelija), dok je efekat na vijabilnost ostao minimalan (Slika 4.7B.).



Slika 4.7. Fino podešavanje odabranog programa za nukleofekciju α TC1-6 ćelija. (A) Nivo fluorescentnog signala ispitivan je pomoću fluorescentnog mikroskopa 48 h nakon nukleofekcije. Broj ćelija koji je podvrgnut nukleofekciji bio je 5×10^5 . **(B)** Fluorescentni signal meren je i pomoću protočnog citofluorimetra 7. dana nakon nukleofekcije. **(C)** U pokušaju da se poveća broj transfekovanih ćelija poređeni su programi CM-150 koji je izabran na osnovu prethodnih eksperimenata i CM-156 koji je pomeren u pravcu povećane efikasnosti nukleofekcije. Tabela za fino podešavanje programa za nukleofekciju je preuzeta sa sledećeg linka: <https://bioscience.lonza.com/download/content/asset/31152>. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost između grupa je određena pomoću Studentovog t-testa, * $p \leq 0,05$.

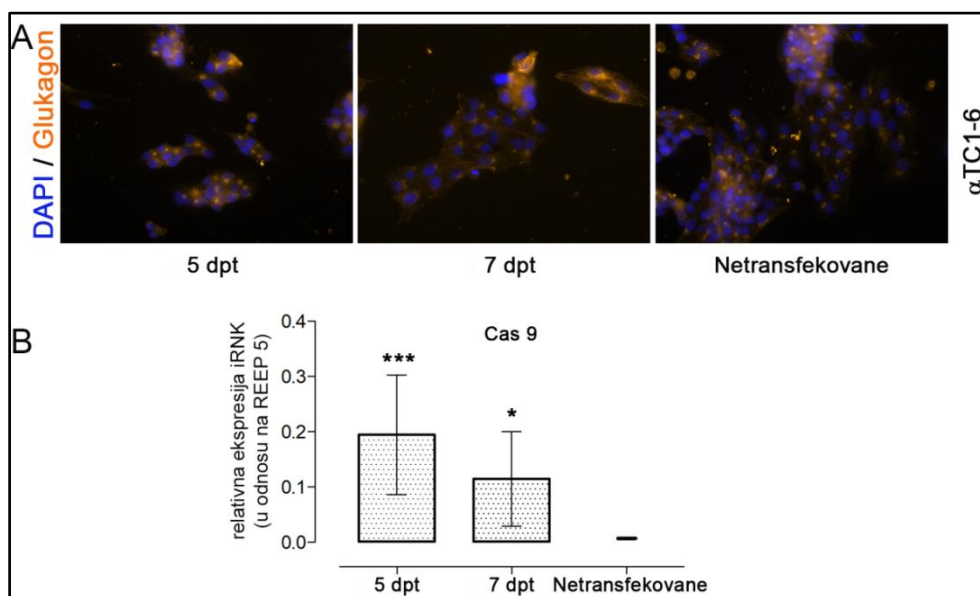
Odabrani program koji je obezbedio najbolju efikasnost transfekcije primenjen je na kivete koje omogućavaju nukleofekciju na velikoj skali. Za kivetu je korišćeno 7,5 μ g plazmidne DNK za EpiCRISPR sistem u napred navedenom odnosu i 5×10^6 ćelija koje su resuspendovane u 100 μ L SF rastvora sa suplementom. Rezultati su dodatno potvrdili reproducibilnost ove metode (Slika 4.8.), definitivno izdvajajući program CM-156 za nukleofekciju α TC1-6 ćelija u odnosu na transfekciju posredovanu PEI-jem. Analiza ekspresije GFP pomoću fluorescentne mikroskopije u nekoliko vremenskih tačaka nakon nukleofekcije

pokazala je da se nivo ekspresije GFP menja u toku vremena što ukazuje na prolaznu transfekciju α TC1-6 ćelija (Slika 4.8A.). Protočnom citofluorimetrijom je izmeren visok nivo fluorescentnih ćelija na petom danu posle nukleofekcije (71,12%) nakon čega je zapažen pad fluorescence meren na sedmom danu (59,5%) u nesortiranim ćelijama (Slika 4.8B.). Desetog dana nakon nukleofekcije GFP se i dalje eksprimira u ćelijama ali na mnogo nižem nivou u poređenju sa ranijim danima (Slika 4.8A.). Ćelije su sortirane na osnovu prisustva GFP-a 5. i 7. dana nakon nukleofekcije i dalje analizirane.



Slika 4.8. Praćenje ekspresije GFP u ćelijama koje su transfekovane pomoću CM-156 programa. (A) Nivo ekspresije GFP ispitivan je pomoću fluorescentnog mikroskopa 3., 5., 7. i 10. dana nakon nukleofekcije. Ćelijska jedra su obojena pomoću DAPI-ja. (B) Fluorescentni signal je meren i pomoću protočnog citofluorimetra 5. i 7. dana nakon nukleofekcije. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost između grupa je određena pomoću Studentovog t-testa, * $p \leq 0.05$.

Imunofluorescentnom detekcijom glukagona pokazano je da ne postoji nikakva razlika u njegovom prisustvu u transfekovanim ćelijama u odnosu na kontrolne netransfekovane α TC1-6 ćelije (Slika 4.9A.), što upućuje na normalnu fiziologiju. Nakon sortiranja je u ovim ćelijama određen i relativni nivo ekspresije iRNK za *Cas9* na petom i sedmom danu posle nukleofekcije. Rezultati RT-qPCR analize su potvrdili uspešan ulazak i prisustvo EpiCRISPR sistema u α TC1-6 ćelijama (Slika 4.9B.). Detektovani pad u nivou ekspresije iRNK za *Cas9* na sedmom danu u odnosu na peti dan je u korelaciji sa promenom u ekspresiji GFP-a ukazujući na tranzijentnu transfekciju α TC1-6 ćelija (Slika 4.8B.).

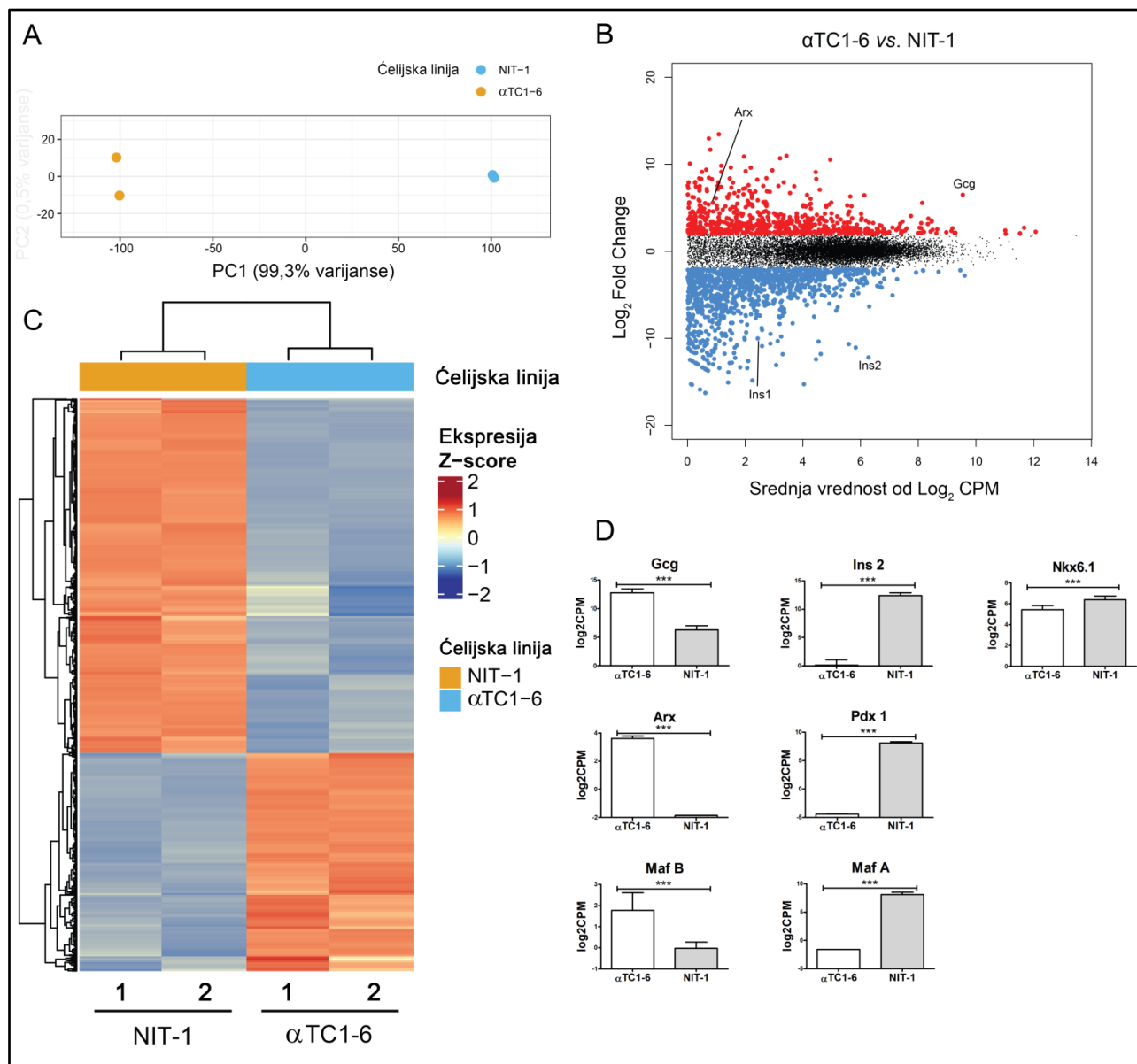


Slika 4.9. Uticaj nukleofekcije na funkcionalnost α TC1-6 ćelija. (A) Imunofluorescentna detekcija prisustva glukagona (narandžasta fluorescencija) u transfekovanim i netransfekovanim α TC1-6 ćelijama. Ćelijska jedra su obojena DAPI bojom (plava fluorescencija). (B) Relativni nivo ekspresije iRNK za *Cas9* u kontrolnim netransfekovanim i transfekovanim ćelijama na 5. i 7. danu nakon nukleofekcije meren pomoću RT-qPCR analize. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Statistička značajnost između grupa je određena pomoću one-way ANOVA testa. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ u poređenju sa kontrolnim netransfekovanim ćelijama.

4.2. Analiza pankreatičnih alfa i beta ćelija

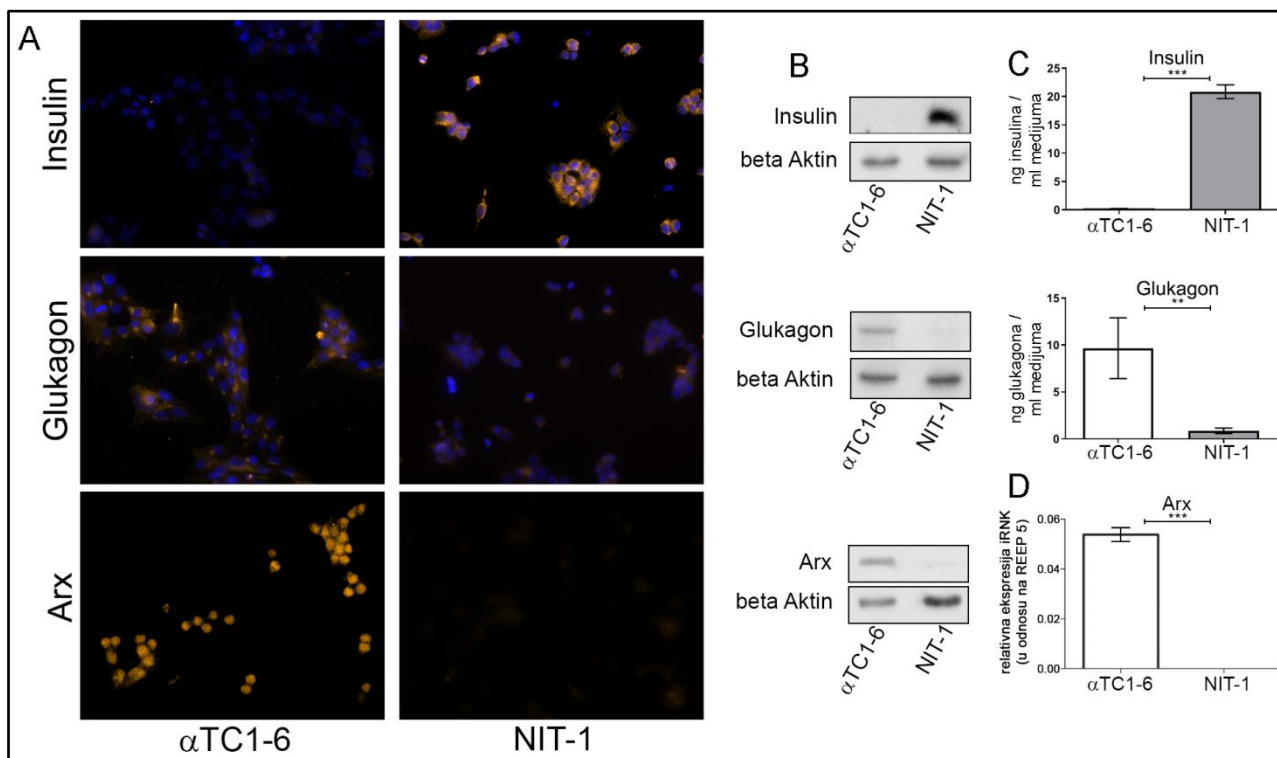
4.2.1. Analiza transkriptoma pankreatične alfa i beta ćelijske linije miša.

U cilju karakterizacije model sistema u okviru ove doktorske disertacije urađeno je RNK sekvenciranje i analiza transkriptoma alfa (α TC1-6) i beta ćelijske linije (NIT-1) pankreasa miša pri čemu su korišćene po dve replike za svaku ćelijsku liniju. Analiza glavnih komponenti (PCA) transkriptoma alfa i beta ćelijske linije korišćenjem svih detektovanih gena (FPKM ≥ 1 ; N=2) razdvojila je uzorke u dva klastera (Slika 4.10A.), naglašavajući da se najveća varijabilnost transkriptoma može povezati sa obrascima genske ekspresije koji su specifični



Slika 4.10. Karakterizacija model sistema – Analiza transkriptoma mišijih pankreatičnih alfa i beta ćelija. (A) Analiza glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) na podacima dobijenim prilikom RNK sekvenciranja alfa (α TC1-6, N=2, plava boja) i beta ćelijske linije (NIT-1, N=2, narandžasta) pokazuje >99% varijabilnosti u transkripciji po prvoj glavnoj komponenti. (B) MA dijagram pokazuje analizirane podatke sa RNK sekvenciranja. Statistički značajno više (N=654) i niže (N=1061) eksprimirani geni su istaknuti crvenom odn. plavom bojom i predstavljaju Log2 fold change > 0,5, FDR < 0,05 i srednju vrednost od Log2 CPM > 0 (C) Toplotna mapa (engl. *Heatmap*) i dendrogram prikazuju značajno različito eksprimirane gene između α TC1-6 (N=2) i NIT-1 (N=2) ćelijskih linija (vidi Sliku 4.10B). Kao meru genske ekspresije toplotna mapa prikazuje vrednosti Z score u boji na skali između plave i crvene boje, a uzorci i geni su grupisani po euklidskoj udaljenosti. (D) Ekspresija odabranih gena koji su odgovorni za održavanje identiteta ćelija koji su statistički značajno različito eksprimirani u α TC1-6 i NIT-1 ćelijama, ***p ≤ 0,001.

za tip ćelija (Slika. 4.10C.). Analiza diferencijalne genske ekspresije je pokazala 654 više i 1061 manje eksprimiranih gena u α TC1-6 u odnosu na NIT-1 ćelijsku liniju (Slika 4.10B). Geni koji su specifično eksprimirani samo u α TC1-6 ćelijama uključuju klasične transkripcione faktore koji su važni za sazrevanje i održavanje identiteta alfa ćelija a to su *Arx* (Log₂ CPM 3,62) i *MafB* (Log₂ CPM 1,77). Gen koji ispoljavaju najveću razliku u ekspresiji u α TC1-6 ćelijama je gen koji kodira za glukagon (*Gcg*). U ovim ćelijama nema ni tragova sinteze sa gena koji kodiraju za insulin (*Ins1/2*). Odabrana beta ćelijska linija pankreasa miša, NIT-1, je pokazala da se u njoj pojačano eksprimiraju geni koji kodiraju za transkripcione faktore za uspostavljanje identiteta beta ćelija kao što su *Nkx6-1* (Log₂ CPM 6,39), *Pdx1* (Log₂ CPM 8,10) and *MafA* (Log₂ CPM 8,09). Geni koji ispoljavaju najveću razliku u ekspresiji u NIT-1 ćelijama su geni koji kodiraju za insulin (*Ins1* i *Ins2*).



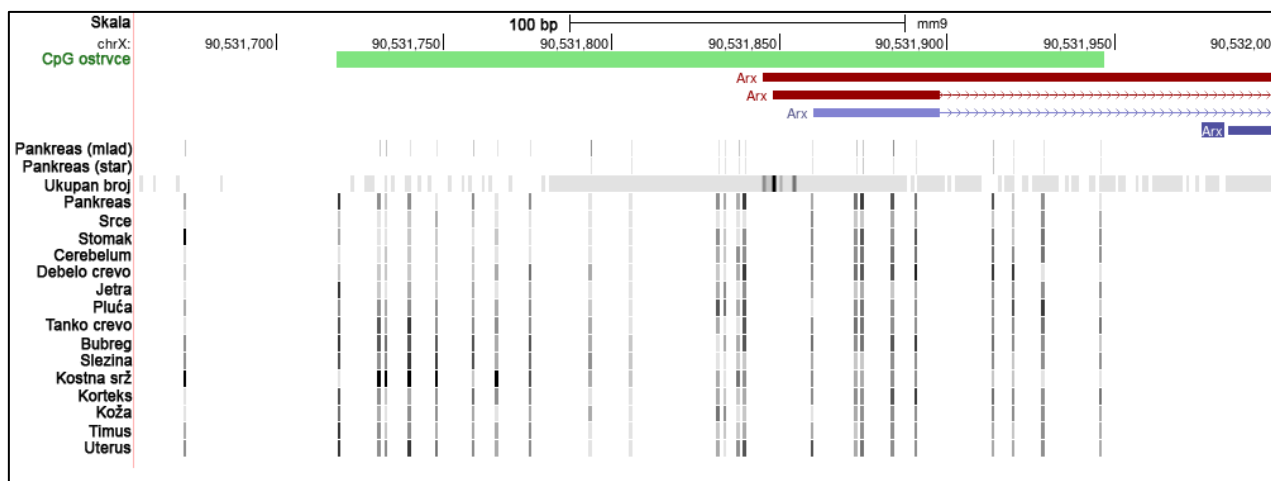
Slika 4.11. Insulin i glukagon kao glavni produkti koji su specifični za tip ćelija. (A) Imunofluorescentna analiza prisustva insulina, glukagona i Arx-a u α TC1-6 i NIT-1 ćelijama (narandžasta fluorescenca). Ćelijska jedra su obojena pomoću DAPI boje (plava fluorescenca). Ćelije koje su analizirane anti-Arx antitelom nisu bojene DAPI-jem. (B) Ekspresija insulina, glukagona i ARX-a na nivou proteina ispitivana je pomoću imunoblot analize u lizatima izolovanim iz α TC1-6 i NIT-1 ćelija. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi. Imunoblot analiza pomoću anti- β -aktin antitela je korišćena kao interna kontrola. (C) Količina oslobođenog insulina i glukagona u ćelijski medijum

ispitivana je pomoću ELISA eseja. (D) Relativni nivo ekspresije iRNK za *Arx* u α TC1-6 i NIT-1 ćelijama meren pomoću RT-qPCR analize. Nivo ekspresije iRNK za *REEP 5* je korišćen kao endogena kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD, N=3. Statistička značajnost između grupa je određena pomoću Studentovog t-testa, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001.

Obe ćelijske linije kojima je analiziran transkriptom su dalje podvrgnute imunofluorescentnoj (Slika 4.11A.) i imunoblot analizi (Slika 4.11B.) s ciljem da se ispita ekspresija insulina i glukagona na nivou proteina, s obzirom da će se α TC1-6 ćelije kasnije koristiti kao model sistem za ciljano epigenetičko utišavanje genske ekspresije s ciljem da im se promeni identitet. Rezultati ovih analiza su potvrdili da α TC1-6 ćelije kao terminalno diferencirani ćelijski tip proizvode isključivo glukagon, bez prisustva insulina. Funkcionalnost ovih ćelija je potvrđena ispitivanjem njihove sposobnosti da oslobađaju jedinstveni hormon koji sintetišu i skladište. ELISA esejem je potvrđeno da NIT-1 ćelije oslobađaju insulin u ćelijski medijum bez dodatne stimulacije glukozom. U medijumu u kome su rasle ove ćelije detektovani su i tragovi glukagona (0,87 ng/ml). Nasuprot tome, α TC1-6 ćelije oslobađaju isključivo glukagon, dok u medijumu nije detektovan insulin ni u tragovima (Slika 4.11C.). Dalje je ispitivano prisustvo *Arx*-a na nivou proteina u obe ćelijske linije imunofluorescentnom i imunoblot analizom pomoću anti-*Arx* antitela (Slika 4.11A, B.). Rezultati su potvrdili da je *Arx* isključivo eksprimiran u α TC1-6 ćelijama za razliku od NIT-1 ćelijske linije (Slika 4.11A.). Ispitivanje ekspresije *Arx*-a na nivou iRNK je takođe dodatno potvrdilo da je statistički značajno više prisutan u α TC1-6 ćelijama u poređenju sa NIT-1 ćelijama (Slika 4.11D.). Ovi rezultati su u skladu sa činjenicom da je ARX ključni transkripcioni faktor koji je neophodan za održavanje identiteta alfa ćelija dok nema efekta na očuvanje identiteta beta ćelija.

4.2.2. Analiza epigenetičkog pejzaža u delu promotora gena za *Arx*.

Kako bi se analizirali epigenetički mehanizmi koji se nalaze u osnovi detektovane razlike u ekspresiji ključnog regulatora identiteta alfa ćelija, *Arx*-a, između analiziranih ćelijskih linija pankreasa miša (Slika 4.11.B, D.) ispitivan je obrazac metilacije molekula DNK i histona na *Arx* genu. Najpre je urađen uporedni prikaz dela promotora *Arx*-a korišćenjem dostupnih podataka uz pomoć UCSC (engl. *University of California, Santa Cruz*, UCSC) pretraživača genoma na osnovu čega je prikazano da je nivo metilacije u pankreasa niži u odnosu na nivo metilacije u drugim organima kod miša (Slika 4.12).

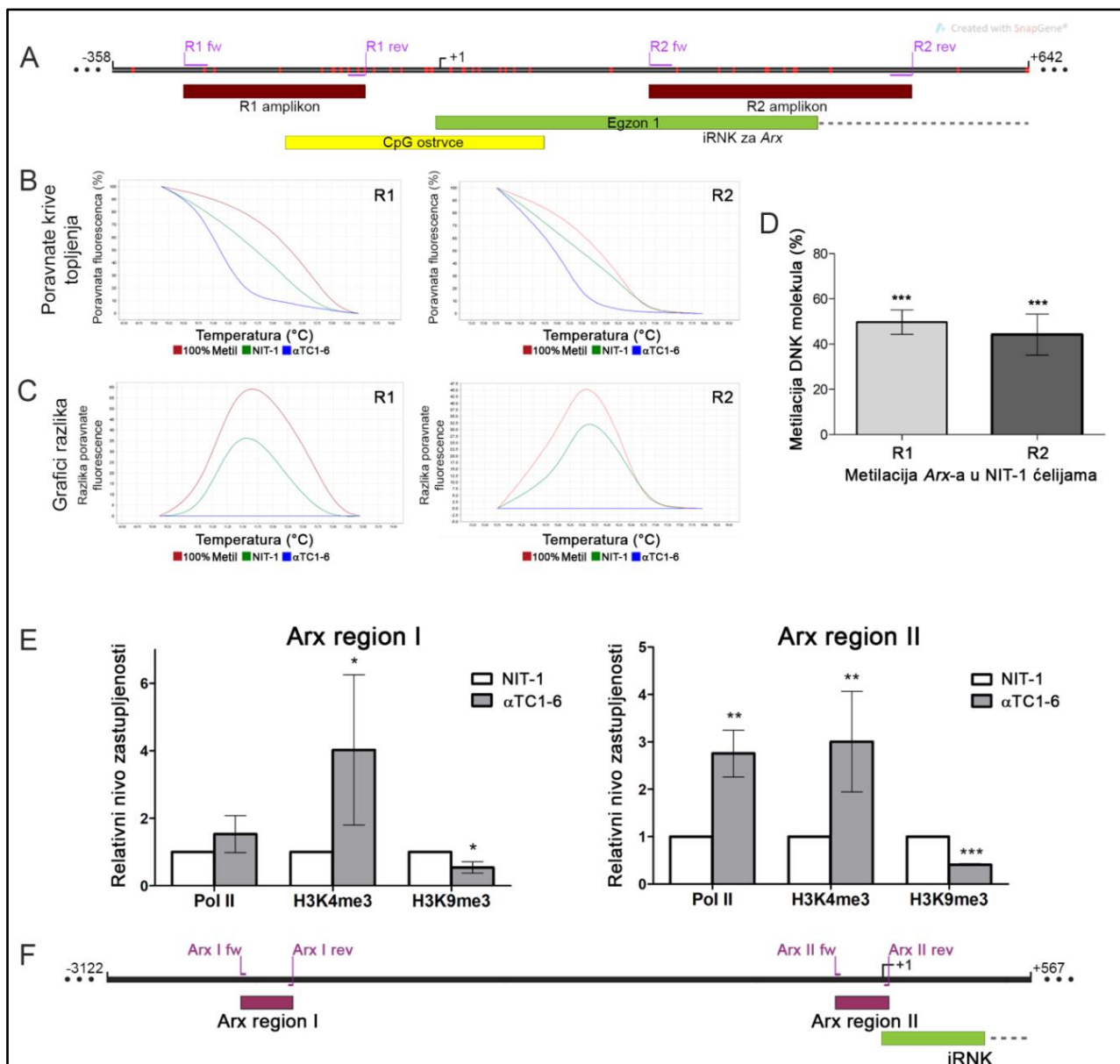


Slika 4.12. Uporedni prikaz metilacionog statusa dela promotora *Arx*-a u različitim organima u mišu. Deo promotora *Arx*-a u tkivu pankreasa ima nizak nivo metilacije u poređenju sa drugim organima kod miševa. Za dobijanje prikaza korišćen je UCSC pretraživač genoma koji omogućava pristup podacima o sekvenci genoma različitih vrsta. CpG ostrvce je prikazano kao zeleni

pravougaonik, gen za *Arx* bordo bojom, a iRNK ljubičastom bojom. CpG dinukleotid je prikazan uspravnom crticom sive boje- nemetilovan ili crne boje- metilovan.

Obrazac metilacije DNK α TC1-6 i NIT-1 ćelija analiziran je u okviru dva odabrana regiona *Arx* gena pomoću HRM analize. Prvi region (R1 amplikon) je dao informaciju o razlici u metilacionom statusu za 10 CpG-ova između α TC1-6 i NIT-1 ćelija u okviru sekvence promotora *Arx*-a koja se nalazi 81 bp uzvodno u odnosu na TSS-a. Drugi analizirani region (R2 amplikon) je pozicioniran 229 bp nizvodno u odnosu na TSS, obuhvata deo prvog egzona i introna i daje informaciju o metilacionom statusu 9 CpG-ova (Slika 4.13A.). Rezultati koji su dobijeni HRM analizom su potvrdili postojanje statistički značajne razlike u metilacionom statusu između analiziranih delova promotora *Arx* gena u ove dve ćelijske linije pankreasa miša. Relativni nivo metilacije u NIT-1 ćelijama je izražen kao procenat metilacije u odnosu na α TC1-6 ćelije koje su posmatrane kao nemetilovane - 0% (jer je u njima *Arx* aktivan) i komercijalno dostupnog metilovanog mišijeg standarda koji je posmatran kao 100% metilovan. Poravnate krive topljenja i grafici razlika (Slika 4.13B, C.) pokazuju da je nivo metilacije za R1 i R2 analizirane regione u NIT-1 ćelijama pozicioniran između α TC1-6 ćelija koje eksprimiraju *Arx* i *in vitro* potpuno metilovanog standarda. Dobijeni rezultati su pokazali da je prvi analizirani region (R1 amplikon) u okviru *Arx* gena u NIT-1 ćelijama više metilovan u odnosu na α TC1-6 ćelije za 49,72%, dok za drugi analizirani region (R2 amplikon) ova razlika iznosi 44,23% (Slika 4.13D.). Dobijeni rezultati ukazuju na to da mehanizmi koji regulišu ekspresiju *Arx*-a u α TC1-6 i NIT-1 ćelijama uključuju metilaciju molekula DNK koja *Arx* u NIT-1 ćelijama drži u represivnom stanju, dok je odsustvo metilacije u α TC1-6 ćelijama povezano sa njegovom ekspresijom.

Rezultati koji su dobijeni u prethodnim eksperimentima su potvrdili uzrok koji se nalazi u osnovi razlike u ekspresiji *Arx* gena u analiziranim ćelijskim linijama pankreasa miša. U sledećem koraku je korišćena ChIP metoda praćena qPCR kvantifikacijom pomoću koje je ispitivano prisustvo RNK pol II, H3K4me3, i H3K9me3 na promotoru gena za *ARX* u okviru *Arx* I i *Arx* II regiona (Slika 4.13E, F.). *Arx* I region je pozicioniran 2561 bp uzvodno u odnosu na TSS i pokriva 208 bp, dok *Arx* II region obuhvata 214 bp i uključuje TSS. Region *Arx* II je pokazao veću razliku u prisustvu Pol II i analiziranih histonskih modifikacija (Slika 4.13F.). Anti-RNK pol II antitelo je iskorišćeno za kontrolne ChIP eksperimente kojima je potvrđeno da je RNK pol II više prisutna na promotoru *Arx* gena u α TC1-6 ćelijama u odnosu na NIT-1 ćelije u oba analizirana regiona (Slika 4.13E.). Dobijeni rezultati upućuju na to da aktivna transkripcija *Arx* gena u alfa ćelijama okarakterisana prisustvom Pol II odgovara ranije dobijenom profilu ekspresije (Slika 4.11B, D.). Anti-H3K4me3 antitelo je iskorišćeno za analizu prisustva trimetilacije 4og lizina na histonu H3. Rezultati su pokazali da je ova modifikacija značajno više prisutna u oba analizirana regiona *Arx* gena u α TC1-6 ćelijama u odnosu na NIT-1 (Slika 4.13E.) upućujući na otvorenu strukturu hromatina i transkripcionu aktivnost gena. Anti-H3K9me3 antitelo u ovim ChIP eksperimentima je poslužio za analizu histonske modifikacije koja je povezana sa metilacijom molekula DNK i predstavlja marker represivnog stanja gena. Rezultati su pokazali da je H3K9me3 statistički značajno više prisutna u oba analizirana regiona u NIT-1 ćelijama u odnosu na α TC1-6 ćelije (Slika 4.13E.).

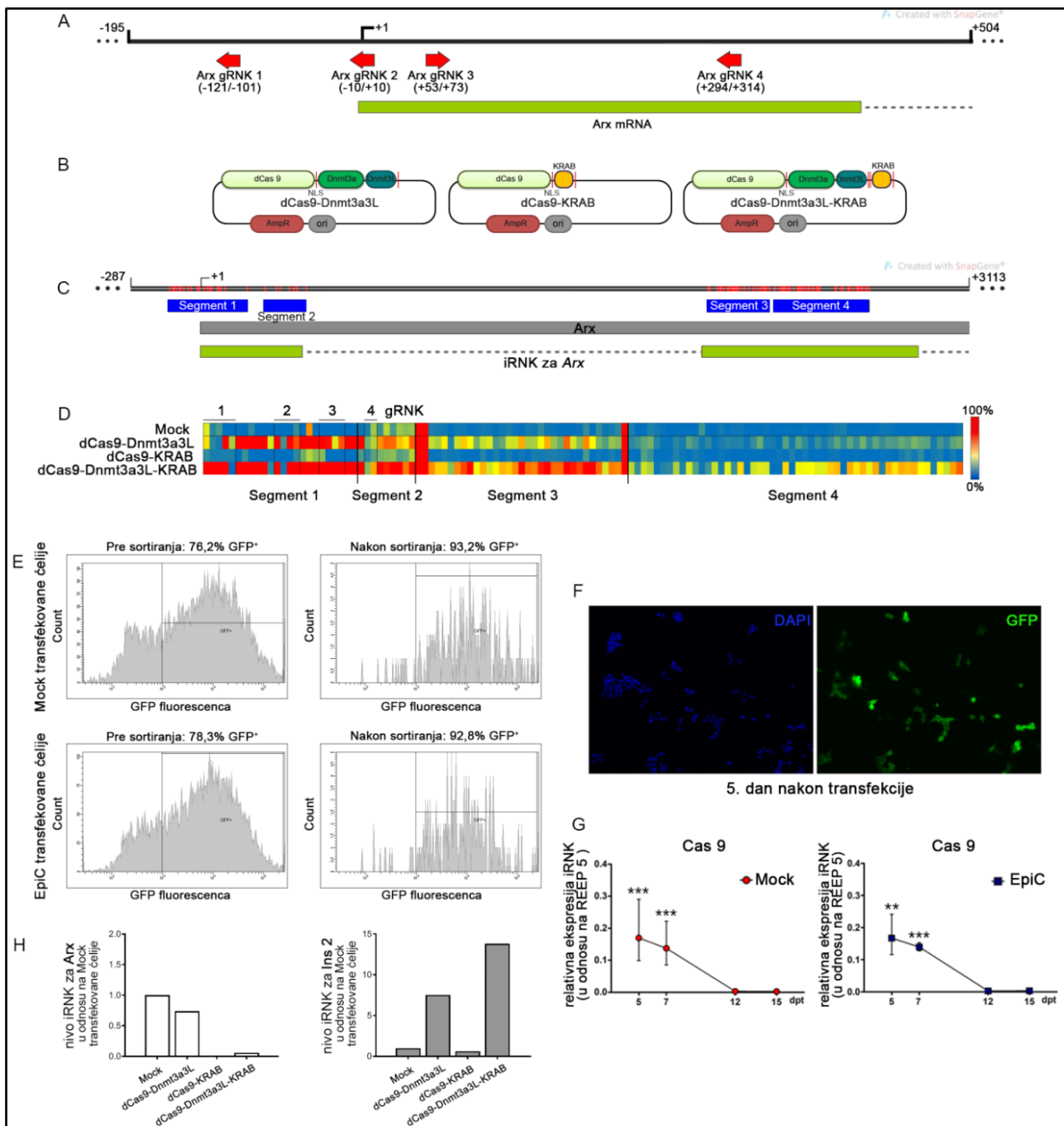


Slika 4.13. Prisustvo različitih epigenetičkih oznaka na promotoru Arx gena u αTC1-6 i NIT-1 ćelijskim linijama (A) Shematski prikaz dela Arx gena sa položajem prajmera (ljubičaste linije) koji su korišćeni za analizu metilacionog statusa. Analizirani delovi gena su prikazani kao tamno crveni pravougaonici, pozicija TSS-a kao +1, egzon kao zeleni pravougaonik, intron kao isprekidana linija, pozicija CpG ostrvca kao žuti pravougaonik a pozicije CpG mesta kao crvene vertikalne linije. Shema je napravljena pomoću SnapGene softvera. (B) Reprezentativne poravnate krive topljenja i (C) grafici razlika dobijeni pomoću HRM analize pokazuju pozicije kriva za NIT-1 ćelije u odnosu na αTC1-6 ćelije posmatrane kao nemetilovane (%) i komercijalno dostupan metilovani standard koji je uzet kao 100% metilovan. (D) Grafikon predstavlja relativni nivo metilacije DNK u NIT-1 ćelijama u odnosu na αTC1-6 ćelije u dva analizirana regiona u okviru Arx-a. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ±SD. Za određivanje statističke značajnosti korišćen je one sample t-test, ***p ≤ 0,001. (E) Analiza prisustva RNK pol II, H3K4me3, i H3K9me3 na Arx I i Arx II regionu u promotoru Arx gena ChIP-qPCR metodom. Nivo prisustva izračunat je normalizacijom u odnosu na IgG imunoprecipitaciju a potom prikazan relativno u odnosu na NIT-1 ćelije (N=2). Podaci su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška srednje vrednosti (F) Shematski prikaz pozicije prajmera koji su korišćeni za ChIP analizu u okviru Arx gena. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ±SD. Kolmogorov-Smirnov test je korišćen za određivanje raspodele uzoraka. Za određivanje statističke značajnosti korišćen je one sample t-test za uzorke sa normalnom raspodelom, dok je za uzorke koji nemaju normalnu raspodelu vrednosti korišćen Wilcoxon Signed Paired test, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001.

4.3. Iniciranje promene fenotipa α TC1-6 ćelija nakon ciljane metilacije pomoću EpiCRISPR sistema.

4.3.1. Efikasno uvođenje metilacije u region promotora *Arx* gena u α TC1-6 ćelijama.

Da bi se efikasno uneo sistem za ciljano uvođenje metilacije u α TC1-6 ćelije, one su podvrgnute nukleofekciji za koju su ranije optimizovani uslovi (Poglavlje 4.1.2.). Za nukleofekciju su korišćena i međusobno poređena tri različita fuziona konstrukta za represiju genske ekspresije (dCas9-Dnmt3a3L, dCas9-KRAB, dCas9-Dnmt3a3L-KRAB) (Fig. 4.13B.) u kombinaciji sa reporterskim plazmidom i četiri različite gRNK koje imaju ulogu da pozicioniraju fuzione konstrukte na promotor *Arx* gena (*Arx* gRNK 1-4) (Slika 4.14A.).



Slika 4.14. Ciljana metilacija promotora *Arx*-a u α TC1-6 ćelijama indukovana alatom za epigenetičko editovanje. (A) Shematski prikaz pozicije četiri gRNK predstavljene kao crvene strelice koje pozicioniraju EpiCRISPR konstrukt na X hromozomu u okviru *Arx* gena. Prvi egzon je predstavljen kao zeleni pravougaonik, a prvi intron kao isprekidana linija. (B) Shematski prikaz fuzionih konstrukata koji su korišćeni za dirigovanu represiju gena. Gen za Cas9 je mutiran tako da njegov proteinski produkt ima neaktivan katalitički domen. On je dodatno fuzionisan sa tri različita efektorska domena pomoću linkera od 28 aminokiselina koji sadrži signal za jedarnu lokalizaciju (engl. *nuclear localization signal*, NLS). Nije nacrtano u razmeri. (C) Shematski prikaz X hromozoma na kome se nalazi *Arx* (sivi pravougaonik) i pozicijom delova koji su analizirani bisulfitnim sekvenciranjem (plavi pravougaonici). Crvene uspravne linije predstavljaju pojedinačna CpG mesta u sekvenci. (D) Toplotna mapa koja predstavlja analizu ciljanog bisulfitnog sekvenciranja prikazuje prosek metilacije po CpG dinukleotidu u analiziranim delovima *Arx* gena. Redovi na mapi označavaju pojedinačne ekperimente kotransfekcije sa jednim od tri različita konstrukta za ciljanu gensku represiju u kombinaciji sa četiri gRNK. Kolone označavaju pojedinačne CpG dinukleotide u okviru analiziranih regiona (crveno – metilovani, plavo-nemetilovani C iz CpG dinukleotida). (E) Rezultati ćelijskog sortiranja tranzijentno transfekovanih α TC1-6 ćelija pomoću FACS-a. Prikaz zastupljenosti fluorescentnih ćelija pre i nakon sortiranja u procentima. (F) Reprezentativne mikrografije prikazuju visoku efikasnost tranzijentne transfekcije α TC1-6 ćelija i ekspresiju zelenog fluorescentnog proteina 5. dana nakon transfekcije. Ćelijska jedra su obojena DAPI-jem (plava fluorescencija). (G) Relativni nivo ekspresije iRNK za Cas9 u 5., 7., 10., 12. i 15. danu nakon transfekcije u ćelijama koje su sortirane na osnovi prisustva GFP-a na 5. danu. Mock ćelije – transfekovane su sa kombinacijom *pmaxGFPTM Vektora*, plazmidom za editovanje epigenoma (dCas9-3a3L-KRAB), i praznim vektorom za gRNK; EpiC ćelije - transfekovane su sa kombinacijom *pmaxGFPTM Vektora*, plazmidom za targetovanu represiju genske ekspresije i četiri gRNK za ciljanje promotora *Arx*-a (*Arx* gRNK 1-4 plazmidi). (H) Relativni nivo ekspresije iRNK za *Arx* i *Ins2* 5. dana nakon transfekcije ispitivan je RT-qPCR metodom. Nivo ekspresije iRNK za *REEP5* korišćen je kao endogena kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Kolmogorov-Smirnov test (sa D-W-L P vrednostima) je korišćen za utvrđivanje normalnosti uzoraka. Za određivanje statističke značajnosti korišćen je one sample t-test za uzorke sa normalnom raspodelom, dok je za uzorke koji nemaju normalnu raspodelu vrednosti korišćen Wilcoxon Signed Paired test, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001.

Crvene strelice na Slici 4.14A. prikazuju njihov položaj i orijentaciju u odnosu na TSS. Petog dana nakon transfekcije sortirane su samo transfekovane ćelije na osnovu prisustva GFP-a (Slika 4.14F, G.). Bisulfitnim sekvenciranjem molekula DNK analizirani su rezultati za ukupno 117 CpG-ova koji su locirani u promotorskom regionu *Arx*-a kao i u delu prvog i drugog egzona označenim kao Segment 1-4 (Slika 4.14D.). Rezultati sekvenciranja su pokazali da u ćelijama transfekovanim sa dCas9-KRAB konstruktom nije detekovana povećana metilacija u odnosu na kontrolne ćelije, što je u skladu sa očekivanim (Slika 4.14D.). Konstrukt dCas9-Dnmt3a3L je bio efikasan u uvođenju metilacije u okviru analiziranih Segmenta 1 i 2 na *Arx*-u. Kao najefikasniji konstrukt za uvođenje metilacije na promotoru *Arx*-a se izdvojio dCas9-Dnmt3a3L-KRAB, koji je ostvario efekat na 94% od svih prisutnih CpG mesta u analiziranim segmentima *Arx* gena (110 od 117 CpG-a).

Kao posledica transfekcije ćelija sa dCas9 konstruktom koji je fuzionisan sa DNMT3a3L efektorskim domenom i posledične ciljane metilacije, došlo je do započinjanja transkripcije *Ins2* gena u α TC1-6 ćelijama (Slika 4.14H.). Iako je pad u nivou ekspresije iRNK za *Arx* mali, efekat ove promene se odražava na porast prisustva iRNK za *Ins2* od 7,5 puta u odnosu na Mock transfekovane ćelije. Sa druge strane, KRAB kao efektorski domen koji je fuzionisan sa dCas9 nema sposobnost da direktno uvede metilaciju DNK molekula. Pet dana nakon transfekcije zabeležen je pad u nivou ekspresije *Arx*-a u odnosu na Mock transfekovane ćelije. Ovakva promena u genskoj ekspresiji bi mogla da bude posledica kondenzacije hromatina indukovane KRAB-om. Ipak, ovako izazvana promena u ekspresiji *Arx*-a ne dovodi do inicijacije transkripcije *Ins2* gena (Slika 4.14H.). EpiCRISPR konstrukt je pored indukovanog najvećeg stepena metilacije (na 110 od 117 analiziranih CpG mesta u *Arx* genu) postigao i najveći stepen supresije *Arx* gena u odnosu na ostala dva konstrukta za indukovanje genske

represije. Nivo iRNK za *Arx* je bila 16,67 puta niža, dok je nivo *Ins2* iRNK porastao za 13,79 puta u poređenju sa Mock transfekovanim ćelijama 5. dana nakon transfekcije (Slika 4.14H.).

Iako je postignuta efikasnost nukleofekcije bila veoma visoka, 5. dana nakon nukleoporacije ćelije su bile podvrgnute fluorescentno aktiviranom sortiranju kako bi se pul ćelija za kasnije analize dodatno obogatio. Nakon sortiranja, dobijen je pul ćelija u kome je 93,2% ćelija bilo GFP⁺ za Mock transfekovane ćelije i 92,8% za EpiC transfekovane ćelije (kombinacija plazmida sa dCas9-Dnmt3a3L-KRAB konstruktom i četiri gRNK za *Arx*) (Slika 4.14E.). Nakon sortiranja, u transfekovanim ćelijama meren je nivo ekspresije iRNK za *Cas9* kao pokazatelja uspešnosti transfekcije. Analiza ekspresije je urađena na 5., 7., 12. i 15. danu nakon transfekcije. Rezultati su pokazali da nivo ekspresije iRNK za *Cas9* između svih analiziranih tačaka najviši na 5. danu, nakon čega njeno prisustvo počinje da se smanjuje. U 12. danu nakon transfekcije prisustvo iRNK za *Cas9* više nije detektabilno. Ovaj obrazac ekspresije iRNK za *Cas9* je isti i za Mock i za EpiC transfekovane ćelije (Fig. 4.14G.).

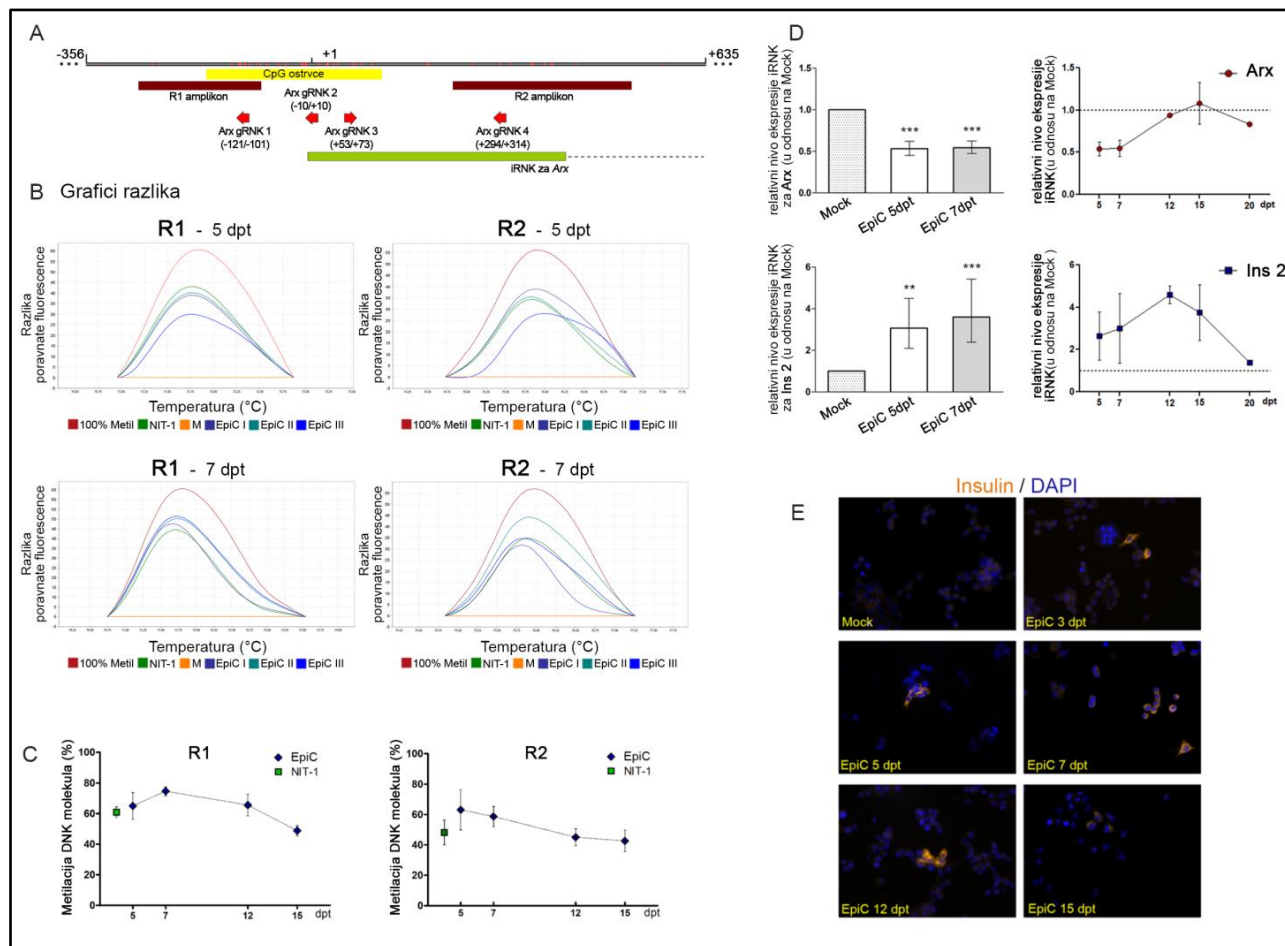
Uzimajući u obzir detektovani nivo uvedene metilacije kao i obrazac ekspresije gena za *Arx* i *Ins2* u α TC1-6 ćelijama nakon transfekcije, kao najefikasniji konstrukt za indukovanje represije *Arx*-a odabran je dCas9-Dnmt3a3L-KRAB i korišćen u svim narednim eksperimentima koji su imali za cilj promenu fenotipa alfa ćelija u smeru fenotipa beta ćelija pankreasa.

4.3.2. Ciljana metilacija i represija *Arx*-a dovodi do inicijacije sinteze insulina u α TC1-6 ćelijama.

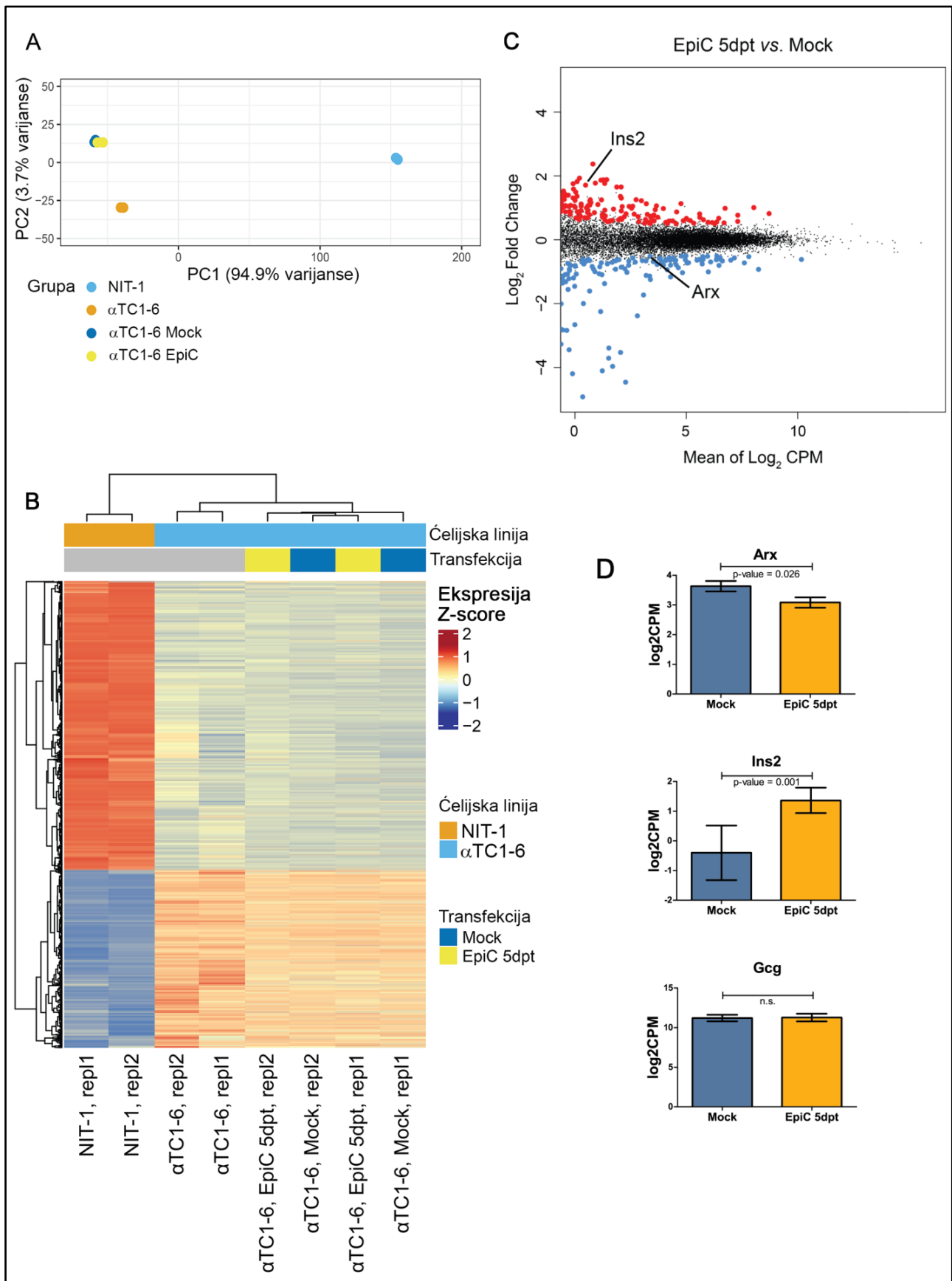
Nakon ispitivanja uspešnosti i efikasnosti transfekcije kao i odabira konstrukta za gensku represiju, analizirana je njegova aktivnost u sortiranim GFP⁺ pozitivnim α TC1-6 ćelijama na 5. i 7. danu nakon transfekcije. U tu svrhu je u sortiranim ćelijama ispitivan obrazac metilacije molekula DNK pomoću HRM analize (Slika 4.15B, C.) na delu gena za *Arx* u okviru ranije analiziranih regiona (R1 i R2 region, Slika 4.13.). Mock transfekovane ćelije su posmatrane kao nemetilovane (Slika 4.13) (Dhawan i sar., 2011; Lawlor i sar., 2017), a komercijalno dostupni metilovani mišiji standard kao 100% metilovan molekul DNK. Grafici razlika poravnate fluorescence (Slika 4.15B.) su pokazali da je nivo metilacije *Arx* gena u EpiC transfekovanim ćelijama u oba analizirana regiona (R1 i R2 region, Slika 4.15A.) na 5. i 7. danu nakon transfekcije sličan nivou metilacije koji je detektovan u NIT-1 ćelijama koje ne eksprimiraju *Arx*. U prvom analiziranom R1 regionu detektovano je 65% više metilacije u EpiC transfekovanim ćelijama, dok je u R2 regionu zabeleženo 63% više metilacije u odnosu na Mock transfekovane ćelije na 5. danu nakon transfekcije (Slika 4.15C.). Sedmog dana nakon transfekcije primećen je porast u metilaciji od 9% u R1 regionu, dok je zabeležen blagi pad u R2 regionu od 4% u odnosu na nivo metilacije koji je detektovan 5. dana. Nivo metilacije u EpiC transfekovanim ćelijama je nastavio da pada u narednim danima za oko 25%, dostižući oko 40% više metilacije u odnosu na Mock transfekovane α TC1-6 ćelije na 15. danu nakon transfekcije (Slika 4.15C.). Rezultati koji su dobijeni HRM analizom su potvrdili da je EpiCRISPR fuzionisani konstrukt sposoban da efikasno uvede metilaciju DNK molekula na ciljanom regionu koja je u ovom slučaju bio deo gena za *Arx*. Ovako uvedena metilacija dostiže nivo metilacije koji *Arx* poseduje u ćelijama u kojima je on u potpunosti ugašen. Pokazano je da se uvedena metilacija efikasno održavala do 7. dana od transfekcije nakon čega je započeo postepeni pad.

Linijski grafikoni ukazuju da je nivo uvedene metilacije nakon transfekcije na genu za *Arx* sličan sa nivoom metilacije u NIT-1 pankreatičnim beta ćelijama. Nakon što je dodatno potvrđeno efikasno uvođenje metilacije u okviru promotora za *Arx* u α TC1-6 ćelijama HRM analizom, ispitivane su posledice ove epigenetičke promene na njegovu ekspresiju. Rezultati RT-qPCR-a su pokazali da je nivo iRNK za *Arx* na 5. i 7. danu nakon transfekcije bio značajno

redukovano (45% niže) u odnosu na nivo ekspresije u Mock transfekovanim ćelijama (Slika 4.15D.). Dvanaestog dana nakon transfekcije zabeleženo je vraćanje na inicijalni nivo ekspresije iRNK za *Arx*. Iz ovakovog obrasca ekspresije se može zaključiti da su ove promene u ekspresiji nastale kao posledica ciljane metilacije posredovane EpiCRISPR konstruktom i da su definisane vremenskim okvirom.



Slika 4.15. Ciljana metilacija promotora *Arx*-a pokreće ekspresiju *Ins2* u mišijim α TC1-6 ćelijama. (A) Shematski prikaz dela gena za *Arx* sa pozicijama prajmera koji su korišćeni u analizi metilacionog statusa DNK molekula (R1 i R2 amplikon), žuti pravougaonik – CpG ostrvrce i položaja četiri gRNK. Za Mock transfekcije su korišćeni plazmidi: pmaxGFP (5%), dCas9-Dnmt3a3L-KRAB (20%) i prazan plazmid za gRNA (75%). Za EpiC transfekcije su korišćeni plazmidi: pmaxGFP (5%), dCas9-Dnmt3a3L-KRAB (20%) i 1-4 gRNK u odnosu 1:1 (75%). (B) Reprerentativni grafici razlika koji su dobijeni pomoću HRM analize na dva različita regiona gena za *Arx* na petom i sedmom danu nakon transfekcije, pokazuju poziciju kriva za EpiC i NIT-1 uzorke u odnosu na Mock koji je posmatran kao 0% metilovani standard i 100% metilovanog standarda. (C) Promena u nivou metilacije u vremenu u R1 i R2 analiziranim regionima na EpiC odnosu na Mock transfekovane ćelije. (D) Stubičasti grafikoni predstavljaju relativni nivo ekspresije iRNK za *Arx* i *Ins2* u 5. i 7. danu nakon transfekcije u odnosu na Mock transfekovane ćelije. Promene u nivou ekspresije iRNK za *Arx* i *Ins2* u vremenu prikazane su linijskim grafikonima koji prikazuju 5., 7., 12. i 15. dan nakon transfekcije (N=4). (E) Imunofluorescentna analiza prisustva insulina u Mock i EpiC transfekovanim ćelijama sa anti-insulinskim antitelom (narandžasta fluorescenca) u nekoliko vremenskih tačaka nakon transfekcije. Ćelijska jedra su obojena DAPI bojom (plava fluorescenca). Statistička značajnost je odedena korišćenjem one sample t-testa za vrednosti sa normalnom raspodelom. Wilcoxon Signed Rank test je korišćen za utvrđivanje statističke značajnosti za vrednosti koje ne prate normalnu raspodelu. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$.



Slika 5.16. Analiza transkriptoma transfekovanih i netransfekovanih α TC1-6 ćelija i poređenje sa kontrolnom NIT-1 ćelijskom linijom. (A) Analiza glavnih komponenti (PCA) na podacima dobijenim nakon sekvenciranja transkriptoma alfa-ćelijske linije (α TC1-6, N=2, narandžasta), beta ćelijske linije (NIT-1, N=2, svetlo plava) i alfa ćelijske linije nakon pet dana od Mock transfekcije (N=2, tamno plava) i EpiC transfekcije (N=2, žuta). PCA analiza opisuje >94% transkripcione varijabilnosti na

prvoj glavnoj komponenti (PC1). (B) Toplotna mapa i dendrogram pokazuju značajno različito eksprimirane gene između α TC1-6, NIT-1, Mock i EpiC transfekovanih ćelija. Toplotna mapa prikazuje vrednosti Z- score u boji, na skali između plave i crvene, kao meru genske ekspresije beta i netransfekovanih i transfekovanih alfa ćelija, pri čemu su geni klasterovani pomoću Euklidske udaljenosti. (C) MA plot dobijen nakon RNK sekvenciranja pokazuje diferencijalno eksprimirane gene u EpiC (N=2) u odnosu na Mock transfekovane ćelije (N=2). Analiza je pokazala 357 značajno pojačano eksprimiranih (crvene tačkice) i 266 značajno sniženo eksprimiranih gena (plave tačkice). Prikazani rezultati predstavljaju sledeće parametre: \log_2 Fold Change > 0,5, p-value < 0,05 i mean \log_2 CPM > 0. (D) Dijagrami koji prikazuju razlike u nivou ekspresije iRNK za *Arx*, *Ins2* i *Gcg* dobijeni su korišćenjem podataka sa RNK sekvenciranja. Za analizu statističke značajnosti razlika u ekspresiji korišćen je one-sided test, dok je za ostala dva gena korišćen two-sided test.

Promene u ekspresiji *Arx*-a su praćene promenama u ekspresiji *Ins2*. Naime, 5. dana od transfekcije α TC1-6 su počele da proizvode iRNK za *Ins2*, sa trendom ka povećanju nivoa sinteze sa vremenom, pri čemu dostižu maksimalan nivo na 12. danu nakon transfekcije. Nakon toga je usledio nagli pad u nivou sinteze iRNK za *Ins2* koji je rezultovao odsustvom detektabilnog nivoa iRNK za *Ins2* nakon 20 dana od transfekcije (Slika 4.15D.). Imunofluorescentnom analizom sa anti-insulinskim antitelom je pokazano da je kod malog broja EpiC transfekovanih α TC1-6 ćelija insulin prisutan i na nivou proteina od 3 do 15. dana nakon transfekcije (Slika 4.15E).

Kako bi se detaljnije ispitali efekti indukovane metilacije u α TC1-6 ćelijama urađena je analiza transkriptoma Mock i EpiC transfekovanih ćelija na 5. danu nakon transfekcije. PCA analiza transkriptoma α TC1-6, beta NIT-1, Mock i EpiC transfekovanih ćelija korišćenjem svih detektovanih gena (FPKM ≥ 1 ; N = 2) razdvaja uzorke u dva klastera koji su specifični za ćelijsku liniju. Prva glavna komponenta opisuje postojanje >94% transkripcione varijabilnosti razdvajajući alfa i beta ćelijske linije. Po drugoj glavnoj komponenti postoji 3,7% varijabilnosti koja se odnosi na razlike između transfekovanih i netransfekovanih ćelija, pa se i kontrolne alfa ćelije mogu razdvojiti u zasebnu grupu različitu od Mock i EpiC transfekovanih ćelija (Slika 4.16A).

Poređenje transkripcinih profila pomoću toplotne mape pokazalo je da se transfekovane i netransfekovane alfa ćelije mogu zajedno grupisati i da imaju drugačiji ekspresioni profil u odnosu na NIT-1 beta ćelijsku liniju (Slika 4.16A, B). Analiziranjem i poređenjem transkriptoma transfekovanih alfa ćelija (EpiC i Mock uzoraka) zajedno sa netransfekovanim alfa i beta ćelijskim linijama pankreasa miša, uočeno je da EpiC transfekovane ćelije i dalje imaju identitet alfa ćelija (Slika 4.16A, B). Za analizu transkriptoma EpiC transfekovanih ćelija u odnosu na Mock korišćeni su sledeći parametri: \log_2 FC > 0,5, bez kovarijanti, pval < 0,05; \log_2 CPM_cutoff > 0. Rezultati analize transkriptoma su pokazali 357 značajno povišeno eksprimiranih i 266 značajno smanjeno eksprimiranih gena u EpiC u odnosu na Mock transfekovane ćelije (Slika 4.16C.). Rezultati dobijeni RT-qPCR analizom (Slika 4.15D.) koji pokazuju prisustvo značajno većeg nivoa ekspresije iRNK za *Ins2* u EpiC ćelijama u odnosu na Mock su ovom analizom dodatno potvrđeni (Slika 4.16D.). Rezultati analize ekspresije iRNK za *Arx* pomoću one-sided t-testa pokazali su da je dirigovana metilacija na promotoru gena za *Arx* dovoljna da indukuje njegov pad u ekspresiji.

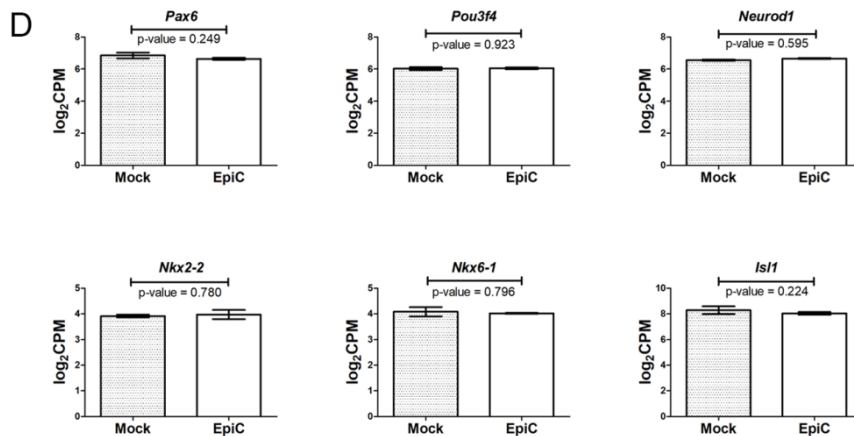
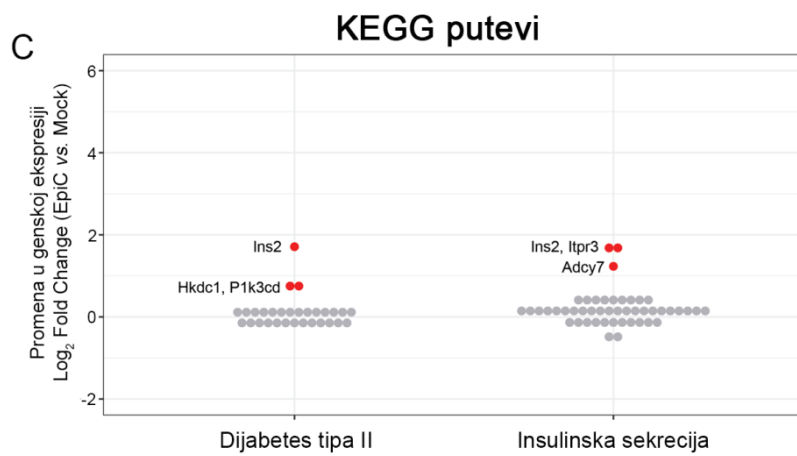
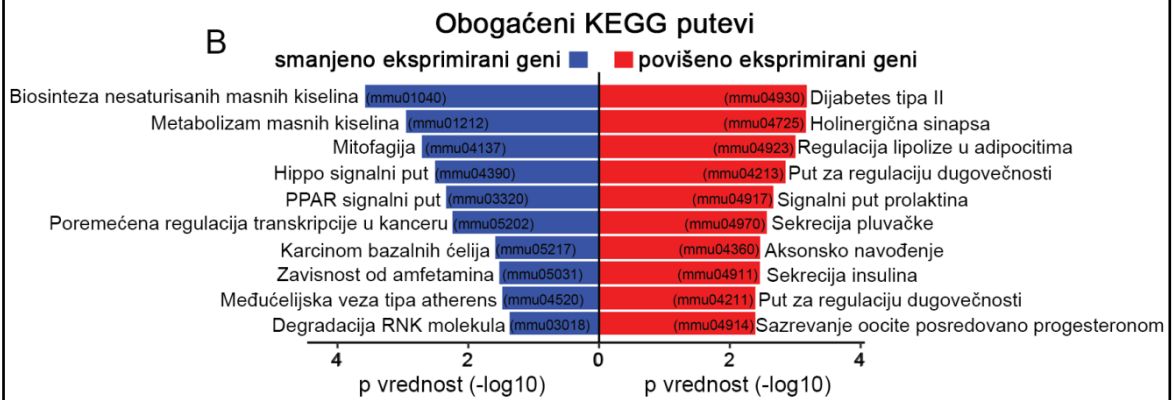
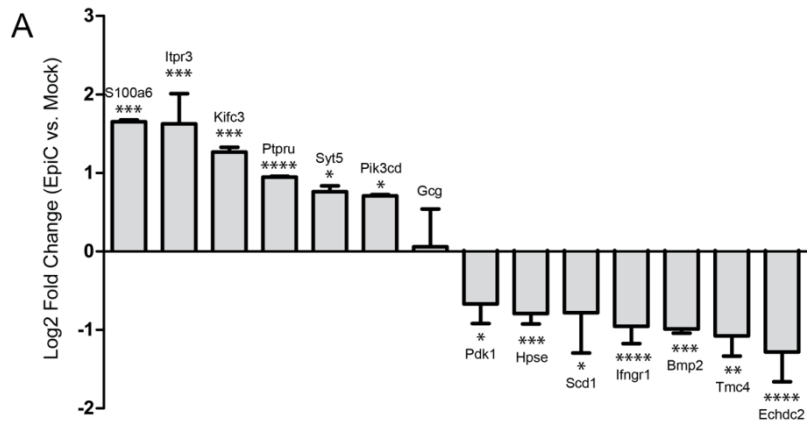
Sa liste gena koji su značajno povišeno ili sniženo eksprimirani u EpiC transefkovanim ćelijama izdvojeni su oni koji imaju važnu ulogu u oblikovanju identiteta beta ćelija i većinom ukazuju na promene u ekspresiji gena koji su uključeni u Ca^{2+} signaling (p vrednost $\leq 0,05$) (Slika 4.17A.). Analizom KEGG puteva koja daje uvid u to sa kojim su biološkim procesima povezani različito eksprimirani geni u EpiC u odnosu na Mock transfekovane ćelije na petom danu nakon transfekcije (p vrednost $\leq 0,05$). Geni koji su bili povišeno eksprimirani nakon targetovane metilacije promotora *Arx*-a povezani su sa više različitih puteva među kojima su i putevi uključeni u dijabetes tipa 2 i insulinsku sekreciju (Slika 4.17B.). Većina sniženo

ekspimiranih gena u EpiC transfekovanim ćelijama u odnosu na Mock povezana je sa metabolizmom masnih kiselina i biosintezom nezasićenih masnih kiselina. *Ins2* se izdvojio kao najvažniji gen koji se pojačano eksprimira u EpiC u odnosu na Mock transfekovane ćelije u dva puta iz KEGG baze puteva koji su od velikog značaja u svetlu transdiferencijacije alfa ćelija u ćelije koje proizvode insulin. Pored *Ins2*, kao značajno više ekspimirani geni izdvojili su se i gen za heksokinazu koja sadrži domen 1 (engl. *hexokinase domain containing 1*, *Hkdc1*) i delta katalitičku subjedinicu fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat 3 kinaze (engl. *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta*, *Pik3cd*) u putu Dijabetesa tipa 2 (KEGG put: *mmu04930*) kao i inozitol 1,4,5-trifosfat receptor 3 (engl. *inositol 1,4,5-triphosphate receptor 3*, *Itpr3*) i adenilat ciklaza tipa 7 (engl. *adenylate cyclase type 7*, *Adcy7*) u putu Insulinske sekrecije (KEGG put: *mmu04911*) (Slika 4.17C). Analiza ekspresije iRNK za transkripcione faktore koji su specifični za beta ćelije pankreasa kao što su *Pax6*, *Pou3f4*, *NeuroD1*, *Nkx2-2*, *Nkx6-1* i *Isl1* pokazala je da nema statistički značajne razlike između Mock i EpiC transfekovanih ćelija (Slika 4.17D).

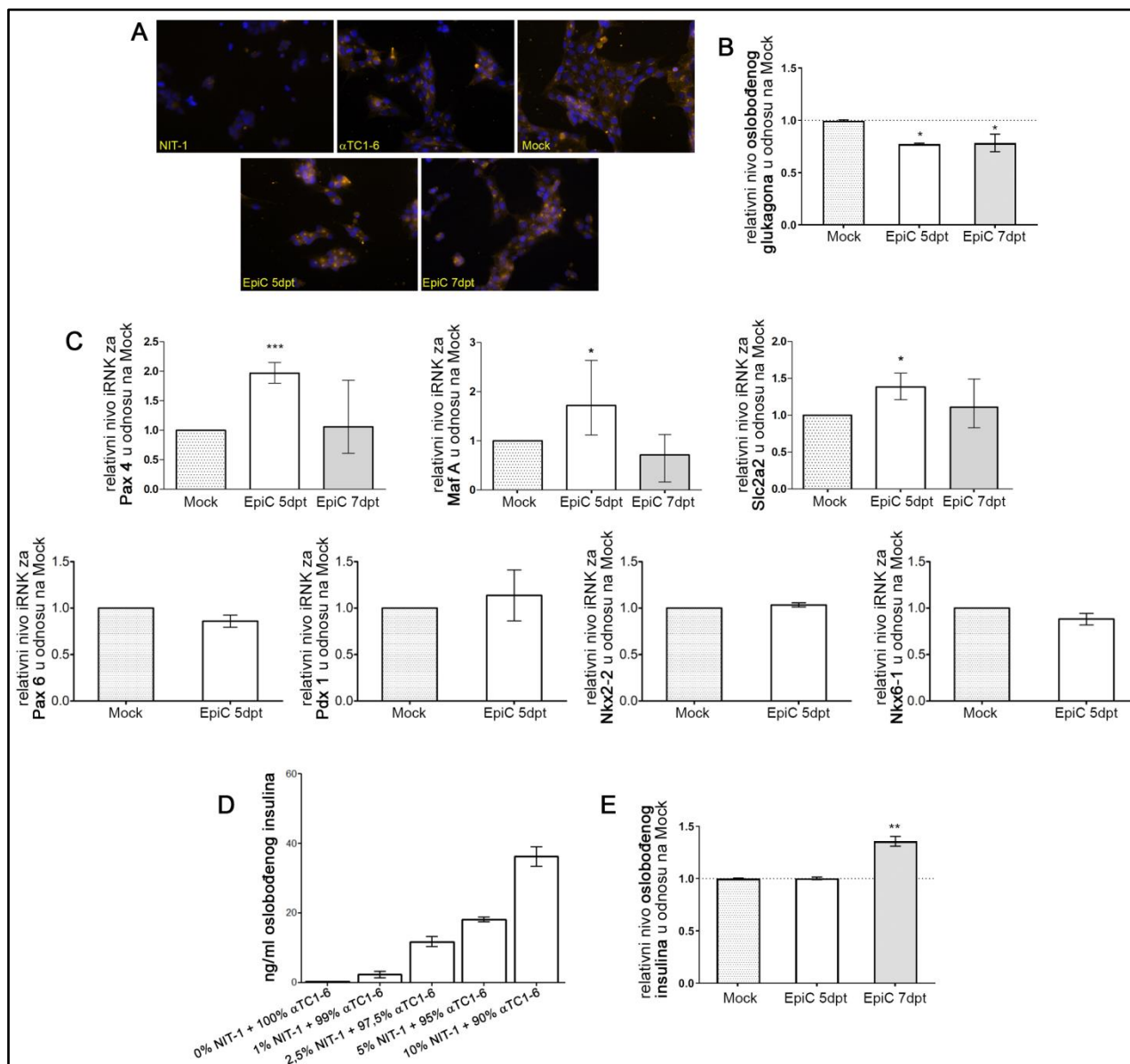
4.3.3. Epigenetičko utišavanje *Arx*-a dovodi do bihormonalnog stanja α TC1-6 ćelija.

Imunofluorescentna analiza je, pored pokrenute sinteze insulina u transfekovanim ćelijama, pokazala i da nema vidljivih promena u prisustvu glukagona u ćelijama nakon 7 dana od Mock i EpiC transfekcije u poređenju sa netransfekovanim ćelijama (Slika 4.18A.). Sa druge strane, nakon kvantifikacije količine oslobođenog insulina merenog ELISA esejem pokazano je da bihormonalne α TC1-6 EpiC transfekovane ćelije oslobađaju ~20% manje glukagona u ćelijski medijum u odnosu na Mock transfekovane ćelije na 5. i 7. danu nakon transfekcije (Slika 4.18B.). Rezultati RT-qPCR analiza su pokazali da 5. i 7. dana nakon transfekcije u EpiC transfekovanim ćelijama dolazi do promena u transkripcionom obrascu ključnih regulatora transkripcije koji imaju važnu ulogu u održavanju identiteta beta ćelija. Nivo iRNK za *Pax4* i *MafB* je značajno povišen u EpiC transfekovanim ćelijama u odnosu na Mock transfekovane ćelije 5. dana od transfekcije, nakon čega dolazi do pada u nivou ekspresije. Detektovani nivo ekspresije na 7. danu je bez statistički značajne razlike između Mock i EpiC ćelija (Slika 4.18C.). Isti obrazac ekspresije zabeležen je i za iRNK za glukozni transporter *Slc2a2* koji je neophodan za proces glukozom stimulisane insulinske sekrecije koji se odvija u beta ćelijama (Slika 4.18C.). Analiza ekspresije iRNK za *Pax6*, *Nkx6-1*, *Nkx2-2* i *Pdx1* pomoću RT-qPCR metode je pokazala da ne postoji statistički značajna razlika u nivou ekspresije između Mock i EpiC transfekovanih ćelija na 5. danu nakon transfekcije (Slika 4.17C) što je u skladu sa rezultatima dobijenim nakon analiziranja transkriptoma (Slika 4.17D). Tranzijentna transfekcija sa EpiCRISPR sistemom za ciljanu metilaciju dovoljna je da dovede do vremenski ograničenih efekata na supresiju ekspresije *Arx*-a koja dovodi do inicijacije ekspresije *Ins2* i bihormonalnog stanja α TC1-6 ćelija.

Beta ćelije su neophodne za održavanje homeostaze glukoze delujući kao senzori za nivo glukoze kroz različite mehanizme. GSIS predstavlja kompleksan regulatorni sistem beta ćelija pankreasa koji ima ulogu da prepozna koncentraciju glukoze van ćelije i da odgovori adekvatnim oslobađanjem insulina u datom trenutku. Funkcionalnost NIT-1 ćelija potvrđena je nakon ispitivanja njihove sposobnosti da aktivno odgovore na 30 mM glukozu oslobađanjem insulina iz ćelija. GSIS esej je urađen u populaciji kontrolnih α TC1-6 ćelija koje su pomešane sa NIT-1 ćelijama u različitom procentu (0%, 1%, 2.5%, 5% i 10%) kako bi se utvrdio najmanji procenat ćelija koje oslobađaju dovoljno insulina koji može da bude detektovan ELISA esejem.



Slika 4.17. Lista bioloških procesa koji su povezani sa različito eksprimiranim genima u EpiC u odnosu na Mock transfekovane α TC1-6 ćelije na 5. danu nakon transfekcije. (A) Pojačano i sniženo eksprimirani geni u EpiC transfekovanim ćelijama u odnosu na Mock izraženi kao log2 fold change, p-vrednosti: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. (B) Analiza baze KEEG puteva je dala listu bioloških procesa koji su povezani sa različito eksprimiranim genima u EpiC u odnosu na Mock transfekovane ćelije na petom danu nakon transfekcije. (C) Promene u ekspresiji gena (log2 fold change) koji su uključeni u puteve Dijabetesa tipa 2 i Insulinske sekrecije. Značajno povišeno eksprimirani geni su obeleženi kao crvene tačkice (kao i na Slici 5.6C.). (D) Dijagrami koji prikazuju razlike u nivou ekspresije iRNK za *Pax6*, *Pou3f4*, *NeuroD1*, *Nkx2-2*, *Nkx6-1* and *Isl1* dobijeni su korišćenjem podataka sa RNK sekvenciranja. Za analizu statističke značajnosti razlika u ekspresiji korišćen je two-sided test.



Slika 4.18. Promene u sekreciji hormona i ekspresiji gena karakterističnih za beta ćelije u EpiC transfekovanim α TC1-6 ćelijama. (A) Imunofluorescentna analiza prisustva glukagona u NIT-1, α TC1-6 netransfekovanim, Mock i EpiC transfekovanim ćelijama na 5. i 7. danu nakon transfekcije sa anti-glukagonskim antitelom (narandžasta fluorescenca). Ćelijska jedra su obojena DAPI bojom (plava fluorescenca). (B) Nivo sekrecije glukagona iz ćelija u ćelijskom medijumu meren je ELISA esejem na 5. i 7. danu nakon transfekcije (N=4). (C) Relativni nivo ekspresije iRNK za *Pax4*, *MafA*, *Slc2a2*, *Pax6*, *Pdx1*, *Nkx2-2* i *Nkx6-1* u EpiC transfekovanim ćelijama u odnosu na Mock na 5. i 7. danu nakon transfekcije (N=4). Nivo iRNK za *REEP 5* je korišćen kao endogena kontrola. (D) Glukozom stimulisana

insulinska sekrecija u ćelijskom medijumu merena ELISA esejem. Koncentracija oslobođenog insulina u α TC1-6 pomešana sa NIT-1 ćelijskom linijom u različitom procentu (0-10%) merena je nakon inkubacije ćelija u KRB puferu sa 30 mM glukozom. (E) Nivo oslobođenog insulina iz α TC1-6 ćelija meren je ELISA esejem u ćelijskom medijumu na 5. i 7. danu nakon transfekcije. Za utvrđivanje statističke značajnosti korišćen je one sample t-test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Koncentracija oslobođenog insulina u KRB puferu merena je 2 h nakon dodavanja 30 mM glukoze. Iz kontrolnih α TC1-6 ćelija koje su pomešane sa 10% NIT-1 ćelija oslobođeno je oko 4,5 puta više insulina (36,2 ng/ml) nakon stimulacije 30 mM glukozom u trajanju od 2 h u KRB puferu u odnosu na bazalne uslove koji podrazumevaju KRB pufer bez glukoze. Dalje smanjivanje procenta NIT-1 ćelija je urađeno kako bi se utvrdio najniži merljivi nivo insulina koji može biti detektovan ELISA esejem. Samo 1% NIT-1 ćelija koje proizvode insulin (2,3 ng/ml) u pulu sa 99% α TC1-6 ćelija dovoljan je da, nakon stimulacije glukozom, oslobodi nivo insulina koji može da se detektuje ELISA esejem (Slika 4.18D.).

Nakon utvrđivanja minimalne količine insulina koji može da bude detektovan u ćelijskom medijumu ELISA esejem, ispitivana je i sposobnost EpiC transfekovanih ćelija da oslobađaju insulin u medijum u kome rastu istom metodom (Slika 4.18E). Petog dana nakon transfekcije nije bilo merljivog nivoa oslobođenog insulina iz EpiC transfekovanih ćelija, dok je sedam dana nakon transfekcije detektovano 35% više oslobođenog insulina (3,3 ng/ml) u medijum iz EpiC u poređenju sa Mock transfekovanim ćelijama (Slika 4.18E). Poređenjem oslobođenog insulina iz EpiC transfekovanih ćelija sa istom vrednošću nakon mešanja pankreatičnih alfa i beta ćelija (Slika 4.18D.), može se zaključiti da se oko 1% EpiC transfekovanih ćelija može smatrati ćelijama koje su sposobne da sintetišu i oslobađaju insulin.

5. DISKUSIJA

Nastanak diferenciranih ćelija adultnog organizma se posmatra kao razvojni proces nediferenciranih u terminalno diferencirane ćelije koje formiraju tkiva ili organe (Wang i sar., 2021). Direktno reprogramiranje ili transdiferencijacija se odnosi na promenu ćelijskog identiteta koja ne uključuje pluripotentno i intermedijerno stanje. Ovaj proces se odvija prirodno u živim organizmima u različitim situacijama. Stoga se transdiferencijacija može posmatrati i kao mehanizam za popravku tkiva zaobilazeći rezervoare nediferenciranih ćelija kao što su matične ćelije. Primeri transdiferencijacije su veoma važni jer pokazuju da terminalno diferencirane ćelije nisu „fiksne“ već da zadržavaju sposobnost reprogramiranja zahvaljujući promenama u genskoj ekspresiji (Thowfeequ i sar., 2007). Glavni cilj regenerativne medicine je obnova strukture i funkcionalnosti oštećenih tkiva ili organa na osnovu konverzije ćelijskog identiteta. Ćelijsko reprogramiranje može da se izazove veštačkim putem pomoću hemikalija/malih molekula ili indukovanom promenom ekspresije određenih transkripcionih faktora koji uvode ćeliju u intermedijerno ili pluripotentno stanje (Zhao i sar., 2015). Održavanje stabilnosti ćelijskog identiteta se opisuje kao proces koji „nije uklesan u kamenu“ već je zavisian od konteksta u kojem se ćelije nalaze, pri čemu kontrola promene ćelijskog fenotipa postoji na nekoliko nivoa (Cigliola i sar., 2018). Održavanje identiteta adultnih ćelija se može posmatrati kao dinamičan proces koji zavisi od konvergencije velikog broja signala, čija složenost može biti u korelaciji sa regenerativnim kapacitetom nekog tkiva (Holmberg i Perlmann, 2012). Ćelije održavaju svoj identitet aktivnim procesom i pomoću represivnih signala koji se oslobađaju iz susednih ćelija i blokiraju unutrašnju tendenciju diferenciranih ćelija da modifikuju svoj fenotip i funkcionalne karakteristike (Cigliola i sar., 2018). Mogućnost da se utiče na reprogramiranje ćelijskog identiteta ima veliki značaj za modelovanje bolesti i potencijal za prevođenje u terapijske svrhe (Goell i Hilton, 2021). Transdiferencijacija ćelija je mnogo brži i efikasniji proces i kao takva pogodnija za reparaciju u *in vivo* uslovima u odnosu na indirektno reprogramiranje koje podrazumeva prolazak kroz intermedijerno pluripotentno stanje (Wang i sar., 2021). Do sada je u *in vitro* uslovima dobijen veliki broj funkcionalnih tipova ćelija kao što su kardiomiociti, neuroni, progenitorske/stem ćelije, hepatociti, hematopoetske ćelije koji potiču od fibroblasta ili drugih tipova somatskih ćelija (Kalra i sar., 2021). Endogene glijalne ćelije se konvertuju u funkcionalne neurone uz pomoć različitih faktora za reprogramiranje (Guo i sar., 2014), dok su hepatociti koji su dobijeni direktnim reprogramiranjem miofibroblasta jetre doveli do usporavanja razvoja fibroze u jetri (Song i sar., 2016). Trenutno su aktuelna klinička ispitivanja primene ćelijske terapije u nadomeštanju broja glavnih funkcionalnih ćelija u mnogim bolestima kao što su neuroni u Parkinsonovoj bolesti ili pigmentni epitel retine pri makularnoj degradaciji koja je povezana sa starenjem (Wang i sar 2021).

Pored Parkinsonove bolesti, dijabetes je bolest koja nastaje kao posledica gubitka specifičnog tipa ćelija i može se takođe posmatrati kao dobar kandidat za primenu regenerativne medicine (Ciešlar-Pobuda i sar., 2017). Među najranijim istraživanjima koja se tiču plastičnosti ćelija nalazi se studija iz 2008. godine u kojoj je urađen skrining više od 1000 transkripcionih faktora, među kojima su se izdvojili NEUROG3, PDX1 i MAFA kao dovoljni da reprogramiraju egzokrine ćelije pankreasa adultnog miša u funkcionalne ćelije koje proizvode insulin (Zhou i sar., 2008). Po bihormonalnoj hipotezi dijabetes predstavlja bihormonalnu bolest koja nastaje kao rezultat kombinacije nedostatka insulina usled gubitka beta ćelija i viška glukagona koji se javlja zbog poremećene hormonske ravnoteže i hiperplazije alfa ćelija. Alfa ćelije pankreasa iz istog organa su favorizovane kao rezervoar ćelija pogodnih za transdiferencijaciju u beta ćelije jer bi se njihovim reprogramiranjem potencijalno obnovila masa beta ćelija, dok bi se istovremeno smanjila masa alfa ćelija. Na taj način bi došlo do

popravke narušenog balansa između hormona pankreasa (insulina i glukagona) (Unger and Cherrington, 2012; Unger and Orci, 2010). Direktno reprogramiranje alfa ćelija pankreasa se smatra bezbednijim pristupom nego ćelijska terapija koja se bazira na upotrebi embrionalnih stem ćelija ili indukovanih pluripotentnih ćelija, zato što se direktnim reprogramiranjem prevazilazi pluripotentno stanje i rizik od maligniteta. Prednosti koje alfa ćelije poseduju u odnosu na druge tipove ćelija u pogledu transdiferencijacije u beta ćelije se odnose i na njihovo zajedničko poreklo, visok nivo plastičnosti kao i blisku pozicioniranost koja obezbeđuje prirodno okruženje pogodno za preživljavanje i adekvatnu prokrvljenost koja je neophodna za njihovo normalno funkcionisanje (Colarusso i Zhou, 2022; Saleh i sar., 2021).

Ćelijsko reprogramiranje često uključuje upotrebu virusnih vektora i faktora rasta što ograničava njihov terapijski potencijal, pa je s toga nepohodno da se pronađu novi, alternativni pristupi koji prevazilaze ova ograničenja. Dosadašnji rezultati pružaju odličnu osnovu za buduća istaživanja u ovoj oblasti kako bi se dobijena saznanja najefikasnije iskoristila u terapiji dijabetesa (Colarusso i Zhou, 2022). Iako je načinjen veliki napredak na polju ćelijskog reprogramiranja, koji pruža ogroman terapijski potencijal, još uvek postoji veliki broj nerazjašnjenih pitanja u vezi sa mehanizmima koji se nalaze u osnovi transdiferencijacije velikog broja različitih tipova ćelija u ćelije koje proizvode insulin. Neke od nepoznanica se odnose na efikasnost ćelijske transfekcije, sposobnost reprogramiranih ćelija da zadrže novonastalo stanje odn. na njihovu sklonost da se vraćaju u pređašnje stanje. Takođe, kod transdiferenciranih ćelija treba analizirati postojanje i stepen funkcionalnih karakteristika endogenih beta ćelija tj. da li one imaju sposobnost da odgovore na brojne fiziološke stimuluse kako bi učestvovala u održanju metaboličke ravnoteže. Pored toga, od velike je važnosti za novonastale transdiferencirane ćelije da ne podležu autoimunskom napadu, što se naročito odnosi na alogene transplantacije, i da te ćelije nemaju povećani onkogeni potencijal. Finalni ćelijski produkt nakon reprogramiranja ne bi morao da bude "perfektna" beta ćelija, koja u potpunosti odgovara zreloj beta ćeliji poreklom iz ostrvaca kako bi ostvarila svoj terapijski potencijal. Najvažnije je da ona nema rizik od tumorogenze ili hipoglikemične efekte a da sa druge strane bude izdržljiva, da oslobađa dovoljno insulina i da reaguje na stimulaciju glukozom (sigurna, efikasna i izdržljiva) (Colarusso i Zhou, 2022).

Pokretanje ćelijskog reprogramiranja može da se postigne indukcijom i supresijom ekspresije transkripcionih faktora delovanjem na različite nivoe regulacije njihove ekspresije. Pristup koji podrazumeva upotrebu malih molekula za reprogramiranje deluje kao sigurniji put od upotrebe virusnih vektora, ali je njihov razvoj veoma složen kada je u pitanju regulisanje brojnih faktora transkripcije (Kalo i sar., 2022; van der Meulen i Huisin, 2015). Pronalazak takvih molekula, ali i načina njihove isporuke u pankreas je jedan od pravaca za zamenu terapija koje se oslanjaju na genetičku manipulaciju (van der Meulen i Huisin, 2015). Pored pronalaska malih molekula koji bi imali sposobnost da utiču na promenu ćelijskog identiteta, tako i napredak u istraživanjima koja se tiču efikasne isporuke gena u ćelije pomoću plazmida, AAV, nanočestica, modifikovanih RNK molekula bi mogli da obezbede sigurniju, efikasniju i jednostavniju ekspresiju faktora za transdiferencijaciju u targetnim ćelijama. Otkriće alata za editovanje genoma kao što su ZFN, TALEN i CRISPR/Cas su pojednostavili i ubrzali razvoj metoda koje omogućavaju direktnu transdiferencijaciju somatskih ćelija u druge tipove ćelija preskačući intermedijerno pluripotentno stanje (Kalra i sar., 2021). Sva nedavna istraživanja koja se baziraju na upotrebi različitih CRISPR/Cas9 sistema u potencijalnoj terapiji dijabetesa targetuju veliki broj različitih tipova ćelija i gena koji su povezani sa dijabetesom. CRISPR/Cas9 sistem za targetovanu aktivaciju gena (engl. *target gene activation*, TGA) je nedavno iskorišćen za *in vivo* transdiferencijaciju mišijih ćelija jetre u ćelije koje produkuju insulin zahvaljujući indukovanoj prekomernoj ekspresiji transkripcionog faktora PDX1. Kao posledica transdiferencijacije detektovan je povećan nivo insulina u serumu koji je doprineo poboljšanju hiperglikemijskog statusa kod dijabetičnih

životinja (Liao i sar., 2017). Ovaj TGA sistem ne uvodi izmene direktno na DNK molekulu, već targetovano aktivira gene indirektnim putem tako što izaziva epigenetičko remodelovanje regrutovanjem transkripcione mašinerije ili regrutovanjem epigenetičkih modulatora i izmenama histonskih modifikacija. Naime, sistem je ispitivan na adultnim životinjama koje eksprimiraju Cas9 (*knockin* životinje za Cas9) u koje je u repnu venu injeciran AAV vektor koji nosi informaciju za gRNK i aptamer koji ima ulogu da regrutuje kompleks za aktivaciju transkripcije ciljanog gena. Ovakav TGA sistem je, pored model sistema za DT1, korišćen za tretman muskularne distrofije i akutne bolesti bubrega (Liao i sar., 2017).

Editovanje epigenoma se razvilo i proširilo svoj potencijal u različitim oblastima od bazičnih istraživanja sve do biomedicine i primenjene biotehnologije (Goell i Hilton, 2021). Alati epigenetičkog editovanja bi u velikoj meri mogli da doprinesu masovnoj proizvodnji ćelija za terapiju dijabetesa (Colarusso i Zhou, 2022). Jedno od skorijih istraživanja je podrazumevalo korišćenje multipleksnog epigenetičkog editovanja za indukovanje ekspresije gena koji su specifični za beta ćelije u imortalizovanim humanim embrionalnim ćelijama bubrega (HEK293 ćelijska linija) i humanim indukovanim pluripotentnim ćelijama. Ova studija je podrazumevala istovremeno korišćenje više različitih CRISPR/dCas9 sistema i to CRISPR/dCas9-VP160, CRISPR/dCas9-TET1 i CRISPR/dCas9-P300 kako bi se aktivirali geni za PDX1, NEUROG3, PAX4 i insulin (Alejandra i sar., 2020).

5.1. Optimizacija transfekcije

Ključni korak za efikasno i precizno uvođenje (epi)genetičkih modifikacija pomoću (Epi)CRISPR sistema je odabir efikasne strategije za isporuku sistema u ciljanim ćelijama. Efikasnost transfekcije se definiše kao procenat živih ćelija koje eksprimiraju reporterski protein (u ovom slučaju GFP) i analizira se fluorescentnom mikroskopijom ili FACS analizom. Metoda za transfekciju se smatra adekvatnom i prihvatljivom ukoliko obezbeđuje 60-80% editovanih atherentnih ćelija, 40-60% ćelija u suspenziji i 40-80% primarnih humanih ćelija (Tyumentseva i sar., 2021). Pri tranzijentnoj transfekciji unešeni genetički materijal se ne ugrađuje u genom domaćina već ostaje eksprimiran samo određeni vremenski period zato što se gubi u procesu ćelijske deobe i biva razgrađen od strane faktora iz okruženja (Recillas-Targa, 2006). Optimalno vreme za merenje efekta unešenog genetičkog materijala u jedro ćelija domaćina je između prvog i četvrtog dana nakon transfekcije (Kim i Eberwine, 2010). Međutim, kada efektorski domen ostvaruje svoje aktivnosti editovanjem epigenoma, indirektno efekte uvedenih epigenetičkih promena kao što je metilacija molekula DNK, treba očekivati i analizirati nakon dužeg vremenskog intervala. Pri tranzijentnoj transfekciji komponente CRISPR sistema se uvode u ćelije domaćina bez inkorporacije u njihov genom i imaju vremenski ograničenu aktivnost. Glavna prednost tranzijentnih transfekcija je da ovakav pristup ograničava i rizik od potencijalnih „off-target“ efekata tako što su komponente CRISPR sistema prisutne u ćeliji ograničeni vremenski period (Shen i sar., 2019). Cas9 protein ima molekulsku težinu od oko 160 kDa, a nakon formiranja ribonukleoproteinskog kompleksa (RNP) u citoplazmi ćelija, on dobija ukupno negativno naelektrisanje koje potiče od fosfatne kičme gRNK. Zbog ovih karakteristika Cas9 RNP kompleks ima otežan prolaz kroz membrane ćelija. Kada se jednom nađu unutar ćelije, i Cas9 protein i molekuli gRNK moraju da prežive procese degradacije, i da se translociraju u nukleus kako bi obavilo (epi)genetičko editovanje. Stoga proces transfekcije treba da obezbedi optimalno unošenje stranih nukleinskih kiselina (ili proteina) u eukariotske ćelije, a da pri tome ne narušava njihovu vijabilnost i funkcionalnost (Kim i Eberwine, 2010). CRISPR/Cas9 sistem može da se isporuči u ćelije u formi molekula DNK (sve komponente u jednom plazmidu ili kotransfekcija više članova kompleksa koji su na odvojenim plazmidima), iRNK, ili u formi proteina (RNP). S obzirom da svaki tip ćelija ima svoje specifičnosti, neophodno je odabrati adekvatan metod i optimizovati sam proces transfekcije kako bi isporuka nukleinskih kiselina (ili proteina) bila dovoljno

efikasna. Razvoj alata za editovanje genoma i epigenoma praćen je i razvojem tehnologije za isporuku ovih alata u ćelije. CRISPR/Cas9 sistem može biti isporučen u ciljane ćelije koristeći brojne metode za transfekciju (Tyumentseva i sar., 2021). Trenutno se metode za isporuku CRISPR/Cas9 sistema u ćelije mogu podeliti na virusne i nevirusne (hemijske i fizičke) (Yip, 2020). Isporuka gena koja je posredovana virusima podrazumeva integrisanje sekvence za CRISPR/Cas9 u genom virusa i oslobađanje genskog kompleksa u inficiranu ćeliju (Xu i sar., 2019). U toku ovog procesa može doći do integracije virusnog vektora u ćeliju domaćina što može da dovede do mutacija, kancerogeneze ili imunskog odgovora. Postoje i komercijalno dostupni reagensi koji su specijalizovani za isporuku CRISPR/Cas9 ribonukleoproteinskog kompleksa u ćelije kao što je nelipozomalni polimerni sistem TransIT-X2® ili Lipofectamine™ CRISPRMAX™ sistem za transfekciju lipidnim nanopartikulama. Trenutno se elektroporacija smatra „zlatnim standardom“ za isporuku CRISPR/Cas9 RNP kompleksa u ciljanim ćelijama (Tyumentseva i sar., 2021).

U okviru ove doktorske disertacije korišćene su α TC1-6 ćelije pankreasa miša kao ciljane ćelije u koje treba da se isporuči sistem za ciljano uvođenje metilacije molekula DNK. Prvi korak bio optimizacija metode za isporuku ovog sistema u ćelije. U te svrhe je korišćen konstrukt dCas9-Dnmt3a3L-KRAB dizajniran u formi plazmidne DNK (Saunderson i sar., 2017; Stepper i sar., 2017), koji je kotransfekovan sa reporterskim genom koji je bio na zasebnoj plazmidu. Za transfekciju α TC1-6 ćelija koje su osetljive na veoma male promene nivoa kiseonika i grubu manipulaciju najpre je analizirana metoda za transfekciju pomoću PEI-ja. Ova metoda za transfekciju je odabrana kao „zlatni standard“ kada je u pitanju hemijski tip transfekcije, pre svega zbog svoje jednostavne primene, niske citotoksičnosti i pristupačnosti. Transfekcije sa ovim katjonskim polimerom imaju brojne prednosti kao što su dobro zaštićeni materijal za transfekciju, manja ograničenja u njegovoj veličini, niska imunogenost i niska kancerogenost (Chen i sar., 2019). S obzirom da pozitivno naelektrisani molekuli PEI-ja čvrsto interaguju sa molekulima DNK, kao i da se efikasno oslobađaju iz endozoma zahvaljujući snažnom efektu protonskog sunđera, ovaj tip transfekcije omogućava visoku efikasnost (Chen i sar., 2019). Ryu i saradnici su 2018. godine pokazali da se komercijalni jet-PEI i razgranati polimer PEI-ja od 25 kDa mogu uspešno koristiti za isporuku plazmidne DNK za CRISPR/Cas9 sistem. Međutim, upotreba ovih nanonosača je bila ograničena zbog njihove visoke citotoksičnosti (Ryu i sar., 2018). PEI je uspešno korišćen za transfekciju nekoliko ćelijskih linija sisara sa FACE plazmidom koji u osnovi sadrži CRISPR/Cas9 sistem. (Shao i sar., 2018). Ove transfekcije su imale visok stepen vijabilnosti i efikasnosti transfekcije. Takođe, Neuro2a ćelije su uspešno transfekovane plazmidom koji je nosio informacije za Cas9 i gRNK za targetovanje *Slc26a4* lokusa pomoću PEI-ja (Yip, 2020). Uprkos tome što nije bilo negativnih efekata na preživljavanje α TC1-6 ćelija, rezultati efikasnosti transfekcije pomoću PEI-ja koji su dobijeni u okviru ove doktorske disertacije su pokazali da ovaj vid transfekcije nije dobar izbor za ovu ćelijsku liniju. Naime, efikasnost transfekcije sa velikim plazmidom za EpiCRISPR sistem pri najčešće korišćenim parametrima za transfekciju (odnos DNK:PEI, vreme inkubacije) je bila veoma niska (~3,8%).

Kako transfekcija pomoću PEI-ja nije dala zadovoljavajuće rezultate, pristupilo se nukleofekciji kao alternativnom metodu za trasfekciju α TC1-6 ćelija koja se bazira na elektroporaciji. Specijalizovana mašina, tzv. Nukleofektor, proizvodi specifičan električni puls koji dovodi do prolaznog narušavanja celovitosti ćelijske i jedarne membrane što omogućava direktan ulazak plazmidne DNK u jedra ciljanih ćelija. Na ovaj način je obezbeđena brža ekspresija isporučenih gena u odnosu na druge metode za transfekciju ćelija jer se preskače korak ćelijske deobe, što je od velike važnosti za transfekciju primarnih ćelijskih kultura. Pini i sar. su poredili efikasnost isporuke CRISPR/Cas9 sistema u primarne mioblaste pomoću nekoliko nevirusnih metoda za transfekciju (Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), TurboFect (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Gene Juice

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i elektroporaciju (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Oni su pokazali da elektroporacija ostvaruje najmanje 2,5x puta veću efikasnost u odnosu na druge hemijske metode za transfekciju (Pini i sar., 2022). Za kotransfekciju humanih T ćelija sa plazmidima koji nose informaciju za CRISPR/Cas9 sistem i piggyBac transpozon za isporuku i ekspresiju CAR gena, korišćena je elektroporacija pomoću Nucleofector™ II/2b uređaja (Hu i sar., 2019). Takođe, nukleofektor tehnologija uspešno je korišćena za isporuku CRISPR/Cas9 sistema i pravljenje ROR1 *knockout* malignih B ćelija za koje je poznato da se izuzetno teško transfekuju (Yu, 2020). Mišija pankreatična beta ćelijska linija MIN-6 je uspešno transfekovana ekspresionim plazmidima za CRISPR/Cas9 sistem korišćenjem X subjediniice Amaxa sistema kako bi se obrisao gen za epitelni kanal za natrijum (engl. *epithelial sodium channel*, ENaC) iz ovih ćelija u cilju dobijanja *knockout* ćelijske linije i proučavanja funkcije gena (Zhang i sar., 2021). Elektroporacija je korišćena i za efikasnu isporuku Cas9 RNP kompleksa koji sačinjavaju protein Cas9 i fluorescentno obeležen crRNA/tracrRNA kompleks koji služi za targetovanje gena (Seki i Rutz, 2018; Zoppo i sar., 2021). Savell i saradnici su pokazali da sgRNA:dCas9-VPR konstrukt koji se bazira na CRISPR sistemu može biti isporučen u HEK293T ćelije pomoću agensa FuGene HD (Promega) u manjoj meri, dok se C6 ćelije glioma mogu uspešno transfekovati korišćenjem Nucleofector 2b aparata (Lonza) (Savell i sar., 2019). Lonzina tehnologija za nukleofekciju se pokazala kao adekvatan metod za isporuku CRISPR/Cas9 sistema za veliki broj ćelijskih linija poreklom od različitih organizama, pre svega zbog visoke efikasnosti transfekcije sa velikim plazmidima i visokog stepena preživljavanja ćelija (Chicaybam i sar., 2017).

U trenutku započinjanja ove doktorske disertacije nije bilo optimizovanog protokola niti dostupnih podataka o nukleofekciji α TC1-6 ćelija pomoću Amaxa Nucleofector™ 4D tehnologije. Stoga je prvo bilo neophodno optimizovati proces nukleofekcije s ciljem da se pronađu najbolji uslovi za dobijanje visokog nivoa transfekovanih α TC1-6 ćelija. Proces optimizacije je podrazumevao pronalazak balansa između visoke efikasnosti prenosa plazmida u ćelije i minimalne ćelijske smrtnosti kako bi se obezbedio dovoljan broj transfekovanih ćelija za dalje analize (Recillas-Targa, 2006). Korišćena su tri različita pufera za nukleofekciju u kombinaciji sa različitim programima koji su generisani od strane X subjediniice Nukleofektor mašine. Rezultati optimizacije nukleofekcije α TC1-6 ćelija su pokazali da je SF rastvor imao najmanje negativnih efekata na preživljavanje ćelija i omogućio najveći stepen njihovog oporavka nakon primenjenog električnog pulsa, pa se izdvojio kao najefikasniji u odnosu na SE i SG rastvor. Tranzijentne pore koje nastaju na ćelijskoj i jedarnoj membrani prilikom primene električnog pulsa za vreme nukleofekcije ostaju otvorene oko 15 min, omogućavajući jonima Ca^{2+} iz DMEM-a da difunduju unutar ćelije (Shigekawa i Dower, 1988). Inluks Ca^{2+} iz medijuma unutar ćelija može da inicira mnoge puteve signalne transdukcije i da negativno utiče na vijabilnost ćelija (Chen i sar., 2005). Kako bi se smanjio ovaj rizik, uveden je korak oporavka α TC1-6 ćelija u trajanju od 10 min na 37°C u medijumu koji sadrži niži nivo jona Ca^{2+} , kao što je RPMI medijum, jer pozitivno utiče na preživljavanje ćelija.

U proces optimizacije nukleofekcije bila je uključena i optimizacija broja ćelija za nukleofekciju s ciljem da se dobije optimalan broj transfekovanih ćelija za dalje analize. Gustina sejanja ćelija može da utiče na dostupnost nutrijenata i metabolizam ćelija. Naime, kada broj ćelija koje se zasejavaju na neku površinu pređe optimalan broj, dolazi do njihovog odumiranja zbog prebrzog iskorišćenja nutrijenata (Mason i Rathmell, 2011). Sa druge strane, pokazano je da povećanjem broja ćelija koje se podvrgavaju procesu transfekcije dolazi do redukovanja toksičnog efekta koji izaziva visoka koncentracija plazmida, pa je samim tim i ukupan broj transfekovanih ćelija veći (Fakiruddin i sar., 2014). Dupliranje broja ćelija za transfekciju za potrebe ove disertacije u odnosu na inicijalne vrednosti nije imalo negativnog efekta na preživljavanje ćelija, i rezultovalo je proporcionalnim povećanjem broja

transfekovanih ćelija. Još jedan od faktora koji utiče na efikasnost transfekcije je i količina plazmida, pri čemu broj transfekovanih ćelija značajno raste sa povećanjem koncentracije plazmida. Sa druge strane, velika količina plazmida može negativno da utiče na vijabilnost ćelija (Chopra i sar., 2020). Optimizacija procesa transfekcije obuhvata i definisanje količine plazmida koja će doprineti povećanju efikasnosti transfekcije, a koja neće negativno uticati na vijabilnost ćelija. Dvostepeno dupliranje količine plazmida u odnosu na inicijalne vrednosti (sa 0,4 μg na 2 μg) je u ovom slučaju doprinelo povećanju efikasnosti transfekcije bez negativnih efekata na preživljavanje $\alpha\text{TC1-6}$ ćelija. Veličina plazmida je takođe jedan od faktora koji može bitno da utiče na efikasnost transfekcije, pri čemu je transfekcija sa malim plazmidima u velikoj meri efikasnija u odnosu na transfekcije sa velikim plazmidima (Lesueur i sar., 2016; Troyanovsky i sar., 2016). U ovoj disertaciji je to potvrđeno primenom obe metode za transfekciju. Naime, mVenus (4731 bp) i pmaxGFP™ (3486 bp) pripadaju grupi malih reporterskih plazmida, dok je dCas9-Dnmt3a3L-KRAB skoro 3 puta veći (11.548 bp). Rezultati transfekcije pomoću obe metode su pokazali da postoji velika razlika u efikasnosti kada se porede ćelije koje su transfekovane sa malim reporterskim plazmidom u odnosu na one koje su transfekvane sa dCas9-Dnmt3a3L-KRAB. Ta razlika se ogleda u 7,8x nižoj efikasnosti za transfekciju pomoću PEI-ja i 4x nižoj efikasnosti nakon nukleoporacije $\alpha\text{TC1-6}$ ćelija sa velikim dCas9-Dnmt3a3L-KRAB plazmidom u odnosu na male reporterske plazmide. U toku procesa isporuke plazmida pri nukleofekciji veliki plazmidi mogu da se zapletu i zaglave u otvorene pore na membrani, što onemogućava njihov adekvatan ulazak u ćeliju i zatvaranje pora na membrani, rezultujući ćelijskom smrću (Stewart i sar., 2018). Kotransfekcija ćelija sa plazmidima različite veličine omogućava zajedničko putovanje plazmida kroz pore nastale na ćelijskoj i jedarnoj membrani, pri čemu mali plazmidi olakšavaju ulazak i putovanje većih plazmida (kao što je dCas9-Dnmt3a3L-KRAB). Stoga je povećanje efikasnosti transfekcije direktno obezbeđeno zahvaljujući prisustvu malih plazmida (Søndergaard i sar., 2020). Jedan od razloga za bolju efikasnost nukleofekcije sa EpiCRISPR plazmidima od transfekcije pomoću PEI-ja mogao bi da leži u efikasnijem unosu kombinacije malih i velikih plazmida kroz pore nastale delovanjem električnog pulsa u odnosu na unos kondenzovanih čestica putem endocitoze. Kao rezultat toga je zabeležen niži stepen pada u efikasnosti nukleofekcije koja nastaje zbog veličine plazmida u poređenju sa padom u efikasnosti transfekcije pomoću PEI-ja.

$\alpha\text{TC1-6}$ ćelije su atherentne ćelije koje ne formiraju monosloj, već rastu u klasterima koji su slabo pričvršćeni za atherentnu površinu suda u kome se gaje, sa po nekom pojedinačnom ćelijom u suspenziji. Transfekcija posredovana PEI-jem se može posmatrati i kao neadekvatan izbor metode za transfekciju ćelija koje imaju tendenciju da formiraju klasterne, zato što je samo deo ćelija izložen kompleksu DNK/PEI dok je ostatak ćelija prekriven drugim ćelijama i nije u mogućnosti da dođe u fizički kontakt sa partikulama za transfekciju. Istraživanja u okviru ove disertacije su pokazala da je nukleofekcija metoda koja više odgovara $\alpha\text{TC1-6}$ ćelijskoj liniji zbog načina na koji ove ćelije rastu, zato što su veoma osetljive i na male promene CO_2 u ćelijskoj kulturi, kao i zbog veličine plazmida za EpiCRISPR sistem. Ranije je zabeležena efikasnost nukleofekcije $\alpha\text{TC1-6}$ od 40% sa pCMV-3FLAG-3a plazmidnom DNK, za čiju transfekciju je tada korišćen Amaxa 2b Nukleofektor (Lonza) (Carnegie i sar., 2010). U okviru ove disertacije je nakon procesa optimizacije postignuta efikasnost nukleofekcije od ~70% korišćenjem Amaxa 4D X subjedinice. Još jedan od razloga za dobijenu bolju efikasnost nukleofekcije u odnosu na transfekciju pomoću PEI-ja može da leži u činjenici da se za nukleofekciju koriste ćelije u suspenziji gde sve ćelije imaju podjednaku šansu da budu izložene i dostupne za transfekovanje. Nakon transfekcije ćelija u suspenziji, one se zasejavaju na atherentnu površinu suda, gde ubrzo nastavljaju svoje normalne fiziološke procese. Naime, ćelije koje su transfekovane samo sa velikim dCas9-Dnmt3a3L-KRAB plazmidom nisu pokazale nikakve promene u fiziologiji ćelija 5. i 7. dana nakon transfekcije, što govori o tome da one brzo i lako prevazilaze stresni događaj u vidu

kratkotrajnog električnog pulsa kome su bile podvrgnute. Sam plazmid dCas9-Dnmt3a3L-KRAB koji spada u grupu većih plazmida nema citotoksične efekte na α TC1-6 ćelije. Normalna fiziološka funkcija transfekovanih ćelija se ogleda u nepromenjenom prisustvu hormona glukagona i pored prisutnog dCas9-Dnmt3a3L-KRAB plazmida. Sve prethodno navedeno ukazuje na to da je nukleofekcija korišćenjem SF ratvora i CM-156 programa dobar izbor za isporuku EpiCRISPR sistema u α TC1-6 ćelijsku liniju. Takođe, prisustvo samo dCas9-Dnmt3a3L-KRAB plazmida bez gRNK sekvenci koje bi ga navodile na specifično mesto u genomu, ne ispoljava nikakva toksična dejstva na ćelije. S obzirom da je postignuta efikasnost od ~70% transfekovanih ćelija pri vijabilnosti koja je veća od 80%, može se zaključiti da je optimizacija transfekcije uspešna i da zadovoljava kriterijume koji opisuju adekvatnu i prihvatljivu metodu ćelijske transfekcije (Tyumentseva i sar., 2021).

5.2. Editovanje epigenoma alfa ćelija u cilju dobijanja ćelija koje proizvode insulin

Osim u pankreasu, adaptivne promene ćelijskog identiteta su karakteristika različitih tipova ćelija u mnogim organima. Urođena *in situ* adaptivna ćelijska plastičnost se posmatra kao veliki potencijal za tretman degenerativnih bolesti koji bi omogućio ponovno uspostavljanje populacije ćelija koje nedostaju (Furuyama i sar., 2019). Epigenetički status i obrazac genske ekspresije u različitim ćelijama endokrinog pankreasa mora stabilno da se prenosi nakon svake ćelijske deobe kako bi se obezbedilo održavanje identiteta ćelija u okviru Langerhansovih ostrvaca. Identitet alfa i beta ćelija pankreasa određen je antagonističkim efektima ključnih transkripcionih faktora: ARX i PAX4 (Collombat i sar., 2003). Dhawan i saradnici su pokazali da nakon ablacije Dnmt1 u beta ćelijama pankreasa dolazi do njihove transdiferencijacije u alfa ćelije (Dhawan i sar., 2011). *Arx* gen je metilovan i reprimiran u beta ćelijama, dok je hipometilovan i eksprimiran u alfa ćelijama i beta ćelijama u kojima je odsutan *Dnmt1*. Stoga je *Arx* definisan kao ključni faktor za određivanje ćelijske loze. Delecija *Dnmt1* u beta ćelijama dovodi do pasivne demetilacije genoma koja je povezana sa stepenom njihove replikacije. To se odražava na postepenu promenu ćelijskog identiteta a koja se ogleda kroz istovremenu ekspresiju insulina i glukagona (Dhawan i sar., 2011). Papizan i saradnici su pokazali da je prisustvo NKX2-2 kao člana velikog represorskog kompleksa na metilovanom promotoru *Arx*-a neophodno za održavanje identiteta beta ćelija pankreasa (Papizan i sar., 2011). Analize trodimenzionalne strukture hromatina i transkriptoma su pokazale da su humane ćelije pankreasa definisane specifičnom strukturom hromatina koja prati za tip ćelija specifičan program genske ekspresije koji je kontrolisan posredstvom transkripcionih faktora (Su i sar., 2022). Za potrebe ove doktorske disertacije analiziran je transkriptom α TC1-6 i NIT-1 ćelijskih linija. Rezultati su pokazali da u ovim ćelijama postoje po dva klastera gena koji su specifični za tip ćelija a definisana su na osnovu obrasca genske ekspresije. Potvrđeno je da ove ćelije eksprimiraju hormone i transkripcione faktore koji su specifični za tip ćelija kojem pripadaju, a njihova ekspresija je potvrđena i na proteinskom nivou. Takođe, ELISA esejem je potvrđeno da ove ćelije sekretuju njihove glavne produkte van ćelije što ukazuje da su one funkcionalne i da predstavljaju dobar model sistem za ispitivanje sposobnosti promene identiteta usled uvođenja epigenetičkih modifikacija. S obzirom da je aktivnost ključnih transkripcionih faktora, kao što je ARX, epigenetički kontrolisana, njena ciljana represija pomoću dirigovane metilacije DNK molekula predstavlja jedan od načina za indukovanu proizvodnju insulina uz minimalne intervencije u ćeliji. HRM analizom je potvrđeno da je metilacija promotorskog regiona *Arx*-a u NIT-1 ćelijama za oko 50% veća u odnosu na α TC1-6 ćelije i kao takva dovoljna za odsustvo genske ekspresije. Analiza metilacionog profila promotora *Arx*-a u α TC1-6 i NIT-1 ćelijskim linijama odgovara detektovanom obrascu ekspresije *Arx* gena u ovim ćelijskim linijama koji je u skladu i sa navedenim literaturnim podacima (Arda i sar., 2018; Collombat i sar., 2005; Dhawan i sar., 2011; Papizan i sar., 2011).

Plastičnost koja postoji između ćelija unutar Langerhansovog ostrvca dobra je osnova koja može da se iskoristi u svrhu regulacije mase beta ćelija i nekih drugih ćelija endokrinog pankreasa (Ziv i sar., 2013). Naime, visok nivo plastičnosti epigenoma alfa ćelija pankreasa pokazan je eksperimentima koji su ispitivali epigenetički i transkripcioni profil alfa i beta ćelija humanog pankreasa. Rezultati su pokazali da je mnogo veći broj gena u alfa ćelijama bivalentno obeležen aktivirajućim i reprimirajućim histonskim markerima (H3K4me3 za aktivno stanje i H3K27me3 histonske modifikacije za utišano stanje) u odnosu na beta ćelije (Bramswig i sar., 2013). Istovremeno prisustvo oba ova markera na jednom genu je češće u pluripotentnim i nediferenciranim ćelijama u odnosu na terminalno diferencirane ćelije (Saunderson i sar., 2017). Međutim, ovakav obrazac histonskih modifikacija je prisutan i u diferenciranim alfa ćelijama pankreasa i posebno izražen na genima koji kodiraju za regulatore transkripcije specifične za beta ćelije pankreasa. Sa druge strane, ovi isti geni u beta ćelijama u najvećoj meri nose markere ili aktivnog ili reprimiranog stanja. Uprkos suprotnoj ulozi u održavanju homeostaze glukoze u cirkulaciji, alfa i beta ćelije imaju zajedničke progenitorske ćelije, i kasnije eksprimiraju veliki broj istih gena koji imaju ulogu u unosu i metabolizmu glukoze i sekreciji hormona (Benner i sar., 2014). Rezultati ChIP analiza za potrebe ove disertacije su pokazali da epigenetički pejzaž na delu promotora *Arx*-a u potpunosti odgovara funkcionalnoj genskoj ekspresiji u α TC1-6 ćelijama, nasuprot NIT-1 ćelijama u kojima je *Arx* suprimiran. To se ogleda kroz povećano prisustvo Pol II i H3K4me3 na delu promotora *Arx*-a u α TC1-6 ćelijama u odnosu na NIT-1 ćelije. Lawlor i saradnici su takođe dobili slične rezultate za humane primarne i mišije ćelijske linije (α TC1 i beta TC-6 (β TC6)). Oni su pokazali da je regulatorna arhitektura očuvana između mišijih ćelijskih linija i primarnih ćelija ostrvaca i da se mogu iskoristiti u funkcionalnim epigenetičkim pristupima za analizu regulatornih elemenata, gena, i puteva od interesa koji kontrolišu identitete i funkciju ćelija ostrvaca (Lawlor i sar., 2017). Nakon ispitivanja genske ekspresije i dostupnosti hromatina, Mawla i saradnici su dodatno potvrdili da se genska ekspresija ključnih transkripcionih faktora koji regulišu identitet svakog od analiziranih tipova ćelija pankreasa podudara sa stepenom pristupačnosti hromatina u regionu koji obuhvata TSS (Mawla i sar., 2022).

Nakon optimizacije metode za transfekciju α TC1-6 ćelija, pristupilo se ispitivanju sposobnosti ovih ćelija da se transdiferenciraju u ćelije koje proizvode insulin nakon indukovane dirigovane metilacije isključivo *Arx* gena upotrebom EpiCRISPR alata. U osnovi regulacije ekspresije *Arx*-a se nalazi metilacija molekula DNK koja služi kao okosnica za prenošenje histonskih modifikacija i održavanje represivne hromatinske strukture (Dhawan i sar., 2011). Koliko važnu ulogu u održavanju identiteta beta ćelija ima metilacija promotora *Arx*-a govori istraživanje koje je pokazalo da se utišavanjem MeCP2 i PRMT6 u beta ćelijama fenokopira nedostatak *Dnmt1*. Kao posledica utišavanja dolazi do dediferencijacije beta ćelija koja se ogleda kroz ekspresiju *Arx*-a zajedno sa *Gcg* i *MafB*. Nakon indukovane ekspresije *Arx*-a u Min6 ćelijama (transfekcija sa konstruktom za overekspresiju ili tretman pomoću 5-aza-dC) dolazi do odvajanja MeCP2 i PRMT6 sa UR2 regiona promotora *Arx*-a. To dovodi do pokretanja ekspresije *Arx*-a, *Gcg*-a i *MafB*, dok se paralelno smanjuje ekspresija markera specifičnih za beta ćelije kao što su *Pdx1*, *Pax4*, *Ins* (Dhawan i sar., 2011).

U okviru ove doktorske disertacije ciljana metilacija promotora *Arx*-a je predložena kao efikasan, precizan i reverzibilan pristup za gensku represiju i direktno reprogramiranje kako bi alfa ćelije pankreasa počele da proizvode insulin. Ostale ćelije endokrinog i egzokrinog pankreasa već imaju metilovan i neaktivan *Arx* (Arda i sar., 2018). Imajući u vidu epigenetički profil *Arx* gena u ćelijama endokrinog pankreasa, ovakav pristup stimulacije alfa ćelija da proizvode insulin posredstvom targetovane metilacije *Arx*-a i njegovog utišavanja, bi obezbedio minimalne sporedne neželjene efekte na ostale ćelije endokrinog pankreasa. Prvi korak u transdiferencijaciji je podrazumevao poređenje i odabir jednog od tri različita

konstrukta za indukovanje genske represije (dCas9-Dnmt3a3L, dCas9-KRAB i dCas9-Dnmt3a3L-KRAB) koji su kotransfekovani sa četiri različite gRNK. Konstrukti su dizajnirani na Institutu za biohemiju Univerziteta u Štutgartu, od strane dr Petera Steppera pod rukovodstvom dr Tomasza Jurkowskog. Stepper i saradnici su testirali sistem za epigenetičko editovanje (bez represorskog domena KRAB) na tri različita gena i pokazali efikasno targetovano indukovanje metilacije koje dovodi do genske represije (Stepper i sar., 2017). U isto vreme su Vojsa i saradnici takođe objavili da su razvili alat za indukovanje metilacije DNK molekula na specifičnim dirigovanim mestima pomoću katalitičkog domena DNMT3A koji je fuzionisan sa neaktivnim Cas9. Oni su pokazali da istovremeno može da se metiluje više regiona u okviru jednog promotora i da se metilacija dešava na oko 35 bp od mesta vezivanja konstrukta (Vojsa i sar., 2016). Steper i sardanici su pokazali da su pikovi ciljane metilacije koji su indukovani pomoću dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L detektovani oko 25 bp uzvodno od i 40 bp nizvodno od pozicije PAM sekvence (Stepper i sar., 2017). Takođe, ovaj konstrukt je ostvario efikasnu metilaciju CpG ostrvca koje je oko 1000 bp udaljeno od targetovane sekvence. Potvrđeno je i da sam fuzioni konstrukt ne ostvaruje nikakav efekat na metilaciju bez prisustva gRNK, što se poklapa sa odsustvom metilacije u Mock transfekovanim alfa ćelijama. Mesto vezivanja sistema za epigenetičko editovanje koje je definisano komplementarnim sparivanjem ciljanog DNK molekula i gRNK u dužini od 20 bp ostaje fizički zaštićeno i nemetilovano. Autori su predložili mehanizam DNK metilacije pomoću ovog sistema koji podrazumeva multimerizaciju endogenih molekula Dnmt3a/Dnmt3L koji formira kompleks sa DNK (Stepper i sar., 2017). Korišćenjem istog sistema za epigenetičko editovanje u primarnim ćelijama dojki izolovanim iz zdravog humanog tkiva, Saunderson i saradnici su pokazali da metilacija molekula DNK može da bude indukovana na više gena odjednom upotrebom gRNK molekula koje pozicioniraju represorski kompleks na ciljanim genima. Metilacija koja je indukovana na ovaj način imala je pik između 6 i 10 dana nakon transfekcije i pokazala se kao dugotrajna i efikasna u utišavanju genske ekspresije (Saunderson i sar., 2017).

Analiza metilacije DNK molekula pomoću targetovanog bisulfitnog sekvenciranja u α TC1-6 ćelijama nakon transfekcije sa konstruktima za gensku represiju je pokazala da je sistem koji se izdvojio kao najefikasniji u *in vitro* uslovima bio tzv. EpiCRISPR. Ovaj sistem je sačinjen od dCas9-Dnmt3a3L-KRAB konstrukta u kombinaciji sa četiri gRNK (1-4). dCas9-Dnmt3a3L-KRAB predstavlja fuzioni protein koji sadrži katalitički domen mišijeg Dnmt3a, C-terminalni domen Dnmt3L i KRAB domen koji su kuplovani sa katalitički neaktivnim Cas9. Uloga KRAB domena je da pospešuje kondenzaciju hromatina i gusto pakovanje u hromatinske strukture višeg reda i time dodatno doprinese represiji genske ekspresije. Za KRAB se u ćeliji vezuje KAP1 (engl. *KRAB associated protein 1*), sa kojim deluje kao transkripcioni represor. KAP1 ima ulogu da regrutuje niz epigenetičkih prigušavača kao što su SETDB1 (engl. *SET domain bifurcated 1*) i EHMT2 (engl. *euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2*), dve histonske metiltransferaze koje uvode H3K4me2 i H3K4m3, histonsku demetilazu 1 specifičnu za lizin (engl. *lysine-specific histone demethylase 1*, LSD1), kompleks za remodelovanje nukleozoma i deacetilazu (engl. *nucleosome remodeling and deacetylase*, NURD) koji uklanja metilaciju na četvrtom lizinu histona H3 kao i acetil grupe. Svi ovi enzimi modifikuju histone zajedno sa HP1 (engl. *heterochromatin protein 1*) familijom proteina i dovode do uspostavljanja represivnog stanja hromatina. KAP1 ima sposobnost i da regrutuje *de novo* DNMT3a ili 3b koji uvodi metilaciju molekula DNK i doprinosi trajnom zaključavanju (Amabile i sar., 2016). Imajući u vidu ulogu KRAB domena u konstruktima za gensku represiju može se zaključiti da bi detektovana veća efikasnost uvedene metilacije molekula DNK u α TC1-6 ćelijama mogla da bude posledica dodatnog regrutovanja enzima DNMT3a ili DNMT3b.

U okviru ove doktorske disertacije ćelije su analizirane u nekoliko vremenskih tačaka: 5., 7., 12., 15. i 20. dan nakon transfekcije. Ove vremenske tačke se poklapaju sa prethodnim zapažanjima Thorel-a i saradnika koji navode da je 5. dan tačka ranog odgovora alfa ćelija na povrede, 15. dan je vreme kada je zabeleženo da su se alfa ćelije konvertovale ali da su i dalje bihormonalne, a 30. dana alfa ćelije više nisu eksprimirale glukagon u ostrvcima (Thorel i sar., 2010). Detektovani nivo iRNK za *Cas9* odražava prisustvo EpiCRISPR kompleksa u transfekovanim alfa ćelijama. Prisustvo iRNK za *Cas9* postepeno opada nakon 5. dana od transfekcije, rezultujući potpunim odsustvom 12. dana kao posledica tranzijentne transfekcije ćelija. U α TC1-6 ćelijama transfekovanim sa dCas9-KRAB dolazi do pada u nivou ekspresije *Arx*-a, međutim u njima nije zabeležena inicijacija transkripcije *Ins2*, kao što je slučaj sa preostala dva konstrukta koji imaju sposobnost da metiluju molekul DNK. Targetovana metilacija pomoću dCas9-Dnmt3a3L konstrukta je bila najmanje efikasna u pogledu smanjenja ekspresije *Arx*-a u odnosu na ostala dva konstrukta, ali je kod ovih ćelija ipak detektovan početak ekspresije *Ins2*. Iz ovoga se može zaključiti da uvođenje metilacije *Arx*-a deluje kao inicijalni i neophodni signal za pokretanje ekspresije *Ins2* u alfa ćelijama. Sa druge strane, ukoliko ćelija ne detektuje tu inicijalnu metilaciju molekula DNK posredovanu direktnim vezivanjem Dnmt3a(3L) za DNK molekul, pretpostavka je da joj treba dati više vremena kako bi se započela ekspresija insulina.

Rezultati eksperimenata za ovu doktorsku disertaciju su pokazali da samo jedna tranzijentna kotransfekcija α TC1-6 ćelija sa EpiCRISPR konstruktom i četiri gRNK koje pozicioniraju kompleks za epigenetičko editovanje, dovodi do hipermetilacije promotora gena za *Arx* i supresije genske ekspresije 7 dana nakon transfekcije. Nivo uvedene metilacije u α TC1-6 ćelijama nakon pet dana od transfekcije približan je nivou metilacije u NIT-1 ćelijama. Razlike između nivoa indukovane metilacije na 5. i 7. danu od transfekcije su minimalne, nakon čega sledi postepeni pad od ukupno ~20% do poslednjeg analiziranog dana. Iako uvedena modifikacija pokazuje opadajući trend, ona se održava na promotoru *Arx*-a 15 dana od transfekcije. Čak i u odsustvu konstrukta koji je analiziran ekspresijom iRNK za *Cas9*, 12 dana nakon transfekcije nivo uvedene metilacije ostaje bliži nivou u NIT-1 ćelijama nego inicijalnom nivou u alfa ćelijama. Sa druge strane, nakon pada u nivou ekspresije iRNK za *Arx* za oko 50% 5. dana nakon transfekcije, nivo ekspresije *Arx*-a nakon 7. dana počinje da raste, vraćajući se na inicijalne vrednosti posle 12. dana. Sve ovo upućuje na postojanje ćelijskih mehanizama koji detektuju novonastale promene na nivou epigenoma, održavaju identitet alfa ćelija i odupiru se njegovim promenama. O'Geen i saradnici su analizirali dugotrajnost indukovane represije ciljanih gena uz pomoć kotransfekcije dva konstrukta za epigenetičko editovanje: DNMT3A-dCas9 i KRAB-dCas9. Oni su pokazali da je metilacija molekula DNK i H3K9me3 histonska modifikacija prolazna i da potpuno nestaje 24 dana nakon tretmana. Takođe su pokazali i da su različite kombinacije histonskih modifikacija i metilacije molekula DNK neophodne da bi se postigla maksimalna genska represija, te da je neophodno fino podešavanje alata za editovanje u zavisnosti od lokusa i tipa ćelija (O'Geen i sar., 2019). Pretpostavka je da hipermetilacija promotora *Arx*-a indukovana EpiCRISPR sistemom u nekoj meri dovodi do kondenzacije hromatina u promotorskom regionu zahvaljujući represorskom kompleksu koji je aktiviran od strane KRAB-KAP1 kompleksa. Mehanizam kojim ova uvedena promena u alfa ćelijama dovodi do početka ekspresije i sinteze insulina u pankreatičnim alfa ćelijama još uvek nije razjašnjen.

U EpiC ćelijama insulin je detektovan na nivou iRNK pomoću RTqPCR metode i nakon sekvenciranja transkriptoma. Na proteinskom nivou insulin je detektovan imunofluorescentnim bojenjem unutarćelijskog insulina i merenjem količine oslobođenog insulina u ćelijskom medijumu pomoću ELISA eseja. Sedmog dana nakon editovanja epigenoma iz približno 1% transfekovanih alfa ćelija počeo je da se oslobađa sintetisani insulin. Ovaj procenat transdiferenciranih ćelija se poklapa sa stepenom spontano

reprogramiranih alfa ćelija od oko 1–2% koji su dobili Oropeza i sar. nakon potpunog gubitka beta ćelija pankreasa. U odsustvu insulina i puteva prenosa signala koje on pokreće, oko 98% alfa ćelija zadržava svoj fenotip (Oropeza i sar., 2021). U alfa ćelijama u kojima je aktivirana proizvodnja insulina zabeleženo je i povećanje ekspresije markera specifičnih za alfa ćelije, što ukazuje da u ovim ćelijama postoje mehanizmi koji se odupiru pokušajima promene identiteta alfa ćelija (Cigliola i sar., 2018). U okviru ove doktorske disertacije je pokazano da u istom vremenskom intervalu kada je zabeležen povratak na inicijalni nivo ekspresije *Arx*-a (7-12 dan nakon transfekcije) detektovan je i najviši nivo ekspresije iRNK za *Ins2* u α TC1-6 ćelijama. Nakon ove vremenske tačke nivo iRNK za *Ins2* počinje naglo da opada sve do kontrolnog nivoa detektovanog u alfa ćelijama.

Analiza ekspresije iRNK za *Arx* je pokazala da je uvođenje dirigovane metilacije na njegovom promotoru u EpiC transfekovanim ćelijama dovoljno da dovede do direktnog smanjenja ekspresije. S obzirom da je ARX transkripcioni faktor koji deluje kao aktivator ili represor, kao posledica smanjenja njegove ekspresije došlo je do promena u ekspresiji nekoliko različitih gena u EpiC transfekovanim ćelijama. Ovi geni (među kojima su *Ins2* i neki drugi geni koji su uključeni u Ca^{2+} signaling) mogu da budu važni za tranzijentno oblikovanje ćelijskog identiteta u smeru ka beta ćelijama. Analiza transkriptoma transfekovanih ćelija je pokazala da su geni koji su pojačano ekspimirani nakon uvedene metilacije *Arx*-a u vezi sa nekoliko metaboličkih puteva definisanih u KEGG bazi puteva. U putu DT2 iz KEGG baze kao povišeno ekspimiran se izdvojio *Pik3cd* gen za katalitičku subjedinicu p110d koja je deo holoenzima fosfatidil inozitol 3 kinaze (PI3K). Aktivnost ove kinaze je od velike važnosti za regulaciju insulinske sekrecije a njena smanjena aktivnost u beta ćelijama doprinosi njihovoj poremećenoj funkciji u dijabetesu (Kaneko i sar., 2010). Drugi gen je *Hkdc1*, kodira za nedavno otkrivenu heksokinazu koja pripada evoluciono konzervisanoj familiji kinaza koje imaju ulogu u fosforilaciji glukoze pri ulasku u ćeliju čime se ona uvodi u ćelijski metabolizam (Ludvik i sar., 2016; Wilson, 2003). Iz KEGG puta Sekrecije insulina izvojila su se dva gena povezana sa unutarćelijskim nivoom Ca^{2+} i to gen za *Itpr3* koji kodira za ligand zavistan Ca^{2+} kanal koji se nalazi na membranama unutarćelijskih depoa jona Ca^{2+} kao što su endoplazmatični retikulum i sekretorne granule (Dyachok i Gylfe, 2004). Drugi je *Adcy7* - gen koji kodira za membransku adenilat ciklazu koja konvertuje adenozin trifosfat (ATP) u ciklični adenozin monofosfat (cAMP) i pirofosfat. cAMP ima ulogu signalnog molekula za koji se smatra da pojačava sekreciju insulina koja je pokrenuta povišenom koncentracijom Ca^{2+} u beta ćelijama (Tengholm i Gylfe, 2017). Za oba KEGG puta je zajednička pojačana ekspresija *Ins2* gena u EpiC transfekovanim ćelijama u odnosu na Mock.

Pored prethodno opisanih gena, RTqPCR analizom detektovan je i kratkotrajni porast u ekspresiji ključnih transkripcionih faktora beta ćelija kao što su *Pax4* i *MafA*, kao i glukoznog transportera *Slc2a2* na nivou iRNK. Naime, nakon zabeleženog značajnog porasta u njihovoj ekspresiji na 5. danu, usledio je pad nakon 7 dana od transfekcije i povratak na inicijalni nivo u ekspresiji. Povećanje u ekspresiji *Pax4* može biti direktna posledica smanjene ekspresije *Arx*-a s obzirom da ARX može da se veže za promotor *Pax4* gde ostvaruje svoju represorsku ulogu (Courtney i sar., 2014). Ranije je pokazano da indukovana ekspresija *Pax4* pomoću adenovirusa u α TC1-9 ćelijskoj liniji dovodi do pokretanja insulinske i smanjenja glukagonske sekrecije. Maksimalni nivo u ekspresiji insulina je bio na 7. danu nakon tretmana a do 12. dana je značajno opao i poklapa se sa padom u ekspresiji *Pax4*. U ovim ćelijama je detektovana pojačana ekspresija *MafA* na nivou iRNK što ukazuje na aktivnu ulogu PAX4 na ekspresiju *MafA*. (Zhang i sar., 2016). Sličan obrazac ekspresije je dobijen i u ovoj disertaciji gde je pokazano da je maksimalni nivo ekspresije iRNK za *Ins2* bio na 12. danu. Nakon povratka ekspresije *Arx*-a na početni nivo i ekspresija *Ins2* je krenula da opada. Promene u α TC1-6 ćelijama koje su nastale nakon targetovanog epigenetičkog editovanja se ne mogu posmatrati kao ćelijsko reprogramiranje već početkom transdiferencijacije s obzirom da specifični

markeri beta ćelija kao što su *Pdx1* ili *NeuroD1* nisu detektovani. Ovi faktori su već korišćeni za efikasno reprogramiranje različitih tipova ćelija u ćelije koje proizvode insulin u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Kalo i sar., 2022). Pored ova dva transkripciona faktora, nisu detektovane ni promene u ekspresiji iRNK za *Pax6*, *Pou3f4*, *Nkx2-2*, *Nkx6-1* i *Isl1* koji su takođe važni u definisanju i održavanju identiteta beta ćelija. Modifikacija epigenoma α TC1-6 ćelija koja je urađena za potrebe ove disertacije se može posmatrati kao polazna tačka za napredak ka ćelijskom reprogramiranju. Ovu tvrdnju dodatno podržavaju rezultati analize i poređenja transkriptoma NIT-1 i netransfekovanih sa transfekovanim α TC1-6 ćelijama. Iako je detektovano ukupno 623 diferencijalno eksprimiranih gena između Mock i EpiC transfekovanih ćelija, na osnovu njihovih transkripcionih profila može se zaključiti da su one i dalje veoma slične α TC1-6 ćelijama i da se u velikoj meri razlikuju od profila NIT-1 beta ćelijske linije.

Postoji puno podataka o obnavljanju mase beta ćelija ali se slabije zna o spoljašnjim signalima koji utiču na kontrolu identiteta i regulaciju mase alfa ćelija pankreasa. Lee i saradnici su predložili da u dijabetesu dolazi do pojave alfa ćelija koje su rezistentne na insulin (Lee i sar., 2014). Pojačana sekrecija glukagona koja je zabeležena kod pacijenata sa DT2 može da bude posledica smanjene inhibicije sekrecije zbog odsustva insulina ili usled povećanja mase alfa ćelija (Menge i sar., 2011). Jedan od mehanizama kojim se reguliše masa alfa ćelija pankreasa se ostvaruje utšavanjem ekspresije *Arx*-a. Nedavno je pokazano da FcoR povećava metilaciju *Arx*-a u beta ćelijama pankreasa i tako doprinosi represiji njegove ekspresije. Kada se FcoR ukloni iz beta ćelija, dolazi do njihove konverzije u alfa ćelije usled pokretanja ekspresije *Arx*-a. Rezultati ovih istraživanja ukazuju da je ekspresija FcoR izuzetno važna za održavanje identiteta alfa i beta ćelija endokrinog pankreasa. FcoR-Foxo1 osa utiče na regulaciju ekspresije *Arx*-a a samim tim i na masu alfa ćelija (Kodani i sar., 2020).

Analiza ekspresije glukagona za potrebe ove disertacije je pokazala da nije bilo značajnih promena između Mock i EpiC transfekovanih ćelija na 5. danu nakon transfekcije niti je uočena promena u prisustvu ovog hormona u ćelijama u odnosu na netransfekovane ćelije. Međutim, 5. i 7. dana nakon ciljane metilacije *Arx*-a, α TC1-6 ćelije su oslobađale manje glukagona u medijumu u kom su rasle. Gu i saradnici su 2021. godine objavili rezultate istraživanja u kojima su gajili u kokulturi α TC1-6 i MIN-6 ćelijske linije u odnosu 1:3 koji približno odgovara odnosu ovih tipova ćelija u Langerhansovom ostrvcu. Oni su pokazali da prisustvo alfa ćelija nije imalo nikakvih efekata na sekreciju insulina iz MIN-6 ćelija, dok kokultura ove dve ćelijske linije dovodi do smanjenja u sekreciji glukagona iz α TC1-6 ćelija. Zabeležen je i značajan pad u ekspresiji *Gcg*-a pri koncentraciji glukoze od 11,1 ili 25 mM, dok koncentracija od 5,5 mM nije imala nikakav efekat. Iako nije poznat mehanizam za ovu izmenu u nivou sekrecije glukagona, autori su predložili potencijalni mehanizam po kome beta ćelije suprimiraju sekreciju glukagona iz alfa ćelija zahvaljujući direktnom ćelijskom kontaktu koje se dešava i unutar ostrvaca (Gu i sar., 2021).

Kako bi se postigao veći stepen transdiferencijacije pankreatičnih alfa ćelija u ćelije koje su slične beta ćelijama neophodno je da se poboljša stabilnost supresije gena za *Arx*. Paralelno s tim, ćelijama bi trebalo obezbediti više vremena kako bi došlo do ekspresije gena specifičnih za beta ćelije a koji mogu da aktiviraju različite signalne puteve i uslove većeg stepena reprogramiranja. Ova istraživanja su potvrdila da tranzijentna transfekcija pankreatičnih α TC1-6 ćelija miša pomoću EpiCRISPR konstrukta dovodi do hipermetilacije promotora *Arx*-a i njegove supresije do 7 dana nakon transfekcije. Korišćenjem EpiCRISPR konstrukta došlo je do promene u metilacionom statusu promotora gena za *Arx* u mišijim alfa ćelijama pankreasa u *in vitro* uslovima nakon samo jedne tranzijentne nukleofekcije. Kao posledica toga došlo je do sinteze insulina koji je veći za 35% u odnosu na Mock transfekovane alfa ćelije. ***Epigenetičkim editovanjem samo jednog gena u alfa ćelijama dolazi do tranzijentne ekspresije, sinteze i oslobađanja insulina iz ovih ćelija.*** Povećanje

stabilnosti uvedenih epigenetičkih markera bi potencijalno moglo da se postigne višestrukim uzastopnim transfekcijama što bi moglo da dovede do izraženijeg efekta na supresiju ekspresije *Arx*-a (po analogiji sa tehnikom „produžene genske ekspresije“ koja se koristi za proizvodnju rekombinantnih proteina) (Cervera i sar., 2015).

Da bi se indukovalo potpuno reprogramiranje alfa ćelija, u nekim narednim eksperimentima bi trebalo omogućiti stabilnu i konstantnu ekspresiju transkripcionih faktora koji su specifični za beta ćelije. Collombat i saradnici su još 2003. godine po prvi put pokazali transdiferencijaciju alfa ćelija u beta ćelije do koje dolazi nakon pojačane ekspresije regulatornog proteina PAX4 (Collombat i sar., 2003). Kada se *Pax4* eksprimira u alfa ćelijama, to dovodi do obnavljanja funkcionalne mase beta ćelija pankreasa i do pozitivnih efekata kod dijabetičnih životinja kod kojih su beta ćelije prethodno bile uništene hemijskim putem (Collombat i sar., 2009). Indukovana ekspresija transkripcionih faktora kao što su PDX1 i MAFA u humanim alfa ćelijama dovodi do njihove efikasne konverzije u ćelije koje proizvode i oslobađaju insulin, pri čemu zadržavaju i markere alfa ćelija. Nakon transplantacije takvih ćelija u dijabetične miševе dolazi do velikog stepena poboljšanja hiperglikemijskog stanja i uvođenja u normoglikemiju (Furuyama i sar., 2019). Godine 2018. Cigliola je sa saradnicima pokazala da su adaptivne promene identiteta alfa ćelija unutar ostrvca ograničene lokalnim insulinskim i SmoHh (engl. *Smoothened mediated Hedgehog (Hh) signaling*) signalnim putevima koji su pokrenuti u susednim beta i delta ćelijama. Gubitak beta ćelija i inhibicija signalnih puteva koji se pokreću u odgovoru na insulin u kombinaciji sa inhibiranim signalnim putevima koje pokreće SmoHh u alfa ćelijama stimuliše alfa ćelije da proizvoide insulin (Cigliola i sar., 2018). Čak i nakon gašenja ove dvojne regulacije, diferencijacija identiteta alfa ćelija se dešava samo delimično što ukazuje na postojanje sinergističkog efekta većeg broja signala koji ograničavaju konverziju ćelijskog identiteta. Stoga bi drugi pristup za povećanje stepena transdiferencijacije pankreatičnih alfa ćelija u ćelije koje su slične beta ćelijama podrazumevao targetovanu supresiju *Arx*-a i aktivaciju *Pax4* (ili nekog drugog transkripcionog regulatora beta ćelija) u alfa ćelijama koji bi potencijalno mogao da dovede do pojačane sinteze insulina i kompletnog reprogramiranja transfekovanih alfa ćelija. Rezultati brojnih istraživanja su pokazali da transkripcioni faktori koji su eksprimirani u beta ćelijama kao što su PDX1, NKX6.1, NKX2-2 i PAX6 imaju direktnu ulogu u represiji gena koji nisu specifični za beta ćelije (Gao i sar., 2014; Gauthier i sar., 2007; Papizan i sar., 2011; Swisa i sar., 2017). Ova i brojna druga istraživanja sugerišu na postojanje ključnih „kočionih signala“ koji treba da se uklone kako bi se neutralizovala otpornost prema adaptivnim promenama ćelijskog identiteta. Stoga se održavanje ćelijskog identiteta posmatra kao aktivan proces koji se održava pomoću parakrinih represivnih signala oslobođenih iz susednih ćelija a koji sputavaju unutrašnju tendenciju za promene u diferenciranim ćelijama (Cigliola i sar., 2018). Efekat potencijalnog povećanja u sintezi i sekreciji insulina iz EpiC α TC1-6 transfekovanih ćelija na hiperglikemijski status bi trebalo da bude utvrđen i ispitivan u *in vivo* uslovima kod dijabetičnih životinja.

Postoje brojni literaturni podaci iz kojih se može zaključiti da je za transdiferencijaciju ćelija koje nisu poreklom iz pankreasa kao i za egzokrine ćelije pankreasa potreban veći broj transkripcionih faktora da bi se inicirala promena identiteta, a da su te promene spore i slabo efikasne. Sa druge strane, za reprogramiranje alfa ili delta ćelija endokrinog pankreasa dovoljan je samo jedan transkripcioni faktor ili uklanjanje najvećeg broja beta ćelija iz ostrvca (Collombat i sar., 2009; Courtney i sar., 2013). Iz toga se može zaključiti da ćelije endokrinog pankreasa lakše podležu promenama, a da na globalnom nivou razlog za to treba tražiti u epigenetičkoj sličnosti između različitih ali razvojno bliskih i povezanih tipova ćelija (Xie i sar., 2015). Bivalentno obeleženi geni u alfa ćelijama mogu da budu odgovorni za visok nivo plastičnosti jer tako obeleženi oni čekaju odgovarajući stimulus i spremni su za aktivaciju u svakom trenutku. S obzirom da alfa ćelije imaju veću plastičnost ka fenotipu beta ćelija u

odnosu na ćelije egzokrinog pankreasa (jer nose manje bivalentno obeleženih gena koji su specifični za beta ćelije), profil histonske metilacije se može posmatrati kao indikator plastičnosti ćelija (Xie i sar., 2015). Analiza otvorenih struktura hromatina je pokazala da postoji veća razlika između otvorenih regiona endokrinih i egzokrinih ćelija pankreasa u odnosu na razliku između samih endokrinih ćelija. To može da bude razlog za postojanje različitog praga za konverziju između ćelijskih tipova pankreasa koji se uspostavlja hromatinskom strukturom u toku razvoja i ćelijske diferencijacije (Arda i sar., 2018).

Molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi transdiferencijacije ćelija pankreasa još uvek nisu u potpunosti poznati. Istraživanja u drugim sistemima ukazuju na to da hromatinske strukture imaju glavnu ulogu u određivanju uspešnosti ishoda reprogramiranja (Soufi i sar., 2012; Xu i sar., 2011). U prilog ovome govore i rezultati koji su dobijeni iz alfa ćelija u kojima je isključen jedan od enzima za modifikaciju epigenetičkih markera kao što je DNMT1 što za posledicu ima njihovu transdiferencijaciju (Chakravarthy i sar., 2017; Dhawan i sar., 2011). Takođe, inhibicija DNMT enzima u progenitorskim ćelijama pankreasa promovira specifikaciju alfa ćelija, dok prekomerna ekspresija DNMT1 favorizuje specifikaciju beta ćelijske linije (Liu i sar., 2019). Međutim, postoje dokazi koji govore o tome da geni koji su diferencijalno ekspimirani u alfa odn. u beta ćelijama imaju iste otvorene hromatinske regione, a koji su različiti od egzokrinih ćelija. To sugeriše na aktivnost različitih kombinacija pojačavača nakon diverzifikacije endokrinih odn. egzokrinih ćelija pankreasa (Arda i sar., 2018).

U okviru ove disertacije zabeleženo je da se nivo ekspresije *Arx*-a nakon indukovanog utišavanja posle sedam dana vratio na početni nivo iako je metilacija promotora bila slična nivou u NIT-1 beta ćelijskoj liniji. Ovo ukazuje da u ćeliji postoje dodatni regulatorni regioni koji kontrolišu ekspresiju *Arx*-a u alfa ćelijama i vraćaju je i zadržavaju na početni nivo, a koji bi trebalo da budu dodatna meta za targetovanje u cilju reprogramiranja. U prilog ovome govore rezultati istraživanja otvorene strukture hromatina po kojima u ćeliji postoje višestruki regulatorni regioni koju utiču na ekspresiju gena a koji su specifični za alfa ili beta ćelije humanog pankreasa (Arda i sar., 2018). Pa tako, pored specifičnog obrasca genske ekspresije koji je posledica heterogenosti u epigenomu endokrinih ćelija pankreasa, postoji i dodatni nivo regulacije ekspresije koji je zajednički za ove tipove ćelija, a odnosi se na gene koji su uključeni u proizvodnju hormona kao i signalne puteve aktivirane stresom (Chiou i sar., 2021).

Primenom sintetičke biologije iz koje je proistekao alat za editovanje epigenoma bez promena u primarnoj DNK sekvenci a inspirisano prirodnim fenomenom promene identiteta terminalno diferenciranih ćelija izdvojila se fokusirana tehnologija i novi pravac u razvoju tretmana i ublažavanja simptoma dijabetesa. U ovoj fazi istraživanja se može reći da je indukovana metilacija na promotorskom delu gena za *Arx* u α TC1-6 ćelijama u jednom koraku dovoljna da dovede do tranzijentne represije *Arx*-a i pokretanja sinteze insulina i jednog dela ključnih regulatora transkripcije za beta ćelije. Međutim ovakva izmena epigenoma nije dovela do njihovog potpunog reprogramiranja u beta ćelije. Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su potvrdili koncept dirigovane ćelijske transdiferencijacije usled epigenetičkih modifikacija. Ovi rezultati predstavljaju još jednu kariku u razjašnjavanju mehanizama koji leže u osnovi transdiferencijacije alfa ćelija pankreasa u ćelije koje proizvode insulin i pružaju osnovu za buduća istraživanja i primenu u in vivo sistemu.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ekspreimenata urađenih u okviru ove doktorske disertacije, dobijeni i prikazani rezultati upućuju na sledeće zaključke:

1. Čelijska linija alfa ćelija pankreasa miša α TC1-6 je dobar model sistem za ispitivanje sposobnosti promene ćelijskog identiteta uvođenjem epigenetičkih modifikacija.
2. Efikasnost transfekcije α TC1-6 ćelija se razlikuje u zavisnosti od primenjene metode što je zaključeno na osnovu sledećeg:
 - transfekcija α TC1-6 ćelija pomoću PEI-ja nema negativnih efekata na preživljavanje ćelija ali daje nisku efikasnost
 - efikasnost nukleofekcije zavisi od pufera za nukleofekciju, električnog pulsa, broja ćelija, količine i veličine plazmida, nivoa jona Ca^{2+} u medijumu nakon električnog pulsa
 - nukleofekcija α TC1-6 ćelija pomoću CM-156 pulsa u SF puferu pruža visoku efikasnost transfekcije i nisku citotoksičnost α TC1-6 ćelija
3. Epigenetički pejzaž (metilacija molekula DNK i histonske modifikacije H3K4me3 i H3K9me3) promotora *Arx*-a odgovara funkcionalnoj genskoj ekspresiji u α TC1-6 ćelijama i odsustvu ekspresije u NIT-1 ćelijama.
4. Uvedena ciljana metilacija *Arx* gena dovodi do vremenski ograničene, duplo smanjene ekspresije nivoa iRNK, koja se vraća na početni nivo 12 dana nakon transfekcije.
5. Prolazno smanjenje ekspresije *Arx*-a dovoljno je za pokretanje procesa transdiferencijacije α TC1-6 ćelija u ćelije koje proizvode insulin. 1% tranzijentno transfekovanih ćelija proizvodi 35% više insulina u odnosu na lažno transfekovane ćelije. Insulin je detektovan na nivou iRNK i proteina unutar i van ćelija do 15 dana nakon transfekcije.
6. Transkripcioni profil epigenetički modifikovanih α TC1-6 ćelija je sličniji profilu alfa nego beta ćelija:
 - U ovim ćelijama je pokrenuta ekspresija transkripcionih faktora specifičnih za beta ćelije kao što su *Pax4* i *MafA*, kao i ekspresija glukoznog transportera *Slc2a2*. Nisu detektovane promene u ekspresiji sledećih gena: *Pax6*, *Pou3f4*, *NeuroD1*, *Nkx2-2*, *Nkx6-1* i *Isl1*.
 - Nekoliko gena od 357 pojačano eksprimiranih na 5. danu nakon transfekcije su u vezi sa više signalnih puteva koji imaju ključnu ulogu u dijabetesu tipa 2 i insulinskoj sekreciji, dok su neki od 266 sniženo eksprimiranih gena u vezi sa biosintezom i metabolizmom nezasićenih masnih kiselina po KEGG bazi bioloških puteva.
7. α TC1-6 ćelije koje proizvode insulin oslobađaju manje glukagona iako ne pokazuju promene u ekspresiji iRNK za *Gcg*.
8. Izneti zaključci o efektu prolazno uvedene metilacije *Arx*-a potvrđuju značaj stabilnosti epigenetičkih modifikacija u očuvanju/promeni ćelijskog identiteta i pružaju dobru osnovu za dalju primenu epigenetičkih alata u cilju ćelijskog reprogramiranja.

7. LITERATURA

- Ackermann, A.M., and Gannon, M. (2007) Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *Journal of Molecular Endocrinology* 38 (1-2), 193-206.
- Ackermann, A.M., Moss, N.G., and Kaestner, K.H. (2018) GABA and Artesunate Do Not Induce Pancreatic α -to- β Cell Transdifferentiation In Vivo. *Cell metabolism* 28(5), 787-792.e783.
- Ahrén, B. (2015) Glucagon – Early breakthroughs and recent discoveries. *Peptides* 67, 74-81.
- Aigha, I.I., and Abdelalim, E.M. (2020) NKX6.1 transcription factor: a crucial regulator of pancreatic β cell development, identity, and proliferation. *Stem Cell Research & Therapy* 11(1), 459.
- Alejandra, G.C., Lucia, C., Ho, H.S., Luis, G., Juan, R.P., and Federico, P.-B. (2020) Activation of pancreatic β -cell genes by multiplex epigenetic CRISPR-editing. p. 214544. 10.1101/2020.07.24.214544%JbioRxiv
- Amabile, A., Migliara, A., Capasso, P., Biffi, M., Cittaro, D., Naldini, L., and Lombardo, A. (2016) Inheritable Silencing of Endogenous Genes by Hit-and-Run Targeted Epigenetic Editing. *Cell* 167(1), 219-232.
- Arda, H.E., Tsai, J., Rosli, Y.R., Giresi, P., Bottino, R., Greenleaf, W.J., Chang, H.Y., and Kim, S.K. (2018) A Chromatin Basis for Cell Lineage and Disease Risk in the Human Pancreas. *Cell Systems* 7(3), 310-322.
- Ariyachet, C., Tovaglieri, A., Xiang, G., Lu, J., Shah, M.S., Richmond, C.A., Verbeke, C., Melton, D.A., Stanger, B.Z., Mooney, D., *et al.* (2016) Reprogrammed Stomach Tissue as a Renewable Source of Functional β Cells for Blood Glucose Regulation. *Cell stem cell* 18(3), 410-421.
- Artner, I., Le Lay, J., Hang, Y., Elghazi, L., Schisler, J.C., Henderson, E., Sosa-Pineda, B., and Stein, R. (2006) MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells. *Diabetes* 55(2), 297-304.
- American Diabetes Association. (2013) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 37 Supl 1, S81-S90.
- American Diabetes Association Professional Practice Committee (2022). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes care*, 45 (Suppl 1), S17-S38.
- Babaya, N., Nakayama, M., Moriyama, H., Gianani, R., Still, T., Miao, D., Yu, L., Hutton, J.C., and Eisenbarth, G.S. (2006) A new model of insulin-deficient diabetes: male NOD mice with a single copy of Ins1 and no Ins2. *Diabetologia* 49(6), 1222-1228.
- Bae, J.-S., Kim, T.-H., Kim, M.-Y., Park, J.-M., and Ahn, Y.-H. (2010) Transcriptional Regulation of Glucose Sensors in Pancreatic β -Cells and Liver: An Update. *Sensors* 10, 5031-5053.
- Barker, C.J., Leibiger, I.B., and Berggren, P.O. (2013) The pancreatic islet as a signaling hub. *Advances in Biological Regulation* 53(1), 156-163.
- Barrangou, R., and Marraffini, L.A. (2014) CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell* 54(2), 234-244.
- Basile, G., Qadir, M.M.F., Mauvais-Jarvis, F., Vetere, A., Shoba, V., Modell, A.E., Pastori, R.L., Russ, H.A., Wagner, B.K., and Dominguez-Bendala, J. (2022) Emerging diabetes therapies: Bringing back the β -cells. *Molecular Metabolism* 60, 101477.
- Batut, I.z.j.z.S.D.M.J. (2021) Registar za dijabetes u Srbiji, 2021.

- Baumel-Alterzon, S., and Scott, D.K. (2022) Regulation of Pdx1 by oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cells. *Frontiers in Endocrinology* 13.
- Bending, D., Zacccone, P., and Cooke, A. (2012) Inflammation and type one diabetes. *International Immunology* 24(6), 339-346.
- Benner, C., van der Meulen, T., Cacéres, E., Tigyi, K., Donaldson, C.J., and Huising, M.O. (2014) The transcriptional landscape of mouse beta cells compared to human beta cells reveals notable species differences in long non-coding RNA and protein-coding gene expression. *BMC genomics* 15(1), 620.
- Bennett, P.H., and Knowler, W. (2005) Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus and glucose homeostasis. *Joslin's Diabetes mellitus* 14, 331-339.
- Berger, C., and Zdzienbło, D. (2020) Glucose transporters in pancreatic islets. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 472(9), 1249-1272.
- Bernstein, B.E., Meissner, A., and Lander, E.S. (2007) The mammalian epigenome. *Cell* 128(4), 669-681.
- Bessis, N., GarciaCozar, F.J., and Boissier, M.C. (2004) Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Therapy* 11 Suppl 1, S10-S17.
- Beyerlein, A., Donnachie, E., Jergens, S., and Ziegler, A.-G. (2016) Infections in Early Life and Development of Type 1 Diabetes. *JAMA* 315, 1899-1901.
- Bohuslavova, R., Fabriciova, V., Lebrón-Mora, L., Malfatti, J., Smolik, O., Valihrach, L., Benesova, S., Zucha, D., Berkova, Z., Saudek, F., *et al.* (2023) ISL1 controls pancreatic alpha cell fate and beta cell maturation. *Cell & Bioscience* 13(1), 023-01003.
- Borowiak, M., and Melton, D.A. (2009) How to make beta cells? *Current opinion in cell biology* 21(6), 727-732.
- Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y.D., Giovannoni, L., Parnaud, G., and Berney, T. (2010) Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes* 59(5), 1202-1210.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(16), 7297-7301.
- Bramswig, N.C., Everett, L.J., Schug, J., Dorrell, C., Liu, C., Luo, Y., Streeter, P.R., Naji, A., Grompe, M., and Kaestner, K.H. (2013) Epigenomic plasticity enables human pancreatic α to β cell reprogramming. *The Journal of clinical investigation* 123(3), 1275-1284.
- Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A.J., Socci, N.D., and Scandura, J.M. (2011) DNA Methylation of the First Exon Is Tightly Linked to Transcriptional Silencing. *PloS one* 6(1), e14524.
- Brevini, T.A.L., Pennarossa, G., Manzoni, E.F.M., & Gandolfi, F. (2018) Safety and Efficacy of Epigenetically Converted Human Fibroblasts Into Insulin-Secreting Cells: A Preclinical Study. *Advances in experimental medicine and biology* 1079, 151-162.
- Bru-Tari, E., Cobo-Vuilleumier, N., Alonso-Magdalena, P., Dos Santos, R.S., Marroqui, L., Nadal, A., Gauthier, B.R., and Quesada, I. (2019) Pancreatic alpha-cell mass in the early-onset and advanced stage of a mouse model of experimental autoimmune diabetes. *Scientific Reports* 9(1), 9515.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52(1), 102-110.

- Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.O., and Caicedo, A. (2006) The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(7), 2334-2339.
- Capecchi, M.R. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244(4910), 1288-1292.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., *et al.* (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7(5), 335-336.
- Carnegie, J.R., Robert-Cooperman, C.E., Wu, J., Young, R.A., Wolf, B.A., & Burkhardt, B.R. (2010) Characterization of the expression, localization, and secretion of PANDER in alpha-cells. *Molecular and cellular endocrinology* 325(1-2), 36-45
- Cervera, L., Gutiérrez-Granados, S., Berrow, N.S., Segura, M.M., and Gòdia, F. (2015) Extended gene expression by medium exchange and repeated transient transfection for recombinant protein production enhancement. *Biotechnology and bioengineering* 112(5), 934-946.
- Chakravarthy, H., Gu, X., Enge, M., Dai, X., Wang, Y., Damond, N., Downie, C., Liu, K., Wang, J., Xing, Y., *et al.* (2017) Converting Adult Pancreatic Islet α Cells into β Cells by Targeting Both Dnmt1 and Arx. *Cell metabolism* 25(3), 622-634.
- Chavez, A., Scheiman, J., Vora, S., Pruitt, B.W., Tuttle, M., P R Iyer, E., Lin, S., Kiani, S., Guzman, C.D., Wiegand, D.J., *et al.* (2015) Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature Methods* 12(4), 326-328.
- Chen, B., Gilbert, L.A., Cimini, B.A., Schnitzbauer, J., Zhang, W., Li, G.W., Park, J., Blackburn, E.H., Weissman, J.S., Qi, L.S., *et al.* (2013) Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* 155(7), 1479-1491.
- Chen, K., Jiang, S., Hong, Y., Li, Z., Wu, Y.-L., and Wu, C. (2019) Cationic polymeric nanoformulation: Recent advances in material design for CRISPR/Cas9 gene therapy. *Progress in Natural Science: Materials International* 29(6), 617-627.
- Chen, S., Du, K., and Zou, C. (2020) Current progress in stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Stem Cell Research & Therapy* 11(1), 275.
- Chen, X., Zhang, X., Kubo, H., Harris, D.M., Mills, G.D., Moyer, J., Berretta, R., Potts, S.T., Marsh, J.D., and Houser, S.R. (2005) Ca^{2+} influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes. *Circulation research* 97(10), 1009-1017.
- Chen, Y.-J., Finkbeiner, Stacy R., Weinblatt, D., Emmett, Matthew J., Tameire, F., Yousefi, M., Yang, C., Maehr, R., Zhou, Q., Shemer, R., *et al.* (2014) De Novo Formation of Insulin-Producing “Neo- β Cell Islets” from Intestinal Crypts. *Cell Reports* 6(6), 1046-1058.
- Cheng, A.W., Wang, H., Yang, H., Shi, L., Katz, Y., Theunissen, T.W., Rangarajan, S., Shivalila, C.S., Dadon, D.B., and Jaenisch, R. (2013) Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Research* 23(10), 1163-1171.
- Chera, S., Baronnier, D., Ghila, L., Cigliola, V., Jensen, J.N., Gu, G., Furuyama, K., Thorel, F., Gribble, F.M., Reimann, F., *et al.* (2014) Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic δ -cells into insulin producers. *Nature* 514(7523), 503-507.
- Chicaybam, L., Barcelos, C., Peixoto, B., Carneiro, M., Limia, C.G., Redondo, P., Lira, C., Paraguassú-Braga, F., Vasconcelos, Z.F., Barros, L., *et al.* (2017) An Efficient

Electroporation Protocol for the Genetic Modification of Mammalian Cells. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 4, 99.

- Chiou, J., Zeng, C., Cheng, Z., Han, J.Y., Schlichting, M., Miller, M., Mendez, R., Huang, S., Wang, J., Sui, Y., *et al.* (2021) Single-cell chromatin accessibility identifies pancreatic islet cell type- and state-specific regulatory programs of diabetes risk. *Nature Genetics* 53(4), 455-466.
- Chong, Z.X., Yeap, S.K., and Ho, W.Y. (2021) Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ* 9, e11165-e11165.
- Chopra, S., Ruzgys, P., Maciulevičius, M., Jakutavičiūtė, M., and Šatkauskas, S. (2020) Investigation of Plasmid DNA Delivery and Cell Viability Dynamics for Optimal Cell Electrotransfection In Vitro. *Applied Sciences* 10(17), 6070.
- Choudhury, S.R., Cui, Y., Lubecka, K., Stefanska, B., and Irudayaraj, J. (2016) CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget* 7(29), 46545-46556.
- Chung, C.-H., Hao, E., Piran, R., Keinan, E., and Levine, F. (2010) Pancreatic β -Cell Neogenesis by Direct Conversion from Mature α -Cells. *Stem Cells* 28, 1630-1638.
- Cieślak-Pobuda, A., Knoflach, V., Ringh, M.V., Stark, J., Likus, W., Siemianowicz, K., Ghavami, S., Hudecki, A., Green, J.L., and Łos, M.J. (2017) Transdifferentiation and reprogramming: Overview of the processes, their similarities and differences. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1864(7), 1359-1369.
- Cigliola, V., Ghila, L., Thorel, F., van Gurp, L., Baronnier, D., Oropeza, D., Gupta, S., Miyatsuka, T., Kaneto, H., Magnuson, M.A., *et al.* (2018) Pancreatic islet-autonomous insulin and smoothed-mediated signalling modulate identity changes of glucagon+ α -cells. *Nature cell biology* 20(11), 1267-1277.
- Colarusso, J.L., and Zhou, Q. (2022) Direct Reprogramming of Different Cell Lineages into Pancreatic β -Like Cells. *Cellular Reprogramming* 24(5), 252-258.
- Collombat, P., Hecksher-Sørensen, J., Broccoli, V., Krull, J., Ponte, I., Mundiger, T., Smith, J., Gruss, P., Serup, P., & Mansouri, A. (2005) The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development (Cambridge, England)* 132(13), 2969-2980.
- Collombat, P., Hecksher-Sørensen, J., Krull, J., Berger, J., Riedel, D., Herrera, P.L., Serup, P., and Mansouri, A. (2007) Embryonic endocrine pancreas and mature β cells acquire α and PP cell phenotypes upon Arx misexpression. *The Journal of Clinical Investigation* 117, 961-970.
- Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sorensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G., and Gruss, P. (2003) Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes & development* 17(20), 2591-2603.
- Collombat, P., Xu, X., Ravassard, P., Sosa-Pineda, B., Dussaud, S., Billestrup, N., Madsen, O.D., Serup, P., Heimberg, H., and Mansouri, A. (2009) The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell* 138(3), 449-462.
- Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., *et al.* (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339(6121), 819-823.
- Cornell, S. (2015) Continual evolution of type 2 diabetes: an update on pathophysiology and emerging treatment options. *Therapeutics and clinical risk management* 11, 621-632.

- Courtney, M., Gjernes, E., Druelle, N., Ravaud, C., Vieira, A., Ben-Othman, N., Pfeifer, A., Avolio, F., Leuckx, G., Lacas-Gervais, S., *et al.* (2013) The Inactivation of Arx in Pancreatic α -Cells Triggers Their Neogenesis and Conversion into Functional β -Like Cells. *PLoS Genetics* 9(10), e1003934.
- Courtney, M., Rabe, T., Collombat, P., and Mansouri, A. (2014) Pax4 and Arx Represent Crucial Regulators of the Development of the Endocrine Pancreas. *New Journal of Science* 2014, 981569.
- de Groote, M.L., Verschure, P.J., and Rots, M.G. (2012) Epigenetic Editing: targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes. *Nucleic acids research* 40(21), 10596-10613.
- Dean, E.D., Li, M., Prasad, N., Wisniewski, S.N., Von Deylen, A., Spaeth, J., Maddison, L., Botros, A., Sedgeman, L.R., Bozadjieva, N., *et al.* (2017) Interrupted Glucagon Signaling Reveals Hepatic α Cell Axis and Role for L-Glutamine in α Cell Proliferation. *Cell metabolism* 25(6), 1362-1373.
- Deltour, L., Vandamme, J., Jouvenot, Y., Duvill  , B., Kelemen, K., Schaerly, P., Jami, J., and Paldi, A. (2004) Differential expression and imprinting status of Ins1 and Ins2 genes in extraembryonic tissues of laboratory mice. *Gene expression patterns: GEP* 5(2), 297-300.
- Dhawan, S., Georgia, S., Tschen, S.I., Fan, G., and Bhushan, A. (2011) Pancreatic β cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of Arx. *Developmental cell* 20(4), 419-429.
- Dholakia, S., Mittal, S., Quiroga, I., Gilbert, J., Sharples, E.J., Ploeg, R.J., and Friend, P.J. (2016) Pancreas Transplantation: Past, Present, Future. *The American journal of medicine* 129(7), 667-673.
- Docherty, F.M., and Russ, H.A. (2019) Cell-Cell Interactions Driving Differentiation of Adult Pancreatic Stem Cells. In *Encyclopedia of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, R.L. Reis, ed. (Oxford: Academic Press), pp. 367-374.
- Donath, M.Y., and Halban, P.A. (2004) Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 47(3), 581-589.
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., and Melton, D.A. (2004) Adult pancreatic β -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429(6987), 41-46.
- Dorrell, C., Schug, J., Lin, C.F., Canaday, P.S., Fox, A.J., Smirnova, O., Bonnah, R., Streeter, P.R., Stoeckert, C.J., Jr., Kaestner, K.H., *et al.* (2011) Transcriptomes of the major human pancreatic cell types. *Diabetologia* 54(11), 2832-2844.
- Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346(6213), 1258096.
- Doyle, M.J., and Sussel, L. (2007) Nkx2.2 regulates beta-cell function in the mature islet. *Diabetes* 56(8), 1999-2007.
- Dyachok, O., and Gylfe, E. (2004) Ca(2+)-induced Ca(2+) release via inositol 1,4,5-trisphosphate receptors is amplified by protein kinase A and triggers exocytosis in pancreatic beta-cells. *The Journal of biological chemistry* 279(44), 45455-45461.
- Edlund, H. (2002) Pancreatic organogenesis — developmental mechanisms and implications for therapy. *Nature Reviews Genetics* 3, 524-532.
- Ewels, P.A., Peltzer, A., Fillinger, S., Patel, H., Alneberg, J., Wilm, A., Garcia, M.U., Di Tommaso, P., and Nahnsen, S. (2020) The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nature biotechnology* 38(3), 276-278.

- Fakiruddin, K.S., Baharuddin, P., Lim, M.N., Fakharuzi, N.A., Yusof, N.A.N.M., and Zakaria, Z. (2014) Nucleofection optimization and in vitro anti-tumourigenic effect of TRAIL-expressing human adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Cancer cell international* 14(1), 122.
- Ferber, S., Halkin, A., Cohen, H., Ber, I., Einav, Y., Goldberg, I., Barshack, I., Seijffers, R., Kopolovic, J., Kaiser, N., *et al.* (2000) Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nature Medicine* 6(5), 568-572.
- Friocourt, G., and Parnavelas, J.G. (2010) Mutations in ARX Result in Several Defects Involving GABAergic Neurons. *Frontiers in cellular neuroscience* 4, 4.
- Fukunaka, A., and Fujitani, Y. (2018) Role of Zinc Homeostasis in the Pathogenesis of Diabetes and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences* 19(2), 476.
- Furuyama, K., Chera, S., van Gurp, L., Oropeza, D., Ghila, L., Damond, N., Vethe, H., Paulo, J.A., Joosten, A.M., Berney, T., *et al.* (2019) Diabetes relief in mice by glucose-sensing insulin-secreting human α -cells. *Nature* 567(7746), 43-48.
- Fus-Kujawa, A., Prus, P., Bajdak-Rusinek, K., Teper, P., Gawron, K., Kowalczyk, A., and Sieron, A.L. (2021) An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 9, 701031.
- Gao, T., McKenna, B., Li, C., Reichert, M., Nguyen, J., Singh, T., Yang, C., Pannikar, A., Doliba, N., Zhang, T., *et al.* (2014) Pdx1 maintains β cell identity and function by repressing an α cell program. *Cell metabolism* 19(2), 259-271.
- Gauthier, B.R., Gosmain, Y., Mamin, A., and Philippe, J. (2007) The beta-cell specific transcription factor Nkx6.1 inhibits glucagon gene transcription by interfering with Pax6. *The Biochemical journal* 403(3), 593-601.
- Ghoneim, M.A., Refaie, A.F., Elbassiouny, B.L., Gabr, M.M., and Zakaria, M.M. (2020) From Mesenchymal Stromal/Stem Cells to Insulin-Producing Cells: Progress and Challenges. *Stem cell reviews and reports* 16(6), 1156-1172.
- Gjaltema, R.A.F., and Rots, M.G. (2020) Advances of epigenetic editing. *Current opinion in chemical biology* 57, 75-81.
- Glover, D.J., Lipps, H.J., and Jans, D.A. (2005) Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nature reviews. Genetics* 6(4), 299-310.
- Goell, J.H., and Hilton, I.B. (2021) CRISPR/Cas-Based Epigenome Editing: Advances, Applications, and Clinical Utility. *Trends in Biotechnology* 39(7), 678-691.
- Goldberg, A.D., Allis, C.D., and Bernstein, E. (2007) Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* 128(4), 635-638.
- Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry* 74, 481-514.
- González-Domínguez, I., Grimaldi, N., Cervera, L., Ventosa, N., and Gòdia, F. (2019) Impact of physicochemical properties of DNA/PEI complexes on transient transfection of mammalian cells. *New biotechnology* 49, 88-97.
- Gosmain, Y., Katz, L.S., Masson, M.H., Cheyssac, C., Poisson, C., and Philippe, J. (2012) Pax6 is crucial for β -cell function, insulin biosynthesis, and glucose-induced insulin secretion. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 26(4), 696-709.
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., and Guillemot, F. (2000) neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(4), 1607-1611.

- Gromada, J., Chabosseau, P., and Rutter, G.A. (2018) The α -cell in diabetes mellitus. *Nature reviews. Endocrinology* 14(12), 694-704.
- Groner, A.C., Meylan, S., Ciuffi, A., Zangger, N., Ambrosini, G., Dénervaud, N., Bucher, P., and Trono, D. (2010) KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS genetics* 6(3), 1000869.
- Gu, W., Anker, C.C.B., Christiansen, C.B., Moede, T., Berggren, P.O., Hermansen, K., Gregersen, S., and Jeppesen, P.B. (2021) Pancreatic β Cells Inhibit Glucagon Secretion from α Cells: An In Vitro Demonstration of α - β Cell Interaction. *Nutrients* 13(7), 2281.
- Gu, Z., Eils, R., and Schlesner, M. (2016) Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 32(18), 2847-2849.
- Guo, P., Zhang, T., Lu, A., Shiota, C., Huard, M., Whitney, K.E., and Huard, J. (2023) Specific reprogramming of alpha cells to insulin-producing cells by short glucagon promoter-driven Pdx1 and MafA. *Molecular therapy. Methods & clinical development* 28, 355-365.
- Guo, Z., Zhang, L., Wu, Z., Chen, Y., Wang, F., and Chen, G. (2014) In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell stem cell* 14(2), 188-202.
- Habener, J.F., and Stanojevic, V. (2012) α -cell role in β -cell generation and regeneration. *Islets* 4(3), 188-198.
- Han, X., Fang, Q., Yao, F., Wang, X., Wang, J., Yang, S., and Shen, B.Q. (2009) The heterogeneous nature of polyethylenimine-DNA complex formation affects transient gene expression. *Cytotechnology* 60(1-3), 63-63.
- Heerboth, S., Lapinska, K., Snyder, N., Leary, M., Rollinson, S., and Sarkar, S. (2014) Use of epigenetic drugs in disease: an overview. *Genetics & epigenetics* 6, 9-19.
- Heigwer F, Kerr G, Boutros M. (2014) E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nature methods* 11(2):122-123
- Henquin, J.-C. (2011) The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β -cells. *Diabetes Research and Clinical Practice* 93, S27-S31.
- Herrera, P.L., Huarte, J., Sanvito, F., Meda, P., Orci, L., and Vassalli, J.D. (1991) Embryogenesis of the murine endocrine pancreas; early expression of pancreatic polypeptide gene. *Development (Cambridge, England)* 113(4), 1257-1265.
- Hickey, R.D., Galivo, F., Schug, J., Brehm, M.A., Haft, A., Wang, Y., Benedetti, E., Gu, G., Magnuson, M.A., Shultz, L.D., et al. (2013) Generation of islet-like cells from mouse gall bladder by direct ex vivo reprogramming. *Stem Cell Research* 11(1), 503-515.
- Hilton, I.B., D'Ippolito, A.M., Vockley, C.M., Thakore, P.I., Crawford, G.E., Reddy, T.E., and Gersbach, C.A. (2015) Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology* 33(5), 510-517.
- Hohenstein, K.A., Pyle, A.D., Chern, J.Y., Lock, L.F., and Donovan, P.J. (2008) Nucleofection mediates high-efficiency stable gene knockdown and transgene expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26(6), 1436-1443.
- Holmberg, J., and Perlmann, T. (2012) Maintaining differentiated cellular identity. *Nature reviews. Genetics* 13(6), 429-439.
- Hsu, P.D., Lander, E.S., and Zhang, F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157(6), 1262-1278.
- Hu, B., Zou, Y., Zhang, L., Tang, J., Niedermann, G., Firat, E., Huang, X., and Zhu, X.J.H.g.t. (2019) Nucleofection with plasmid DNA for CRISPR/Cas9-mediated inactivation of

- programmed cell death protein 1 in CD133-specific CAR T cells. *Human gene therapy*, 30(4), 446–458.
- Hussain, M.A., Miller, C.P., and Habener, J.F. (2002) Brn-4 transcription factor expression targeted to the early developing mouse pancreas induces ectopic glucagon gene expression in insulin-producing beta cells. *Journal of Biological Chemistry* 277(18), 16028-16032.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology* 169(12), 5429-5433.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., and Edlund, H. (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371(6498), 606-609.
- Jurkowski, T.P., Ravichandran, M., and Stepper, P. (2015) Synthetic epigenetics—towards intelligent control of epigenetic states and cell identity. *Clinical Epigenetics* 7, 18.
- Kalo, E., Read, S., and Ahlenstiel, G. (2022) Reprogramming-Evolving Path to Functional Surrogate β -Cells. *Cells* 11(18).
- Kalra, R.S., Dhanjal, J.K., Das, M., Singh, B., and Naithani, R. (2021) Cell Transdifferentiation and Reprogramming in Disease Modeling: Insights into the Neuronal and Cardiac Disease Models and Current Translational Strategies. *Cells* 10(10).
- Kaneko, K., Ueki, K., Takahashi, N., Hashimoto, S., Okamoto, M., Awazawa, M., Okazaki, Y., Ohsugi, M., Inabe, K., Umehara, T., *et al.* (2010) Class IA phosphatidylinositol 3-kinase in pancreatic β cells controls insulin secretion by multiple mechanisms. *Cell metabolism* 12, 619-632.
- Karpińska, M., and Czauderna, M. (2022) Pancreas—Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism. *Frontiers in Physiology* 13, 807632.
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B.J., Jacobsen, L.M., Schatz, D.A., and Lernmark, Å. (2017) Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews. Disease Primers* 3, 17016.
- Kearns, N.A., Pham, H., Tabak, B., Genga, R.M., Silverstein, N.J., Garber, M., and Maehr, R. (2015) Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nature methods* 12(5), 401-403.
- Keith, M.B., Farrell, P.J., Iatrou, K., and Behie, L.A. (2000) Use of flow cytometry to rapidly optimize the transfection of animal cells. *BioTechniques* 28(1), 148-154.
- Khurana, I., Al-Hasani, K., Maxwell, S., K.N, H., Okabe, J., Cooper, M.E., Collombat, P., and El-Osta, A. (2021) DNA methylation status correlates with adult β -cell regeneration capacity. *NPJ Regenerative medicine* 6(1), 7.
- Kieffer, T.J., and Habener, J.F. (1999) The glucagon-like peptides. *Endocrine reviews* 20(6), 876-913.
- Kim, J., Okamoto, H., Huang, Z., Anguiano, G., Chen, S., Liu, Q., Cavino, K., Xin, Y., Na, E., Hamid, R., *et al.* (2017) Amino Acid Transporter Slc38a5 Controls Glucagon Receptor Inhibition-Induced Pancreatic α Cell Hyperplasia in Mice. *Cell metabolism* 25, 1348-1361.
- Kim, T.K., and Eberwine, J.H. (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397(8), 3173-3178.
- Klec, C., Ziomek, G., Pichler, M., Malli, R., and Graier, W.F. (2019) Calcium Signaling in β -cell Physiology and Pathology: A Revisit. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 6110.

- Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences* 31(2), 89-97.
- Kodani, N., Nakae, J., Kobayashi, M., Kikuchi, O., Kitamura, T., and Itoh, H. (2020) FCoR-Foxo1 Axis Regulates α -Cell Mass through Repression of Arx Expression. *iScience* 23, 100798.
- Kühl, C. (1998) Etiology and pathogenesis of gestational diabetes. *Diabetes Care* 21 Suppl 2, B19-26.
- Kungulovski, G., and Jeltsch, A. (2016) Epigenome Editing: State of the Art, Concepts, and Perspectives. *Trends in genetics* 32(2), 101-113.
- Lam, C.J., Chatterjee, A., Shen, E., Cox, A.R., and Kushner, J.A. (2018) Low-Level Insulin Content Within Abundant Non- β Islet Endocrine Cells in Long-standing Type 1 Diabetes. *Diabetes* 68(3), 598-608.
- Landi, A., Babiuk, L.A., and van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2007) High transfection efficiency, gene expression, and viability of monocyte-derived human dendritic cells after nonviral gene transfer. *Journal of Leukocyte Biology* 82(4), 849-860.
- Langlois, A., Dumond, A., Vion, J., Pinget, M., and Bouzakri, K. (2022) Crosstalk Communications Between Islets Cells and Insulin Target Tissue: The Hidden Face of Iceberg. *Frontiers in Endocrinology* 13.
- Lawlor, N., Youn, A., Kursawe, R., Ucar, D., and Stitzel, M.L. (2017) Alpha TC1 and Beta-TC-6 genomic profiling uncovers both shared and distinct transcriptional regulatory features with their primary islet counterparts. *Scientific Report* 7, 017-12335.
- Lee, J., Sugiyama, T., Liu, Y., Wang, J., Gu, X., Lei, J., Markmann, J.F., Miyazaki, S., Miyazaki, J.-i., and Szot, G.L. (2013) Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells. *eLife* 2, e00940.
- Lee, Y., Berglund, E.D., Yu, X., Wang, M.-Y., Evans, M.R., Scherer, P.E., Holland, W.L., Charron, M.J., Roth, M.G., and Unger, R.H. (2014) Hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes requires insulin-resistant alpha cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(36), 13217-13222.
- Lemper, M., Leuckx, G., Heremans, Y., German, M.S., Heimberg, H., Bouwens, L., and Baeyens, L. (2015) Reprogramming of human pancreatic exocrine cells to β -like cells. *Cell Death & Differentiation* 22, 1117-1130.
- LeRoith, D. (2002) Beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *American journal of medicine* 113 Suppl 6A, 01276-01277.
- Lesueur, L.L., Mir, L.M., and André, F.M. (2016) Overcoming the Specific Toxicity of Large Plasmids Electrotransfer in Primary Cells In Vitro. *Molecular therapy. Nucleic acids* 5(3), e291-e291.
- Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., and Zhao, X. (2020) Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5, 1.
- Li, J., Casteels, T., Frogne, T., Ingvorsen, C., Honoré, C., Courtney, M., Huber, K.V.M., Schmitner, N., Kimmel, R.A., Romanov, R.A., et al. (2017) Artemisinin Target GABA(A) Receptor Signaling and Impair α Cell Identity. *Cell* 168, 86-100.e115.
- Li, W., Nakanishi, M., Zumsteg, A., Shear, M., Wright, C., Melton, D.A., and Zhou, Q. (2014) In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine subtypes. *eLife* 3, e01846.

- Liao, H.-K., Hatanaka, F., Araoka, T., Reddy, P., Wu, M.-Z., Sui, Y., Yamauchi, T., Sakurai, M., O'Keefe, D.D., Núñez-Delicado, E., *et al.* (2017) In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation. *Cell* 171, 1495-1507.e1415.
- Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E.J., Shi, Z., and Zhang, B. (2019) WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic acids research* 47, W199-w205.
- Liu, J., Banerjee, A., Herring, C.A., Attalla, J., Hu, R., Xu, Y., Shao, Q., Simmons, A.J., Dadi, P.K., Wang, S., *et al.* (2019) Neurog3-Independent Methylation Is the Earliest Detectable Mark Distinguishing Pancreatic Progenitor Identity. *Developmental Cell* 48, 49-63.
- Liu, J., Hunter, C.S., Du, A., Ediger, B., Walp, E., Murray, J., Stein, R., and May, C.L. (2011) Islet-1 regulates Arx transcription during pancreatic islet alpha-cell development. *Journal of Biological Chemistry* 286(17), 15352-15360.
- Loscalzo, J., and Handy, D.E. (2014) Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease (2013 Grover Conference series). *Pulmonary circulation* 4, 169-174.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A.L., and Randall, R. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193(1), 265-275.
- Ludvik, A.E., Pusec, C.M., Priyadarshini, M., Angueira, A.R., Guo, C., Lo, A., Hershenhouse, K.S., Yang, G.Y., Ding, X., Reddy, T.E., *et al.* (2016) HKDC1 Is a Novel Hexokinase Involved in Whole-Body Glucose Use. *Endocrinology* 157(9), 3452-3461.
- Maahs, D.M., West, N.A., Lawrence, J.M., and Mayer-Davis, E.J. (2010) Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 39(3), 481-497.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., Shmakov, S.A., Alkhnbashi, O.S., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D.H., Horvath, P., *et al.* (2020) Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology* 18(2), 67-83.
- Mason, E.F., and Rathmell, J.C. (2011) Cell metabolism: An essential link between cell growth and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813(4), 645-654.
- Matsuoka, T.A., Artner, I., Henderson, E., Means, A., Sander, M., and Stein, R. (2004) The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9), 2930-2933.
- Mauda-Havakuk, M., Litichever, N., Chernichovski, E., Nakar, O., Winkler, E., Mazkereth, R., Orenstein, A., Bar-Meir, E., Ravassard, P., Meivar-Levy, I., *et al.* (2011) Ectopic PDX-1 expression directly reprograms human keratinocytes along pancreatic insulin-producing cells fate. *PLOS ONE* 6, 18.
- Mawla, A., Meulen, T.v.d., and Huising, M. (2022) Chromatin accessibility differences between alpha, beta, and delta cells identifies common and cell type-specific enhancers. *Research Square*.
- Maxwell, K.G., Augsornworawat, P., Velazco-Cruz, L., Kim, M.H., Asada, R., Hoglebe, N.J., Morikawa, S., Urano, F., and Millman, J.R. (2020) Gene-edited human stem cell-derived β cells from a patient with monogenic diabetes reverse preexisting diabetes in mice. *Science translational medicine* 12(540).
- Melloul, D., Marshak, S., and Cerasi, E. (2002) Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45, 309-326.

- Meng, L., Liu, X., Wang, Y., Zhang, W., Zhou, W., Cai, F., Li, F., Wu, J., Xu, L., Niu, L., *et al.* (2019) Sonoporation of Cells by a Parallel Stable Cavitation Microbubble Array. *Advanced Science* 6, 1900557.
- Menge, B.A., Grüber, L., Jørgensen, S.M., Deacon, C.F., Schmidt, W.E., Veldhuis, J.D., Holst, J.J., and Meier, J.J. (2011) Loss of Inverse Relationship Between Pulsatile Insulin and Glucagon Secretion in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 60(8), 2160-2168.
- Michels, A.W., Redondo, M.J., and Atkinson, M.A. (2022) The pathogenesis, natural history, and treatment of type 1 diabetes: time (thankfully) does not stand still. *The lancet. Diabetes & endocrinology* 10(2), 90-92.
- Mills, J.C., Stanger, B.Z., and Sander, M. (2019) Nomenclature for cellular plasticity: are the terms as plastic as the cells themselves? *The EMBO Journal* 38, e103148.
- Miranda, T.B., and Jones, P.A. (2007) DNA methylation: The nuts and bolts of repression. *Journal of cellular physiology* 213(2), 384-390.
- Moin, A.S.M., and Butler, A.E. (2019) Alterations in Beta Cell Identity in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Current Diabetes Report* 19, 019-1194.
- Newgard, C.B., and McGarry, J.D. (1995) Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 64, 689-719.
- Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., and Nureki, O. (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156(5), 935-949.
- Novikova, L., Smirnova, I.V., Rawal, S., Dotson, A.L., Benedict, S.H., and Stehno-Bittel, L. (2013) Variations in Rodent Models of Type 1 Diabetes: Islet Morphology. *Journal of Diabetes Research* 2013, 965832.
- O'Geen, H., Bates, S.L., Carter, S.S., Nisson, K.A., Halmaj, J., Fink, K.D., Rhie, S.K., Farnham, P.J., and Segal, D.J. (2019) Ezh2-dCas9 and KRAB-dCas9 enable engineering of epigenetic memory in a context-dependent manner. *Epigenetics & Chromatin* 12(1), 26.
- Orci, L., Baetens, D., Rufener, C., Amherdt, M., Ravazzola, M., Studer, P., Malaisse-Lagae, F., and Unger, R.H. (1976) Hypertrophy and hyperplasia of somatostatin-containing D-cells in diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73(4), 1338-1342.
- Oropeza, D., Cigliola, V., Romero, A., Chera, S., Rodríguez-Seguí, S.A., and Herrera, P.L. (2021) Stage-specific transcriptomic changes in pancreatic α -cells after massive β -cell loss. *BMC genomics* 22(1), 021-07812.
- Papizan, J.B., Singer, R.A., Tschen, S.I., Dhawan, S., Friel, J.M., Hipkens, S.B., Magnuson, M.A., Bhushan, A., and Sussel, L. (2011) Nkx2.2 repressor complex regulates islet β -cell specification and prevents β -to- α -cell reprogramming. *Genes & development* 25(21), 2291-2305.
- Petersen, M.C., and Shulman, G.I. (2018) Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological reviews* 98(4), 2133-2223.
- Pfister, S.X., and Ashworth, A. (2017) Marked for death: targeting epigenetic changes in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 16(4), 241-263.
- Pini, V., Mariot, V., Dumonceaux, J., Counsell, J., O'Neill, H.C., Farmer, S., Conti, F., and Muntoni, F.J.S.r. (2022) Transiently expressed CRISPR/Cas9 induces wild-type dystrophin in vitro in DMD patient myoblasts carrying duplications. *Scientific reports* 12(1), 1-13.
- Prasadan, K., Daume, E., Preuett, B., Spilde, T., Bhatia, A., Kobayashi, H., Hembree, M., Manna, P., and Gittes, G.K. (2002) Glucagon is required for early insulin-positive differentiation in the developing mouse pancreas. *Diabetes* 51(11), 3229-3236.

- Rahier, J., Goebbels, R.M., and Henquin, J.C. (1983) Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia* 24(5), 366-371.
- Recillas-Targa, F. (2006) Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Molecular Biotechnology* 34(3), 337-354.
- Remedi, M.S., and Emfinger, C. (2016) Pancreatic β -cell identity in diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 18 Suppl 1(Suppl 1), 110-116.
- Rešić Lindehammer, S., Honkanen, H., Nix, W.A., Oikarinen, M., Lynch, K.F., Jönsson, I., Marsal, K., Oberste, S., Hyöty, H., and Lernmark, Å. (2012) Seroconversion to islet autoantibodies after enterovirus infection in early pregnancy. *Viral immunology* 25(4), 254-261.
- Ribeiro, S., Mairhofer, J., Madeira, C., Diogo, M.M., Lobato da Silva, C., Monteiro, G., Grabherr, R., and Cabral, J.M. (2012) Plasmid DNA Size Does Affect Nonviral Gene Delivery Efficiency in Stem Cells. *Cellular Reprogramming* 14(2), 130-137.
- Ritz-Laser, B., Estreicher, A., Gauthier, B.R., Mamin, A., Edlund, H., and Philippe, J. (2002) The pancreatic beta-cell-specific transcription factor Pax-4 inhibits glucagon gene expression through Pax-6. *Diabetologia* 45(1), 97-107.
- Robertson, R.P., Harmon, J., Tran, P.O., and Poitout, V. (2004) Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* (Oxford, England) 26(1), 139-140.
- Roderigo-Milne, H., Hauge-Evans, A.C., Persaud, S.J., and Jones, P.M. (2002) Differential expression of insulin genes 1 and 2 in MIN6 cells and pseudoislets. *Biochemical and biophysical research communications* 296(3), 589-595.
- Ryu, N., Kim, M.A., Park, D., Lee, B., Kim, Y.R., Kim, K.H., Baek, J.I., Kim, W.J., Lee, K.Y., and Kim, U.K. (2018) Effective PEI-mediated delivery of CRISPR-Cas9 complex for targeted gene therapy. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* 14(7), 2095-2102.
- Sabatini, P.V., Speckmann, T., and Lynn, F.C. (2019) Friend and foe: β -cell Ca(2+) signaling and the development of diabetes. *Molecular metabolism* 21, 1-12.
- Saleh, M., Gittes, G.K., and Prasad, K. (2021) Alpha-to-beta cell trans-differentiation for treatment of diabetes. *Biochemical Society Transactions* 49(6), 2539-2548.
- Salman, I.S., Al-Shammari, A.M., and Haba, M.K. (2022) Direct Reprogramming of Mice Skin Fibroblasts into Insulin-Producing Cells In Vitro. *Cell Reprogramming* 24(5), 271-282.
- Sander, J.D., and Joung, J.K. (2014) CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology* 32(4), 347-355.
- Sandoval, D.A., and D'Alessio, D.A. (2015) Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiological reviews* 95(2), 513-548.
- Sangan, C.B., Jover, R., Heimberg, H., and Tosh, D. (2015) In vitro reprogramming of pancreatic alpha cells towards a beta cell phenotype following ectopic HNF4 α expression. *Molecular and cellular endocrinology* 399, 50-59.
- Sapra A., and Bhandari, P. (2022) Diabetes Mellitus. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Sarnobat, D., Lafferty, R.A., Charlotte Moffett, R., Tarasov, A.I., Flatt, P.R., and Irwin, N. (2022) Effects of artemether on pancreatic islet morphology, islet cell turnover and α -cell

- transdifferentiation in insulin-deficient GluCreERT2;ROSA26-eYFP diabetic mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.
- Sarnobat, D., Moffett, C.R., Tanday, N., Reimann, F., Gribble, F.M., Flatt, P.R., and Tarasov, A.I. (2020) Antidiabetic drug therapy alleviates type 1 diabetes in mice by promoting pancreatic α -cell transdifferentiation. *Biochemical pharmacology* 182, 114216.
- Saunderson, E.A., Stepper, P., Gomm, J.J., Hoa, L., Morgan, A., Allen, M.D., Jones, J.L., Gribben, J.G., Jurkowski, T.P., and Ficuz, G. (2017) Hit-and-run epigenetic editing prevents senescence entry in primary breast cells from healthy donors. *Nature Communications* 8(1), 1450.
- Savell, K.E., Bach, S.V., Zipperly, M.E., Revanna, J.S., Goska, N.A., Tuscher, J.J., Duke, C.G., Sultan, F.A., Burke, J.N., and Williams, D.J.E. (2019) A neuron-optimized CRISPR/dCas9 activation system for robust and specific gene regulation. *eNeuro* 6(1).
- Schisler, J.C., Fueger, P.T., Babu, D.A., Hohmeier, H.E., Tessem, J.S., Lu, D., Becker, T.C., Naziruddin, B., Levy, M., Mirmira, R.G., *et al.* (2008) Stimulation of Human and Rat Islet β -Cell Proliferation with Retention of Function by the Homeodomain Transcription Factor Nkx6.1. *Molecular and Cellular Biology* 28, 3465-3476.
- Schwitzgebel, V.M., Scheel, D.W., Connors, J.R., Kalamaras, J., Lee, J.E., Anderson, D.J., Sussel, L., Johnson, J.D., and German, M.S. (2000) Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development (Cambridge, England)* 127(16), 3533-3542.
- Seki, A., and Rutz, S.J.J.o.E.M. (2018) Optimized RNP transfection for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in primary T cells. *Journal of experimental medicine* 215(3), 985-997.
- Shao, J., Wang, M., Yu, G., Zhu, S., Yu, Y., Heng, B.C., Wu, J., and Ye, H. (2018) Synthetic far-red light-mediated CRISPR-dCas9 device for inducing functional neuronal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(29), E6722-E6730.
- Shen, C.C., Hsu, M.N., Chang, C.W., Lin, M.W., Hwu, J.R., Tu, Y., and Hu, Y.C. (2019) Synthetic switch to minimize CRISPR off-target effects by self-restricting Cas9 transcription and translation. *Nucleic Acids Research* 47(3), e13.
- Shigekawa, K., and Dower, W.J. (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques* 6(8), 742-751.
- Siddique, A.N., Nunna, S., Rajavelu, A., Zhang, Y., Jurkowska, R.Z., Reinhardt, R., Rots, M.G., Ragozin, S., Jurkowski, T.P., and Jeltsch, A. (2013) Targeted methylation and gene silencing of VEGF-A in human cells by using a designed Dnmt3a-Dnmt3L single-chain fusion protein with increased DNA methylation activity. *Journal of molecular biology* 425(3), 479-491.
- Smith, Z.D., and Meissner, A. (2013) DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews. Genetics* 14(3), 204-220.
- Sonawane, N.D., Szoka, F.C., and Verkman, A.S. (2003) Chloride Accumulation and Swelling in Endosomes Enhances DNA Transfer by Polyamine-DNA Polyplexes. *Journal of Biological Chemistry* 278(45), 44826-44831.
- Søndergaard, J.N., Geng, K., Sommerauer, C., Atanasoai, I., Yin, X., and Kutter, C.J.C.b. (2020) Successful delivery of large-size CRISPR/Cas9 vectors in hard-to-transfect human cells using small plasmids. *Communications biology* 3(1), 1-6.

- Song, G., Pacher, M., Balakrishnan, A., Yuan, Q., Tsay, H.C., Yang, D., Reetz, J., Brandes, S., Dai, Z., Pützer, B.M., *et al.* (2016) Direct Reprogramming of Hepatic Myofibroblasts into Hepatocytes In Vivo Attenuates Liver Fibrosis. *Cell stem cell* 18(6), 797-808.
- Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G., and Gruss, P. (1997) The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing β cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386(6623), 399-402.
- Soufi, A., Donahue, G., and Zaret, Kenneth S. (2012) Facilitators and Impediments of the Pluripotency Reprogramming Factors' Initial Engagement with the Genome. *Cell* 151(5), 994-1004.
- Stanger, B.Z., and Hebrok, M. (2013) Control of Cell Identity in Pancreas Development and Regeneration. *Gastroenterology* 144(6), 1170-1179.
- Stanojevic, V., and Habener, J.F. (2015) Evolving function and potential of pancreatic alpha cells. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 29(6), 859-871.
- Steiner, D.J., Kim, A., Miller, K., and Hara, M. (2010) Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets* 2(3), 135-145.
- Stepper, P. (2020). CRISPR-Cas9 fusions for synthetic epigenetics (Stuttgart: University of Stuttgart).
- Stepper, P., Kungulovski, G., Jurkowska, R.Z., Chandra, T., Krueger, F., Reinhardt, R., Reik, W., Jeltsch, A., and Jurkowski, T.P. (2017) Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic Acids Research* 45(4), 1703-1713.
- Sternberg, S.H., and Doudna, J.A. (2015) Expanding the Biologist's Toolkit with CRISPR-Cas9. *Molecular cell* 58(4), 568-574.
- Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C., and Doudna, J.A. (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507(7490), 62-67.
- Stewart, M.P., Langer, R., and Jensen, K.F.J.C.r. (2018) Intracellular delivery by membrane disruption: mechanisms, strategies, and concepts. *Chemical reviews* 118(16), 7409-7531.
- Stoffers, D.A., Zinkin, N.T., Stanojevic, V., Clarke, W.L., and Habener, J.F. (1997) Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nature genetics* 15(1), 106-110.
- Strømme, P., Mangelsdorf, M.E., Shaw, M.A., Lower, K.M., Lewis, S.M.E., Bruyere, H., Lütcherath, V., Gedeon, Á.K., Wallace, R.H., Scheffer, I.E., *et al.* (2002) Mutations in the human ortholog of Aristaless cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nature Genetics* 30(4), 441-445.
- Stuchbury, G., and Münch, G. (2010) Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA. *Cytotechnology* 62(3), 189-194.
- Su, C., Gao, L., May, C.L., Pippin, J.A., Boehm, K., Lee, M., Liu, C., Pahl, M.C., Golson, M.L., Naji, A., *et al.* (2022) 3D chromatin maps of the human pancreas reveal lineage-specific regulatory architecture of T2D risk. *Cell metabolism* 34(9), 1394-1409.
- Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B.B., Stein, C., Basit, A., Chan, J.C.N., Mbanya, J.C., *et al.* (2022) IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice* 183, 109119.
- Sutherland, E.W., and De Duve, C. (1948) Origin and distribution of the hyperglycemic-glycogenolytic factor of the pancreas. *The Journal of biological chemistry* 175(2), 663-674.

- Swisa, A., Avrahami, D., Eden, N., Zhang, J., Feleke, E., Dahan, T., Cohen-Tayar, Y., Stolovich-Rain, M., Kaestner, K.H., Glaser, B., *et al.* (2017) PAX6 maintains β cell identity by repressing genes of alternative islet cell types. *The Journal of clinical investigation* 127(1), 230-243.
- Tabák, A.G., Herder, C., Rathmann, W., Brunner, E.J., and Kivimäki, M. (2012) Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet (London, England)* 379(9833), 2279-2290.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2015) A developmental framework for induced pluripotency. *Development (Cambridge, England)* 142(19), 3274-3285.
- Tanday, N., Irwin, N., Moffett, R.C., Flatt, P.R., and O'Harte, F.P.M. (2020) Beneficial actions of a long-acting apelin analogue in diabetes are related to positive effects on islet cell turnover and transdifferentiation. *Diabetes, obesity & metabolism* 22(12), 2468-2478.
- Teitelman, G., Alpert, S., Polak, J.M., Martinez, A., and Hanahan, D. (1993). Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon and the neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide. *Development (Cambridge, England)* 118(4), 1031-1039.
- Tengholm, A., and Gylfe, E. (2017) cAMP signalling in insulin and glucagon secretion. *Diabetes, obesity & metabolism* 19 Suppl 1, 42-53.
- Teta, M., Long, S.Y., Wartschow, L.M., Rankin, M.M., and Kushner, J.A. (2005) Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* 54(9), 2557-2567.
- Thakore, P.I., Black, J.B., Hilton, I.B., and Gersbach, C.A. (2016) Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nature methods* 13(2), 127-137.
- Thorel, F., Népote, V., Avril, I., Kohno, K., Desgraz, R., Chera, S., and Herrera, P.L. (2010) Conversion of adult pancreatic α -cells to β -cells after extreme β -cell loss. *Nature* 464(7292), 1149-1154.
- Thorens, B., Charron, M.J., and Lodish, H.F. (1990) Molecular physiology of glucose transporters. *Diabetes Care* 13(3), 209-218.
- Thowfeequ, S., Myatt, E.-J., and Tosh, D. (2007) Transdifferentiation in developmental biology, disease, and in therapy. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 236(12), 3208-3217.
- Tokarz, V.L., MacDonald, P.E., and Klip, A. (2018) The cell biology of systemic insulin function. *The Journal of Cell Biology* 217(7), 2273-2289.
- Troyanovsky, B., Bitko, V., Pastukh, V., Fouty, B., and Solodushko, V. (2016) The Functionality of Minimal PiggyBac Transposons in Mammalian Cells. *Molecular therapy. Nucleic acids* 5(10), 76.
- Tyumentseva, M.A., Tyumentsev, A.I., and Akimkin, V.G. (2021) Protocol for assessment of the efficiency of CRISPR/Cas RNP delivery to different types of target cells. *PloS one* 16(11).
- Unger, R.H., and Cherrington, A.D. (2012) Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *The Journal of clinical investigation* 122(1), 4-12.
- Unger, R.H., and Orci, L. (2010) Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(37), 16009-16012.

- van der Meulen, T., and Huising, M.O. (2015) Role of transcription factors in the transdifferentiation of pancreatic islet cells. *Journal of molecular endocrinology* 54(2), R103-117.
- van der Meulen, T., Lee, S., Noordeloos, E., Donaldson, C.J., Adams, M.W., Noguchi, G.M., Mawla, A.M., and Huising, M.O. (2018) Artemether Does Not Turn α Cells into β Cells. *Cell metabolism* 27(1), 218-225.e214.
- Vojta, A., Dobrinić, P., Tadić, V., Bočkor, L., Korać, P., Julg, B., Klasić, M., and Zoldoš, V. (2016) Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation. *Nucleic Acids Research* 44(12), 5615-5628.
- Waddington, C.H. (2014) *The strategy of the genes* (Routledge).
- Wang, H., Brun, T., Kataoka, K., Sharma, A.J., and Wollheim, C.B. (2007) MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion. *Diabetologia* 50(2), 348-358.
- Wang, H., La Russa, M., and Qi, L.S. (2016) CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual review of biochemistry* 85, 227-264.
- Wang, H., Yang, Y., Liu, J., and Qian, L. (2021) Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms and progress. *Nature reviews. Molecular cell biology* 22(6), 410-424.
- Wentworth, B.M., Schaefer, I.M., Villa-Komaroff, L., and Chirgwin, J.M. (1986) Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *Journal of molecular evolution* 23(4), 305-312.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S.H., and Doudna, J.A. (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482(7385), 331-338.
- Wilson, J.E. (2003) Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *The Journal of experimental biology* 206(Pt 12), 2049-2057.
- Wurm, F.M. (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology* 22(11), 1393-1398.
- Xiao, X., Guo, P., Shiota, C., Zhang, T., Coudriet, G.M., Fischbach, S., Prasad, K., Fusco, J., Ramachandran, S., Witkowski, P., *et al.* (2018) Endogenous Reprogramming of Alpha Cells into Beta Cells, Induced by Viral Gene Therapy, Reverses Autoimmune Diabetes. *Cell stem cell* 22(1), 78-90.e74.
- Xie, R., Carrano, A.C., and Sander, M. (2015) A systems view of epigenetic networks regulating pancreas development and β -cell function. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* 7(1), 1-11.
- Xu, C.-R., Cole, P.A., Meyers, D.J., Kormish, J., Dent, S., and Zaret, K.S. (2011) Chromatin "Prepattern" and Histone Modifiers in a Fate Choice for Liver and Pancreas. *Science (New York, N.Y.)* 332(6032), 963-966.
- Xu, C.L., Ruan, M.Z.C., Mahajan, V.B., and Tsang, S.H. (2019) Viral Delivery Systems for CRISPR. *Viruses* 11(1), 28.
- Xu, S., and Xu, J.P. (2019) Present status and expectation of aristaless-related homeobox (ARX) in endocrine pancreas. *The International journal of developmental biology* 63(11-12), 579-587.
- Yang, L., Li, S., Hatch, H., Ahrens, K., Cornelius, J.G., Petersen, B.E., and Peck, A.B. (2002) In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(12), 8078-8083.
- Yip, B.H. (2020) Recent Advances in CRISPR/Cas9 Delivery Strategies. *Biomolecules* 10(6), 839.

- Young, J.L., and Dean, D.A. (2015) Electroporation-mediated gene delivery. *Advances in genetics* 89, 49-88.
- Yu, J. (2020) Electroporation of CRISPR-Cas9 into malignant B cells for loss-of-function studies of target gene via knockout. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2050, pp. 85-90.
- Zakeri, A., Kouhbanani, M.A.J., Beheshtkhoo, N., Beigi, V., Mousavi, S.M., Hashemi, S.A.R., Karimi Zade, A., Amani, A.M., Savardashtaki, A., Mirzaei, E., *et al.* (2018) Polyethylenimine-based nanocarriers in co-delivery of drug and gene: a developing horizon. *Nano Reviews & Experiments* 9(1), 1488497.
- Zhang, X., Zhao, L., Jin, R., Li, M., Li, M.S., Li, R., and Liang, X. (2021) CRISPR/Cas9-Mediated α -ENaC Knockout in a Murine Pancreatic β -Cell Line. *Frontiers in genetics* 12.
- Zhang, Y., Fava, G.E., Wang, H., Mauvais-Jarvis, F., Fonseca, V.A., and Wu, H. (2016) PAX4 Gene Transfer Induces α -to- β Cell Phenotypic Conversion and Confers Therapeutic Benefits for Diabetes Treatment. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 24(2), 251-260.
- Zhao, Z., Xu, M., Wu, M., Tian, X., Zhang, C., and Fu, X. (2015) Transdifferentiation of Fibroblasts by Defined Factors. *Cell Reprograming* 17(3), 151-159.
- Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., and Melton, D.A. (2008) In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455(7213), 627-632.
- Ziv, O., Glaser, B., and Dor, Y. (2013) The plastic pancreas. *Developmental cell* 26(1), 3-7.
- Zoppo, M., Okoniewski, N., Pantelyushin, S., Vom Berg, J., Schirmer, K.J.C., and bioscience (2021) A ribonucleoprotein transfection strategy for CRISPR/Cas9-mediated gene editing and single cell cloning in rainbow trout cells. *Cell & bioscience* 11(1), 1-15.

8. PRILOZI

Biografija

Marija B. Đorđević rođena je 30. avgusta 1990. god. u Leskovcu. Godine 2009. je završila Gimnaziju u Lebanu. Iste godine je upisala Osnovne studije na smeru Molekularna biologija i fiziologija na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, i završila školske 2012/2013. godine sa prosečnom ocenom 9,27. Master studije na istom fakultetu, na modulu Humana molekularna biologija, upisuje 2013. god. i završava 2014. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Master rad pod naslovom „Pozitivan efekat hemokina CXCL12 na preživljavanje beta ćelija pankreasa: uticaj na ekspresiju i aktivnost katalaze”, je urađen na Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” - Instituta od nacionalnog značaja za republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom dr Nevene Grdović i dr Dušanke Savić-Pavićević. Doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, modul Molekularna biologija eukariota, upisuje 2014. god. Od 2017. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik, a od 2020. god. kao istraživač saradnik na Odeljenju za molekularnu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”- Instituta od nacionalnog značaja za republiku Srbiju Univerziteta u Beogradu. Godine 2017. dobila je nagradu za najbolji poster na Prvom kongresu molekularnih biologa Srbije u okviru poster sesije Molekularna biologija eukariota. Marija Đorđević je do danas objavila 16 radova u časopisima međunarodnog značaja, od kojih 2 kao prvi autor i ima 18 saopštenja na međunarodnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а **Марија Ђорђевић**

број индекса **M3003/2014**

Изјављујем

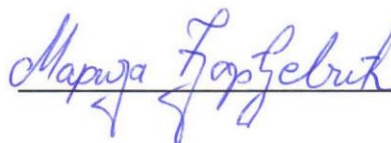
да је докторска дисертација под насловом

Трансдиференцијација алфа ћелија панкреаса миша у ћелије које производе инсулин циљаном метилацијом ДНК применом Ери-CRISPR система

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 20.04.2023.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Марија Б. Ђорђевић**

Број индекса **M3003/2014**

Студијски програм **Молекуларна биологија**

Наслов рада **Трансдиференцијација алфа ћелија панкреаса миша у ћелије које производе инсулин циљаном метилацијом ДНК применом Ери-CRISPR система**

Ментор др Јелена Арамбашић-Јовановић и др Мелита Видаковић

Потписани/а **Марија Б. Ђорђевић**

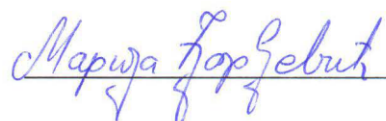
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 20.04.2023.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Трансдиференцијација алфа ћелија панкреаса миша у ћелије које производе инсулин циљаном метилацијом ДНК применом Epi-CRISPR система

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

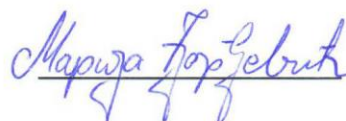
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 20.04.2023.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.