

Broj 3 • septembar 2023. № 3 • September 2023.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**  
Trends in **Molecular Biology**



GODINA OD OTKRIĆA  
SEKUNDARNE STRUKTURE MOLEKULA DNK



Beograd • Belgrade • 2023.  
IMGGI • IMGGE

## Uloga ciljanih (epi)genetičkih modifikacija u potencijalnoj terapiji dijabetesa

Marija Đorđević, Svetlana Dinić, Mirjana Mihailović, Aleksandra Uskoković, Nevena Grdović, Jelena Arambašić Jovanović, Melita Vidaković

Odeljenje za molekularnu biologiju, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković",  
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu  
Kontakt: marija.sinadinovic@ibiss.bg.ac.rs

### Apstrakt

U osnovi dijabetesa se nalazi smanjen broj beta ćelija endokrinog pankreasa, njihovo poremećeno funkcionisanje ili gubitak identiteta u procesu dediferencijacije. Jedna od aktuelnih strategija za potencijalnu primenu u terapiji dijabetesa je i direktno ćelijsko reprogramiranje kojim bi se nadomestio nedostatak funkcionalnih beta ćelija i insulina u organizmu. Ovaj pravac u istraživanjima podrazumeva transdiferencijaciju somatskih ćelija poreklom iz različitih organa u ćelije koje proizvode insulin kroz modulaciju ekspresije transkripcionih faktora koji su ključni za održavanje ćelijskog identiteta. U ovom poglavlju biće predstavljena aktuelna istraživanja koja podrazumevaju ćelijsko reprogramiranje uz pomoć novih sintetičkih alata koji imaju ulogu da dirigovano uvode izmene u (epi)genom sa posebnim osvrtom na CRISPR/Cas9 sistem i njegove modifikacije. Alfa ćelije endokrinog pankreasa predstavljaju atraktivan izvor ćelija za potencijalnu terapiju dijabetesa zato što dele zajedničko poreklo sa beta ćelijama, imaju visok nivo plastičnosti kao i zbog bliske pozicioniranosti koja obezbeđuje prirodno okruženje pogodno za njihovo preživljavanje. Jedna od nedavnih studija je podrazumevala upotrebu EpiCRISPR sistema za ciljano uvođenje metilacije u okviru promotora gena *Arx* u alfa ćelijama pankreasa miša u cilju njihove transdiferencijacije. Uvedene izmene na nivou epigenoma su dovele do pokretanja ekspresije insulina u alfa ćelijama pankreasa miša i inicijacije procesa njihove transdiferencijacije u ćelije koje proizvode insulin.

**Ključne reči:** editovanje epigenoma; dijabetes; CRISPR/Cas9; alfa ćelije pankreasa; transdiferencijacija; insulin

## The role of targeted (epi)genetic modifications in potential diabetes therapy

Marija Đorđević, Svetlana Dinić, Mirjana Mihailović, Aleksandra Uskoković, Nevena Grdović, Jelena Arambašić Jovanović, Melita Vidaković

Department of Molecular Biology University of Belgrade,

Institute for Biological Research "Siniša Stanković" National Institute of the Republic of Serbia

Correspondence: marija.sinadinovic@ibiss.bg.ac.rs

### Abstract

Diabetes is caused by a reduced number of beta cell mass, impaired functioning, or loss of beta cell identity through the dedifferentiation process. Direct cellular reprogramming is one of the current strategies in the potential diabetes therapy, which would replace the lack of functional beta cells and regulate insulin levels. This research approach involves the transdifferentiation of somatic cells from several organs into insulin-producing cells by modulating the expression pattern of transcription factors responsible for maintaining cellular identity. This chapter will present current research involving cellular reprogramming using the new synthetic tools that have ability to introduce targeted (epi)genetic modifications. Special attention will be paid to the CRISPR/Cas9 system and its modifications. Pancreatic alpha cells represent an attractive cell source for potential diabetes therapy because they share a common origin with beta cells, have a high level of plasticity, and provide a natural environment suitable for cell survival because of their close placement. One of the recent studies involved the use of the EpiCRISPR system for targeted DNA methylation within the Arx gene promoter in murine pancreatic alpha cells. The introduced changes at the epigenetic level led to the initiation of insulin expression in the alpha cells of the mouse pancreas and the initiation of their transdifferentiation process into insulin-producing cells.

**Key words:** epigenome editing; diabetes; CRISPR/Cas9; pancreatic alpha cells, transdifferentiation, insulin

Šećerna bolest ili dijabetes predstavlja grupu metaboličkih poremećaja koji dovode do hronične hiperglikemije tj. povišene koncentracije glukoze u krvi usled poremećene biološke aktivnosti hormona insulina, njegove neadekvatne sekrecije ili zbog postojanja oba poremećaja. Beta ćelije pankreasa predstavljaju senzore glukoze, proizvode i oslobađaju hormon insulin koji reguliše brojne fiziološke procese, a njegova ključna uloga je u održavanju koncentracije glukoze u krvi. U osnovi patogeneze dijabetesa se nalazi poremećeno funkcionisanje beta ćelija, gubitak njihovog identiteta i prisustvo polihormonalnih ćelija, kao i povećano umiranje, s obzirom da sposobnost deobe beta ćelija opada sa godinama [1]. U odnosu na uzrok nastanka bolesti dijabetes se klasifikuje na nekoliko tipova, ali bez obzira na tip dijabetesa kod obolelih dolazi do hronične hiperglikemije i istih hroničnih komplikacija koje su posledica apsolutno ili relativno narušene funkcionalnosti beta ćelija, njihove poremećene proliferacije ili autoimunske reakcije koja na kraju dovodi do smanjenja mase beta ćelija [2].

### **Pristupi u terapiji dijabetesa**

Pored farmakološkog pristupa u terapiji dijabetesa gde spada upotreba insulina i lekova koji deluju na povećanje senzitivnosti ćelija na insulin, stimulaciju insulinske sekrecije i poboljšanje kontrole glikemije, aktuelan je i ćelijski pristup u terapiji. Naime, egzogeno dodavanje insulina nije u potpunosti efikasno u regulaciji svakodnevnih naleta visokog nivoa glukoze u krvi, što dugoročno gledano dovodi do niza komplikacija u okviru drugih organa, kao što su bolesti bubrega i kožne infekcije [3, 4]. Kako bi se povećao broj ćelija koje su osetljive na glukozu i koje odgovaraju oslobađanjem adekvatne količine insulina važno je delovati lokalno na nivou organizma. Ćelijski pristup u terapiji ima za cilj zamenu oštećenih ili obnavljanje ukupne mase beta ćelija i podrazumeva transplantaciju pankreasa i Langerhansovih ostrvaca poreklom od donora. Ovaj pristup je efikasan, ali se susreće sa brojnim preprekama kao što su ograničen broj donora i pridruženi sporedni efekti imunosupresivnih lekova što onemogućava široku primenu ovog vida terapije. Broj obolelih od dijabetesa u svetu je u konstantnom porastu pa je pronalaženje alternativnih terapeutskih pristupa važan pravac u istraživanjima. Velika pažnja je usmerena ka očuvanju preostalih i sprečavanju daljeg gubitka funkcionalnih beta ćelija, ka stimulaciji replikacije i rasta novih beta ćelija poreklom od progenitorskih ćelija [5, 6]. Težnja za pronalaskom alternativnih izvora beta ćelija dovela je do velikog broja pokušaja diferencijacije embrionalnih i indukovanih pluripotentnih stem ćelija, kao i reprogramiranja terminalno diferenciranih tipova ćelija prisutnih u organizmu [6, 7]. Embrionalne i indukovane pluripotentne matične ćelije poseduju veliki potencijal da se diferenciraju u druge tipove ćelija, između ostalih i u beta ćelije pankreasa, međutim njihovo korišćenje u ćelijskoj terapiji još uvek nailazi na ograničenja kao što je mogućnost napada od strane autoimunskog sistema ili njihova tumorogena priroda [8]. Proces ćelijske transdiferencijacije podrazumeva direktan prelazak iz jednog u drugi terminalno diferencirani tip ćelija, isključujući pluripotentno i intermedijerno stanje. Sposobnost ćelija da adaptiraju svoj fenotip kao odgovor na promene iz spoljašnje sredine bez promena u genetičkom materijalu definiše se kao ćelijska plastičnost. Zahvaljujući tome, mogućnost da se utiče na reprogramiranje ćelijskog identiteta daje veliki prostor za modelovanje bolesti i potencijal za prevođenje u terapeutske svrhe [9]. Veliki broj funkcionalnih tipova ćelija poput kardiomiocita, neurona, hepatocita i hematopoetskih ćelija do sada je dobijen od fibroblasta ili drugih tipova somatskih ćelija u *in vitro* uslovima [10]. Takođe su uspešno realizovani različiti pokušaji transdiferencijacije pankreatičnih i drugih tipova somatskih ćelija koje nisu poreklom iz pankreasa u ćelije koje zadobijaju sposobnost da reaguju na glukozu, proizvode i oslobađaju insulin, tzv. ćelije koje liče na beta ćelije pankreasa [11, 12]. Ćelije jetre, epitelne ćelije žučne kese, fibroblasti kože, ćelije antralnog dela želuca i keratinociti su neki od najčešće korišćenih tipova ćelija koji nisu poreklom iz pankreasa u pokušajima transdiferencijacije u ćelije koje proizvode insulin (Slika 1.) [13-18]. Acinarne i duktalne ćelije koje ulaze u sastav egzokrinog dela pankreasa

su uspešno transdiferencirane u prisustvu više transkripcionih faktora koji su specifični za beta ćelije kao što su NGN3, MAFA i PAX6 (Slika 2.) [19, 20].

Različiti nivoi regulacije genske ekspresije su tačke na kojima može da se deluje kako bi se pojačala, smanjila ili potpuno isključila ekspresija gena za transkripcione faktore koji su pre svega odgovorni za održavanje ćelijskog identiteta. Kako bi se unapredio ćelijski pristup u terapiji dijabetesa u cilju modulacije ekspresije ključnih transkripcionih faktora neophodno je detaljno proučiti njihovu ulogu u pravilnom funkcionisanju beta ćelija, ispitati interakcije i mehanizme koji regulišu njihovu ekspresiju.

Rezultati istraživanja koji su pokazali postojanje veze između epigenetičkih modifikacija i razvoja dijabetesa doveli su do razvoja tzv. „epilekova“ koji imaju sposobnost da menjaju epigenetička obeležja gde spadaju inhibitori histonskih deacetilaza (kao što je vorinostat) ili demetilujućim agensi (predstavnik je 5-Aza-2'-dezoksicitidin koji inhibira enzime DNK metiltransferaze) [21, 22]. Problem sa tretmanom mnogih kompleksnih bolesti, među kojima je i dijabetes, različitim „epilekovima“ je što oni deluju neselektivno na epigenetička obeležja za koja su razvijeni i dovode do neželjenih sporednih efekata. Neki od njih imaju lošu stabilnost i kratak polужivot [23, 24]. Sa druge strane, novi sintetički epigenetički alati dizajnirani su tako da dirigovano i precizno menjaju epigenetička obeležja na specifičnim mestima, s ciljem da dovedu do promene u ekspresiji samo jednog ili više gena. Zahvaljujući reverzibilnoj prirodi epigenetičkih modifikacija ciljano editovanje epigenoma pruža ogroman potencijal u različitim oblastima, od osnovnih istraživanja do biomedicine i primenjene biotehnologije, te bi moglo da se posmatra kao alternativa u odnosu na „epilekove“ [9]. Napredak u efikasnoj isporuci genetičkog materijala u ćelije pomoću plazmida, adeno-asociranih virusa (AAV), modifikovanih molekula RNK i nanočestica obezbeđuje efikasniji, jednostavniji i sigurniji put za pokretanje procesa transdiferencijacije ciljanih ćelija [12, 25, 26].

Različite ćelije jednog organizma ispoljavaju specifične karakteristike i održavaju stabilan obrazac genske ekspresije. Nastanak diferenciranih ćelija adultnog organizma se posmatra kao razvojni proces nediferenciranih u terminalno diferencirane ćelije koje formiraju tkiva ili organe [27]. U stabilnim uslovima, ćelije adultnog organizma održavaju diferencirano stanje pri čemu jedinstveni tip ćelija često može da usvoji neke karakteristike drugog tipa ćelija zahvaljujući promenama u genskoj ekspresiji koje nastaju kao posledica odgovora na promene iz okruženja [28, 29]. Ključnu ulogu u interpretaciji genoma koja podrazumeva aktivaciju ili represiju dela genoma imaju epigenetički mehanizmi koji utiču na dostupnost genomskih regiona. Proučavanjem mehanizama koji se nalaze u osnovi promena u genskoj ekspresiji, a koje nisu nastale zbog izmena u sekvenci molekula DNK, bavi se epigenetika. Waddington je još 1942. godine prvi put upotrebio termin „epigenetika“ kako bi označio uticaj okruženja na genom u toku razvoja u cilju formiranja ćelijskog fenotipa [30]. Skup epigenetičkih obeležja koja uključuju metilaciju molekula DNK, dostupnost hromatina, posttranslacione modifikacije histonskih proteina (kao što su acetilacija, fosforilacija, ubikvitinacija, sumoilacija histona, itd.) i nekodirajuće RNK definišu identitet ćelija višecelijskog organizma, ali i dopuštaju ćelijama promene u genskoj ekspresiji i posledično promene u fenotipu. Ove promene mogu da se jave kao odgovor na promene iz okruženja kao što su stvaranje ćelijskog diverziteta u toku razvoja ili prilagođavanje ćelija na promene u dostupnosti hranljivih materija ili izloženost stresnim stimulusima [31].

Metilacija molekula DNK predstavlja naslednu, kovalentnu epigenetičku modifikaciju koja je najviše izučavana i podrazumeva prenos metil grupe sa S-adenozilmetionina na citozin na poziciji C5 pri čemu nastaje 5-metilcitozin. Metilacija molekula DNK nije nasumično rasuta po genomu, već se najčešće nalazi na citozinu u okviru CpG dinukleotida koji su grupisani u tzv. CpG ostrvca kod sisara [32]. Hipermetilovana CpG ostrvca koja su lokalizovana u promotorskom regionu blizu početka mesta transkripcije gena predstavljaju marker transkripciono neaktivnih gena, što definiše direktnu vezu između epigenetičkih modifikacija i gen-

ske ekspresije [33]. Metilacija molekula DNK obezbeđuje stabilno nasleđivanje obrasca genske ekspresije, pri čemu se metilovani geni drže reprimirani i zaključani. Takođe, metilacija ima veoma važnu ulogu u genomskom imprintingu, inaktivaciji X hromozoma i tumorogenezi [34]. Enzimi DNK metiltransferaze (engl. *DNA methyltransferase*) (DNMT1, DNMT3A, i DNMT3B) imaju ulogu u uvođenju i prenošenju obrasca metilacije molekula DNK. Ovi enzimi imaju dve različite regulatorne funkcije, od kojih DNMT1 DNK metiltransferaza ima ulogu u održavanju obrasca već uspostavljene metilacije u toku replikacije. Obrazac metilacije DNK molekula se uspostavlja pomoću metiltransferaza koje vrše *de novo* metilaciju, a to su DNMT3A i DNMT3B, i mogu da interaguju sa DNMT3L koji nema metiltransferaznu aktivnost, ali stimuliše *de novo* metiltransferaze [35].

## Epigenetičko editovanje

Epigenetičko editovanje se bazira na upotrebi DNK vezujućeg domena koji pruža mogućnost preciznog baznog sparivanja sa sekvencom od interesa i ne dovodi do izmena u primarnoj sekvenci molekula DNK. Specifičnim pozicioniranjem elemenata koji imaju ulogu da modifikuju epigenetičke markere neslektivno delovanje je svedeno na minimum, što redukuje sporedne neželjene efekte [36-38]. Domenu koji se vezuje za molekul DNK može da bude pripojen i tzv. efektorski domen poreklom od enzima koji imaju ulogu da pišu ili brišu epigenetička obeležja na molekulu DNK ili na histonskim repovima. Efektorski domen može i da regrutuje druge enzime koji uvode ili uklanjaju specifična epigenetička obeležja. Za pozicioniranje kompleksa za editovanje epigenoma na molekulu DNK koriste se 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 proteini koji se vezuju za molekul DNK i moraju da se dizajniraju zasebno za svaki regon koji se targetuje. TALE-TET1 sistem je uspešno korišćen za demetilaciju ICR2 regiona (engl. *imprinted control region 2*), u cilju smanjenja ekspresije p57, inhibitora ćelijskog ciklusa i povećanja replikacije pankreatičnih beta ćelija [39]. Grupisani (klasterovani) kratki palindromski ponovci na jednakim rastojanjima (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, CRISPR) su prisutni kod mnogih bakterija i većine arhea i imaju ulogu u stečenom imunskom sistemu [40, 41]. Asociirane endonukleaze (engl. *CRISPR associated*, Cas) formiraju komplekse (CRISPR/Cas) zajedno sa pojedinačnim molekulima CRISPR-RNK (crRNK) koji se na osnovu komplementarnosti sparuju sa stranim molekulima DNK [42, 43]. Primena ovog sistema koji je inicijalno razvijen za editovanje genoma dovela je do velikog napretka u razvoju sistema za epigenetičko editovanje zahvaljujući fleksibilnosti i modularnoj prirodi sistema [44]. Prednost CRISPR/Cas9 sistema koja ga čini privlačnim za potencijalne terapijske pristupe se ogleda u mogućnosti istovremenog ciljanja više regiona u genomu uz pomoć više različitih RNK vodilja (gRNK) bez ikakvih izmena na proteinu Cas9 [45, 46]. Naime, Cas9 ima dva endonukleazna domena koji se aktiviraju prilikom formiranja kompleksa sa molekulom DNK, ostavljajući dvolančani prekid. Male insercije i delecije u ciljanom regionu koje nastaju kao rezultat popravke uvedenih dvolančanih prekida dovode do mutacija i poremećene funkcionalnosti genskog produkta [47]. Nakon gašenja endonukleazne aktivnosti, dCas9 (engl. *deactivated/dead Cas9*, dCas9) protein može da ima ulogu platforme kojoj će se dodati drugi efektorski domeni s ciljem da menjaju metilacioni status ciljanog lokusa, uvode posttranslacione modifikacije histona ili da dovode do različitih modifikacija istovremeno utičući na arhitekturu hromatina [9, 44]. Efektorski domeni koji služe kao aktivatori genske ekspresije su VP64, VP160 [48], TET1 [49], tripartitini transkripcioni aktivator VPR (sastavljen je od VP64, P65 i Rta) [50], kao i katalitička subjedinica acetiltransferaze P300 koja katalizuje acetilaciju lizina 27 histona H3 [51]. Kao represori se koriste domeni DNMT3A, DNMT3A-DNMT3L, KRAB (engl. *Krüppel associated box*), LSD1 (engl. *lysine specific demethylase 1*) enzima.

## Upotreba CRISPR/Cas9 sistema za dobijanje ćelija koje proizvode insulin

Alati za editovanje (epi)genoma su pojednostavili i ubrzali razvoj metoda koje omogućavaju direktnu promenu terminalno diferenciranih ćelija u druge tipove ćelija zaobilazanjem intermedijernog stanja i mogli bi u velikoj meri da doprinesu masovnoj proizvodnji ćelija za terapiju dijabetesa [10, 52]. Istraživanja koja se zasnivaju na upotrebi različitih CRISPR/Cas9 sistema uključuju različite tipove ćelija delujući na gene koji su povezani sa dijabetesom. CRISPR/Cas9 sistem za ciljanu aktivaciju gena (engl. *target gene activation*, TGA) je korišćen za transdiferencijaciju mišijih ćelija jetre u ćelije koje proizvode insulin u *in vivo* uslovima. TGA sistem ne deluje direktno na molekul DNK, već ciljano aktivira gene indirektnim putem tako što regrutuje transkripcionu mašineriju ili modulatore koji menjaju epigenetičke oznake. Ovaj sistem je ispitivan na adultnim životinjama koje eksprimiraju Cas9 (*knockin* životinje za Cas9), kojima je kroz repnu venu injeciran AAV vektor sa informacijom za gRNK i aptamer koji ima ulogu da regrutuje kompleks za aktivaciju transkripcije ciljanog gena [53]. Ovaj sistem je doveo do uspešnog pokretanja ekspresije transkripcionog faktora PDX1 u ćelijama jetre, nakon čega je zabeležena njihova transdiferencijacija u ćelije koje proizvode insulin. Kod miševa kojima je dijabetes tipa 1 (DT1) izazvan pomoću streptozotocina došlo je do povećanja nivoa insulina u serumu i poboljšanja hiperglikemijskog statusa. Ovakav TGA sistem je, pored model sistema za DT1, korišćen za tretman muskularne distrofije i akutne bolesti bubrega [53]. Istraživači su razvili način kako da efikasno upotrebe CRISPR/Cas9 za popravku mutacije u genu za protein volframin u humanim indukovanim pluripotentnim matičnim ćelijama i da ih zatim transdiferenciraju u funkcionalne beta ćelije pomoću šestostepenog protokola za diferencijaciju ciljanjem različitih razvojnih i signalnih puteva. U ovom istraživanju korišćene su indukovane pluripotentne ćelije poreklom od fibroblasta izolovanih iz pacijenata sa Volframovim sindromom koji predstavlja redak autozomalno recesivni poremećaj uzrokovan mutacijom u genu *WFS1*. Pojava prvih simptoma dijabetesa se razvija u ranom detinjstvu, zajedno sa oštećenjem optičkog nerva i neurodegeneracijom. Nakon transplantacije genetički korigovanih i diferenciranih beta ćelija u dijabetične miševe dolazi do normalizacije nivoa glukoze u krvi, u toku šestomesečnog perioda posmatranja. Naime, korekcija gena *WFS1* značajno doprinosi povećanju stepena diferencijacije i funkcionisanja beta ćelija u kojima je pokazan niži nivo stresa i apoptotskih markera u odnosu na ćelije u kojima mutacija nije korigovana i koje nakon transplantacije nisu dovele do postizanja kontrole glikemije [54]. Nedavno je pokazano da alati koji se zasnivaju na CRISPR sistemu mogu da se koriste za multipleksno epigenetičko editovanje kako bi se pokrenula ekspresija gena specifičnih za beta ćelije u imortalizovanim humanim embrionalnim ćelijama bubrega (HEK293 ćelijska linija) i humanim indukovanim pluripotentnim ćelijama. Ova studija je pokazala princip usmeravanja ćelijske diferencijacije pomoću istovremenog korišćenja nekoliko 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. CRISPR/dCas9-P300 se pokazao kao najefikasniji u aktivaciji ekspresije svih ciljanih gena, dok kombinacija sva tri testirana sistema nije dala sinergistički efekat [55]. Takođe, CRISPR/dCas9-P300 je delovao najefikasnije kada je bio u kombinaciji sa samo jednom gRNK, čiji je efekat pak zavisio od pozicije na promotoru. Kombinacija 2-3 najefikasnije gRNK nije dala nikakvo poboljšanje u aktivaciji, što je u suprotnosti u odnosu na rezultate koji su dobijeni ispitivanjem sistema za utišavanje genske ekspresije [46].

U februaru 2022. godine je prvi put primenjena VCTX210 alogena terapija matičnim ćelijama koja je dizajnirana da nadomesti gubitak beta ćelija pankreasa u dijabetesu. CyT49 humane pluripotentne matične ćelije su modifikovane uz pomoć CRISPR/Cas9 sistema tako da izbegnu prepoznavanje i napad od strane autoimunskog sistema pacijenata, što bi moglo da omogući eliminaciju imunosupresivne terapije pri transplantaciji. Naime, ćelijskoj liniji CyT49 nedostaje gen *B2M* dok eksprimira CD274 koji je poznat kao progra-

mirani ligand smrti (PD-L1) koji štiti ćelije od napada T ćelija [56]. Ovaj pristup u ćelijskoj terapiji je u fazi 1 kliničkog ispitivanja, i do sada je potvrđeno da je kod prvog pacijenta koji je primio terapiju zabeležena proizvodnja insulina 90 dana od tretmana kao i smanjena upotreba egzogenog insulina za 91% [57, 58].

### Transdiferencijacija alfa ćelija pankreasa

Kao glavni i najatraktivniji alternativni izvor ćelija za transdiferencijaciju u beta ćelije izdvojile su se alfa ćelije endokrinog pankreasa. Pored toga što se njihovim direktnim reprogramiranjem prevazilazi pluripotentno stanje i rizik od maligniteta, prednost koju poseduju alfa ćelije u odnosu na druge tipove ćelija je zajedničko poreklo sa beta ćelijama, visok nivo plastičnosti, bliska pozicioniranost u Langerhansovom ostrvcu i bogata prokrvljenost što obezbeđuje prirodno okruženje pogodno za njihovo preživljavanje i normalno funkcionisanje [52, 59]. Njihovom transdiferencijacijom bi se potencijalno obnovila masa beta ćelija, dok bi se istovremeno smanjio broj alfa ćelija i popravio narušeni balans između insulina i glukagona koji se javlja u dijabetesu [25, 60]. Alfa ćelije imaju sposobnost da se spontano transdiferenciraju u ćelije koje proizvode insulin nekoliko meseci nakon skoro potpunog gubitka beta ćelija kod miševa koji su tretirani toksinom difterije [61]. Veliki potencijal alfa ćelija da se indukovano transdiferenciraju u beta ćelije pokazuju različiti eksperimentalni pristupi koji ističu važnu ulogu transkripcionih faktora specifičnih za beta ćelije kao što su Pax4, PDX1, MafA ili Nkx6-1 [12, 62].

O povezanosti metilacije molekula DNK sa određivanjem ćelijskog identiteta govori i podatak da u odsustvu Dnmt1 i Arx-a iz alfa ćelija pankreasa miša dolazi do njihove transdiferencijacije u beta ćelije [63]. Ulogu Arx-a u određivanju identiteta alfa ćelija endokrinog pankreasa učvrstilo je istraživanje koje je pokazalo da je Arx u beta ćelijama pankreasa metilovan i utišan, dok je u alfa ćelijama i beta ćelijama kojima nedostaje Dnmt1 hipometilovan i aktivan [64]. Rezultati ovog istraživanja inicirali su alternativni put za transdiferencijaciju alfa ćelija pankreasa. Naime, nakon samo jedne transfekcije i ciljanog utišavanja ekspresije isključivo gena Arx koji je krucijalan za održavanje identiteta alfa ćelija dolazi do pokretanja procesa njihove transdiferencijacije i tranzijentne ekspresije, sinteze i oslobađanja insulina iz ovih ćelija [65]. Nakon optimizacije procesa nukleofekcije u cilju efikasnije isporuke sistema za epigenetičko editovanje u alfa ćelijama pankreasa miša ( $\alpha$ TC1-6 ćelijska linija) [26], upoređivan je nivo ekspresije gena Arx nakon primene tri različita konstrukta za gensku represiju. Korišćeni su dCas9-Dnmt3a3L, dCas9-KRAB i dCas9-Dnmt3a3L-KRAB u kombinaciji sa četiri gRNK dizajnirane da obuhvate promotorski region gena Arx [65]. Konstrukat dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L uvodi metilaciju na oko 1000 bp udaljenih od ciljane sekvence, pri čemu su pikovi metilacije na 25 bp uzvodno od i 40 bp nizvodno od pozicije PAM sekvence, dok mesto vezivanja obezbeđeno komplementarnim sparivanjem ciljanog DNK molekula i gRNK u dužini od 20 bp ostaje fizički zaštićeno i nemetilovano [36]. Domen KRAB deluje kao snažan represor transkripcije. On nema enzimatsku funkciju, ali regrutuje proteine utišavače koji modifikuju histone (histonske metiltransferaze, deacetilaze i kompleks za remodelovanje nukleozoma) i DNMT3A/3B, uspostavljajući heterohromatin [46, 66]. Rezultati ciljanog bisulfitnog sekvenciranja su pokazali da je konstrukat dCas9-Dnmt3a3L-KRAB (EpiCRISPR) bio najefikasniji u uvođenju metilacije. EpiCRISPR konstrukat predstavlja fuzioni protein koji sadrži katalitički domen mišijeg Dnmt3a, C-terminalni domen Dnmt3L i KRAB domen koji su kuplovani sa katalitički neaktivnim dCas9. Uvedena metilacija je za posledicu imala 45% niži nivo ekspresije iRNK za Arx do 7. dana od nukleofekcije, a nakon 12 dana se ekspresija podigla na početni nivo. Iako iRNK za Cas9 nije detektovana u ovom periodu, uvedena metilacija je ostala bliža nivou detektovanom u beta ćelijskoj liniji nego inicijalnom nivou u alfa ćelijama. U 1% tranzijentno transfekovanih (reprogramiranih) alfa ćelija insulin je detektovan na nivou iRNK i proteina unutar i nakon oslobađanja iz ćelija do 15. dana nakon transfekcije. Iako nisu detektovane pro-



mene u nivou iRNK za glukagon, ove ćelije ga u manjoj meri sekretuju u odnosu na lažno transfekovane ćelije. Rezultati analize transkripcionog profila epigenetički modifikovanih alfa ćelija pokazuju da je on sličniji profilu kontrolnih alfa nego beta ćelija iako je došlo do pokretanja ekspresije *Slc2a2* kao i *Pax4* i *MafA* na nivou iRNK (Slika 3). Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje mehanizama koji održavaju identitet alfa ćelija i odupiru se promenama na nivou epigenoma. Takođe, zaključeno je i da se metilacija *Arx*-a može posmatrati kao neophodan signal za pokretanje ekspresije *Ins2* u alfa ćelijama [65]. Eksperimentalno je pokazano da editovanje epigenoma uz pomoć DNMT3A-dCas9 i KRAB-dCas9 dovodi do prolazne metilacije molekula DNK i trimetilacije histona H3 na lizinu 9 i da ove modifikacije potpuno nestaju 24 dana nakon tretmana. Ustanovljeno je da su za maksimalnu represiju gena neophodne različite kombinacije histonskih modifikacija i metilacije molekula DNK odnosno fino podešavanje alata za editovanje u zavisnosti od lokusa i tipa ćelija [67].

Krajnji cilj ćelijskog reprogramiranja nije "perfektna" beta ćelija, koja u potpunosti odgovara zreloj beta ćeliji endokrinog pankreasa kako bi ostvarila terapijski potencijal. Nju pre svega treba da karakteriše odsustvo rizika od tumorigeneze ili hipoglikemijskih efekata kao i izdržljivost, da oslobađa dovoljno insulina i da reaguje na stimulaciju glukozom [52].

## **ZAKLJUČAK:**

Inspirisano prirodnom pojavom spontane promene identiteta terminalno diferenciranih tipova ćelija usled promena iz okruženja kao i zahvaljujući razvoju alata za editovanje (epi)genoma javio se novi pravac u razvoju potencijalnih tretmana dijabetesa. Saznanja koja su dobijena iz rezultata brojnih uspešno realizovanih pokušaja ćelijske transdiferencijacije iskorišćena su za razjašnjenje osnova mehanizama ovog procesa, dok su sa druge strane otvorena i mnoga pitanja koja se tiču sposobnosti zadržavanja novonastalog stanja odn. tendencije ka vraćanju u pređašnje stanje. Postojanje mogućnosti uticanja na reprogramiranje ćelijskog identiteta pruža veliki značaj za modelovanje mnogih kompleksnih bolesti kao i potencijal za prevođenje u terapijske svrhe. Rezultat svih uloženi istraživačkih napora su klinička ispitivanja koja uključuju CRISPR terapiju za različite bolesti, uključujući i dijabetes i koja su uglavnom u prvoj fazi ispitivanja.

## **ZAHVALNICA:**

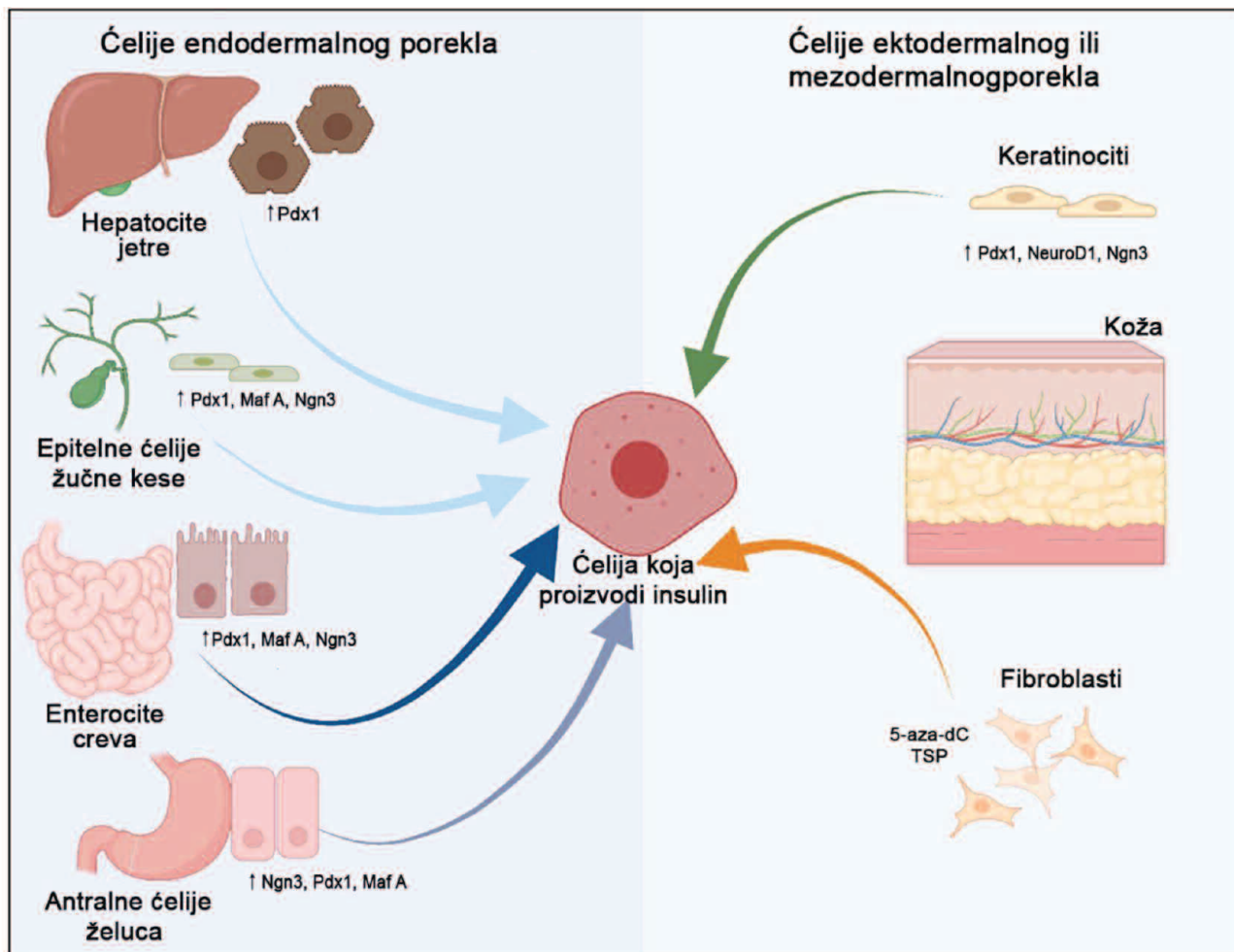
Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj ugovora: 451-03-47/2023-01/ 200007 i Evropskoj federaciji za istraživanja u dijabetesu (engl. *European Foundation for the Study of Diabetes* EFSD), Evropskim istraživačkim programom u ćelijskoj plastičnosti koja se nalazi u osnovi patofiziologije dijabetesa tipa 2. Autori se zahvaljuju dr Tomašu P. Jurkovskom sa Univerziteta u Kardifu na njegovoj stručnoj pomoći i prijateljstvu, kao i na plazmidima za gensku represiju.

**LITERATURA:**

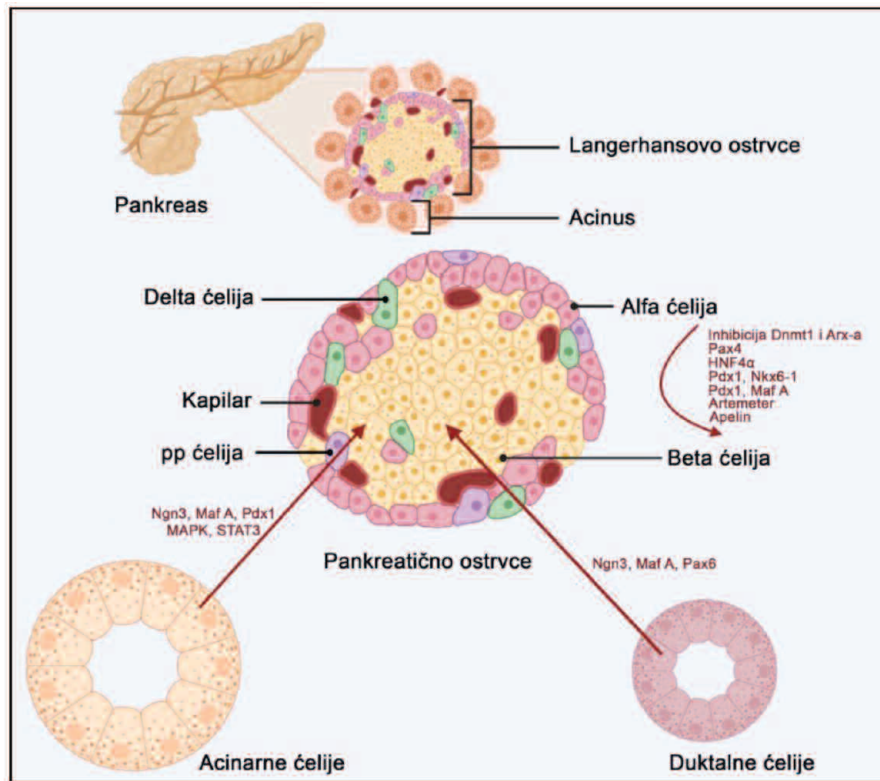
1. Tschen SI, Dhawan S, Gurlo T, Gurlo T, Bhushan A. Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. *Diabetes* 2009;58 (6): 1312–1320.
2. Donath MY, Halban PA. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. *Diabetologia* 2004;47 (3): 581-9.
3. Cornell S. Continual evolution of type 2 diabetes: an update on pathophysiology and emerging treatment options. *Ther Clin Risk Manag* 2015;11: 621-32.
4. Michels AW, Redondo MJ, Atkinson MA. The pathogenesis, natural history, and treatment of type 1 diabetes: time (thankfully) does not stand still. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2022;10 (2): 90-2.
5. Ackermann AM, Gannon M. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol* 2007;38 (1-2): 193-206.
6. Basile G, Qadir MMF, Mauvais-Jarvis F, Vetere A, Shoba V, Modell AE, et al. Emerging diabetes therapies: Bringing back the  $\beta$ -cells. *Molecular Metabolism* 2022;60: 101477.
7. Khurana I, Al-Hasani K, Maxwell S, K.N Harikrishan, Okabe J, Cooper ME, et al. DNA methylation status correlates with adult  $\beta$ -cell regeneration capacity. *NPJ Regenerative Medicine* 2021;6 (1): 7.
8. Ghoneim MA, Refaie AF, Elbassiouny BL, Gabr MM, Zakaria MM. From Mesenchymal Stromal/Stem Cells to Insulin-Producing Cells: Progress and Challenges. *Stem Cell Rev Rep* 2020;16 (6): 1156-72.
9. Goell JH, Hilton IB. CRISPR/Cas-Based Epigenome Editing: Advances, Applications, and Clinical Utility. *Trends in Biotechnology* 2021;39 (7): 678-91.
10. Kalra RS, Dhanjal JK, Das M, Singh B, Naithani R. Cell Transdifferentiation and Reprogramming in Disease Modeling: Insights into the Neuronal and Cardiac Disease Models and Current Translational Strategies. *Cells* 2021;10 (10): 2558.
11. Borowiak M, Melton DA. How to make beta cells? *Curr Opin Cell Biol* 2009;21 (6): 727-32.
12. Kalo E, Read S, Ahlenstiel G. Reprogramming-Evolving Path to Functional Surrogate  $\beta$ -Cells. *Cells* 2022;11 (18): 2183.
13. Ariyachet C, Tovaglieri A, Xiang G, Lu J, Shah MS, Richmond CA, et al. Reprogrammed Stomach Tissue as a Renewable Source of Functional  $\beta$  Cells for Blood Glucose Regulation. *Cell stem cell* 2016;18 (3): 410-21.
14. Mauda-Havakuk M, Litichever N, Chernichovski E, Nakar O, Winkler E, Mazkereth R, et al. Ectopic PDX-1 expression directly reprograms human keratinocytes along pancreatic insulin-producing cells fate. *PLOS ONE* 2011;6 (10): 18.
15. Salman IS, Al-Shammari AM, Habu MK. Direct Reprogramming of Mice Skin Fibroblasts into Insulin-Producing Cells In Vitro. *Cell Reprogram* 2022;24 (5): 271-82.
16. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, et al. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nature medicine* 2020;6 (5), 568–572.
17. Hickey RD, Galivo F, Schug J, Brehm MA, Haft A, Wang Y, et al. Generation of islet-like cells from mouse gall bladder by direct ex vivo reprogramming. *Stem cell research* 2013;11 (1), 503–515.
18. Fontcuberta-PiSunyer M, García-Alamán A, Prades È, Téllez N, Alves-Figueiredo H, Ramos-Rodríguez M, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts into insulin-producing cells using transcription factors. *Communications Biology* 2023;6 (1): 256.
19. Li W, Nakanishi M, Zumsteg A, Shear M, Wright C, Melton DA, et al. In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine subtypes. *eLife* 2014;3: e01846.
20. Lee J, Sugiyama T, Liu Y, Wang J, Gu X, Lei J, et al. Expansion and conversion of human pancreatic ductal cells into insulin-secreting endocrine cells. *eLife* 2013;2: e00940.
21. Kim HJ, Bae SC. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American journal of translational research* 2011;3 (2): 166-79.
22. Esposito S, Toni G, Tascini G, Santi E, Berioli MG, Principi N. Environmental Factors Associated With Type 1 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10: 592.
23. Heerboth S, Lapinska K, Snyder N, Leary M, Rollinson S, Sarkar S. Use of epigenetic drugs in disease: an overview. *Genet Epigenet* 2014;6: 9-19.
24. Pfister SX, Ashworth A. Marked for death: targeting epigenetic changes in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 2017;16 (4): 241–263.
25. van der Meulen T, Huising MO. Role of transcription factors in the transdifferentiation of pancreatic islet cells. *J Mol Endocrinol* 2015;54 (2): R103-17.

26. Đorđević M, Paunović V, Jovanović Tucović M, Tolić A, Rajić J, Dinić S, et al. Nucleofection as an Efficient Method for Alpha TC1-6 Cell Line Transfection. *Applied Sciences* 2022;12 (15): 7938.
27. Wang H, Yang Y, Liu J, Qian L. Direct cell reprogramming: approaches, mechanisms and progress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021;22 (6): 410-24.
28. Mills JC, Stanger BZ, Sander M. Nomenclature for cellular plasticity: are the terms as plastic as the cells themselves? *The EMBO Journal* 2019;38 (19): e103148.
29. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* 2007;128 (4): 635-8.
30. Waddington CH. Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature* 1959;183 (4676): 1654-1655.
31. Parveen N, Dhawan S. DNA Methylation Patterning and the Regulation of Beta Cell Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021;12: 651258.
32. Moore LD, Le T, Fan G. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38 (1): 23-38.
33. Golson ML, Kaestner KH. Epigenetics in formation, function, and failure of the endocrine pancreas. *Molecular Metabolism* 2017;6 (9): 1066-76.
34. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* 2013;14 (3): 204-20.
35. Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: The nuts and bolts of repression. *Journal of Cellular Physiology* 2007;213 (2): 384-90.
36. Stepper P, Kungulovski G, Jurkowska RZ, Chandra T, Krueger F, Reinhardt R, et al. Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 2017;45 (4): 1703-13.
37. Falahi F, van Kruchten M, Martinet N, Hospers G, Rots MG. Current and upcoming approaches to exploit the reversibility of epigenetic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2014;16 (4): 412.
38. de Groote ML, Verschure PJ, Rots MG. Epigenetic Editing: targeted rewriting of epigenetic marks to modulate expression of selected target genes. *Nucleic acids research* 2012;40 (21): 10596-613.
39. Ou K, Yu M, Moss NG, Wang YJ, Wang AW, Nguyen SC, et al. Targeted demethylation at the CDKN1C/p57 locus induces human  $\beta$  cell replication. *The Journal of Clinical Investigation* 2019;129 (1): 209-14.
40. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014;346 (6213): 1258096.
41. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014;157 (6): 1262-78.
42. Barrangou R and Marraffini RB. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular cell* 2014;54 (2): 234-244.
43. Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 2012;482 (7385): 331-8.
44. Thakore PI, Black JB, Hilton IB, Gersbach CA. Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nat Methods* 2016;13 (2): 127-37.
45. Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2020;5 (1): 1.
46. Amabile A, Migliara A, Capasso P, Biffi M, Cittaro D, Naldini L, et al. Inheritable Silencing of Endogenous Genes by Hit-and-Run Targeted Epigenetic Editing. *Cell* 2016;167 (1): 219-32.
47. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989;244 (4910): 1288-92.
48. Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res* 2013;23 (10): 1163-71.
49. Choudhury SR, Cui Y, Lubecka K, Stefanska B, Irudayaraj J. CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter. *Oncotarget* 2016;7 (29): 46545-56.
50. Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, P R Iyer E, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature Methods* 2015;12 (4): 326-8.
51. Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nature Biotechnology* 2015;33 (5): 510-7.
52. Colarusso JL, Zhou Q. Direct Reprogramming of Different Cell Lineages into Pancreatic  $\beta$ -Like Cells. *Cellular Reprogramming* 2022;24 (5): 252-8.
53. Liao H-K, Hatanaka F, Araoka T, Reddy P, Wu M-Z, Sui Y, et al. In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation. *Cell* 2017;171 (7): 1495-507.e15.

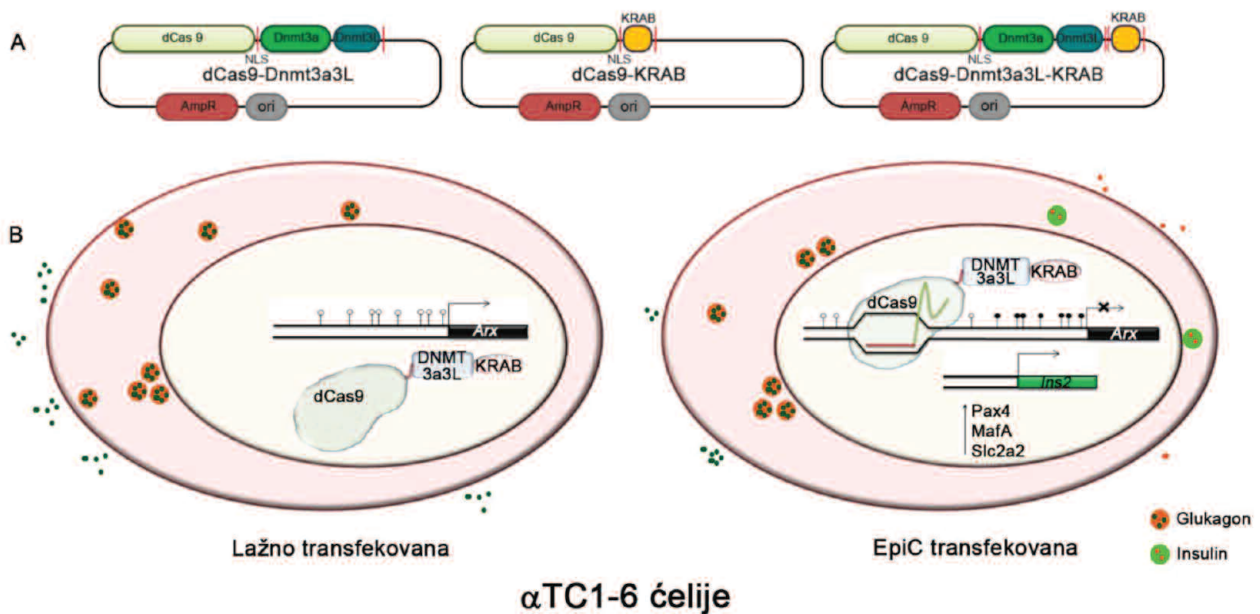
54. Maxwell KG, Augsornworawat P, Velazco-Cruz L, Kim MH, Asada R, Hoglebe NJ, et al. Gene-edited human stem cell-derived  $\beta$  cells from a patient with monogenic diabetes reverse preexisting diabetes in mice. *Sci Transl Med* 2020;12 (540): eaax9106.
55. Alejandra GC, Lucia C, Ho HS, Luis G, Juan RP, Federico P-B. Activation of pancreatic  $\beta$ -cell genes by multiplex epigenetic CRISPR-editing. *BioRxiv* 2020:2020.07.24.214544.
56. Ilic D, Ogilvie C. Pluripotent Stem Cells in Clinical Setting-New Developments and Overview of Current Status. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2022;40 (9): 791-801.
57. Philippidis A. First Patient Dosed with VCTX210, a Cell Therapy for Type 1 Diabetes. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 2022;42 (5): 10-1.
58. Yang L, Hu ZM, Jiang FX, Wang W. Stem cell therapy for insulin-dependent diabetes: Are we still on the road? *World journal of stem cells* 2022;14 (7): 503-12.
59. Saleh M, Gittes GK, Prasad K. Alpha-to-beta cell trans-differentiation for treatment of diabetes. *Biochemical Society Transactions* 2021;49 (6): 2539-48.
60. Unger RH, Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest* 2012;122 (1): 4-12.
61. Thorel F, Népote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, et al. Conversion of adult pancreatic  $\alpha$ -cells to  $\beta$ -cells after extreme  $\beta$ -cell loss. *Nature* 2010;464 (7292): 1149-54.
62. Guo P, Zhang T, Lu A, Shiota C, Huard M, Whitney KE, et al. Specific reprogramming of alpha cells to insulin-producing cells by short glucagon promoter-driven Pdx1 and MafA. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 2023;28: 355-65.
63. Chakravarthy H, Gu X, Enge M, Dai X, Wang Y, Damond N, et al. Converting adult pancreatic islet  $\alpha$  cells into  $\beta$  cells by targeting both Dnmt1 and Arx. *Cell metabolism* 2017;25 (3): 622-34.
64. Dhawan S, Georgia S, Tschen SI, Fan G, Bhushan A. Pancreatic  $\beta$  cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of Arx. *Dev Cell* 2011;20 (4): 419-29.
65. Đorđević M, Stepper P, Feuerstein-Akgoz C, Gerhauser C, Paunović V, Tolić A, et al. EpiCRISPR targeted methylation of Arx gene initiates transient switch of mouse pancreatic alpha to insulin-producing cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2023;14: 1134478.
66. Groner AC, Meylan S, Ciuffi A, Zangger N, Ambrosini G, Déneraud N, et al. KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS Genet* 2010;6 (3): 1000869.
67. O'Geen H, Bates SL, Carter SS, Nisson KA, Halmaj J, Fink KD, et al. Ezh2-dCas9 and KRAB-dCas9 enable engineering of epigenetic memory in a context-dependent manner. *Epigenetics & Chromatin* 2019;12 (1): 26.



Slika 1. Somatske ćelije kao izvor ćelija za transdiferencijaciju u ćelije koje proizvode insulin. Ćelije endodermalnog porekla su hepatocite, epitelne ćelije žučne kese, ćelije intestinalnih kripti i antralne ćelije želuca; ćelije ektodermalnog porekla su keratinociti, a fibroblasti su mezodermalnog porekla. Pored tipa ćelija dat je spisak transkripcionih faktora ili tretmana koji su primenjeni u cilju transdiferencijacije. (Preuzeto i modifikovano od Kalo i sar., 2022) [12].



**Slika 2.** Shematski prikaz Langerhansovog ostrvca i pokušaja transdiferencijacije pankreatičnih ćelija u ćelije koje proizvode insulin. Pored crvenih strelica su pobrojani transkripcioni faktori i njihove kombinacije ili hemijski agensi koji su korišćeni u eksperimentima za indukciju ćelijske transdiferencijacije (Preuzeto i modifikovano od Kalo i sar., 2022) [12].



**Slika 3.** Metilacija promotora *Arx*-a dovodi do pokretanja ekspresije *Ins2* u alfa ćelijama (αTC1-6 ćelijska linija). **A)** Shematski prikaz konstrukata koji su korišćeni za dirigovanu represiju *Arx* gena. **B)** „Lažno“ transfekovanim alfa ćelijama nedostaju četiri gRNK uz pomoć kojih se dCas9-Dnmt3a3L-KRAB konstrukti vezuju za promotore *Arx* gena. U EpiC transfekovanim ćelijama (ćelije transfekovane kombinacijom plazmida koji nose dCas9-Dnmt3a3L-KRAB konstrukti, repaterski konstrukti i 4 gRNK za *Arx*) se nakon smanjene ekspresije *Arx*-a beleži pokretanje ekspresije insulina na nivou iRNK i proteina, kao i pokretanje ekspresije *Pax4*, *MafA* i *Slc2a2* koji su karakteristični za beta ćelije pankreasa (Preuzeto i prilagođeno od Đorđević i sar., 2023) [65].

CIP - Каталогизacija y publikaciji  
Народна библиотека Србије, Београд

577.2

**TRENDOVI u molekularnoj biologiji** = Trends in  
Molecular Biology. - 2021, br. 1 (sep.)- . - Beograd :  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
2021- (Beograd : Curent Print). - 28 cm

Godišnje. - Tekst na srp. i engl. jeziku.  
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji  
COBISS.SR-ID 45105929