

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Vývojová a buněčná biologie



Mgr. Ondřej Smolík

Vývoj a ztráta funkce endokrinní tkáně pankreatu
Development and dysfunction of pancreatic endocrine cells

Typ závěrečné práce:

Disertační práce

Vedoucí práce:

RNDr. Gabriela Pavlínková, Ph.D.

Praha, 2024

Charles University

Faculty of Science

Study programme: Developmental and cell biology



Mgr. Ondřej Smolík

Development and dysfunction of pancreatic endocrine cells

Vývoj a ztráta funkce endokrinní tkáně pankreatu

Type of thesis:

Doctoral thesis

Supervisor:

RNDr. Gabriela Pavlínková, Ph.D.

Prague, 2024

Prohlášení:

Závazně prohlašuji, že jsem práci sepsal samostatně, všechny použité zdroje a literatura jsou v práci řádně citovány a práce nebo její podstatná část nebyla využita jako závěrečná práce k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Poděkování:

Děkuji své školitelce za odborné vedení dizertačního projektu.

Děkuji Ivě, Žandě, Pětě a Kačce za přátelství a oporu nejen v dobách největší tmy a za skutečnou týmovou práci.

Děkuji své rodině za konstantní podporu a naslouchání.

Děkuji Monice za to, že byla mým průvodcem na cestě za poznáním sebe i druhých.

Děkuji Raffaelovi, Melisse, Gemmě a Archaně za to, že oživili mé nadšení a víru ve vědu.

Děkuji Lee za přínosnou přátelskou kritiku a chuť poznávat mezinárodní vědu.

Děkuji svým nejbližším, těm, kteří se mnou šli alespoň kousek cesty a věřili mi.

A děkuji Jakobovi za to, že mě držel za ruku v cílové rovině.

„When the darkness fades in, that’s when all the stars align.“

Obsah

1.	Abstrakt	1
2.	Úvod	3
2.1.	<i>Diabetes mellitus.....</i>	3
2.1.1.	Klasifikace diabetu	4
2.1.2.	Regulace glykémie a inzulínová sekrece	4
2.1.3.	Současná léčba a budoucí terapeutické směřování.....	7
2.2.	<i>Struktura funkce a pankreatu.....</i>	9
2.2.1.	Langerhansovy ostrůvky	10
2.3.	<i>Molekulární regulace vývoje pankreatu.....</i>	13
2.3.1.	Specifikace pankreatických progenitorů	15
2.3.2.	Specifikace pankreatických endokrinních progenitorů.....	16
2.3.3.	Diferenciace a maturace endokrinních buněk pankreatu	16
2.3.4.	Jednobuněčné transkriptomické studie endokrinní tkáně	18
2.3.5.	Pioneer faktory	19
2.4.	<i>NEUROD1</i>	19
2.4.1.	Role NEUROD1 ve vývoji a funkci endokrinní části pankreatu	20
2.4.2.	Role NEUROD1 v determinaci a reprogramování buněčného osudu	22
2.5.	<i>ISL1.....</i>	24
2.5.1.	Role ISL1 ve vývoji a funkci endokrinní části pankreatu	24
2.5.2.	Role ISL1 v determinaci buněčného osudu	26
3.	Přehled publikací	28
3.1.	NEUROD1 is required for the early α and β endocrine differentiation in the pancreas	28
3.2.	NEUROD1 reinforces endocrine cell fate acquisition in pancreatic development	28
3.3.	ISL1 controls pancreatic α cell fate and β cell maturation	29
3.4.	ISL1 is necessary for auditory neuron development and contributes toward tonotopic organization.....	30
3.5.	NEUROD1: transcriptional and epigenetic regulator of human and mouse neuronal and endocrine cell lineage programs	30
4.	Výsledky a metody.....	32
4.1.	<i>Vybraná imunohistochemická barvení a fluorescenční mikroskopie.....</i>	32

4.1.1.	NEUROD1	32
4.1.2.	Tyrosin hydroxyláza	34
4.1.3.	GLP1	35
4.2.	<i>Metody</i>	36
4.2.1.	Kvantitativní PCR s přímou buněčnou lyzí	36
4.2.2.	Mezimodelové srovnání diferenciální genové exprese	37
4.2.3.	Optimalizace metody CUT&Tag sekvenování	38
4.2.4.	Optimalizace izolace a přípravy sekvenačních knihoven malých RNA molekul	40
5.	Diskuze	45
5.1.	<i>ISL1 a NEUROD1 jako faktory determinující vývoj a zránění endokrinních buněk pankreatu</i>	45
5.1.1.	Vliv na diferenciaci a zránění beta linie	46
5.1.2.	Vliv na diferenciaci a zránění alfa linie	47
5.1.3.	Dopad eliminace na endokrinní progenitory	48
5.1.4.	Vliv na ostatní endokrinní buněčné linie	50
5.2.	<i>Vztah mezi transkripční regulací NEUROD1 a ISL1 na remodelaci chromatinu</i>	51
5.3.	<i>Limitace využitých biologických modelů</i>	54
5.4.	<i>Význam a budoucí směřování výzkumu transkripční regulace endokrinní tkáně pankreatu</i>	55
5.5.	<i>Závěr</i>	56
6.	Shrnutí	57
7.	Doprovodné oddíly	58
7.1.	<i>Seznam zkratk</i>	58
7.2.	<i>Seznam primárních protilátek</i>	59
7.3.	<i>Seznam chemikálií</i>	59
7.4.	<i>Reference</i>	60

1. Abstrakt

Incidence diabetu dlouhodobě světově roste a hledání nových terapeutických přístupů narůstá na významu. Cílem je nalezení funkční náhrady za dysfunkční pankreatickou endokrinní tkáň, konkrétně beta buňky produkující inzulín. Významný potenciál se nachází v reprogramování příbuzných buněčných typů, které vzájemně sdílí blízké vývojové progenitory. Znalost transkripčně regulačních sítí řídících proces endokrinní specifikace a diferenciaci by mohla vést v budoucnu k cílené buněčné terapii *in situ* či *in vitro*. Endokrinní linie je ve vyvíjejícím se pankreatu specifikována expresí *Neurog3*, který iniciuje komplexní kaskádu reorganizace chromatinu a kaskádovitou časově specifickou expresi genů vedoucí ke vzniku všech endokrinních buněčných typů z multipotentních progenitorů. Role mnoha těchto genů však není dosud objasněna. Tato dizertační práce se soustředí na *NEUROD1* a *ISL1*, dva klíčové transkripční faktory nezbytné pro endokrinní vývoj a funkci. Oba faktory indukují během vývoje specifické diferenciační programy v jiných buněčných typech, kde reorganizují chromatin. Pomocí pokročilé analýzy fenotypu tkáňově specifických delecí těchto faktorů v myším modelu, molekulárně genetických přístupů (RT-qPCR, RNA-seq) a epigenomického profilování (CUT&Tag-seq) se podařilo identifikovat vliv těchto faktorů na časovou diferenciaci, proliferaci a zrání endokrinních buněk, zejména u alfa a beta linie. Eliminace těchto faktorů narušuje molekulární mechanismy transkripční regulace na úrovni chromatinu a tím dochází k diferenciační zástavě či zpoždění ve stádiu endokrinních progenitorů, což dále vede k defektu v morfogenezi Langerhansových ostrůvků a ztrátě endokrinní tkáně. Zrání zbývající endokrinní populace je ovlivněno zachováním nematurovaných znaků a vyúsťuje v poruchu hormonální exprese a závažný diabetický fenotyp. Tyto výsledky potvrzují zásadní význam *NEUROD1* a *ISL1* ve vývoji a funkci endokrinní tkáně pankreatu a poskytují nový mechanistický vhled na molekulární podstatu jejich genově regulační funkce.

The global incidence of diabetes has been steadily increasing, highlighting the urgent need for innovative therapeutic strategies. One promising approach is to develop functional replacements for dysfunctional pancreatic endocrine tissue, particularly insulin-producing beta cells. Reprogramming related cell types that share common developmental progenitors holds significant potential. A deeper understanding of the transcriptional regulatory networks that govern endocrine specification and differentiation could pave the way for targeted cell therapies, both *in situ* and *in vitro*. In the developing pancreas, the endocrine lineage is specified by the expression of *Neurog3*, which triggers a complex cascade of chromatin reorganization and temporally specific gene expression, leading to the formation of all endocrine cell types from multipotent progenitors. However, the roles of many of these genes remain unclear. This dissertation focuses on *NEUROD1* and *ISL1*, two critical transcription factors essential for endocrine development and function. These factors induce specific differentiation programs in other non-pancreatic cell types during development, reorganizing chromatin in the process. Through advanced phenotypic analysis of tissue-specific deletions of these factors in a mouse model, along with molecular genetic approaches (RT-qPCR, RNA-seq) and epigenomic profiling (CUT&Tag-seq), we have identified the impact of these factors on the early differentiation, proliferation, and maturation of pancreatic endocrine cells, particularly within the alpha and beta lineages. The absence of these factors disrupts the molecular mechanisms of transcriptional regulation at the chromatin level, leading to differentiation arrest or delay at the endocrine progenitor stage. This disruption results in defects in the morphogenesis of the islets of Langerhans and a loss of endocrine tissue. The maturation of the remaining endocrine population is compromised, retaining immature characteristics and resulting in impaired hormone expression and a severe diabetic phenotype. These findings underscore the crucial roles of *NEUROD1* and *ISL1* in the development and function of pancreatic endocrine tissue and provide new mechanistic insights into the molecular basis of their gene regulatory functions.

2. Úvod

Tato část dizertační práce uceleně uvozuje do problematiky a stručně shrnuje současné znalosti relevantních témat se zaměřením na funkci a vývoj endokrinní tkáně pankreatu. Vzhledem k experimentální povaze výzkumu se většina textu věnuje vybrané problematice z hlediska systematické biologie použitému biologickému modelu, tedy myši domácí (*Mus musculus*), v širším kontextu souvisejících patologií pak člověku (*Homo sapiens sapiens*), pokud není uvedeno jinak.

2.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (cukrovka, úplavice cukrová) je komplexním druhem onemocnění, na kterém se podílí faktory genetické, environmentální a imunologické. Příčinou diabetu je zvýšená hladina glukózy v krvi (hyperglykémie), která je způsobená absolutním, či relativním nedostatkem inzulínu produkovaného beta buňkami slinivky břišní (Češka et al. 2020). Za objev tohoto hormonu byla před sto lety (v roce 1923) udělena Nobelova cena za fyziologii a lékařství (March et al. 2022).

V současnosti je podle Světové zdravotnické organizace (WHO) diabetes jednou z deseti globálně nejčastějších příčin úmrtí ('Webpage - WHO: Diabetes' 2023). Podle údajů Mezinárodní diabetologické federace (IDF) v roce 2021 postihovala tato chronická metabolická patologie celosvětově 9,8 % dospělé populace, tj. přibližně 537 milionů lidí, a její incidence meziročně stále narůstá ('Webpage - IDF: Facts & Figures' 2023). Epidemický vývoj posledních desetiletí, který je často spojován s „moderním způsobem života“, je alarmující a vyžaduje odbornou i veřejnou pozornost, neboť nejnovější datové modely predikují pro rok 2045 nárůst celosvětově o dalších 247 milionů případů diabetu u dospělých na výsledných 11,2 % světové populace ('Webpage - Diabetes Atlas: Global Diabetes Data Report 2000 — 2045' 2023). U takového nárůstu se očekává mimo zátěže na zdravotnický systém i významný socioekonomický dopad globálního charakteru (Rowley et al. 2017; Khan et al. 2019). Každý druhý diabetik navíc netuší, že diabetem trpí (Saeedi et al. 2019).

Situace proto vyžaduje edukaci populace, zavedení důsledných preventivních opatření a prohloubení znalostí etiologie tohoto onemocnění i souvisejících biologických procesů, které pomohou nalézt nové způsoby dostupné a efektivní terapie.

2.1.1. Klasifikace diabetu

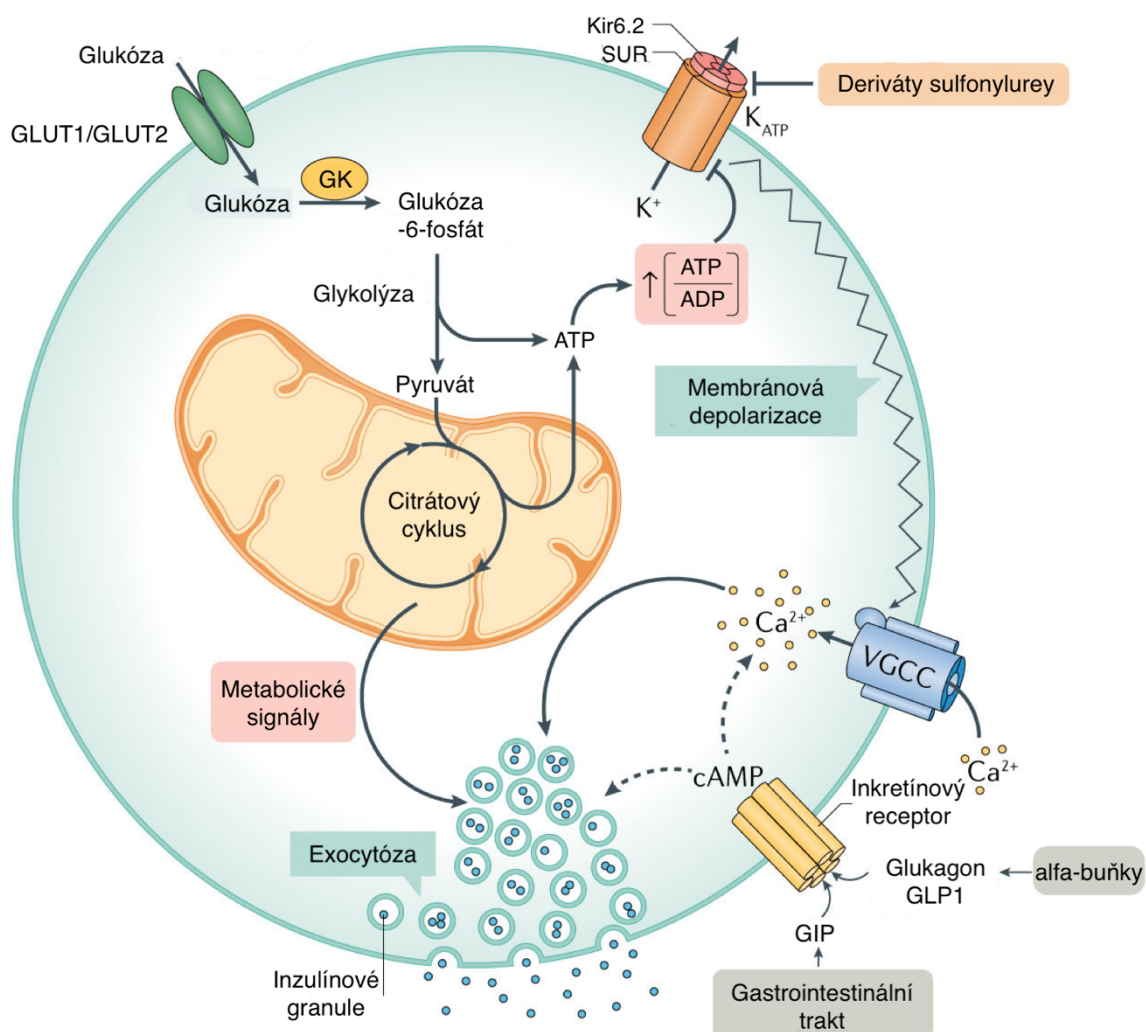
Diabetes rozdělujeme do tří základních skupin podle příčiny jeho vzniku (Češka et al. 2020).

- Typ 1 (T1DM): autoimunitně podmíněný, kdy buňky imunitního systému pacienta aktivně napadnou a eliminují buněčnou populaci beta buněk. Tento typ tvoří zhruba 5 % případů a manifestuje se často již v dětství a dospívání před 20. rokem života.
- Typ 2 (T2DM): s převažující poruchou sekrece, či působení inzulínu, kdy beta buňky pacienta mají sníženou citlivost vůči inzulínové signalizaci (tzv. inzulínová rezistence) anebo poruchu jeho sekrece. Tento typ zastupuje zhruba 93 % případů a vyskytuje se zejména u dospělé populace. Hojně navazuje na metabolický syndrom.
- Ostatní: zbývající typy činí kolem 2 % případů a lze mezi ně zařadit gestační diabetes či řadu méně běžných forem diabetu. Patří sem i geneticky (monogenně) podmíněné formy diabetu objevující se před 25. rokem života (MODY, „Maturity Onset Diabetes of the Young“)(Hoffman et al. 2023), kterých rozlišujeme více než 14 na základě dysfunkčního genu způsobujícího defekt v mechanismu inzulínové sekrece. Nejčastěji se jedná o MODY 1 (*HNF4A*), MODY 2 (*GCK*) a MODY 3 (*HNF1A*).

2.1.2. Regulace glykémie a inzulínová sekrece

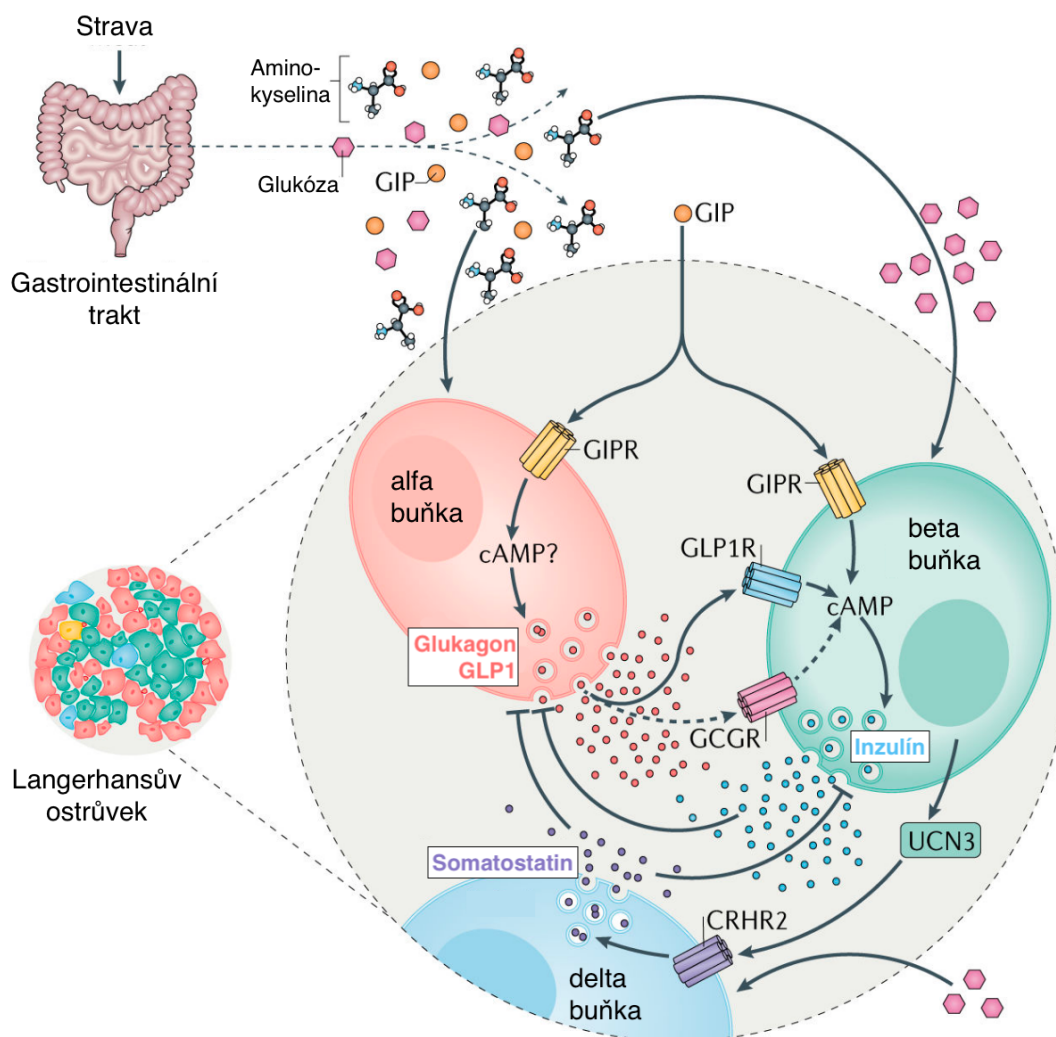
Klíčem pro regulaci glykémie je aktivovaná inzulínová signalizace, která skrze vnější buněčné inzulínové receptory umožňuje glukóze jako hlavnímu metabolickému zdroji energie (ATP) intracelulární vstup do buněčného lumen (Češka et al. 2020). Beta buňky citlivě detekují hladinu glukózy a reagují na glykemické výkyvy uvolněním inzulínu do krve procesem tzv. glukózou stimulované inzulínové sekrece (GSIS). U lidských buněk je import glukózy do beta buněk zprostředkován transportéry GLUT1 a GLUT3, zatímco u myši je to GLUT 2. Tento mezidruhový rozdíl hraje roli v citlivosti jejich odpovědí (Rorsman and Braun 2013).

Proces GSIS (Obrázek 1)(J. E. Campbell and Newgard 2021) je spouštěn iniciačními signály (celé šipky) a zesilován amplifikačními signály (přerušované šipky). Limitujícím faktorem odpovědi je kapacita glukokinázy (GK), která fosforylací moderuje vstup molekul



Obrázek 1: **Základní signalizační dráhy glukózou stimulované sekrece inzulínu (GSIS) v beta buňkách** (převzato a upraveno dle Campbell and Newgard 2021)[z důvodu rozsahu popsáno v textu]

glukózy do glykolýzy, oxidace, citrátového cyklu a tím generaci ATP. Navýšení poměru ATP vůči ADP intracelulárně ústí v uzavření sodných kanálů (K_{ATP}), způsobuje membránovou depolarizaci a následné otevření napětově řízených vápenatých kanálů (VGCC). Intracelulární navýšení vápenatých iontů iniciuje exocytózu inzulínových granul. GK a K_{ATP} kanály hrají tedy nejdůležitější roli v regulaci inzulínové sekrece, což dokazuje nejen řada lidských patologií (včetně MODY) spojených s mutacemi kódujícími zúčastněné proteiny a jejich podjednotky (Osbak et al. 2009; Matschinsky and Wilson 2019), ale i řada farmakologických strategií regulujících právě funkci K_{ATP} kanálů (Shimomura and Maejima 2017; Pipatpolkai et al. 2020). Amplifikační signály jsou závislé na membránové depolarizaci a podílí se na nich cyklický AMP (cAMP) a dále glukagon s inkretiny (GIP a



Obrázek 2: **Další hormony ovlivňující sekreci inzulínu** (převzato a upraveno dle Campbell and Newgard 2021)

[z důvodu rozsahu popsáno pouze v textu]

GLP1), které jsou produkovány alfa buňkami¹ a buňkami gastrointestinálního traktu během trávení, kdy se navyšuje koncentrace glukózy a aminokyselin v krvi (Obrázek 2)(J. E. Campbell and Newgard 2021). Aktivace GIP nebo GLP1 receptorů (GIPR, GLP1R) alfa buněk, resp. beta buněk, stimuluje GSIS skrze cAMP. GIP také stimuluje alfa buněčnou sekreci glukagonu doposud neobjasněnou drahou iniciovanou volnými aminokyselinami. Glukagon působí všeobecně jako antagonist inzulínu (reguluje tedy glykémii během hladovění) a naopak. Rozdílná citlivost na glukózu alfa a beta buněk je zajištěna diferenciální expresí glukózových transportérů GLUT1 a GLUT2 (Gromada, Chabosseau, and Rutter 2018). Současné poznatky ovšem poukazují na jejich kooperaci během GSIS.

¹ Další typ endokrinních buněk, více v kapitole Langerhansovy ostrůvky

Alfa buňky produkují z preglukagonového polypeptidového prekurzoru glukagon i alternativně zpracovaný GLP1 a oba navyšují cAMP v beta buňkách během odpovědi na trávení skrze GLP1R a v menší míře (přerušovaná šipka) skrze glukagonový receptor (GCGR). Proto GIP stimuluje GSIS přímo na úrovni beta buněk a nepřímo (parakrinně) přes alfa buňky. Urocortin 3 (UCN3) produkovaný beta buňkami navíc parakrinně posiluje aktivitu delta buněk² a navyšuje sekreci somatostatinu skrze CRHR2 receptory. Zvýšená sekrece somatostatinu inhibuje beta buněčnou sekreci a zprostředkovává tak negativní zpětnou vazbu. Somatostatin reguluje rovněž i sekreci glukagonu (Briant et al. 2018).

V případě, kdy inzulínová signalizace nefunguje (Sprague and Arbeláez 2011), je hypoglykemická buňka odkázaná na alternativní zdroje ATP, například procesem glukoneogeneze, glykogenolýzy či katabolismu tuků. Ten je spřažen s produkcí ketoláték. Osmotická aktivita glukózy a vedlejších reakčních produktů způsobuje v důsledku kontinuální dehydrataci. Tyto změny zásadně ovlivňují homeostázi organismu. Dlouhodobě vysoká extracelulární koncentrace glukózy v krvi vede ke glykaci řady biomolekul (např. hemoglobinu) a narušení jejich běžné funkce.

2.1.3. Současná léčba a budoucí terapeutické směřování

Primárním cílem soudobé léčby je individuální stabilizace glykémie (Melmer and Laimer 2016), aby se co nejvíce blížila fyziologickým hodnotám (normoglykémii) a nedocházelo k jejím akutním výkyvům, ani dlouhodobým výchytkám způsobujícím sekundární komplikace jako jsou angiopatie, nefropatie, neuropatie a retinopatie. Hypoglykémie se může stát život ohrožujícím stavem, hyperglykémie je pak hlavním faktorem makrovaskulárních a mikrovaskulárních onemocnění. Druh zvolené terapie je závislý na typu diabetu.

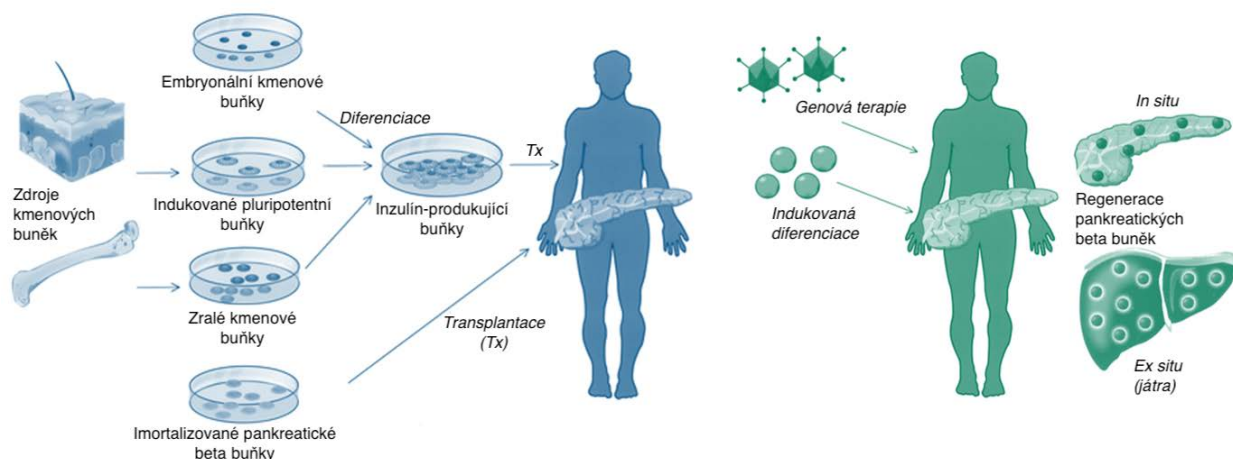
Mezi aktuálními způsoby současné běžné léčby řadíme externí dodávání inzulínu, které se týká zejména T1DM. Pacient je závislý na monitorování koncentrace glukózy v krvi a na ní závislé dávce inzulínu. Moderní technologie tuto cestu usnadňují formou inzulínových pump a glykémii-monitorovacích zařízení. V případě TD2M, je na místě změna životního stylu formou diety a navýšením tělesné aktivity, popřípadě v kombinaci s užíváním farmakologických přípravků ('Webpage - Mayo Clinic: Diabetes Treatment'

² Další typ endokrinních buněk, více v kapitole Langerhansovy ostrůvky

2023), které stimulují sekreci inzulínu, limitují glukoneogenezi, blokují účinnost vybraných trávicích enzymů a zpomalují trávení, zvyšují citlivost beta buněk vůči inzulínové signalizaci či omezují vstřebávání glukózy ledvinami. Řadíme sem orálně užívané biguanidy (Metformin), meligtinidy, sulfonylureázy, inhibitory dipeptidyl-peptidázy 4 (DPP4), alfa-glukosidáz a sodno-glukózového transportéru 2 (SGLT2), žlučové sekvestranty a také injekčně podávaná mimetika amylinu (IAPP) a inkretinu (GLP1).

Další využívanou terapeutickou, avšak méně častou, alternativou je transplantace Langerhansových ostrůvků izolovaných z mrtvých lidských těl nazývaná také Edmontonův protokol (Verhoeff, Marfil-Garza, and Shapiro 2021). Transplantace dlouhodobě zlepšuje glykemickou kontrolu a inzulínové působení. Tato procedura je ovšem velice limitovaná zdroji ostrůvků a vyžaduje také celoživotní imunosupresi. Z toho důvodu je současným biomedicínským trendem v rámci terapie diabetu hledání alternativních zdrojů buněk, které by mohly substituovat inzulín produkující buňky, či snaha restartovat potenciál sebeobnovy beta buněk.

V tomto směru jsou možné dva přístupy (Obrázek 3); *ex vivo* (modře) a *in vivo* (zeleně)(Kobayashi, Yuasa, and Okitsu 2009). V rámci *ex vivo* cílí výzkumy na generování beta buněčných alternativ *in vitro* z různých buněčných typů, jejich následnou modulaci pomocí kultivačních protokolů a poté transplantaci do těla pacienta. *In vivo* přístupy pak cílí na aktivaci genů *in situ* pro regeneraci cílových buněk, či indukci transdiferenciace.



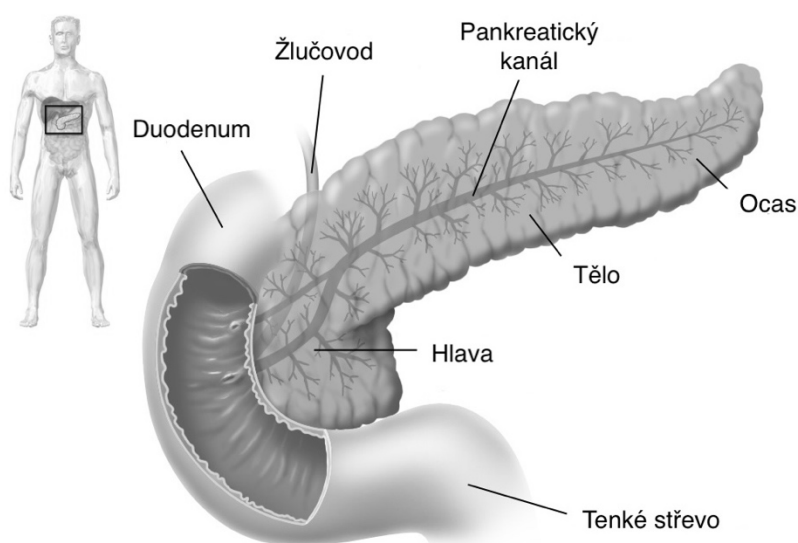
Obrázek 3: **Experimentální přístupy moderní terapie diabetu** (převzato a upraveno dle Kobayashi, Yuasa, and Okitsu 2009)[z důvodu rozsahu popsáno pouze v textu]

Studie posledních několika let cílí především na *ex vivo* a kultivují *in vitro* buněčné preparáty derivované z lidských pluripotentních buněk (hPSCs) (Siehler et al. 2021; De Klerk and Hebrok 2021). Jako zdroj jsou používány lidské embryonální kmenové buňky (hESCs) a z etických důvodů častěji indukované pluripotentní buňky (iPSCs) či mezenchymální kmenové buňky (MSCs), u kterých je zkoumána mimo diferenciaci do inzulín produkujících buněk i schopnost modulovat imunitní odpověď na transplantát. Pomocí těchto buněčných typů v kombinaci s vhodnými kultivačními protokoly by bylo možné v budoucnu připravit pacientovi léčbu „na míru.“ Řada kultivačních protokolů generujících ostrůvkové organoidy v posledních letech postoupila do rané fáze klinických studií cílených na T1DM i T2DM (De Klerk and Hebrok 2021). Přestože překonávají faktor omezené dostupnosti, stále se často potýkají s imunologickou rejekcí.

Znalost fundamentálních biologických procesů ovlivňujících vývoj a funkce endokrinních buněk je tak nepostradatelnou komponentou celého terapeutického procesu, kterou je nutné prohlubovat a využít pro modulaci *ex vivo* i *in vivo* postupů. Poté bude možné tyto znalosti aplikovat do translační medicíny a připravit nejvhodnější alternativy buněk produkujících inzulín či terapii aplikovat přímo *in situ*.

2.2. Struktura funkce a pankreatu

Pankreas (slinivka břišní) je protáhlý amorfní orgán trávicí soustavy uložený v dutině břišní těsně přisedající na spodní stěnu žaludku (Čihák et al. 2001; Dolenšek, Rupnik, and Stožer 2015). Sahá od svého ústí do duodena, kde je lokalizovaná tzv. hlava orgánu, odtud pokračuje přes tzv. tělo a postupně se zužuje směrem až ke slezině v tzv. ocas (Obrázek 4). U myší tento typ morfologie není zjevný (Dolenšek, Rupnik, and Stožer 2015).



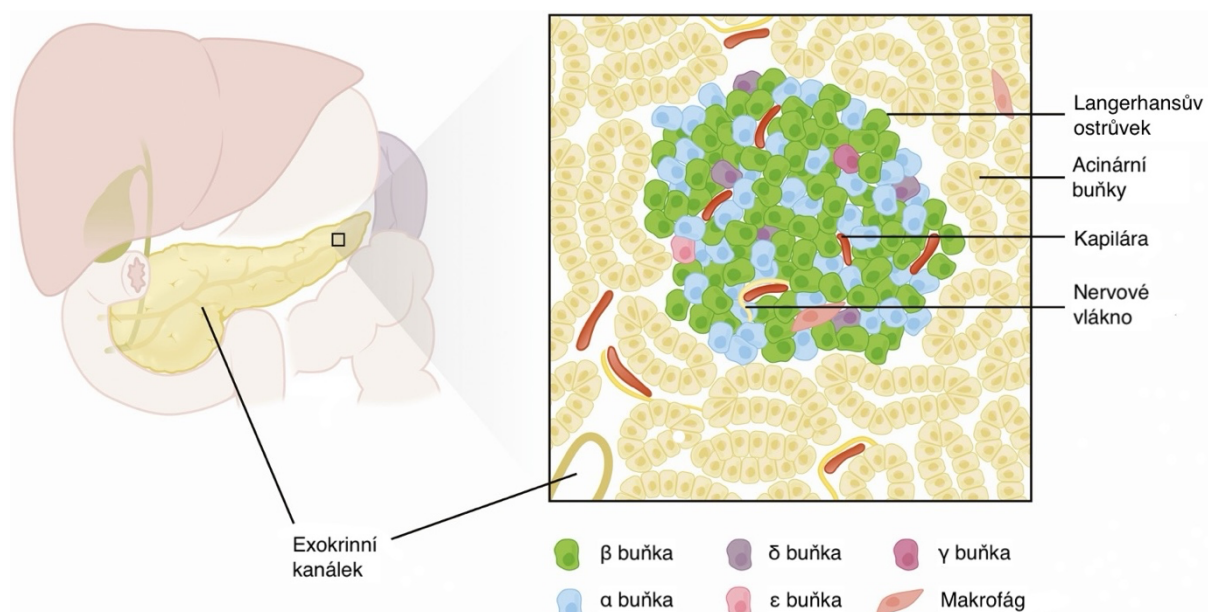
Obrázek 4: **Lokalizace a anatomie pankreatu** (převzato a upraveno z ‘Figure - Duodenum and pancreas’ 2007; ‘Figure - Pancreatic tissue’ 2013)[z důvodu rozsahu popsáno pouze v textu]

Pankreas jako orgán typu žlázy plní duální metabolickou funkci v závislosti na dvou typech obsažené tkáně, které ji tvoří; exokrinní a endokrinní (Češka et al. 2020). Exokrinní funkcí je produkce řady trávicích enzymů, např. amyláz, lipáz, trypsinu, chymotrypsinu a dalších, které vznikají v distálně uložených acinárních buňkách a jsou sbírány a odváděny pomocí sítě kanálků, tvořených duktálními buňkami, až do lumen duodena, kde jsou enzymy aktivovány k trávení. Endokrinní funkci naplňují Langerhansovy ostrůvky, malé buněčné shluky disperzně rozprostřené v celém pankreatickém parenchymu. Tyto mikroorgány jsou napojeny na hustou síť nervových zakončení a také vlasečnic a sekretují hormony do krevního řečiště. Tím zásadně ovlivňují metabolismus v celém organismu pomocí tzv. endokrinní signalizace.

2.2.1. Langerhansovy ostrůvky

Langerhansovy ostrůvky reprezentují pouze několik procent celkové hmotnosti orgánu (Dolenšek, Rupnik, and Stožer 2015) a jejich počet v lidském pankreatu se odhaduje na jednotky milionů (Da Silva Xavier 2018), oproti tomu v myším pankreatu se vyskytuje několik tisíc ostrůvků (Bock, Pakkenberg, and Buschard 2003; Hörnblad, Cheddad, and Ahlgren 2011).

Skládají se z několika endokrinních buněčných typů (Shih, Wang, and Sander 2013; Walker et al. 2021), které produkují hormony a signální peptidy. Konkrétně se jedná o buňky alfa (produkující glukagon), beta (inzulín), delta (somatostatin), epsilon (ghrelin) a gamma (pankreatický polypeptid) (Obrázek 5). V některých případech se do této skupiny řadí i transientně přítomné G buňky produkující gastrin, které postnatálně mizí (Suissa et al. 2013). Dále ostrůvek tvoří buňky s jiným vývojovým původem; konkrétně rezidentní makrofágy přispívající k funkčnosti celého ostrůvku (Calderon et al. 2015), endoteliální buňky (Olsson and Carlsson 2006; Dolenšek, Rupnik, and Stožer 2015) a neurony. Většinu tvoří beta buňky: 50-60 % u člověka, 60-80 % u myši; a alfa buňky: 20-40 % u člověka, 10-20 % u myši (Dolenšek, Rupnik, and Stožer 2015). Delta a gamma buňky tvoří zhruba 10 % u člověka, u myši představují méně než 5 %. Epsilon buňky jsou pak nejméně četnou složkou ostrůvku s cca 1 %.



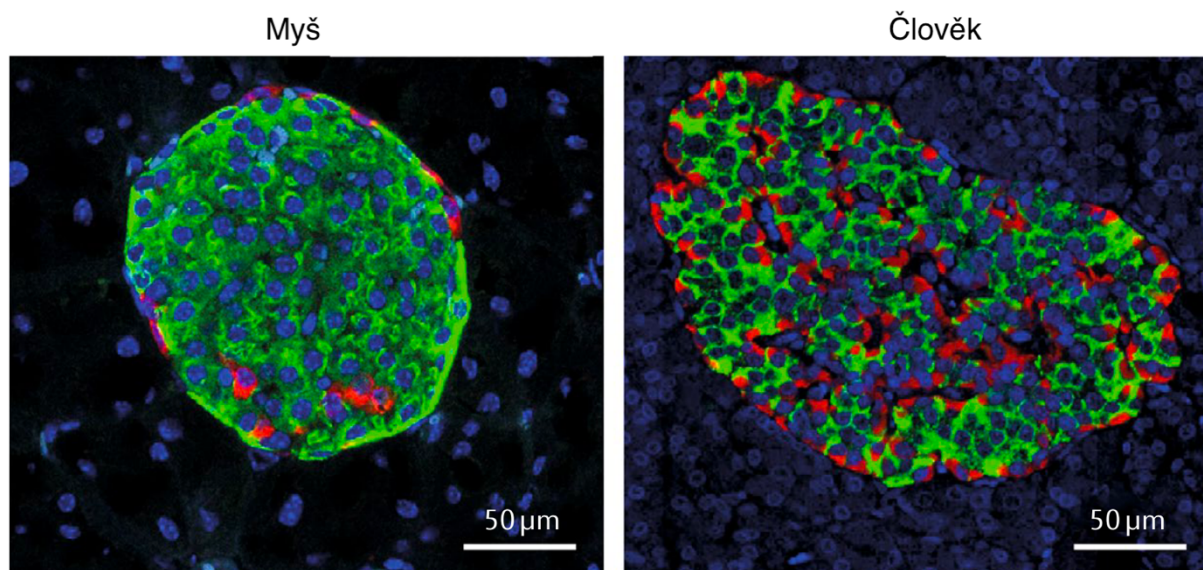
Obrázek 5: **Schéma průřezu lidského Langerhansova ostrůvku s jednotlivými zastoupenými buněčnými typy zasazené do kontextu celého pankreatu** (převzato a upraveno dle Walker et al. 2021)

Ostrůvek (skládající se z buněk alfa, beta, delta, gamma a epsilon) je obklopen exokrinní tkání (acinárními buňkami v rozetové organizaci ústícími do jednotlivých kanálek z duktálních buněk) a je napojen na síť kapilár a nervových zakončení. Součástí jsou i makrofágy vlastní danému ostrůvku.

Rozmístění Langerhansových ostrůvků, jejich struktura a výsledný vliv na endokrinní funkce jsou předmětem dlouhodobé diskuze. Ostrůvky jsou ve zdravém lidském pankreatu rozmístěny rovnoměrně bez ohledu na část orgánu (Ionescu-Tirgoviste et al. 2015), či s méně výraznými odchylkami mezi ocasem a zbytkem pankreatu (X. Wang et al. 2013), u myší se denzita rozmístění liší v závislosti na části orgánu i kmeni samotného experimentálního modelu (Bock, Pakkenberg, and Buschard 2003; Hörnblad, Cheddad, and Ahlgren 2011).

Do nedávna bylo široce uznáváno, že mikroarchitektura Langerhansových ostrůvků se v rámci mezidruhové variability mezi člověkem a myší výrazně liší (Dolenšek, Rupnik, and Stožer 2015; Gromada, Chabosseau, and Rutter 2018). Myší ostrůvky se na první pohled vyznačující charakteristický sférickým uspořádáním, kde je jádro ostrůvku, sestávající téměř výhradně z beta buněk, obklopeno ostatními buněčnými typy (C. R. Pfeifer et al. 2015). Oproti tomu zdánlivě neorganizované lidské ostrůvky takto definovanou strukturu postrádají (Brissova et al. 2005; Cabrera et al. 2006)(Obrázek 6), či

jim byly přisuzovány jiné typy organizace (Orci and Unger 1975; Erlandsen et al. 1976; Grube and Bohn 1983).



Obrázek 6: **Srovnání architektury běžného myšního a lidského Langerhansova ostrůvku** (převzato a upraveno dle Gromada et al. 2018)

Imunohistochemické barvení průřezu lidským a myším Langerhansova ostrůvku – modře buněčná jádra DAPI, zeleně beta buňky (inzulín), červeně alfa buňky (glukagon); měřítko 50 µm.

Novodobé studie ovšem popisují model trojvrstvého („sendvičového“) uspořádání u lidských ostrůvků, kdy se v protáhlé struktuře mezi dvěma krajními vrstvami alfa buněk nachází silná vrstva beta buněk (Dolenšek, Rupnik, and Stožer 2015). Celé trojvrství je pak složeno do kompaktního sferičtějšího uspořádání. Alfa buňky rovněž rámují prostor styku ostrůvku s mikrovaskulárním systémem. Vzhledem k tomu, že alfa buňky prokazatelně funkčně ovlivňují beta buňky (Huypens et al. 2000; Wojtusciszyn et al. 2008) a lidské ostrůvky jsou citlivější v odpovědích na glukózu (Cabrera et al. 2006), mohly by být lidské ostrůvky prostřednictvím této mikroarchitektury lépe adaptované ve svých glykémii-regulujících funkcích (Henquin, Dufrane, and Nenquin 2006; Rorsman and Braun 2013). Ostrůvky podobné lidské struktuře se mohou objevit u myší také, a to pravděpodobně jako důsledek diabetu a dalších patologií s vyššími požadavky na inzulín (Kharouta et al. 2009; A. Kim et al. 2009). Oproti tomu jiná komplexní studie pozoruje vyšší míru variability v lidských ostrůvcích a označuje ve výsledku lidskou a myší mikroarchitekturu za srovnatelnou (Bonner-Weir, Sullivan, and Weir 2015). Je nutné podotknout, že jasný konsenzus v této problematice se nedaří nalézt ani srovnáním s dalšími živočišnými druhy s ohledem na aspekty jako je například celková hmotnost organismu (Dolenšek, Rupnik, and Stožer 2015). Nicméně se ukazuje, že rozhodující je pro architekturu ostrůvků jejich

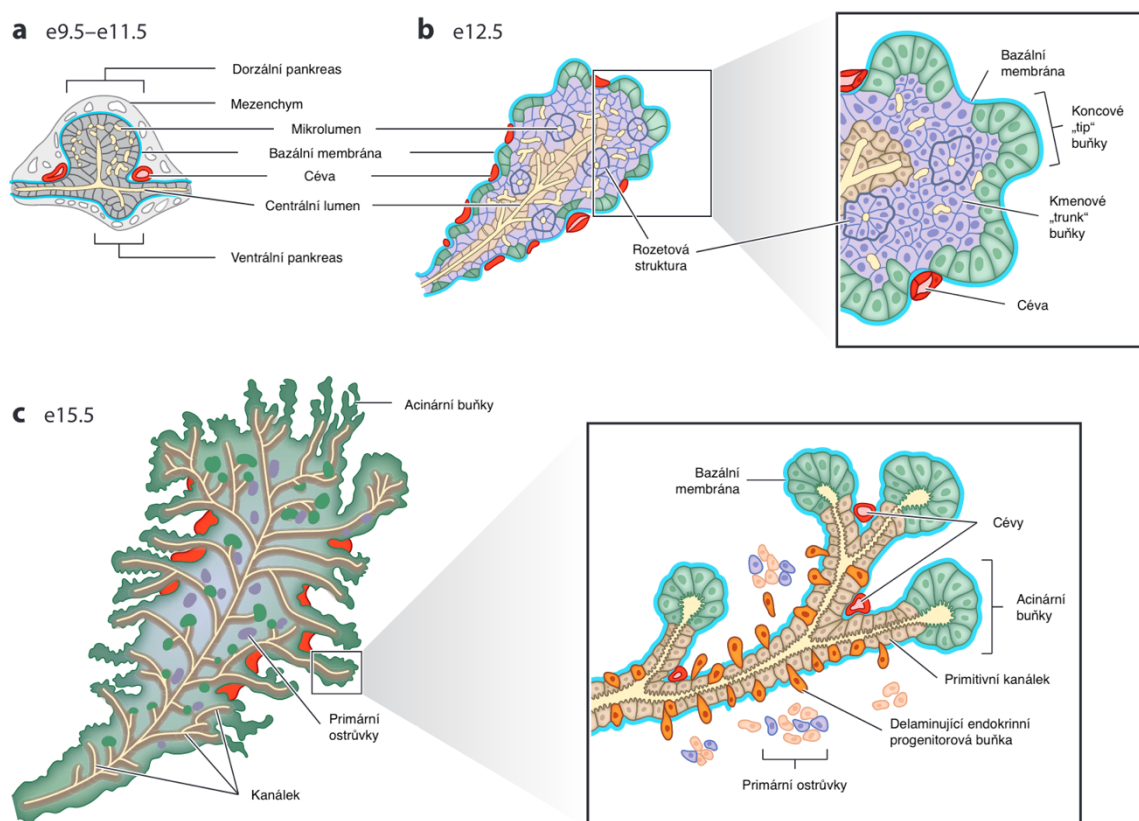
celková velikost, která má všeobecnou limitní hodnotu; malé ostrůvky zaujímají sférické uspořádání a ty větší pak komplexnější mikroarchitekturu. Nároky na inzulín pak kompenzuje navýšení počtu ostrůvků u rozměrově větších druhů při zachování lineární závislosti poměru počtu ostrůvků a celkové tělesné hmotnosti.

Proliferační schopnosti endokrinních buněk jsou velmi limitované. Všeobecně platí, že tyto buňky proliferují pouze během embryonálního vývoje, případně krátce po narození, než dosáhnou úplné maturace v závislosti na druhu buňky, což předurčuje jejich fyziologickou nenahraditelnost a souvisí i s řadou patologií. Proliferace beta buněk u myši vrcholí okolo P3 (třetího postnatálního dne)(W.-L. Qiu et al. 2017), zatímco alfa buňky dosahují nejvyššího řádu buněčného dělení již v P0 (W.-L. Qiu et al. 2017). Jsou ovšem známy i velmi vzácné případy, kdy specifická subpopulace beta buněk může reiniciovat svou sebeobnovu a znovu zahájit buněčné dělení (Mariniello et al. 2019).

2.3. Molekulární regulace vývoje pankreatu

Pankreas se v průběhu časného vývoje zakládá jako párový orgán v hepatopankreální oblasti (Suckale 2008; Pan and Wright 2011). Endodermální tkáň ve formě dvou pupenů, ventrálního a dorzálního, vystupuje z primitivního střeva během tzv. primární tranzice do okolního mezenchymu. Ventrální pupen je menší a navazuje na něj vznikající společný jaterní a žlučový vývod, zatímco dorsální je větší a samostatný. Oba pupeny se v průběhu organogeneze prodlužují a větví. Obě části běžně splývají v jeden orgán jako následek rotace vyvíjející se trávící trubice. Tento rozdíl se například promítá i do rozdílných poměrů endokrinních buněčných typů, které z daných částí vznikají (Suckale 2008). Pankreas ovšem vzniká z jednoho epitelu, tedy multipotentního progenitorového buněčného typu (G. Gu, Dubauskaite, and Melton 2002), v prostředí morfogenového gradientu (Suckale 2008) a na tomto procesu specifikace a diferenciaci se podílí řada vnějších i vnitřních signálů (Shih, Wang, and Sander 2013; Larsen and

Grapin-Botton 2017). Proces dává vzniknout morfologicky i funkčně odlišným buněčným liniím; exokrinní (včetně duktální) a endokrinní (Obrázek 7).



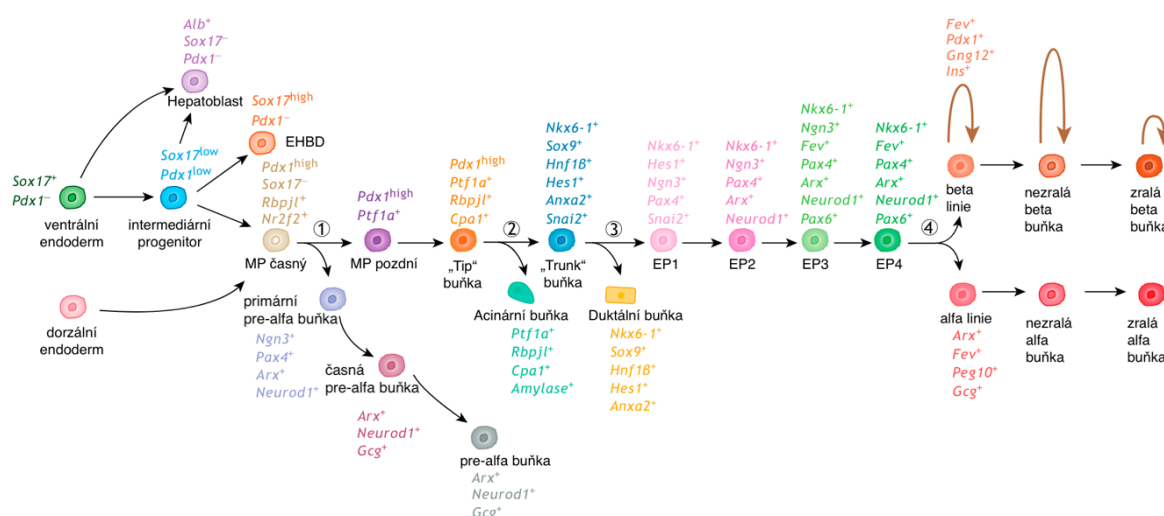
Obrázek 7: Časná pankreatogeneze myši (převzato a upraveno dle Larsen a Grapin-Botton 2017)

A: Primární tranzice – V období mezi E9.0 a E11.5 ventrální a dorzální pankreatický pupen vystupuje do okolního mezenchymu. Mnohvrstevný nepolarizovaný pankreatický epitel je obklopen bazální membránou. Vytváří se drobné lumen a cévy do struktury nezasahují.

B: Sekundární tranzice – Kolem E12.5 se buňky kmenové („trunk“) části polarizují, formují rozetovou strukturu. Mikrolumen se propojují a začínají vytvářet síť kanálek a centrální lumen. Koncové („tip“) buňky formují první výčnělky v kontaktu s bazální membránou. Cévní systém vstupuje do vyvíjejícího se orgánu.

C: V E15.5 je již hustá kanálková síť tvořena jednovrstevným epitelem duktálních buněk vedoucích do diferencovaných konců z acinárních buněk. Endokrinní progenitory delaminují z primitivních kanálek a zakládají vně primární ostrůvky. Cévy prorůstají skrze větvení celým orgánem.

Celá organogeneze je řízena komplexním systémem transkripční regulace, kdy se kaskádově uspořádaná exprese jednotlivých transkripčních faktorů dynamicky mění, tvoří tzv. „geny regulující sítě“ (GRN)(Arda, Benitez, and Kim 2013; X.-X. Yu and Xu 2020)(Obrázek 8), v závislosti na vzájemných interakcích a čase a tím determinuje expresi dalších funkčních genů a konečně i buněčný osud vyvíjeného buněčného typu. Zásadním



Obrázek 8: Schéma kaskádové transkripční regulace vyvíjející se myši endokrinní alfa a beta linie (převzato a upraveno dle Yu and Xu 2020)

Multipotentní pankreatické progenitory jsou odvozeny jak z ventrálního endodermu uskutečňujícím hepatogenezi, tak z dorzálního endodermu (vlevo). Již z časných multipotentních progenitorů (MP) se vyvíjí primitivní endokrinní linie (1) s převažujícími alfa buňkami, jejíž vývojový význam dosud nebyl plně objasněn. Pozdní progenitory dávají vzniknout acinárním buňkám (2) z „tip“ populace buněk a také ductálním buňkám (3) a endokrinním progenitorům (EP). Jejich vývoj má čtyři identifikovaná stádia s dynamickou změnou genové exprese a následně generuje alfa a beta buněčnou linii (4). Schéma uvádí relativní transkripční faktory ke každému kroku diferenciaci.

přínosem posledních několika let v této oblasti byla dostupnost analýz jednobuněčných („single cell“) transkriptomů (Muraro et al. 2016; X. Yu et al. 2019; Szlachcic et al. 2021; Ma et al. 2023), která navázala na funkční studie zaměřené na jednotlivé geny pomocí tkáňově specifických podmíněných delecí, které daly základ tomuto odvětví (Magnuson and Osipovich 2013). Jednobuněčná transkriptomika umožnila pozorovat dynamiku expresních profilů vývojově odlišných buněčných populací i jejich diferenciační mezistupně. Tento metodický přístup je nyní zdokonalován o poziční rozměr jednotlivých buněk ve tkáni (Olaniru et al. 2023).

2.3.1. Specifikace pankreatických progenitorů

Transkripční faktor *Pdx1* je nejčasnějším markerem v období primární tranzice (E9.5 – E12.5) vyvíjejícího se pankreatu a reprezentuje progenitorové stádium na samotné bázi pankreatické specifikace (Guz et al. 1995; U. Ahlgren, Jonsson, and Edlund 1996; G. Gu, Dubauskaite, and Melton 2002). Nezbytnou expresi *Pdx1* následně umocňuje jeho

„downstream“ cílový gen *Ptf1a* (Offield et al. 1996; Wiebe et al. 2007). Kooperace těchto dvou transkripčních faktorů je nezbytná pro specifikaci pankreatických progenitorů (Burlison et al. 2008). V GRN pankreatické diferenciaci dále hraje důležitou roli transkripční faktor *Sox9* (Seymour et al. 2007) a řada dalších jako *Gata4* a *Gata6*, *Foxa1* a *Foxa2*, *Hnf6a* (*Onecut1*), *Hnf1b* (*Onecut2*) (Pan and Wright 2011; Larsen and Grapin-Botton 2017).

2.3.2. Specifikace pankreatických endokrinních progenitorů

Specifikované multipotentní progenitory ve fázi sekundární tranzice (E13.5 – E15.5) diferencují do kompartmentizovaného větvičího se orgánu, který na povrchu formuje různorodé prohlubně. Uvnitř vzniká primární síť složená z „tip and trunk“ domén, tedy koncových a kmenových domén. Koncové domény tvoří rozetové buněčné struktury, které dají vzniknout acinárním buňkám exprimujícím *Ptf1a*, *c-Myc* a *Cpai* (Zhou et al. 2007; Pan et al. 2013), zatímco bipotentní buňky kmenové části dále diferencují do duktálních (kanálkových buněk) a také endokrinní buněčné linie a charakteristicky exprimují *Nkx6.1* (Ae et al. 2010), *Hnf6a* (Jacquemin et al. 2000), *Hnf1b* (Solar et al. 2009), *Sox9* (Kopp et al. 2011) a *Hes1* (Kopinke et al. 2011). Svůj bipotentní potenciál si tyto buňky zachovávají až do pozdní fáze organogeneze (Larsen and Grapin-Botton 2017). Proces diferenciaci těchto dvou vývojových linií řídí transkripční faktory *Ptf1a* (ve prospěch „tip“ linie) a *Nkx6.1* (ve prospěch „trunk“ linie) (Ae et al. 2010). Zásadní roli během této determinace hraje Notch signalizace (Larsen and Grapin-Botton 2017).

V malém zlomku „trunk“ buněčné populace dochází k aktivaci bHLH transkripčního faktoru *Neurog3*, který je nezbytný pro endokrinní specifikaci (Gradwohl et al. 2000; G. Gu, Dubauskaite, and Melton 2002; Gouzi et al. 2011) a indukuje endokrinní diferenciaci (Apelqvist et al. 1999; Schwitzgebel et al. 2000). Jeho hlavním antagonistou a regulátorem je *Hes1* (Jensen et al. 2000; Schwitzgebel et al. 2000; Ahnfelt-Rønne et al. 2012) a zajišťuje inhibici jeho exprese ve většině buněk.

2.3.3. Diferenciaci a maturace endokrinních buněk pankreatu

Neurog3⁺ buňky opouští proliferační režim, iniciují delaminační proces a migrují do míst, kde zakládají primární endokrinní ostrůvky (Rukstalis and Habener 2007; Gouzi et al. 2011; Miyatsuka et al. 2011). Zatímco *Neurog3* sám svou expresi posléze inhibuje (Smith, Watada, and German 2004), jeho krátká exprese v endokrinních progenitorech

aktivuje GRN a spouští tak diferenciaci vedoucí k vývoji a poté maturaci všech endokrinních buněčných typů. Doposud není ovšem jasné, zda jsou *Neurog3*⁺ buňky uniformní skupinou buněk s jednotným diferenciacním potenciálem diferencovat do všech endokrinních buněčných typů, či je jejich buněčný osud již predeterminován v předcházejících krocích a jedná se tak o heterogenní skupinu buněk (Murtaugh 2007).

Klíčové transkripční faktory se aktivují a vypínají v různých fázích vývoje a vzájemně kooperují, či kompetují v determinaci jednotlivých buněčných osudů. Patří mezi ně mimo jiné *Neurod1* (H. P. Huang et al. 2000; Smith, Watada, and German 2004, 200), *Nkx2.2* (Watada et al. 2003; Smith, Watada, and German 2004), *Arx* (Collombat et al. 2003), *Pax4* (Collombat et al. 2003; Smith et al. 2003), *Insm1* (Mellitzer et al. 2006), *Rfx6* (Soyer et al. 2010) anebo *Isl1* (Ulf Ahlgren et al. 1997).

Zásadní a nejlépe prozkoumanou je specifikace a diferenciacie alfa a beta buněčné linie. Mezi esenciální faktory beta buněčné linie řadíme *Pdx1* (Holland et al. 2002; Gannon et al. 2008), *Nkx2.2* (Sussel et al. 1998), *Pax4* (Sosa-Pineda et al. 1997; Collombat et al. 2003) či *Nkx6.1* (Henseleit et al. 2005). K těm se v pozdějším stádiu vývoje přidávají maturační faktory jako například *Mafa* a *Mafb*. Zásadní je i kombinatorika a proměnlivost jednotlivých faktorů během celého procesu. *Mafb* je fyziologicky exprimován v časných beta buňkách (Artner et al. 2006; 2007; 2010), zatímco *Mafa* je charakteristický pouze pro maturované beta buňky (C. Zhang et al. 2005; Nishimura et al. 2006), kdy jeho expresi řídí *Pdx1*, *Nkx2.2* a *Foxa2* (Raum et al. 2006). Pro alfa buněčnou linii jsou charakteristické transkripční faktory *Arx* (Collombat et al. 2003), *Pax6* (Sander et al. 1997) nebo *Foxa2* (Gromada, Franklin, and Wollheim 2007). Významnou roli v maturaci pak hraje opět *Mafb* a zastává tedy duální funkci v obou buněčných typech (Artner et al. 2006).

Je zřejmé, že řada transkripčních faktorů zastává i specifické funkce v různých endokrinních buněčných typech. Pro příklad, *Nkx6.1* je klíčový pro diferenciaci beta buněk a zároveň je nutné jeho expresi udržovat (Schaffer et al. 2013), neboť v opačném případě dochází ke změně buněčné identity ve prospěch delta buněk (Taylor, Liu, and Sander 2013). Podobně buněčnou identitu determinuje *Arx* v alfa buňkách (Collombat et al. 2003), které při jeho ztrátě nabývají fenotyp podobný beta buňkám (Courtney et al. 2013). Duální funkce, kdy diferenciacní faktor posiluje jeden buněčný osud a reprimuje jiný, nalezneme i u *Pdx1* (Gannon et al. 2008; T. Gao et al. 2014) či *Nkx2.2* (Sussel et al. 1998; Churchill et al. 2017; Gutiérrez et al. 2017) anebo *Neurod1* (Naya et al. 1997;

Anderson et al. 2009). Vzájemné interakce mezi transkripčními faktory lze ilustrovat na případu *Pax6*, který má důležitou roli v endokrinním vývoji i produkci hormonů (Sander et al. 1997; St-Onge et al. 1997). *Pax6* aktivuje v alfa buňkách společně s *Neurod1* a *Mafb* expresi glukagonu (Gosmain et al. 2010), zatímco v beta buňkách ji v kooperaci s *Pax4* a *Nkx6.1* reprimuje (Ritz-Laser et al. 2002; Gauthier et al. 2007).

2.3.4. Jednobuněčné transkriptomické studie endokrinní tkáně

Nástup a rutinní používání jednobuněčných transkriptomických studií umožnil detailně studovat genovou expresi i dříve nepopsaných a často vzácných málopočetných buněčných populací (X.-X. Yu and Xu 2020). V kombinaci s izolací buněk v různých vývojových stádiích bylo tak umožněno sledovat dynamické expresní změny v pseudočase a definovat nové charakteristické markery, což znamenalo malou revoluci i na poli poznání buněčných progenitorů procházejících diferenciací. Zásadní limitací pro tyto studie v různých vývojových stádiích je počet získaných buněk, neboť tento přístup vyžaduje specifický buněčný práh – tedy počet buněk v příslušné detekované buněčné populaci. Níže vybrané studie jsou zaměřeny na myší model, kde je očekávaná znalost vzhledem k etickým limitacím širší, přestože řada výzkumů pracuje i s modelem lidským (Ma et al. 2023; Olaniru et al. 2023) a buněčnými *in vitro* alternativami (Krentz et al. 2018).

Studium samotné *Neurog3*⁺ buněčné populace u myší ve stádiu E14.5 a E16.5 přineslo překvapivé zjištění (Scavuzzo et al. 2018), že ač tato populace v rozsahu celého studovaného období vzniká, diferenciací dynamika se údajně liší. V časnějším stádiu mají mít progenitory tendence diferenciací inklinovat směrem k alfa linii, zatímco později k beta linii a jako jeden z důvodů je diskutována rozdílná organizace chromatinu či heterogenita uvnitř *Neurog3*⁺ buněčné populace a klíčová role dalších determinačních faktorů, která by mohla determinovat diferenciaci i před samotnou aktivací exprese *Neurog3*. Ve stádiu E14.5 u myší se podařilo identifikovat buněčnou populaci endokrinních progenitorů, které již přestali exprimovat *Neurog3* a zároveň v dané době teprve iniciovali endokrinní diferenciaci (Byrnes et al. 2018). Tato buněčná populace se vyznačovala vysokou expresí transkripčního faktoru *Fev* a také přechodnou expresí pankreatického *Isl1*, nicméně v ní ještě nedocházelo k expresi hormonů, ale rozdělovala se do dvou základní charakteristických linií – alfa a beta. Později se podařilo na základě několika publikovaných datasetů vycházejících z myšího modelu v různých

vývojových stádiích mezi E9.5-E17.5 identifikovat celkem čtyři endokrinní progenitorové populace vyznačující se charakteristickou expresí vybraných transkripčních faktorů v pseudočasové ose *Neurog3* (EP1) – *Pax4* (EP2) – *Fev* + *Neurod1* (EP3) – *Isl1* + další (EP4) (X. Yu et al. 2019). V širším rozsahu pak tyto studie poskytly deskriptivní data a odhalily řadu markerů charakteristických pro většinu buněčných populací v kontextu celé pankreatogeneze (Krentz et al. 2018; van Gurp et al. 2019). Přestože nejnovější poznatky nepotvrzují hypotézu heterogenní *Neurog3*⁺ populace (Duvall et al. 2022), jednoznačně demonstrují směrodatnou souhru transkriptomu a epigenomu v celém diferenciacním procesu, kde je klíčovým determinantem stádiově specifická kombinatorika transkripčních faktorů a navazující kaskádové remodelování uzavřeného chromatinu (Duvall et al. 2022; de la O et al. 2023).

2.3.5. Pioneer faktory

Spojku mezi transkriptomem a stavem epigenomu zajišťují pioneer faktory jako podskupina transkripčních faktorů, které jsou schopny iniciovat řízenou transformaci histonového kódu (histonových značek) vazbou do svých cílových sekvencí DNA a lokálně introdukovat chromatinové značky, primárně v místě genových enhancerů specifikačních a diferenciacních genů, a tím rozvolnit („euchromatizovat“) uzavřený heterochromatin a umožnit tak přístup k DNA dalším transkripčním faktorům. Pioneer faktory tak hrají zásadní roli v určení buněčného osudu ve vývoji i rakovinových patologiích a mohou být využity k řízenému terapeutickému reprogramování. Mezi nejznámější řadíme například p53, SOX2, OCT4, NANOG, MYOD, FOXA1, GATA4 (Iwafuchi-Doi and Zaret 2014; Balsalobre and Drouin 2022; Barral and Zaret 2024). V kontextu endokrinní části pankreatu byl jako pioneer faktor identifikován NEUROG3 (Duvall et al. 2022).

2.4. NEUROD1

NEUROD1 (dříve označovaný také jako BETA2 či NEUROD) je jedním ze základních transkripčních faktorů z rodiny bHLH (basic helix-loop-helix). Tyto regulátory mají ve své homo-, či heterodimerizované formě schopnost vazby na DNA skrze DNA-vazebnou doménu do sekvencí označovaných jako E-box (5'-CANNTG-3'). Tím zásadně ovlivňují expresi svých cílových genů a řadu vývojových a fyziologických buněčných procesů (Jones 2004). V případě NEUROD1 konkrétně v neuronech (Tutukova, Tarabykin, and Hernandez-

Miranda 2021), endokrinních buňkách pankreatu anebo gastrointestinálního traktu (Reuter et al. 2022).

2.4.1. Role NEUROD1 ve vývoji a funkci endokrinní části pankreatu

Neurod1 je v pankreatu nejčasněji detekovatelný *in vivo* okolo E9.5 výhradně ve vyvíjející se endokrinní linii (Naya et al. 1997; Chu, Nemoz-Gaillard, and Tsai 2001). V průběhu vývoje se jeho exprese postupně vytrácí téměř z většiny buněčných typů (Itkin-Ansari et al. 2005), zůstává ale aktivní v maturovaných beta buňkách, kde se jako jeden z klíčových faktorů podílí na zajištění procesu jejich maturace (C. Gu et al. 2010) a přispívá k fyziologickým odpovědím na glukózu aktivací inzulínového genu (Naya, Stellrecht, and Tsai 1995; Romer et al. 2019) společně s dalším transkripčními faktory jako PDX1, ISL1, MAFA (Y. Qiu et al. 2002). Mutace v lidském genu *Neurod1* byly rovněž asociovány s T2DM (Malecki et al. 1999) a MODY 6 (Horikawa and Enya 2019). Delece genu *Neurod1* je u několikadenních novorozených myší letální, protože způsobuje závažnou hyperglykémii, při které myši nejsou schopné metabolizovat mateřské mléko. Hlavním důvodem tohoto defektu je významné snížení inzulínové exprese, které lze pozorovat již v embryonálním vývoji mezi E14.5 a E17.5 (Naya et al. 1997). Deficience *Neurod1* snižuje expresi i dalších pankreatických endokrinních peptidů, konkrétně glukagonu, somatostatinu a peptidu YY (PYY). Tento defekt se projevuje i na histologické úrovni ve formě narušené architektury Langerhansových ostrůvků a kritickým snížením množství beta buněk oproti kontrolnímu fenotypu. Ztráta endokrinní buněčné masy byla připisována nejprve apoptóze (Naya et al. 1997), později narušené proliferační schopnosti beta buněk (Romer et al. 2019) anebo oběma těmito procesům (Dudek et al. 2021). Tento defekt se však objevuje pouze v případě, kdy k *Neurod1* deficienci dojde v průběhu embryonálního vývoje (C. Gu et al. 2010). Ke ztrátě beta buněk, ať už z jakéhokoliv důvodu, nedochází v případě delece *Neurod1* v maturovaných buňkách. Místo sférického uspořádání formují během časného vývoje narušené endokrinní buňky neorganizované shluky, které zdánlivě kopírují strukturu exokrinních kanálků, ze kterých vývojově vystupují (Naya et al. 1997; C. Gu et al. 2010; Dudek et al. 2021). Za velmi specifických genetických podmínek se ale podařilo hyperglykemický fenotyp *Neurod1*-deficientních myší postnatálně zvrátit (H. Huang et al. 2002). Během prvních dvou měsíců života novorozených myší byl nedostatek inzulín produkujících buněk kompenzován. Hypotéza v této studii diskutuje případ neonatální

neogeneze beta buněk, respektive dediferenciace endokrinních či duktálních buněk a jejich následnou navýšenou kompenzační proliferaci. Pozorované buňky již ale nedosáhly plně maturovaného stavu a nebyly schopné ani znovu ustálit běžnou morfologii myších ostrůvků.

Tyto fakta situují NEUROD1 do středu zásadních procesů, které vyžadují precizní načasování a buněčnou lokalizaci pro správný vývoj jednotlivých buněčných typů i fungování vysoce specializovaných terminálně diferencovaných maturovaných endokrinních buněk.

NEUROD1 je nepostradatelným transkripčním faktorem regulujícím systém genové exprese a tím i diferenciaci endokrinních progenitorů. Exprese genu *Neurod1* je přímo aktivována transkripčním faktorem NEUROG3 (H. P. Huang et al. 2000) a paralelně s genem *Nkx2.2* (Watada et al. 2003). Tyto tři transkripční faktory podle dosavadních poznatků definují bázi kaskády diferenciačních genů v endokrinních progenitorech. NKX2.2 a NEUROD1 společně navíc interagují. NKX2.2 reguluje *Neurod1* dvěma konzervovanými mechanismy a zajišťuje aktivaci *Neurod1* během vývoje v kooperaci s NEUROG3 a také nezávisle v beta buňkách (Anderson et al. 2009). Studie využívající dvojitý knock-out *Nkx2.2;Neurod1* také demonstrovali jasnou roli těchto faktorů v endokrinní specifikaci (Chao et al. 2007; Mastracci et al. 2013). Dysbalance mezi těmito faktory mění diferenciační profil vyvíjejících se buněk; *Neurod1* ve prospěch beta buněk, zatímco nadmíra *Nkx2.2* posouvá buněčný osud více k alfa, gamma a epsilon buňkám v období před E15.5. Po E15.5 fyziologicky převládá exprese *Neurod1* a spouští tak masivní expanzi beta buněk (Chao et al. 2007). Pozdější studie postulují hypotézu, kdy *Nkx2.2* a *Neurod1* pro tento scénář interagují dokonce ještě před samotnou NEUROG3 endokrinní indukci k zajištění buněčného osudu alfa buněk. V opačném případě totiž dochází ke specifikaci hlavně epsilon a gamma buněčné populace (Mastracci et al. 2013). To by podporovalo teorii neuniformní populace *Neurog3*⁺ buněk (Desgraz and Herrera 2009). Mimo to exprese *Neurod1* přímo nepotlačuje alfa buněčný osud, protože *Neurod1* je exprimován v časně diferencovaných buňkách produkujících glukagon (Itkin-Ansari et al. 2005). Recentní studie navíc demonstrují, že delece *Neurod1* ovlivňuje nejen beta, ale i alfa buněčnou linii (Romer et al. 2019) a *Neurod1* dokonce může aktivovat glukagonový promotor (Dumonteil et al. 1998), přestože není nezbytný pro jeho expresi v maturovaných alfa buňkách (Itkin-Ansari et al. 2005). Naopak *Neurod1* během vývoje aktivně potlačuje

expresi somatostatinu v delta buňkách (Itkin-Ansari et al. 2005). V případě postnatální ztráty exprese *Neurod1* se objevují polyhormonální beta buňky, které koexprimují inzulín se somatostatinem anebo PPY (C. Gu et al. 2010) a to vzhledem ke skutečnosti, že beta a delta buňky sdílí společně *Pax4*⁺ progenitory (Sosa-Pineda et al. 1997).

Některé studie dokonce poukazují na skutečnost, kdy by NEUROD1 mohl mít srovnatelnou, nebo nadřazenou roli vůči NEUROG3, protože se jejich působení v aktivaci cílových genů překrývají (Gasa et al. 2004; Anderson et al. 2009). V souladu s tím experimenty v rybím modelu (*Danio rerio*) demonstrovaly, že homolog *Neurod1* ovlivňuje významně endokrinní diferenciaci (Dalgin and Prince 2015). Morpholiny indukovaná deficiencie *Neurod1* vedla k zástavě v progenitorovém buněčném stádiu vývoje bez známek indukce apoptózy, či narušení jejich proliferačních schopností. Nejcitlivější na morpholinový knock-down *Neurod1* byly překvapivě alfa buňky a oproti ostatním buněčným typům vyžadovaly nižší koncentrace pro narušení glukagonové exprese i ke snížení jejich celkové počtu v primárním ostrůvku. Žádné endokrinní funkce navíc u zebřiček nebyly přiřazeny homologu genu *Neurog3* (Flasse et al. 2013). Je pozoruhodné, že u člověka se exprese *Neurog3* objevuje pouze na velmi krátkou chvíli v embryonálním vývoji (Salisbury et al. 2014) a ztráta jeho funkce nemá tak zásadní patofyziologický dopad, což by mohlo poukazovat na zásadnější roli dalších faktorů, včetně NEUROD1, v endokrinní diferenciaci lidský endokrinních buněk (Rubio-Cabezas et al. 2014).

2.4.2. Role NEUROD1 v determinaci a reprogramování buněčného osudu

Schopnost zásadně ovlivňovat buněčnou diferenciaci učinila z NEUROD1 potenciální prostředek pro buněčné reprogramování zaměřené především na možnou terapii DM a neurodegenerativních onemocnění.

Již v roce 2011 byl *Neurod1* použit v reprogramačním koktejlu transkripčních faktorů, které ektopicky exprimované ve fibroblastech indukovaly vznik neuronům-podobným buňkám (Pang et al. 2011) či v motoneuronům (Son et al. 2011). Později byl dokonce použit jako jediný faktor schopný transformovat *in vitro* a *in vivo* lidské i myši reaktivní gliové buňky do funkčních neuronů (Z. Guo et al. 2014). V poslední dekádě plejáda výzkumů navázala (L. Wang and Zhang 2022) a přináší slibné výsledky pro neuroregenerativní medicínu. Reprogramační potenciál NEUROD1 byl rovněž studován ve výzkumech cílených na přípravu imunokompatibilních inzulín-produkujících buněk.

Neurod1 byl v těchto studiích součástí reprogramačních koktejlů i jako samotný induktor, přičemž byly transdiferencovány různé buněčné typy (Samson and Chan 2006). Například šlo o ESCs (Marchand et al. 2009), hepatocyty (Yatoh et al. 2007; Ren et al. 2016), pupečnickový mezenchym (H. Wang et al. 2011), mezenchymální kmenové buňky reprogramované pomocí *Pdx1*, *Neurod1*, a *Ins* (Gerace et al. 2019); kostní dřev s využitím *Pdx1*, *Neurod1* a *Neurog3* (Zhao et al. 2008; H.-T. Li et al. 2017); acinární buňky (T. Zhang et al. 2012) či duktální buňky pankreatu (T. Zhang et al. 2010) a to pomocí faktorů *Pdx1*, *Neurod1*, *Insm1*.

Hledání optimálního řešení této terapie zůstává výzvou současných výzkumů a doposud nebyl stále plně objasněn celý molekulární mechanismus zprostředkovávající tento reprogramační potenciál NEUROD1. Recentní studie poukazují na jeho významnou roli v reorganizaci chromatinu zprostředkovanou „pioneering“ procesem, který byl doposud sledován v ESCs (Pataskar et al. 2016; Aditi Singh et al. 2022), iPSCs (S. Zhang et al. 2018; Choi et al. 2020) a zralých mikroglíích (Matsuda et al. 2019). Ektopická exprese *Neurod1* v myších ESCs iniciuje rychlou stabilní neurogení diferenciaci a zásadně reformuje profil genové exprese těchto buněk *in vitro* i *in vivo* (Pataskar et al. 2016). NEUROD1 se váže do promotorů a enhancerů svých cílových genů, kde dochází k navýšení acetylace histonů H3K27 (H3K27ac). Souběžně v těchto lokusech dochází k odstranění represivních trimethylací H3K27 (H3K27me3) společně s faktory, které zde udržují chromatin v uzavřené konformaci. Distální enhancery jsou po vazbě NEUROD1 navíc označeny aktivační monomethylací H3K4 (H3K4me1). Návazná studie pak poukazuje na skutečnost, že NEUROD1 takto euchromatizuje obrovské množství lokusů (Aditi Singh et al. 2022), pouze polovina z cílových genů je ale aktivována a to v závislosti na přítomnosti dalšího kofaktoru, se kterým NEUROD1 fyzicky interaguje. Tuto skutečnost potvrzuje i interakce NEUROD1 s dalším „pioneer“ faktorem (Akol et al. 2023). Studie indukce neuronálních buněk z lidských iPSCs tento fenomén ještě obohacuje o hypotézu, kdy NEUROD1 zdánlivě zahajuje sebepropagační smyčku a podporuje tak vlastní expresi (Matsuda et al. 2019; Choi et al. 2020). V průběhu obdobně indukované konverze mikroglíálních buněk do neuronů byly pozorované změny na úrovni bivalentních domén v nemetylovaných promotorech cílových genů NEUROD1, které obsahovaly aktivační (H3K4me3) i inhibiční (H3K27me3) histonové značky. Po vazbě NEUROD1 došlo ke ztrátě H3K27me3 a aktivaci genové exprese. I v tomto případně se NEUROD1 vázal do své vlastní

regulační sekvence a také do sekvence *Kdm6b*, demethylázy zprostředkovávající odstranění H3K27me3.

V kontextu cílené buněčné trans/diferenciace do neuronálních buněk je zřejmé, že NEUROD1 jako „pioneer“ faktor otevírá chromatin a tím aktivuje expresi cílových genů. Doposud žádná studie ovšem nedemonstrovala podobný mechanismus u endokrinních buněk.

2.5. ISL1

ISL1 (ISLET1) je důležitý LIM-homeodoménový (LIM-HD) transkripční aktivátor (Karlsson et al. 1990), který se podílí na řadě buněčných procesů během embryogeneze souvisejících s diferenciací a determinací buněčného osudu, zejména ve vyvíjejícím kardiovaskulárním (Zhuang et al. 2013) a nervovém systému (Thor et al. 1991), gastrointestinálním traktu (Das and May 2011) či zadních končetinách a řadě mezodermálních a endodermálních struktur (Zhuang et al. 2013), a také např. přímo na regulaci glykémie (H. Zhang et al. 2009). Delece *Isl1* je příčinou zástavy vývoje a embryonální letality u myši v E9.5 (Pfaff et al. 1996). Z molekulárního pohledu specificky rozpoznává DNA sekvenci 5'-ATAATTAA-3', často v promotorech genů, kde po navázání skrze svou homeodoménu slouží jako „lešení“ a „náborové místo“ pro další transkripční faktory (H. Zhang et al. 2009) a kofaktory (Gadd et al. 2013; Caputo et al. 2015), se kterými interaguje pomocí svých LIM domén.

2.5.1. Role ISL1 ve vývoji a funkci endokrinní části pankreatu

Exprese *Isl1* je poprvé detekovatelná v myším dorzálním pankreatickém pupenu a také v mezenchymu, který ho obklopuje, v E9.0 a již v E9.5 jeho delece způsobuje eliminaci endokrinní pankreatické linie (Ulf Ahlgren et al. 1997). Vzhledem k embryonální letalitě v E9.5 z důvodu narušení srdečního vývoje je nutné využívat pro další studium funkcí *Isl1* jeho tkáňově specifické delece (Pfaff et al. 1996).

Isl1 je ve vývoji exprimován ve všech endokrinních buněčných typech pankreatu (Krentz et al. 2018) a jeho exprese významně narůstá během diferenciaci endokrinních progenitorů do alfa buněčné linie (Scavuzzo et al. 2018). To potvrzuje i existence vazebného místa ISL1 v sekvenci genu *Arx*, který je jedním z hlavních regulátorů tohoto procesu (J. Liu et al. 2011). Podílí se přímo na expresi inzulínu (H. Zhang et al. 2009), a to v synergii s NEUROD1, glukagonu (M. Wang and Drucker 1995), somatostatinu (Leonard

et al. 1992). Embryonální delece *Isl1* vede k časně ztrátě endokrinní tkáně, snížení exprese všech souvisejících hormonů a následně způsobuje postnatálně diabetický fenotyp novorozených myší (Du et al. 2009). Hlavním důvodem byla označena snížená proliferace a zvýšená apoptóza vyvíjejících se buněk. U zebřiček nezpůsobuje ztráta *isl1* snížení počtu endokrinních buněk, nicméně zásadně snižuje jejich hormonální expresi (Wilfinger, Arkhipova, and Meyer 2013). Zároveň byla zaznamenána rozdílná role v jeho funkci během primární a sekundární tranzice, kdy v průběhu první buněčné expanze je u mutantů eliminována ve vznikajících buňkách exprese glukagonu a snížena v případě inzulínu a somatostatinu, zatímco během druhé je jeho produkce eliminována a inzulín a glukagon produkující buňky vznikají v nezměněném počtu. Do vývoje endokrinního vývoje jsou zapojeny i další nezbytné kofaktory přímo interagující s ISL1, jako LDB1 a LDB2 (Hunter et al. 2013; Toren et al. 2022).

Postnatální delece *Isl1* v maturovaných beta buňkách zásadně narušuje jejich schopnost inzulínové sekrece snížením exprese přímo regulovaných genů *MafA*, *Pdx1* a *Slc2a2* (*GLUT2*) (Ediger et al. 2014). Navýšení exprese *Isl1* naopak zlepšuje inzulínovou sekreci a glukózovou homeostázi (J. Liu, Walp, and May 2012), nenavyšuje ovšem buněčnou proliferaci. Alternativní varianty sestřihu *Isl1* hrají roli v jeho efektivitě a mohou být specifické pro odlišné buněčné endokrinní typy (Ando et al. 2003). Stejně tak může být ISL1 modulován epigeneticky pomocí *miR-7a* (H. Liu et al. 2021). ISL1 reguluje stav chromatinu vazbou koregulátorů SET9 a KDM6B v promotoru inzulínového genu v závislosti na koncentraci glukózy v buňce; sám je vázán v místě promotoru společně s NEUROD1 v normoglykemických podmínkách, zatímco za stavu hyperglykémie ho ve vazbě střídá PDX1 (W. Wang et al. 2016). V neposlední řadě je interakce ISL1 s řadou dalších transkripčních faktorů, např. HNF4a (Eeckhoutte et al. 2006), a kofaktorů esenciální pro fyziologickou regulaci inzulínové exprese a maturaci, např. LHX1 (Bethea et al. 2019), RNF20 a RNF40 (Wade et al. 2019), PIAS4 (Yan et al. 2016), SSBP3 (Galloway et al. 2015; Toren et al. 2023) a LDB1 (Ediger et al. 2017) či CREB v rámci exprese somatostatinu (Leonard et al. 1992).

Ve zralých diferencovaných endokrinních buňkách má ISL1 antiapoptotickou a proliferaci stimulující funkci, neboť přímo aktivuje expresi regulátorů buněčného cyklu *c-Myc* a cyklin D1 a tím přechod z G1 do S fáze (T. Guo et al. 2011). V průběhu procesu formuje komplex s PDX1 a SET7/9 (Yang et al. 2015), čímž zprostředkovává trimethylaci

H3K4 v promotoru cyklinu D1. Naopak v jiné *Isl1*-deficientní studii apoptotická ztráta buněčné masy nebyla postnatálně pozorována (Ediger et al. 2014).

V porovnání s *Neurod1* je *Isl1* v kontextu endokrinní tkáně pankreatu méně probádaným genem. Dosavadní studie ovšem prokázaly, že hraje důležitou roli v jejím vývoji i fyziologickém fungování maturovaných buněk. Vedle řady zmíněných studií popisujících transkripční kofaktory regulující transkripci společně s ISL1 se doposud pouze v několika případech, tj. regulace proliferace (Yang et al. 2015) či exprese inzulinu (W. Wang et al. 2016), podařilo konkrétně objasnit její molekulární mechanismy. V případě ISL1 je tak nezbytné doplnit tyto neprobádané procesy, které by mohli v budoucnu přispět k terapiím DM, a to zejména ty, které definují buněčnou diferenciaci.

2.5.2. Role ISL1 v determinaci buněčného osudu

Žádná studie doposud nezkoumala molekulární mechanismy ISL1 spojené s determinací buněčného osudu v pankreatických progenitorech. Jeho významnou roli se ovšem úspěšně podařilo demonstrovat v průběhu jiného procesu organogeneze.

Komparativní analýzou genové exprese (RNA-seq) a ATAC-seq embryonální *Isl1*-deficientní srdeční tkáně a srdečních progenitorů odvozených od ESCs u myšího modelu bylo demonstrováno, že *Isl1* je jedním z hlavních kardiogenetických determinantů (R. Gao et al. 2019). Během specificky načasované transienční exprese *Isl1* během vývoje dochází v lokusech vazby ISL1 na DNA k otevření chromatinu a přímé aktivaci velkého množství „downstream“ genů spouštějících diferenciaci kardiomyocytů. Jedním z cílových genů je *Smarca3* (*Baf60c*), který kóduje jednu z podjednotek tvořících chromatin-remodelující BRG1 SWI/SNF komplex. Pomocí ChIP, chromatinové imunoprecipitace, se podařilo prokázat přímou vazbu tří faktorů komplexu, tedy ISL1, BRG1 a BAF60C. ISL1 přímo navádí do místa své vazebné sekvence chromatin-remodelující komplex, přičemž expresi jedné jeho tkáňově specifické komponenty sám aktivuje, a definuje tak diferenciaci kardiomyocytů.

Druhý případ přímé interakce ISL1 s chromatin-remodelujícím komplexem byl pozorován rovněž v myších srdečních progenitorech (Y. Wang et al. 2016). Studie demonstrovala přímé ovlivnění (aktivaci) enhancerů dvou cílových genů ISL1, kdy v jejich úsecích po navázání transkripčního faktoru došlo k acetylaci a odstranění trimethylace H3K27. Proces demethylace byl zprostředkován demethylázou JMJD3 (*Kdm6b*), která je

do lokusů lokalizována fyzickou interakcí s ISL1. Tato vazba navíc zdánlivě moduluje i globální aktivitu tohoto enzymu.

Dosavadní výzkum v myších progenitorech kardiomyocytů jasně ukazuje, že ISL1 funguje ve vývoji jako „pioneer“ faktor, který skrze vazbu do svých vazebných míst přivádí další modulační komplexy a aktivuje tak expresi cílových genů. Lze tedy analogicky očekávat, že podobnou funkci by mohl zastávat i v jiných orgánových systémech.

3. Přehled publikací

Tato kapitola stručně představuje publikace zahrnuté do této dizertační práce, referuje podíl vlastní práce. Klíčové publikace jsou dostupné v kapitole Přílohy, ostatní jsou dostupné online ve formě „open access“ pod DOI.

3.1. NEUROD1 is required for the early α and β endocrine differentiation in the pancreas

Bohuslavova R, **Smolik O**, Malfatti J, Berkova Z, Novakova Z, Saudek F, Pavlinkova G. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 23;22(13):6713; doi: 10.3390/ijms22136713 (Bohuslavova et al. 2021)(Příloha 8.1)

Publikace jako první studuje roli NEUROD1 v časném vývoji pankreatu s využitím tkáňově specifické delece u myšího modelu pomocí *Isl1^{Cre/+} Neurod1^{loxP/loxP} TdTomato^{Ai14}*.

Eliminace *Neurod1* (*Isl1^{Cre/+} Neurod1^{-/-}; Neurod1CKO*) významně ovlivňuje síť transkripčních faktorů regulujících průběh sekundární tranzice vývoje endokrinní alfa a beta linie. Jeho návazná deficiencie vede k dysfunkční specifikaci a diferenciaci buněčných progenitorů alfa a beta linie. Morfologicky význačné je narušení architektury Langerhansových ostrůvků. Delece *Neurod1* způsobuje sníženou proliferaci beta buněk a tím i jejich celkový výskyt ve tkáni. Zbývající beta buňky produkují snížené množství inzulínu a přispívají tak k silně diabetickému fenotypu a snížení životaschopnosti novorozených myší.

Metodicky jsem se podílel na sběru vzorků, imunohistochemickém barvení, související analýze fenotypu a produkce hormonů, analýze buněčné proliferace a dřívějších projektových dat a přípravě manuskriptu.

3.2. NEUROD1 reinforces endocrine cell fate acquisition in pancreatic development

Bohuslavova R*, Fabriciova V*, **Smolik O***, Lebrón-Mora L, Abaffy P, Benesova S, Zucha D, Valihrach L, Berkova Z, Saudek F, Pavlinkova G. *Nat Commun.* 2023 Sep 9;14(1):5554; doi: 10.1038/s41467-023-41306-6 (Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023)(Příloha 8.2)

Publikace navazuje na předchozí studii NEUROD1 ve vývoji pankreatu s využitím odlišného myšího modelu *Neurod1^{Cre/+} Neurod1^{loxP/loxP} TdTomato^{Ai14}* umožňujícím studovat v detailu výhradně endokrinní linii.

Deficience *Neurod1* (*Neurod1^{Cre/+} Neurod1^{-/-}*; *Neurod1ST*) koreluje s předchozími zjištěními u *Neurod1CKO*, prokazatelně ovlivňuje také proliferaci alfa buněk a způsobuje závažnější defekt v endokrinních funkcích a tím navyšuje postnatální mortalitu u *Neurod1ST*. Analýza transkriptomu („bulk“ RNA-seq *Neurod1ST*) a vybrané části epigenomických markerů (CUT&Tag-seq *Neurod1ST*) endokrinní buněčné populace E15.5 demonstruje zásadní deviaci od běžného endokrinního profilu se zachovanými neendokrinními prvky a narušenými endokrinními funkcemi. Dochází ke snížení exprese zásadních proendokrinních diferenciacních transkripčních faktorů a faktorů remodelujících chromatin, a naopak ke zvýšení u neendokrinních markerů. Epigenomický profil histonových modifikací H3K4me3 a H3K27me3 v blízkosti vazebných motivů NEUROD1 u řady lokusů dysregulovaných genů koreluje se změnami v genové expresi.

Metodicky jsem se podílel na sběru vzorků, imunohistochemickém barvení, související analýze fenotypu a produkce hormonů, RT-qPCR, přípravě vzorků a knihoven pro “bulk” RNA-seq, bioinformatickém zpracování dat “bulk” RNA-seq a CUT&Tag-seq a analýze HOMER včetně vizuálních podkladů zahrnutých do publikace. Připravil jsem první verzi manuskriptu.

3.3. ISL1 controls pancreatic α cell fate and β cell maturation

Bohuslavova R, Fabriciova V, Lebrón-Mora L, Malfatti J, Smolik O, Valihrach L, Benesova S, Zucha D, Berkova Z, Saudek F, Evans SM, Pavlinkova G. Cell Biosci. 2023 Mar 10;13(1):53; doi: 10.1186/s13578-023-01003-9 (Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023)(Příloha 8.3)

Publikace se zaměřuje na roli ISL1 v diferenciaci endokrinní alfa a beta buněk pankreatu s využitím myšího modelu *Neurod1^{Cre/+} Isl1^{loxP/loxP} TdTomato^{Ai14}*.

Studie jako první popisuje nepostradatelnou úlohu ISL1 v transkripční regulaci endokrinní diferenciaci. ISL1 je přímo zodpovědný za zachování funkční alfa a beta linie, neboť *Isl1*-deficientní endokrinní buňky (*Neurod1^{Cre/+} Isl1^{-/-}*; *Isl1CKO*) nedosahují v případě beta linie plné maturace a alfa buňky produkující glukagon v pozdějším stádiu vývoje téměř kompletně mizí. Neformuje se ani charakteristická morfologie ostrůvků. Analýza transkriptomu („bulk“ RNA-seq *Isl1CKO*) koresponduje s analýzou epigenomických značek H3K4me3 a H3K27me3 (CUT&Tag-seq *Isl1CKO*) ovlivňující genovou expresi v endokrinní buněčné populaci. U *ISL1CKO* dochází

k navýšení markerů intermediárního stádia vývoje endokrinních progenitorů, zatímco u postnatální endokrinní buněčné populace dochází následně ke snížení exprese klíčových maturačních faktorů, které jsou zodpovědné za expresi hormonů.

Metodicky jsem se podílel na sběru vzorků, imunohistochemickém barvení, související analýze fenotypu a produkce hormonů, RT-qPCR a bioinformatickém zpracování dat “bulk” RNA-seq a CUT&Tag-seq.

3.4. ISL1 is necessary for auditory neuron development and contributes toward tonotopic organization

*Filova I, Pysanenko K, Tavakoli M, Vochyanova S, Dvorakova M, Bohuslavova R, **Smolik O**, Fabriciova V, Hrabalova P, Benesova S, Valihrach L, Cerny J, Yamoah EN, Syka J, Fritzsch B, Pavlinkova G. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022 Sep 13;119(37):e2207433119. doi: 10.1073/pnas.2207433119 (Filova et al. 2022)(nepřiloženo)*

Publikace studuje roli ISL1 v embryonálním vývoji sluchových nervů a související defekty v myším modelu *Neurod1^{Cre/+} Isl1^{loxP/loxP} TdTomato^{Ai14}*.

Eliminace *Isl1* vede ke kritickým morfologickým a funkčním změnám inervace sluchového ústrojí skrze transkripční regulaci a změny v genové expresi v neuronálních progenitorech vnitřního ucha. Článek se dotýká tematiky dizertační práce pouze částečně, není proto přikládán do příloh.

Metodicky jsem se podílel na bioinformatické analýze a interpretaci transkriptomických dat („bulk“ RNA-seq *Isl1CKO*) včetně vizuálních podkladů zahrnutých do publikace.

3.5. NEUROD1: transcriptional and epigenetic regulator of human and mouse neuronal and endocrine cell lineage programs

*Pavlinkova G, **Smolik O**. NEUROD1: transcriptional and epigenetic regulator of human and mouse neuronal and endocrine cell lineage programs. Front Cell Dev Biol. 2024 Jul 22;12:1435546. doi: 10.3389/fcell.2024.1435546 (Pavlinkova and Smolik 2024)(nepřiloženo)*

Souhrnný článek sumarizuje aktuální vědecké poznatky o regulaci genové exprese pomocí transkripčního faktoru NEUROD1 v buněčné diferenciaci a reprogramování. NEUROD1 je nepostradatelný specifikační a diferenciační faktor ve vývoji neuronů i endokrinních buněk pankreatu s významným buněčně-terapeutickým potenciálem. Publikace zahrnuje studie zkoumající NEUROD1 jako „pioneering“ faktor zapojený do

procesu remodelace chromatinu, regulace genové exprese a determinace buněčného osudu. Jedná se o review s širším tematickým překryvem, publikace proto není přiložena.

Do článku jsem zpracoval literaturu zahrnující roli NEUROD1 v endokrinní tkáni pankreatu a kapitolu o reprogramování a reorganizaci chromatinu indukovanou expresí *Neurod1*.

4. Výsledky a metody

Následující podkapitoly představují vybrané nepublikované komentované výsledky (včetně negativních, které dle mého uvážení stojí za zmínění) vztažené k jednotlivým biologickým modelům projektu a dále metodické optimalizace, na kterých jsem pracoval v průběhu doktorského studia a které budou dále diskutovány v následující kapitole Diskuze.

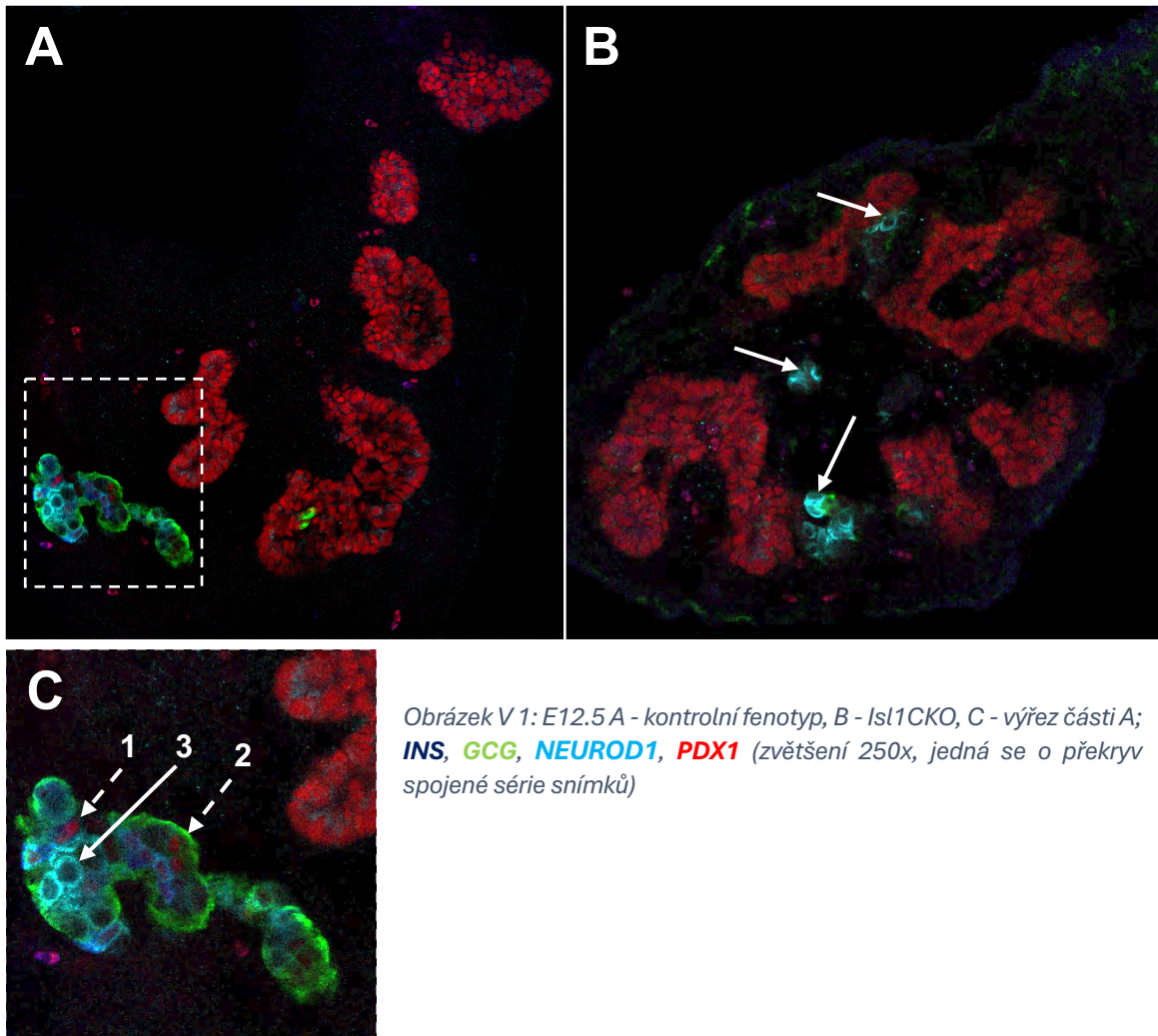
4.1. Vybraná imunohistochemická barvení a fluorescenční mikroskopie

V průběhu experimentální práce na *Isl1CKO* bylo jedním z mých cílů ukázat koexpresi hormonů s NEUROD1 a dále demonstrovat, že buněčná alfa populace skutečně v průběhu embryonálního vývoje bez náhrady mizí. Testoval jsem na základě literatury další markery, kterými daná buněčná populace v časném období diferenciaci disponuje, či může disponovat. Metodologie je totožná s již referovanými publikacemi (Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023). Primární protilátka proti danému epitopu využitá navíc oproti publikaci je k nalezení v doprovodném oddílu Seznam protilátek.

4.1.1. NEUROD1

NEUROD1 je charakteristický marker všech buněčných typů endokrinní části pankreatu a zároveň tzv. „Cre driver“ v případě modelu *Isl1CKO*. Jeho proměnlivou expresi je v praxi obtížné zachytit pomocí imunohistochemických metod. Vzhledem k jeho funkci transkripčního faktoru, a také jak bylo zvykem v laboratoři, je možné NEUROD1 detekovat v jádře. Ke svému překvapení jsem pravidelně detekoval slabý fluorescenční signál v cytoplazmě specifické subpopulace buněk v případě kontrolních i *Isl1CKO* vzorků v embryonálních stádiích vývoje. V obrázku V1 můžeme v části A pozorovat řez kontrolní embryonální tkáně pankreatu stádia E12.5, v části B naopak *Isl1CKO* a část C je přibližným výřezem z části A. Červeně je barven pankreatický marker PDX1, zeleně glukagon, modře inzulin a tyrkysově právě NEUROD1. V detailu C lze pak rozlišit tři základní typy buněk: 1 – inzulin-pozitivní buňky (beta linie), 2 – glukagon-pozitivní buňky (alfa linie) a 3 – neidentifikovaná subpopulace vykazující v porovnání s ostatními silný NEUROD1⁺ signál v cytoplazmě. Nejzajímavějším faktem bylo, že tato subpopulace číslo 3 byla výrazně četnější ve vzorcích *Isl1CKO*

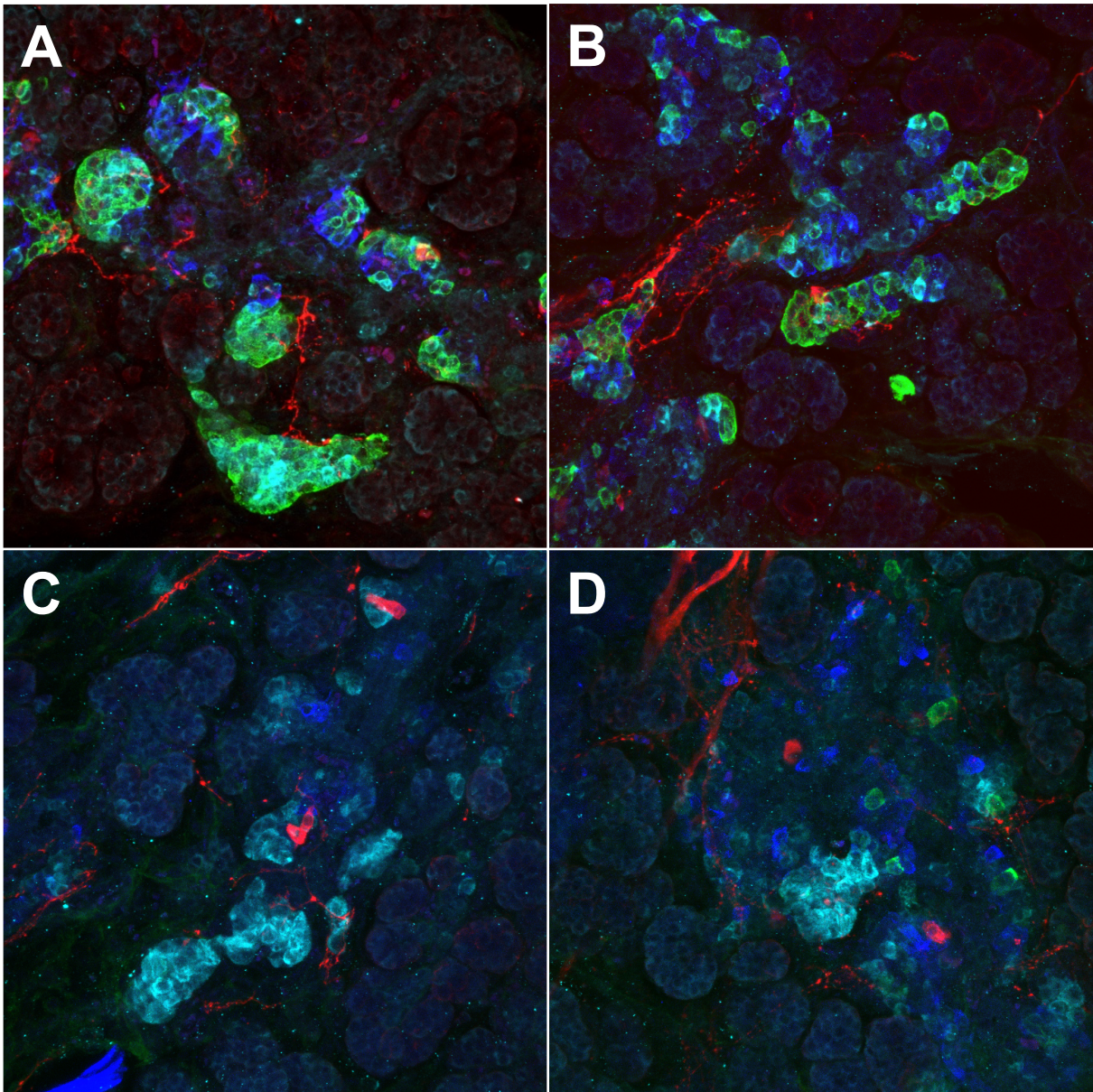
a bylo možné ji reprodukcibilně pozorovat i u dalších barvení (viz následující kapitola).



Je známo, že v nefyziologických podmínkách, jako je například hepatocelulární karcinom, může výskyt *NEUROD1* významně narůstat i v cytoplazmě (P. Huang et al. 2023). Vzhledem k metodologickým limitacím nebylo možné tuto populaci buněk pozorovat důkladněji. V *Isl1CKO* se nicméně podařilo detekovat zvýšenou míru exprese genů intermediárního stádia vývoje endokrinních buněk, konkrétně *Fev*. Tento transkripční faktor se vyskytuje v jedné z časných fází vývoje endokrinních progenitorů a rovněž souběžně s expresí *Neurod1* (Byrnes et al. 2018; de la O et al. 2023). Má pracovní hypotéza byla, že se jedná o shluky nediferencovaných endokrinních progenitorů.

4.1.2. Tyrozin hydroxyláza

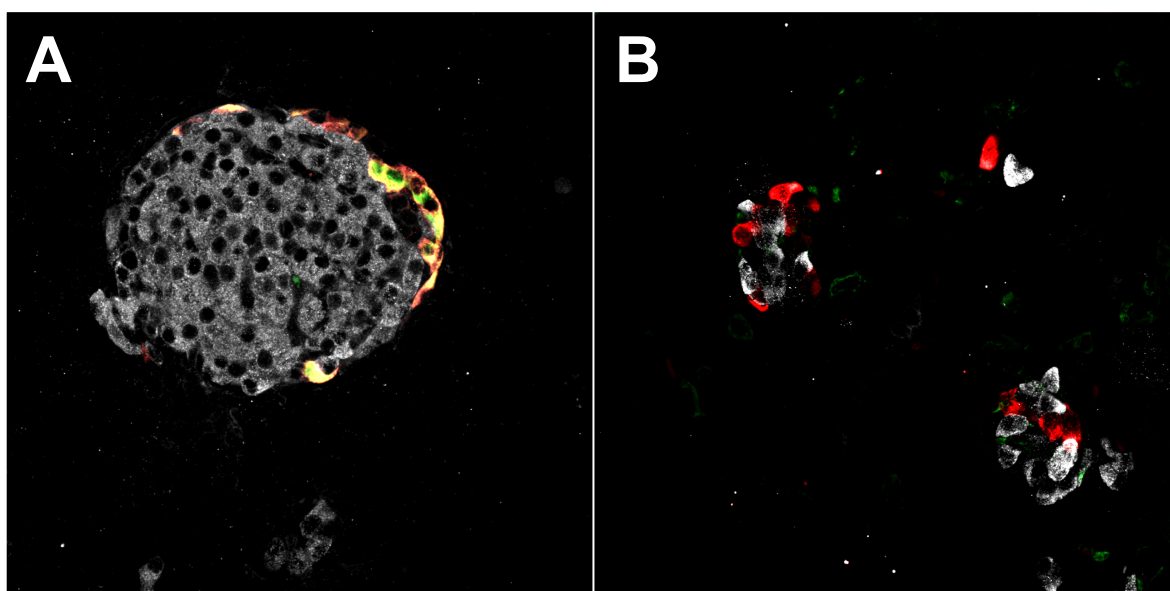
Tyrozin hydroxyláza je jedním z enzymů katecholaminerní signalizace a je v první řadě neurálním markerem sympatetické inervace regulující endokrinní funkce Langerhansových ostrůvků; v průběhu časného vývoje pankreatu je však exprimována souběžně s glukagonem v diferencující alfa linii (Vázquez et al. 2014). Na obrázku V2 pozorujeme fenotyp ve stádiu E16.5, v části A a B kontrolu, v části C a D *Isl1CKO*. Červeně je barvena tyrozin hydroxyláza (neurony a ojedinělé buňky), modře inzulin (beta buňky), zeleně glukagon (alfa buňky) a tyrkysově NEUROD1. Mezi *Isl1CKO* a kontrolou v rámci exprese nebyly pozorovány rozdíly, ani „koexprese“ s glukagonem (a to ani v případě kontroly).



Obrázek V 2: E16.5 A-B - kontrolní fenotyp, C-D - *Isl1CKO*; *INS*, *GCG*, *NEUROD1*, *TH* (zvětšení 250x)

4.1.3. GLP1

GLP1 je produktem alternativního zpracování proglukagonového prekurzoru (Fava, Dong, and Wu 2016), které se odvíjí nejen od glykemických podmínek (Sancho et al. 2017). Pomocí detekce tohoto signálního peptidu se podařilo vyvrátit teorii, která předpokládala, že u *Isl1CKO* alfa linie v průběhu vývoje zcela mizí z důvodu dysfunkční diferenciaci. Přestože je vývoj alfa buněk (i beta linie) významně zasažen a glukagon téměř není detekován, alfa linii lze demonstrovat v buněčných shlucích pomocí barvení GLP1. Na obrázku V3 je ve stádiu P0 na části A zachycen kontrolní fenotyp a na části B *Isl1CKO*. V tomto a pozdějších stádiích je obtížné zachytit větší množství ostrůvků na jednom řezu z důvodu výrazně expandované exokrinní tkáně v pankreatu. Červeně pozorujeme vizualizovaný GLP1, zeleně glukagon a bíle inzulin. Koexprese glukagonu a GLP1 je zjevná pouze v kontrolním vzorku v okraji ostrůvku, kde dochází k překryvu signálu v místě žlutého zbarvení. Je evidentní, že přestože eliminace *Isl1* výrazně redukuje alfa buněčnou masu, nedochází k jejímu úplnému vymizení, nýbrž v těchto buňkách může docházet k adaptaci na metabolický defekt a ke změně ve zpracování proglukagonu do formy GLP1 (Sancho et al. 2017).



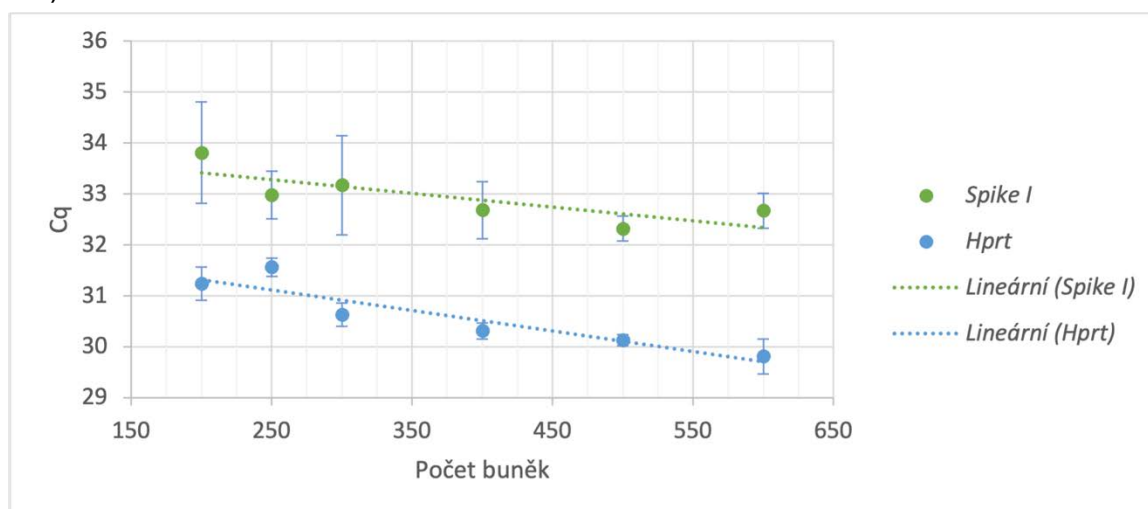
Obrázek V 3: P9 A - kontrolní fenotyp, B - *Isl1CKO*; *INS*, *GCG*, *GLP1* (zvětšení 600x)

4.2. Metody

4.2.1. Kvantitativní PCR s přímou buněčnou lyzí

Dlouhodobě bylo cílem výzkumu zkoumat transkriptom pouze endokrinní populace. Pomocí kvantitativní PCR s reverzní transkripcí provedené na vzorcích z *in vivo* modelů, ve kterých činí přes 90 % exokrinní část pankreatu, nebylo reálně spolehlivě detekovat změny v genové expresi u endokrinních genů s malým výskytem mRNA molekul, jako jsou například právě transkripční faktory. U řady genů může být navíc relativní změna v genové expresi maskována expresí stejného genu právě v exokrinní části tkáně. Poté, co byl v laboratoři úspěšně zaveden protokol na izolaci *Tomato-Ai14*-pozitivních buněk (v případě využívaných modelů tedy buněk s aktivní CRE-rekombinázu)(Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023; Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023), bylo možné nasbírat buněčnou populaci čistě endokrinních buněk ze vzorku. Cílem bylo tyto vzorky podrobit analýze diferenciální exprese pomocí RT-qPCR a rozšířit zavedený postup o přímou buněčnou lyzi v reakčním roztoku. Rutinní mezikrok izolace RNA ze vzorků by v tomto případě vedl ke ztrátám a kompletnímu zkreslení výsledných hodnot.

V pilotním experimentu jsem se rozhodl otestovat spolehlivost metody a hodnoty, jakých by bylo možné dosáhnout v případě genu *Hprt*, který laboratoř dlouhodobě využívá jako referenční gen v rámci RT-qPCR. Pomocí FACS jsem sesbíral sérii 200-600 endokrinních buněk ($n = 3$ na daný počet buněk). Počet buněk byl vybrán na základě experimentálních zkušeností spolupracující Laboratoře genové exprese (Zucha et al. 2020).

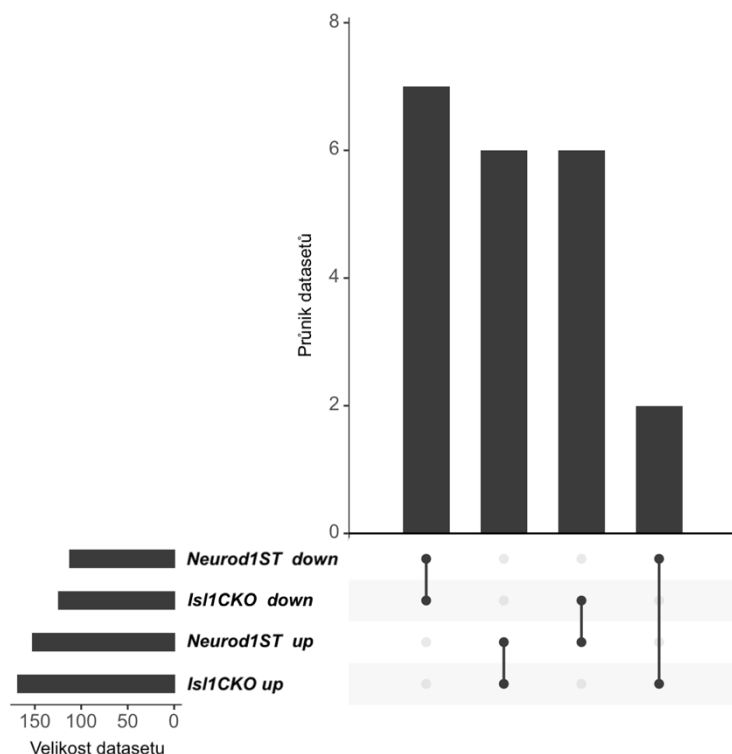


Obrázek V 4: Graf závislosti hodnot Cq mRNA *Hprt* a *Spike I* na počtu přímo-lyzovaných buněk

V rozmezí mezi 512 a 1024 lyzovaných buněk již totiž byly detekovány inhibiční efekty reverzní transkripce buněčných komponentů, které vznikají po buněčné lyzi v reakční vodě („molecular grade“). Vedle standardního postupu používaného v laboratoři (Bohuslavova et al. 2021; Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023; Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023) jsem do reakce včlenil vnitřní kontrolu ve formě exogenní RNA *Spike I* (TATAA Biocenter) přidané do reakčního „mastermixu“ zředěnou 1:999. Výsledek jednorázového experimentu dokumentuje obrázek V4. Graf demonstruje vztah mezi detekovanými amplifikačními cykly (Cq) a počtem lyzovaných buněk pro mRNA *Spike I* a *Hprt*, hodnoty jsou proloženy křivkou lineární spojnice trendu. V případě *Spike I* bylo očekáváno více horizontální směřování křivky a reprodučibilnější hodnoty Cq ~33. Tato odchylka může být připsána technické chybě při pipetování. V případě *Hprt* dle očekávání s narůstajícím počtem buněk klesá detekovaný amplifikační cyklus, přičemž se střední hodnota pohybuje kolem Cq ~30,5. Lze tedy očekávat, že v případě méně četných RNA molekul by výsledky mohly být hraniční. Detekční limit RT-qPCR se pohybuje v jednotkách RNA molekul ve vzorku (Forootan et al. 2017; J. Pfeifer 2022; Schmerker 2024). Cílové geny detekované v rozmezí Cq mezi 15 a 35 lze označit za spolehlivé. Nad 35 jsou hodnoty přípustné, pokud experiment splňuje další kritéria jako reprodučibilitu, konzistentnost mezi replikáty (biologickými i technickými), optimální hodnoty efektivity reakce či vyloučenou dimerizaci primerů. Samotný experiment návaznost neměl, neboť se laboratoř přiklonila posléze k využití NGS a analýze celého transkriptomu formou „bulk“ RNA sekvenování z časově ekonomických důvodů i rozsahu získaných výsledků.

4.2.2. Mezimodelové srovnání diferenciální genové exprese

Diferenciální genová exprese endokrinní buněčné populace byla studována u dvou využívaných modelů v průběhu sekundární tranzice (Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023; Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023) pomocí sekvenování RNA izolovaných endokrinních buněk pankreatu. Vzhledem k tomu, že obě studie byly publikovány samostatně, rozhodl jsem se dodatečně srovnat jejich výsledky mezi sebou. Exprese *Isl1* navazuje ve vývoji pankreatu na *Neurod1* s velmi krátkým časovým odstupem, přičemž oba transkripční faktory mají zásadní vliv na endokrinní funkce. To se projevilo i v případě delece těchto faktorů, kdy došlo k signifikantnímu snížení exprese



Obrázek V 5: Schématické znázornění počtu shodných prvků v datasetech diferencially exprimovaných genů

genů zodpovědných za produkci hormonů a regulaci glykémie v rámci skupin genové ontologie. Překvapivý výsledek srovnání transkriptomů ovšem zobrazuje obrázek V5.

Shoda mezi geny se sníženou relativní expresí byla 7 genů, resp. mezi navýšenými geny bylo u obou modelů sdíleno 6 genů (viz tabulka V1). Tento paradox má však několik logických příčin pramenících z parametrů samotného experimentu.

Vzorky endokrinní populace (n = 6 - 8 na genotyp) obsahovaly jako vstupní materiál pouze 100 buněk, což v rámci vysoce heterogenní populace buněčných progenitorů dává prostor pro významnou variabilitu mezi vzorky, která je umocněná nepoměrem jednotlivých buněčných typů mezi kontrolou a *Isl1CKO*, resp. *Neurod1ST*, a také prvkem náhody, tzn. nelze předpokládat, že poměr buněk zastoupený ve vzorku bude zachován i ve zlomku sortovaných buněk. Toto je jedno z hlavních úskalí „bulk“ analýz, které je třeba mít v budoucnu na paměti.

Tabulka V1: Seznam jednotlivých genů přítomných v průniku mezimodelových množin deregulovaných genů

Průnik datasetů	Seznam genů
<i>Isl1CKO</i> down/ <i>Neurod1ST</i> down	<i>Ffar1, Klf4, Mafa, Nnat, Npy, Ociad2, Rasgrf1</i>
<i>Isl1CKO</i> up/ <i>Neurod1ST</i> up	<i>Apoe, Dab2, Gc, Lgi2, Osbpl8, Wls</i>
<i>Isl1CKO</i> down/ <i>Neurod1ST</i> up	<i>Arhgap24, Maob, Ptn, Ptprd, Rims3, Slc28a2b</i>
<i>Isl1CKO</i> up/ <i>Neurod1ST</i> down	<i>Cryba2, Pcsk6</i>

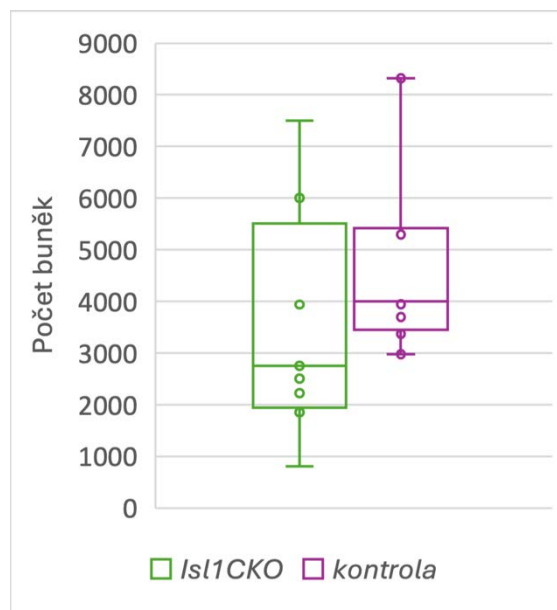
4.2.3. Optimalizace metody CUT&Tag sekvenování

Sekvenační výsledky experimentů nastiňující molekulární dopady delece *Neurod1*, resp. *Isl1*, stojící za vývojovými defekty pankreatu způsobenými delecí *Neurod1* (Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023), resp. *Isl1* (Bohuslavova, Fabriciova,

Lebrón-Mora, et al. 2023), a soudobé vědecké poznání „pioneering“ funkce transkripčních faktorů NEUROD1 a ISL1 v jiných orgánových systémech byly motivací pro využití zcela nové metody umožňující mapovat interakce DNA-protein či histonové modifikace. Metoda se vyznačuje oproti jiným alternativám výrazně nižším vstupním množstvím buněčného materiálu, což bylo pro studium malé buněčné populace klíčové, či lepší specifitou (Kaya-Okur et al. 2019; 2020; Y. Li et al. 2021).

Má role v této metodice spočívala v datové analýze výsledných sekvenačních dat a kontextuální zpětné vazbě vázané na parametry optimalizace. Vzhledem ke komplikované reprodukcibilitě bylo zapotřebí uvažovat několik faktorů ovlivňujících výsledky. Zprvce bylo nutné kriticky přistupovat k množství vstupních buněk. V případě E14.5 *Isl1CKO* bylo technicky možné z jednoho embryonálního pankreatu separovat ~ 350-550 endokrinních buněk,

Obrázek V 6: Počet izolovaných buněk na genotyp



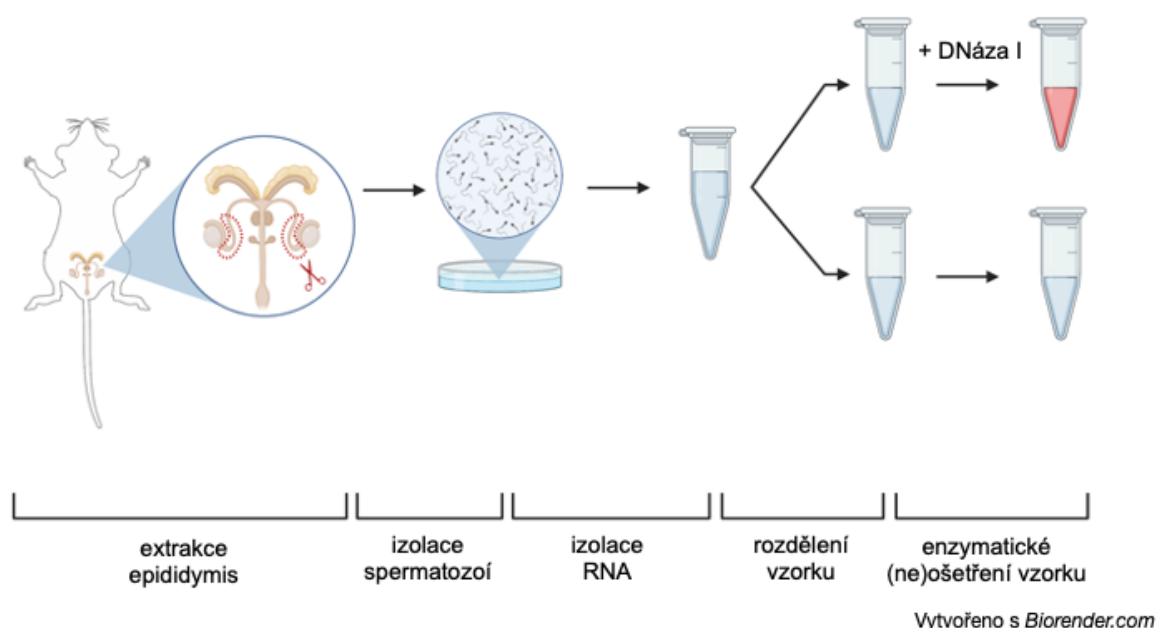
přičemž počet embryí nebylo reálné stanovit předem a vzorky byly spojovány z několika embryí stejného genotypu. Variabilita testovaných vstupních počtů buněk do reakce CUT&Tag je zobrazena v obrázku V6 (n = 12 na genotyp). Druhou proměnnou byl počet amplifikačních cyklů knihovny, který byl stanoven experimentálně v rozmezí 25-27, neboť dosavadní literatura pracovala s alespoň desetinásobným buněčným základem (Y. Li et al. 2021). Třetí proměnnou je technická variabilita, které se při takto malém vstupním množství DNA a ruční izolaci nelze vyhnout. Závěrečným parametrem bylo zahrnutí vnitřní kontroly pro normalizaci; přestože prvotní publikace neimplementují vnitřní kontroly, s variabilním vstupním počtem buněk a náhodnou měrou technických chyb nejen při pipetování je nezbytné výsledná data vztahovat ke stabilnímu prvku. Využili jsme tedy variantu exogenní DNA izolované z *E. coli*, která se neznámého důvodu neprojevila v sekvenční identitě vzorků, a poté komerční produkt CUT&Tag-ITSpike-In Control (Active Motif). Konečné optimalizační doporučení tedy vedlo k jednotnému počtu vstupních

buněk (4 000), amplifikačních cyklů knihovny (26) a využití spike-in kontroly pro normalizaci (Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023).

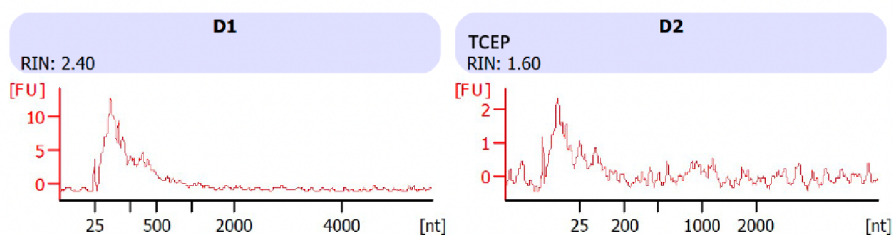
4.2.4. Optimalizace izolace a přípravy sekvenačních knihoven malých RNA molekul

Během mezinárodní mobility OPVVV jsem se v laboratoři Environmentální epigenetiky dr. Teperino v Helmholtzově centru na Ústavu experimentální genetiky v německém Mnichově podílel na výzkumu malých nekódujících RNA molekul obsažených v myších spermatozoích. Hlavním cílem mobility bylo osvojit si novou metodiku spojenou s NGS a v případě zájmu ji pak zavést v domácí laboratoři. Vzhledem ke skutečnosti, že tematicky tamní projekt přímo nesouvisel s hlavním tématem této dizertační práce, nebudu zde jeho vědeckou bázi široce rozvíjet, ale pouze demonstrovat širší metodický přínos prováděné optimalizace. Samotný výzkum epigenetických mechanismů představuje dynamicky se rozvíjející směr, jehož mechanismy významně zasahují do regulace genové exprese. Nedávný výzkum laboratoře ukazuje, že tyto nekódující paternální transkripty (kratší než 200 nukleotidů, představující malou frakci celkového transkriptomu) obsažené ve spermích ovlivňují vývoj a predeterminují metabolismus potomstva (Tomar et al. 2024).

Tento projekt začal otázkou, proč laboratoř pozoruje po ošetření DNázou I izolovaných vzorků RNA z myších spermatozoí sníženou výtěžnost RNA. Hypotéza vedla k triplexním hybridním strukturám RNA-DNA, tzv. „R-smyčkám“, vyskytujícím se mimo jiné právě v samčích gametách, a jejich neznámé funkci (Kianmehr et al. 2019; Jonoska et al. 2021). Realizoval jsem tedy jednoduchý experiment (obrázek V7) (n = 2 na podmínku, 3 biologické replikáty), na jehož konci byly ze vzorků připraveny knihovny pro stanovení diferenciální exprese malých RNA (smRNA-seq). Izolace spermatozoí probíhala podle zavedeného protokolu (Tomar et al. 2024), buňky byly počítány pomocí Countess Cell Counter (Thermofisher) a do každého vzorku byly spojeny spermatozoa čtyř stejně starých samců (celkem ~ 8,5 milionu spermatozoí na vzorek) vzhledem k velice nízkému obsahu RNA. Výtěžnost reakce jsem se prvotně pokoušel navýšit přidáním agens TCEP (Roszkowski and Mansuy 2021) ke standardnímu postupu izolace RNA pomocí TRIzol Reagent (Thermofisher). Výsledky kontradikovaly závěry uvedené publikace (obrázek V8). Další variantou bylo izolaci RNA provést komerčním kitem miRNeasy micro (QIAGEN) (tabulka 2), jehož výtěžek byl významně vyšší. Protokol využíval isopropanolový „wash“ pufr a ošetření DNázou I dle volitelné adaptace z manuálu výrobce.



Obrázek V 7: Design experimentu



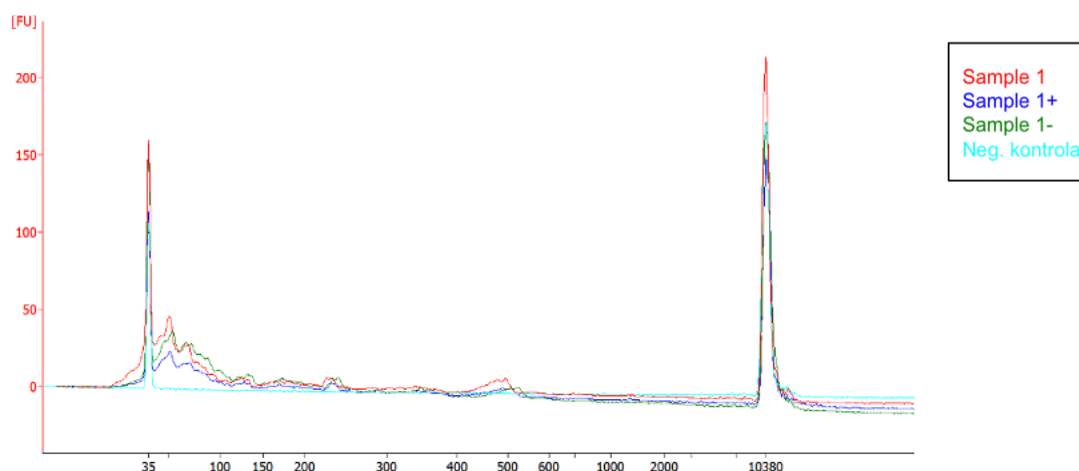
Obrázek V 8: Srovnání profilu (RNA pico kit; Agilent Bioanalyzer) izolované RNA s použitím TCEP (D2) a bez (D1); FU – Fluorescence Unit odpovídá síle signálu korelujícím s množstvím RNA ve vzorku, nt – počet nukleotidů

Vzorek	Věk (d)	Počet buněk (mil/ml)	Koncentrace RNA (ng/ul)	Metoda izolace
1	136	2,69	0,190	TRIzol Reagent
2	189	5,99	0,369	TRIzol Reagent
3	178	6,36	14,996	miRNeasy
4	153	2,90	3,545	miRNeasy

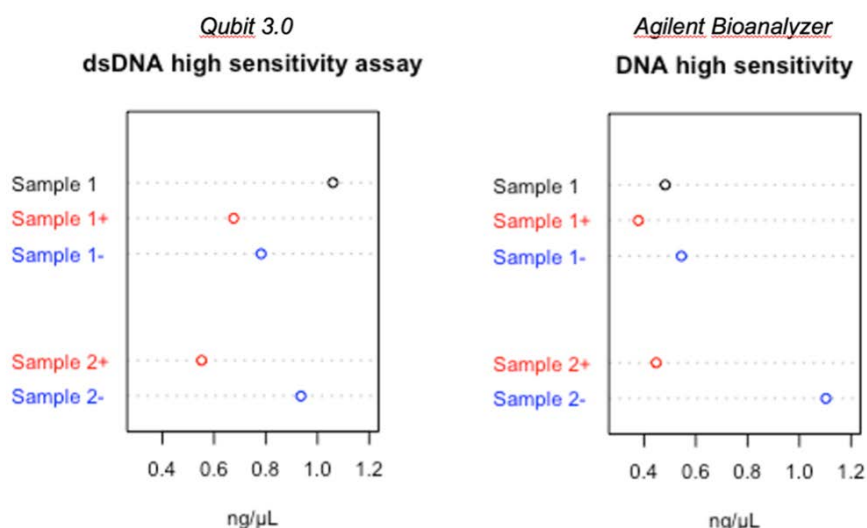
Tabulka 2: Srovnání výtěžnosti izolačních metod RNA TRIzol Reagent a miRNeasy

Profil DNA v takto připravených vzorcích nesl známky přítomnosti malého množství velmi krátkých úseků DNA (obrázek V9). Účinnost DNázy I obsažené v kitu byla experimentálně ověřena (data nepřiložena). Trend snížené koncentrace u DNázou I ošetřených vzorků, ze kterého vycházela prvotní hypotéza, byl taktéž reprodukován

(obrázek V 10). S neošetřenými vzorky bylo nakládáno technicky totožně, enzym byl nahrazen reakční vodou.



Obrázek V 9: Srovnání profilu vzorků vstupního do reakce (1) ošetřeného (1+) a neošetřeného (1-) DNázou I (DNA high sensitivity - Agilent Bioanalyzer); FU – Fluorescence Unit odpovídá síle signálu korelujícím s množstvím RNA ve vzorku, osa X – počet nukleotidů



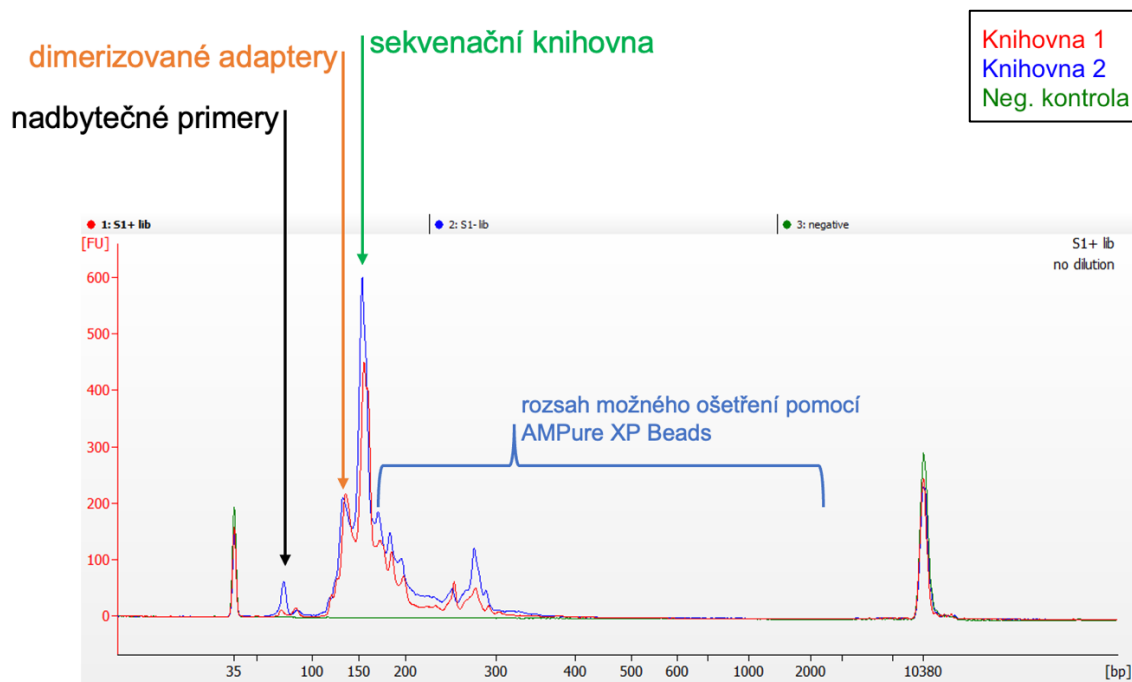
Obrázek V 10: Srovnání dvou kvantifikací (QuBit 3.0 a Agilent Bioanalyzer) DNA ve vzorcích 1 a 2. DNázou I ošetřené vzorky (červeně; +) zachovávají trend snížené koncentrace oproti neošetřeným vzorkům (modře; -); původní vzorek je černě (v případě Agilent došlo k technické chybě pipetování).

Připravené vzorky posloužily jako RNA templát pro přípravu sekvenačních knihoven pomocí NEBNext small RNA library prep kit (NEB) s využitím AMPure XP Beads (Beckman Coulter Life Sciences) a Monarch cleanup kit (NEB). Hlavním úskalím byla skutečnost, že kit pro přípravu knihoven je optimalizován pro vstupní množství 100–1000 ng celkového množství RNA. V případě mých vzorků bylo reálné dosáhnout maximálně 30 ng. Pro zachování vyvážené reakční kinetiky při redukováném vstupním materiálu, která je klíčová pro optimální (jednotnou) velikost fragmentů knihovny, jsem experimentálně adaptoval

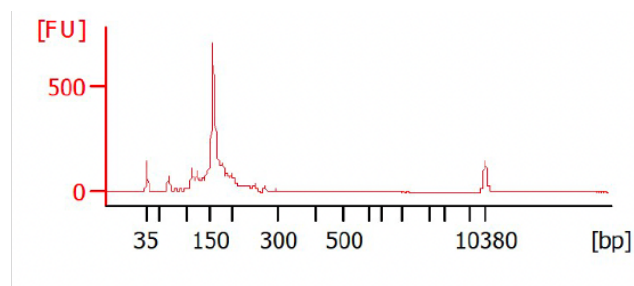
parametry poměrů vstupních primerů a adapterů (Tabulka 3). Popis knihovny připravené za podmínek nevyvážené reakční kinetiky zobrazuje obrázek V11. Krátké fragmenty je nutné eliminovat ještě před přípravou samotné knihovny úpravou poměrů jednotlivých primerů a adapterů, zatímco fragmenty větší než knihovna mohou být odstraněny pomocí AMPure XP Beads dodatečně. Profil optimalizované knihovny ilustruje obrázek V12.

Parametr	Hodnota
Vstupní množství RNA	30 ng
Amplifikace	15 cyklů
5' a 3' primery	1:5 ředění
RT primery	neředěné
PCR barkódy	neředěné
Síla AMPure XP Beads	0,9x

Tabulka 3: Parametry přípravy knihovny

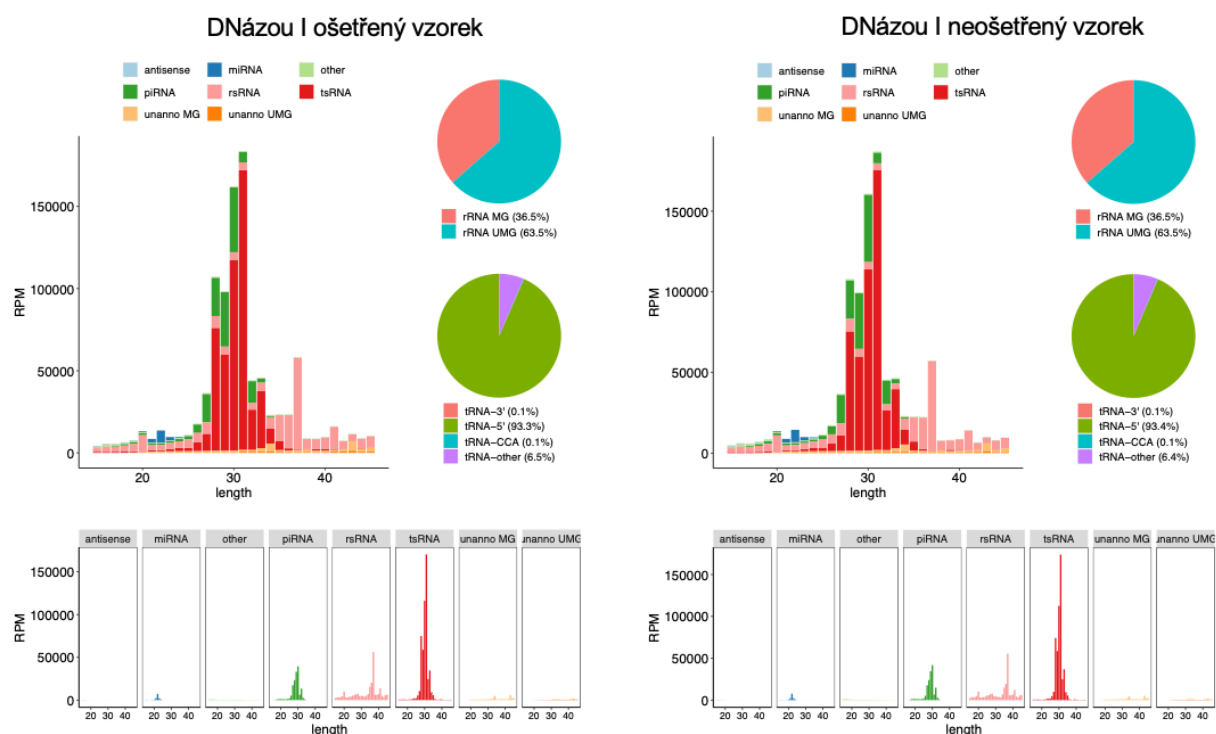


Obrázek V 11: Profil knihoven připravených za nevyvážených reakčních parametrů (DNA high sensitivity - Agilent Bioanalyzer); FU – Fluorescence Unit odpovídá síle signálu korelujícím s množstvím RNA ve vzorku, bp – počet párů bazí



Obrázek V 12: Profil optimalizované knihovny smRNA-seq (DNA high sensitivity - Agilent Bioanalyzer); FU – Fluorescence Unit odpovídá síle signálu korelujícím s množstvím RNA ve vzorku, bp – počet párů bazí

Konečná analýza sekvenačních dat byla analyzována pomocí SPORTS1.1 (Shi et al. 2018). Celkově mezi ošetřenými a neošetřenými vzorky nebyly detekovány rozdíly, což potvrzuje jejich podstatu vycházející z technického replikátu rozděleného vzorku (Obrázek V13).



Obrázek V 13: Porovnání globálního profilu malých RNA v ošetřeném a neošetřeném vzorku DNázou I

Analýza diferenciální exprese mezi ošetřenými a neošetřenými vzorky nicméně identifikovala signifikantní změny v řádech jednotek až desítek různých typů malých RNA molekul (Tabulka 4). Několik z nich bylo vybráno mezi kandidáty pro funkční *in vivo* experimenty, konkrétně například zralé tRNA *Glu-CTC*, *Glu-TTC*, YRNA *Rny1* či snRNA *Rnug5*. Na podrobnější analýzu již v rámci mobility nebyl prostor, projekt v laboratoři nicméně nadále pokračuje.

Počet identifikovaných anot. sekvencí	Typ RNA
8	lincRNA
34	mt-tRNA
138	piRNA
159	rRNA
8	snoRNA
3	snRNA
1	tRNA
2	YRNA

Tabulka 4: Přehled diferenciálně identifikovaných sekvencí příslušných k malým RNA

5. Diskuze

Předkládané publikace jsou zaměřené na objasnění molekulární role transkripčních faktorů ISL1 a NEUROD1 ve vývoji a funkci endokrinní linie pankreatu pomocí analýzy fenotypu, molekulárně biologických metod a NGS. Tato kapitola reflektuje klíčová zjištění z příložených studií a kriticky nahlíží na vybrané aspekty provedených experimentů.

5.1. ISL1 a NEUROD1 jako faktory determinující vývoj a zrání endokrinních buněk pankreatu

Vývoj endokrinních linií můžeme rozdělit do třech klíčových procesů, konkrétně diferenciaci (včetně specifikace buněčné linie), proliferace a maturace (včetně fyziologického fungování po skončení maturačního procesu) (Shih, Wang, and Sander 2013; W.-L. Qiu et al. 2017). Vedle vnějších faktorů zprostředkovaných okolními buňkami a tkání je pro maturaci a fyziologické fungování ostrůvků důležitá jejich architektura, která odráží i stav zralosti obsažených buněk (Adams and Blum 2022), což koreluje se stavem buněčné identity v případě eliminace *Isl1* (Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023). Ztráta alfa buněčné populace podle reportovaných studií na strukturu ostrůvků vliv nemá a kritickou komponentou je právě maturované beta buněčné jádro (Shiota et al. 2013; Adams and Blum 2022). Podle nejnovější poznatků endokrinní progenitory pouze vycestovávají a zůstávají v kontaktu s duktálními buňkami (Sharon et al. 2019; Sznurkowska et al. 2020), kde zakládají primární ostrůvky, které mohou připomínat buněčné řetízky. Podobně charakterizovaný fenotyp byl pozorován i v případě *Neurod1* deficiencie v E18.5, kdy je jinak běžně architektura ostrůvku zformována (Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023), a obdobný defekt pozorují i další studie (Naya et al. 1997; C. Gu et al. 2010; Bohuslavova et al. 2021; Dudek et al. 2021). Tento defekt koreluje s pozorovaným narušením diferenciacního procesu.

Předkládané publikace v rámci proliferačního procesu potvrzují dosavadní studie, které vyhodnotily sníženou míru buněčné proliferace v průběhu sekundární tranzice jako hlavní příčinu úbytku endokrinní tkáně, či většiny beta buněčné populace, u delečních mutantů *Neurod1* či *Isl1*, (Romer et al. 2019; Bohuslavova et al. 2021; Dudek et al. 2021; Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023; Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023) a zároveň vyvrátily podíl apoptózy na

tomto úbytku (Naya et al. 1997; Du et al. 2009; Dudek et al. 2021). Za procesem diferenciaci a maturaci se dále ohlíží podkapitoly dle příslušné endokrinní linie pankreatické tkáně.

5.1.1. Vliv na diferenciaci a zrání beta linie

Beta buňky jsou primárním cílem endokrinních studií pro pochopení jejich funkce během normálního vývoje pankreatu a také jejich dysfunkce v patologických stavech. Kompletní zralosti, tedy schopnosti plnohodnotně regulovat glykémii, dosahují u myši postnatálně nejdříve v období následujícím P9 (Blum et al. 2012; W.-L. Qiu et al. 2017). Regulace glykémie je vysoce komplexní proces, na jehož bázi stojí exprese inzulinu, která je mimo jiné regulována řadou transkripčních faktorů. Deficience *Neurod1* i *Isl1* má významný dopad na produkci inzulinu, protože jsou přímými regulátory jeho exprese a historicky se jedná o detailně zkoumaný proces (Karlsson et al. 1990; Naya, Stellrecht, and Tsai 1995; Sharma et al. 1999; Y. Qiu et al. 2002; Docherty et al. 2005; Babu et al. 2008; H. Zhang et al. 2009; W. Wang et al. 2016; H. Liu et al. 2021). Kromě úbytku celkového množství buněk produkujících inzulin je deficientní defekt na této populaci pozorovatelný až na úrovni samotné exprese inzulinu a dalších genů, včetně maturačních markerů, a odpovědi na krevní hladinu glukózy. ISL1 a NEUROD1 koordinovaně regulují intenzitu transkripce inzulinového genu společně s PDX1 a také MAFA (C. Zhang et al. 2005; Artner et al. 2010; Hang and Stein 2011), jehož funkce se zdá být zmíněným faktorům dle výsledků podřazená a může se tak jednat o jeden z finálních maturačních faktorů beta buněk (Hang et al. 2014).

Deficience *Isl1* vedla ke snížení exprese maturačních markerů (*Ucn3*, *Slc2a2*, *Trpm5*, *G6pc2*) postnatální populace beta buněk a souvisejících transkripčních faktorů *Pdx1* či *Mafa*, při zachování řady genů charakteristických pro vývoj progenitorů (Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023), což odpovídá závěrům dřívější studie (Du et al. 2009).

Eliminace *Neurod1* v případě *Neurod1CKO* dává postnatálně vzniknout dvěma beta-buněčným populacím (Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023). Jedna (*Neurod1*⁺) se svým fenotypem blíží kontrolním beta buňkám. V tomto případě se patrně jedná o dceřiné buňky, které unikly zpožděné delecii *Neurod1* a kompenzují dopady deficience ve zbývajících buňkách (více v části Limitace

využitých biologických modelů), či se může jednat o buňky diferencované z jiného buněčného zdroje neexprimující *Isl1*. Druhá populace (*Neurod1*⁻) nese znaky nezralosti spojené se sníženou expresí *Ucn3*, *Slc2a2* či s navýšenými markery nezralé populace jako *Mafb*, *Chga* a další. Tato zjištění korelují s řadou původních studií (C. Gu et al. 2010; Jia et al. 2015; Romer et al. 2019). Pozoruhodné je navýšení transkripčních faktorů *Isl1*, *Nkx6.1* a *Pdx1*, které naznačuje beta buněčnou adaptaci a stresový kompenzační mechanismus, stejně jako koexprese dalších hormonů. Přítomnost polyhormonální populace v deficientním případě *Neurod1* byla dříve rovněž pozorována u maturovaných ostrůvků (C. Gu et al. 2010).

5.1.2. Vliv na diferenciaci a zrání alfa linie

Alfa buňky jsou druhou nejčetnější buněčnou komponentou Langerhansových ostrůvků. Předkládané výsledky ukazují, že *Neurod1* hraje důležitou roli v jejich vývoji, a to již v průběhu primární tranzice během pankreatogeneze, dále v proliferaci a také maturaci buněk alfa linie (Bohuslavova et al. 2021; Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023), zatímco *Isl1* je naprosto nepostradatelný i pro její zachování (Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023). Defekty této endokrinní buněčné populace nebyly doposud jinými studii reportovány v souvislosti s deficiencí žádného ze zkoumaných transkripčních faktorů.

Alfa buňky diferencují jako první endokrinní linie ve dvou vlnách (X.-X. Yu and Xu 2020). Primární alfa buňky nejsou příliš prozkoumány, sekundární vlna dosahuje vrcholu proliferace a následně maturovaného stavu dříve v porovnání s beta linií (W.-L. Qiu et al. 2017), přičemž zralé alfa buňky neexprimují *Pdx1* (Krentz et al. 2018). Při eliminaci *Neurod1* nedochází v průběhu časného vývoje primární alfa linie k masivní redukci glukagon produkujících buněk (Bohuslavova et al. 2021; Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023), jak je tomu v případě eliminace *Isl1* (Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023), nicméně dochází k narušení transkripční regulace klíčových genů zodpovědných za specifikaci alfa linie (*Arx*, *Nkx2.2*, *Mafb*, *Pax6*, *Pou3f4*). Tato data korespondují s dosavadní literaturou (Chao et al. 2007; Mastracci et al. 2013). *Neurod1* deficientní alfa linie navíc kontinuálně exprimuje *Pdx1* a kvymizení této exprese, která je spojená s maturačním

procesem, dochází až se značným zpožděním v porovnání s kontrolním fenotypem. Dynamika stádiově specifické exprese *Pdx1* poukazuje na narušenou diferenciaci a maturaci (T. Gao et al. 2014; P. Guo et al. 2023). V případě deficiencie *Neurod1* u *Neurod1CKO* nebyla zaznamenána signifikantní redukce alfa buněčné proliferace v E17.5 a pouze hraničně signifikantní u *Neurod1ST*. Přesto pozorujeme celkový úbytek alfa buněčné populace, který je možné přisoudit sníženému celkovému množství diferencujících progenitorů (Bohuslavova et al. 2021; Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023).

Přiložená publikace poprvé ukazuje zásadní vliv transkripčního faktoru *Isl1* na diferenciaci alfa buněk (Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023), kdy v *Isl1* deficientní endokrinní buněčné populaci dochází v průběhu sekundární tranzice k téměř kompletnímu vymizení alfa linie. Jako hlavní marker alfa linie je ve studii využíván glukagon, v případě light-sheet mikroskopie také GLP1, který je alternativním peptidem pocházejícím z preglukagonového prekursoru (Fava, Dong, and Wu 2016; Sancho et al. 2017). Snížení exprese dalších specifických alfa buněčných markerů vedle glukagonu, který ISL1 přímo reguluje (M. Wang and Drucker 1995), v E12.5 (*Arx, MafB, Peg10, Pou3f4*) a v E14.5 (*Peg10, Pou6f2*) potvrzuje celkový úbytek alfa buněčné hmoty, a naopak dochází k navýšení progenitorového endokrinního markeru *Fev* (více v části Endokrinní progenitory). Existenci GLP1 pozitivních buněk u *Isl1CKO* v P0 oponující robustním argumentům podporujícím diferenciaci zástavu alfa linie (kapitola Metody a výsledky – GLP1) by tedy bylo možné vysvětlit tím, že se jedná o ojedinělé buňky, které unikly delecii *Isl1* a adaptovaly se na hyperglykemické prostředí (Hayashi 2011).

5.1.3. Dopad eliminace na endokrinní progenitory

Endokrinní progenitory lze označit jako přechodná vývojová mezistádia v průběhu diferenciaci specifická pro každou buněčnou linii, které se vyznačují charakteristickou genovou expresí a schopností proliferace.

Eliminace *Isl1* vedla k navýšení exprese *Fev*, markeru pozdějších endokrinních progenitorů (Byrnes et al. 2018; Bastidas-Ponce et al. 2019) ve stádiu E12.5 a E14.5, což indikuje diferenciaci zástavu, či zdržení, které odpovídá dekonvolučnímu srovnání s jednobuněčným profilem kontrolního pankreatického fenotypu (van Gurp et al. 2019) a také *in silico* analýze vazebných motivů ISL1 a FEV

u identifikovaných deregulovaných genů. ISL1 a FEV sdílí řadu vazebných míst v promotorech těchto klíčových genů (*Pax6*, *Mafb*, *Nkx6.2*, *Insm1*, *Sox9*, *Arx*, *Fev*, *Nkx6.1*, *Foxa2*, *Neurod1*, *Rfx3*, *Rfx6*) pro alfa i beta linii a pravděpodobně tak ISL1 v průběhu diferenciaci přejímá část jeho vazebných interakcí, anebo společně úzce kooperují a tím v rámci diferenciačního procesu posunují profil jednotlivých buněčných typů k pozdějším stádiům endokrinního vývoje. S tím korelují i pseudočasové modely diferenciaci a hypotézy popisované v jednobuněčných transkriptomických studiích (Byrnes et al. 2018; de la O et al. 2023).

Kritickým iniciačním momentem pro specifikaci endokrinní linie pankreatu je exprese *Neurog3* (Gradwohl et al. 2000; Jensen et al. 2000; Lee et al. 2001; G. Gu, Dubauskaite, and Melton 2002; Desgraz and Herrera 2009; Gouzi et al. 2011; Suissa et al. 2013) a jeho možná interakce s „downstream“ *Neurod1* je předmětem několika studií (H. P. Huang et al. 2000; Schwitzgebel et al. 2000; Gasa et al. 2008; Anderson et al. 2009; Mastracci et al. 2013; 2013). Exprese *Neurog3* v endokrinních progenitorech se překrývá s rychle nastolenou expresí *Neurod1*, hypoteticky je tedy možné, že NEUROD1 přebírá hlavní diferenciační roli a NEUROG3 slouží pouze jako iniciační bod v tomto regulačním systému (Gasa et al. 2008; Anderson et al. 2009). S touto hypotézou korelují zjištění, že je exprese *Neurog3* například u člověka velice krátká (Salisbury et al. 2014) či u zebřiček jeho homologní gen postrádá funkci ve vývoji pankreatu (Flasse et al. 2013). Eliminace *Neurod1* v *Neurod1CKO* způsobila signifikantní snížení exprese *Neurog3* v E14.5 a naopak zvýšení počtu NEUROG3-pozitivních buněk v E15.5, tedy v období sekundární tranzice, kdy dochází k jejich masivní proliferaci a tím nárůstu endokrinní buněčné populace (Bohuslavova et al. 2021). Vzhledem k „bulk“ limitacím embryonální analýzy transkriptomu *Neurod1ST* (X. Li and Wang 2021) se tuto skutečnost nepodařilo potvrdit a postnatální jednobuněčná analýza transkriptomu endokrinní populace neidentifikovala *Neurog3* mezi deregulovanými geny (vyjma malé subpopulace delta buněk) (Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023), což nasvědčuje jeho izolované specifikační roli v embryonálním období. Výsledky nevylučují zapojení NEUROD1 do zpětnovazebné regulační smyčky *Neurog3*. Druhou možností je NEUROG3-

iniciovaná *Neurod1* smyčka; NEUROD1 má schopnost vazby do lokusu genu *Neurod1*, čímž může indukovat vlastní expresi (Matsuda et al. 2019).

Deficience *Neurod1* vedla k signifikantní dysbalanci identity endokrinních progenitorů, kdy u diferencujících endokrinních buněk zůstaly zachovány neendokrinní molekulární charakteristiky jako je exprese *Sox9*, *Cdh4* či elementy MAPK/ERK signalizace a řada dalších (Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023). Pankreatické endokrinní buňky sdílí řadu charakteristik s neurony (Edlund 2001). Proces neurogeneze indukovaný expresí *Neurod1* je dlouhodobě intenzivně studován (Pavlinkova and Smolik 2024), přičemž exogenní exprese čistě tohoto transkripčního faktoru diferencuje či konvertuje různé buněčné typy do neuronům podobným buněk. Předkládané výsledky ukazují, že *Neurod1* je nezbytným faktorem umocňujícím endokrinní diferenciační program také v pankreatu; bez něj si zachovávají buňky příbuznost s acinární a duktální linií, přičemž morfologicky tomu odpovídá již zmiňovaná defektní architektura Langerhansových ostrůvků.

5.1.4. Vliv na ostatní endokrinní buněčné linie

V předkládaných studiích jsou dokumentovány dopady delece téměř výhradně na alfa a beta linii, endokrinní progenitory nicméně dávají vzniknout pěti buněčnými typům (X.-X. Yu et al. 2021). Eliminace *Neurod1* i *Isl1* má potenciál ovlivnit každý z nich (Byrnes et al. 2018; Krentz et al. 2018; Bastidas-Ponce et al. 2019; van Gurp et al. 2019) a předkládají to i původní deleční publikace (Ulf Ahlgren et al. 1997; Naya et al. 1997). Vyjma ghrelinu (epsilon buňky) bylo pozorováno snížení produkce příslušných hormonů/peptidů pomocí RT-qPCR; v případě *Neurod1CKO* ve stádiu E14.5 a P1 se jedná o inzulín a glukagon (Bohuslavova et al. 2021), resp. u *Neurod1ST* v E15.5 (Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023), a u *Isl1CKO* v E14.5 byla detekována snížená exprese mRNA inzulínu, glukagonu, somatostatinu (*Sst*; delta buňky) i pankreatického polypeptidu (*Ppy*; gamma buňky) (Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023). Tyto výsledky jsou v konsenzu s literaturou (Du et al. 2009; Dumonteil et al. 1998; Naya, Stellrecht, and Tsai 1995).

NEUROD1 není přítomen v maturovaných delta ani gamma buňkách, naopak jeho exprese reprimuje diferenciační proces delta linie (Itkin-Ansari et al. 2005), což potvrzuje i jednobuněčná studie v E18.5 (Krentz et al. 2018). Delece

Neurod1 by se mohla projevit ve změněném poměru beta/delta buněk, tuto hypotézu ovšem nepotvrzuje žádná z námi provedených analýz transkriptomu, neboť signifikantní změna exprese *Sst* v případě *Neurod1* deficiencie nebyla zaznamenána. V kontrastu s *Neurod1*, *Isl1* je silně exprimován v alfa i delta buňkách v E15.5, resp. E18.5 (Krentz et al. 2018), a ke snížení exprese *Sst* dochází u *Isl1CKO* (Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023). Vzhledem k tomu, že se populace gamma buněk produkující pankreatický polypeptid (*Ppy*) vyčleňuje v průběhu diferenciaci z alfa linie (X.-X. Yu et al. 2021), lze předpokládat, že bude také zasažena defektem způsobeným *Isl1* deficiencí; exprese *Ppy* mRNA v E14.5 tomu napovídá (Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023).

Absence studia markerů dalších endokrinních linií je tedy zajímavým impulzem pro potenciální rozšiřující experiment, který by se zaměřil na doplnění imunohistochemického barvení pro vizualizaci všech endokrinních buněčných typů v tkáňovém kontextu Langerhansových ostrůvků, a to zejména na stav gamma buněčné populace.

5.2. Vztah mezi transkripční regulací NEUROD1 a ISL1 na remodelaci chromatinu

Znalost molekulárních mechanismů regulace genové exprese je zcela nezbytná pro řadu aplikací nejen v biomedicině. V předkládaných studiích se podařilo nepřímo demonstrovat zapojení obou studovaných transkripčních faktorů do tohoto procesu pomocí profilování chromatinu metodou CUT&Tag sekvenování (Kaya-Okur et al. 2019). V případě ISL1 (R. Gao et al. 2019; Maven et al. 2023) i NEUROD1 (Pataskar et al. 2016; Matsuda et al. 2019) bylo již v jiných buněčných modelech prokázáno, že mají schopnost remodelace chromatinu a zároveň „pioneeringu“. Jsou tedy schopni ve svých vazebných místech „euchromatizovat“ uzavřený chromatin a aktivovat v daných místech genovou expresi (Abhilasha Singh et al. 2023). Ve dvou případech (Bohuslavova, Fabriciova, Lebrón-Mora, et al. 2023; Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023) jsme se zaměřili na diferenciální lokalizaci dvou chromatinových značek, H3K4me3 a H3K27me3, které jsou charakteristické pro bivalentní regiony (převážně promotory) (Blanco et al. 2020) a v případě kolokalizace umožňují dynamickou aktivaci jinak umlčeného genu odstraněním inhibiční modifikace K27me3 z histonu H3 právě v průběhu vývoje (Mikkelsen et al. 2007). Tyto regiony byly

identifikovány jako potenciální cíle rozhodující o buněčném osudu v endokrinních progenitorech mezi alfa a beta buněčnou linií (Bramswig et al. 2013). Diferenciálním srovnáním epigenomických profilů u jednotlivých delečních modelů bylo v předkládaných studiích prokázáno, že důvodem snížení exprese u řady genů je v důsledku eliminace *Isl1* či *Neurod1* zachování H3K27me3 v místě promotorů. Na tomto základě lze usuzovat, že NEUROD1 i ISL1 se v kooperaci s dalšími chromatin remodelujícími komponenty podílí na jejich odstranění a fungují tak jako klíčové body nejen při regulaci exprese inzulínu, ale také v diferenciačního procesu (S. A. Campbell and Hoffman 2016).

Konkrétně, v případě *Isl1CKO* ve stádiu E14.5 se v takto neaktivním stavu podařilo identifikovat několik genů zodpovědných za diferenciaci alfa a beta linie (*Mafa*, *Ripply3*, *Sorcs1*, *Mnx1*). Naopak postnatálně, ve stádiu P9, koreloval stav chromatinu *Isl1CKO* s navýšenou genovou expresí u významných progenitorových markerů a iniciačních produktů endokrinní sekrece (*Fev*, *ChgA*, *ChgB*) a vedle toho sníženou expresí u genů zrajících alfa a beta buněk (*Glp1r*, *Pyy*, *Ucn3*). Experimentálně identifikovaná vazebná místa ISL1 pomocí CUT&Tag dodala transkriptomickým výsledkům cenný kontext; bylo identifikováno několik potenciálních vazebných partnerů ISL1, jmenovitě NKX6.1, RFX6, PDX1 či NKX2.2. Tyto transkripční faktory jsou postnatálně nesmírně důležité zejména pro zrání a udržení maturovaného stavu, což koreluje s pozorovanou patologií *Isl1CKO* a rozšiřuje výsledky předchozí deleční studie (Ediger et al. 2014). PDX1 je navíc jednou z hlavních komponent chromatin remodelujícího komplexu (W. Wang et al. 2016; Spaeth et al. 2019) diferencujících i maturovaných beta buněk. Takto se podařilo demonstrovat spojitost mezi deficiencí *Isl1* a regulací bivalentních promotorů, klíčovou pro překonání kritických milníků v procesu diferenciace ústící v maturaci beta linie. Využitými metodami se však nepodařilo najít molekulární spojitost mezi známou aktivací *Arx* (J. Liu et al. 2011; Xu and Xu 2019), genu zodpovědného za specifikaci alfa linie (Collombat et al. 2003), skrze ISL1. Je tedy hypoteticky možné, že se ISL1 v endokrinních buňkách pankreatu mimo depozice H3K27me3 podílí i na organizaci dalších chromatin remodelujících značek, jako například H3K4me1 v enhancerech (W. Wang et al. 2016).

V případě *Neurod1ST* ve stádiu E15.5 bylo identifikováno několik klíčových genů inhibovaných pomocí H3K27me3 vztahujících se k endokrinní diferenciaci (*Isl1*, *Tox3*, *Mafa*) a řada genů se zachovanou histonovou značkou v neendokrinní lokalizaci (*Sox9*, *Vcan*, *Ocln*). NEUROD1 ve srovnání s ISL1 ovlivňuje bazální geny související se specifikací, pravděpodobně obdobným mechanismem. Mezi jeho transkripční cíle by se navíc mohly řadit další chromatin regulující faktory, resp. jejich podjednotky (Tsuda et al. 2021), jako *Smarcd2*, *Smarca4*, *Smarca1*, jejichž expresi delece *Neurod1* dereguluje. Pozorované navýšení exprese *Smarcd2* a následné snížení u *Tox3* a v *Neurod1*-deficientní populaci endokrinních progenitorů (Krentz et al. 2018) je velice zajímavou skutečností, která by zasloužila další studium. *Tox3* ovlivňuje identitu diferencujících neuronů (Sahu et al. 2016) a *Smarcd2* má v pankreatické tkáni dosud neprobádanou roli.

Pro epigenomická profilování byla využita metoda CUT&Tag, při které jsme u embryonálních stádií naráželi na úskalí nízkého počtu vstupních buněk, přestože metoda avizuje nízkou náročnost na tento parametr (Kaya-Okur et al. 2019; 2020; Y. Li et al. 2021), a pohybovali jsme se na spodní hraně spolehlivosti. Pro posílení robustnosti výsledků jsme se proto zaměřili čistě na diferenciální epigenomické profily diferenciálně exprimovaných genů. H3K4me3 a H3K27me3 patří mezi běžné epitopy a využity byly osvědčené robustní komerční protilátky s vysokou specificitou (Active Motif). Obdobný postup fungoval pro protilátku proti ISL1. Neúspěšně byla s účelem detekovat vazebná místa jednorázově testována protilátka proti NEUROD1, která je jinak standardně využívána pro imunohistochemická barvení; vazebné motivy byly proto doplněny *in silico*. Optimalizace metody zahrnující výskyt histonové modifikace probíhala v řadě aspektů na vysoce experimentální úrovni, neboť v té době nebyla dostupná např. sada užívaných chemikálií či optimalizovaná bioinformatická pipeline pro zpracování dat. V současnosti je tato metodologie komerčně optimalizovaná s řadou variací včetně řešení pro vzácné epitopy, má dostupnou podporu a variace protokolů (EpiCypher, Active Motif) či alternativu ve formě CUT&RUN (F. Yu, Sankaran, and Yuan 2021), která je vhodnější pro vzácné cíle jako jsou třeba DNA-vazebné faktory.

Vzhledem ke skutečnosti, že ve výsledku pokryla analýza pouze zlomek histonových značek (Janssen and Lorincz 2022), přestože v kontextu literatury

vysoce validní (Bramswig et al. 2013), zvažoval bych pro budoucí použití jednobuněčný ATAC-seq (Grandi et al. 2022). Výpovědní hodnota této metody je z hlediska stavu chromatinu ve vybraných buňkách kompletní a rozpětí vstupního počtu buněk se pohybuje v rozmezí 500-50 000 buněk, což je zásadním faktorem pro studium embryonálního vývoje.

5.3. Limitace využitých biologických modelů

V předkládaných publikacích byla demonstrována kritická role *Neurod1* ve vývoji a funkci endokrinní části pankreatu. Ve všech třech biologických modelech (*Neurod1CKO*, *Neurod1ST* i *Isl1CKO*) byla ke studiu využita tkáňově specifická delece systémem *Cre-loxP* (H. Kim et al. 2018) zprostředkovaná aktivací exprese endokrinního genu, tedy *Isl1*, resp. *Neurod1*. *Neurod1* je v genové regulační kaskádě lokalizován bazálně („upstream“) a *Isl1* naopak více „downstream“ (Krentz et al. 2018). K eliminaci *Neurod1* proto v obou případech (*Isl1^{Cre}*; *Neurod1CKO*, resp. *Neurod1^{Cre}*; *Neurod1ST*) dochází se zpožděním. V případě *Isl1CKO* byl naopak nejprve aktivován „Cre-driver“. Aktivace CRE rekombinázy a následná delece genu je závislá na více faktorech včetně buněčné dynamiky (Kühn and Torres 2002). Buňky v časném embryonálním vývoji se vyznačují vysokou měrou proliferace i transkripce (Brantley and Di Talia 2021), lze proto očekávat, že k samotné deleci cílového genu by došlo na spodní hranici zdržení, a to v řádu hodin. V případě předkládaných studií byl detekován fluorescenční reportér CRE aktivity tdTOMATO ihned během stádia primární tranzice (E9.5). Transientní expresi *Neurod1* v endokrinních progenitorech ovšem nelze kategoricky vyloučit; NEUROD1 může dočasně ovlivnit výsledný fenotyp (*Cre⁺ Neurod1^{-/-}*) a odlišovat se tak například od globální delece (*Neurod1^{-/-}*) (Naya et al. 1997). Přestože zásadní rozdíly mezi fenotypem *Neurod1CKO* a *Neurod1ST* nebyly pozorovány, předpokládaná pozdější delece u *Isl1^{Cre} Neurod1^{-/-}* v případě *Neurod1CKO* mohla vést ke zdatně vyšší schopnosti přežití u diabetických novorozených myší (Bohuslavova et al. 2021) oproti *Neurod1ST* (Bohuslavova, Fabriciova, Smolik, et al. 2023). Dalším faktorem může být také rozdílné genetické pozadí u kmene myší nesoucí *Cre* vedoucí k dříve pozorované neonatální neogenezi beta buněk (H. Huang et al. 2002), která mohla defekt kompenzovat.

V budoucnosti bych pro vyloučení možných zkreslení uvažoval využití budto více bazálně lokalizovaného „Cre driveru“ (např. *Pdx1*, *Neurog3*) pro vývojové studie, či třeba *Ins1* a další pro diferencované buňky (Magnuson and Osipovich 2013). Ke zvážení by byla i možnost externě indukovaného Cre podle potřeb dané studie (Reinert et al. 2012).

S ohledem na charakter některých prováděných experimentů, se domnívám, že je na místě do budoucna uvažovat o rozšíření experimentálních modelů o *in vitro* model (Bakhti, Böttcher, and Lickert 2019; Milojević et al. 2021). Přestože jsou *in vivo* modely alfou a omegou současného biomedicínského výzkumu a nelze bez jejich využití počítat s translačním potenciálem do humánní medicíny, přesvědčili jsme se o úskalích, která s sebou přináší. Při práci na úrovni jednotlivých buněk je velice náročné u vzácných heterogenních buněčných populací, jako jsou právě endokrinní progenitory, získat solidní množství buněk jako základ pro vysokokapacitní NGS metody (Satam et al. 2023). Kombinace *in vivo* a *in vitro* přístupů je využívána za podmínek, kdy je obtížné z různých důvodů získat buněčný materiál v potřebné kvalitě, či kvantitě (Bu et al. 2009; R. Gao et al. 2019; Maven et al. 2023).

5.4. Význam a budoucí směřování výzkumu transkripční regulace endokrinní tkáně pankreatu

Základní výzkum procesů determinujících buněčný osud je zcela klíčový pro moderní terapie diabetu cílící na generaci endokrinních buněčných náhrad (Kobayashi, Yuasa, and Okitsu 2009; Bakhti, Böttcher, and Lickert 2019; X.-X. Yu and Xu 2020; Siehler et al. 2021). V průběhu posledních tří dekad byly NEUROD1 i ISL1 nejprve identifikovány jako transkripční faktory regulující expresi inzulínu, později byly jejich klíčové role objasněny pomocí (tkáňově-specifických) delečních studií. S nástupem jednobuněčných NGS analýz transkriptomu (Muraro et al. 2016; W.-L. Qiu et al. 2017; Byrnes et al. 2018; Krentz et al. 2018; Bastidas-Ponce et al. 2019; van Gurp et al. 2019; X. Yu et al. 2019; de la O et al. 2023; Ma et al. 2023) nastalo ideální období pro objasnění transkripčně regulačních mechanismů v heterogenních buněčných populacích a dalším krokem bylo rozšíření o epigenetické profilování (Schwartzman and Tanay 2015; Harada, Kimura, and

Ohkawa 2021). Nejnovějším trendem je pak genová exprese s informací o její lokalizaci v tkáni, tzv. „spatial“ transkriptomika (Olaniru et al. 2023). Domnívám se, že pro kontext endokrinní tkáně je současná rozlišovací schopnost těchto metod nízká a v rámci ostrůvků v tkáni by docházelo k většímu překryvu signálu z jednotlivých buněk do příliš malého detekčního prostoru (např. alfa-buněčného okraje s beta-buněčným jádrem). V budoucnu ale očekávám, že bude i tato technika dovedena k vyššímu rozlišení a bude možné identifikovat prostorovou expresi např. na řezu Langerhansova ostrůvku.

Translace základního výzkumu do vývoje protokolů řízené diferenciaci či transdiferenciaci pomocí exprese *Neurod1*, *Isl1* a dalších faktorů (Jung et al. 2018; Pavlinkova and Smolik 2024) do buněk produkujících inzulín již probíhá. Z důvodu epigenetické plasticity a blízké příbuznosti beta buňkám jsou jako zdroj uvažovány i alfa buňky (Bramswig et al. 2013; Ackermann et al. 2016; P. Guo et al. 2023). Dosavadní výsledky ukazují, že optimální postup bude vyžadovat kombinaci několika transkripčních faktorů a také specifické načasování jejich působení, což podtrhuje význam základního výzkumu vývoje těchto buněk.

5.5. Závěr

NEUROD1 a ISL1 jsou nepostradatelné transkripční faktory pro endokrinní vývoj, jejichž role odpovídá postavení v genové kaskádě regulující tento proces. NEUROD1 je bazální regulátor, který přejímá hlavní úlohu definující buněčný osud celé endokrinní linie po iniciačním impulzu NEUROG3. ISL1 je specializovanějším faktorem zajišťujícím průchod pozdějšími vývojovými stádii. Výsledky předkládané v této práci demonstrují, že absence těchto faktorů způsobuje stagnaci v daném stádiu vývoje (endokrinní progenitory), či zpoždění diferenciačního procesu, které má negativní vliv na morfogenezi endokrinní tkáně a zrání (maturační markery) a později na buněčné funkce (hormonální sekrece), zatímco jiné regulační systémy jsou zachovány. Výsledkem je systém selhávající ve své primární funkci (regulaci glykémie). NEUROD1 i ISL1 sdílí mechanismus regulace těchto procesů pomocí remodelace chromatinu ve svých vazebných místech, a to ve vývoji i postnatálních fyziologických endokrinních funkcích. Získané poznatky dokládají jako první tuto roli v transkripční regulaci v endokrinní tkáni pankreatu, jež má potenciál pro uplatnění v biomedicínské terapii diabetu.

6. Shrnutí

NEUROD1 je klíčový pro specifikaci a časnou diferenciaci endokrinních buněk pankreatu a dále pro jejich zrání a funkci. Jeho eliminace zásadně ovlivňuje síť endokrinních transkripčních faktorů a pravděpodobně zasahuje i do „upstream“ koordinace tohoto procesu iniciovaného faktorem NEUROG3. NEUROD1 indukuje změny na úrovni transkriptomu a epigenomu, které definují endokrinní buněčný osud a umocňují endokrinní diferenciaci. V *Neurod1*-deficientních buněčných progenitorech dochází ke změnám exprese klíčových proendokrinních transkripčních faktorů jako *Insm1*, *Isl1*, *Mafa* či faktorů remodelujících chromatin vedle navýšení exprese neendokrinních genů jako *Sox9*, což poukazuje na zkrat v určení buněčné identity. Eliminace *Neurod1* vede k významným změnám v architektuře Langerhansových ostrůvků. Vznik primární alfa linie není zasažen, později se ale objevují abnormality v její diferenciaci. Snížená míra proliferace beta linie vede k celkové redukci beta buněčné masy. Narušený proces maturace se manifestuje postnatálně kombinací zralých a nezralých markerů beta linie a zvýšeném množství bihormonálních a polyhormonálních beta buněk, což vyúsťuje ve výrazně snížené expresi inzulínu a silně diabetický fenotyp.

ISL1 je nezbytný transkripční faktor pro diferenciaci pankreatické alfa buněčné linie a expanzi a maturaci beta buněk. Jeho eliminace způsobuje vývojovou zástavu v intermediárním stádiu endokrinních progenitorů silně exprimujících marker *Fev* a ztrátu buněčné populace produkující glukagon. ISL1 reguluje transkripci cílových endokrinních genů v kooperaci s dalšími významnými transkripčními faktory jako NKX6.1 a také se podílí na remodelaci chromatinu v oblasti promotorů těchto genů. *Isl1*-deficientní beta buňky mají redukovanou míru proliferace a nedosahují postnatální zralosti z důvodu významně snížené exprese jejich klíčových komponent jako *Pdx1* a *Mafa*, což se projevuje sníženou expresí inzulínu a diabetickým fenotypem.

7. Doprovodné oddíly

7.1. Seznam zkratek

Zkratka	Význam
ADP	Adenozin difosfát
ATAC	„assay for transposase-accessible chromatin“
ATP	Adenozin trifosfát
cAMP	Cyklický adenozin monofosfát
Cq	Amplifikační cyklus (někdy také Ct)
CRHR2	„Corticotropin-releasing hormone receptor 2“
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOI	„digital object identifier“
DPP4	Dipeptidyl peptidáza 4
E[číslo]	Embryonální den
EP	Endokrinní progenitory
GCGR	Receptor glukagonu
GIP	Gastrický inhibiční peptid
GIPR	Receptor GIP
GK	glukokináza
GLP1	„Glucagon-like peptide 1“
GLP1R	Receptor GLP1
GLUT	Glukózový transportér
GRN	Geny regulující síť
GSIS	Glukózou stimulovaná inzulínová sekrece
hESCs	Lidské embryonální kmenové buňky
hPSCs	Lidské pluripotentní kmenové buňky
ChIP	Chromatinová imunoprecipitace
IAPP	Amylín
IDF	Mezinárodní diabetologická federace
K _{ATP}	Sodné kanály regulované ATP
MODY	„Maturity onset diabetes of the young“
MP	Multipotentní progenitory
mRNA	„Messenger“ RNA
MSCs	Mezenchymální kmenové buňky
NGS	Sekvenování nové generace
OPVVV	Operační program Výzkum, vývoj, vzdělávání
P[číslo]	Postnatální den
RNA	Rybonukleová kyselina
RT-qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
seq	sekvenování
SGLT2	Sodno-glukózový transportér 2
smRNA	„small“ RNA
T1DM	Diabetes mellitus – typ 1
T2DM	Diabetes mellitus – typ 2

TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosphin
UCN3	Urocortin 3
VGCC	Napětově řízené vápenaté kanály
WHO	Světová zdravotnická organizace

*Seznam neuvádí zkratky názvů genů a proteinů uvedených pouze v textu.

7.2. Seznam primárních protilátek

Název (Označení)	Host (Výrobce)	Ředění
Anti-GLP1 (ab111125)	Králík (ABcam)	1:1000
Anti-NEUROD1 (sc-1084)	Koza (Santa Cruz Biotech)	1:100
Anti-Tyrosin hydroxyláza (AB152)	Králík (Merck)	1:750

7.3. Seznam chemikálií

Název	Výrobce
AMPure XP Beads	Beckman Coulter
Bioanalyzer High Sensitivity DNA Analysis	Agilent
Bioanalyzer RNA Pico Analysis	Agilent
miRNeasy Micro Kit	QIAGEN
Monarch Cleanup kit	NEB
NEBNext Small RNA Library Prep Kit	NEB
QuBit dsDNA HS Kit	Thermofisher
TATAA Universal RNA Spike I	TATAA Biocenter
TCEP	Thermofisher
TRIzol Reagent	Thermofisher

7.4. Reference

- Ackermann, Amanda M., Zhiping Wang, Jonathan Schug, Ali Najj, and Klaus H. Kaestner. 2016. 'Integration of ATAC-Seq and RNA-Seq Identifies Human Alpha Cell and Beta Cell Signature Genes'. *Molecular Metabolism* 5 (3): 233–44. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.01.002>.
- Adams, Melissa T., and Barak Blum. 2022. 'Determinants and Dynamics of Pancreatic Islet Architecture'. *Islets* 14 (1): 82–100. <https://doi.org/10.1080/19382014.2022.2030649>.
- Ae, Schaffer, Freude Kk, Nelson Sb, and Sander M. 2010. 'Nkx6 Transcription Factors and Ptf1a Function as Antagonistic Lineage Determinants in Multipotent Pancreatic Progenitors'. *Developmental Cell* 18 (6). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.015>.
- Ahlgren, U., J. Jonsson, and H. Edlund. 1996. 'The Morphogenesis of the Pancreatic Mesenchyme Is Uncoupled from That of the Pancreatic Epithelium in IPF1/PDX1-Deficient Mice'. *Development (Cambridge, England)* 122 (5): 1409–16. <https://doi.org/10.1242/dev.122.5.1409>.
- Ahlgren, Ulf, Samuel L. Pfaff, Thomas M. Jessell, Thomas Edlund, and Helena Edlund. 1997. 'Independent Requirement for ISL1 in Formation of Pancreatic Mesenchyme and Islet Cells'. *Nature* 385 (6613): 257–60. <https://doi.org/10.1038/385257a0>.
- Ahnfelt-Rønne, Jonas, Mette C. Jørgensen, Rasmus Klinck, Jan N. Jensen, Ernst-Martin Füchtbauer, Tye Deering, Raymond J. MacDonald, Chris V. E. Wright, Ole D. Madsen, and Palle Serup. 2012. 'Ptf1a-Mediated Control of Dll1 Reveals an Alternative to the Lateral Inhibition Mechanism'. *Development (Cambridge, England)* 139 (1): 33–45. <https://doi.org/10.1242/dev.071761>.
- Akol, Ipek, Annalisa Izzo, Fabian Gather, Stefanie Strack, Stefanie Heidrich, Darren Ó hAilín, Alejandro Villarreal, et al. 2023. 'Multimodal Epigenetic Changes and Altered NEUROD1 Chromatin Binding in the Mouse Hippocampus Underlie FOXG1 Syndrome'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120 (2): e2122467120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2122467120>.
- Anderson, Keith R., Ciara A. Torres, Keely Solomon, Thomas C. Becker, Christopher B. Newgard, Christopher V. Wright, James Hagman, and Lori Sussel. 2009. 'Cooperative Transcriptional Regulation of the Essential Pancreatic Islet Gene NeuroD1 (Beta2) by Nkx2.2 and Neurogenin 3'. *Journal of Biological Chemistry* 284 (45): 31236–48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.048694>.
- Ando, K., S. Shioda, H. Handa, and K. Kataoka. 2003. 'Isolation and Characterization of an Alternatively Spliced Variant of Transcription Factor Islet-1'. *Journal of Molecular Endocrinology* 31 (3): 419–25. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0310419>.
- Apelqvist, A., H. Li, L. Sommer, P. Beatus, D. J. Anderson, T. Honjo, M. Hrabe de Angelis, U. Lendahl, and H. Edlund. 1999. 'Notch Signalling Controls Pancreatic Cell Differentiation'. *Nature* 400 (6747): 877–81. <https://doi.org/10.1038/23716>.
- Arda, H Efsun, Cecil M Benitez, and Seung K Kim. 2013. 'Gene Regulatory Networks Governing Pancreas Development'. *Developmental Cell* 25 (1): 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.03.016>.

- Artner, Isabella, Bruno Bianchi, Jeffrey C. Raum, Min Guo, Tomomi Kaneko, Sabine Cordes, Michael Sieweke, and Roland Stein. 2007. 'MafB Is Required for Islet Beta Cell Maturation'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (10): 3853–58. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700013104>.
- Artner, Isabella, Yan Hang, Magdalena Mazur, Tsunehiko Yamamoto, Min Guo, Jill Lindner, Mark A. Magnuson, and Roland Stein. 2010. 'MafA and MafB Regulate Genes Critical to β -Cells in a Unique Temporal Manner'. *Diabetes* 59 (10): 2530–39. <https://doi.org/10.2337/db10-0190>.
- Artner, Isabella, John Le Lay, Yan Hang, Lynda Elghazi, Jonathan C. Schisler, Eva Henderson, Beatriz Sosa-Pineda, and Roland Stein. 2006. 'MafB: An Activator of the Glucagon Gene Expressed in Developing Islet Alpha- and Beta-Cells'. *Diabetes* 55 (2): 297–304. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.02.06.db05-0946>.
- Babu, Daniella A, Swarup K Chakrabarti, James C Garmey, and Raghavendra G Mirmira. 2008. 'Pdx1 and BETA2/NeuroD1 Participate in a Transcriptional Complex That Mediates Short-Range DNA Looping at the Insulin Gene'. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (13): 8164–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800336200>.
- Bakhti, Mostafa, Anika Böttcher, and Heiko Lickert. 2019. 'Modelling the Endocrine Pancreas in Health and Disease'. *Nature Reviews Endocrinology* 15 (3): 155–71. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0132-z>.
- Balsalobre, Aurelio, and Jacques Drouin. 2022. 'Pioneer Factors as Master Regulators of the Epigenome and Cell Fate'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 23 (7): 449–64. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00464-z>.
- Barral, Amandine, and Kenneth S. Zaret. 2024. 'Pioneer Factors: Roles and Their Regulation in Development'. *Trends in Genetics: TIG* 40 (2): 134–48. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.10.007>.
- Bastidas-Ponce, Aimée, Sophie Tritschler, Leander Dony, Katharina Scheibner, Marta Tarquis-Medina, Ciro Salinno, Silvia Schirge, et al. 2019. 'Comprehensive Single Cell mRNA Profiling Reveals a Detailed Roadmap for Pancreatic Endocrinogenesis'. Edited by Allon Klein and Barbara Treutlein. *Development* 146 (12). <https://doi.org/10.1242/dev.173849>.
- Bethea, Maigen, Yanping Liu, Alexa K. Wade, Rachel Mullen, Rajesh Gupta, Vasily Gelfanov, Richard DiMarchi, et al. 2019. 'The Islet-Expressed Lhx1 Transcription Factor Interacts with Islet-1 and Contributes to Glucose Homeostasis'. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 316 (3): E397–409. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00235.2018>.
- Blanco, Enrique, Mar González-Ramírez, Anna Alcaine-Colet, Sergi Aranda, and Luciano Di Croce. 2020. 'The Bivalent Genome: Characterization, Structure, and Regulation'. *Trends in Genetics* 36 (2): 118–31. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.11.004>.
- Blum, Barak, Siniša Hrvatin, Christian Schuetz, Claire Bonal, Alireza Rezaia, and Douglas A Melton. 2012. 'Functional Beta-Cell Maturation Is Marked by an Increased Glucose Threshold and by Expression of Urocortin 3'. *Nature Biotechnology* 30 (3): 261–64. <https://doi.org/10.1038/nbt.2141>.

- Bock, Troels, Bente Pakkenberg, and Karsten Buschard. 2003. 'Increased Islet Volume but Unchanged Islet Number in *Ob/Ob* Mice'. *Diabetes* 52 (7): 1716–22. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.7.1716>.
- Bohuslavova, Romana, Valeria Fabriciova, Laura Lebrón-Mora, Jessica Malfatti, Ondrej Smolik, Lukas Valihrach, Sarka Benesova, et al. 2023. 'ISL1 Controls Pancreatic Alpha Cell Fate and Beta Cell Maturation'. *Cell & Bioscience* 13 (March):53. <https://doi.org/10.1186/s13578-023-01003-9>.
- Bohuslavova, Romana, Valeria Fabriciova, Ondrej Smolik, Laura Lebrón-Mora, Pavel Abaffy, Sarka Benesova, Daniel Zucha, et al. 2023. 'NEUROD1 Reinforces Endocrine Cell Fate Acquisition in Pancreatic Development'. *Nature Communications* 14 (1): 5554. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41306-6>.
- Bohuslavova, Romana, Ondrej Smolik, Jessica Malfatti, Zuzana Berkova, Zanita Novakova, Frantisek Saudek, and Gabriela Pavlinkova. 2021. 'NEUROD1 Is Required for the Early α and β Endocrine Differentiation in the Pancreas'. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (13): 6713. <https://doi.org/10.3390/ijms22136713>.
- Bonner-Weir, Susan, Brooke A. Sullivan, and Gordon C. Weir. 2015. 'Human Islet Morphology Revisited'. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 63 (8): 604–12. <https://doi.org/10.1369/0022155415570969>.
- Bramswig, Nuria C., Logan J. Everett, Jonathan Schug, Craig Dorrell, Chengyang Liu, Yanping Luo, Philip R. Streeter, Ali Naji, Markus Grompe, and Klaus H. Kaestner. 2013. 'Epigenomic Plasticity Enables Human Pancreatic α to β Cell Reprogramming'. *The Journal of Clinical Investigation* 123 (3): 1275–84. <https://doi.org/10.1172/JCI66514>.
- Brantley, Susanna E., and Stefano Di Talia. 2021. 'Cell Cycle Control during Early Embryogenesis'. *Development* 148 (13): dev193128. <https://doi.org/10.1242/dev.193128>.
- Briant, L. J. B., T. M. Reinbothe, I. Spiliotis, C. Miranda, B. Rodriguez, and P. Rorsman. 2018. ' δ -Cells and β -Cells Are Electrically Coupled and Regulate α -Cell Activity via Somatostatin'. *The Journal of Physiology* 596 (2): 197–215. <https://doi.org/10.1113/JP274581>.
- Brissova, Marcela, Michael J. Fowler, Wendell E. Nicholson, Anita Chu, Boaz Hirshberg, David M. Harlan, and Alvin C. Powers. 2005. 'Assessment of Human Pancreatic Islet Architecture and Composition by Laser Scanning Confocal Microscopy'. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 53 (9): 1087–97. <https://doi.org/10.1369/jhc.5C6684.2005>.
- Bu, Lei, Xin Jiang, Silvia Martin-Puig, Leslie Caron, Shenjun Zhu, Ying Shao, Drucilla J. Roberts, Paul L. Huang, Ibrahim J. Domian, and Kenneth R. Chien. 2009. 'Human ISL1 Heart Progenitors Generate Diverse Multipotent Cardiovascular Cell Lineages'. *Nature* 460 (7251): 113–17. <https://doi.org/10.1038/nature08191>.
- Burlison, Jared S., Qiaoming Long, Yoshio Fujitani, Christopher V. E. Wright, and Mark A. Magnuson. 2008. 'Pdx-1 and Ptf1a Concurrently Determine Fate Specification of Pancreatic Multipotent Progenitor Cells'. *Developmental Biology* 316 (1): 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.01.011>.

- Byrnes, Lauren E., Daniel M. Wong, Meena Subramaniam, Nathaniel P. Meyer, Caroline L. Gilchrist, Sarah M. Knox, Aaron D. Tward, Chun J. Ye, and Julie B. Sneddon. 2018. 'Lineage Dynamics of Murine Pancreatic Development at Single-Cell Resolution'. *Nature Communications* 9 (1): 3922. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06176-3>.
- Cabrera, Over, Dora M. Berman, Norma S. Kenyon, Camillo Ricordi, Per-Olof Berggren, and Alejandro Caicedo. 2006. 'The Unique Cytoarchitecture of Human Pancreatic Islets Has Implications for Islet Cell Function'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (7): 2334–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510790103>.
- Calderon, Boris, Javier A. Carrero, Stephen T. Ferris, Dorothy K. Sojka, Lindsay Moore, Slava Epelman, Kenneth M. Murphy, Wayne M. Yokoyama, Gwendalyn J. Randolph, and Emil R. Unanue. 2015. 'The Pancreas Anatomy Conditions the Origin and Properties of Resident Macrophages'. *Journal of Experimental Medicine* 212 (10): 1497–1512. <https://doi.org/10.1084/jem.20150496>.
- Campbell, Jonathan E., and Christopher B. Newgard. 2021. 'Mechanisms Controlling Pancreatic Islet Cell Function in Insulin Secretion'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22 (2): 142–58. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00317-7>.
- Campbell, Stephanie A., and Brad G. Hoffman. 2016. 'Chromatin Regulators in Pancreas Development and Diabetes'. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27 (3): 142–52. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.12.005>.
- Caputo, Luca, Hagen R. Witzel, Petros Kolovos, Sirisha Cheedipudi, Mario Looso, Athina Mylona, Wilfred F.J. van IJcken, et al. 2015. 'The Isl1/Ldb1 Complex Orchestrates Genome-Wide Chromatin Organization to Instruct Differentiation of Multipotent Cardiac Progenitors'. *Cell Stem Cell* 17 (3): 287–99. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.007>.
- Češka, Richard, Tomáš Štulc, Vladimír Tesař, and Milan Lukáš. 2020. *Interna*. 3., Aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton.
- Chao, Christina S., Zoe L. Loomis, Jacqueline E. Lee, and Lori Sussel. 2007. 'Genetic Identification of a Novel NeuroD1 Function in the Early Differentiation of Islet α , PP and ϵ Cells'. *Developmental Biology* 312 (2): 523–32. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.057>.
- Choi, Won-Young, Ji-Hyun Hwang, Ann-Na Cho, Andrew J. Lee, Inkyung Jung, Seung-Woo Cho, Lark Kyun Kim, and Young-Joon Kim. 2020. 'NEUROD1 Intrinsically Initiates Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells into Neural Progenitor Cells'. *Molecules and Cells* 43 (12): 1011–22. <https://doi.org/10.14348/molcells.2020.0207>.
- Chu, K., E. Nemoz-Gaillard, and M. J. Tsai. 2001. 'BETA2 and Pancreatic Islet Development'. *Recent Progress in Hormone Research* 56:23–46. <https://doi.org/200402231548>.
- Churchill, Angela J, Giselle Dominguez Gutiérrez, Ruth A Singer, David S Lorberbaum, Kevin A Fischer, and Lori Sussel. 2017. 'Genetic Evidence That Nkx2.2 Acts Primarily Downstream of Neurog3 in Pancreatic Endocrine Lineage Development'. *eLife* 6 (January):e20010. <https://doi.org/10.7554/eLife.20010>.

- Čihák, Radomír, Miloš Grim, Rastislav Druga, Milan Med, and Ivan Helekal. 2001. *Anatomie. 2., upr. A dopl. vyd.* Praha: Grada.
- Collombat, Patrick, Ahmed Mansouri, Jacob Hecksher-Sorensen, Palle Serup, Jens Krull, Gerard Gradwohl, and Peter Gruss. 2003. 'Opposing Actions of Arx and Pax4 in Endocrine Pancreas Development'. *Genes & Development* 17 (20): 2591–2603. <https://doi.org/10.1101/gad.269003>.
- Courtney, Monica, Elisabet Gjernes, Noémie Druelle, Christophe Ravaud, Andhira Vieira, Nouha Ben-Othman, Anja Pfeifer, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003934>.
- Da Silva Xavier, Gabriela. 2018. 'The Cells of the Islets of Langerhans'. *Journal of Clinical Medicine* 7 (3): 54. <https://doi.org/10.3390/jcm7030054>.
- Dalgin, Gökhan, and Victoria E. Prince. 2015. 'Differential Levels of NeuroD Establish Zebrafish Endocrine Pancreas Cell Fates'. *Developmental Biology* 402 (1): 81–97. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.03.007>.
- Das, Pragnya, and Catherine Lee May. 2011. 'Expression Analysis of the Islet-1 Gene in the Developing and Adult Gastrointestinal Tract'. *Gene Expression Patterns: GEP* 11 (3–4): 244–54. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2010.12.007>.
- De Klerk, Eleonora, and Matthias Hebrok. 2021. 'Stem Cell-Based Clinical Trials for Diabetes Mellitus'. *Frontiers in Endocrinology* 12 (February):631463. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.631463>.
- Desgraz, Renaud, and Pedro L. Herrera. 2009. 'Pancreatic Neurogenin 3-Expressing Cells Are Unipotent Islet Precursors'. *Development* 136 (21): 3567–74. <https://doi.org/10.1242/dev.039214>.
- Docherty, Hilary M., Colin W. Hay, Laura A. Ferguson, John Barrow, Elaine Durward, and Kevin Docherty. 2005. 'Relative Contribution of PDX-1, MafA and E47/B2 to the Regulation of the Human Insulin Promoter'. *Biochemical Journal* 389 (3): 813–20. <https://doi.org/10.1042/BJ20041891>.
- Dolenšek, Jurij, Marjan Slak Rupnik, and Andraž Stožer. 2015. 'Structural Similarities and Differences between the Human and the Mouse Pancreas'. *Islets* 7 (1): e1024405. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1024405>.
- Du, Aiping, Chad S. Hunter, Johanna Murray, Daniel Noble, Chen-Leng Cai, Sylvia M. Evans, Roland Stein, and Catherine Lee May. 2009. 'Islet-1 Is Required for the Maturation, Proliferation, and Survival of the Endocrine Pancreas'. *Diabetes* 58 (9): 2059–69. <https://doi.org/10.2337/db08-0987>.
- Dudek, Karrie D, Anna B Osipovich, Jean-Philippe Cartailier, Guoqing Gu, and Mark A Magnuson. 2021. 'Insm1, Neurod1, and Pax6 Promote Murine Pancreatic Endocrine Cell Development through Overlapping yet Distinct RNA Transcription and Splicing Programs'. *G3 Genes|Genomes|Genetics* 11 (11): jkab303. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab303>.
- Dumonteil, Eric, Beate Laser, Isabel Constant, and Jacques Philippe. 1998. 'Differential Regulation of the Glucagon and Insulin I Gene Promoters by the Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors E47

and BETA2'. *Journal of Biological Chemistry* 273 (32): 19945–54.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.19945>.

Duvall, Eliza, Cecil M. Benitez, Krissie Tellez, Martin Enge, Philip T. Pauerstein, Lingyu Li, Songjoon Baek, et al. 2022. 'Single-Cell Transcriptome and Accessible Chromatin Dynamics during Endocrine Pancreas Development'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (26): e2201267119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2201267119>.

Ediger, Benjamin N., Aiping Du, Jingxuan Liu, Chad S. Hunter, Erik R. Walp, Jonathan Schug, Klaus H. Kaestner, Roland Stein, Doris A. Stoffers, and Catherine L. May. 2014. 'Islet-1 Is Essential for Pancreatic β -Cell Function'. *Diabetes* 63 (12): 4206–17. <https://doi.org/10.2337/db14-0096>.

Ediger, Benjamin N., Hee-Woong Lim, Christine Juliana, David N. Groff, LaQueena T. Williams, Giselle Dominguez, Jin-Hua Liu, et al. 2017. 'LIM Domain-Binding 1 Maintains the Terminally Differentiated State of Pancreatic β Cells'. *The Journal of Clinical Investigation* 127 (1): 215–29.
<https://doi.org/10.1172/JCI88016>.

Edlund, H. 2001. 'Developmental Biology of the Pancreas.' *Diabetes* 50 (suppl_1): S5.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.50.2007.S5>.

Eeckhoutte, J., I. Briche, M. Kurowska, P. Formstecher, and B. Laine. 2006. 'Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha Ligand Binding and F Domains Mediate Interaction and Transcriptional Synergy with the Pancreatic Islet LIM HD Transcription Factor Isl1'. *Journal of Molecular Biology* 364 (4): 567–81.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.096>.

Erlandsen, S L, O D Hegre, J A Parsons, R C McEvoy, and R P Elde. 1976. 'Pancreatic Islet Cell Hormones Distribution of Cell Types in the Islet and Evidence for the Presence of Somatostatin and Gastrin within the D Cell.' *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 24 (7): 883–97.
<https://doi.org/10.1177/24.7.60437>.

Fava, Genevieve E., Emily W. Dong, and Hongju Wu. 2016. 'Intra-Islet Glucagon-like Peptide 1'. *Journal of Diabetes and Its Complications* 30 (8): 1651–58. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.05.016>.

Filova, Iva, Kateryna Pysanenko, Mitra Tavakoli, Simona Vochyanova, Martina Dvorakova, Romana Bohuslavova, Ondrej Smolik, et al. 2022. 'ISL1 Is Necessary for Auditory Neuron Development and Contributes toward Tonotopic Organization'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (37): e2207433119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2207433119>.

Flasse, Lydie C, Justine L Pirson, David G Stern, Virginie Von Berg, Isabelle Manfroid, Bernard Peers, and Marianne L Voz. 2013. 'Ascl1b and Neurod1, Instead of Neurog3, Control Pancreatic Endocrine Cell Fate in Zebrafish'. *BMC Biology* 11 (1): 78. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-78>.

Forootan, Amin, Robert Sjöback, Jens Björkman, Björn Sjögreen, Lucas Linz, and Mikael Kubista. 2017. 'Methods to Determine Limit of Detection and Limit of Quantification in Quantitative Real-Time PCR (qPCR)'. *Biomolecular Detection and Quantification* 12 (June):1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001>.

- Gadd, Morgan S., David A. Jacques, Ivan Nisevic, Vanessa J. Craig, Ann H. Kwan, J. Mitchell Guss, and Jacqueline M. Matthews. 2013. 'A Structural Basis for the Regulation of the LIM-Homeodomain Protein Islet 1 (Isl1) by Intra- and Intermolecular Interactions'. *Journal of Biological Chemistry* 288 (30): 21924–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.478586>.
- Galloway, Jamie R., Maigen Bethea, Yanping Liu, Rachel Underwood, James A. Mobley, and Chad S. Hunter. 2015. 'SSBP3 Interacts With Islet-1 and Ldb1 to Impact Pancreatic β -Cell Target Genes'. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 29 (12): 1774–86. <https://doi.org/2020071614102274400>.
- Gannon, Maureen, Elizabeth Tweedie Ables, Laura Crawford, David Lowe, Martin F. Offield, Mark A. Magnuson, and Christopher V. E. Wright. 2008. 'Pdx-1 Function Is Specifically Required in Embryonic Beta Cells to Generate Appropriate Numbers of Endocrine Cell Types and Maintain Glucose Homeostasis'. *Developmental Biology* 314 (2): 406–17. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.038>.
- Gao, Rui, Xingqun Liang, Sirisha Cheedipudi, Julio Cordero, Xue Jiang, Qingquan Zhang, Luca Caputo, et al. 2019. 'Pioneering Function of Isl1 in the Epigenetic Control of Cardiomyocyte Cell Fate'. *Cell Research* 29 (6): 486–501. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0168-1>.
- Gao, Tao, Brian McKenna, Changhong Li, Maximilian Reichert, James Nguyen, Tarjinder Singh, Chenghua Yang, et al. 2014. 'Pdx1 Maintains β Cell Identity and Function by Repressing an α Cell Program'. *Cell Metabolism* 19 (2): 259–71. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.002>.
- Gasa, Rosa, Caroline Mrejen, Nathaniel Leachman, Marc Otten, Michael Barnes, Juehu Wang, Swarup Chakrabarti, Raghavendra Mirmira, and Michael German. 2004. 'Proendocrine Genes Coordinate the Pancreatic Islet Differentiation Program *in Vitro*'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (36): 13245–50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405301101>.
- Gasa, Rosa, Caroline Mrejen, Francis C. Lynn, Peter Skewes-Cox, Lidia Sanchez, Katherine Y. Yang, Chin-Hsing Lin, Ramon Gomis, and Michael S. German. 2008. 'Induction of Pancreatic Islet Cell Differentiation by the Neurogenin–neuroD Cascade'. *Differentiation* 76 (4): 381–91. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00228.x>.
- Gauthier, Benoit R., Yvan Gosmain, Aline Mamin, and Jacques Philippe. 2007. 'The Beta-Cell Specific Transcription Factor Nkx6.1 Inhibits Glucagon Gene Transcription by Interfering with Pax6'. *The Biochemical Journal* 403 (3): 593–601. <https://doi.org/10.1042/BJ20070053>.
- Gerace, Dario, Rosetta Martiniello-Wilks, Rosaline Habib, Binhai Ren, Najah Therese Nassif, Bronwyn Anne O'Brien, and Ann Margaret Simpson. 2019. 'Ex Vivo Expansion of Murine MSC Impairs Transcription Factor-Induced Differentiation into Pancreatic β -Cells'. *Stem Cells International* 2019 (March):1–15. <https://doi.org/10.1155/2019/1395301>.
- Gosmain, Yvan, Eric Marthinet, Claire Cheyssac, Audrey Guérardel, Aline Mamin, Liora S. Katz, Karim Bouzakri, and Jacques Philippe. 2010. 'Pax6 Controls the Expression of Critical Genes Involved in Pancreatic α Cell Differentiation and Function*', *Journal of Biological Chemistry* 285 (43): 33381–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.147215>.

- Gouzi, Mathieu, Yung Hae Kim, Keiichi Katsumoto, Kerstin Johansson, and Anne Grapin-Botton. 2011. 'Neurogenin3 Initiates Stepwise Delamination of Differentiating Endocrine Cells during Pancreas Development'. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 240 (3): 589–604. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22544>.
- Gradwohl, G, A Dierich, M LeMeur, and F Guillemot. 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): 1607–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1607>.
- Grandi, Fiorella C., Hailey Modi, Lucas Kampman, and M. Ryan Corces. 2022. 'Chromatin Accessibility Profiling by ATAC-Seq'. *Nature Protocols* 17 (6): 1518–52. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00692-9>.
- Gromada, Jesper, Pauline Chabosseau, and Guy A. Rutter. 2018. 'The α -Cell in Diabetes Mellitus'. *Nature Reviews Endocrinology* 14 (12): 694–704. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0097-y>.
- Gromada, Jesper, Isobel Franklin, and Claes B. Wollheim. 2007. 'Alpha-Cells of the Endocrine Pancreas: 35 Years of Research but the Enigma Remains'. *Endocrine Reviews* 28 (1): 84–116. <https://doi.org/10.1093/era/28.1.84>.
- Grube, D., and R. Bohn. 1983. 'The Microanatomy of Human Islets of Langerhans, with Special Reference to Somatostatin (D-) Cells'. *Archivum Histologicum Japonicum = Nihon Soshikigaku Kiroku* 46 (3): 327–53. <https://doi.org/10.1679/aohc.46.327>.
- Gu, Chunyan, Gretchen H. Stein, Ning Pan, Sandra Goebbels, Hanna Hörnberg, Klaus-Armin Nave, Pedro Herrera, et al. 2010. 'Pancreatic Beta Cells Require NeuroD to Achieve and Maintain Functional Maturity'. *Cell Metab* 11 (4): 298–310. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.006>.
- Gu, Guoqiang, Jolanta Dubauskaite, and Douglas A. Melton. 2002. 'Direct Evidence for the Pancreatic Lineage: NGN3+ Cells Are Islet Progenitors and Are Distinct from Duct Progenitors'. *Development* 129 (10): 2447–57. <https://doi.org/10.1242/dev.129.10.2447>.
- Guo, Ping, Ting Zhang, Aiping Lu, Chiyo Shiota, Matthieu Huard, Kaitlyn E. Whitney, and Johnny Huard. 2023. 'Specific Reprogramming of Alpha Cells to Insulin-Producing Cells by Short Glucagon Promoter-Driven Pdx1 and MafA'. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 28 (March):355–65. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2023.02.003>.
- Guo, Ting, Weiping Wang, Hui Zhang, Yinan Liu, Ping Chen, Kangtao Ma, and Chunyan Zhou. 2011. 'ISL1 Promotes Pancreatic Islet Cell Proliferation'. *PLoS One* 6 (8): e22387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022387>.
- Guo, Ziyuan, Lei Zhang, Zheng Wu, Yuchen Chen, Fan Wang, and Gong Chen. 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. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.12.001>.

- Gurp, Léon van, Mauro J. Muraro, Tim Dielen, Lina Seneby, Gitanjali Dharmadhikari, Gerard Gradwohl, Alexander van Oudenaarden, and Eelco J. P. de Koning. 2019. 'A Transcriptomic Roadmap to α - and β -Cell Differentiation in the Embryonic Pancreas'. *Development (Cambridge, England)* 146 (12): dev173716. <https://doi.org/10.1242/dev.173716>.
- Gutiérrez, Giselle Domínguez, Aaron S. Bender, Vincenzo Cirulli, Teresa L. Mastracci, Stephen M. Kelly, Aristotelis Tsirigos, Klaus H. Kaestner, and Lori Sussel. 2017. 'Pancreatic β Cell Identity Requires Continual Repression of Non- β Cell Programs'. *The Journal of Clinical Investigation* 127 (1): 244–59. <https://doi.org/10.1172/JCI88017>.
- Guz, Y., M. R. Montminy, R. Stein, J. Leonard, L. W. Gamer, C. V. Wright, and G. Teitelman. 1995. 'Expression of Murine STF-1, a Putative Insulin Gene Transcription Factor, in Beta Cells of Pancreas, Duodenal Epithelium and Pancreatic Exocrine and Endocrine Progenitors during Ontogeny'. *Development (Cambridge, England)* 121 (1): 11–18. <https://doi.org/10.1242/dev.121.1.11>.
- Hang, Yan, and Roland Stein. 2011. 'MafA and MafB Activity in Pancreatic β Cells'. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 22 (9): 364–73. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.05.003>.
- Hang, Yan, Tsunehiko Yamamoto, Richard K. P. Benninger, Marcela Brissova, Min Guo, Will Bush, David W. Piston, et al. 2014. 'The MafA Transcription Factor Becomes Essential to Islet β -Cells Soon after Birth'. *Diabetes* 63 (6): 1994–2005. <https://doi.org/10.2337/db13-1001>.
- Harada, Akihito, Hiroshi Kimura, and Yasuyuki Ohkawa. 2021. 'Recent Advances in Single-Cell Epigenomics'. *Current Opinion in Structural Biology* 71 (December): 116–22. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.06.010>.
- Hayashi, Y. 2011. 'Metabolic Impact of Glucagon Deficiency'. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 13 (s1): 151–57. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01456.x>.
- Henquin, Jean-Claude, Denis Dufrane, and Myriam Nenquin. 2006. 'Nutrient Control of Insulin Secretion in Isolated Normal Human Islets'. *Diabetes* 55 (12): 3470–77. <https://doi.org/10.2337/db06-0868>.
- Henseleit, Korinna D., Shelley B. Nelson, Kirsten Kuhlbrodt, J. Christopher Hennings, Johan Ericson, and Maike Sander. 2005. 'NKX6 Transcription Factor Activity Is Required for Alpha- and Beta-Cell Development in the Pancreas'. *Development (Cambridge, England)* 132 (13): 3139–49. <https://doi.org/10.1242/dev.01875>.
- Hoffman, Laura S., Tamaryn J. Fox, Catherine Anastasopoulou, and Ishwarlal Jialal. 2023. 'Maturity Onset Diabetes in the Young'. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532900/>.
- Holland, Andrew M., Michael A. Hale, Hideaki Kagami, Robert E. Hammer, and Raymond J. MacDonald. 2002. 'Experimental Control of Pancreatic Development and Maintenance'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (19): 12236–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.192255099>.

- Horikawa, Yukio, and Mayumi Enya. 2019. 'Genetic Dissection and Clinical Features of MODY6 (NEUROD1-MODY)'. *Current Diabetes Reports* 19 (3): 12. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1130-9>.
- Hörnblad, Andreas, Abbas Cheddad, and Ulf Ahlgren. 2011. 'An Improved Protocol for Optical Projection Tomography Imaging Reveals Lobular Heterogeneities in Pancreatic Islet and β -Cell Mass Distribution'. *Islets* 3 (4): 204–8. <https://doi.org/10.4161/isl.3.4.16417>.
- Huang, H. P., M. Liu, H. M. El-Hodiri, K. Chu, M. Jamrich, and M. J. Tsai. 2000. 'Regulation of the Pancreatic Islet-Specific Gene BETA2 (neuroD) by Neurogenin 3'. *Mol Cell Biol* 20 (9): 3292–3307. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.9.3292-3307.2000>.
- Huang, Hsiang-po, Khoi Chu, Eric Nemoz-Gaillard, Dorit Elberg, and Ming-Jer Tsai. 2002. 'Neogenesis of β -Cells in Adult BETA2/NeuroD-Deficient Mice'. *Molecular Endocrinology* 16 (3): 541–51. <https://doi.org/2016092613583800484>.
- Huang, Ping, Wei Duan, Cao Ruan, Lingxian Wang, Rendy Hosea, Zheng Wu, Jianting Zeng, Shourong Wu, and Vivi Kasim. 2023. 'NeuroD1-GPX4 Signaling Leads to Ferroptosis Resistance in Hepatocellular Carcinoma'. Edited by Carmen Priolo. *PLOS Genetics* 19 (12): e1011098. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1011098>.
- Hunter, Chad S., Shilpy Dixit, Tsadok Cohen, Benjamin Ediger, Crystal Wilcox, Mark Ferreira, Heiner Westphal, Roland Stein, and Catherine Lee May. 2013. 'Islet α -, β -, and δ -Cell Development Is Controlled by the Ldb1 Coregulator, Acting Primarily with the Islet-1 Transcription Factor'. *Diabetes* 62 (3): 875–86. <https://doi.org/10.2337/db12-0952>.
- Huypens, P., Z. Ling, D. Pipeleers, and F. Schuit. 2000. 'Glucagon Receptors on Human Islet Cells Contribute to Glucose Competence of Insulin Release'. *Diabetologia* 43 (8): 1012–19. <https://doi.org/10.1007/s001250051484>.
- Ionescu-Tirgoviste, Constantin, Paul A. Gagniuc, Elvira Gubceac, Liliana Mardare, Irinel Popescu, Simona Dima, and Manuella Militaru. 2015. 'A 3D Map of the Islet Routes throughout the Healthy Human Pancreas'. *Scientific Reports* 5 (1): 14634. <https://doi.org/10.1038/srep14634>.
- Itkin-Ansari, P., E. Marcora, I. Geron, B. Tyrberg, C. Demeterco, E. Hao, C. Padilla, et al. 2005. 'NeuroD1 in the Endocrine Pancreas: Localization and Dual Function as an Activator and Repressor'. *Dev Dyn* 233 (3): 946–53. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20443>.
- Iwafuchi-Doi, Makiko, and Kenneth S. Zaret. 2014. 'Pioneer Transcription Factors in Cell Reprogramming'. *Genes & Development* 28 (24): 2679–92. <https://doi.org/10.1101/gad.253443.114>.
- Jacquemin, P., S. M. Durviaux, J. Jensen, C. Godfraind, G. Gradwohl, F. Guillemot, O. D. Madsen, et al. 2000. 'Transcription Factor Hepatocyte Nuclear Factor 6 Regulates Pancreatic Endocrine Cell Differentiation and Controls Expression of the Proendocrine Gene Ngn3'. *Molecular and Cellular Biology* 20 (12): 4445–54. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.12.4445-4454.2000>.

- Janssen, Sanne M., and Matthew C. Lorincz. 2022. 'Interplay between Chromatin Marks in Development and Disease'. *Nature Reviews Genetics* 23 (3): 137–53. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00416-x>.
- Jensen, J, R S Heller, T Funder-Nielsen, E E Pedersen, C Lindsell, G Weinmaster, O D Madsen, and P Serup. 2000. 'Independent Development of Pancreatic Alpha- and Beta-Cells from Neurogenin3-Expressing Precursors: A Role for the Notch Pathway in Repression of Premature Differentiation.' *Diabetes* 49 (2): 163–76. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.2.163>.
- Jia, S., A. Ivanov, D. Blasevic, T. Müller, B. Purfürst, W. Sun, W. Chen, M. N. Poy, N. Rajewsky, and C. Birchmeier. 2015. 'Insm1 Cooperates with Neurod1 and Foxa2 to Maintain Mature Pancreatic β -Cell Function'. *Embo j* 34 (10): 1417–33. <https://doi.org/10.15252/emboj.201490819>.
- Jones, Susan. 2004. 'An Overview of the Basic Helix-Loop-Helix Proteins'. *Genome Biology* 5 (6): 226. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-6-226>.
- Jonoska, Nataša, Nida Obatake, Svetlana Poznanović, Candice Price, Manda Riehl, and Mariel Vazquez. 2021. 'Modeling RNA:DNA Hybrids with Formal Grammars'. In *Using Mathematics to Understand Biological Complexity*, edited by Rebecca Segal, Blerta Shtylla, and Suzanne Sindi, 22:35–54. Association for Women in Mathematics Series. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57129-0_3.
- Jung, Yunshin, Ruyi Zhou, Toshiki Kato, Jeffrey K. Usui, Masafumi Muratani, Hisashi Oishi, Margarete M. S. Heck, and Satoru Takahashi. 2018. 'Isl1 β Overexpression With Key β Cell Transcription Factors Enhances Glucose-Responsive Hepatic Insulin Production and Secretion'. *Endocrinology* 159 (2): 869–82. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00663>.
- Karlsson, O., S. Thor, T. Norberg, H. Ohlsson, and T. Edlund. 1990. 'Insulin Gene Enhancer Binding Protein Isl-1 Is a Member of a Novel Class of Proteins Containing Both a Homeo- and a Cys-His Domain'. *Nature* 344 (6269): 879–82. <https://doi.org/10.1038/344879a0>.
- Kaya-Okur, Hatice S., Derek H. Janssens, Jorja G. Henikoff, Kami Ahmad, and Steven Henikoff. 2020. 'Efficient Low-Cost Chromatin Profiling with CUT&Tag'. *Nature Protocols* 15 (10): 3264–83. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0373-x>.
- Kaya-Okur, Hatice S., Steven J. Wu, Christine A. Codomo, Erica S. Pledger, Terri D. Bryson, Jorja G. Henikoff, Kami Ahmad, and Steven Henikoff. 2019. 'CUT&Tag for Efficient Epigenomic Profiling of Small Samples and Single Cells'. *Nature Communications* 10 (1): 1930. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09982-5>.
- Khan, Moien Abdul Basith, Muhammad Jawad Hashim, Jeffrey Kwan King, Romona Devi Govender, Halla Mustafa, and Juma Al Kaabi. 2019. 'Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends'. *Journal of Epidemiology and Global Health* 10 (1): 107. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191028.001>.
- Kharouta, Michael, Kevin Miller, Abraham Kim, Pawel Wojcik, German Kilimnik, Arunangsu Dey, Donald F. Steiner, and Manami Hara. 2009. 'No Mantle Formation in Rodent Islets—The Prototype of Islet

Revisited'. *Diabetes Research and Clinical Practice* 85 (3): 252–57.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.06.021>.

Kianmehr, Leila, Homayoun Khazali, Hassan Rajabi-Maham, Ali Sharifi-Zarchi, François Cuzin, and Mino Rassoulzadegan. 2019. 'Genome-Wide Distribution of Nascent Transcripts in Sperm DNA, Products of a Late Wave of General Transcription'. *Cells* 8 (10): 1196.
<https://doi.org/10.3390/cells8101196>.

Kim, Abraham, Kevin Miller, Junghyo Jo, German Kilimnik, Pawel Wojcik, and Manami Hara. 2009. 'Islet Architecture: A Comparative Study'. *Islets* 1 (2): 129–36. <https://doi.org/10.4161/isl.1.2.9480>.

Kim, Hyeonhui, Minki Kim, Sun-Kyoung Im, and Sungsoon Fang. 2018. 'Mouse Cre-LoxP System: General Principles to Determine Tissue-Specific Roles of Target Genes'. *Laboratory Animal Research* 34 (4): 147. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147>.

Kobayashi, Naoya, Takeshi Yuasa, and Teru Okitsu. 2009. 'Regenerative Medicine for Diabetes Mellitus'. *Cell Transplantation* 18 (5–6): 491–96. <https://doi.org/10.1177/096368970901805-602>.

Kopinke, Daniel, Marisa Brailsford, Jill E. Shea, Rebecca Leavitt, Courtney L. Scaife, and L. Charles Murtaugh. 2011. 'Lineage Tracing Reveals the Dynamic Contribution of Hes1+ Cells to the Developing and Adult Pancreas'. *Development (Cambridge, England)* 138 (3): 431–41.
<https://doi.org/10.1242/dev.053843>.

Kopp, Janel L., Claire L. Dubois, Ashleigh E. Schaffer, Ergeng Hao, Hung Ping Shih, Philip A. Seymour, Jenny Ma, and Maike Sander. 2011. 'Sox9+ Ductal Cells Are Multipotent Progenitors throughout Development but Do Not Produce New Endocrine Cells in the Normal or Injured Adult Pancreas'. *Development (Cambridge, England)* 138 (4): 653–65. <https://doi.org/10.1242/dev.056499>.

Krentz, Nicole A. J., Michelle Y. Y. Lee, Eric E. Xu, Shannon L. J. Sproul, Alexandra Maslova, Shugo Sasaki, and Francis C. Lynn. 2018. 'Single-Cell Transcriptome Profiling of Mouse and hESC-Derived Pancreatic Progenitors'. *Stem Cell Reports* 11 (6): 1551–64.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.11.008>.

Kühn, Ralf, and Raul M. Torres. 2002. 'Cre/ loxP Recombination System and Gene Targeting'. In *Transgenesis Techniques*, by Alan R. Clarke, 180:175–204. New Jersey: Humana Press.
<https://doi.org/10.1385/1-59259-178-7:175>.

Larsen, Hjalte List, and Anne Grapin-Botton. 2017. 'The Molecular and Morphogenetic Basis of Pancreas Organogenesis'. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 66 (June):51–68.
<https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.01.005>.

Lee, J. C., S. B. Smith, H. Watada, J. Lin, D. Scheel, J. Wang, R. G. Mirmira, and M. S. German. 2001. 'Regulation of the Pancreatic Pro-Endocrine Gene Neurogenin3'. *Diabetes* 50 (5): 928–36.
<https://doi.org/10.2337/diabetes.50.5.928>.

Leonard, J., P. Serup, G. Gonzalez, T. Edlund, and M. Montminy. 1992. 'The LIM Family Transcription Factor Isl-1 Requires cAMP Response Element Binding Protein to Promote Somatostatin Expression in

Pancreatic Islet Cells'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (14): 6247–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.14.6247>.

Li, Hong-Tu, Fang-Xu Jiang, Ping Shi, Tao Zhang, Xiao-Yu Liu, Xue-Wen Lin, Zhong-Yan San, and Xi-Ning Pang. 2017. 'In Vitro Reprogramming of Rat bmMSCs into Pancreatic Endocrine-like Cells'. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 53 (2): 157–66. <https://doi.org/10.1007/s11626-016-0087-0>.

Li, Xinmin, and Cun-Yu Wang. 2021. 'From Bulk, Single-Cell to Spatial RNA Sequencing'. *International Journal of Oral Science* 13 (1): 36. <https://doi.org/10.1038/s41368-021-00146-0>.

Li, Yuefeng, Kiran Nakka, Thomas Olender, Philippe Gingras-Gelinas, Matthew Man-Kin Wong, Daniel C. L. Robinson, Hina Bandukwala, et al. 2021. 'Chromatin and Transcription Factor Profiling in Rare Stem Cell Populations Using CUT&Tag'. *STAR Protocols* 2 (3): 100751. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100751>.

Liu, Hui, Di Zhang, Yewen Zhou, and Sheng Cui. 2021. 'MicroRNA-7a Inhibits Isl1 Expression to Regulate Insulin Secretion by Targeting Raf1 and Mapkap1 in NIT-1 Cells'. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 57 (8): 817–24. <https://doi.org/10.1007/s11626-021-00611-4>.

Liu, Jingxuan, Chad S. Hunter, Aiping Du, Benjamin Ediger, Erik Walp, Johanna Murray, Roland Stein, and Catherine Lee May. 2011. 'Islet-1 Regulates Arx Transcription during Pancreatic Islet α -Cell Development'. *The Journal of Biological Chemistry* 286 (17): 15352–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.231670>.

Liu, Jingxuan, Erik R. Walp, and Catherine Lee May. 2012. 'Elevation of Transcription Factor Islet-1 Levels in Vivo Increases β -Cell Function but Not β -Cell Mass'. *Islets* 4 (3): 199–206. <https://doi.org/10.4161/isl.19982>.

Ma, Zhuo, Xiaofei Zhang, Wen Zhong, Hongyan Yi, Xiaowei Chen, Yinsuo Zhao, Yanlin Ma, Eli Song, and Tao Xu. 2023. 'Deciphering Early Human Pancreas Development at the Single-Cell Level'. *Nature Communications* 14 (1): 5354. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40893-8>.

Magnuson, Mark A., and Anna B. Osipovich. 2013. 'Pancreas-Specific Cre Driver Lines and Considerations for Their Prudent Use'. *Cell Metabolism* 18 (1): 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.011>.

Malecki, Maciej T., Ulupi S. Jhala, Anthony Antonellis, Liz Fields, Alessandro Doria, Tihamer Orban, Mohammed Saad, James H. Warram, Marc Montminy, and Andrzej S. Krolewski. 1999. 'Mutations in NEUROD1 Are Associated with the Development of Type 2 Diabetes Mellitus'. *Nature Genetics* 23 (3): 323–28. <https://doi.org/10.1038/15500>.

March, Christine A., Ingrid M. Libman, Dorothy J. Becker, and Lynne L. Levitsky. 2022. 'From Antiquity to Modern Times: A History of Diabetes Mellitus and Its Treatments'. *Hormone Research in Paediatrics* 95 (6): 593–607. <https://doi.org/10.1159/000526441>.

- Marchand, Mélanie, Insa S. Schroeder, Suzy Markossian, Anouchka Skoudy, Didier Nègre, François-Loïc Cosset, Paco Real, Christian Kaiser, Anna M. Wobus, and Pierre Savatier. 2009. 'Mouse ES Cells Over-Expressing the Transcription Factor NeuroD1 Show Increased Differentiation towards Endocrine Lineages and Insulin-Expressing Cells'. *The International Journal of Developmental Biology* 53 (4): 569–78. <https://doi.org/10.1387/ijdb.092856mm>.
- Mariniello, Katia, Gerard Ruiz-Babot, Emily C. McGaugh, James G. Nicholson, Angelica Gualtieri, Carles Gaston-Massuet, Maria Cristina Nostro, and Leonardo Guasti. 2019. 'Stem Cells, Self-Renewal, and Lineage Commitment in the Endocrine System'. *Frontiers in Endocrinology* 10 (November):772. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00772>.
- Mastracci, Teresa L., Keith R. Anderson, James B. Papizan, and Lori Sussel. 2013. 'Regulation of Neurod1 Contributes to the Lineage Potential of Neurogenin3+ Endocrine Precursor Cells in the Pancreas'. *PLOS Genetics* 9 (2): e1003278. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003278>.
- Matschinsky, Franz M., and David F. Wilson. 2019. 'The Central Role of Glucokinase in Glucose Homeostasis: A Perspective 50 Years After Demonstrating the Presence of the Enzyme in Islets of Langerhans'. *Frontiers in Physiology* 10 (March):148. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00148>.
- Matsuda, Taito, Takashi Irie, Shutaro Katsurabayashi, Yoshinori Hayashi, Tatsuya Nagai, Nobuhiko Hamazaki, Aliya Mari D. Adefuin, et al. 2019. 'Pioneer Factor NeuroD1 Rearranges Transcriptional and Epigenetic Profiles to Execute Microglia-Neuron Conversion'. *Neuron* 101 (3): 472-485.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.12.010>.
- Maven, Bonnie E.J., Casey A. Gifford, Melanie Weilert, Barbara Gonzalez-Teran, Ruth Hüttenhain, Angelo Pelonero, Kathryn N. Ivey, et al. 2023. 'The Multi-Lineage Transcription Factor ISL1 Controls Cardiomyocyte Cell Fate through Interaction with NKX2.5'. *Stem Cell Reports* 18 (11): 2138–53. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2023.09.014>.
- Mellitzer, Georg, Stefan Bonné, Reini F. Luco, Mark Van De Castele, Nathalie Lenne-Samuel, Patrick Collombat, Ahmed Mansouri, et al. 2006. 'IA1 Is NGN3-Dependent and Essential for Differentiation of the Endocrine Pancreas'. *The EMBO Journal* 25 (6): 1344–52. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601011>.
- Melmer, Andreas, and Markus Laimer. 2016. 'Treatment Goals in Diabetes'. In *Endocrine Development*, edited by C. Stettler, E. Christ, and P. Diem, 31:1–27. S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000439364>.
- Mikkelsen, Tarjei S., Manching Ku, David B. Jaffe, Biju Issac, Erez Lieberman, Georgia Giannoukos, Pablo Alvarez, et al. 2007. 'Genome-Wide Maps of Chromatin State in Pluripotent and Lineage-Committed Cells'. *Nature* 448 (7153): 553–60. <https://doi.org/10.1038/nature06008>.
- Milojević, Marko, Jan Rožanc, Jernej Vajda, Laura Činč Čurić, Eva Paradiž, Andraž Stožer, Uroš Maver, and Boštjan Vihar. 2021. 'In Vitro Disease Models of the Endocrine Pancreas'. *Biomedicines* 9 (10): 1415. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101415>.

- Miyatsuka, Takeshi, Yasuhiro Kosaka, Hail Kim, and Michael S. German. 2011. 'Neurogenin3 Inhibits Proliferation in Endocrine Progenitors by Inducing Cdkn1a'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (1): 185–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004842108>.
- Muraro, Mauro J., Gitanjali Dharmadhikari, Dominic Grün, Nathalie Groen, Tim Dielen, Erik Jansen, Leon van Gurp, et al. 2016. 'A Single-Cell Transcriptome Atlas of the Human Pancreas'. *Cell Systems* 3 (4): 385–394.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.09.002>.
- Murtaugh, L. Charles. 2007. 'Pancreas and Beta-Cell Development: From the Actual to the Possible'. *Development (Cambridge, England)* 134 (3): 427–38. <https://doi.org/10.1242/dev.02770>.
- Naya, F. J., H. P. Huang, Y. Qiu, H. Mutoh, F. J. DeMayo, A. B. Leiter, and M. J. Tsai. 1997. 'Diabetes, Defective Pancreatic Morphogenesis, and Abnormal Enteroendocrine Differentiation in BETA2/neuroD-Deficient Mice'. *Genes & Development* 11 (18): 2323–34. <https://doi.org/10.1101/gad.11.18.2323>.
- Naya, F J, C M Stellrecht, and M J Tsai. 1995. 'Tissue-Specific Regulation of the Insulin Gene by a Novel Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor'. *Genes & Development* 9 (8): 1009–19. <https://doi.org/10.1101/gad.9.8.1009>.
- Nishimura, Wataru, Takuma Kondo, Therese Salameh, Ilham El Khattabi, Rikke Dodge, Susan Bonner-Weir, and Arun Sharma. 2006. 'A Switch from MafB to MafA Expression Accompanies Differentiation to Pancreatic Beta-Cells'. *Developmental Biology* 293 (2): 526–39. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.02.028>.
- O, Sean de la, Xinkai Yao, Sean Chang, Zhe Liu, and Julie B. Sneddon. 2023. 'Single-Cell Chromatin Accessibility of Developing Murine Pancreas Identifies Cell State-Specific Gene Regulatory Programs'. *Molecular Metabolism* 73 (July):101735. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2023.101735>.
- Offield, M. F., T. L. Jetton, P. A. Labosky, M. Ray, R. W. Stein, M. A. Magnuson, B. L. Hogan, and C. V. Wright. 1996. 'PDX-1 Is Required for Pancreatic Outgrowth and Differentiation of the Rostral Duodenum'. *Development (Cambridge, England)* 122 (3): 983–95. <https://doi.org/10.1242/dev.122.3.983>.
- Olaniru, Oladapo Edward, Ulrich Kadolsky, Shichina Kannambath, Heli Vaikkinen, Kathy Fung, Pawan Dhami, and Shanta J. Persaud. 2023. 'Single-Cell Transcriptomic and Spatial Landscapes of the Developing Human Pancreas'. *Cell Metabolism* 35 (1): 184-199.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.11.009>.
- Olsson, R, and P Carlsson. 2006. 'The Pancreatic Islet Endothelial Cell: Emerging Roles in Islet Function and Disease'. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (4): 492–97. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.06.021>.
- Orci, Lelio, and RogerH Unger. 1975. 'Functional Subdivision of Islets of Langerhans and Possible Role of D Cells'. *The Lancet* 306 (7947): 1243–44. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(75\)92078-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(75)92078-4).
- Osbak, Kara K., Kevin Colclough, Cecile Saint-Martin, Nicola L. Beer, Christine Bellanné-Chantelot, Sian Ellard, and Anna L. Gloyn. 2009. 'Update on Mutations in Glucokinase (GCK), Which Cause

Maturity-Onset Diabetes of the Young, Permanent Neonatal Diabetes, and Hyperinsulinemic Hypoglycemia'. *Human Mutation* 30 (11): 1512–26. <https://doi.org/10.1002/humu.21110>.

Pan, Fong Cheng, Eric D. Bankaitis, Daniel Boyer, Xiaobo Xu, Mark Van de Castele, Mark A. Magnuson, Harry Heimberg, and Christopher V. E. Wright. 2013. 'Spatiotemporal Patterns of Multipotentiality in Ptf1a-Expressing Cells during Pancreas Organogenesis and Injury-Induced Facultative Restoration'. *Development (Cambridge, England)* 140 (4): 751–64. <https://doi.org/10.1242/dev.090159>.

Pan, Fong Cheng, and Chris Wright. 2011. 'Pancreas Organogenesis: From Bud to Plexus to Gland'. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 240 (3): 530–65. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22584>.

Pang, Zhiping P., Nan Yang, Thomas Vierbuchen, Austin Ostermeier, Daniel R. Fuentes, Troy Q. Yang, Ami Citri, et al. 2011. 'Induction of Human Neuronal Cells by Defined Transcription Factors'. *Nature* 476 (7359): 220–23. <https://doi.org/10.1038/nature10202>.

Pataskar, Abhijeet, Johannes Jung, Pawel Smialowski, Florian Noack, Federico Calegari, Tobias Straub, and Vijay K Tiwari. 2016. 'NeuroD1 Reprograms Chromatin and Transcription Factor Landscapes to Induce the Neuronal Program'. *The EMBO Journal* 35 (1): 24–45. <https://doi.org/10.15252/embj.201591206>.

Pavlinkova, Gabriela, and Ondrej Smolik. 2024. 'NEUROD1: Transcriptional and Epigenetic Regulator of Human and Mouse Neuronal and Endocrine Cell Lineage Programs'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 12:1435546. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1435546>.

Pfaff, Samuel L., Monica Mendelsohn, Colin L. Stewart, Thomas Edlund, and Thomas M. Jessell. 1996. 'Requirement for LIM Homeobox Gene *Isl1* in Motor Neuron Generation Reveals a Motor Neuron–Dependent Step in Interneuron Differentiation'. *Cell* 84 (2): 309–20. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80985-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80985-X).

Pfeifer, C. R., A. Shomorony, M. A. Aronova, G. Zhang, T. Cai, H. Xu, A. L. Notkins, and R. D. Leapman. 2015. 'Quantitative Analysis of Mouse Pancreatic Islet Architecture by Serial Block-Face SEM'. *Journal of Structural Biology* 189 (1): 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.10.013>.

Pfeifer, John. 2022. 'Webpage - Understanding Ct Values in Real-Time PCR'. ThermoFisher. 17 October 2022. <https://www.thermoFisher.com/blog/behindthebench/understanding-ct-values/>.

Pipatpolkai, Tanadet, Samuel Usher, Phillip J. Stansfeld, and Frances M. Ashcroft. 2020. 'New Insights into KATP Channel Gene Mutations and Neonatal Diabetes Mellitus'. *Nature Reviews. Endocrinology* 16 (7): 378–93. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0351-y>.

Qiu, Wei-Lin, Yu-Wei Zhang, Ye Feng, Lin-Chen Li, Liu Yang, and Cheng-Ran Xu. 2017. 'Deciphering Pancreatic Islet β Cell and α Cell Maturation Pathways and Characteristic Features at the Single-Cell Level'. *Cell Metabolism* 25 (5): 1194–1205.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.003>.

- Qiu, Yi, Min Guo, Suming Huang, and Roland Stein. 2002. 'Insulin Gene Transcription Is Mediated by Interactions between the P300 Coactivator and PDX-1, BETA2, and E47'. *Molecular and Cellular Biology* 22 (2): 412–20. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.2.412-420.2002>.
- Raum, Jeffrey C., Kevin Gerrish, Isabella Artner, Eva Henderson, Min Guo, Lori Sussel, Jonathan C. Schisler, Christopher B. Newgard, and Roland Stein. 2006. 'FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 Regulate Islet Beta-Cell-Specific *mafA* Expression through Conserved Sequences Located between Base Pairs -8118 and -7750 Upstream from the Transcription Start Site'. *Molecular and Cellular Biology* 26 (15): 5735–43. <https://doi.org/10.1128/MCB.00249-06>.
- Reinert, Rachel B., Jeannelle Kantz, Amanda Ackermann Misfeldt, Greg Poffenberger, Maureen Gannon, Marcela Brissova, and Alvin C. Powers. 2012. 'Tamoxifen-Induced Cre-loxP Recombination Is Prolonged in Pancreatic Islets of Adult Mice'. *PLoS One* 7 (3): e33529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033529>.
- Ren, Binhai, Chang Tao, Margaret Anne Swan, Nichole Joachim, Rosetta Martiniello-Wilks, Najah T. Nassif, Bronwyn A. O'Brien, and Ann M. Simpson. 2016. 'Pancreatic Transdifferentiation and Glucose-Regulated Production of Human Insulin in the H4IIE Rat Liver Cell Line'. *International Journal of Molecular Sciences* 17 (4): 534. <https://doi.org/10.3390/ijms17040534>.
- Reuter, Anne Sophie, David Stern, Alice Bernard, Chiara Goossens, Arnaud Lavergne, Lydie Flasse, Virginie Von Berg, Isabelle Manfroid, Bernard Peers, and Marianne L. Voz. 2022. 'Identification of an Evolutionarily Conserved Domain in Neurod1 Favouring Enteroendocrine versus Goblet Cell Fate'. Edited by Gérard Gradwohl. *PLOS Genetics* 18 (3): e1010109. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010109>.
- Ritz-Laser, Beate, A. Estreicher, B. R. Gauthier, A. Mamin, H. Edlund, and J. Philippe. 2002. 'The Pancreatic Beta-Cell-Specific Transcription Factor Pax-4 Inhibits Glucagon Gene Expression through Pax-6'. *Diabetologia* 45 (1): 97–107. <https://doi.org/10.1007/s125-002-8249-9>.
- Romer, Anthony I., Ruth A. Singer, Lina Sui, Dieter Egli, and Lori Sussel. 2019. 'Murine Perinatal β -Cell Proliferation and the Differentiation of Human Stem Cell-Derived Insulin-Expressing Cells Require NEUROD1'. *Diabetes* 68 (12): 2259–71. <https://doi.org/10.2337/db19-0117>.
- Rorsman, Patrik, and Matthias Braun. 2013. 'Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets'. *Annual Review of Physiology* 75 (1): 155–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183754>.
- Roszkowski, Martin, and Isabelle M. Mansuy. 2021. 'High Efficiency RNA Extraction From Sperm Cells Using Guanidinium Thiocyanate Supplemented With Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9:648274. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.648274>.
- Rowley, William R., Clement Bezold, Yasemin Arikan, Erin Byrne, and Shannon Krohe. 2017. 'Diabetes 2030: Insights from Yesterday, Today, and Future Trends'. *Population Health Management* 20 (1): 6–12. <https://doi.org/10.1089/pop.2015.0181>.

- Rubio-Cabezas, Oscar, Ethel Codner, Sarah E. Flanagan, José L. Gómez, Sian Ellard, and Andrew T. Hattersley. 2014. 'Neurogenin 3 Is Important but Not Essential for Pancreatic Islet Development in Humans'. *Diabetologia* 57 (11): 2421–24. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3349-y>.
- Rukstalis, J. Michael, and Joel F. Habener. 2007. 'Snail2, a Mediator of Epithelial-Mesenchymal Transitions, Expressed in Progenitor Cells of the Developing Endocrine Pancreas'. *Gene Expression Patterns: GEP* 7 (4): 471–79. <https://doi.org/10.1016/j.modgep.2006.11.001>.
- Saeedi, Pouya, Inga Petersohn, Paraskevi Salpea, Belma Malanda, Suvi Karuranga, Nigel Unwin, Stephen Colagiuri, et al. 2019. 'Global and Regional Diabetes Prevalence Estimates for 2019 and Projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th Edition'. *Diabetes Research and Clinical Practice* 157 (November):107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>.
- Sahu, Sanjeeb Kumar, Alina Fritz, Neha Tiwari, Zsuzsa Kovacs, Alireza Pouya, Verena Wüllner, Pablo Bora, et al. 2016. 'TOX3 Regulates Neural Progenitor Identity'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1859 (7): 833–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.04.005>.
- Salisbury, Rachel J, Jennifer Blaylock, Andrew A Berry, Rachel E Jennings, Ronald De Krijger, Karen Piper Hanley, and Neil A Hanley. 2014. 'The Window Period of NEUROGENIN3 during Human Gestation'. *Islets* 6 (3): e954436. <https://doi.org/10.4161/19382014.2014.954436>.
- Samson, Susan L., and Lawrence Chan. 2006. 'Gene Therapy for Diabetes: Reinventing the Islet'. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 17 (3): 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.02.002>.
- Sancho, Veronica, Giuseppe Daniele, Daniela Lucchesi, Roberto Lupi, Annamaria Ciccarone, Giuseppe Penno, Cristina Bianchi, Angela Dardano, Roberto Miccoli, and Stefano Del Prato. 2017. 'Metabolic Regulation of GLP-1 and PC1/3 in Pancreatic α -Cell Line'. Edited by Nigel Irwin. *PLOS ONE* 12 (11): e0187836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187836>.
- Sander, M., A. Neubüser, J. Kalamaras, H. C. Ee, G. R. Martin, and M. S. German. 1997. 'Genetic Analysis Reveals That PAX6 Is Required for Normal Transcription of Pancreatic Hormone Genes and Islet Development'. *Genes & Development* 11 (13): 1662–73. <https://doi.org/10.1101/gad.11.13.1662>.
- Satam, Heena, Kandarp Joshi, Upasana Mangrolia, Sanober Waghoo, Gulnaz Zaidi, Shravani Rawool, Ritesh P. Thakare, et al. 2023. 'Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements'. *Biology* 12 (7): 997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>.
- Scavuzzo, Marissa A., Matthew C. Hill, Jolanta Chmielowiec, Diane Yang, Jessica Teaw, Kuanwei Sheng, Yuelin Kong, et al. 2018. 'Endocrine Lineage Biases Arise in Temporally Distinct Endocrine Progenitors during Pancreatic Morphogenesis'. *Nature Communications* 9 (1): 3356. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05740-1>.
- Schaffer, Ashleigh E., Brandon L. Taylor, Jacqueline R. Benthuisen, Jingxuan Liu, Fabrizio Thorel, Weiping Yuan, Yang Jiao, et al. 2013. 'Nkx6.1 Controls a Gene Regulatory Network Required for Establishing and Maintaining Pancreatic Beta Cell Identity'. *PLoS Genetics* 9 (1): e1003274. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003274>.

- Schmerker, Jeff. 2024. 'Webpage - Understanding Cq Values in PCR'. Integrated DNA Technologies. 2024. <https://www.idtdna.com/pages/community/blog/post/understanding-cq-values-in-pcr>.
- Schwartzman, Omer, and Amos Tanay. 2015. 'Single-Cell Epigenomics: Techniques and Emerging Applications'. *Nature Reviews. Genetics* 16 (12): 716–26. <https://doi.org/10.1038/nrg3980>.
- Schwitzgebel, V. M., D. W. Scheel, J. R. Connors, J. Kalamaras, J. E. Lee, D. J. Anderson, L. Sussel, J. D. Johnson, and M. S. German. 2000. 'Expression of Neurogenin3 Reveals an Islet Cell Precursor Population in the Pancreas'. *Development* 127 (16): 3533–42. <https://doi.org/10.1242/dev.127.16.3533>.
- Seymour, Philip A., Kristine K. Freude, Man N. Tran, Erin E. Mayes, Jan Jensen, Ralf Kist, Gerd Scherer, and Maïke Sander. 2007. 'SOX9 Is Required for Maintenance of the Pancreatic Progenitor Cell Pool'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (6): 1865–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609217104>.
- Sharma, A., M. Moore, E. Marcora, J. E. Lee, Y. Qiu, S. Samaras, and R. Stein. 1999. 'The NeuroD1/BETA2 Sequences Essential for Insulin Gene Transcription Colocalize with Those Necessary for Neurogenesis and P300/CREB Binding Protein Binding'. *Molecular and Cellular Biology* 19 (1): 704–13. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.1.704>.
- Sharon, Nadav, Raghav Chawla, Jonas Mueller, Jordan Vanderhooft, Luke James Whitehorn, Benjamin Rosenthal, Mads Gürtler, et al. 2019. 'A Peninsular Structure Coordinates Asynchronous Differentiation with Morphogenesis to Generate Pancreatic Islets'. *Cell* 176 (4): 790-804.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.003>.
- Shi, Junchao, Eun-A Ko, Kenton M. Sanders, Qi Chen, and Tong Zhou. 2018. 'SPORTS1.0: A Tool for Annotating and Profiling Non-Coding RNAs Optimized for rRNA- and tRNA-Derived Small RNAs'. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics, SI: RNA Epigenetics (III)*, 16 (2): 144–51. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2018.04.004>.
- Shih, Hung Ping, Allen Wang, and Maïke Sander. 2013. 'Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis'. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 29 (1): 81–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122405>.
- Shimomura, Kenju, and Yuko Maejima. 2017. 'KATP Channel Mutations and Neonatal Diabetes'. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)* 56 (18): 2387–93. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.8454-16>.
- Shiota, Chiyo, Krishna Prasad, Ping Guo, Yousef El-Gohary, John Wiersch, Xiangwei Xiao, Farzad Esni, and George K. Gittes. 2013. 'α-Cells Are Dispensable in Postnatal Morphogenesis and Maturation of Mouse Pancreatic Islets'. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 305 (8): E1030-1040. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00022.2013>.
- Siehler, Johanna, Anna Karolina Blöching, Matthias Meier, and Heiko Lickert. 2021. 'Engineering Islets from Stem Cells for Advanced Therapies of Diabetes'. *Nature Reviews Drug Discovery* 20 (12): 920–40. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00262-w>.

- Singh, Abhilasha, Sharmila Basu Modak, Madan M. Chaturvedi, and Jogeswar S. Purohit. 2023. 'SWI/SNF Chromatin Remodelers: Structural, Functional and Mechanistic Implications'. *Cell Biochemistry and Biophysics* 81 (2): 167–87. <https://doi.org/10.1007/s12013-023-01140-5>.
- Singh, Aditi, Arun Mahesh, Florian Noack, Beatriz Cardoso De Toledo, Federico Calegari, and Vijay K. Tiwari. 2022. 'Tcf12 and NeuroD1 Cooperatively Drive Neuronal Migration during Cortical Development'. *Development* 149 (3): dev200250. <https://doi.org/10.1242/dev.200250>.
- Smith, Stuart B., Rosa Gasa, Hirotaka Watada, Juehu Wang, Steven C. Griffen, and Michael S. German. 2003. 'Neurogenin3 and Hepatic Nuclear Factor 1 Cooperate in Activating Pancreatic Expression of Pax4'. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (40): 38254–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302229200>.
- Smith, Stuart B., Hirotaka Watada, and Michael S. German. 2004. 'Neurogenin3 Activates the Islet Differentiation Program While Repressing Its Own Expression'. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 18 (1): 142–49. <https://doi.org/10.1210/2003-0114>.
- Solar, Myriam, Carina Cardalda, Isabelle Houbracken, Mercè Martín, Miguel Angel Maestro, Nele De Medts, Xiaobo Xu, et al. 2009. 'Pancreatic Exocrine Duct Cells Give Rise to Insulin-Producing Beta Cells during Embryogenesis but Not after Birth'. *Developmental Cell* 17 (6): 849–60. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.11.003>.
- Son, Esther Y., Justin K. Ichida, Brian J. Wainger, Jeremy S. Toma, Victor F. Rafuse, Clifford J. Woolf, and Kevin Eggan. 2011. 'Conversion of Mouse and Human Fibroblasts into Functional Spinal Motor Neurons'. *Cell Stem Cell* 9 (3): 205–18. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.07.014>.
- Sosa-Pineda, Beatriz, Kamal Chowdhury, Miguel Torres, Guillermo Oliver, and Peter Gruss. 1997. 'The Pax4 Gene Is Essential for Differentiation of Insulin-Producing β Cells in the Mammalian Pancreas'. *Nature* 386 (6623): 399–402. <https://doi.org/10.1038/386399a0>.
- Soyer, Josselin, Lydie Flasse, Wolfgang Raffelsberger, Anthony Beucher, Christophe Orvain, Bernard Peers, Philippe Ravassard, et al. 2010. 'Rfx6 Is an Ngn3-Dependent Winged Helix Transcription Factor Required for Pancreatic Islet Cell Development'. *Development (Cambridge, England)* 137 (2): 203–12. <https://doi.org/10.1242/dev.041673>.
- Spaeth, Jason M., Jin-Hua Liu, Daniel Peters, Min Guo, Anna B. Osipovich, Fardin Mohammadi, Nilotpal Roy, et al. 2019. 'The Pdx1-Bound Swi/Snf Chromatin Remodeling Complex Regulates Pancreatic Progenitor Cell Proliferation and Mature Islet β -Cell Function'. *Diabetes* 68 (9): 1806–18. <https://doi.org/10.2337/db19-0349>.
- Sprague, Jennifer E., and Ana María Arbeláez. 2011. 'Glucose Counterregulatory Responses to Hypoglycemia'. *Pediatric Endocrinology Reviews: PER* 9 (1): 463–73; quiz 474–75.
- St-Onge, L., B. Sosa-Pineda, K. Chowdhury, A. Mansouri, and P. Gruss. 1997. 'Pax6 Is Required for Differentiation of Glucagon-Producing Alpha-Cells in Mouse Pancreas'. *Nature* 387 (6631): 406–9. <https://doi.org/10.1038/387406a0>.

- Suckale, Jakob. 2008. 'Pancreas Islets in Metabolic Signaling - Focus on the Beta-Cell'. *Frontiers in Bioscience* Volume (13): 7156. <https://doi.org/10.2741/3218>.
- Suissa, Yaron, Judith Magenheimer, Miri Stolovich-Rain, Ayat Hija, Patrick Collombat, Ahmed Mansouri, Lori Sussel, et al. 2013. 'Gastrin: A Distinct Fate of Neurogenin3 Positive Progenitor Cells in the Embryonic Pancreas'. *PLoS One* 8 (8): e70397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070397>.
- Sussel, L., J. Kalamaras, D. J. Hartigan-O'Connor, J. J. Meneses, R. A. Pedersen, J. L. Rubenstein, and M. S. German. 1998. 'Mice Lacking the Homeodomain Transcription Factor Nkx2.2 Have Diabetes Due to Arrested Differentiation of Pancreatic Beta Cells'. *Development (Cambridge, England)* 125 (12): 2213–21. <https://doi.org/10.1242/dev.125.12.2213>.
- Szlachcic, Wojciech J., Natalia Ziojła, Dorota K. Kizewska, Marcelina Kempa, and Malgorzata Borowiak. 2021. 'Endocrine Pancreas Development and Dysfunction Through the Lens of Single-Cell RNA-Sequencing'. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9 (April):629212. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.629212>.
- Sznurkowska, Magdalena K., Edouard Hannezo, Roberta Azzarelli, Lemonia Chatzeli, Tatsuro Ikeda, Shosei Yoshida, Anna Philpott, and Benjamin D. Simons. 2020. 'Tracing the Cellular Basis of Islet Specification in Mouse Pancreas'. *Nature Communications* 11 (1): 5037. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18837-3>.
- Taylor, Brandon L., Fen-Fen Liu, and Maïke Sander. 2013. 'Nkx6.1 Is Essential for Maintaining the Functional State of Pancreatic Beta Cells'. *Cell Reports* 4 (6): 1262–75. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.010>.
- Thor, S., J. Ericson, T. Brännström, and T. Edlund. 1991. 'The Homeodomain LIM Protein Isl-1 Is Expressed in Subsets of Neurons and Endocrine Cells in the Adult Rat'. *Neuron* 7 (6): 881–89. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90334-v](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90334-v).
- Tomar, A., M. Gomez-Velazquez, R. Gerlini, G. Comas-Armangué, L. Makharadze, T. Kolbe, A. Boersma, et al. 2024. 'Epigenetic Inheritance of Diet-Induced and Sperm-Borne Mitochondrial RNAs'. *Nature* 630 (8017): 720–27. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07472-3>.
- Toren, Eliana, Jessica D. Kepple, Kristen V. Coutinho, Samuel O. Poole, Iztiba M. Deeba, Tanya H. Pierre, Yanping Liu, Maïgen M. Bethea, and Chad S. Hunter. 2023. 'The SSBP3 Co-Regulator Is Required for Glucose Homeostasis, Pancreatic Islet Architecture, and Beta-Cell Identity'. *Molecular Metabolism* 76 (October):101785. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2023.101785>.
- Toren, Eliana, Yanping Liu, Maïgen M. Bethea, Alexa Wade, and Chad S. Hunter. 2022. 'The Ldb1 Transcriptional Co-Regulator Is Required for Establishment and Maintenance of the Pancreatic Endocrine Lineage'. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 36 (8): e22460. <https://doi.org/10.1096/fj.202200410R>.
- Tsuda, Motoyuki, Akihisa Fukuda, Munenori Kawai, Osamu Araki, and Hiroshi Seno. 2021. 'The Role of the SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma'. *Cancer Science* 112 (2): 490–97. <https://doi.org/10.1111/cas.14768>.

Tutukova, Svetlana, Victor Tarabykin, and Luis R. Hernandez-Miranda. 2021. 'The Role of Neurod Genes in Brain Development, Function, and Disease'. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 14 (June):662774. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.662774>.

Vázquez, Patricia, Ana M. Robles, Flora de Pablo, and Catalina Hernández-Sánchez. 2014. 'Non-Neural Tyrosine Hydroxylase, via Modulation of Endocrine Pancreatic Precursors, Is Required for Normal Development of Beta Cells in the Mouse Pancreas'. *Diabetologia* 57 (11): 2339–47. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3341-6>.

Verhoeff, Kevin, Braulio A. Marfil-Garza, and A.M. James Shapiro. 2021. 'Update on Islet Cell Transplantation'. *Current Opinion in Organ Transplantation* 26 (4): 397–404. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000891>.

Wade, Alexa K., Yanping Liu, Maigen M. Bethea, Eliana Toren, Hubert M. Tse, and Chad S. Hunter. 2019. 'LIM-Domain Transcription Complexes Interact with Ring-Finger Ubiquitin Ligases and Thereby Impact Islet β -Cell Function'. *The Journal of Biological Chemistry* 294 (31): 11728–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006985>.

Walker, John T, Diane C Saunders, Marcela Brissova, and Alvin C Powers. 2021. 'The Human Islet: Mini-Organ With Mega-Impact'. *Endocrine Reviews* 42 (5): 605–57. <https://doi.org/2022041200084345700>.

Wang, Hong-wu, Li-min Lin, Hong-yan He, Fang You, Wei-zhong Li, Tian-hua Huang, Gui-xia Ma, and Lian Ma. 2011. 'Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly Differentiate into Insulin-Producing Cells in Vitro'. *Chinese Medical Journal* 124 (10): 1534. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2011.10.018>.

Wang, Lei-Lei, and Chun-Li Zhang. 2022. 'In Vivo Glia-to-neuron Conversion: Pitfalls and Solutions'. *Developmental Neurobiology* 82 (5): 367–74. <https://doi.org/10.1002/dneu.22880>.

Wang, M., and D. J. Drucker. 1995. 'The LIM Domain Homeobox Gene Isl-1 Is a Positive Regulator of Islet Cell-Specific Proglucagon Gene Transcription'. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (21): 12646–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.21.12646>.

Wang, Weiping, Qiong Shi, Ting Guo, Zhe Yang, Zhuqing Jia, Ping Chen, and Chunyan Zhou. 2016. 'PDX1 and ISL1 Differentially Coordinate with Epigenetic Modifications to Regulate Insulin Gene Expression in Varied Glucose Concentrations'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 428 (June):38–48. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.03.019>.

Wang, Xiaojun, Ryosuke Misawa, Mark C. Zielinski, Peter Cowen, Junghyo Jo, Vipul Periwal, Camillo Ricordi, et al. 2013. 'Regional Differences in Islet Distribution in the Human Pancreas - Preferential Beta-Cell Loss in the Head Region in Patients with Type 2 Diabetes'. Edited by Thomas W H. Kay. *PLoS ONE* 8 (6): e67454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067454>.

Wang, Yang, Yuejiao Li, Chen Guo, Qin Lu, Weiping Wang, Zhuqing Jia, Ping Chen, Kangtao Ma, Danny Reinberg, and Chunyan Zhou. 2016. 'ISL1 and JMJD3 Synergistically Control Cardiac Differentiation of Embryonic Stem Cells'. *Nucleic Acids Research* 44 (14): 6741–55. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw301>.

Watada, Hirotaka, David W. Scheel, Joey Leung, and Michael S. German. 2003. 'Distinct Gene Expression Programs Function in Progenitor and Mature Islet Cells'. *Journal of Biological Chemistry* 278 (19): 17130–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213196200>.

'Webpage - Diabetes Atlas: Global Diabetes Data Report 2000 — 2045'. 2023. 2023. <https://diabetesatlas.org/data/>.

'Webpage - IDF: Facts & Figures'. 2023. International Diabetes Federation. 2023. <https://idf.org/about-diabetes/diabetes-facts-figures/>.

'Webpage - Mayo Clinic: Diabetes Treatment'. 2023. 2023. <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/type-2-diabetes/in-depth/diabetes-treatment/art-20051004>.

'Webpage - WHO: Diabetes'. 2023. 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.

Wiebe, Peter O., Jay D. Kormish, Venus T. Roper, Yoshio Fujitani, Ninche I. Alston, Kenneth S. Zaret, Christopher V. E. Wright, Roland W. Stein, and Maureen Gannon. 2007. 'Ptf1a Binds to and Activates Area III, a Highly Conserved Region of the Pdx1 Promoter That Mediates Early Pancreas-Wide Pdx1 Expression'. *Molecular and Cellular Biology* 27 (11): 4093–4104. <https://doi.org/10.1128/MCB.01978-06>.

Wilfinger, Armin, Valeriya Arkhipova, and Dirk Meyer. 2013. 'Cell Type and Tissue Specific Function of Islet Genes in Zebrafish Pancreas Development'. *Developmental Biology* 378 (1): 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.03.009>.

Wojtusciszyn, A., M. Armanet, P. Morel, T. Berney, and D. Bosco. 2008. 'Insulin Secretion from Human Beta Cells Is Heterogeneous and Dependent on Cell-to-Cell Contacts'. *Diabetologia* 51 (10): 1843–52. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1103-z>.

Xu, Sai, and Ji-Ping Xu. 2019. 'Present Status and Expectation of Aristaless-Related Homeobox (ARX) in Endocrine Pancreas'. *The International Journal of Developmental Biology* 63 (11–12): 579–87. <https://doi.org/10.1387/ijdb.190242sx>.

Yan, Chengzhi, Chulin Yu, Di Zhang, Yan Cui, Jinlian Zhou, and Sheng Cui. 2016. 'Protein Inhibitor of Activated STAT Y (PIASy) Regulates Insulin Secretion by Interacting with LIM Homeodomain Transcription Factor Isl1'. *Scientific Reports* 6 (December):39308. <https://doi.org/10.1038/srep39308>.

Yang, Zhe, Qiao Zhang, Qin Lu, Zhuqing Jia, Ping Chen, Kangtao Ma, Weiping Wang, and Chunyan Zhou. 2015. 'ISL-1 Promotes Pancreatic Islet Cell Proliferation by Forming an ISL-1/Set7/9/PDX-1 Complex'. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 14 (24): 3820–29. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1069926>.

Yatoh, Shigeru, Tomoyuki Akashi, Phillip P. Chan, Hideaki Kaneto, Arun Sharma, Susan Bonner-Weir, and Gordon C Weir. 2007. 'NeuroD and Reaggregation Induce β -Cell Specific Gene Expression in Cultured Hepatocytes'. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 23 (3): 239–49. <https://doi.org/10.1002/dmrr.678>.

- Yu, Fulong, Vijay G Sankaran, and Guo-Cheng Yuan. 2021. 'CUT&RUNTools 2.0: A Pipeline for Single-Cell and Bulk-Level CUT&RUN and CUT&Tag Data Analysis'. *Bioinformatics* 38 (1): 252–54. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab507>.
- Yu, Xin-Xin, Wei-Lin Qiu, Liu Yang, Yan-Chun Wang, Mao-Yang He, Dan Wang, Yu Zhang, et al. 2021. 'Sequential Progenitor States Mark the Generation of Pancreatic Endocrine Lineages in Mice and Humans'. *Cell Research* 31 (8): 886–903. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00486-w>.
- Yu, Xin-Xin, Wei-Lin Qiu, Liu Yang, Yu Zhang, Mao-Yang He, Lin-Chen Li, and Cheng-Ran Xu. 2019. 'Defining Multistep Cell Fate Decision Pathways during Pancreatic Development at Single-cell Resolution'. *The EMBO Journal* 38 (8): e100164. <https://doi.org/10.15252/emj.2018100164>.
- Yu, Xin-Xin, and Cheng-Ran Xu. 2020. 'Understanding Generation and Regeneration of Pancreatic β Cells from a Single-Cell Perspective'. *Development* 147 (7): dev179051. <https://doi.org/10.1242/dev.179051>.
- Zhang, Chuan, Takashi Moriguchi, Miwako Kajihara, Ritsuko Esaki, Ayako Harada, Homare Shimohata, Hisashi Oishi, et al. 2005. 'MafA Is a Key Regulator of Glucose-Stimulated Insulin Secretion'. *Molecular and Cellular Biology* 25 (12): 4969–76. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.12.4969-4976.2005>.
- Zhang, Hui, Wei-Ping Wang, Ting Guo, Ji-Chun Yang, Ping Chen, Kang-Tao Ma, You-Fei Guan, and Chun-Yan Zhou. 2009. 'The LIM-Homeodomain Protein ISL1 Activates Insulin Gene Promoter Directly through Synergy with BETA2'. *Journal of Molecular Biology* 392 (3): 566–77. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.036>.
- Zhang, Siwei, Winton Moy, Hanwen Zhang, Catherine Leites, Heather McGowan, Jianxin Shi, Alan R. Sanders, Zhiping P. Pang, Pablo V. Gejman, and Jubao Duan. 2018. 'Open Chromatin Dynamics Reveals Stage-Specific Transcriptional Networks in hiPSC-Based Neurodevelopmental Model'. *Stem Cell Research* 29 (May):88–98. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.03.014>.
- Zhang, Tao, Nicolle A. Saunee, Mary B. Breslin, Kejing Song, and Michael S. Lan. 2012. 'Functional Role of an Islet Transcription Factor, INSM1/IA-1, on Pancreatic Acinar Cell Trans-Differentiation'. *Journal of Cellular Physiology* 227 (6): 2470–79. <https://doi.org/10.1002/jcp.22982>.
- Zhang, Tao, Hongwei Wang, Nicolle A. Saunee, Mary B. Breslin, and Michael S. Lan. 2010. 'Insulinoma-Associated Antigen-1 Zinc-Finger Transcription Factor Promotes Pancreatic Duct Cell Trans-Differentiation'. *Endocrinology* 151 (5): 2030–39. <https://doi.org/10.1093/endo/bap380>.
- Zhao, Min, Stephanie A. Amiel, Sanaz Ajami, Jie Jiang, Mohamed Rela, Nigel Heaton, and Guo Cai Huang. 2008. 'Amelioration of Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice with Cells Derived from Human Marrow Stromal Cells'. Edited by Kevin Docherty. *PLoS ONE* 3 (7): e2666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002666>.
- Zhou, Qiao, Anica C. Law, Jayaraj Rajagopal, William J. Anderson, Paul A. Gray, and Douglas A. Melton. 2007. 'A Multipotent Progenitor Domain Guides Pancreatic Organogenesis'. *Developmental Cell* 13 (1): 103–14. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.06.001>.

Zhuang, Shaowei, Qingquan Zhang, Tao Zhuang, Sylvia M. Evans, Xingqun Liang, and Yunfu Sun. 2013. 'Expression of Isl1 during Mouse Development'. *Gene Expression Patterns* 13 (8): 407–12. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2013.07.001>.

Zucha, Daniel, Peter Androvic, Mikael Kubista, and Lukas Valihrach. 2020. 'Performance Comparison of Reverse Transcriptases for Single-Cell Studies'. *Clinical Chemistry* 66 (1): 217–28. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2019.307835>.