

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Jovana D. Komazec

VARIJANTE KODIRAJUĆIH I NEKODIRAJUĆIH  
REGIONA GENA UZROČNIKA DIJABETESA  
ADULTNOG TIPRA KOD MLADIH KAO MODULATORI  
FENOTIPA I REGULATORI GENSKE EKSPRESIJE

Doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Jovana D. Komazec

CODING AND NONCODING VARIANTS OF  
DISEASE-CAUSING GENES OF MATURITY-ONSET  
DIABETES OF THE YOUNG: PHENOTYPE  
MODULATORS AND REGULATORS OF GENE  
EXPRESSION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

---

**MENTORI:**

**dr Milena Ugrin**, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**dr Sonja Pavlović**, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

**dr Milena Ugrin**, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**dr Sonja Pavlović**, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

**prof. dr Svetlana Radović**, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**doc. dr. Mihailo Jelić**, docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**doc. dr Vera Zdravković**, docent, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, katedra pedijatrije

Datum odbrane: \_\_\_\_\_ 2020. godine

---

---

## *☞Zahvalnica☞*

*Ovaj rad je osmišljen i realizovan u Laboratoriji za Molekularnu biomedicinu na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo na Univerzitetu u Beogradu.*

*Zahvaljujem se svim kolegama na nesebičnoj pomoći i dragocenim savetima koji su mi značili u svakodnevnim laboratorijskim aktivnostima i tokom izrade ove teze. Posebno se zahvaljujem svojim mentorima i članovima komisije:*

*dr Sonji Pavlović zahvaljujem na ukazanoj prilici da se bavim naukom. Hvala Vam na svim savetima i posvećenom vremenu, kako tokom izrade ove teze, tako i mimo nje. I posebno hvala za brojne razgovore koji su mi značili, a nisu svi bili o temi ove disertacije.*

*dr Mileni Ugrin, svom neposrednom mentoru, zahvaljujem na kritičkom pogledu i brojnim korisnim sugestijama koje su mi bile od velike pomoći tokom pisanja ove teze. Hvala ti što si me uvek saslušala, što si imala veliko strpljenje za mene i ukazivala mi na pravilnosti i nepravilnosti u mom radu od kada sam došla u laboratoriju pa sve do ovog momenta.*

*Prof. dr Svetlani Radović zahvaljujem na kritičkoj oceni ove teze i savetima koji su doprineli njenom uobličavanju i poboljšanju.*

*Dr Veri Zdravković zahvaljujem na posvećenom vremenu i pažljivom čitanju ove teze, kao i na saradnji u ostvarivanju iste.*

*Dr Mihailu Jeliću zahvaljujem na pažljivom čitanju ove teze i korisnim savetima i sugestijama.*

*Svim kolegama laboratorije 01: Branki, Nataši, Teodori, Tanji, Goci, Maji, Vesni, Jeleni, Kristel, Biljani, Sanji, Nikoli, Ireni, Aniti, Marini, Vladi i Bojanu, kao i novim mlađim licima laboratorije 01: Nini, Mioni, Marini, Katarini i Đorđu, želela bih da se zahvalim na druženju, razgovorima, savetima, podeljenom iskustvu i svemu što ste me naučili.*

*Posebno bih želela da se zahvalim mojim dragim prijateljima. Hvala vam na velikoj podršci, razumevanju i ohrabriranju, na svim savetima i lepim zajedničkim trenucima. Hvala vam sto ste verovali u mene i podsticali me da istrajem.*

*Dragim roditeljima i bratu veliko hvala što ste uvek tu za mene, što brinete i pružate mi bezuslovnu ljubav i podršku u svemu.*

*I na kraju hvala tebi Lepi što si tu za mene. Hvala ti na neograničenoj podršci i ljubavi, hvala ti na svim našim razgovorima i hvala ti što me čuješ i kada ti ne pričam. Mom malom Iliji, mom čedovištu, hvala što sve činiš smislenijim. Tvoj osmeh briše sve moje brige u trenutku.*

---

---

# Varijante kodirajućih i nekodirajućih regiona gena uzročnika dijabetesa adultnog tipa kod mladih kao modulatori fenotipa i regulatori genske ekspresije

## Rezime

Dijabetes adultnog tipa kod mladih (MODY) je nasledni, autozomno dominantni oblik dijabetesa, klinički i genetički veoma heterogen, koji nastaje kao posledica primarne disfunkcije  $\beta$ -ćelija pankreasa. MODY nastaje usled genetičkih varijanti u jednom od brojnih gena asociраних sa MODY dijabetesom, te je metodom sekvenciranja nove generacije i metodom istovremenog umnožavanja vezanih proba, prvi put u Srbij, analizirano 13 gena uzročnika MODY dijabetesa kod 29 klinički suspektnih pedijatrijskih pacijenata. Kombinovanjem ove dve metode detektovano je 20 različitih varijanti kod 75,9% pacijenata u 4 različita gena. Varijante u dva gena, *GCK* i *HNF1B*, detektovane redom, kod 50% i 22,7% pacijenata, predstavljale su glavne uzročnike MODY dijabetesa u ovoj grupi pacijenata. U ovoj studiji identifikovana je i jedna nova prethodno neprijavljena varijanta u *GCK* genu, c.596T>C; p.Val199Ala, za koju su *in silico* predikcije nedvosmisleno pokazale da je patogena. Kako bi se detektovale varijante u promotorskom regionu, koje takođe dovode do MODY dijabetesa, analizirani su promotorski regioni četiri najčešća gena uzročnika MODY dijabetesa. Varijantni set u promotorskom regionu *GCK* gena (-282C>T; -194A>G; 402C>G) i varijanta c.-154-160insTGGGGGT u promotoru *HNF1A* gena, odabrane su kako bi se u funkcionalnim esejima u ćelijskoj kulturi ispitaio njihov uticaj na ekspresiju datih gena. Analizirane su i interakcije ovih potencijalnih regulatornih elemenata sa transkripcionim faktorima u esejima usporene elektroforetske pokretljivosti. Rezultati funkcionalne analize odabarnih promotorskih varijanti ukazali su da varijante u promotoru, osim potencijalno patogenog efekta, mogu da imaju i ulogu modifikatora fenotipa, čime su dopunjena postojeća znanja o varijantama u promotorima MODY gena.

**Ključne reči:** Dijabetes, MODY, *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, DNK varijante, sekvenciranje nove generacije (NGS), funkcionalna analiza, promotor.

**Naučna oblast:** Molekularna biologija eukariota

**Uža naučna oblast:** Molekularna genetika

**UDK broj:** 616.379-008.64:575.113 (497.11)(043.3)

---

---

# Coding and noncoding variants of disease-causing genes of maturity-onset diabetes of the young: phenotype modulators and regulators of gene expression

## Abstract

Maturity-onset diabetes of the young (MODY) is an inherited, autosomal dominant form of diabetes, clinically and genetically very heterogeneous, resulting from primary  $\beta$ -cell dysfunction. Since MODY diabetes is caused by single gene variants in one of the many MODY-related genes, next generation sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification analysis were used to analyze 13 MODY-related genes in 29 clinically suspected pediatric patients, for the first time in Serbia. Combining these two methods, 20 different variants, found in 4 genes, were identified in 75.9% patients. Variants in the *GCK* and *HNF1B* gene, detected in 50% and 22.7% patients, respectively, were the main cause of MODY diabetes in our patients. Also, a novel variant in the *GCK* gene: c.596T>C, p.Val199Ala was identified and predicted to be pathogenic by *in silico* algorithms. Due to the fact that promoter variants can also lead to MODY diabetes, promoter regions of the four most common MODY genes were screened. Two variants, the variant set in the promoter region of the *GCK* gene (-282C>T; -194A>G; 402C>G), and the variant c.-154-160insTGGGGGT in the promoter of the *HNF1A* gene, were selected to analyze their effect on gene expression in functional cell culture studies. Also, electrophoretic mobility shift assay was carried out to investigate the interaction of potential transcription factors with the promoter region surrounding the variant, as well as whether the variants affect the binding of those transcription factors. The results of the functional analysis of the selected promoter variants indicated that variants in the promoter, in addition to potentially pathogenic effect, may also play the role of a phenotype modifier, thus supplementing the existing knowledge about variants in the promoters of MODY genes.

**Key words:** Diabetes, MODY, *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B*, DNK variants, next generation sequencing (NGS), functional analysis, promoter.

**Scientific field:** Molecular biology of eukaryotes

**Scientific subfield:** Molecular genetics

**UDK number:** 616.379-008.64:575.113 (497.11)(043.3)

---

---

## LISTA SKRAĆENICA

- ABCC8 - Gen za SUR1 subjedinicu K-ATP kanala na membrani  $\beta$ -ćelija, sinonim SUR1 (eng. *ATP binding cassette subfamily C member 8 gene*)
- APPL1 - APPL1 protein (eng. *Adaptor Protein, Phosphotyrosine interacting with PH domain and Leucine zipper 1*)
- ATP - Adenozin trifosfat
- bHLH - Proteinska struktura proteina *Basic helix-loop-helix* (bHLH)
- BLK - B limfocitna tirozin kinaza (eng. *B lymphocyte kinase BLK*)
- bp - Bazni par
- CEL - Karboksil ester lipaza, enzim (eng. *Carboxyl ester lipase, CEL*)
- DM1 - Dijabetes melitus tip 1 (*Diabetes mellitus tip 1, DM1*)
- DM2 - Dijabetes tip melitus 2 (*Diabetes mellitus tip 2, DM2*)
- DMSO - Dimetilsulfoksid
- ddNTP - Didezoksiribonukleotid
- dNTP - Dezoksiribonukleotida
- GAD - GAD pankreasni antigen (eng. *Glutamic acid decarboxylase*)
- GCK - Gen za glukokinazu (eng. *Glukokinase, GCK*)
- GLUT2 - Glukozni transporter 2 (eng. *Glucose transporter 2, GLUT-2*)
- GSIS - Glukozom stimulirana sekrecija insulina (eng. *Glucose stimulated insulin secretion, GSIS*)
- HDL - Lipoprotein velike gustine (eng. *High-density lipoprotein, HDL*)
- HNF - Hepatocitni nukleusni faktori, familija transkripcionih faktora (eng. *Hepatocyte nuclear factors*)
- HNF1A - Hepatocitni nukleusni faktor 1A, transkripcioni faktor (eng. *Hepatocyte nuclear factor 1A, HNF1A*)
- HNF1B - Hepatocitni nukleusni faktor 1B, transkripcioni faktor (eng. *Hepatocyte nuclear factor 1 B, HNF1B*)
- HNF4A - Hepatocitni nukleusni faktor 4A, transkripcioni faktor (eng. *Hepatocyte nuclear factor 4A, HNF4A*)
- hsCRP - Visoko osjetljivi C reaktivni protein (eng. *High sensitive C-reactive protein*)
- IA-2 - IA-2 pankreasni antigen (eng. *Insulinoma antigen-2*)
- INS - Gen za insulin (eng. *Insulin, INS*)
- KCNJ11 - Gen za Kir6.2 subjedinicu K-ATP kanala (eng. *Potassium voltage-gated channel subfamily J member 11*)
- KLF11 - KLF11 transkripcioni faktor (eng. *Kruppel like factor 11, KLF11*)
- MAX - Transkripcioni faktor MAX (eng. *Myc associated factor X, MAX*)
- MLPA - Metoda istovremenog umnožavanja vezanih proba (eng. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA*)
- MODY - Dijabetes adultnog tipa kod mladih (eng. *Maturity-Onset Diabetes of the Young, MODY*)
- MYC - Transkripcioni faktor MYC (eng. *MYC transcription factor*)
- NEUROD1 - Neurogeni faktor diferencijacije 1 (eng. *Neuronal differentiation factor 1, NEUROD1*)
- NGS - Sekvenciranje nove generacije (eng. *Next Generation Sequencing, NGS*)
- OHA - Oralni antidijabetici, oralni hipoglikemijski lekovi (eng. *Oral hypoglycemic agents*)
- PAX4 - Gen za PAX 4 transkripcioni faktor (eng. *Paired box 4, PAX4*)
- PDX1 - Gen za pankreasni i duodenalni homeoboks protein 1 (eng. *Pancreatic and duodenal homeobox, PDX1*)
-

- 
- POU - Akronim od Pit-1/Oct-1/Unc-86, odnosno od *Pituitary-specific Pit-1, Octamer-binding proteins Oct-1* i *Oct-2*, i neuralni *Unc-86* iz *Caenorhabditis elegans*; POU familija proteina (transkripcionih faktora); POU domen
- PNDM - Permanentni (trajni) neonatalni dijabetes (eng. *Permanent neonatal diabetes mellitus, PNDM*)
- RCAD - eng. *Renal Cysts and Diabetes Syndrome*
- RREB1 - Transkripcioni faktor RREB1 (eng. *Ras-responsive element-binding protein 1*)
- SNV - Pojedinačne nukleotidne varijante (eng. *Single Nucleotide Variants, SNV*)
- SUR 1 - SUR1 subjedinica K-ATP kanala (eng. *Sulfonylurea Receptor 1, SUR1*)
- TCF1 - *Transcription Factor 1*, drugi naziv za *HNF1A* gen
- TCF2 - *Transcription Factor 2*, drugi naziv za *HNF1B* gen
- TNDM - Tranzijentni (prolazni) neonatalni dijabetes (eng. *Transient neonatal diabetes mellitus, TNDM*)
- USF - Transkripcioni faktor USF (eng. *Upstream transcription factor, USF*)
- UTR - Netranslirajući region iRNK (eng. *Untranslated region*)
- VNTR - Varijabilan broj tandemskih ponovaka (eng. *Variable number of tandem repeats, VNTR*)
- wt - eng. *wild type*
-



---

## SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Dijabetes adultnog tipa kod mladih (MODY) .....	2
1.2. Kratak historijski osvrt na MODY dijabetes.....	7
1.3. Kliničke karakteristike MODY pacijenata i sličnost sa drugim oblicima dijabetesa.....	7
1.4. Dijagnoza MODY dijabetesa i značaj genetičke potvrde dijagnoze.....	9
1.5. Geni uzročnici MODY dijabetesa .....	11
1.5.1. Gen <i>GCK</i> i GCK-MODY .....	11
1.5.2. Gen <i>HNF1A</i> i HNF1A-MODY .....	14
1.5.3. Gen <i>HNF4A</i> i HNF4A-MODY .....	17
1.5.4. Gen <i>HNF1B</i> i HNF1B-MODY .....	18
1.5.5. Geni uzročnici retkih MODY podtipova.....	20
<b>CILJEVI</b> .....	<b>24</b>
<b>MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>26</b>
3.1. MATERIJAL.....	27
3.1.1. Ispitanici .....	27
3.1.2. Prajmeri i oligonukleotidi.....	27
3.1.3. Bakterijski soj .....	30
3.1.4. Plazmidni vektori .....	30
3.1.5. Čelijske linije .....	30
3.2. METODE .....	31
3.2.1. METODE ZA DETEKCIJU GENSKIH VARIJANTI U GENIMA ASOCIRANIM SA MODY DIJABETESOM.....	31
3.2.1.1. Izolacija DNK i kvantifikacija .....	31
3.2.1.2. Sekvenciranje nove generacije (NGS) .....	32
3.2.1.3. Metoda istovremenog umnožavanja vezanih proba (MLPA) .....	35
3.2.1.4. Amplifikacija regiona DNK od interesa metodom PCR.....	36
3.2.1.5. Analiza DNK na agaroznom gelu .....	38
3.2.1.6. Sekvenciranje po Sangeru.....	38
3.2.1.7. <i>In silico</i> analiza novootkrivene varijante <i>c.596T&gt;C</i> ; <i>p.Val199Ala</i> u <i>GCK</i> genu .....	40
3.2.2. FUNKCIONALNA ANALIZA VARIJANTI U PROMOTORSKOM REGIONU GENA <i>GCK I</i> <i>HNF1A</i> .....	40
3.2.2.1. Metodologija rekombinantne DNK – pravljenje plazmidnih konstrukata za ekspreimente tranzijentne transfekcije.....	40
3.2.2.2. Kultivisanje bakterija.....	42
3.2.2.3. Pripremanje <i>E.coli DH5α</i> kompetentnih ćelija za transformaciju .....	42

---

---

3.2.2.4. Transformacija <i>E.coli DH5α</i> kompetentnih ćelija.....	43
3.2.2.5. Detekcija i izolacija plazmidnog konstrukta.....	43
3.2.2.6. Izolacija plazmidne DNK na maloj skali ("mini prep").....	44
3.2.2.7. Izolacija plazmidne DNK na maloj skali .....	45
3.2.2.8. Izolacija plazmidne DNK na velikoj skali .....	45
3.2.2.9. Čuvanje transformanata .....	46
3.2.2.10. Ćelijske linije i uslovi gajenja .....	46
3.2.2.11. Zamrzavanje ćelijskih linija.....	47
3.2.2.12. Tranzijentna transfekcija ćelija HepG2 i Rin-5F lipofektaminom .....	47
3.2.2.13. Priprema ćelijskih ekstrakata za CAT i β-galaktozidazni esej .....	48
3.2.2.14. Beta galaktozidazni esej.....	48
3.2.2.15. CAT ELISA esej.....	49
3.2.3. ANALIZA INTERAKCIJE DNK I JEDARNIH PROTEINA .....	49
3.2.3.1. <i>In silico</i> analiza varijanti u promotorskom regionu .....	50
3.2.3.2. Izolacija jedarnih proteina iz Rin-5F i HepG2 ćelija.....	50
3.2.3.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu .....	50
3.2.3.4. Obeležavanje probe radioizotopom γ - <sup>32</sup> P .....	51
3.2.3.5. Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti .....	52
<b>REZULTATI.....</b>	<b>53</b>
4.1. MOLEKULARNO-GENETIČKA ANALIZA PACIJENATA SA VARIJANTAMA U MODY GENIMA...54	
4.1.1. Spektar varijanti detektovanih u MODY genima .....	54
4.1.2. <i>In silico</i> analiza novootkrivene varijante <i>c.596T&gt;C; p.Val199Ala</i> u <i>GCK</i> genu .....	57
4.1.3. Klinička slika pacijenata sa potvrđenim varijantama u MODY genima .....	58
4.2. ANALIZA PROMOTORSKIH REGIONA GENA UZROČNIKA MODY DIJABETESA.....60	
4.2.1. Detekcija varijanti u promotorskim regionima MODY gena .....	60
4.2.2. Analiza varijantnog seta u promotorskom regionu gena <i>GCK</i> .....62	
4.2.2.1. Funkcionalna analiza promotorskog regiona gena <i>GCK</i> sa i bez varijantnog seta.....63	
4.2.2.2. Analiza vezivanja transkripcionih faktora za promotorski region <i>GCK</i> gena sa i bez ispitivane varijante .....	64
4.2.2.3. Genotip-fenotip korelacija .....	66
4.2.3. Analiza varijante <i>c.-154-160insTGGGGGT</i> u promotorskom regionu gena <i>HNF1A</i> .....67	
4.2.3.1. Funkcionalna analiza varijante <i>c.-154-160insTGGGGGT</i> u promotorskom regionu gena <i>HNF1A</i> .....	68
4.2.3.2. Analiza vezivanja transkripcionih faktora za promotorski region gena <i>HNF1A</i> sa i bez ispitivane varijante .....	69
4.2.3.3. Genotip-fenotip korelacija .....	70
<b>DISKUSIJA .....</b>	<b>71</b>
5.1. MOLEKULARNO-GENETIČKA KARAKTERIZACIJA PACIJENTA SA VARIJANTAMA U MODY GENIMA .....	72
5.1.1. Distribucija i učestalost varijanti u MODY genima .....	72
5.1.2. Spektar varijanti po MODY genima i korelacija genotipa i fenotipa nosilaca varijanti u MODY genima.....	73
5.1.2.1. Varijante u <i>GCK</i> genu – korelacija genotipa i fenotipa .....	73
5.1.2.2. Varijante u <i>HNF1A</i> genu - korelacija genotipa i fenotipa .....	74
5.1.2.3. Varijante u <i>HNF1B</i> genu – korelacija genotipa i fenotipa .....	75

---

---

5.1.2.4. Varijante u <i>NEUROD1</i> genu – korelacija genotipa i fenotipa .....	76
5.2. ANALIZA PROMOTORSKIH REGIONA GENA UZROČNIKA MODY DIJABETESA.....	77
5.2.1. Analiza promotorskog regiona <i>GCK</i> gena.....	77
5.2.2. Funkcionalna analiza varijantnog seta u promotorskom regionu <i>GCK</i> gena i genotip-fenotip korelacija.....	78
5.2.3. Interakcija promotorskog regiona <i>GCK</i> gena sa transkripcionim faktorima .....	79
5.2.4. Funkcionalna analiza varijante c.-154-160insTGGGGGT u promotoru <i>HNF1A</i> gena.....	80
5.2.5. Interakcija promotorskog regiona koji sardži varijantu c.-154-160insTGGGGGT <i>HNF1A</i> gena sa transkripcionim faktorima.....	80
<b>ZAKLJUČCI.....</b>	<b>83</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>86</b>
<b>PRILOZI .....</b>	<b>98</b>

---



UVOD

---

## 1.1. Dijabetes adultnog tipa kod mladih (MODY)

Dijabetes melitus je metabolički poremećaj višestruke etiologije. Odlikuje se hroničnom hiperglikemijom koja nastaje kao posledica defekta u sekreciji insulina i/ili zbog defekta u njegovom dejstvu. Dijabetes melitus tip 1 (*Diabetes melitus*, DM1) i dijabetes melitus tip 2 (*Diabetes melitus*, DM2), dva glavna oblika dijabetesa, predstavljaju kompleksne multifaktorijalne bolesti koje nastaju kombinacijom spoljašnjih i genetičkih faktora kao i faktora asociranih sa načinom života. Pored ova dva tipa, postoji i poseban tip dijabetesa označen kao monogeniski dijabetes, koji, kao što i naziv kaze, nastaje kao posledica genetičkih varijanti u jednom genu (WHO 2019). Međutim, do danas je opisano više od 40 gena odgovornih za nastanak monogeniskog dijabetesa, a pravilno funkcionisanje svakog od njih, tj. njihovih proteinskih produkata je neophodno za normalu funkciju  $\beta$ -ćelija pankreasa. Otkriće i identifikacija ovih gena omogućila je bolje razumevanja funkcije  $\beta$ -ćelije pankreasa, kao i genetičke osnove  $\beta$ -ćelije, što je na kliničkom nivou doprinelo boljem razumevanju monogeniskog dijabetesa, precizniju dijagnozu, omogućilo primenu adekvatnije terapije i pružanje prognostičkih informacija, kao i genetičko savetovanje za članove porodice (Hattersley and Greeley 2018).

Najučestaliji oblik monogeniskog dijabetesa je dijabetes adultnog tipa kod mladih (eng. *Maturity-Onset Diabetes of the Young*, MODY). MODY dijabetes se odlikuje autozomno dominantnim nasleđivanjem, pojavom hiperglikemije u ranom životnom dobu, odsustvom ketoacidoze (pojava velike koncentracije ketona u krvi koja se javlja usled nedovoljne količine insulina) i primarnom disfunkcijom  $\beta$ -ćelija pankreasa. Kod većine pacijenata se manifestuje kao hiperglikemija koja se pojavljuje u detinjstvu ili adolescenciji i kod kojih postoji istorija dijabetesa u porodici (Althari and Gloyn 2015; Fajans and Bell 2011). Iako predstavlja monogeniski tip dijabetesa, danas se zna da MODY nije jedinstven entitet, već se odlikuje velikom genetičkom, kliničkom i metaboličkom heterogenošću (Firdous et al. 2018). Prema najsavremenijoj literaturi, MODY dijabetes nastaje kao posledica genskih varijanti u 14 gena: *HNF1A*, *GCK*, *HNF4A*, *PAX4*, *HNF1B*, *NEUROD1*, *KLF11*, *CEL*, *PAX4*, *INS*, *BLK*, *ABCC8*, *KCNJ11* i *APPL1* (Tabela 1). Produkti ovih gena su transkripcioni faktori, enzimi, komponente  $K_{ATP}$  membranskog kanala i proteini određene funkcije (npr. insulin) (Jang 2020). Pojedini transkripcioni faktori, poput *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B* i *PDX1*, se eksprimiraju veoma rano tokom embrionalnog razvića i važni su za razviće i diferencijaciju  $\beta$ -ćelija pankreasa. U adultnoj  $\beta$ -ćeliji bitni su za njeno pravilno funkcionisanje. Genske varijante u ovim genima mogu da dovedu i do nastanka abnormalnosti drugih organa zbog svog plejotropnog dejstva. Sa druge strane genske varijante u genima koji kodiraju enzime, npr. u *GCK* genu, ili subjedinice transmembranskih kanala (*ABCC8* i *KCNJ11*) direktno utiču na sekreciju insulina onemogućavajući odgovor ćelije na povećanje koncentracije glukoze. Zbog različitih uloga koju ovi geni, tj. njihovi produkti ostvaruju u  $\beta$ -ćeliji, postoje različiti podtipovi MODY dijabetesa, od kojih se svaki odlikuje svojim kliničkim karakteristikama (Tabela 1) (Firdous et al. 2018; Schwitzgebel 2014).

Tabela 1. Geni uzročnici MODY dijabetesa i osnovne kliničke odlike asociranih podtipova

<b>MODY podtip</b>	<b>MODY gen</b>	<b>Hr. lokus</b>	<b>Naziv i funkcija gena</b>	<b>Patofiziologija</b>	<b>Osnovne kliničke karakteristike</b>	<b>God. otkrića</b>
HNF4A-MODY (MODY 1)	<i>HNF4A</i>	20q13	Hepatocitni nukleusni faktor 1A; Transkripcioni faktor	Disfunkcija $\beta$ -ćelije, smanjena sekrecija insulina	Redi MODY podtip (5-10%); progresivna hiperglikemija, mikro- i makrovaskularne komplikacije, neonatalna hipoglikemija, makrosomija, osetljivost na sulfonilureu, terapija - niske doze sulfoniluree	1991
GCK-MODY (MODY 2)	<i>GCK</i>	7p13	Glukokinaza, enzim glukozni senzor	Disfunkcija $\beta$ -ćelije, smanjena osetljivost enzima na glukozu	Čest MODY podtip (30-50%); blaga, stabilna hiperglikemija, odsustvo terapije	1993
HNF1A-MODY (MODY 3)	<i>HNF1A</i>	12q24.2	Hepatocitni nukleusni faktor 4 A, Transkripcioni faktor	Disfunkcija $\beta$ -ćelije, smanjena sekrecija insulina, progresivno propadanje $\beta$ -ćelije	Čest MODY podtip (30-50%), progresivna hiperglikemija, glukozourija, mikro- i makrovaskularne komplikacije; ostljivost na sulfonilureu, terapija - niske doze sulfoniluree	1996
PDX1-MODY (MODY 4)	<i>PDX1</i>	13q12.1	Pankreasni i duodenalni homeoboks protein 1, transkripcioni faktor	Disfunkcija $\beta$ -ćelije, nepravilan razvoj i ageneza pankreasa	Redak MODY podtip (<1%); neonatalni dijabetes, pankreasna ageneza; dijeta, OHA ili insulin kao terapija	1997
HNF1B-MODY (MODY 5)	<i>HNF1B</i>	17q12	Hepatocitni nukleusni faktor 1B; Transkripcioni faktor	Disfunkcija $\beta$ -ćelije, smanjena sekrecija insulina,	Redi MODY podtip (5%); dijabetes asociran sa abnormalnostima pankreasa, urogenitalnog sistema; varijabilan fenotip; insulinska terapija	1997
NEUROD1-MODY (MODY 6)	<i>NEUROD1</i>	2q31	Neurogeni faktor diferencijacije 1, Transkripcioni faktor	Disfunkcija $\beta$ -ćelije	Redak MODY podtip (<1%), dijabetes u odraslom dobu, varijabilan fenotip; OHA ili insulin kao terapija	1999

Nastavak tabele 1

KLF11-MODY (MODY 7)	<i>KLF11</i>	2p25	<i>Kruppel-like faktor 11</i> ; Transkripcioni faktor	Disfunkcija $\beta$ -ćelije	Veoma redak MODY podtip ( $\ll 1\%$ ), fenotip sličan DM2; OHA ili insulin kao terapija	2005
CEL-MODY (MODY 8)	<i>CEL</i>	9q34	Karboksil-estar lipaza, enzim	Smanjena endokrina i egzokrina funkcija pankreasa	Veoma redak MODY podtip ( $\ll 1\%$ ); dijabetes u adultnom dobu, disfunkcija egzokrinog pankreasa, lipomatoza; dijeta, OHA ili insulin kao terapija	2006
PAX4-MOY (MODY 9)	<i>PAX4</i>	7q32	<i>Pax 4 (Paired box 4)</i> transkripcioni faktor	Disfunkcija $\beta$ -ćelije	Veoma redak MODY podtip ( $\ll 1\%$ ); dijeta, OHA ili insulin kao terapija	2007
INS-MODY (MODY 10)	<i>INS</i>	11p15	Insulin	Smanjena sinteza ili odsustvo insulina	Redak MODY podtip ( $< 1\%$ ), pojava u mladom dobu, dijeta, sulfonilurea ili insulin kao terapija;	2008
BLK-MODY (MODY 11)	<i>BLK</i>	8p23.1	B-limfocitna tirozin kinaza	Disfunkcija $\beta$ -ćelije, defekt u sekreciji insulina	Veoma redak ( $\ll 1\%$ ); Gojazost	2009
ABCC8-MODY (MODY 12)	<i>ABCC8</i>	11p15	SUR1 subjedinica ATP zavisnog kalijumovog kanala, učestvuje u regulaciji sekrecije insulina	Disfunkcija ATP zavisnog kalijumovog kanala	Redak MODY podtip ( $< 1\%$ ), klinički fenotip sličan HNF1A/4A-MODY, visoke doze sulfoniluree, mnogo češće nastaje PNDM i TNDM; sulfonilurea kao terapija	2012
KCNJ11-MODY (MODY 13)	<i>KCNJ11</i>	11p15.1	Kir6.2 subjedinica ATP zavisnog kalijumovog kanala, učestvuje u regulaciji sekrecije insulina	Disfunkcija ATP zavisnog kalijumovog kanala	Veoma redak MODY podtip ( $\ll 1\%$ ), visoke doze sulfoniluree; NDM usled homozigotnih varijanti; sulfonilurea kao terapija	2012
(APPL1-MODY) MODY 14	<i>APPL1</i>	3p14.3	APPL1 protein	Defekt u sekreciji insulina	Veoma redak ( $\ll 1\%$ ), pojava dijabetesa u odraslom dobu; dijeta, OHA ili insulin kao terapija	2015



---

*Nastavak tabele 1*

*HR. – hromozom; APPL1 - Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interaction, PH domain, and leucine zipper containing 1 protein; OHA - oralni hipoglikemijski lekovi. Preuzeto i modificovano prema (Anik et al. 2015; Firdous et al. 2018; Jang 2020; Urakami 2019). PNDM – Permanentni neonatalni dijabetes (eng. Permanent neonatal diabetes mellitus, PNDM), TNDM – Tranzijentni neonatalni dijabetes (eng. Transient neonatal diabetes mellitus, TNDM)*

MODY dijabetes je redak oblik dijabetesa. Učestalost MODY dijabetesa je 1-6% u pedijatrijskoj dijabetičnoj populaciji, a slična je i u adultnoj, 1-5% (Fendler et al. 2012; Irgens et al. 2013; Johansson et al. 2017; Johnson et al. 2019; Pihoker et al. 2013; Urakami 2019). Od 14 gena uzročnika MODY dijabetesa, četiri gena *HNF1A*, *GCK*, *HNF4A* i *HNF1B* predstavljaju najčešće uzročnike MODY dijabetesa u ispitivanim populacijama, od kojih su genske varijante u genima *GCK* i *HNF1A* odgovorne za nastanak MODY dijabetesa u 80%-90% slučajeva (Schober et al. 2009; Shields et al. 2010; Søvika et al. 2013). Pokazano je da odnos ova dva gena uzročnika MODY dijabetesa varira od populacije do populacije (Tabela 2), čineći genske varijante u *GCK* genu glavnim uzročnikom MODY dijabetesa u zemljama poput Španije (Estalella et al. 2007a), Italije (Delvecchio et al. 2014), Grčke (Tatsi et al. 2013) i Poljske (Fendler et al. 2012) za razliku od zemalja smeštenih severnije, Norveške (Søvika et al. 2013), Danske (Johansen et al. 2005), Holandije (Weinreich et al. 2015), Velike Britanije (Shields et al. 2010) u kojima su genske varijante u *HNF1A* genu glavni uzročnik. Ova varijacija se može pripisati razlikama u strategiji skrininga dijabetesa, jer zemlje koje retko izvode rutinske testove glukoze u krvi češće identifikuju *HNF1A* gen kao uzročnik MODY dijabetesa, za razliku od zemalja u kojima se rutinski sprovode ovi testovi, te češće identifikuju genske varijante u *GCK* genu (Shields et al. 2010; Thanabalasingham and Owen 2011). Posle *GCK* i *HNF1A* gena, varijante u *HNF4A* i *HNF1B* genima su odgovorne za nastanak dijabetesa u 10-15% MODY slučajeva. Preostali geni predstavljaju veoma retke uzročnike MODY dijabetesa, i obuhvataju pojedinačno manje od 1% svih MODY pacijenata. Za neke od njih se postavlja pitanje da li zaista predstavljaju MODY gene budući da su varijante inicijalno opisane kao odgovorne za nastanak MODY dijabetesa pronađene i kod normoglikemičnih nosilaca (Bonfond et al. 2013), ili je pak pokazano da su češće uzrok drugih oblika dijabetesa (Valkovicova et al. 2019).

Tabela 2. *MODY* geni najčešće odgovorni za nastanak *MODY* dijabetesa u različitim Evropskim populacijama

	<i>HNF1A</i>	<i>GCK</i>	<i>HNF4A</i>	<i>HNF1B</i>	Ref.
Velika Britanija	52%	32%	10%	6%	(Shields et al. 2010)
Norveška	45%	30%	9%	4%	(Søvika et al. 2013)
Danska	36%	10%	3%	NA	(Johansen et al. 2005)
Holandija	17%	15%	6%	NA	(Weinreich et al. 2015)
Nemačka i Austrija	31%	62%	4%	NA	(Schober et al. 2009)
Republika Češka	11,5%	31%	5%	NA	(Pruhova et al. 2003)
Italija	16%	53%	5%	3%	(Delvecchio et al. 2014)
Grčka	12%	54%	NA	NA	(Tatsi et al. 2013)
Poljska	9%*	83%	9%*	0,1%	(Fendler et al. 2012)
Španija	8%	80%	0%	1%	(Estalella et al. 2007a)

*Napomena: varijante u HNF1A i HNF4A genima su prikazane objedinjeno u studiji, NA-nije vršena analiza gena u datoj studiji*

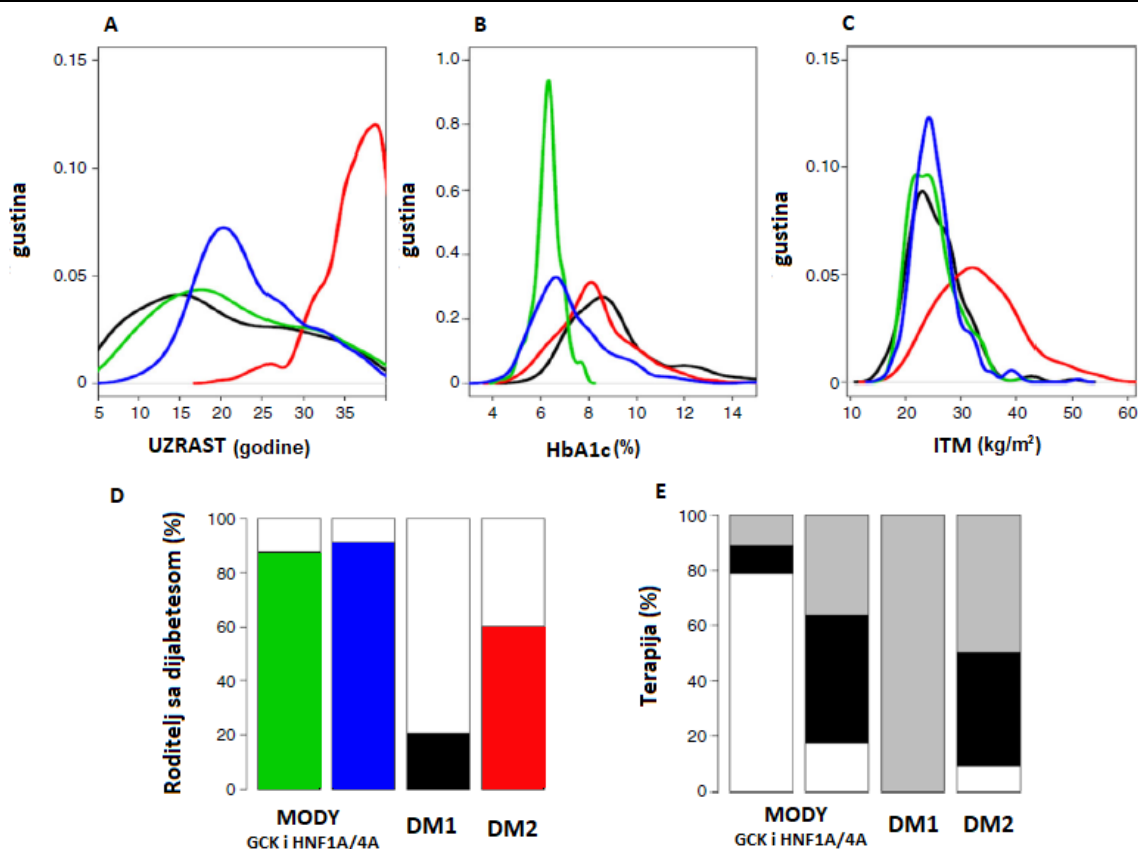
---

## 1.2. Kratak istorijski osvrt na MODY dijabetes

MODY dijabetes prvi put je opisan 1964. godine na Petom internacionalnom kongresu dijabetološke federacije (*Fifth Congress of the International Diabetes Federation*) u Torontu. Dijabetes se u to vreme delio na „juvenilni dijabetes“, koji se javljao u mladom dobu i zahtevao lečenje insulinom, i „dijabetes starijih“, koji se javljao kod odraslih starijih osoba i zahtevao lečenje insulinom tek nakon nekoliko godina. Dijabetes koji se javljao u mladom dobu i bio prisutan kod više članova jedne familije, a ispoljavao karakteristike insulin nezavisnog dijabetesa odraslih predstavljao je dijabetes adultnog tipa kod mladih (Fajans and Bell 2011). Nekoliko godina kasnije pokazano je da se opisani dijabetes nasleđuje na autozomno dominantan način, a u radu koji su objavili Stefan Fajans (*Stefan Fajans*) i Robert Tattersal (*Robert Tattersal*) 1974. godine, u kojem je prvi put upotrebljen termin MODY, ukazano je i na postojanje heterogene genetičke osnove ovog tipa dijabetesa (Fajans and Bell 2011; Tattersall 1974). Devedestetih godina dvadesetog veka dovedeni su u vezu sa MODY dijabetesom i prvi geni *HNF4A*, *GCK*, *HNF1A*, *IPF1 (PDX1)* i *HNF1B* prema kojima su nazvani prvi MODY podtipovi redom prema redosledu otkrića MODY1, MODY2, MODY3, MODY4 i MODY5 (Fajans and Bell 2011). Do 2015. godine, najviše zaslugom napretka savremene tehnologije (NGS), dovedeno je još devet gena u vezu sa nastankom dijabetesa koji se odlikuje autozomno dominantnim nasleđivanjem i nastankom u ranom dobu, označeni redom kao MODY6-MODY14 (Tabela 1). Kako se od otkrića prvih MODY gena broj gena povećavao i kako je postalo jasno da MODY dijabetes više nije jedan entitet, već obuhvata različite podtipove koji se razlikuju prema kliničkim odlikama i terapiji što zavisi od gena uzročnika, ukazala se potreba za označavanjem MODY podtipova prema genetičkoj etiologiju, npr. GCK-MODY umesto MODY2 (Murphy et al. 2008).

## 1.3. Kliničke karakteristike MODY pacijenata i sličnost sa drugim oblicima dijabetesa

Sa kliničkog aspekta, glavne odlike MODY dijabetesa su nastanak dijabetesa u mladom dobu, obično pre 25. godine života, očuvana endogena produkcija insulina (nije potrebna primena insulina bar 5 godina nakon postavljanja dijagnoze) i prisustvo dijabetesa u porodici (postojanje dijabetesa kod dva ili 3 člana u porodici), zatim i odsustvo gojaznosti i dijabetesne ketoacidoze (Aarthy et al. 2020; Fajans and Bell 2011; Urbanová et al. 2018). Međutim, ovi kriterijumi za prepoznavanje MODY dijabetesa, nisu dovoljno specifični, te je MODY dijabetes vrlo često pogrešno dijagnostikovao kao jedan od dva najčešća tipa dijabetesa, DM1 ili DM2 (Hattersley and Patel 2017; Naylor and Philipson 2011; Shields et al. 2010). Prema studiji sprovedenoj u Velikoj Britaniji procenjeno je da više od 80% MODY pacijenata nema ispravnu dijagnozu, već se vodi sa dijagnozom jednog od dva najčešća tipa dijabetesa (Shields et al. 2010). U populacionoj studiji sprovedenoj u SAD-u koja je za cilj imala da proceni učestalost MODY dijabetesa u pedijatrijskoj populaciji sa dijabetesom, među MODY potvrđenim pacijentima, 36% je inicijalno imalo dijagnozu DM1, odnosno 51% DM2. Samo 6% pacijenata je na kliničkom nivou imalo ispravno postavljenu dijagnozu MODY dijabetesa (Pihoker et al. 2013). Odsustvo jedinstvenog kliničkog kriterijuma i postojanje preklapajućih kliničkih karakteristika sa drugim oblicima dijabetesa su glavni razlozi zašto se MODY dijabetes teško prepoznaje (Slika 1) (Hattersley and Patel 2017).



Slika 1. Kliničke karakteristike MODY dijabetesa koje se preklapaju sa DM1 i DM2 prikazani graficima gustine (A, B i C) i preko histograma (D i E). A) uzrast pri kojoj nastaje dijabetes; B) vrednosti HbA1c; C) ITM (indeks telesne mase); D) Procenat roditelja sa dijabetesom; E) Terapija koja se koristi za lečenje odgovarajućeg tipa dijabetesa (Bela boja - dijeta; siva boja - oralni hipoglikemijski lekovi (OHA) i crna - insulin). DM1 - crna linija, DM2 - crvena linija, zelena i plava linija, predstavljaju dva najučestalija MODY podtipa (GCK-MODY zelena linija, HNF1A/HNF4A plava linija). Preuzeto i modifikovano iz (Hattersley and Patel 2017).

Uzrast pri kome se dijagnostikuje MODY najčešće je adolescentno doba, međutim tada se takođe može razviti i DM1. Jedan od pouzdanih parametara za razlikovanje ova dva tipa dijabetesa su pankreasni antigeni GAD (eng. *Glutamic Acid Decarboxylase*) i/ili IA-2 (eng. *Insulinoma Antigen-2*). Iako je prisustvo ovih antigena specifično za DM1, pozitivan rezultat se može naći kod oko 80% pacijenta sa DM1. Sa druge strane, iako se MODY dijabetes odlikuje odsustvom istih, prema rezultatima jedne studije kod veoma malog procenta (<1%) MODY potvrđenih pacijenta su detektovana GAD antitela (McDonald et al. 2011). Dodatno, sa trajanjem dijabetesa, titar antitela može da se smanji te da negativan rezultat kod DM1 pacijenata (Misra and Owen 2018). Endogena produkcija insulina je očuvana kod MODY dijabetesa, ali nije kod DM1, što se utvrđuje određivanjem vrednosti C-peptida (Anik, Catli, Abaci, & Bober, 2015; Owen, 2013). Međutim pri ranoj dijagnozi DM1, vrednosti C-peptida mogu da budu merljive i iznad vrednosti praga za DM1, te u tom slučaju ne može da se diskriminiše DM1 (S. Misra & Owen, 2018). Bitan pokazatelj je prisustvo dijabetesa u porodici (nasledne osnove), zbog prirode nasleđivanja MODY dijabetesa. Međutim, ova informacija često nije poznata, a dodatna otežavajuća okolnost je što promene u MODY genima mogu da nastanu i spontano, *de novo* (Shields and Colclough 2017). Kod pacijenata sa DM1 nasleđivanje nije upobičajeno i prisutno je kod svega 2-4% pacijenata (Naylor and Philipson 2011). Sa druge strane ako je hiperglikemija detektovana kasnije u odrasloj dobi, može da navede na DM2 dijabetes. U ovom slučaju ispitivanje nasledne osnove nije

od velikog značaja s obzirom na to da je porodična istorija karakteristika i DM2 i MODY dijabetesa. MODY dijabetes se odlikuje odsustvom simptoma metaboličkog sindroma (gojaznost i insulinska rezistencija) koji su specifični za DM2 (Naylor and Philipson 2011). Gojaznost je retka kod MODY pacijenata, međutim budući da je gojaznost sveprisutnija među decom i adolescentima, češće se javlja i kod MODY pacijenata kao nezavisan faktor (Anik et al. 2015). Sličnosti i razlike MODY, DM1 i DM2 dijabetesa su prikazane u tabeli 3.

Tabela 3. *Kliničke karakteristike MODY dijabetesa, DM1 i DM2 kod dece i adolescenata*

<b>Kliničke karakteristike</b>	<b>MODY</b>	<b>DM1</b>	<b>DM2</b>
Dijagnoza dijabetesa (u godinama)	< 25	5 - 20	> 10
Istorija dijabetesa u porodici (%)	60-95	<10	90
Tip nasleđivanja	AD	Poligeno	Poligeno
Gojaznost	Uobičajena za opštu populaciju	Retko	Učestalo
Insulinska rezistencija/metabolički sindrom/acanthosis nigricans (zastupljenost kod pacienata)	Retko	Retko	Učestalo
Poliurija/Polidipsija (zastupljenost kod pacienata)	Varijabilno	Učestalo	Retko
Dijabetična ketoacidoza (zastupljenost kod pacienata)	Retko	Učestalo	Retko
Pacijenti sa GAD i IA-2 antigenima (%)	< 1	87 - 94	11 - 30
Vrednosti C-peptida	Normalne	Veoma niske ili nedetektabilne	Visoke ili normalne
Vrednosti hsCRP	Normalne kod MODY2 i MODY1, niske kod MODY3	Normalne	Često veoma visoke

*DM1- dijabetes tip 1; DM2 - dijabetes tip 2; AD - autozomno dominantno. Preuzeto i modifikovano iz (Anik et al. 2015; Owen 2013).*

#### **1.4. Dijagnoza MODY dijabetesa i značaj genetičke potvrde dijagnoze**

Uzimajući u obzir sve pomenute odlike MODY dijabetesa i negenetičke parametre (biomarkere) za bolje prepoznavanje, na kliničkom nivou može da se postavi dijagnoza MODY dijabetesa. Međutim bez potvrde genetičkom analizom ne može se sa sigurnošću tvrditi da je zaista u pitanju MODY dijabetes (Aarthy et al. 2020). Postoje različite strategije za sprovođenje genetičke analize, od analize jednog suspektog gena, preko grupe MODY gena i na kraju primenom sekvenciranja nove generacije (NGS) koja omogućuje istovremenu analizu svih gena uzročnika (Ellard et al. 2008; Ellard et al. 2013). Odabir metode pre svega zavisi od finansijskog faktora, a poslednja metoda, NGS, i dalje ima visoku cenu (Lachance 2016). Međutim, s obzirom na to da se pomoću nje u relativno kratkom vremenskom

periodu analiziraju svi suspektni geni, ova metoda se sve češće primenjuje, što potvrđuju i brojni radovi na ovu temu (de Santana and Caetano 2019; Özdemir et al. 2018; Tatsi et al. 2020). Genetičke analize koje obuhvataju analize pojedinačnog gena ili grupu gena, podrazumevaju da se na kliničkom nivou odredi genetička etiologija MODY dijabetesa. Iako je to za najčešće podtipove donekle moguće ako se sprovedu šire laboratorijske analize, lako može doći do lažno negativnog rezultata usled odabira pogrešnog gena za analizu (Gao et al. 2014; Hattersley and Patel 2017).

Pacijenti koji nisu prepoznati kao MODY pacijenti često slede planove za praćenje glikemijske kontrole specifične za DM1 i DM2, uključujući i egzogeni insulin (Shields et al. 2010; Thanabalasingham and Owen 2011). Postoje značajni negativni uticaji na kvalitet života koji su direktno vezani za primenu insulina, a posebno sa psihosocijalnog stanovišta. Pojedinci kojima je propisano lečenje insulinom izražavaju brojne zabrinutosti i strahove, koji su u vezi sa samoprimenom terapije ili konstantnim praćenjem stanja (zbog rizika od hipoglikemije), opštim zdravstvenim stanjem, i ometenim brojnim normalnim i društvenim aktivnostima (neophodna je stalna kontrola unosa hrane i pića, ograničenja u sportu, zavisnost od drugih ljudi, itd.) (Szopa et al. 2019). Ove posledice se mogu izbeći sprovođenjem genetičkog testa i postavljanjem prave dijagnoze (Shields et al. 2010; Thanabalasingham and Owen 2011).

Prepoznavanje MODY pacijenta i dobijanja genetičke potvrde je od ključnog značaja za ove pacijente imajući u vidu da su terapija i klinički tok zavisni od genetičke etiologije MODY dijabetesa. Za potvrđene MODY pacijente to uglavnom znači promenu trenutne terapije u smeru njenog ukidanja ili uvođenja medikamentozne umesto injekcione terapije (egzogeni insulin) što se u oba slučaja odražava na poboljšanje kvaliteta života pacijenata (Hattersley and Greeley 2018; Szopa et al. 2019; Urbanová et al. 2018). Pacijenti kod kojih se utvrdi genska varijanta u *GCK* genu ne zahtevaju terapiju, osim u trudnoći kada je potrebna kako bi se sprečile potencijalne komplikacije rasta ploda (Dickens et al. 2019). Budući da je glikemija kod ovih pacijenata stabilna i blaga tokom celog života, ovi pacijenti ne zahtevaju posebno praćenje (Carmody et al. 2016; Gardner and Tai 2012). U slučaju da je dijabetes uzrokovan genskim varijantama u genima *HNF1A* i *HNF4A*, niske doze sulfoniluree omogućuju bolju regulaciju glikemije kod pacijenata u odnosu na insulinску terapiju. Dodatno, kod ovih pacijenata može da se predvidi dalji klinički tok, jer se zna da je progresivno propadanje  $\beta$ -ćelija pankreasa, i pojava mikro- i makrovaskularnih komplikacija specifična za ovaj podtip (Bacon et al. 2016; Pearson et al. 2003; Shepherd et al. 2009).

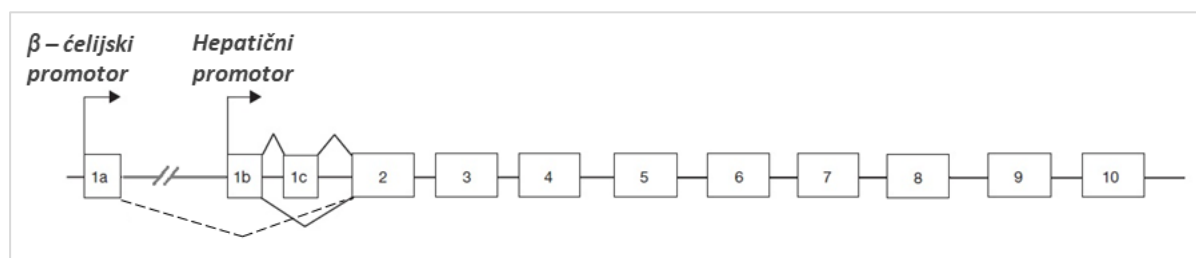
Molekularna potvrda MODY dijabetesa može da ukaže na sprovođenje dodatnih ispitivanja kako bi se uočile abnormalnosti na drugim organima, npr. abnormalnosti pankreasa ili urogenitalnog sistema koje se mogu javiti kod nosilaca genskih varijanti u *HNF1B* genu, ili egzokrinog pankreasa kod nosilaca varijanti u *CEL* genu (Anik et al. 2015).

Za članove porodice pancijenata sa genetički potvrđenim MODY dijabetesom, takva informacija je od značaja, budući da je verovatnoća nasleđivanja MODY dijabetesa 50%. S toga, ostali članovi porodice koji pokazuju simptome dijabetesa mogu da se testiraju i dobiju dijagnozu bolesti. Za asimptomatske članove, pozitivan genetički test bi im omogućio da se ranije obrate lekarima kako bi predupredili moguće komplikacije i preduzeli preventivne mere (Hattersley and Greeley 2018).

## 1.5. Geni uzročnici MODY dijabetesa

### 1.5.1. Gen *GCK* i GCK-MODY

Gen *GCK* se nalazi na hromozomu 7 u regionu 7p13 i ekspirira enzim glukokinazu. Gen *GCK* sadrži 12 egzona i dva alternativna promotora, udaljena 30kb jedan od drugog, sa kojih se vrši tkivno-specifična ekspresija glukokinaze. Sa uzlaznog ili neuroendokrinog promotora vrši se ekspresija glukokinaze u  $\beta$ -ćelijama pankreasa, neuroendokrinim ćelijama i nekim enteroendokrinim ćelijama (intestinalne K- i L-ćelije). Sa nishodnog ili hepatičnog promotora vrši se ekspresija glukokinaze isključivo u hepatocitima (ćelijama jetre). Glukokinaze, ekspimirane u ovim ćelijama, se razlikuju po svom N-terminalnom domenu, tj. prvih 13-15 aminokiselina, dok je ostatak proteinske sekvence identičan, što je posledica uključivanja alterativnog egzona 1, koji se nalazi u blizini odgovarajućeg alternativnog promotora (Slika 2). Glukokinaza, u zavisnosti od N-terminalnog domena, je produkt veličine 464-466 aminokiselina. Pankreasna glukokinaza sadrži 465 aminokiselina (Iynedjian 2009).



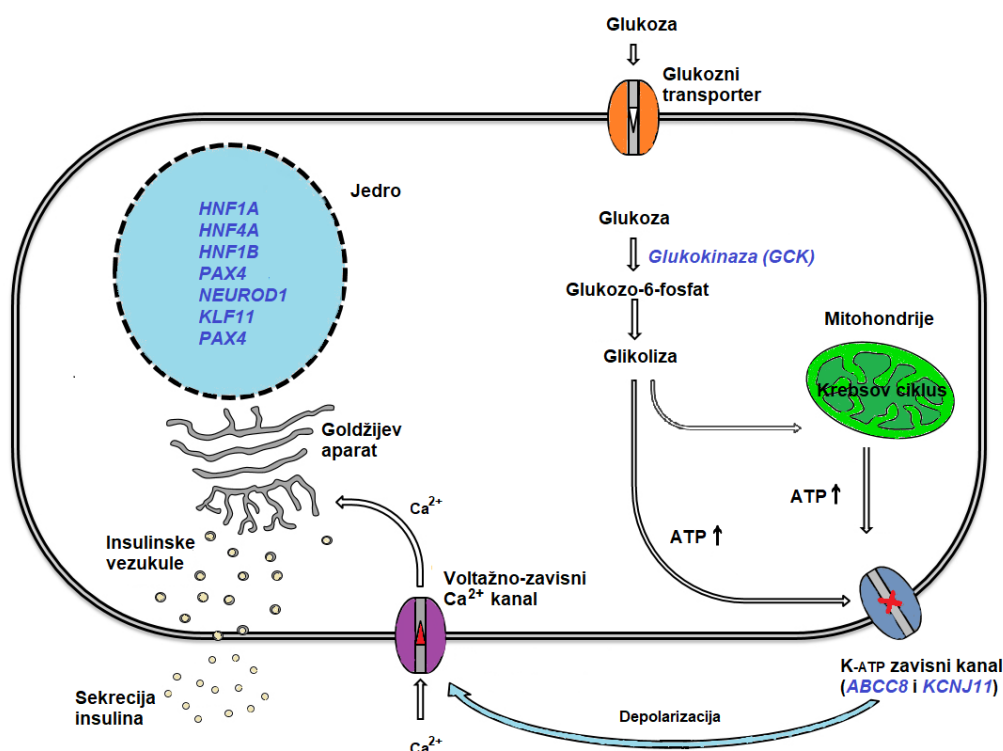
Slika 2. Ilustrovani prikaz gena *GCK*. Alternativnim splajsovanjem dobijaju se tri transkripcione varijante koje se razlikuju u prvom egzonu, dok su im egzoni 2-10 zajednički. Transkripciona varijanta 1 sadrži egzon 1a specifičan za pankreasnu izoformu glukokinaze. Transkripciona varijanta 2 sadrži egzon 1b, a transkripciona varijanta 3, sadrži dodatni egzon 1c koji ne sadrži transkripciona varijanta 2. Transkripcione varijante 2 i 3 se ekspimiraju isključivo u ćelijama jetre. Preuzeto i modifikovano iz (Gloyn 2003).

Glukokinaza (heksokinaza IV ili Heksokinaza D) je monomerni enzim koji pripada familiji heksokinaza. Katalizuje reakciju fosforilacije glukoze u glukozo-6-fosfat (G6P) uz pomoć ATP-a. U fiziološkim uslovima glavni substrat ovog enzima je glukoza, zbog čega je naziv glukokinaza opšteprihvaćen, pre nego heksokinaza IV ili heksokinaza D. Glukokinaza je ključni regulatorni enzim  $\beta$ -ćelija pankreasa i katalizuje prvu reakciju glikolitičkog puta, konverziju glukoze u G6P, što je istovremeno i ograničavajuća reakcija stope metabolizma glukoze. Ima presudnu ulogu u regulaciji sekrecije insulina, zbog čega predstavlja svojevrzni senzor za glukozu u  $\beta$ -ćelijama. Ulogu senzora duguje svojim specifičnim kinetičkim osobinama koje joj omogućuju da u fiziološkom opsegu koncentracije glukoze (4-15mmol/l) prilagođava sekreciju insulina stopi fosforilacije glukoze u G6P koja je direktno zavisna od koncentraciji glukoze. Kinetičke osobine koje joj to omogućuju su nizak afinitet enzima za glukozu ( $S_{0.5}$  7-9 mmol/l), kooperativnost sa glukozom (Hilov koeficijent 1.7) i odsustvo inhibicije sopstvenim produktom reakcije G6P-om (Iynedjian 2009; McDonald and Ellard 2013; Osbak et al. 2009).

Glukokinaza se ekspirira u  $\beta$ -ćelijama, hepatocitima, ćelijama nervnog sistema koje su osetljive na glukozu (primarno u hipotalamusu) i određenim ćelijama crevnog sistema (L- i

K-tip enterocita), međutim njena uloga u  $\beta$ -ćelijama pankreasa je ključna za regulaciju glukozne homeostaze. U  $\beta$ -ćelijama reguliše sekreciju insulina, dok u ćelijama jetre primarno učestvuje u skladištenju glukoze u obliku glikogena (glikogenezi). Naime, studije na animalnim modelima su pokazale da odsustvo ekspresije pankreasne glukokinaze rezultuje teškom hiperglikemijom koja dovodi do smrti. U slučaju odsustva ekspresije hepatične glukokinaze, javlja se blaži oblik hiperglikemije, ali izraženiji poremećaj u sintezi glikogena u hepatocitima (Osbak et al. 2009).

Glukozom stimulisana sekrecija insulina, *GSIS* (eng. *glucose stimulated insulin secretion*, *GSIS*) je osnovni mehanizam sekrecije insulina specifičan za  $\beta$ -ćelije pankreasa, u kojem glukokinaza ima ključnu ulogu. Delujući kao glukozni senzor, glukokinaza direktno „oseća“ promene koncentracije glukoze u krvi prema kojima proporcionalno stimuliše sekreciju insulina. U fiziološkim uslovima, prag pri kojem se stimuliše *GSIS* iznosi 5mmol/l, i on je rezultat precizno regulisane interakcije procesa ulaska glukoze, njenog metabolizma i na kraju same sekrecije insulina (Slika 3). Ulaskom glukoze u ćeliju vrši se njena fosforilacija u G6P glukokinazom i započinje proces katabolizma glukoze koji povećava količinu ATP-a u ćeliji. Na račun povećane koncentracije ATP-a zatvaraju se  $K_{ATP}$ -zavisni kanali i dolazi do depolarizacije membrane što je signal za otvaranje voltažno-zavisnih kanala za kalcijum. Influx kalcijuma, tj. povećanje intracelularne koncentracije kalcijuma stimuliše egzocitozu insulinskih granula i sekreciju insulina. U ovom putu glukokinaza ima ključnu ulogu, te bilo kakve promene koje dovode do narušavanja njene aktivnosti direktno utiču na glukozni prag za *GSIS* (Matschinsky FM 2004; McDonald and Ellard 2013).



Slika 3. Ilustracija pankreasne  $\beta$ -ćelije i osnovnih koraka glukozom stimulusane sekrecije insulina (eng. *GSIS*). Sa porastom koncentracije glukoze u krvi, iznad bazalnog nivoa ( $\sim 5\text{mmol/l}$ ), glukoza se transportuje u  $\beta$ -ćeliju preko glukoznog transportera. Ulaskom glukoze u ćeliju glukokinaza vrši fosforilaciju glukoze u glukozo-6-fosfat. U procesima glikolize kao i u Krebsovom ciklusu i oksidativnoj fosforilaciji produkuje se ATP, a povećanje koncentracije ATP-a dovodi do zatvaranja kalijumovih ATP-zavisnih kanala i depolarizacije ćelijske membrane. Depolarizovana membrana je signal za otvaranje voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala usled čega se javlja influx kalcijumovih jona. Povećanje intracelularne koncentracije kalcijuma



---

stimuliše egzocitozu insulinskih vezikula i sekreciju insulina. Inaktivirajuće genske varijante u *GCK* genu dovode do smanjenja glukokinazne aktivnosti i smanjenja stope fosforilacije što rezultuje blagom hiperglikemijom i povećanim glukoznim pragom za sekreciju insulina (sa 5mmol/l na 7 mmol/l). Preuzeto i modifikovano iz (Heuvel-Borsboom et al. 2016).

U prilog ključnoj ulozi glukokinaze u regulaciji sekrecije insulina govore brojne genske varijante identifikovane u *GCK* genu koje dovode do nastanka hipo- i hiperglikemije. U *GCK* genu je identifikovano preko 600 različitih varijanti (Osbak et al. 2009). Genske varijante tipa *missense*, *nonsense*, *frameshift* i *splice site* su prijavljene u svim egzonomima *GCK* gena bez primećenog postojanja „*hot spot*“ mesta. Najveći broj varijanti su tipa *missense*, dok su delecije u *GCK* genu, bilo parcijalne ili delecija celog gena, veoma retke (Ellard et al. 2007). Ove varijante su odgovorne za nastanak tri različita fenotipa. Naime, heterozigotne inaktivirajuće varijante dovode do smanjenja afiniteta glukokinaze za substratom, glukozom, što dovodi do pomeranje praga za *GSIS* ka višim vrednostima (sa 5 mmol/l na 7 mmol/l). Suprotno, heterozigotne aktivirajuće varijante dovode do povećanja afiniteta glukokinaze za supstratom i pomeranja praga *GSIS*-a ka malim vrednostima (na oko 1.5mmol/l). Posledica druge pojave je stimulirana sekrecija insulina koja dovodi do hipoglikemije i nastanka hiperinsulinemične hipoglikemije. U slučaju inaktivacije oba alela, usled homozigotnih inaktivirajućih ili dvosrukkih heterozigotnih varijanti, javlja se deficijencija glukokinaze usled koje nastaje permanentni neonatalni dijabetes (PNDM). Genske varijante tipa *nonsense*, *splice-site* i *frameshift* dovode do skraćivanja proteina ili narušavanja funkcije enzima. Takve heterozigotne varijante dovode do haploinsuficijencije glukokinaze i povećanih vrednosti glukoze u krvi (Matschinsky FM 2004). U promotorskom regionu *GCK* gena, koji obuhvata region od oko 300bp u odnosu na start transkripcije, identifikovana je samo jedna varijanta asocirana sa GCK-MODY dijabetesom (Bae et al. 2010; Gasperikova et al. 2009).

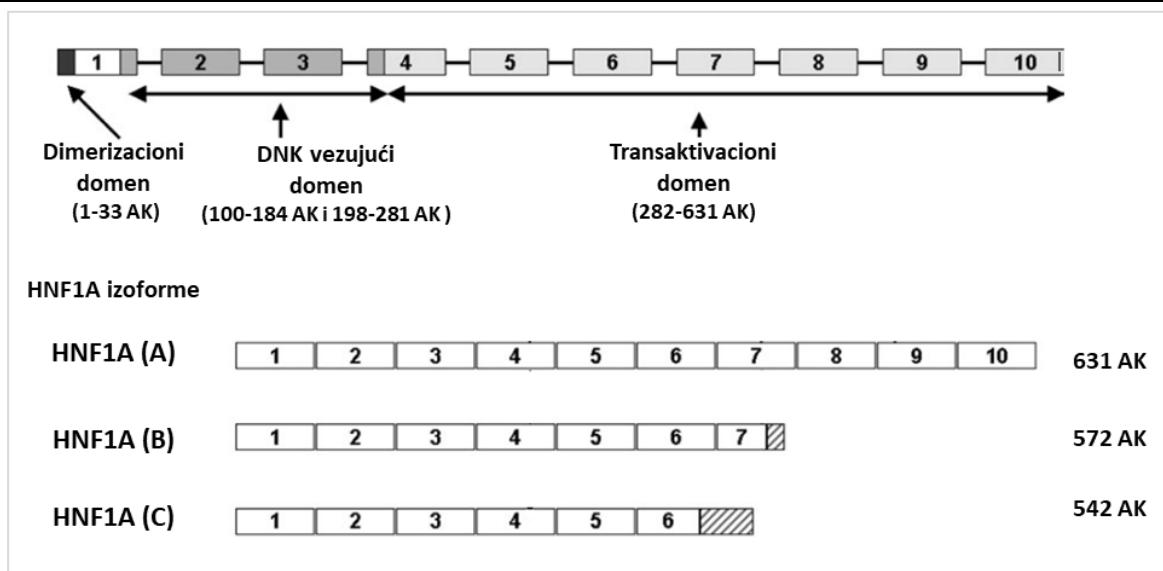
GCK-MODY, ranije poznat kao MODY2 nastaje kao posledica heterozigotnih inaktivirajućih varijanti u *GCK* genu. Fenotip ovog MODY podtipa je veoma homogen uprkos velikom broju genskih varijanti koje različito utiču na aktivnost enzima, što se može pripisati kompenzacionoj regulaciji drugog *wild-type* alela (Matschinsky FM 2004; Sreenan et al. 1998). GCK-MODY se razlikuje od ostalih MODY podtipova. Odlikuje se asimptomatskom, blagom i stabilnom hiperglikemijom koja je prisutna od rođenja. Kod ovih pacijenata regulacija sekrecije insulina je u potpunosti očuvana, ali se dešava pri višim vrednostima glukoze. Vrednosti glukoze kod MODY 2 pacijenta se kreću od 5.5 mmol/l do 8 mmol/l, što odgovara vrednostim pomerenog praga pri kojem se stimuliše sekrecija insulina (Carmody et al. 2016; Matschinsky FM 2004; Misra and Owen 2018). Budući da je asimptomatska i neprogresivna tokom života, hiperglikemija često ostaje neotkrivena, sve dok se slučajno ne otkrije tokom rutinskih ispitivanja. Značajno je da GCK-MODY pacijenti zadržavaju dobru homeostatsku kontrolu nad glukozom u krvi, što dokazuje i mali porast nivoa glukoze (< 3mmol) u 120. minutu oralnog testa tolerancije na glukozu (OGTT). Ovo, u kombinaciji sa neprogresivnom prirodom hiperglikemije, čini mikro- i makrovaskularne komplikacije veoma retkim kod ovih pacijenata (McDonald and Ellard 2013). GCK-MODY pacijenti ne zahtevaju lečenje. Opšti je stav da pri zdravim životnim navikama terapija kod GCK-MODY dijabetesa nije potrebna (Gardner and Tai 2012; Lachance 2016). Upotreba oralnih hipoglikemika ili insulina je neefikasna u smanjenju glikozikovanog hemoglobina (HbA1c) (vrednosti kod MODY2 pacijenata se kreću od 5,6% do 7,6%), jer egzogeni insulina u malim dozama dovodi do kompenzacijskog smanjenja endogene sekrecije insulina, što znači da glukoza kao i vrednosti HbA1c ostaju nepromenjeni (Stride et al. 2014).

Poseban slučaj po pitanju terapije predstavljaju trudnice. U zavisnosti kakav je genetički status majke i fetusa, određuje se da li je potrebno tokom trudnoće uvesti insulinsku terapiju kako bi se sprečila makrozomija (velika porođajna težina bebe) (Carmody et al. 2016; Dickens et al. 2019). Ukoliko fetus nasledi promenu od majke imaće isti pomeraj glukoznog praga kao i majka i neće reagovati na hiperglikemiju majke, te će rast fetusa biti normalan. Međutim, ukoliko fetus ima normalan genotip, a majka je nosilac promene u genu *GCK*, fetus će proizvoditi veće količine insulina u odgovoru na hiperglikemiju majke što će dovesti do rasta fetusa i makrozomije (Misra and Hattersley 2016; Murphy 2015). U ovom slučaju preporučeno je uvođenje insulinske terapije kako bi se sprečio nastanak fetalne makrozomije kao i drugih komplikacija tokom trudnoće (Dickens et al. 2019). Ukoliko fetus nasledi genetičku promenu od oca, porođajna težina biće manja u odnosu na prosečnu porođajnu težinu fetusa kod normalnog genotipa majke i deteta usled smanjene sekrecije insulina i insulin-posredovanog rasta fetusa (Barrio et al. 2002; Hattersley et al. 1998).

### 1.5.2. Gen *HNF1A* i *HNF1A-MODY*

Gen za hepatocitni nuklearni faktor 1 A (*HNF1A*, drugi naziv *TCF1*) se nalazi na hromozomu 12, u regionu 12q24. Gen *HNF1A* sadrži 10 egzona čijim se alternativnim splajsovanjem i poliadenilacijom dobija više transkripata koji daju različite izoforme (Harries et al. 2006). Prema Uniprot bazi, izoforma A je najduža i sadrži 631 aminokiselinu, a izoforme B, sa 572 aminokiseline, i C, sa 524 aminokiseline, predstavljaju skraćene verzije (Slika 4). Sve tri izoforme se ekspimiraju u pankreasu, jetri i bubrezima, s tim što se ekspresioni profil izoformi razlikuje ne samo prema tkivu već i prema stadijumu razvića pankreasa. Izoforma A je dominantna u jetri, bubrezima i fetalnom pankreasu, dok su izoforme B i C dominantne u adultnom pankreasu. Sve tri izoforme su aktivne, s tim da su izoforme B i C pet puta aktivnije od izoforme A (Harries et al. 2006).

*HNF1A* je tkivno-specifični transkripcioni faktor koji pripada porodici nukleusnih hepatocitnih faktora (HNF), tačnije *HNF1*, koji su prvobitno identifikovani u jetri, a kasnije i u drugim organima. *HNF1A* se sastoji iz tri proteinska domena: dimerizacionog, DNK vezujućeg i transaktivacionog (Slika 4). U vidu homodimera ili heterodimera sa *HNF1B*, *HNF1A* transkripcioni faktor se vezuje za DNK (Lau et al. 2018). Njegov DNK vezujući domen, koji se sastoji od dva POU (*Pit-1/Oct-1/Unc-86*) pod-domena, POU<sub>S</sub> i POU<sub>H</sub>, prepoznaje specifičnu palindromsku sekvencu 5'-GTTAATNATTAAC-3'. POU<sub>S</sub> pod-domen učestvuje u stabilizaciji proteina, a POU<sub>H</sub> ostvaruje direktnu interakciju sa DNK molekulom. Transaktivacioni domen putem protein-protein interakcija interaguje sa velikim brojem proteina, koji učestvuju u npr. stabilizaciji *HNF1A* homodimera, povećavanju DNK-vezujuću sposobnost *HNF1A* ili njegovu transkripcionu aktivnost (Valkovicova et al. 2019).



Slika 4. Ilustracija gena *HNF1A*, domena HNF1A proteina i 3 izoforme koje se dobijaju alterantivnim splajovanjem. Izoforma A je najduža i sadrži 10 egzona, izoforma B sadrži 7 egzona i izoforma C sadrži 6 egzona. Na nivou gena predstavljena su tri funkcionalna domena transkripcionog faktora HNF1A: dimerizacioni domen (aminokiseline od 1-33,) DNK vezujući domen (sastoji se iz dva dela: POU<sub>S</sub> koji čine aminokiseline 100-184 i POU<sub>H</sub> koji čine 198-281) i transaktivacioni domen (aminokiseline 282-631). Preuzeto i modifikovano iz (Harries et al. 2006).

HNF1A, poput svih članova HNF familije, eksprimira se rano tokom embrionalnog razvića i učestvuje u procesima razvića i diferencijacije pankreasa, jetre i bubrega. Koekspirimira se zajedno sa HNF4A, HNF1B i drugim članovima HNF familije (HNF3, HNF6) (Lau et al. 2018). Zajedno ovi faktori formiraju složenu transkripcionu mrežu koja reguliše ekspresiju brojnih target gena vezujući se za promotorska ili enhancerska mesta u okviru tih gena. Interkonekcija ovih transkripcionih faktora je pokazana na *HNF1A null* animalnim modelima (miševima) kod kojih se javlja smanjenje ekspresije HNF4A ili HNF3 (Valkovicova et al. 2019). Takođe, studije na animalnim modelima su pokazale da HNF1A nije presudan za diferencijaciju pankreasa, ali jeste za održavanje diferenciranosti ćelija pankreasnih ostrvaca (Haliyur et al. 2019; Harries et al. 2006; Lau et al. 2018).

HNF1A transkripcioni faktor reguliše veliki broj gena. U ćelijama jetre HNF1A se vezuje za najmanje 222 gena čiji produkti učestvuju u procesima metabolizma i skladištenja ugljenih hidrata, metabolizmu lipida (sinteza holesterola i apolipoproteina), detoksikaciji i sintezi proteina seruma (albumini, komplemeni i faktori koagulacije) (Odom et al. 2004; Valkovicova et al. 2019). U  $\beta$ -ćelijama pankreasa, HNF1A se vezuje za promotorske regione 106 gena, pri čemu se za 30% ovih gena HNF1A vezuje i u ćelijama jetre (Odom et al. 2004). Produkti ovih gena uključeni su u procese regulacije sinteze i sekrecije insulina i odgovora ćelije na povećanje koncentracije glukoze (Haliyur et al. 2019; Odom et al. 2004). Neki od gena regulisani sa HNF1A su gen za glukozni transporter GLUT2 (*SLC2A2*), gen za piruvat kinazu (*PKL*), gen za insulin (*INS*), *HNF4A* gen (gen uzročnik MODY1 dijabetesa) i *PDX1* gen (gen uzročnik MODY4 dijabetesa) (Yamagata 2003).

Heterozigotne varijante u genu *HNF1A* dovode do nastanka MODY3 dijabetesa, koji predstavlja jedan od dva najučestalija podtipa MODY dijabetesa. U studiji koja je obuhvatila više od 1200 porodica sa MODY dijabetesom, u genu *HNF1A* identifikovano je više od 400 različitih varijanti, pri čemu je većina varijanti pripadala pojedinačnim familijama. Više od 50% činile su *missense* varijante, zatim *frameshift* (~21%), *nonsense* (9.4%), *splice-site* varijante (8.7%), insercije i delecije (2.4%). Veoma mali procenat činile su parcijalne

delecije i delelije celog gena (1.2%). Varijante su pronađene u svim egzonima, pri čemu je najveći broj detektovan u egzonima dva i četiri, a najmanji u egzonima pet i deset (Colclough et al. 2013). U promotorskom regionu, koji obuhvata 300 nukleotida uzvodno od ATG mesta (c.-300-1), identifikovano je oko 15 varijanti (1.9%) (Colclough et al. 2013).

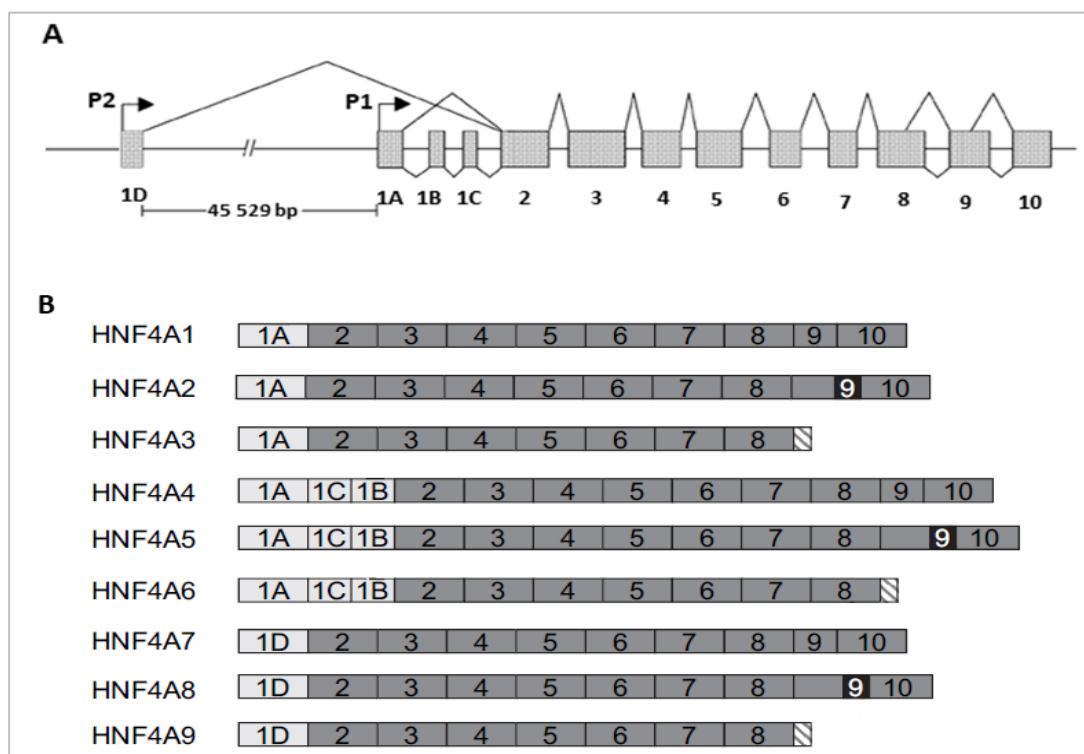
*In vitro* analize varijanti u *HNF1A* genu koje kosegregiraju sa MODY dijabetesom su pokazale da dijabetes nastaje kao posledica *HNF1A* haploinsuficijencije ili dominantno negativnog efekta varijante. Varijante u *HNF1A* genu mogu da dovodu do odsustva vezivanja ili oslabljenog vezivanja *HNF1A* transkripcionog faktora za DNK, kao i odsutne ili oslabljene transaktivacije target gena, ili do smanjene stabilnosti *HNF1A* (Bjørkhaug et al. 2003; Haliyur et al. 2019; Vaxillaire et al. 1999; Yamagata et al. 1998). Naime, smanjena sekrecija insulina, oslabljen odgovor ćelije na povećanje koncentracije glukoze, smanjena proliferacija  $\beta$ -ćelija, kao i abnormalna struktura pankreasnih ostrvaca nastaju kao posledica smanjene količine *HNF1A*. Oslabljen odgovor  $\beta$ -ćelije na povećanje koncentracije glukoze („glucose sensing“) je verovatno posledica narušene ekspresije gena koji učestvuju u metabolizmu glukoze i produkcije ATP-a. Niske koncentracije ATP narušavaju proces sekrecije insulina i vode ka nastanku *HNF1A*-MODY dijabetesa (Haliyur et al. 2019; Valkovicova et al. 2019).

Penetrabilnost genskih varijanti u genu *HNF1A* je visoka i do 25. godine života dijabetes će se razviti kod 60% nosilaca varijanti, a do 55. godine kod skoro svih (Lachance 2016). Pokazano je da genske varijante koje se javljaju u egzonima 1-6 su asocirane sa ranijim nastankom dijabetesa u odnosu na varijante u egzonima 8-10, čak za 12 godina (Bellanne-Chantelot et al. 2008). Priroda ovog dijabetesa je progresivna usled sve većeg propadanja  $\beta$ -ćelija i sve manje sekrecije insulina. Inicijalno nosioci genskih varijanti mogu da imaju normalne ili blizu normalne vrednosti glukoze, usled još uvek dovoljno očuvane endogene produkcije insulina. Vremenom, sve većim propadanjem  $\beta$ -ćelija razvije se hiperglikemija i dijabetes čije je lečenje nepohodno kako bi se, između ostalog, sprečile mikro- i makrovaskularne komplikacije (Gardner and Tai 2012). Nosioci genskih varijanti u genu *HNF1A* su osetljivi na niske doze sulfoniluree. Sulfonilurea se direktno vezuje za svoj receptor (SUR1) koji se nalazi u okviru  $K$ -ATP zavisnog kanala i stimuliše sekreciju insulina preko njega. Na ovaj način sulfonilurea zaobilazi sve prethodne korake metabolizma glukoze koji su narušeni usled smanjene funkcije *HNF1A* transkripcionog faktora (Murphy et al. 2008; Pearson et al. 2003). Prelazak sa insulina na sulfonilureu je uglavnom veoma uspešan kod ovih pacijenata, a glikemija je mnogo bolje regulisana sulfonilureom (Bacon et al. 2016; Bellanné-Chantelot et al. 2004; Szopa et al. 2019). Međutim, usled sve većeg propadanja  $\beta$ -ćelije pankreasa i smanjenja sekrecije insulina, pacijenti postaju neosetljivi na sulfonilureu, te je na kraju insulin neizbežan (Anik et al. 2015).

Osim u pankreasu, *HNF1A* ostvaruje svoju funkciju i u drugim organima. U bubrežima, gen *HNF1A* reguliše ekspresiju gena *SGLT-2* čiji je produkt natrijumov glukozni transporter u proksimalnim tubulama bubrega. Genske varijante u *HNF1A* dovode do smanjene ekspresije gena *SGLT-2* i smanjene reapsorpcije glukoze usled čega se javlja glukozourija, koja je kod *HNF1A*-MODY pacijenata prisutna i pre pojave hiperglikemije (Anik et al. 2015). Dodatno, *HNF1A*-MODY pacijenti se odlikuju povišenim vrednostima HDL (lipoprotein velike gustine, eng. *High-density lipoprotein, HDL*) holesterola u odnosu na pacijente sa DM2, kod kojih su ove vrednosti snižene (McDonald et al. 2012). Uprkos tome, kardiovaskularni rizik nije smanjen, jer je učestalost kardiovaskularnih komplikacija kod MODY3 dijabetesa leži između DM1 i DM2 i zavisi od kontrole glikemije (Misra and Hattersley 2016).

### 1.5.3. Gen *HNF4A* i HNF4A-MODY

Gen za hepatocitni nukleusni faktor 4 A (*HNF4A*) se nalazi na hromozomu 20, u regionu 20q13. Gen *HNF4A* sadrži 13 egzona, među kojima se nalaze četiri varijante egzona 1, i dva alternativna promotora P1 i P2 udaljena oko 45 kb jedan od drugog (Slika 5 A) (Thomas et al. 2001). Sa alternativnih promotora, u procesima alternativnog splajsovanja egzona i poliadenilacije, nastaje 9 izoformi proteina označenih sa HNF4A1-HNF4A9 (Slika 5 B). Izoforme HNF4A1-HNF4A6 se eksprimiraju sa promotora P1 u adultnoj jetri i bubrezima, a izoforme HNF4A7-HNF4A10 sa promotora P2 isključivo u pankreasu. U toku ranog fetalnog razvića pankreasa prisutne su i izoforme sa promotora P1 (Harries et al. 2008).



Slika 5. Ilustracija *HNF4A* gena i HNF4A izoformi. A) *HNF4A* gen sadrži dva promotora P1 i P2, 4 alternativna egzona 1 (označena kao 1D, 1A, 1C i 1B), i egzone 2-10. Pruzeto i modifikovano iz (Thomas et al. 2001). B) Različite HNF4A izoforme: Izoforme HNF4A2, HNF4A5 i HNF4A8 sadrže dodatnih 10 aminokiselina u egzonu 9 u odnosu na izoforme HNF4A1, HNF4A4 i HNF4A7. Izoforme HNF4A3, HNF4A6 i HNF4A9 imaju skraćeni intron 8 (označeno belim sa kosim crtama). Insercija aminokiselina u egzonu 9 kod izoformi HNF4A2, HNF4A5 i HNF4A8 je obeležena crnom bojom. Alternativni egzoni 1A, 1B, 1C i 1D su obeleženi svetlo sivom bojom. Preuzeto i modifikovano iz (Harries et al. 2008).

Hepatocitni transkripcioni faktor 4A, je nukleusni protein koji se kao homodimer vezuje za DNK. Veličine je 465 aminokiselina i sadrži pet funkcionalnih domena (DNK vezujući domen, dva transaktivaciona domena označena kao AF1 i AF1, domen za vezivanje liganda i represorni domen). Pripada familiji hepatičnih nukleusnih faktora (HNF) i zajedno sa HNF1A i ostalim članovima HNF familje proteina čini deo složene mreže faktora transkripcije koja je odgovorna za tkivno-specifičnu i vremenski zavisnu regulaciju ekspresije velikog broja gena tokom embriogeneze. Tokom embriogeneze, učestvuje u razviću jetre, pankreasa i bubrega, a u adultnom tkivu dominantno se eksprimira u jetri i bubrezima, dok je slabije eksprimiran u ćelijama pankreasa (Lau et al. 2018).

HNF4A reguliše ekspresiju velikog broja gena, mnogo veći nego što to čini HNF1A transkripcijski faktor (Odom et al. 2004). Direktno reguliše ekspresiju gena za transport glukoze (*GLUT2*) (Stoffel and Duncan 1997) i gena za insulin (*INS*) (Bartoov-Shifman et al. 2002). Jedan od targeta HNF4A transkripcijskog faktora je i sam gen *HNF1A*. Produkti ova dva gena formiraju specifičnu regulacionu petlju. HNF4A reguliše ekspresiju gena *HNF1A* u hepatocitima i pankreasnim ćelijama, dok HNF1A aktivira ekspresiju *HNF4A* preko P2 promotora u pankreasnim ćelijama (Lau et al. 2018; Thomas et al. 2002). U ćelijama jetre, HNF4A učestvuje u regulaciji gena čiji produkti učestvuju u procesima metabolizma glukoze, kao i metabolizmu holesterola, apolipoproteina i lipidnih transportera (Stoffel and Duncan 1997; Yin et al. 2011)

Heterozigotne varijante u promotoru P2 i kodirajućem regionu gena dovode do nastanka MODY1 dijabetesa. Više od 100 varijanti je identifikovano u genu *HNF4A*. Kao i u slučaju gena *HNF1A*, najdominantnije su *missense* varijante (~58%), a zatim *frameshift* (~11%), *nonsense* (~10%), *splice-site* varijante (~6%), insercije i delecije (~7%). Parcijalne delecije i delecije celog gena su retke (~2%). Genske varijante su detektovane u svim egzonima, pri čemu je u egzonima 7 i 8 zabeleženo najviše varijanti, a najmanje u egzonima 9 i 10. U promotorskom regionu, koji obuhvata 285 nukleotida uzvodno od ATG mesta (c.-285-1) identifikovano je manje od 10 varijanti (Colclough et al. 2013).

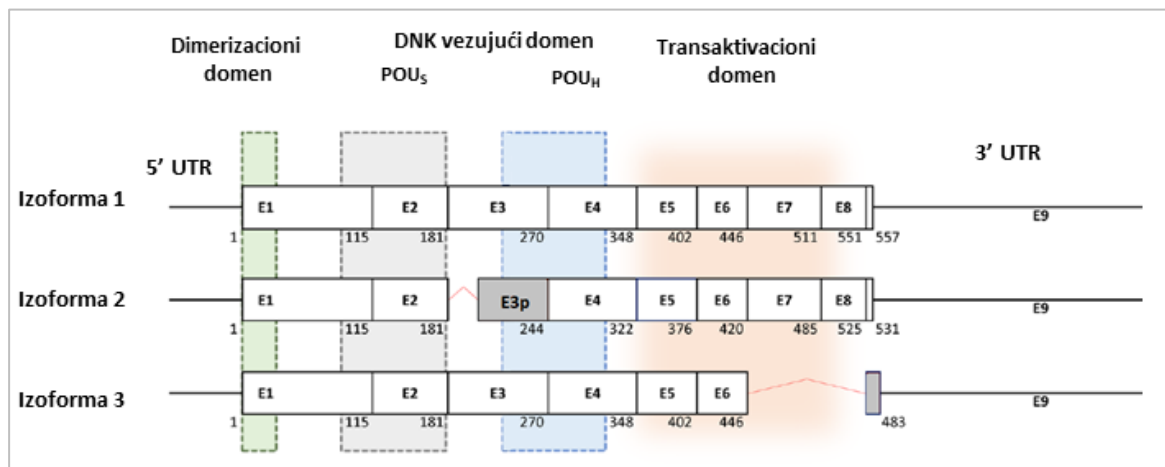
Fenotip HNF4A-MODY dijabetesa je sličan fenotipu HNF1A-MODY dijabetesa, i odlikuje se progresivnim propadanjem  $\beta$ -ćelija koja se manifestuje u nemogućnosti  $\beta$ -ćelija da na povećanje glukoze odgovore sekrecijom insulina (Lachance 2016). Kao i kod HNF1A-MODY dijabetesa, postoji korelacija između pozicije genske varijante u genu i vremena nastanka dijabetesa. Genske varijante prisutne u egzonima 2-8, koji su prisutne u svim izoformama, dovode do ranijeg nastanka dijabetesa u poređenju sa gentičkim varijantama u ostalim egzonima (Harries et al. 2008). Specifičnost HNF4A-MODY dijabetesa je dualna priroda glikemije odnosno prisustvo hipoglikemije u neonatalnom periodu koja je posledica povećane sekrecije insulina u neonatalnom periodu koja prelazi u hiperglikemiju kasnije u životu usled smanjene sekrecije insulina i rezultuje dijabetesom (Misra and Hattersley 2016). Kod roditelja koji su nosioci genske varijante u *HNF4A* genu, verovatnoća pojave makrozomije kod novorođenčeta je 56%, a hiperinsulinemične hipoglikemije je 15%, upravo zbog povećane sekrecije insulina *in utero* (Lachance 2016). Poput pacijenata sa HNF1A-MODY dijabetesom HNF4A-MODY pacijenti su takođe osetljivi na sulfonilureu, te uspešno reaguju na niske doze sulfoniluree (Misra and Hattersley 2016). Za razliku od HNF1A-MODY pacijenata, kod HNF4A-MODY pacijenti imaju snižene vrednosti HDL holesterola i lipoproteina A1 i A2, i povećane vrednosti LDL u odnosu opštu populaciju (Pearson et al. 2005).

#### 1.5.4. Gen *HNF1B* i HNF1B-MODY

Gen *HNF1B* se nalazi na hromozomu 17 u regionu 17q12. U procesima alternativnog splajsovanja formiraju se 3 transkripta koji daju tri izoforme proteina. Izoforma 1 je najduža i u njenom transkriptu se nalazi 9 egzona (Slika 6). Produkt gena je hepatocitni nukleusni faktor 1B koji se u vidu homodimera ili heterodimera sa HNF1A vezuje za DNK. HNF1A i HNF1B su članovi iste HNF1 familije transkripcijskih faktora i kao i HNF1A, HNF1B protein se sastoji iz tri domena: dimerizacionog, DNK vezujućeg i transkripcijskog domena (Hojny et al. 2020; Lau et al. 2018).

Transkripcijski faktor HNF1B se eksprimira veoma rano tokom embrionalnog razvića, pre HNF1A i HNF4A i važan je za diferencijaciju ćelija pankreasa kao i za najraniju morfogenezu

pankreasu. U adultnom tkivu, osim u bubrezima, jetri i pankresu, HNF1B se eksrpimira i u plućima, timusu, testisima i ovarijumima. Poput prethodna dva HNF faktora, deo je složene transkripcione mreže kojom se reguliše ekspresija brojnih gena koji učestvuju u održavanju pravilne funkcija ovih organa. Ključan je u organogenezi bubrega (Lau et al. 2018).



Slika 6. Ilustracija HNF1B izoformi. Izoforma 1 je najduža izoforma čiji transcript sadrži 9 egzona. Transkript izoforme 2 ima skraćeni egzon 3 (nedostaje region od 78bp na 5'-kraju). Transkript izoforme 3 nema egzone 7 i 8, a egzon 9 je usled alterantivnog spajsovanja drugačiji i završava se na alterantivnom stop kodonu 92bp nizvodno u odnosu na prethodna dva transkripta. Obojeni regioni (zeleno, plavo i crveno) označavaju domene proteina, a brojevi ispod belih pravougaonika (oznaka egzona) predstavljaju redne brojeve aminokiselina svake izoforme. Preuzeto i modifikovano iz (Hojny et al. 2020).

Genske promene u genu *HNF1B* obuhvataju nukleotidne zamene, manje delecije i insercije nukleotida, ali i parcijalne delecije i delecije celog gena (Bellanne-Chantelot et al. 2005; Edghill et al. 2008b). Ove promene u 50% slučajeva nastaju spontano, tako da nije prisutna porodična istorija bolesti (Edghill et al. 2006). Velike delecije su specifične za gen *HNF1B* jer se nalazi u regionu hromozoma 17 koji je podložan genomskim rearanžmanima i velikim delecijama koje nastaju nehomologom rekombinacijom (El-Khairi and Vallier 2016). Prema publikaciji iz 2015. godine, u genu *HNF1B* je identifikovano 106 različitih varijanti, od čega su 34% činile velike delecije, 31% *missense* varijante, 15% *frameshift* varijante, 11% *nonsense* i 8% *splice-site* varijante. Iako je najveći broj varijanti lokalizovan u prva četiri egzona, nije uočeno postojanje „hot spot“ mesta, već su varijante raspoređene po celom genu (Alvelos et al. 2015).

Heterozigotne varijante dovode do nastanka HNF1B-MODY dijabetesa. Nije pokazano da fenotip pacijenata zavisi od vrste promene u genu, te je fenotip pacijenata sličan bez obzira da li se radi o parcijalnoj ili deleciji celog gena ili promeni pojedinačnog nukleotida. Odsustvo ove korelacije ukazuje da se obolenje razvija kao posledica haploinsuficijencije HNF1B (Bellanné-Chantelot et al. 2004; Clissold et al. 2015). Penetrabilnost varijanti je varijabilna te pojava bolesti može da nastane rano u detinjstvu ili kasnije u adultnom dobu (Bingham and Hattersley 2004). Dijabetes kod HNF1B-MODY pacijenata nastaje usled poremećaja funkcije  $\beta$ -ćelija i smanjene sekrecije insulina koji su posledica hipoplazije pankreasa (El-Khairi and Vallier 2016).

Iako je gen *HNF1B* prvobitno asociran sa nastankom dijabetesa, vrlo brzo je pokazano da je glavno obeležje nosilaca genskih varijanti u *HNF1B* genu prisustvo cisti na bubrezima. Zbog istovremenog prisustva dijabetesa i cisti na bubrezima HNF1B-MODY dijabetes je

prepoznatljiv još i kao *RCAD* sindrom (*Renal Cysts and Diabetes Syndrome*). Studije na animalnim modelima su pokazale da su ciste posledica smanjene transkripcione aktivacije tzv. cističnih gena *PKHD1*, *PKD1* i *UMOD*, koji se nalaze pod direktnom kontrolom gena *HNF1B* (Bingham and Hattersley 2004; Clissold et al. 2015). Imajući u vidu da se *HNF1B* eksprimira u brojnim pomenutim tkivima, čije razviće reguliše tokom embriogeneze, genske promene u genu *HNF1B* dovode do multisistemskih poremećaja.

Pored pomenutih cisti, genske varijante u *HNF1B* genu mogu da dovedu do različitih strukturnih (hipoplazija bubrega, potkovičasti bubreg) i histoloških aberacija bubrega (glomerulocistični bubrezi, oligomeganefronija, displazija bubrega). U pogledu funkcije bubrega, ona može biti varijabilna, od očuvane (normalne) do teško oštećene da je pacijentima neophodna dijaliza (Lim and Kim 2020). U drugim organima genske varijante u genu *HNF1B* dovode do poremećaja u funkcionisanju jetre, te su jetrene transaminaze (alanin transaminaza i  $\gamma$ -glutamil transferaza) povećane kod pacijenata. Disbalans elektrolita u vidu hipomagnezemije, hipokalemije, hipourikemije, je čest kod nosilaca varijanti u *HNF1B* genu (Clissold et al. 2015). *HNF1B* reguliše ekspresiju *FXRD* gena, čiji produkt ( $\gamma$  subjedinica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP zavisnog kanala) učestvuje u reapsorpciji magnezijuma u nefronu (Ferrè et al. 2011). Hipomagnezemija je karakteristična za više od polovinu nosilaca genskih varijanti u *HNF1B* genu (Faguer et al. 2011). Neretko se javljaju u urogenitalni poremećaji, koji su češći kod osoba ženskog pola (Bingham and Hattersley 2004; Clissold et al. 2015; Faguer et al. 2011).

Dijabetes kod mladih pacijenata se neretko dijagnostikuje nakon dijagnoze renalnih bolesti. Vrlo često nije prisutna istorija dijabetesa ili poremećaja u radu bubrega u porodici jer značajan broj genskih varijanti nastaje spontano, *de novo*, i prvi put se javlja kod pacijenta (probanda) (Bellanné-Chantelot et al. 2004). Ovi pacijenti nisu osetljivi na sulfonilureu, te se dijabetes reguliše insulinskom terapijom, a terapija za poremećaj funkcije bubrega je slična kao za druge hroničnih bolesti bubrega (Misra and Hattersley 2016).

### 1.5.5. Geni uzročnici retkih MODY podtipova

Izučavanje prethodna četiri gena uzročnika omogućilo je dobro definisanje asociiranih MODY podtipova i prepoznavanje jedinstvenih kliničkih odlika svakog od njih. Preostali geni opisani su u značajno manjem broju porodica i predstavljaju veoma retke uzročnike MODY dijabetesa. Među njima, heterozigotne varijante u genima *INS* i *ABCC8* su prijavljene u nešto većem broju porodica (u oko 25 porodica) u poređenje sa brojem varijanti prijavljenim u ostalim genima (Aarthy et al. 2020). Kliničke karakteristike ovih podtipova su još heterogenije i uključuju pojavu gojaznosti i dijabetesne ketoacidoze među pacijentima, koje ne predstavljaju klasične odlike MODY dijabetesa.

#### *Gen PDX1 i PDX1-MODY*

Genske varijante u *PDX1* (eng. *Pancreatic duodenal homeobox gene 1, PDX1*) genu su odgovorne za nastanak PDX1-MODY dijabetesa, ranije poznatog kao MODY4. *PDX1* je transkripcioni faktor važan za razviće i diferencijaciju  $\beta$ -ćelije pankreasa, kao i za regulaciju ekspresije gena za insulin, glukozni transporter (*GLUT2*) i glukokinazu (*GCK*) (Schwitzgebel 2014; Yu et al. 2019). Heterozigotne varijante dovode do nastanka MODY dijabetesa, dok su



homozigotne odgovorne za neonatalni dijabetes. Iako je PDX1 bitan za razviće pankreasa, samo kod nekoliko pacijenata je primećena ageneza pankreasa (Caetano and Santana 2018). PDX1-MODY je opisan u 13 porodica i odlikuje se varijabilim fenotipom. Kod nosilaca genskih varijanti dijabetes, blagog oblika, nastao je između 2 i 35 godine života. Neki pacijenti su bili gojazni, a terapijski pristup je uključivao uglavnom insulin (Aarthy et al. 2020).

#### *Gen NEUROD1 i NEUROD1-MODY*

Gen *NEUROD1*, poznat još i kao *BETA2*, kodira neurogeni faktor diferencijacije, transkripcijski faktor koji se eksprimira rano tokom embrionalnog razvića učestvujući u formiranju cerebeluma (malog mozga), hipokampusu, unutrašnjem uva i retine. Eksprimira se u endokrinim ćelijama pankreasa, crevima i nekim neuronima centralnog i perifernog sistema (Horikawa and Enya 2019). *NEUROD1* transkripcijski faktor se sastoji iz dva domena, bHLH (eng. *Basic helix-loop-helix*) domena, koji je zadužen za vezivanje za DNK, i transaktivacionog domena. *NEUROD1* reguliše ekspresiju gena za insulin, SUR1 subjedinicu  $K_{ATP}$  zavisnog kanala, glukokinazu (*GCK*), i *PAX6* gena, važnih za održavanje glukozne homeostaze (Horikawa and Enya 2019). Heterozigotne varijante dovode do nastanka *NEUROD1-MODY* dijabetesa, ranijeg *MODY6* podtipa, opisan u do sada 16 porodica (Aarthy et al. 2020; Horikawa and Enya 2019). Najveći broj varijanti asociran sa *MODY* dijabetesom je identifikovan u transaktivacionom domenu, i uglavnom su to bile *frameshift* i *missense* varijante (Abreu et al. 2019). Nosioci heterozigotnih genskih varijanti u *NEUROD1* genu imaju varijabilan fenotip. Nastanak dijabetesa može da varira od 10 do 33 godine. Gojaznost, dijabetesna ketoacidoza i mikrovaskularne komplikacije poput retinopatije, nefropatije i neuropatije su često opisane kod pacijenata. Kod pacijenata se takođe mogu javiti i neurološke abnormalnosti (zastoj u razvoju, sensorineuralna gluvoća, oslabljen vid), ali su one obično udružene sa neonatalnim dijabetesom koji nastaje usled homozigotnih varijanti u ovom genu (Aarthy et al. 2020). Kao terapija uglavnom je korišćen insulin (Aarthy et al. 2020; Horikawa and Enya 2019).

#### *Gen KLF11 i KLF11-MODY*

Gen *KLF11* kodira transkripcijski faktor *KLF11* koji se eksprimira u ćelijama pankreasnih ostravaca. Učestvuje u regulaciji ekspresije insulina u uslovima visoke koncentracije glukoze, vezujući se za promotere gena *INS* i *PDX1* (Neve et al. 2005; Schwitzgebel 2014). *KLF11-MODY*, ili *MODY7*, je veoma redak *MODY* podtip. Do sada su opisane tri *missense* varijante asocirane sa *MODY* dijabetesom koje dovode do smanjene sekrecije insulina. Na kliničkom nivou nosioci ovih promena ispoljavaju simptome rano nastalog DM2 ili dijabetesa tipa 1 B (idiopatski dijabetes zavisan od insulina) (Neve et al. 2005; Ushijima et al. 2019).

#### *Gen CEL i CEL-MODY*

Produkt gen *CEL* je enzim karboksil-estar lipaza (eng. *carboxyl-ester lipase*), glavna komponenta pankreasnog soka, koja učestvuje u procesim hidrolize i apsorpcije holesterol-estara u duodenumu. Gen *CEL* se eksprimira u ćelijama egzokrinog pankreasa i ćelijama mlečnih žlezda, ali ne i u pankreasnim ostrvcima (Johansson et al. 2011). Do danas su prijavljene samo tri varijante u *CEL* genu kod 8 familija, koje su asocirane sa *MODY*

dijabetesom (CEL-MODY, MODY 8)(Aarthy et al. 2020; Raeder et al. 2006; Torsvik et al. 2010). Sve prijavljene varijante bile su nukleotidne delecije u jedanaestom egzonu koje dovode do skraćivanja proteina (*frameshift* varijante). Jedanaesti egzon *CEL* gena kodira skoro identične varijabilne tandemske ponovke (eng. *variable number of tandem repeats*, VNTR), čiji se broj kod zdravih osoba kreće između 7 i 21, a najčešće je 16. Ovi ponovci nisu od značaja za obavljanje funkcije enzima (ne utiču na katalitičku aktivnost ili aktivaciju enzima), ali jesu za pravilno savijanje, sekreciju i stabilnost (Torsvik et al. 2010). Funkcionalne studije su pokazale da ove promene dovode do nepravilnog savijanja proteina, koji se u ćeliji akumulira dovodeći do citotoksičnog efekta. Dijabetes se kod pacijenata razvija usled propadanja egzokrinog pankreasa koje zahvata i okolne endokrine ćelije pankreasa (Johansson et al. 2011; Raeder et al. 2014). Kod ovih pacijenata insulin je korišćen za lečenje, a kod jednog pacijenta su primećene mikrovaskularne komplikacije (retinopatija) (Aarthy et al. 2020).

#### *Gen PAX4 i PAX4-MODY*

PAX4 (eng. *Paired box 4*) je transkripcioni faktor koji se eksprimira tokom embrionalnog razvika i ima važnu ulogu u diferencijaciji i funkcionisanju  $\beta$ -ćelija pankreasa, a u adultnom pankreasu je važan za regeneraciju  $\beta$ -ćelija (Plengvidhya et al. 2007). PAX4-MODY, raniji MODY 9, koji nastaje usled heterozigotnih promena u genu *PAX4*, opisan je u nekoliko porodica sa različitom prezentacijom dijabetesa, od blažeg koji se razvio u odrasloj dobi, do težeg u adolescentnoj dobi koji je zahtevao primenu insulinske terapije (Chapla et al. 2015; Jo et al. 2011; Plengvidhya et al. 2007).

#### *Gen INS i INS- MODY*

INS-MODY (raniji MODY 10) nastaje usled promena u genu za insulin (*INS*). Genske varijante u ovom genu najčešće dovode do nastanka insulin zavisnog dijabetesa koji se javlja u prvih 6 meseci života (PNDM), a mnogo ređe su uzrok autozomno dominantnog MODY dijabetesa koji se javlja kasnije u mladoj dobi. Produkt ekspresije gena *INS* je prekursorska forma insulina, preproinsulin (Meur et al. 2010). Promene u genu *INS* dovode do nepravilnog savijanja proteina koji se nagomilava u endoplazmatičnom retikulumu dovodeći do stresa endoplazmatičnog retikuluma i apoptoze  $\beta$ -ćelije (Edghill et al. 2008a; Meur et al. 2010). Ovaj podtip MODY dijabetesa je opisan u oko 25 porodica širom sveta (Aarthy et al. 2020). Klinička prezentacija dijabetesa je varijabilna, kao i njegova progresija čak i između nosilaca iste promene unutar jedne familije. Dijabetes se u proseku javlja između 13-14. godine i pokazuje jasan autozomno dominantan način nasleđivanja. Dijabetesna ketoacidoza, gojaznost i blag oblik dijabetesa su opisani kod ovih pacijenata. Lečenje podrazumeva primenu insulina, iako u početku mogu da se koriste oralni hipoglikemijski agensi (Aarthy et al. 2020; Glaser 2008; Meur et al. 2010).

#### *Gen BLK i BLK-MODY*

B limfocitna kinaza, produkt gen *BLK*, osim u B limfocitima, eksprimira se u  $\beta$ -ćelijama pankreasa. BLK predstavlja modulator sinteze i sekrecije insulina, povećavajući ekspresiju gena *PDX1* i *Nkx6.1* u uslovima visoke koncentracije glukoze. Do sada je samo jedna promena dovedena u vezu sa MODY dijabetesom, p.Ala71Thr. *In vitro* analize su pokazale da opisana varijanta skoro potpuno suprimira ekspresiju gena *PDX1* i *Nkx6.1* uključenih u

regulaciju sekrecije insulina i *GSIS*-a (Borowiec et al. 2009). Pacijenti kod kojih je identifikovana ova varijanta razvili su dijabetes u odraslom dobu, odlikovali su se gojaznošću i koristili su insulin za regulaciju dijabetesa. Uloga *BLK* gena kao uzročnika *MODY* dijabetesa je pod znakom pitanja, budući da je kasnija studija identifikovala više od 50 normoglikemičnih nosilaca date varijante (Bonfond et al. 2013).

#### *Gen ABCC8 i ABCC8-MODY*

Gen *ABCC8* kodira receptor za sulfoniureu (*SUR1*), subjedinicu kalijumonog ATP zavisnog kanala na membrani  $\beta$ -ćelija pankreasa (Bowman et al. 2012). Ovaj kanal predstavlja heterooktamer koji sačinjavaju 4 Kir6.2 subjedinice (produkt *KCNJ11* gena) koje formiraju poru kanala za prolazak kalijumovog jona, i 4 subjedinice *SUR1* koje regulišu otvaranje i zatvaranje kanala (Flanagan et al. 2009). Ovi kanali su važni za regulaciju sekrecije insulina budući da su direktni učesnici u putu glukozom stimulisane sekreciju insulina. Zatvaranje kanala koje se javlja nakon vezivanja ATP-a, dovodi do depolarizacije ćelijske membrane i otvaranja voltažno zavisnih kanala za kalcijum, što stimuliše sekreciju insulina (Ovsyannikova et al. 2016). Genske varijante u ovom genu mogu da dovedu smanjenja ili povećanja aktivnosti kanala, što će dovesti do hiper- ili hipoglikemije, te su tri različita fenotipa/bolesti moguća (Bowman et al. 2012). Kongenitalna hiperinsulinemija i permanentni neonatalni dijabetes su najčešća posledica genskih varijanti u *ABCC8* genu. Kod značajno manjeg broja pacijenata genske varijate u *ABCC8* genu dovode do nastanka blažeg oblika dijabetesa u adultnom dobu, odnosno *ABCC8-MODY* (*MODY12*) dijabetesa. Pacijenti sa ovim podtipom se odlikuju varijabilnom kliničkom slikom (Ovsyannikova et al. 2016), koja ličili na *HNF1A/4A-MODY* i osetljivi su na sulfonilureu, koja je korišćena kao terapija u regulaciji dijabetesa (Bowman et al. 2012).

#### *Gen KCNJ11 i KCNJ11-MODY*

Gen *KCNJ11* kodira drugu subjedinicu kalijumovog ATP zavisnog kanala koja formira kanal za prolazak kalijumovog jona. Kao i kod prethodnog gena, genske varijante mogu dovesti do nastanka kongenitalne hiperinsulinemije, neonatalnog dijabetesa i veoma retko *MODY* dijabetesa (Liu et al. 2013). *KCNJ11-MODY* ili *MODY13* je opisan kod svega nekoliko porodica, koje su razvile dijabetes u mlađem odraslom dobu koji se klinički manifestovao kao *DM2*. Pacijenti su lečeni insulinom i sulfonilureom (Aarthy et al. 2020; Yorifuji et al. 2005).

#### *Gen APPL1 i APPL1-MODY*

Gen *APPL1* (eng. *Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interaction, PH domain, and leucine zipper containing 1*) je poslednji identifikovani gen uzročnik *MODY* dijabetesa (*MODY 14*), te zauzima četranesto mesto među *MODY* genima. *APPL1* je protein koji ima više funkcionalnih domena preko kojih stupa u interakciju sa drugim proteinima, uključujući i ključne proteine insulinskog signalnog puta. Identifikovane su dve različite varijante kod dve porodice koje dovode do gubitka funkcije proteina (*loss-of-function varijante*) što za posledicu ima smanjenu sekreciju insulina. Dijabetes se razvio u odraslom dobu kod nosilaca varijanti i uglavnom je lečen insulinom (Prudente et al. 2015).

**CILJEVI**

MODY dijabetes predstavlja poseban tip dijabetesa koji se odlikuje velikom kliničkom i genetičkom heterogenošću. Određivanje etiologije MODY dijabetesa kod pedijatrijskih pacijenata ima velike implikacije za dalji tok bolesti koji se pre svega ogleda u primeni adekvatne terapije i predikciji toka bolesti. S tim u vezi definisani su ciljevi prvog dela ove teze:

- Ispitivanje molekularno-genetičke osnove pacijenata sa kliničkim odlikama MODY dijabetesa primenom NGS i MLPA metode.
- Utvrđivanje spektra i učestalosti varijanti u MODY genima i određivanje korelacije između genotipa i fenotipa kod pacijenata u Srbiji.

MODY dijabetes iako najčešće nastaje usled varijanti u kodirajućim regionima MODY gena, može da nastane i prisustvom varijanti u promotorskom regionu. S tim u vezi ciljevi drugog dela studije su:

- Detekcija varijanti u okviru promotorskog regiona 4 gena koji su najčešće odgovorni za nastanak MODY dijabetesa, *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B*.
- *In vitro* funkcionalna analiza varijanti detektovanih u promotorskom regionu analiziranih gena.
- Analiza interakcije regiona promotora u kome se nalazi varijanta sa potencijalnim transkripcionim faktorima.
- Određivanje genotip-fenotip korelacije novootkrivenih varijanti u promotorskom regionu analiziranih gena.

# MATERIJAL 1 METODE

## 3.1. MATERIJAL

### 3.1.1. Ispitanici

Studija ispitivanja dijabetesa adultnog tipa kod mladih (eng. *Maturity-onset diabetes of the young, MODY*) je započeta u martu 2016. godine. U ovoj studiji učestvovali su pedijatrijski pacijenti lečeni na Odeljenju za endokrinologiju Univerzitetske dečje klinike, Beograd, sa kliničkim simptomima karakterističnim za poseban oblik dijabetesa tipa MODY. Roditelji pacijenata, kao i drugi članovi porodice, bili su uključeni u studiju radi potvrde statusa nosioca varijante kada je to bilo moguće. Svi učesnici u ovoj studiji su dali svoj pristanak za učestvovanje.

Kliničke karakteristike, biohemijski parametri, kao i uzorak periferne krvi obezbeđeni su od strane lekara i saradnika na Odeljenju za endokrinologiju Univerzitetske dečje klinike, Univerziteta u Beogradu. Uzorci periferne krvi pedijatrijskih pacijenata i članova porodice su uzeti na 3,8% natrijum citratu kao antikoagulansu u odnosu 9:1 i transportovani do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), gde je eksperimentalno sprovedena studija.

U studiji je učestvovalo 29 pedijatrijskih pacijenata kod kojih je na kliničkom nivou postavljena dijagnoza MODY dijabetesa, i 38 članova porodice. Kontrolna grupa sastojala se od 57 ispitanika iz Srbije, čiji su genomske profili dobijeni istom metodologijom i od kojih je oformljena interna baza genomske profila koja je korišćena za utvrđivanje učestalosti detektovanih varijanti ili eliminaciju potencijalnih populaciono specifičnih varijanti. Kontrolnu grupu za poređenje rezultata sekvenciranja promotorskih regiona odabranih MODY gena činilo je 20 ispitanika iz Srbije (dobrovoljnih davaoca uzorka krvi).

Ova studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Univerzitetske dečje klinike Univerziteta u Beogradu i sprovedena u skladu sa etičkim standardima utvrđenim Helsinškim deklaracijama iz 1964. godine i njenim kasnijim amandmanima. Informisana saglasnost je dobijena od svih učesnika u ovoj studiji.

### 3.1.2. Prajmeri i oligonukleotidi

Prajmeri koji su korišćeni u različitim PCR reakcijama u ovoj studiji dati su u tabelama 4-6. Oligonukleotidne probe korišćene u EMSA eksperimentima dati su u tabeli 7. Svi prajmeri i oligonukleotidne probe su dizajnirane su pomoću *online* softvera *PrimerBlast*<sup>1</sup>, a *Oligo Analyzer 3.1*<sup>2</sup> i *USCS In silico PCR*<sup>3</sup> *online* softveri su korišćeni radi provere karakteristika i specifičnosti prajmera. Za analizu prisustva pojedinačnih nukleotidnih varijanti (eng. *Single Nucleotide Polymorphism, SNP*) u sekvenci prajmera korišćen je *SNPChek*<sup>4</sup> *online* softver. U vreme dizajniranja prajmera, nijedan prajmer nije sadržao pojedinačne nukleotidne varijante (eng. *single nucleotide variants, SNV*). Svi prajmeri su dizajnirani na osnovu referentne sekvence za odgovarajući gen preuzete iz *NCBI GeneBank*<sup>5</sup> baze podataka.

<sup>1</sup> PrimerBlast: [www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)

<sup>2</sup> OligoAnalyzer: <https://www.idtdna.com>

<sup>3</sup> USCS In silico PCR: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>

<sup>4</sup> SNPChek: <https://genetools.org/SNPCheck/snpcheck.htm>

<sup>5</sup> NCBI baza podataka <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za validaciju detektovanih varijanti u MODY genima, temperature anilinga i očekivana veličina PCR produkta.

Naziv i referentna sekvenca gena	Egzon		Sekvenca prajmera (smer 5' → 3')	Veličina PCR produkta (bp)	Temp. anilinga (°C)
<b>GCK</b> <b>NM_000162.3</b>	3	F	TAGTCCCTTGTGCCTTCCCT	380	60
		R	CTCCCCACCCCTGGTAGACA		
	4	F	CATTCAGTGGCCAGGTGTTG	320	59
		R	GGGGGCTACATTTGAAGGCA		
	5	F	GGGACTCAGCCCTGCAGAAATA	380	60
		R	TGGAAGCCAAGGAGAAAGGCA		
	6	F	AGGGCATCCTTCTCAACTGG	434	60
R		ACCAGGCTCTGCTCTGACATC			
7	F	TGAAGCAACCCAGGTCTTCC	506	60	
	R	GAGCAGAAGGGATGGAGCTT			
8	F	TGAACCAGCTGGGGGAGTG	374	60	
	R	GAGACCAAGTCTGCAGTGCC			
9	F	ATCGCCCCATTTCTCCAGAG	489	58	
	R	ATCTTGGAGCTTGGGAACCGC			
<b>HNF1B</b> <b>NM_00458.4</b>	1	F	CGGGGAGTAACAGGTGTCTG	596	58
		R	GGGACTTCTCTGGTGGGAAAC		
	2	F	CCTCATGTCTACCCCAAAGTTG	484	58
R		GGCCAAATCTACTTGCCACC			
4	F	TCTTCTCCTCGAGAGCCACA	576	59	
	R	AGATCCGTGGCAAGAACCAG			
<b>HNF1A</b> <b>NM_000545.5</b>	1	F	GAGTTTGGTTTGTGTCTGCCG	521	60
		R	GGGGACTCAACTCAG AAGGG		
4	F	TGCTCACCCAATTCGATTCTCT	605	60	
	R	GCATGAATGGAATGGAACCAA			
<b>NEUROD1</b> <b>NM_002500.4</b>	2	F	CGCAAGGTGGTGCCTTGCTATTC	596	60
R		GCAGCGGTGCCTGAGAAGATTG			

Legenda: F - "forward" prajmer, R - "reverse" prajmer

Tabela 5. Prajmeri korišćeni za umnožavanje promotorskog regiona *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B* gena

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (smer 5' → 3')	Naziv i referentna sekvenca gena	Očekivana veličina PCR produkta (bp)	Temp. anilinga (°C)
GCK_prom1_F	CACAGTCACCTGCAGCCTAA		504	59
GCK_prom1_R	GACAGGCAAGCAAACACTCC			
GCK_prom2_F	CCTGTCCAGCTTTGGACTCT	GCK NM_000162.3	652	59
GCK_prom2_R	TGTGGGGCTTAGTGTCCTTC			
GCK_prom3_F	TGTCTGGAGAGATCGCACTG		689	59
GCK_prom3_R	GGGACCATCTCACATCCCTA			
HNF1A_prom_F	GCATTTTTGGCTCTCCTGTC	HNF1A NM_000545.5	543	59
HNF1A_prom_R	TCTGCAGCTGGCTCAGTTTAG			



<i>Nastavak tabele 5</i>				
HNF4A_prom_F	CCTGTATGCAACTCCCAGCA	HNF4A	660	59
HNF4A_prom_R	CCGTAAGAAACACACGGGGA	NM_000457.4		
HNF1B_prom_F	TCCAGGGTCTCTACTCTTCGC	HNF1B	770	59
HNF1B_prom_R	AACTCCTCCAAGGCCTGAACC	NM_000458.2		

Tabela 6. Prajmeri korišćeni za kloniranje promotorskog regiona

<b><i>Prajmeri za kloniranje promotorskog regiona gena GCKu pCAT basic plazmidni vektor</i></b>			
Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u smeru 5'→3'	Temp. anilinga (°C)	Veličina PCR produkta (bp)
GCKprom_clon_F	<i>ccaagctt</i> CAAGCTGCCTGCTCCCTTTC	66	835
GCKprom_clon_R	<i>gctctaga</i> GGCCTCCATCCTGGCTCTGT		

<b><i>Prajmeri za kloniranje promotorskog regiona gena HNF1A u pBLCAT5 plazmidni vektor</i></b>			
Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u smeru 5'→3'	Temp. anilinga (°C)	Veličina PCR produkta (bp)
HNF1Aprom_clon_F	<i>ccaagctt</i> GGGAGCTCCAATGTAAACAGAACA	57	138
HNF1Aprom_clon_R	<i>gctctaga</i> GCCAAACCAAACCTTGCACCCA		

*Legenda: Italic mala slova – nukleotidi koji su dodati da bi se pospešilo prepoznavanje restrikcionog mesta na kraju prajmera. Mala podebljana slova: sekvenca koju specifično prepoznaju enzimi HindIII i XbaI i seku je. Velika slova: sekvenca prajmera*

Tabela 7. Oligonukleotidne probe korišćene u EMSA esejima

Naziv oligonukleotida	Sekvenca oligonukleotida (smer 5'→3')
HNF1A_prom_wt_C	GCCAGGGTTGGGGGTTGGGGGTGCCACAG
HNF1A_prom_wt_NC	CTGTGGGCACCCCCAACCCCCAACCCCTGGC
HNF1A_prom_mut_C	GCCAGGGTTGGGGGTTGGGGGTTGGGGGTGCCACAG
HNF1A_prom_mut_NC	CTGTGGGCACCCCCAACCCCCAACCCCAACCCCTGGC
GCK-194_wt_C	AAGGCTTAACAGGCTAGCGGTCAGTGTAGT
GCK-194_wt_NC	ACTACAGTGACCGCTAGCCTGTTAAGCCTT
GCK-194_mut_C	AAGGCTTAACAGGCTGGCGGTCAGTGTAGT
GCK-194_mut_NC	ACTACAGTGACCGCCAGCCTGTTAAGCCTT
GCK-282_wt_C	CTGCTTCCAGACTCACGGGATCCTCTGCTC
GCK-282_wt_NC	GAGCAGAGGATCCCGTGAGTCTGGAAGCAG
GCK-282_mut_C	CTGCTTCCAGACTCATGGGATCCTCTGCTC
GCK-282_mut_NC	GAGCAGAGGATCCCATGAGTCTGGAAGCAG
GCK+402_wt_C	CCGTGACCCCTGCGGCGGAGAAGCCTTGA
GCK+402_wt_NC	TCCAAGGCTTCTCCGCCGAGGGGTCACGG
GCK+402_mut_C	CCGTGACCCCTGCGGGGAGAAGCCTTGA
GCK+402_mut_NC	TCCAAGGCTTCTCCCCGAGGGGTCACGG

*Legenda: C (od coding) – kodirajući lanac; NC (od non-coding) – komplementaran nekodirajući lanac*

### 3.1.3. Bakterijski soj

U ovoj studiji korišćen je bakterijski soj *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  za umnožavanje plazmidnih konstrukata.

### 3.1.4. Plazmidni vektori

Za pravljene konstrukata koji su korišćeni za ispitivanje efekta varijanti u promotorskom regionu gena *GCK* na aktivnost datog promotora korišćen je pCATbasic plazmidni vektor, dok je za analizu varijante u promotorskom regionu *HNF1A* gena korišćen pBLCAT5 plazmidni vektor. Vektor pBLCAT5 je takođe korišćen kao pozitivna kontrola u eksperimentima tranzijentne transfekcije. Plazmidni vektor pCH110 je korišćen kao kontrola efikasnosti transfekcije.

### 3.1.5. Čelijske linije

U ovoj studiji korišćene su dve čelijske linije Rin-5F i HepG2. Rin-5F (ATCC® CRL-2058™) čelijska linija je permanentna čelijska linija poreklom od tumora  $\beta$ -ćelija pankreasa (insulinoma) pacova (*Ratus norvegicus*). HepG2 (ATCC® HB-8065™) čelijska linija je permanentna čelijska linija poreklom od humanog karcinoma jetre (hepatoma).

## 3.2. METODE

### 3.2.1. METODE ZA DETEKCIJU GENSKIH VARIJANTI U GENIMA ASOCIRANIM SA MODY DIJABETESOM

Detekcija genskih varijanti u kodirajućim regionima MODY gena je vršena primenom dve savremene metode. Sekvenciranje svih gena asociranih sa nastankom MODY dijabetesa je vršeno metodom sekvenciranja nove generacije (eng. *Next generation Sequencing, NGS*), a detekcija velikih delecija u genima najčešće odgovornim za MODY dijabetes je vršena metodom istovremenog umnožavanja vezanih proba (eng. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification, MLPA*).

Detekcija genskih varijanti u promotorskom regionu 4 MODY gena *HNF1A*, *HNF4A*, *HNF1B* i *GCK* je vršena automatizovanom metodom sekvenciranja po Sangeru.

#### 3.2.1.1. Izolacija DNK i kvantifikacija

(prema uputstvu za korišćenje *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Venlo, Netherlands))

Genomska DNK je izolovana komercijalnim kitom za izolaciju DNK iz pune krvi *QIAamp DNA Blood Mini Kit*. Uzorak krvi, 200  $\mu$ l, je pomešan sa 20  $\mu$ l *Qiagen* proteinaze K i 200  $\mu$ l pufera AL (pufer za lizu) u mikrotubi zapremine 1.5 ml. Smeša je vorteksovana i inkubirana 10 minuta na 56°C, nakon čega je u lizat dodato 200  $\mu$ l 100% etanola. Nakon kratkog vorteksovavanja sadržaj mikrotube je nanet na *QIAamp* kolonicu i centrifugiran (8000rpm, 1 min). Kolonica je prečišćena u dva koraka dodavanjem 500  $\mu$ l pufera AW1, praćeno centrifugiranjem 1 min na 8000 rpm, i 500  $\mu$ l pufera AW2, praćeno centrifugiranjem 1 min na 13000 rpm. Sadržaj kolekcione tube je svaki put odbačen nakon centrifugiranja, jer DNK ostaje vezana za matriks kolonice sve do elucije. Nakon prečišćavanja, kolonica je prebačena na novu mikrotubu od 1,5 ml, i u kolonicu je dodato 200  $\mu$ l pufera AE (pufer za eluciju, *Qiagen*). Nakon inkubacije od 10 minuta, kolonica sa mikrotubom je centrifugirana (8000 rpm, 1 min).

Uzorci DNK koji su analizirani metodom MLPA su bili eluirani sa 200  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, kako je preporučeno od strane proizvođača.

Koncentracija i čistoća izolovane DNK je određena na spektrofotometru *NanoVue* (*Biochrom, Holliston, USA*). Dobijene su očekivane vrednosti za ovakav način izolacije, oko 30 ng/ $\mu$ l. Uzorci izolovane DNK su čuvani na temperaturi -20°C.

Koncentracija uzoraka DNK koji su analizirani metodom NGS je određena upotrebom eseja visoke osetljivosti za određivanje koncentracije dvolančane DNK, *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit* (*ThermoFisher Scientific*) na aparatu *Qubit® 3.0 Fluorimeter* (*ThermoFisher Scientific, MA, USA*) prema uputstvu proizvođača, kako bi se precizno odredila koncentracija dvolančane DNK.

### 3.2.1.2. Sekvenciranje nove generacije (NGS)

Sekvenciranje gena odgovornih za dijabetes tipa MODY je vršeno NGS metodom, upotrebom tehnologije kompanije Illumina, čiji su reagensi kao i aparat (platforma) za sekvenciranje korišćeni (*Illumina, San Diego, USA*). Svi reagensi neophodni za sekvenciranje su sadržani u *TruSight One Sequencing Panel* kitu koji omogućava sekvenciranje 4813 klinički relevantnih gena, među kojima se nalazi i 13 gena asociраниh sa MODY dijabetesom. Ovim panelom detektuju se genske varijante tipa pojedinačnih nukleotidnih varijanti (eng. *Single Nucleotide Variants, SNV*) i manje delecije i insercije unutar kodirajućih regiona svih 4813 gena, kao i susednih intronskih sekvenci.

*Illumina* tehnologija sekvenciranja nove generacije obuhvata 3 glavna koraka:

- pripremu uzorka i formiranje DNK biblioteke
- formiranje klastera i reakciju sekvenciranja
- obradu podataka sekvenciranja

#### Priprema uzorka i formiranje biblioteke DNK

Proces pripreme uzorka podrazumeva niz koraka koji za cilj imaju formiranje biblioteke DNK. Biblioteku DNK čine targetovane DNK sekvence (DNK fragmenti) koje na svojim krajevima sadrže ligirane nukleotidne sekvence adaptera, prajmera, indeksa i oligonukleotida koji su komplementarni oligonukleotidima vezanim za površinu protočne ćelije (eng. *flow cell*).

Detaljan protokol po kome je pripremljena biblioteka DNK je označen brojem *TruSight One Reference Guide #15046431 v01* i dostupan je na zvaničnoj internet stranici kompanije Illumina<sup>6</sup>.

Formirana biblioteka DNK je naneta na kertridž za sekvenciranje, koji sadrži sve neophodne reagense za odvijanje procesa formiranja klastera i sekvenciranje biblioteke DNK, u koncentraciji od 12-13pM u ukupnom volumenu od 600μl rastvora za resuspenziju.

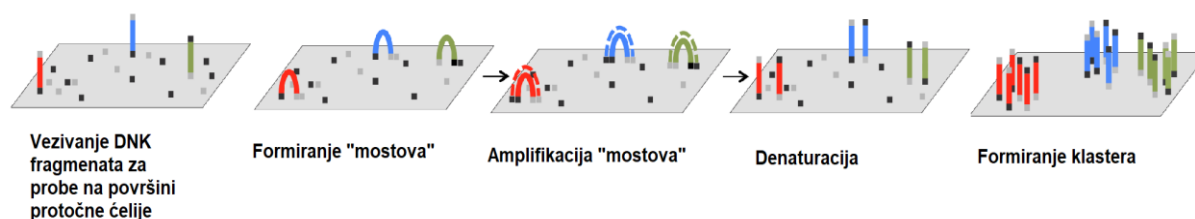
#### Formiranje klastera i reakcija sekvenciranja

Formiranje klastera i sekvenciranje su reakcije koje se odvijaju na površini protočne ćelije i unutar samog aparata, prema instrukcijama proizvođača koje se zadaju sistemu.

Formiranje klastera je proces tokom kojeg se svaki DNK fragment iz DNK biblioteke istovremeno amplifikuje kako bi se formirali klasteri sastavljeni od velikog broja identičnih kopija polazog DNK fragmenta (slika 7). Ovaj korak se vrši kako bi se obezbedio signal dovoljnog intenziteta za detekciju u toku sekvenciranja. Proces počinje komplementarnim vezivanjem DNK fragmenata za oligonukleotidne sekvence fiksirane za površinu protočne ćelije preko oligonukleotidnih sekvenci koje su ligirane za DNK fragment tokom procesa pripreme uzorka. U reakciji koja u osnovi predstavlja reakciju PCR amplifikacije, sintetiše se komplementaran lanac koji je kovalentno vezan za probu, a početni jednolančani DNK fragment, koji je služio kao matrica, se uklanja. Nakon vezivanja DNK fragmenata za probu sledi amplifikacija koja je označena kao „umnožavanje mostova“ (eng. *bridge amplifikation*). Slobodan kraj DNK fragmenta se savija, formira strukturu koja liči na most i komplementarno se vezuje za drugu oligonukleotidnu probu na površini

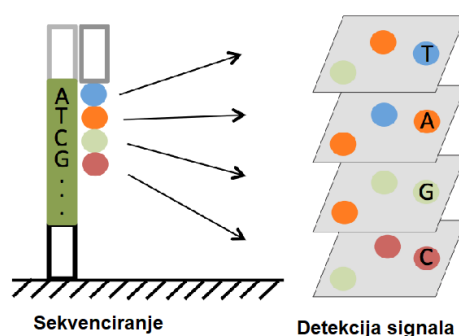
<sup>6</sup> Internet stranica Illumina: <https://support.illumina.com>

protočne ćelije. Na takvom „mostu“ polimeraza sintetiše komplementaran lanac i formira dvolančani DNK fragment. U sledećem koraku se vrši denaturacija na dva jednolančana DNK fragmenta, gde svaki služi kao matrica za narednu amplifikaciju. Proces se ponavlja dok se ne obrazuju klasteri svih klonalno amplifikovanih DNK fragmenata.



Slika 7. Ilustrovani prikaz procesa formiranja klastera. Slika preuzeta i modifikovana iz (Yuan Lu et al. 2016).

Kada se završi klonalna amplifikacija počinje sekvenciranje klonalno amplifikovanih klastera (Slika 8). Očitavanje nukleotida vrši se tokom procesa sinteze nukleotidnog lanca, te se taj način sekvenciranja označava kao sekvenciranje putem sinteze (eng. *sequencing by synthesis*). Svaki klaster se izlaže DNK polimerazi i mešavini četiri fluorescentno obeležena nukleotida. Ovi nukleotidi su takozvani reverzibilni terminatori koji nose fluorescentno obeleženu i blokirajuću grupu, te je omogućena ugradnja samo jednog nukleotida po ciklusu. Komplementaran nukleotid se ugrađuje u rastući lanac, a ostali se uklanjaju. Detekcija fluorescentnog signala vrši se na kraju svakog ciklusa, gde svaki klaster emituje jedan fluorescentni signal. Pre početka novog ciklusa uklanja se fluorescentni obeleživač i blokirajuća grupa, čime je omogućena ugradnja novog nukleotida i nastavak sinteze lanca (Chee Seng Ku et al. 2013; Jackson et al. 2018).



Slika 8. Ilustrovani prikaz reakcije sekvenciranja i detekcija signala na površini protočne ćelije. Slika preuzeta i modifikovana iz (Yuan Lu et al. 2016).

Sekvenciranje je urađeno na *MiSeq* platformi (*Illumina, San Diego, CA*) podešeno tako da izvrši 151 ciklus sekvenciranja sa oba kraja (eng. *pair end read*). Kvalitet sekvenciranja je prikazan kao Q vrednost i predstavlja procenat ugradnje ispravnog nukleotida. Optimalna vrednost kvaliteta sekvenciranja iznosi više od 90% (Q30), što znači da je 1 nt od 1000 nt pogrešno ugrađen u rastući lanac.

### Obrada podataka sekvenciranja

Kada se završi sekvenciranje, *MiSeq* platforma vrši obradu podataka sekvenciranja i generiše fajlove FastQ, BAM (eng. *Binary Alignment/Map*) i VCF (eng. *Variant Calling Files*). Obrada podataka podrazumeva prevođenje fluorescentnog signala u nukleotidne sekvence, takozvane „ridove“ (eng. *read* – očitani nukleotidi) i njihovo poravnavanje sa referentnom sekvencom radi identifikacije varijantnih nukleotida. Dobijeni fajlovi se mogu koristiti od strane drugih softvera kako bi se izvršila anotacija (eng. *annotation*), odnosno dodeljivanje poznatih informacija detektovanoj varijanti, poput tipa genske varijante, gena u kome se nalazi, pozicije u genu, učestalost, patogenosti i sl.

### Analiza varijanti detektovanih metodom sekvenciranja nove generacije

U ovoj studiji su za potrebe analize detektovanih varijanti korišćeni VCF fajlovi i softver *VariantStudio 2.2.* (*Illumina, San Diego, CA*). Nakon anotacije VCF fajla, dobijeni su podaci o svim detektovanim varijantama u 4813 gena. Analiza podataka započeta je isključivanjem varijanti koje nisu prošle filter kvaliteta, koje su sinonimne i čija je učestalost bila veća od 1% prema bazama podataka *Thousand Genomes*<sup>7</sup> i *ExAC*<sup>8</sup> ouhvaćene softverom. Kako bi se analizirali samo geni asocirani sa dijabetesom tipa MODY, izvršeno je filtriranje podataka prema sledećem kriterijumu:

- u obzir je uzeto 13 gena asociranih sa dijabetesom tipa MODY: *HNF1A, GCK, HNF4A, PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CELL, PAX4, INS, BLK, ABCC8, KCNJ11*. Poslednji otkriveni gen *APPL1* nije postojao na korišćenoj *TruSight One* platformi, te nije bio deo analize.
- u obzir su uzeti svi tipovi varijanti: nesinonimne varijante (eng. *missense variants*), varijante koje menjaju mesto iskrajanja introna (eng. *splice site variants*), varijante koje uvode prevremeni stop kodon (eng. *nonsense variants*), male delecije i insercije (eng. *indels*) ili varijante koje menjaju okvir čitanja (eng. *frameshift variants*)
- u obzir su uzete varijante u heterozigotnom i homozigotnom stanju.

Nakon što softver izlista rezultate, proverava se da li je varijanta već poznata u literaturi i bazama podataka, kolika je patogenost varijante, da li je funkcionalno okarakterisana i da li je asocirana sa ovim tipom dijabetesa. Od *online* baza podataka korišćene su: *VarSome*<sup>9</sup>, *HGMD*<sup>10</sup>, *ClinVar*<sup>11</sup>, *dbSNP*<sup>12</sup>, *Ensembl*<sup>13</sup> i *PubMed*<sup>14</sup>. Takođe, proverava se da li detektovana varijanta postoji u kontrolnoj grupi.

Ukoliko se utvrdi da varijanta nije prethodno prijavljena ni u jednoj bazi ili literaturi, niti u kontrolnoj grupi varijanta se smatra da je novootkrivena (*de novo*) i vrši se *in silico* analiza da bi se odredio njen efekat.

Za sve varijante koje su detektovane metodom *NGS*, vršena je validacija varijante metodom sekvenciranja po Sangeru. Uzorci članova porodice su takođe analizirani na prisustvo detektovane varijante istom metodom kako bi se utvrdio tip nasleđivanja.

<sup>7</sup>1000 genoma baza podataka, dostupna na [www.internationalgenome.org](http://www.internationalgenome.org)

<sup>8</sup> Exome Aggregation Consortium (ExAC), dostupna na <http://exac.broadinstitute.org>

<sup>9</sup> Varsome baza podataka, dostupna na <https://varsome.com/>

<sup>10</sup> Human Gene Mutation Database baza podataka, dostupna na <http://www.hgmd.cf.ac.uk>

<sup>11</sup> ClinVar baza podataka, dostupna na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>

<sup>12</sup> NCBI baza podataka dostupna na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>

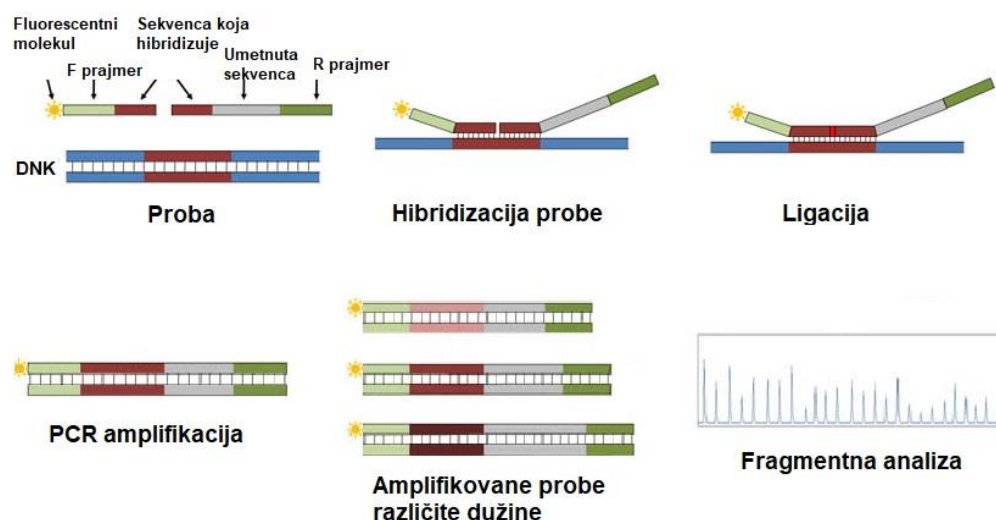
<sup>13</sup> Ensembl baza podataka, dostupna na <https://www.ensembl.org/>

<sup>14</sup> PubMed baza podataka, dostupna na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

### 3.2.1.3. Metoda istovremenog umnožavanja vezanih proba (MLPA)

(prema uputstvu za korišćenje *SALSA® MLPA® Probemix P241-D2 MODY Mix 1, MRC Holland*)

Metoda istovremenog umnožavanja vezanih proba (eng. *Multiplex-ligation dependant Probe Amplification, MLPA*) predstavlja multipleks PCR koji sadrži više parova prajmera kojima se istovremeno amplifikuje veći broj segmenata DNK od interesa. U MLPA metodi koriste se specifične fluorescentno obeležene probe koje hibridizuju za sekvencu od interesa. Svaka proba se sastoji iz dva dela, levog i desnog oligonukleotida. Oba dela sadrže sekvencu koja hibridizuje za region od interesa i univerzalne prajmere za reakciju amplifikacije. Desni deo probe sadrži i dodatnu, umetnutu sekvencu određene dužine koja je potrebna za određivanje veličine fragmenta. Samo ukoliko oba oligonukleotida hibridizuju neposredno jedan do drugog za region od interesa, biće omogućena ligacija dva susedna dela probe i formiraće se jedinstvena proba koja će se amplifikovati u reakciji PCR-a. Ukoliko su neki delovi sekvence deletirani neće doći do ligacije niti amplifikacije regiona od interesa (Slika 9). Svaka proba ima jedinstvenu dužinu tako da se produkti na kraju reakcije PCR-a (DNK fragmenti) mogu razdvojiti kapilarnom elektroforezom na osnovu veličine.



Slika 9. Ilustrovani prikaz reakcija u MLPA metodi. Preuzeto i modifikovano sa [www.applied-maths.com/applications/multiplex-ligation-dependent-probe-amplification-mlpa-analysis](http://www.applied-maths.com/applications/multiplex-ligation-dependent-probe-amplification-mlpa-analysis)

Detekcija velikih delecija u genima *HNF1A*, *HNF1B*, *HNF4A* i *GCK* vršena je metodom MLPA upotrebom komercijalnog kita *SALSA® MLPA® Probemix P241-D2 MODY Mix 1*, verzija D2, lot D2-0413 (*MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands*). Kit sadrži mix od 50 proba, kao i reagense neophodne za odvijanje reakcija hibridizacije, ligacije i PCR amplifikacije proba.

MLPA analiza je izvedena prema protokolu proizvođača, verzija protokola *MDP-005*, i obuhvatala je više sukcesivnih koraka pripreme reakcionih smeša i reakcija inkubacije, i PCR amplifikacije.

U prvom koraku denaturacije DNK, 120 ng genomske DNK, u finalnom volumenu od 5  $\mu$ l (10mM Tris-HCl, pH 8,5) je denaturisano na temperaturi 98°C u trajanju od 5 min, a zatim ohlađeno do temperature 25°C.

U drugom koraku hibridizacije proba, u 5  $\mu$ l ohlađene genomske DNK dodato je 3 $\mu$ l reakcione smeša za hibridizaciju direktno u mikrotube u PCR aparatu. Smeša za hibridizaciju je sadržala 1,5  $\mu$ l MLPA pufera i 1,5  $\mu$ l mešavine specifičnih proba (probemix P241-D2). Finalna reakciona smeša od 8  $\mu$ l je prvo inkubirana 1 minut na 95°C, a zatim ostavljena da hibridizuje na temperaturi 60°C tokom 16-20 sati.

U trećem koraku izvršena je ligacija. Smeša za ligaciju (32  $\mu$ l) je sadržala: 25  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 3  $\mu$ l *Ligase* pufera A, 3  $\mu$ l *Ligase* pufera B, 1  $\mu$ l enzima *Ligase-65*. Neposredno pre dodavanja smeše za ligaciju, hibridizaciona smeša je ohlađena na 54°C. Ligaciona smeša je direktno dodata u mikrotube koje su bile u PCR aparatu na temperaturi od 54°C. Sadržaj je inkubira na 54°C u trajanju od 15 minuta. U narednom koraku enzim je inaktiviran kratkom inkubacijom na 98°C u trajanju od 5 min, nakon čega je smeša ohlađena spuštanjem temperature na 20°C.

U četvrtom koraku probe su amplifikovane u PCR reakciji. Smeša za PCR amplifikaciju (10  $\mu$ l) je dodata direktno u mikrotube, koje su bile u aparatu na temperaturi od 20°C. Smeša za PCR amplifikaciju je sadržala: 7,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l SALSA PCR primer mix, 0,5  $\mu$ l SALSA polimeraze. Zatim je pokrut program za PCR amplifikaciju: 35 ciklusa {95°C/ 30s; 60°C/30s, 72°C/60s } za kojima je sledila finalna elongacija na 72°C 20 minutes i hlađenje na 15°C.

S obzirom na to da se probe razdvajaju na osnovu veličine u toku kapilarne elektroforeze, korišćen je marker standarda za veličinu (eng. *size standard*). U posebnoj tubi je pripremljena smeša (10  $\mu$ l) koja je sadržala 0,7  $\mu$ l PCR produkta, 0,2  $\mu$ l markera za veličinu *GeneScan™ - 500 LIZ (Applied Biosystems)* dopunjena sa 9  $\mu$ l *HiDi formamide* reagensa. Smeša je inkubirana 3 minuta na 86°C, a zatim ohlađena na 4°C u trajanju od 2 min. Razdvajanje proba (fragmentna separacija) je vršeno kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Life Technologies, California, USA)*. Obrada i analiza podataka je vršena upotrebom softvera *Coffalyser.Net (MRC Holland)*.

#### 3.2.1.4. Amplifikacija regiona DNK od interesa metodom PCR

PCR amplifikacija ili umnožavanje DNK fragmenta predstavlja proces kojim se u *in vitro* uslovim oponaša proces replikacije kako bi se dobio veliki broj identičnih kopija željenog regiona DNK. Reakcija PCR amplifikacije se odigrava u reakcionoj smeši koja sadrži DNK matricu (npr. dvolančanu DNK), DNK polimerazu, dezoksiribonukleotide (dNTP) i par prajmer sekvenci kojima se selektuje željeni region i omogućuje njegovo umnožavanje. U cikličnim procesima denaturacije, anilinga (eng. *anealing*) tj. hibridizacije prajmera i elongacije dobija se veliki broj identičnih kopija DNK fragmenta koji se detektuju i vizuelizuju metodom gel elektroforeze (Kadri 2019).

PCR amplifikacija je vršena pomoću komercijalnog kita *HotStartTaq® DNA polimerase (Qiagen, Germany)* prema uputstvu proizvođača i odgovarajućeg para prajmera u zavisnosti od eksperimenta.



## Validacija varijanti detektovanih NGS metodom

Validacija varijanti detektovanih NGS metodom kao i potvrda varijante kod roditelja je vršena metodom sekvenciranja po Sangeru za koju je prvo bilo potrebno umnožiti regione DNK u kojima se varijanta nalazi. Postupak je obuhvatao sledeće korake:

- dizajniranje para prajmera za svaki region u kom se proveravalo prisustvo genske varijante,
- umnožavanje željenog regiona metodom PCR i detekcija PCR produkta agaroznom gel elektroforezom,
- sekvenciranje fragmenta DNK na metodom po Sangeru.

PCR reakciona smeša finalne zapremine 25  $\mu$ l sadržala je sledeće komponente: 50-100 ng DNK, 1 x PCR pufer, 1 x Q solution, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP mix (*ThermoFisher Scientific*), po 10 pmol F i R prajmera, 1 U HotStartTaq® DNA polimeraze i ddH<sub>2</sub>O do 25  $\mu$ l. Prajmeri korišćeni za validaciju svake varijante dati su u tabeli 4.

Temperaturni profil PCR reakcije bio je:

Inicijalna denaturacija	95 °C	15 min	30 ciklusa
Denaturacija	95 °C	30 s	
Aniling*	* °C	30 s	
Ekstenzija	72 °C	45-60 s	
Finalna ekstenzija	72 °C	10 min	

\*Temperatura anilinga svakog para prajmera data je u tabeli 4.

Produkti PCR reakcije su analizirani na 2% agaroznom gelu. Veličina očekivanog produkta PCR reakcije data je u tabeli 2.

## Analiza promotorskih regiona gena *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B*

Kako bi se ispitalo postojanje varijanti u promotorskim regionima 4 *MODY* gena, izvršeno je njihovo sekvenciranje. Međutim, pre toga je potrebno umnožiti željene regione, što je urađeno PCR amplifikacijom.

Promotorski regioni gena *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B* su umnoženi pomoću prajmera iz tabele 3. Finalna PCR reakciona smeša od 25  $\mu$ l sadržala je sledeće komponente: 50-100 ng DNK, 1 x PCR pufer, 1 x Q solution, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTP mix (*ThermoFisher Scientific*), po 10 pmol F i R prajmera, 1 U HotStartTaq® DNA polimeraze, ddH<sub>2</sub>O do 25  $\mu$ l.

Temperaturni profil PCR reakcije bio je:

Inicijalna denaturacija	95 °C	15 min	30 ciklusa
Denaturacija	95 °C	30 s	
Aniling*	* °C	30 s	
Ekstenzija	72 °C	45-60 s	
Finalna ekstenzija	72 °C	10 min	

\*Temperatura anilinga svakog para prajmera data je u tabeli 5.

Produkti PCR reakcije su analizirani na 2% agaroznom gelu. Veličina očekivanog produkta PCR reakcije data je u tabeli 5.

### 3.2.1.5. Analiza DNK na agaroznom gelu

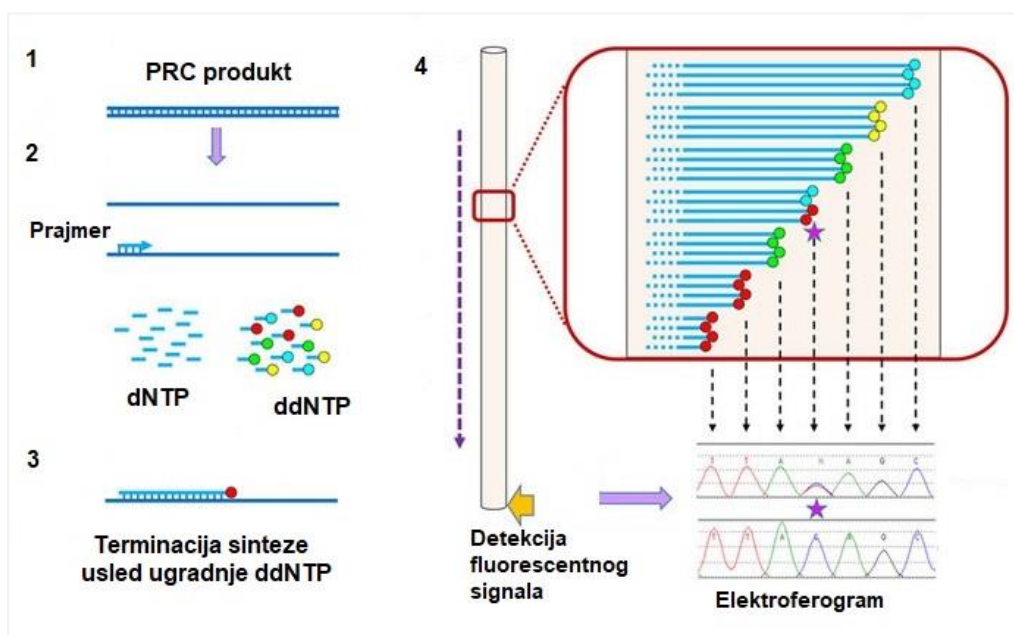
(Maniatis T et al. 1982)

Analiza DNK (nakon izolacije DNK, produkti PCR reakcije, plazmidni konstrukti, itd.) vrši se na agaroznom gelu metodom horizontalne elektroforeze. U zavisnosti od veličine DNK prave se gelovi određene koncentracije, 1% za analizu genomske ili plazmidne DNK, ili 2% za produkte PCR reakcije. Za pravljenje gela korišćen je 1x TAE pufer (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0). Isti pufer je korišćen i za odvijanje elektroforeze. Vizuelizacija DNK je omogućena dodavanjem etidijum bromida (finalna koncentracija 0,5 µg/ml) u gel tokom njegove pripreme. Etidijum bromid je fluorescentni agens koji se interkalira u nukleinske kiseline, omogućavajući njihovu vizuelizaciju pod UV svetlom. Elektroforeza se odvijala pri naponu od 100 mV i struji od 100mA, u trajanju od 30-45 minuta. Veličina fragmenta DNK je određena pomoću odgovarajućeg komercijalnog DNK markera za veličinu (*peqGOLD 100bp DNA-ladder plus, Peqlab*) koji je naneti na gel prilikom nanošenja uzoraka. Vizuelizacija umnoženih fragmenata DNK vršena je upotrebom CCD kamere sa *BioDocAnalyze* sistemom (*Biometra GmbH, Göttingen, Germany*) i osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 312 nm.

### 3.2.1.6. Sekvenciranje po Sangeru

(prema uputstvu za korišćenje *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA*))

Sekvenciranje po Sangeru je metoda terminacije sinteze DNK lanca (eng. *chain termination*) zasnovana na upotrebi didezoksiribonukleotida (ddNTP) ili terminatora, analoga klasičnih dezoksiribonukleotida (dNTP), koji zaustavljaju sintezu komplementarnog lanca nakon ugradnje.



Slika 10. Ilustrovani prikaz metode automatizovanog sekvenciranja zasnovan na Sangerovoj reakciji terminacije. Preuzeto i modifikovano od (Jackson et al. 2018).

U reakciji, DNK polimeraza sintetiše komplementaran lanac pomoću jednog prajmera i smeše didezoksiribonukleotida i dezokiribonukleotida (asimetrični PCR). Ugradnjom didezoksiribonukleotida zaustavlja se sinteza lanca. Na kraju reakcije dobijaju se fragmenti koji se razlikuju za po jedan nukleotid i razdvajaju na osnovu dužine u toku kapilarne elektroforeze. U automatizovanom sekvenciranju didezoksiribonukleotidi su različito fluorescentno obeleženi čime je omogućeno lasersko detektovanje fluorescentnog signala i očitavanje sekvence fragmenta DNK (Slika 10).

Pre nego što se pripremi reakcija sekvenciranja, vrši se prečišćavanje produkata PCR reakcije. Prečišćavanje je vršeno pomoću *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Venlo, Netherlands) prema uputstvu proizvođača.

Za reakciju sekvenciranja korišćeni su isti prajmeri kao i za umnožavanje željenog dela DNK, ali u koncentraciji od 3,2 pmol.

Za sekvenciranje je korišćen *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, a reakciona smeša za reakciju sekvenciranja finlane zapremina 5  $\mu$ l je sadržala: 3-10 ng prečišćenog PCR produkta (za fragment dužine 500bp) ili 5-20ng PCR produkta (za fragmente dužine 500-1000bp), prajme za sekvenciranje (F ili R), 0,5  $\mu$ l *Ready Reaction Mix* i ddH<sub>2</sub>O do finalnog volumena.

Temperaturni profil PCR reakcije za sekvenciranje bio je:

Inicijalna denaturacija	96 °C	1 min	} 25 ciklusa
Denaturacija	96 °C	10 s	
Aniling	50 °C	5 s	
Ekstenzija	60 °C	4 min	
Finalna ekstenzija	4 °C	$\infty$	

Posle završene PCR reakcije za sekvenciranje PCR produkti su precipitirani Na-acetatom i 70% rastvora etanola prema protokolu opisanom od strane Maniatis i sar. (Maniatis T et al. 1982). Precipitacija je vršena dodavanjem 40 µl Na-acetata u PCR smešu, za čim je sledio korak centrifugiranja (13000rpm, 10min). U talog je potom dodato 200 µl 70% hladnog rastvora etanola. Nakon centrifugiranja (13000rpm/20min), talog je potpuno osušen, i zatim rastvoren u 25 µl *HiDi Formamide* reagensa (*Applied Biosystems Life Technologies, California, USA*). Cela zapremina je korišćena za sekvenciranje na automatskom sekvenceru *3130 Genetic Analyzer* prema instrukcijama proizvođača (*Applied Biosystems Life Technologies, California, USA*). Očitavanje sekvenci vršeno je upotrebom softvera *Sequencing Analysis Software v5.3.2 with KB Basecaller v1.4* (*Applied Biosystems Life Technologies, California, USA*).

### 3.2.1.7. *In silico* analiza novootkrivene varijante *c.596T>C*; *p.Val199Ala* u *GCK* genu

Za *in silico* analizu novootkrivene varijante u genu za *GCK:c.596T>C*; *p.Val199Ala*, korišćeni su sledeći bioinformatički prediktivni programi: *MutPred2*<sup>15</sup>, *PolyPhen-2*<sup>16</sup>, *PROVEAN*<sup>17</sup>, i *SIFT*<sup>18</sup>. Ovi programi vrše kompijuterske predikcije efekta nesinonimne (eng. *missense*) varijante na strukturu i funkciju proteina koja je prouzrokovana zamenom (supstitucijom) aminokiseline. Provera evolucione konzerviranosti regiona proteina u kome je došlo do promene je vršena upotrebom *Clustal Omega*<sup>19</sup> programa. Za *in silico* analizu korišćena je referentna sekvenca za gen *GCK*: NM\_000163.2, NP\_000153.1, preuzeta iz *NCBI GeneBank*<sup>20</sup> baze podataka, u FASTA formatu.

## 3.2.2. FUNKCIONALNA ANALIZA VARIJANTI U PROMOTORSKOM REGIONU GENA *GCK* I *HNF1A*

Kako bi se sprovedla funkcionalna analiza i ispitao uticaj varijanti u promotorskim regionima gena na njegovu aktivnost u *in vitro* uslovima, DNK regioni u kojima se nalaze ispitivane varijante su metodama rekombinantne DNK uklonirani u odgovarajuće vektore. Napravljeni plazmidni konstrukti su nazvani *GCKprom\_clonwt/mut* (skraćeno *GCKwt/mut*) i *HNF1Aprom\_clonwt/mut* (skraćeno *HNF1Awt/mut*), prema genu čiji je deo promotorskog regiona ispitivan.

### 3.2.2.1. Metodologija rekombinantne DNK – pravljenje plazmidnih konstrukata za ekspreimente tranzijentne transfekcije (Maniatis T et al. 1982)

Za kloniranje promotorskog regiona gena *GCK* korišćen je *pCAT basic* plazmidni vektor (*Promega*), odnosno *pBLCAT5* vektor (*Promega*) za kloniranje promotorskog regiona gena

<sup>15</sup> Mutation Prediction <http://mutpred.mutdb.org>

<sup>16</sup> Polymorphism Phenotyping V-2 <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>

<sup>17</sup> Protein Variation Effect Analyzer <http://provean.jcvi.org>

<sup>18</sup> Sorting Intolerant From Tolerant <https://sift.bii.aster.edu.sg>

<sup>19</sup> Clustal Omega <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

<sup>20</sup> NCBI GeneBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

*HNF1A*. Vektori pCATbasic i pBLCAT5 su reporterski vektori i koriste se za ispitivanje aktivnosti promotora u eukariotskim ćelijama. Oba vektora sadrže gen za enzim hloramfenikol acetiltransferazu (eng. *Chloramphenicol acetyltransferase, CAT*) ispred kog se nalazi polilinkerski region (eng. *polylinker*) sa restrikcionim mestima za veći broj enzima, među kojima se nalaze i restrikciona mesta za *HindIII* i *XbaI* enzime. Vektori sadrže i gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin, na osnovu čega se bakterije koje imaju ovaj plazmid mogu selektovati.

Umnožavanje željenog regiona PCR reakcijom je vršeno prajmerima za kloniranje koji su dati u tabeli 6. Ovi prajmeri se razlikuju od "klasičnih" po prisustvu dve vrste kratih oligonuleotidnih sekvenci koje se dodaju na 5'-kraj dizajniranog prajmera. Prvo se dodaju onlignonukleotidne sekvence (restrikciona mesta) koje će specifično prepoznati restrikcioni enzimi, u ovom eksperimentu su to bili *HindIII* i *XbaI*, a zatim, na sam kraj, kratki oligonukleotidi, koji pospešuju prepoznavanje restrikcionog mesta od strane enzima.

PCR produkti su provereni elektroforezom na 2% agaroznom gelu, a zatim prečišćeni kitom *QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)*, prema uputstvu proizvođača.

S obzirom na to da se varijanta nalazi u heterozigotnom stanju, nakon umnožavanja formiraće se dve vrste PCR produkata, oni koji sadrže *wild-type* sekvencu u homozigotnom stanju i oni kod kojih je u homozigotnom stanju pristutan varijantni alel.

U sledećem koraku su formirani lepljivi krajevi („*sticky ends*“) i na plazmidu i na PCR produktu u reakcijama digestije odabranim restrikcionim enzimima. U reakciji digestije plazmida, plazmid se „otvara“ pri čemu se formiraju „lepljivi krajevi“ koji su komplementarni lepljivim krajenima PCR produkta. S obzirom na to da se koriste isti enzimi u obe reakcije, obezbeđeno je komplementarno sparivanje krajeva plazmida i PCR produkta.

Digestija PCR fragmenta i plazmidnog vektora izvedena je prema protokolu za korišćenje restrikcionih enzima *HindIII* i *XbaI* (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, California).

Reakciona smeša za digestiju PCR fragmenta/plazmidnog vektora je sadržala:

- |                               |                                |
|-------------------------------|--------------------------------|
| → 200-300ng PCR produkta      | → 500-700ng plazmidnog vektora |
| → 1xTango pufer               | → 1xTango pufer                |
| → 2U <i>HindIII</i>           | → 2U <i>HindIII</i>            |
| → 1U <i>XbaI</i>              | → 1U <i>XbaI</i>               |
| → ddH <sub>2</sub> O do 20 µl | → ddH <sub>2</sub> O do 30 µl  |

Smeše za digestiju su potom inkubirane 16 h na 37°C. Produkti digestije su analizirani elektroforezom na 1% agaroznom gelu u slučaju digestije plazmida, odnosno 2% agaroznom gelu u slučaju digestije PCR produkta. Radi potvrde aktivnosti restrikcionih enzima, istovremeno su pripremljene kontrolne digestije u kojima je plazmid digeriran samo jednim enzimom. Linearizacija plazmida u obe jednostruke digestije je bila potvrda aktivnosti oba restrikciona enzima.

Formiranje plazmidnog konstrukta ili rekombinovanog DNK molekula koji sadrži insertovani deo DNK u plazmidnom vektoru izvršeno je u reakciji ligacije spajanjem PCR produkta i „otvorenog“ plazmida, preko komplementarnih „lepljivih krajeva“.

Ligacija PCR produkta i plazmidnog vektora urađena je prema uputstvu za korišćenje enzima ligaze *T4 DNA Ligase*, 5u/μl (*Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, California*). U reakcionoj smeši za ligaciju ukupna količina DNK ne bi trebalo da bude veća od 200 ng. Molarni odnos vektora i fragmenta je varijabilan. Za fragmente veličine slične vektoru, preporučuje se odnos 1 : 1, dok u slučaju fragmenata manjih od vektora odnos raste 1:2, 1:3, 1:5 i tako dalje.

Reakciona smeša za ligaciju finalne zapremine 20 μl je sadržala sledeće komponente (za molarni odnos 1:5):

- 100 ng digeriranog plazmida
- odgovarajuću količinu digeriranog prečišćenog PCR fragmenta u ng kako bi odnos bio 1:5
- 1X T4 pufer
- 1U T4 ligaze
- ddH<sub>2</sub>O do 20 μl

Ligaciona smeša je inkubirana preko noći na 16°C.

### 3.2.2.2. Kultivisanje bakterija

(Maniatis T et al. 1982)

U toku rada sa bakterijama neophodno je održati sterilne uslove. Iz tog razloga, sve radnje su se odvijale u neposrednoj blizini plamenika. Svo posuđe (petri šolje, menzure, stakleni sudovi, itd.), alati (eža, nastavak, čačkalica, itd.) i rastvori koji su korišćeni, prethodno su sterilisani.

*Escherichia coli* (*E. Coli*) *DH5α* bakterijski soj je korišćen za umnožavanje plazmidnog vektora. Bakterije su kultivisane u tečnom (LB, *Luria-Bertani*) medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj podlozi (LA, *Luria-Agar*) podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca, 1,5% bakto-agar). Svi medijumi za kultivisanje su sterilisani autoklaviranjem na 120°C u toku 20 min.

Bakterije *E.coli DH5α* su kultivisane na temperaturi od 37°C uz aeraciju koja je obezbeđena stalnim mešanjem na šejkeru na 180rpm, u medijumu bez antibiotika, jer soj nije rezistentan na antibiotik. Bakterije koje su usvojile plazmidni konstrukt u eksperimentima transformacije i dobile osobinu rezistencije na antibiotik ampicilin, gajene su u tečnom medijumu ili na čvrstoj podlozi, u koje je dodat ampicilin u finalnoj koncentraciji 100 μg/ml, kako bi se obezbedio selektivan rast.

### 3.2.2.3. Pripremanje *E.coli DH5α* kompetentnih ćelija za transformaciju

(Maniatis T et al. 1982)

Kompetentne ćelije su bakterijske ćelije koje imaju sposobnost da „unesu“ stranu DNK iz spoljasnje sredine bilo na prirodan ili veštački indukovan način. Bakterijske ćelije se tretiraju tako da im se ćelijska membrana učini propustljivijom, a da se pri tome ne umanjí vijabilnost samih ćelija, niti njihova sposobnost umnožavanja.

Priprema kompetentnih ćelija *E.coli DH5α* je vršena metodom kalcijum-hlorida ( $\text{CaCl}_2$ ). Prvo je postavljena prekonoćna kultura tako što je sa čvrste podloge bez antibiotika, pojedinačna bakterijska kolonija *E.coli* prenetu u 5ml tečnog medijuma i kultivisana preko noći na temperaturi od  $37^\circ\text{C}$  uz aeraciju. Narednog dana, 1 ml prekonoćne kulture je inokulisan u 20 ml svežeg tečnog medijuma i kultura je gajena na temperaturi  $37^\circ\text{C}$  uz aeraciju sve do postizanja optičke gustine  $0,3 < \text{OD}_{600} < 0,5$  (rast kulture do logaritamske faze), određene spektrofotometrom. Zatim je 2 ml dobijene kulture inokulisano u 20 ml novog tečnog medijuma. Rast kulture je nastavljen na  $37^\circ\text{C}$  uz aeraciju sve do postizanja optičke gustine od  $\text{OD}_{600}=0,5$  (rast kulture do eksponencijalne faze). Zatim su bakterije istaložene centrifugiranjem (6000 rpm / 10 min /  $+4^\circ\text{C}$ , Sorvall centrifuga, rotor SS-34). Dobijeni talog je resuspendovan u 10 ml hladnog 100 mM  $\text{CaCl}_2$  i inkubiran na ledu 10 minuta, a zatim centrifugiran pri istim uslovima. Talog kompetentnih ćelija je resuspendovan u 2 ml hladnog rastvora 100 mM  $\text{CaCl}_2$  sa 15% glicerolom. Ovako pripremljene kompetentne ćelije su sačuvane u alikvotima od 200  $\mu\text{l}$  na temperaturi  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 3.2.2.4. Transformacija *E.coli DH5α* kompetentnih ćelija (Maniatis T et al. 1982)

Transformacija je proces unošenja „strane“ DNK u bakterijsku ćeliju. Bakterijske ćelije efikasno replikuju sopstvenu, ali i unetu plazmidnu DNK čime se dobija velika količina plazmida, tj željenog plazmidnog konstrukta.

Transformacija *E.coli DH5α* kompetentnih ćelija rekombinantnim plazmidom je vršena metodom toplotnog šoka (eng. *heat shock transformtion*). Temperaturni šok povećava propustljivost membrana, čime se omogućuje ulazak plazmidnog konstrukta u pripremljenu kompetentnu ćeliju.

U 200  $\mu\text{l}$  suspenzije kompetentnih ćelija dodata je cela zapremina ligacione smeše i inkubirana na ledu 1 sat. Smeša je potom izložena temperaturnom šoku, prebacivanjem na  $42^\circ\text{C}$  u trajanju od 2 min, a potom vraćena na led 5 min. U transformisane ćelije (transformante), dodato je 800  $\mu\text{l}$  tečnog medijuma, bez antibiotika, koje su potom gajene 30-60 min na  $37^\circ\text{C}$ , uz aeraciju, kako bi se ćelije oporavile. Oporavak ćelija nastavljen je nakon dodavanja svežeg tečnog medijuma sa antibiotikom (ampicilin finalne koncentracije 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Dobijene transformisane ćelije (100-500  $\mu\text{L}$ ) su utrljane na čvrstu podlogu sa antibiotikom, i gajene preko noći na  $37^\circ\text{C}$ . Narednog dana su uočene pojedinačne kolonije. Samo bakterije kod kojih se desila transformacija, mogle su da izrastu na selektivnoj podlozi, jer sadrže plazmid sa genom za rezistenciju na ampicilin.

#### 3.2.2.5. Detekcija i izolacija plazmidnog konstrukta

Bakterije koje su izrasle na selektivnoj čvrstoj podlozi su one koje su usvojile plazmid u prosecu transformacije i time dobile osobinu rezistencije na ampicilin. Međutim, u ovako postavljenom eksperimentu, nije se moglo odrediti da li je u bakterijsku ćeliju ušao plazmidni konstrukt ili „prazan“ plazmid. Kako se ne bi svaka bakterijska kolonija proveravala sekvenciranjem, čime se dobija konačna potvrda da plazmid sarži željeni DNK fragment, metodom „brze lize“ su prvo selektovane one bakterijske kolonije koje verovatnije nose plazmidni konstrukt.

Kako se početna bakterijska kolonija ne bi „istrošila“ već u prvom uzorkovanju, ona je pažljivo zasađena na novu čvrstu selektivnu podlogu, tzv. striklovanje (eng. *streak plate method*), odakle je ista kolonija mogla da se koristi više puta za detekciju i izolaciju.

**Metoda brze lize („lysis gel electrophoresis“)**

(Barnes 1977)

Brza liza je metoda koja omogućava da se za relativno kratko vreme pretraži veliki broj bakterijskih kolonija i selektuju one koje verovatno nose plazmidni konstrukt.

U eprivetu sa 25 µl 10 mM EDTA pH 8 sterilnom čačkalicom je preneti pojedinačna bakterijska kolonija sa čvrste podloge i snažno mešana zajedno sa čačkalicom. Čačkalica je potom uklonjena, a u suspenziju ćelija je dodato 25 µl sveže napravljenog 2 X „cracking“ pufera (0,2 M NaOH, 0,5% SDS, 0,5 M saharoza). Suspenzija je inkubirana 10 min na 70°C, a potom postepeno ohlađena na sobnoj temperaturi. U suspenziju je dodato 1,5 µl 4 M KCl. Nakon inkubacije od 5 min na ledu, suspenzija je centrifugirana (13000 rpm, 5 min, +4°C). U supernatantu se nalazi plazmidna DNK koja je analizirana elektroforezom na 1% agaroznom gelu (110V, 110mA, 45min).

Bakterijske kolonije transformisane „praznim“ plazmidom su služile kao kontrola za brzu lizu. Poređenjem elektroforetske pokretljivosti plazmida izolovanih iz kontrolnih kolonija i plazmida iz ispitivanih kolonija, identifikovani su oni plazmidi koji su se kretali sporije od „praznih“ plazmida, jer su sadržali ukloniran fragment. Bakterijske kolonije koje su zaostajale, ponovo su zasejane kako bi se izvršila izolaciju plazmidne DNK na maloj skali.

**3.2.2.6. Izolacija plazmidne DNK na maloj skali („mini prep“)**

(Zhou et al. 1990)

„Mini prep“ metoda omogućava izolaciju dovoljne količine plazmidne DNK zadovoljavajuće čistoće i kvaliteta, koja može da se koristi u reakciji digestije restrikcionim enzima i tako potvrdi da li konstrukt nosi insertovani fragment.

Prvo je postavljena prekonoćna kultura tako što je sa čvrste selektivne podloge prenesena pojedinačna bakterijska kolonija u 2 ml tečnog medijuma sa antibiotikom i inkubirana preko noći na 37°C uz aeraciju. Prekonoćna kultura je presuta u mikrotubu i centrifugirana (13000rpm, 5min). Supernatant je dekantovan, a bakterijski talog resuspendovan snažnim mešanjem u zaostalom supernatantu. U suspenziju je dodato 300 µl svežeg pufera TENS za lizu bakterija (1 x TE, 0,1 N NaOH, 0,5% SDS). Suspenzija se lagano mešala okretanjem sve dok se nije dobio homogen lizat. U lizat je dodato 150 µl 3M Na-acetata pH 5,2. Nakon snažnog mešanja, suspenzija je centrifugirana (13000rpm, 2 min). Supernatant sa plazmidnom DNK je prebačen u nove mikrotube. Potom je dodat 1 ml hladnog 95% etanola, za čim je sledilo centrifugiranje (13000rpm, 2min, +4°C). Talog je ispran 70% etanolom, potom centrifugiran (13000rpm, 2min, +4°C) i ostavljen da se potpuno osuši. U osušen talog je dodato 30 µl pufera 1 x TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, pH 8) sa RNK-azom finalne koncentracije 10 µg/ml.

Na ovaj način je izolovana plazmidna DNK, zadovoljavajuće čistoće, korišćena je u reakciji digestije restrikcionim enzimima *HindIII* i *XbaI*. Ukoliko plazmid sadrži insertovani fragment, u reakciji digestije fragment će biti isečen i detektovaće se na agaroznom gelu na odgovarajućoj visini.

Ovako izolovana DNK nije dovoljno čista da bi se koristila za sekvenciranje i proveru plazmidnog konstrukta. Stoga su bakterijske kolonije kod kojih je detektovan „izbačeni“ fragment ponovo zasejane, a izolacija plazmidne DNK je izvršena komercijalnim kitom.



### 3.2.2.7. Izolacija plazmidne DNK na maloj skali

(prema uputstvu za korišćenje *QIAprep® Spin Miniprep Kit High-Yield (Qiagen)*)

Izolacijom plazmidne DNK komercijalnim kitom dobija se dovoljna količina prečišćene plazmidne DNK za sekvenciranje. Sekvenciranje je vršeno u oba smera prajmerima iz tabele 6 na prethodno opisan način (odjeljak 3.1.2.).

Prvo je postavljena prekonoćna kultura tako što je sa čvrste selektivne podloge prenesena pojedinačna bakterijska kolonija u 5 ml tečnog medijuma sa antibiotikom i inkubirana preko noći na 37°C uz aeraciju. Prekonoćna kultura je presuta u epruvetu i centrifugirana (5000 rpm, 10 min, sobna temperatura). Bakterijski talog resuspendovan je u 250 µl hladnog pufera P1, snažno promešan, a potom prebačen u mikrotubu. U suspenziju je dodato 250 µl pufera P2 (pufer za lizu). Sadržaj je promešan okretanjem tube, 10-12 puta, sve dok se nije postao plave boje. Od tog momenta sadržaj je inkubiran tačno 5 minuta, nakon čega je dodato 350 µl pufera N3 (pufer za neutralizaciju). Sadržaj je odmah promešan okretanjem tube, 10-12 puta, dok se nije obezbojio i centrifugiran (13000 rpm/10 min). Dobijeni supernatant je presut direktno na *QIAprep* kolonu. Kolona je centrifugirana (13000 rpm, 1 min), a dobijeni filtrat odbačen. Kolona je isprana sa 500 µl pufera PB, nakon čega je ponovljeno centrifugiranje (13000 rpm/1 min). U drugom ispiranju dodato je 750 µl pufera PE, za čim je sledilo centrifugiranje (13000rpm/1 min). Dodatnim centrifugiranjem (13000 rpm/1 min) uklonjeni su zaostali tragovi pufera. Kolona je prebačena u čistu mikrotubu i dodato je 100 µl pufera EB (pufer za eluciju). Nakon inkubacije od 1-10 min na sobnoj temperaturi i centrifugiranja (13000 rpm/1 min), u mikrotubi se dobija eluat koji sadrži plazmidnu DNK. Koncentracija i čistoća plazmidne DNK je izmerena na spektrofotometru.

### 3.2.2.8. Izolacija plazmidne DNK na velikoj skali

(prema uputstvu za korišćenje *EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen)*)

Izolacijom plazmidne DNK na velikoj skali dobija se velika količina plazmidne DNK, dobrog kvaliteta, koja je korišćena u eksperimentima tranzijentne transfekcije eukariotskih ćelija.

Prvo je postavljena prekonoćna kultura tako što je sa čvrste selektivne podloge prenesena pojedinačna bakterijska kolonija u 500 ml tečnog medijuma sa antibiotikom i inkubirana preko noći na 37°C uz aeraciju. Ukoliko bakterijski soj nije dostupan sa čvrste selektivne podloge, može da se koristiti i glicerolski stok, tako što se sterilnim nastavkom ili ezom dotakne sadržaj i ubaci u tečni medijum. Prekonoćna kultura presuta je dve plasitčne sterilne tube (po 250 ml) i centrifugirana (Sorvall centrifuga, rotor GS-3). Nakon centrifugiranja (6000rpm, 15min, +4°C), supernatant je dekantovan, a bakterijski talog resuspendovan sa 10 ml hladnog pufera P1. Resuspendovani talog je prebačen u sterilne plastične tube od 50 ml. Svi naredni koraci obavljali su se na ledu. U tube je dodato 10 ml pufera P2, koji lizira bakterije, i nakon mešanja okretanjem 4 do 6 puta, sadržaj je inkubiran na sobnoj temperaturi 5 minuta. Za vreme inkubacije smeše, pripremljen je *QIAfilter Cartridge*, zatvaranjem poklopca na dnu kertridža, i postavljen u odgovarajuću tubu od 50 ml. Nakon inkubacije, u dobijeni lizat dodato je 10 ml hladnog pufera P3, nakon čega je promešan okretanjem tube 4 do 6 puta, dok se nije potpuno obezbojio. Dobijeni lizat je presut u kertridž i inkubiran, bez pomeranja, na sobnoj temperaturi 10 min. Kako bi se lizat isfiltrirao, poklopac na dnu kertridža je otvoren, i pod dejstvom gravitacije dobijen je filtrat lizata u koji je dodato 2,5 ml ER pufera. Nakon mešanja okretanjem tube 10 puta, sadržaj je inkubiran na ledu 30 minuta. Za to vreme su pripremljene *QIAGEN-tip 500* kolone nanošenjem 10 ml pufera QBT. Pražnjenje kolone se odvija pod dejstvom gravitacije

u svim narednim koracima. Inkubirani filtrat je nanet na kolonu, i nakon pražnjenja ispran dva puta, dodavanjem 30 ml pufera QC. Kolona je prebačena u staklenu tubu, pečenu na 180°C tokom 12 sati (alternativno mogu da se koristi "endotoxin-free" i "pyrogen-free" tube). U kolonu je dodato 15 ml pufera QN i plazmidna DNK se eluirala dejstvom gravitacije. U eluat je dodato 10,5 ml (0,7 volumena) izopropanola sobne temperature, za čim je sledilo mešanje i centrifugiranje (9000 rpm, 45 min, +4°C; Sorvall centrifuga, rotor S-34). Supernatant je pažljivo dekantovan, a talog ispran sa 5 ml 70% etanola, za čim je sledilo još jedno centrifugiranje (9000 rpm, 20 min, +4°C; Sorvall centrifuga, rotor SS-34). Nakon pažljivog uklanjanja supernatanta, DNK talog je osušen na sobnoj temperaturi, a potom rastvoren rastvoren u 500 µl TE pufera.

### 3.2.2.9. Čuvanje transformanata

(Maniatis T et al. 1982)

Transformanti koji izrastu na čvrstoj selektivnoj podlozi su vijabilni nekoliko nedelja ukoliko se petri šolje čuvaju na +4°C, zatvorene parafilmom i okrenute poklopcem na dole. Za čuvanje transformanata na duži vremenski period pripremljeni su glicerolski stokovi koji su sadržali 150 µl sterilnog 100% glicerola i 850 µl tečne prekonoćne kulture. Glicerolski stokovi su vijabilni nekoliko godina na -20°C i duži niz godina na -80°C.

### 3.2.2.10. Čelijske linije i uslovi gajenja

(prema uputstvu proizvođača čelijskih linija)

U ovoj studiji korišćene su dve čelijske linije, HepG2 i Rin-5F, za eksperimente tranzijentne transfekcije kao i za dobijanje jedarnih (nukleusnih) ekstrakata korišćenih u EMSA eksperimentima.

HepG2 ćelije su gajene u DMEM *Low Glucose* medijumu (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA Laboratories*) sa L-glutaminom i glukozom u koncentraciji 1 g/l, u koji je dodato 10% fetalnog goveđeg seruma (eng. *fetal bovine serum, FBS*), kao i 1% antibiotik penicilin-streptomycin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

Rin-5F ćelije su gajene u RPMI-1640 medijumu (Gibco, UK) u koji je dodat 10% fetalni goveđi serum (eng. *fetal bovine serum - FBS*) kao i 1% antibiotik penicilin-streptomycin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Za ove ćelije je karakteristično da ne dostižu konfluentnost.

Obe čelijske linije su gajene u inkubatoru pod konstantnim uslovima od 37°C u atmosferi od 5% CO<sub>2</sub>.

Rad sa čelijskim linijama se odvija u sterilnim prostorijama uz primenu svih propisanih mera sterilnog rada i počinje oživljavanjem ćelija iz zamrznutih alikvota čuvanih u tečnom azotu (na -196°C). Oživljavanje ćelija je vršeno brzim odmrzavanjem alikvota ćelija direktno iz tečnog azota i resuspendovanjem u medijumu zagrejanom na 37°C. Sadržaj je presut u sterilnu tubu i centrifugiran (1500rpm, 5 min, sobna temperatura), kako bi se uklonio medijum, koji sadrži dimetilsulfoksid (DMSO), reagens u kome su ćelije zamrzavane. Čelijski talog je potom resuspendovan u medijum za kultivaciju i presut u odgovarajući flask. Rin-5F ćelije su kultivisane u 5 ml medijuma u flasku T-25, dok su HepG2 kultivisane u 10ml medijuma u flasku T-75.

HepG2, kao i Rin-5F ćelije, su adherentne ćelije i lepe se za podlogu na kojoj se gaje. Kako bi se odvojile od podloge i pasažirale, korišćen je 1x tripsin za Rin-5F, odnosno 2x tripsin za HepG2. Rin-5F ćelije su pasažiranje po dostizanju konfluentnosti od oko 70% u

odnosu 1:2, dok su HepG2 pasažiranje u odnosu 1:4 do 1:6 po dostizanju 80% konfluentnosti. Nakon uklanjanja medijuma u kome su ćelije rasle, ćelije su pažljivo isprane sa rastvorom PBS (eng. *Phosphate Buffered Saline*; 8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,24 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) kako bi se uklonile zaostale količine seruma iz medijuma koje inhibiraju aktivnost tripsina. Po ispiranju, u ćelije je dodat tripsin kako bi se ćelije odlepile od podloge. Nakon inkubacije od nekoliko minuta na 37°C, aktivnost tripsina je prekinuta dodavanjem ekvivalentne količine medijuma u odnosu na dodatu količinu tripsina. Ćelije su pažljivo resuspendovane do pojedinačne ćelije i subkultivisane u nove petri šolje (ø 10cm) u odgovarajućem odnosu.

Brojanje ćelija je, prema potrebi, vršeno upotrebom *Countess™ Automated Cell Counter* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) aparata, prema instrukcijama proizvođača.

### 3.2.2.11. Zamrzavanje ćelijskih linija

Zamrzavanje ćelija je vršeno u fazi logaritamskog rasta, jedan dan nakon pasažiranja. Tripsinizovane i isprane ćelije su centrifugirane (1500rpm, 5 min) kako bi se istaložile. Nakon toga ćelije su resuspendovane u medijumu za zamrzavanje i prebačene u kriotube. Medijum za zamrzavanje sastoji se iz medijuma za kultivisanje u koji je dodato 10% seruma i 5% dimetilsulfoksida (*DMSO, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany*). DMSO je krioprotektivni agens koji obezbeđuje vezivanje vode i time smanjuje verovatnoću stvaranja kristala leda koji mogu da oštete ćelije. Kriotube su stavljene u posebnu kutiju, koja sadrži izopropil alkohol, u kojima se postepeno spušta temperatura unutar kutije, iako se stavlja direktno na -80°C. Narednog dana ćelije su smeštene u tečni azot (-196°C), gde mogu da se čuvaju duži niz godina.

### 3.2.2.12. Tranzijentna transfekcija ćelija HepG2 i Rin-5F lipofektaminom

(prema uputstvu za korišćenje *Lipofectamine® 2000* (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA))

Rin-5F ćelije su transfekovane plazmidnim konstruktima pCAT\_GCKprom\_wt/mut, a HepG2 ćelije plazmidnim konstruktima pBLCAT5\_HNF1Aprom\_wt/mut. Pozitivnu kontrolu, u oba slučaja, činile su ćelije transfekovane plazmidnim vektorom pBLCAT5. U svim eksperimentima istovremeno je vršena i kotransfekcija plazmidom pCH110, koji je služio kao kontrolni vektor za normalizaciju efikasnosti transfekcije (za β-galaktozidazni esej).

HepG2 i Rin-5F ćelije su transfekovane upotrebom reagensa lipofektamin (*Lipofectamin 2000*). Lipofektamin formira komplekse oko DNK, i stapajući se sa ćelijskom membranom, doprema stranu DNK eukariotskim ćelijama.

Jedan dan pre transfekcije,  $1,2 \times 10^6$  Rin-5F i  $2,5 \times 10^5$  HepG2 ćelija je zasejano u petri šolju (ø 3cm) u 2 ml medijuma za gajenje ćelija sa 10% serumom, ali bez antibiotika. Nakon 24h, vršena je transfekcija. Prvo je u mikrotubi pomešano 4 µg odgovarajućeg plazmidnog konstrukta i 2 µg plazmida pCH110 (ukupno 6 µg plazmidne DNK) i 250 µl medijuma *Optimem* (Invitrogen). U drugoj tubi, 10 µl lipofektamina je pomešano sa 250 µl medijuma *Optimem* i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, smeša sa lipofektaminom je pomešana sa smešom koja sadrži plazmidnu DNK i inkubirana 20

minuta na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije, 500  $\mu$ l smeše sa lipofektamin-plazmidna DNK kompleksom je dodato, kap po kap, u petri šolju sa ćelijama. Ćelije su, potom, inkubirane 48 h pri standardnim uslovima.

### 3.2.2.13. Priprema ćelijskih ekstrakata za CAT i $\beta$ -galaktozidazni esej

(prema protokolu za pripremu ćelijskih ekstrakata iz uputstva za  *$\beta$ -galactosidase Enzyme Assay System (Instruction product E2000), Promega*)

Priprema ćelijskih ekstrakata vršena je metodom cikličnog zamrzavanja i otapanja ćelija (eng. *Freeze-Thaw method*). Nakon 48 h od transfekcije, ćelije su 2 puta pažljivo isprane sa 1x PBS-om od medijuma, nakon čega je u petri šolje sa ćelijama dodato 300  $\mu$ l pufera TEN (40 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8, 150 mM NaCl). Ćelije su inkubirane u puferu 5 minuta, a potom sastrugane sa petri šolje. Sastrugane ćelije su prebačene u mikrotubu i centrifugirane (13000rpm, 1 min, +4°C). Supernatant je uklonjen, a u talog je dodato 150  $\mu$ l 0,25 M tris-HCl pH 8,0, nakon čega je sadržaj snažno promešan. Liza ćelija je vršena naizmeničnim zamrzavanjem ćelija u tečnom azotu, i otapanjem u vodenom kupatilu na 37°C uz snažno mešanje nakon svakog koraka, što je ponovljeno 3 puta. Dobijeni lizirani sadržaj je centrifugiran (13000rpm, 5 min, +4°C). Supernatant sa ćelijskim ekstraktima je prebačen u dve nove mikrotube: 30  $\mu$ l za  $\beta$ -galaktozidazni esej i 70  $\mu$ l za CAT eselisa esej. Ovako pripremljeni ekstrakti se mogu koristiti odmah za izvođenje eseja, ili zamrznuti na -80°C.

### 3.2.2.14. Beta galaktozidazni esej

(prema uputstvu za korišćenje  *$\beta$ -galactosidase Enzyme Assay System Kit, Promega*)

Beta galaktozidazni ( $\beta$ -galaktozidazni) esej se koristi da bi mogla da se izvrši normalizacija rezultata CAT eseja u odnosu na efikasnost transfekcije u pojedinačnom uzorku. Iz tog razloga je u eksperimentima transfekcije ćelija plazmidima pCATbasic i pBLCAT5, istovremeno izvršena i kotransfekcija sa plazmidom pCH110 koji nosi gen za  $\beta$ -galaktozidazu. Esej se zasniva na sposobnosti  $\beta$ -galaktozidaze da hidrolizuje bezbojni substrat ONPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid). Kao produkt reakcije nastaje o-nitrofenol, produkt žute boje, koji može kolorimetrijski da se kvantifikuje.

Priprema eseja odvijala se na ledu. Ćelijski ekstrakti (30  $\mu$ l) su pomešani sa istim volumenom pufera za esej (*Assay 2x buffer*: 200 mM natrijum fosfatni pufer pH 7,3; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM  $\beta$ -merkaptotanol; 1,33 mg/ml ONPG) i inkubirani ~1h do razvijanja boje na 37°C u pokrivenoj mikrotitar ploči sa ravnim dnom. Merenje apsorbance na talasnoj dužini od 420 nm vršeno je pomoću čitača za mikroploče (*Microplate reader Multiscan RC, Labsystems*).

Radi određivanja koncentracije  $\beta$ -galaktozidaze u uzorku, napravljena je standardna kalibraciona kriva pravljenjem serije razblaženja  $\beta$ -galaktozidaze (*Promega*), uključujući blank. Za ovako pripremljen eksperiment napravljena su sledeća razblaženja: 0,19 mU, 0,39 mU, 0,78 mU, 1,56 mU, 3,125 mU, 6,25 mU i 12,5 mU.

### 3.2.2.15. CAT ELISA esej

(prema uputstvu proizvođača eseja *CAT ELISA, Roche*)

CAT ELISA esej je kolorimetrijski enzimski imunoesej za kvantifikaciju ekspresije hloramfenikol acetiltransferaze (*Chloramphenicol acetyltransferase, CAT*) u eukariotskim ćelijama koje su transfekovane plazmidom koji nosi reporterski gen *CAT*. CAT ELISA esej se zasniva na „sendvič“ ELISA principu i izvodi se na mikrotitar ploči za koju je vezano antitelo za CAT (Anti-CAT) za koje se specifično vezuje ukupna hloramfenikol acetiltransferaza prisutna u uzorku (ili standardu). Za hloramfenikol acetiltransferazu specifično se vezuje primarno antitelo koje je obeleženo digoksigeninom (anti-CAT-DIG), a za njega se vezuje sekundarno antitelo koje je konjugovano sa peroksidazom (anti-DIG-POD). Kada se doda substrat za peroksidazu (ABTS), peroksidaza razlaže substrat i dobija se obojeni produkt, čija se apsorbanca meri na talasnoj dužini 405/490nm. Apсорbanca uzorka određuje se pomoću čitača za mikrotitar ploču i direktno je proporcionalna nivou hloramfenikol acetiltransferaze prisutne u uzorku.

Pripremljeni ćelijski ekstrakti (70  $\mu$ l) su pomešani sa puferom za uzorak (*Sample buffer*) do finalne zapremine 200  $\mu$ l, a zatim nanese u bunariće na mikrotitar ploči. Uzorci su pokriveni kako bi se zaštitili od svetlosti i inkubirani (37°C, 1 h). U ovom koraku vrši se vezivanje hloramfenikol acetiltransferaze za antitelo na mikrotitar ploči. Bunarići su potom ispirani 5 puta sa po 250  $\mu$ l pufera za ispiranje (*Washing buffer*). Nakon ispiranja u bunariće je dodato 200  $\mu$ l rastvora anti-CAT-DIG antitela (*Anti-CAT-DIG working dilution*). Mikrotitar ploča je pokrivena i inkubirana (37°C, 1 h). Nakon inkubacije ponovljeno je ispiranje (5x 250  $\mu$ l *Washing buffer*). Zatim je dodato 200  $\mu$ l rastvora anti-DIG-POD antitela (*Anti-DIG-POD working dilution*) i nakon inkubacije (37°C, 1 h) bunarići su isprani (5x 250  $\mu$ l *Washing buffer*). U poslednjem koraku je dodato 200  $\mu$ l sveže napravljenog rastvora POD substrata sa pojačivačem (*POD substrate with substrate enhancer*). Uzorci su pokriveni i inkubirani 30-60 min do razvijanja boje, nakon čega je izmerena apsorbanca na čitaču za mikroploče (*Microplate reader Multiscan RC, Labsystems*).

Radi određivanja koncentracije proteina u uzorku, napravljena je standardna kalibraciona kriva pravljenjem serije razblaženja CAT enzima (Roche kit), uključujući blank. Za ovako pripremljen eksperiment napravljena su sledeća razblaženja: 0,78 pg, 1,5625 pg, 3,125 pg, 6,25 pg, 12,5 pg, 25 pg i 50 pg.

Vrednosti dobijenih aktivnosti CAT enzima normalizovane su u odnosu na aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze poreklom sa pCH110 plazmida. Normalizovane CAT aktivnosti plazmidnih konstrukata su izražene relativno u odnosu na normalizovanu vrednost CAT aktivnosti pBLCAT5 plazmida, i predstavljene su kao srednja vrednost $\pm$ SD dobijena iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Srednje vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poredene Studentovim t-testom. Kao mera statističke značajnosti uzeta je p vrednost manja od 0,05.

### 3.2.3. ANALIZA INTERAKCIJE DNK I JEDARNIH PROTEINA

Za proučavanje interakcija jedarnih proteina sa DNK sekvencom korišćena je metoda usporene elektroforetske pokretljivosti (eng. *Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA*). Pri određenim uslovima jedarni proteini se, ukoliko imaju afinitet za određene sekvence DNK, vezuju za iste, formirajući komplekse koji se u električnom polju kreću sporije nego slobodan DNK fragment.

Sprovođenje EMSA eseja podrazumevalo je prethodnu pripremu ekstrakata jedarnih proteina izolovanih iz odgovarajućih ćelija i obeležavanje oligonukleotidnih proba radioizotopom  $^{32}\text{P}$ .

### 3.2.3.1. *In silico* analiza varijanti u promotorskom regionu

*In silico* analiza varijanti u promotorskom regionu urađena je pomoću dva *online* dostupna programa: TRANSFAC<sup>21</sup> i ConSite<sup>22</sup>. Za *in silico* analizu korišćene su referentne sekvence preuzete iz NCBI GeneBank<sup>23</sup> baze podataka: NM\_000163.2 za promotorski region gena *GCK* i NM\_000545.5 za promotorski region gena *HNF1A*.

### 3.2.3.2. Izolacija jedarnih proteina iz Rin-5F i HepG2 ćelija (Schreiber et al. 1989)

Za izolaciju jedarnih proteina iz ćelijskih linija, HepG2 i Rin-5F bilo je potrebno  $1 \times 10^6$  ćelija. Ćelije su posle taloženja i ispiranja u PBS-u resuspendovane u 400  $\mu\text{l}$  u hladnog pufera A (10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl, 0,1mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF). Nakon inkubacije od 15 minuta na ledu, u ćelije je dodato 25  $\mu\text{l}$  10% rastvora Nonidet NP-40. Nakon snažnog mešanja, smeša je centrifugirana (13000rpm, 30s). U talog, u kome se nalaze ćelijska jedra, je dodato 50  $\mu\text{l}$  hladnog pufera C (20 mM HEPES pH 7,9; 0,4 M NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 mM PMSF). Nakon mešanja sadržaja na platformi za mešanje (15 min, +4°C), suspenzija je centrifugirana (13000rpm, 5 min, +4°C). Dobijeni supernatant, koji sadrži jedarne proteine, je alikvotiran (po 10  $\mu\text{l}$  i 20  $\mu\text{l}$ ) i čuvan na -80°C.

### 3.2.3.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu (Bradford 1976)

Koncentracija proteina merena je metodom po Bradfordu koja se zasniva na vezivanju boje komazi plavo (engl. *Coomassie Brilliant Blue*) za proteine. Koncentracija se određuje spektrofotometrijski merenjem intenziteta boje koji je proporcionalan koncentraciji proteina. U 790  $\mu\text{l}$  vode je rastvoreno 10  $\mu\text{l}$  uzorka (izolovanih jedarnih proteina), a zatim je dodato 200  $\mu\text{l}$  reagensa *Protein Assay Dye Reagent (Bio Rad)* koji sadrži boju komazi plavo. Nakon inkubacije od 5 min u mraku na sobnoj temperaturi, vršeno je merenje apsorbance na talasnoj dužini od 595 nm na spektrofotometru (*Ultrospec 3300 Pro, Amersham Biosciences*). Radi određivanja koncentracije proteina u uzorku, neophodno je napraviti standardnu krivu tako što se poznata razblaženja BSA (*Bovine Serum Albumin*) proteina (1 mg/ml), uključujući blank, pripremaju i mere na isti način kao i uzorci.

<sup>21</sup> TRANSFAC - <http://genexplain.com/transfac/>

<sup>22</sup> ConSite - <http://consite.genereg.net/>

<sup>23</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

### 3.2.3.4. Obeležavanje probe radioizotopom $\gamma$ - $^{32}\text{P}$

(prema uputstvu za korišćenje *T4 Polynucleotide Kinase*, *T4 PNK (Fermentas)*)

Za proučavanje interakcije jedarnih proteina sa regulatornom sekvencom dizajnirane su probe, odnosno, kratki dvolančani molekuli DNK koji sadrže sekvencu kod koje se ispituje potencijalna interakcija jedarnih proteina. Svaka proba se sastoji iz dva komplementarna jednolančana oligonukleotida koja se u reakciji hibridizacije spajaju. Da bi se ispitalo da li proučavana varijanta menja interakciju jedarnih proteina sa DNK, dizajnirane su dve vrste proba: one koje imaju *wild-type* sekvencu i one koje sadrže varijantu u sekvenci. Oligonukleotidi korišćeni u EMSA esejima prikazani su u tabeli 7.

Obeležavanje proba vršeno je pomoću  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  ATP u reakciji katalizovanoj enzimom T4 kinazom. T4 kinaza prebacuje  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  fosfatnu grupu sa ATP na 5'-hidroksil kraj jednolančanog oligonukleotida.

Reakcija obeležavanja je vršena upotrebom T4 kinaze iz kita *T4 Polynucleotide Kinase* koji je sadržao sve neophodne reagense za odvijanje reakcije. Reakciona smeša finalne zapremine 20  $\mu\text{l}$  je sadržala:

- 5 pmol *coding* oligonukleotidne sekvence
- 1 x pufer A iz kita
- 1  $\mu\text{l}$   $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  ATP
- 4  $\mu\text{l}$  24% PEG 6000 rastvor iz kita
- 10 U T4 kinaze
- ddH<sub>2</sub>O do 20  $\mu\text{l}$

Smeša je inkubirana 30 minuta na 37°C. Nakon inkubacije, smeša je prečišćena upotrebom kolonice G-50 (*GE Healthcare*) za prečišćavanje DNK od radioizotopa, prema uputstvu proizvođača, kako bi se uklonio neograđeni aktivitet. Nakon prečišćavanja, dobijen je eluat koji je sadržao obeležen *coding* oligonukleotid, čiji je specifični aktivitet meren na scintilacionom brojaču.

Eluat je potom u potpunosti uparen upotrebom vakuum centrifuge. U narednom koraku, u reakciji hibridizacije sa komplementarnim *non-coding* oligonukleotidom formirana je proba. Upareni eluat je rastvoren u 25  $\mu\text{l}$  10 puta razblaženog pufera za renaturaciju (10 mM Tris-Cl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Zatim je dodat komplementarni *non-coding* oligonukleotid u velikom višku (5x veća koncentracija, 25 pmol) kako bi svi obeleženi *coding* oligonukleotidi hibridizovali sa *non-coding* oligonukleotidom. Reakcija hibridizacije se odvijala na temperaturi 90° C u toku 3 minuta, nakon čega je smeša postepeno ohlađena na sobnoj temperaturi. Specifični aktivitet probe određen je na scintilacionom brojaču.

Pored radioaktivno obeleženih proba, na isti način, pripremljene su i neobeležene probe koje su imale ulogu specifičnih kompetitora (tzv. „hladna proba“).

### 3.2.3.5. Metoda usporene elektroforetske pokretljivosti (*Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA*) ((Fried and Crothers 1981), modifikovano)

EMSA metodom ispitivana je interakcija jedarnih proteina izolovanih iz HepG2 i Rin-5F ćelija sa odgovarajućim promotorskim regionom.

Reakciona smeša za EMSA esej, finalne zapremine 25  $\mu$ l, sastojala se iz:

- 10000 cpm  $^{32}$ P obeležene dvolančane probe
- 6  $\mu$ g jedarnih proteina
- 1 x pufera za vezivanje (10 x pufer: 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 250 mM NaCl, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 50 % glicerola)
- 50 ng nespecifičnog dvolančanog kompetitora *Poly(dI-dC)* (*Sigma-Aldrich*)

Za ispitivanje specifičnosti vezivanja jedarnih proteina za probu, smeši je dodat specifični kompetitor - neobeležena proba („hladna proba“) dodata u ekvimolarnom odnosu i u 10 puta molarnom višku u odnosu na obeleženu probu.

Reakciona smeša je pripremana na ledu, a potom inkubirana na 37°C tokom 30 min. Nakon inkubacije jedarnih proteina sa probom, reakcionoj smeši je dodato 6  $\mu$ l komercijalne boje *6x Loading Dye* (0,25%, brom fenol plavo, 0,25% ksilen cijanol, 30% glicerol) i potom je smeša naneta na 4% poliakrilamidni gel.

Poliakrilamidni gel pripremljen je od sledećih reagenasa:

- akrilamid : N,N-metilenbisakrilamid = 29 : 1;
- 1 x TBE pufer (9 mM Tris, 89 mM borna kiselina, 2 mM EDTA pH 8),
- 0,1% APS (amonijumpersulfat),
- 0,1% TEMED (tetrametiletilendiamin).

Elektroforeza se odvijala u 0,5 x TBE puferu (45 mM Tris, 45 mM borna kiselina, 1 mM EDTA pH 8), pri konstantnom naponu od 250 V i struji od 55 mA u toku jednog sata. Poliakrilamidni gel je sušen i analiziran na aparatu *Phosphor Imager* (*Cyclone, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA*) ili razvijanjem radiografskih filmova.



## REZULTATI

## 4.1. Molekularno–genetička analiza pacijenata sa varijantama u MODY genima

Metodom sekvenciranja nove generacije (NGS) analizirano je 29 uzoraka pacijenata sa kliničkim simptomima karakterističnim za MODY dijabetes. Panel za detekciju varijanti korišćen u studiji nije sadržao poslednje otkriven MODY gen, gen *APPL1*, te je analizirano 13 prethodno opisanih MODY gena koji su postojali na panelu. Kontrolna grupa sastojala se od 57 ispitanika iz Srbije, čiji su genomski profili dobijeni istom metodologijom i od kojih je oformljena interna baza genomskih profila koja je korišćena za utvrđivanje učestalosti detektovanih varijanti ili eliminaciju potencijalnih populaciono specifičnih varijanti. Kod 12 pacijenata urađena je i MLPA analiza za detekciju velikih delecija kod pacijenata kod kojih su postojale renalne abnormalnosti ili nisu detektovane genske varijante metodom NGS.

### 4.1.1. Spektar varijanti detektovanih u MODY genima

Kombinovanjem dve savremene metode, NGS i MLPA, detektovano je ukupno 20 različitih varijanti u 4 MODY gena kod 22 (75,9%) pedijatrijska pacijenta (Tabela 8). U genu *GCK* detektovano je jedanaest varijanti (11), u genu *HNF1B* pet (5) varijanti i u genima u *HNF1A* i *NEURODD1* po dve varijante. Sve detektovane varijante su bile svojstvene pojedinačnim pacijentima, osim jedne varijante u genu *NEUROD1* koja je detektovana kod tri nesrodna pacijenta. Po tipu promene, najveći broj varijanti su bile nukleotidne zamene koje su dovele do nesinonimne aminokiselinske zamene u proteinu (*missense* varijante) (80%), dok su ostatak činile velike delecije (10%), i po jedna insercija (5%) i delecija (5%) jednog nukleotida koja su dovele do pomeranja okvira čitanja (*frameshift* varijante). Osim jedne u homozigotnom stanju u *NEUROD1* genu, sve ostale su bile heterozigotne varijante. Varijante koje su identifikovane NGS metodom kod pacijenata su potvrđene sekvenciranjem po Sangeru. Sve varijante su potvrđene i kod roditelja kada je za to postojao dostupan uzorak.

U *GCK* genu je detektovano 11 različitih varijanti kod 11 (50%) pacijenata sa varijantama u MODY genima. Varijante su bile svojstvene pojedinačnim pacijentima i potvrđene su kod jednog roditelja. Sve varijante su bile tipa *missense* i dovele su do aminokiselinske zamene u proteinu za enzim glukokinazu. Najviše varijanti je detektovano u egzonu 7, i to četiri, dok su u egzonu 5 detektovane dve varijante, a po jedna u egzonima 3, 4, 6, 8 i 9. Sve varijante su bile prethodno prijavljene i poznate u literaturi, osim jedne u egzonu 5 *c.596T>C*; *p.Val199Ala*. Ova varijanta nije pronađena ni u jednoj od korišćenih baza podataka, niti u dostupnoj naučnoj literaturi i prvi put je identifikovana kod pacijenta u ovoj studiji. *In silico* predikcija je korišćena kako bi se predvideo efekat varijante na strukturu i funkciju proteina.

U *HNF1B* genu detektovano je 5 različitih varijanti prethodno prijavljenih u literaturi kod 5 pacijenta (22,7%). Varijante su činile 2 *missense* varijante, 1 delecija pojedinačnog nukleotida koja je dovela do promene okvira čitanja (*frameshift*) i 2 velike delecije detektovane metodom MLPA. Jedna delecija je obuhvatila egzone 3 i 4 (*c.545-?\_1045+?del*, *p.Gln182\_Ser384del*), a druga je obuhvatila egzone 1, 2 i 3 (*c.1-?\_809+?del*, *p.Met1\_Arg270del*). Obe delecije su pronađene u heterozigotnom stanju.

U *HNF1A* genu identifikovane su dve prethodno poznate varijante kod 2 pacijenta (9,1%), jedna *missense* i jedna nukleotidna insercija, koja je dovela do promene okvira čitanja, dajući skraćeni protein.

U genu *NEUROD1* detektovane su dve već poznate varijante kod 4 pacijenta (18,2%), s tim da je varijanta *c.590C>A, p.Pro197His* detektovana kod dva pacijenta u heterozigotnom stanju, i kod jednog pacijenta u homozigotnom stanju.

Tabela 8. Varijante detektovane u *MODY* genima kod klinički okarakterisanih *MODY* pacijenata

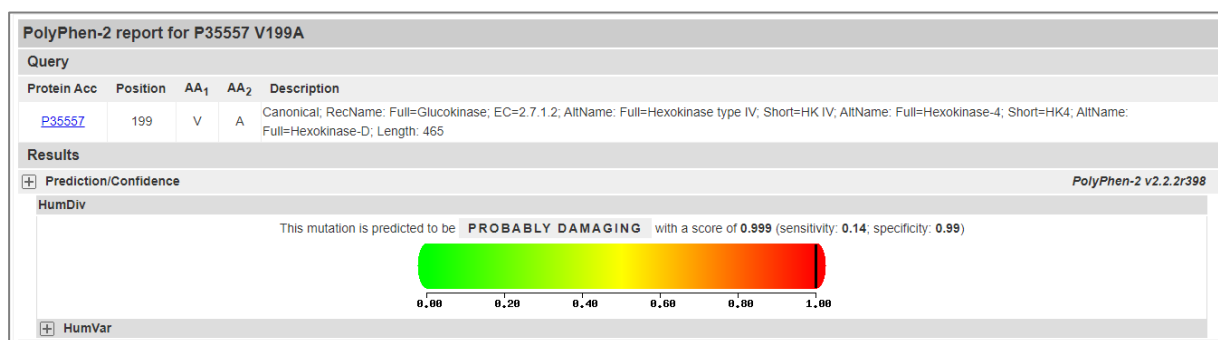
Br.P.	NGS	MLPA	GEN	EGZON	TIP PROMENE	NUKLEOTIDNA ZAMENA	AMINOKISELINSKA ZAMENA	REFERENCA
1	✓		GCK	3	<i>missense</i>	c.214G>A	p.Gly72Arg	(Arden et al. 2007; Osbak et al. 2009)
1	✓		GCK	4	<i>missense</i>	c.446C>T	p.Thr149Ile	(Osbak et al. 2009)
1	✓		GCK	5	<i>missense</i>	c.533G>A	p.Gly178Glu	(Johansen et al. 2005)
1	✓		GCK	5	<i>missense</i>	c.572G>A	p.Arg191Gln	(Massa et al. 2001; Pruhova et al. 2010)
1	✓		GCK	6	<i>missense</i>	c.596T>C	p.Val199Ala	<i>Novootkrivena varijanta</i>
1	✓		GCK	7	<i>missense</i>	c.745G>C	p.Gly249Arg	(Borowiec et al. 2012a)
1	✓		GCK	7	<i>missense</i>	c.763A>G	p.Thr255Ala	(Estalella et al. 2007b)
1	✓		GCK	7	<i>missense</i>	c.781G>A	p.Gly261Arg	(Sakura et al. 1992)
1	✓		GCK	7	<i>missense</i>	c.812T>C	p.Leu271Pro	<i>ClinVar</i> baza
1	✓		GCK	8	<i>missense</i>	c.908G>T	p.Arg303Leu	(Papadimitriou et al. 2015)
1	✓		GCK	9	<i>missense</i>	c.1148C>T	p.Ser383Leu	(Estalella et al. 2007b; Gloyn 2003)
1	✓	✓	HNF1A	1	<i>missense</i>	c.293C>T	p.Ala98Val	(Anuradha et al. 2005; Urhammer et al. 1997b)
1	✓	✓	HNF1A	4	insercija	c.872dupC	p.Pro292fs	(Yamada et al. 1997; Yamagata et al. 1998)
1	✓		HNF1B	1	<i>missense</i>	c.182T>G	p.Val61Gly	(Edghill et al. 2006; Faguer et al. 2011)
1	✓		HNF1B	2	delecija	c.477delT	p.Met160Ter	(Bingham et al. 2001)
1	✓	✓	HNF1B	4	<i>missense</i>	c.1006C>G	p.His336Asp	(Karges et al. 2007; Weber et al. 2006)
1	✓		HNF1B	1,2,3	del. egzona	c.1-?_809+?del	p.Met1_Arg270del	(Yorifuji et al. 2012)
1	-	✓	HNF1B	3,4	del. egzona	c.545-?_1045+?del	p.Gln182_Ser384del	(Edghill et al. 2013; Yorifuji et al. 2012)
3	✓	✓	NEUROD1	2	<i>missense</i>	c.590C>A	p.Pro197His	(Hansen et al. 2000; Sagen et al. 2005)
1	✓	✓	NEUROD1	2	<i>missense</i>	c.750C>A	p.Ser250Arg	ExAc baza, dbSNP baza

Legenda: Br.P.- Broj pacijenata sa varijantom;

#### 4.1.2. In silico analiza novootkrivene varijante c.596T>C; p.Val199Ala u GCK genu

Varijanta c.596T>C; p.Val199Ala, nije pronađena ni u jednoj od korišćenih baza podataka (*Varsome*, *ClinVar*, *HGMD*, *dbSNP*), kao ni u dostupnoj naučnoj literaturi, zbog čega je smatrana veoma retkom. Varijanta je analizirana prediktivnim programima *PolyPhen-2*, *SIFT*, *Provean*, *MutPred-2* i *Mutation online taster*, kako bi se predvideo efekat varijante na strukturu i funkciju proteina.

Rezultati predikcije programom *PolyPhen-2* ukazali su da je reč o promeni koja ima verovatno oštećujući efekat (*probably damaging*) na funkciju i strukturu proteina (Slika 11). *Provean* i *SIFT* prediktivni programi ukazali su da promena ima štetan efekta na funkciju proteina (slika 12). Rezultati predikcije programa *MutPred-2* (slika 13) su ukazali da varijanta ima patogen efekat, odnosno da je uzročnik obolenja (*disease causing*) prema predikciji programa *Mutation taster*. Programom *ClustalOmega* analizirana je evoluciona očuvanost aminokiseline valin na poziciji 199. Rezultati su pokazali da je kod svih analiziranih organizama na datoj poziciji aminokiselina valin, što je potvrdilo njenu evolutivnu očuvanost (slika 14). Rezultati svih predikcionih programa ukazali su da varijanta c.596T>C; p.Val199Ala ima štetan efekat na strukturu i funkciju proteina.



Slika 11. Prikaz rezultata predikcije efekta aminokiselinske zamene p.Ala199Val u genu *GCK* *PolyPhen-2* programom. Vrednost *scora* programa *PolyPhen-2* može imati vrednost od 0 do 1, pri čemu vrednosti bliže 1 označavaju promene koje najverovatnije narušavaju funkciju i strukturu proteina, a vrednosti bliže 0 predstavljaju benigne promene.

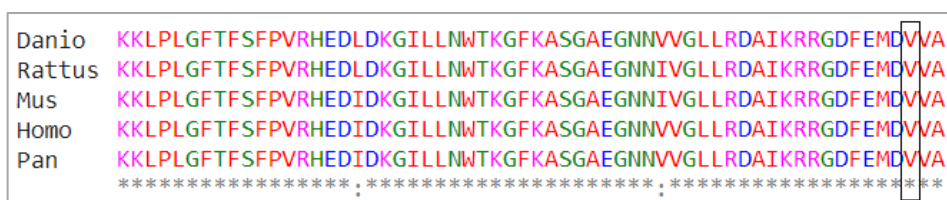
PROVEAN PREDICTION				SIFT PREDICTION		
SCORE	PREDICTION (cutoff=-2.5)	#SEQ	#CLUSTER	SCORE	PREDICTION (cutoff=0.05)	MEDIAN_INFO
-3.44	Deleterious	334	30	0.001	Damaging	2.78

Slika 12. Prikaz rezultata predikcije efekta aminokiselinske zamene p.Ala199Val u genu *GCK* programima *Provean* i *SIFT*. Vrednosti *scora* programa *Provean* ispod granične vrednosti -2,5 označavaju da promena ima štetan efekat na funkciju proteina (*deleterious*), dok vrednosti iznad praga upućuju na neutralnu promenu. Vrednost *scora* predikcije programom *SIFT* ispod vrednosti praga 0,05 ukazuju da promena ima štetan efekat na funkciju proteina (*damaging*), a za vrednosti iznad praga smatra se da promena nema efekat na funkciju proteina.



ID	Substitution	MutPred2 score
NP_000153.1	V199A	0.904

Slika 13. Prikaz rezultata predikcije efekta aminokiselinske zamene p.Ala199Val u genu *GCK* *MutPred-2* programom. *Mutpred-2* prediktivni program daje rezultat u vidu vrednosti (*score*) koja predstavlja verovatnoću da je varijanta patogena. Vrednost bliže jedinici ukazuje na verovatnoću da je varijanta patogena, dok vrednosti bliže nuli ukazuju da je promena benigna.



Danio	KKLPLGFTFSFPVRHEDLDKGILLNWTKGFKASGAEGNNVVGLLRDAIKRRGDFEMDVVA
Rattus	KKLPLGFTFSFPVRHEDLDKGILLNWTKGFKASGAEGNNIVGLLRDAIKRRGDFEMDVVA
Mus	KKLPLGFTFSFPVRHEDLDKGILLNWTKGFKASGAEGNNIVGLLRDAIKRRGDFEMDVVA
Homo	KKLPLGFTFSFPVRHEDLDKGILLNWTKGFKASGAEGNNVVGLLRDAIKRRGDFEMDVVA
Pan	KKLPLGFTFSFPVRHEDLDKGILLNWTKGFKASGAEGNNVVGLLRDAIKRRGDFEMDVVA
	*****:*****:*****:*****:*****

Slika 14. Prikaz rezultata analize evolucione očuvanosti aminokiseline valin na poziciji 199 u protein za glukokinazu *ClustalOmega* programom. Redom su poravnate sekvence dela proteina za glukokinazu iz sledećih organizama: *Danio rerio* (zebrica), *Rattus Norvegicus* (pacov), *Mus musculus* (miš), *Homo sapiens* (čovek) i *Pan troglodytes* (šimpanza). Simbol zvezdica (\*) označava pozicije na kojima se nalaze evoluciono očuvane aminokiseline.

#### 4.1.3. Klinička slika pacijenata sa potvrđenim varijantama u *MODY* genima

Kliničke karakteristike pacijenata sa detektovanim genskim varijantama u genima *GCK*, *HNF1B*, *HNF1A* i *NEUROD1* su prikazane u tabeli 9.

Pacijenti sa genskim varijantama u *GCK* genu imaju relativno uniforman fenotip, srednja vrednost glukoze naše bila je 6,78 mmol/l, a HbA1c 6,34. Hiperglikemija je detektovana između 7. i 14. godine života. Pacijenti su se odlikovali normalnom telesnom težinom. Dijabetes u porodici je prijavljen kod skoro svih pacijenata, a kod 6 pacijenata je potvrđen i kod jednog roditelja.

Pacijenti kod kojih su potvrđene promene u genu *HNF1B* imali su granične vrednosti glikemijskih parametara i normalan indeks telesne mase. Kod četiri pacijenata kod kojih su potvrđene promene u genu *HNF1B* bile su prisutne renalne abnormalnosti.

Pacijent sa potvrđenom insercijom u genu *HNF1A* (p.Pro291fs) imao je povišene glikemijske parametre, i primao je medikamentoznu terapiju za dijabetes. Promena je potvrđena kod majke i sestre, i prijavljen je dijabetes u majčinoj porodici. Kod nosioca promene p.Ala98Val postojale su renalne abnormalnosti. Ova varijanta je detektovana i u kontrolnoj grupi kod jednog ispitanika.

Nosioci promene u genu *NEUROD1* imali su sličnu kliničku sliku. Jedan pacijent je primao insulin. Takođe, među preostalim pacijentima, jedan je imao ciste na bubrezima. Varijanta je potvrđena kod jednog roditelja za tri pacijenta, dok za četvrtog nisu postojali

uzorci krvi oba roditelja (uzorak jednog roditelja je bio *wild-type*). Varijanta p.Pro197His (c.590C>A) je detektovana kod četiri ispitanika u kontrolnoj grupi.

Tabela 9. Kliničke karakteristike pacijenata sa detektovanim varijantama u genima GCK, HNF1B, HNF1A i NEUROD1.

	<b>GCK</b>	<b>HNF1B</b>	<b>HNF1A</b>	<b>NEUROD1</b>
Broj pacijenata	11	5	2	4
Pol (M/Ž)	7/4	5/0	1/1	3/1
Dijagnoza dijabetesa (godine, M±SD (opseg))	11,36 ± 2,36 (7,5 - 14,0)	10,20 ± 3,56 (7,0 - 16,0)	13,5 ± 0,5 (13,0 - 14,0)	16,5 ± 2,65 (14,0 - 20,0)
Glikemija našte (mmol/l, M±SD (opseg))	6,78 ± 0,69 (5,7 - 8,3)	5,84 ± 0,53 (5,5 - 6,7)	8,1 ± 5,09 (4,5 - 11,7)	7,05 ± 1,88 (5,0 - 9,1)
HbA1c (% , M±SD (opseg))	6,34 ± 0,25 (6,0 - 6,8)	5,86 ± 0,57 (5,4 - 6,8)	7,2 ± 2,69 (5,3 - 9,1)	5,95 ± 0,44 (5,3 - 6,3)
ITM (kg/m <sup>2</sup> , M±SD (opseg))	19,91 ± 3,11 (14,9 - 24,8)	17,5 ± 3,55 (12,7 - 22,0)	23,23 ± 0,24 (23,07 - 23,4)	22,28 ± 4,09 (18,5 - 27,8)
Dijabetes u porodici	10	3	1	4
Terapija				
Da	6	3	1	2
Insulin	0	1	0	1
Oralni medikamenti	1	0	1	0
Dijeta	5	2	0	1
Ne	5	2	1	2
Promene na bubrezima	0	4	1	1

*Kliničke karakteristike nosioca novootkrivene varijante GCK: c.596T>C; p.Val199Ala*

Varijanta GCK:c.596T>C; p.Val199Ala pronađena je kod pacijenta kod koga je u jedanaestoj godini života detektovana povišena vrednost glukoze u krvi - glikemija našte: 6,7mmol/l (normalne vrednosti <6,1mmol/l) i HbA1c: 6,2 (normalne vrednosti <5,7). Indeks telesne mase (ITM) pacijenta bio je 14,85 kg/m<sup>2</sup> (<25kg/m<sup>2</sup>). Pacijent nije zahtevao terapiju. U porodici je prijavljeno postojanje dijabetesa sa majčine strane. Majka je imala granične vrednosti glikemije bez tegoba. Kod majke je potvrđeno postojanje varijante GCK:c.596T>C; p.Val199Ala u heterozigotnom stanju, dok je kod oca detektovan normalan alel.

## 4.2. Analiza promotorskih regiona gena uzročnika MODY dijabetesa

U drugom delu studije analizirani su promotorski regioni najčešćih gena uzročnika MODY dijabetesa *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B*. Promotorski regioni ne predstavljaju rutinski deo genetičke analize kod pacijenata, međutim trebalo bi ih uzeti u obzir budući da je prijavljeno nekoliko varijanti po genu, odgovornih za nastanak MODY dijabetesa. U ovom delu istraživanja sekvencirani su promotorski regioni četiri najčešća gena uzročnika MODY dijabetesa kod 29 pacijenata.

### 4.2.1. Detekcija varijanti u promotorskim regionima MODY gena

Rezultati sekvenciranja promotorskih regiona gena *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B* prikazani su u tabeli 10.

Tabela 10. Varijante detektovane u promotorskim regionima gena *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B*

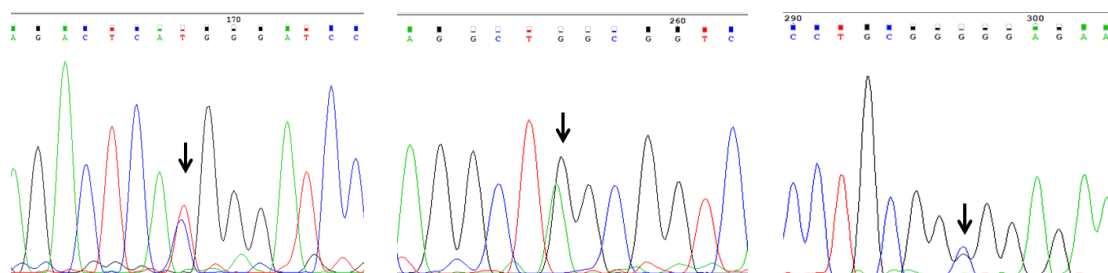
Gen	Nukleotidna zamena	Rs broj	Opšta fr. alela <sup>1</sup>	Br. nosilaca varijante	Ref.
GCK	-930C>T (c.-1416C>T)	rs1476891	0,699	26/29	BP
	-282C>T* (c.-768C>T)	rs35670475	0,0561	6/29	BP
	-194A>G* (c.-680A>G)	rs12702070	0,0576	6/29	BP
	-30G>A (c.-516G>A)	rs1799884	0,163	8/29	(Rose et al. 2005)
	402C>G* (c.-84C>G)	rs13306391	0,0675	6/29	BP
HNF1A	c.-154-160insTGGGGGT	rs538476099	0,00627	1/29	(Lopez-Garrido et al. 2013)
HNF4A	-	-	-	0/29	-
HNF1B	-	-	-	0/29	-

Napomena: Varijante u promotorskom regionu gena *GCK* su u literaturi obeležene prema „starom načinu“ obeležavanja u odnosu na start transkripcije prema Gasperikovoj i sar. (Gasperikova et al. 2009). U zagradi je prikazano obeležavanje prema referentnoj sekvenci i ATG kodonu. 1 - opšta učestalost alela prema podacima iz Varsome baze podataka. BP – varijanta postoji u bazi/bazama podataka Varsome, dbSNP, gnomAD u kojima je prijavljena učestalost u populaciji. \*- varijante označene zvezdicom su detektovane kao varijantni set i nisu pronađene kao pojedinačne varijante među analiziranim pacijentima.

U promotoru *GCK* gena pronađeno je ukupno pet varijanti. Sve varijante su bile nukleotidne zamene pojedinačnog nukleotida u heterozigotnom stanju, osim varijante -903C>T (obeleženo u odnosu na start transkripcije prema referenci (Gasperikova et al. 2009)) koja je detektovana u homozigotnom i heterozigotnom stanju. Ova varijanta je detektovana kod 89% pacijenata (utvrđena učestalost T alela iznosila je 0,55). Varijanta -30G>A je detektovana kod 27,5% pacijenata (utvrđena učestalost alela iznosila je 0,36). Preostale tri varijante 284C>T, -194A>G i 402C>G su identifikovane kod 20% pacijenata i uvek su se pojavljivale u vidu seta od tri varijante istovremeno prisutne kod nosilaca i nisu pronađene kao pojedinačne ili u kombinaciji od dve. Analizom

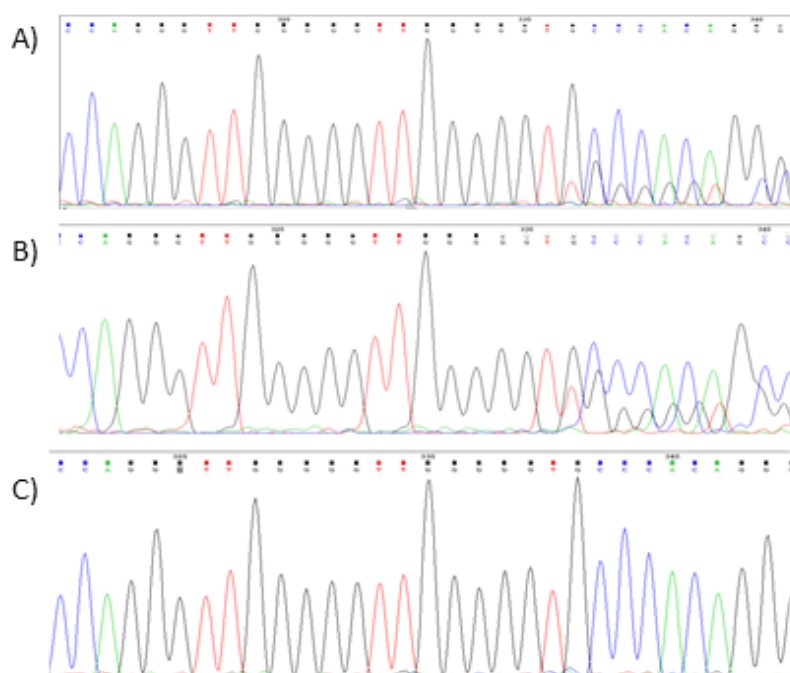


promotorskog regiona roditelja, potvrđeno je da su sve tri varijante nasleđene zajedno od jednog roditelja u pet od šest slučajeva za koliko su bili dostupni uzorci roditelja. Varijantni set je pronađen u kontrolnoj grupi kod 11% ispitanika, odnosno kod 2 od 18. Takođe, nosioci varijantnog seta nisu imali varijantu -30G>A u promotorskom regionu *GCK* gena.



Slika 15. Delovi sekvence promotorskog regiona gena *GCK* kod pacijenta kod koga su detektovane varijante -284C>T (c.-768C>T), -194A>G (c.-680A>G) i -402C>G (c.-84C>G) u heterozigotnom stanju.

U promotorskom regionu gena *HNF1A* pronađena je samo jedna varijanta c.-154-160insTGGGGGT, insercija heptanukleotida TGGGGGT, u heterozigotnom stanju (Slika 16). Normalan alel sadrži dva puta ponovljen heptanukleotid, dok varijanti alel sadrži i treći ponovak. Varijanta je potvrđena kod majke u heterozigotnom stanju, dok je otac bio nosilac normalnog genotipa (*wild-type*). Varijanta nije pronađena kod 20 zdravih kontrolnih ispitanika.



Slika 16. Deo sekvence promotorskog regiona gena *HNF1A*. A) kod pacijenta kod koga je detektovana varijanta c.-154-160insTGGGGGT (proband), B) kod majke pacijenta (varijanta potvrđena) C) kod oca pacijenta (normalan alel, *wild-type* sekvencija).

U genima *HNF4A* i *HNF1B* nije detektovana nijedna varijanta u promotorskom regionu.

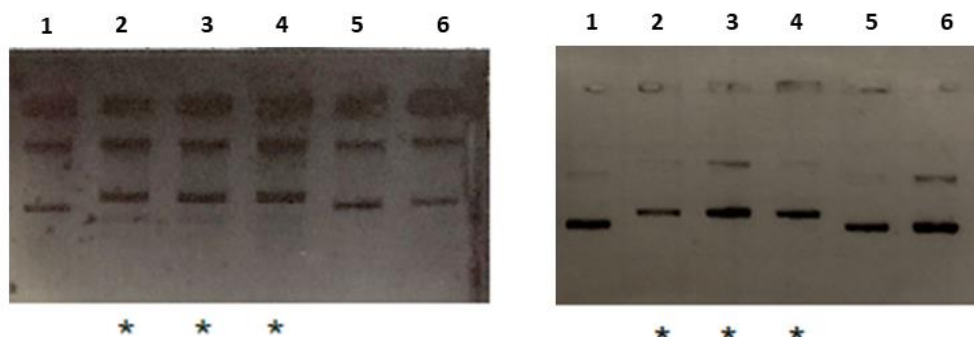
#### 4.2.2. Analiza varijantnog seta u promotorskom regionu gena *GCK*

Detektovane varijante -903C>T i -30G>A nisu bile predmet funkcionalne analize u ovoj studiji. Prva varijanta -903C>T je detektovana sa visokom učestalošću kod pacijenata iz ove studije, a takođe je u bazama podataka prijavljena visoka učestalost varijantnog alela, zbog čega nije dalje razmatrana. Varijanta -30G>A je poznata u literaturi i već je funkcionalno okarakterisana. Sa druge strane, o varijantnom setu, -284C>T, -194A>G i 402C>G, osim učestalosti svakog alela ponaosob, nije pronađena informacija o udruženom postojanju ovih varijanti, kao ni informacija da je neka od ovih varijanti asocirana sa hiperglikemijom, dijabetesom ili nekim drugim fenotipom. Kako bi ispitali efekat varijantnog seta na ekspresiju *GCK* gena sprovedena je funkcionalna analiza ovog varijantnog seta.

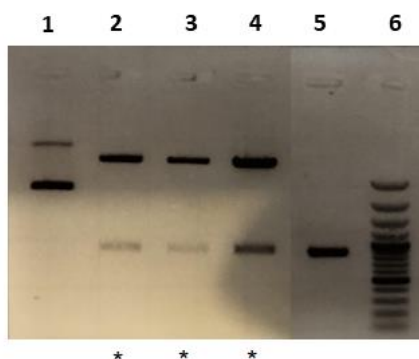
##### Priprema CAT konstrukata

Promotoroski region gena *GCK* veličine 835bp (od -319 do +516 u odnosu na start translacije), koji sadrži set varijanti, ukloniran je u pCATbasic vektor na način opisan u poglavlju Materijal i metode. Kao matrica za umnožavanje odabranog regiona služila je DNK izolovana iz krvi nosioca seta varijanti.

Detekcija konstrukata sa insertovanim fragmentom izvršena je elektroforetskom analizom plazmida izolovanih iz transformanata različitim metodama koje su opisane u poglavljima Materijal i metoda (Slike 17 i 18). Konstrukti kod kojih je uočeno zaostajanje u odnosu na pCATbasic kontrolni vektor su selektovani kao potencijalni nosioci insertovanog fragmenta i korišćeni u daljim analizama.



Slika 17. Detekcija pCATbasic konstrukta sa insertovanim fragmentom promotorskog regiona gena *GCK* iz transformanata metodom brze lize (levo) i metodom „mini prepa“ (desno). 1-5 potencijalni klonovi, 6 - pCATbasic plazmid (kontrolni plazmid bez inserta). Konstrukti kod kojih je uočeno zaostajanje su označeni zvezdicom.

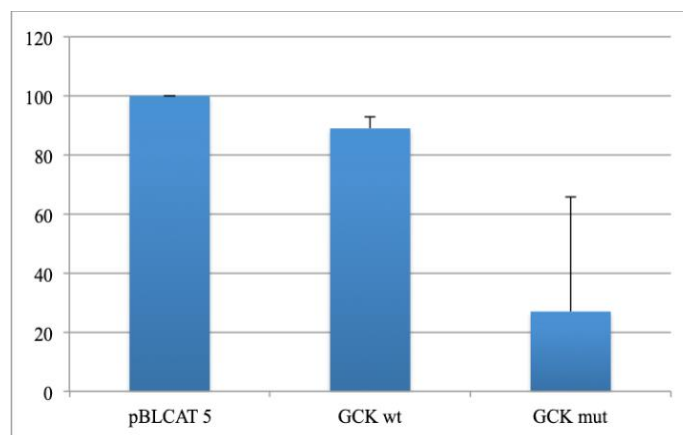


Slika 18. Detekcija insertovanog fragmenta iz promotorskog regiona gena *GCK* digestijom plazmidne DNK izolovane iz odabranog transformanta metodom "mini prep". 1 - pCATbasic plazmid, 2-4 - plazmidna DNK potencijalnog klona digerirana restrikcijom enzimima *HindIII* i *XbaI*, 5 - fragment promotorskog regiona gena *GCK* umnožen PCR reakcijom (835bp) koji predstavlja kontrolu za validaciju dobijenih digeriranih fragmenata, 6 - 1kb DNK marker.

Svi CAT konstrukti kod kojih je detektovan fragment nakon digestije su izolovani komercijalnim kitom za izolaciju plazmidne DNK. Plazmidna DNK je sekvencirana čime je dobijena potvrda uspešnosti kloniranja željenog fragmenta u plazmidni vektor.

#### 4.2.2.1. Funkcionalna analiza promotorskog regiona gena *GCK* sa i bez varijantnog seta

Promotoroski region uzvodnog promotorskog regiona *GCK* gena je ukloniran u pCATbasic reporterski vektor. Dobijeni CAT konstrukti su kotransfekovani sa pCH110 plazmidom u ćelijsku liniju Rin-5F na način opisan u poglavlju Materijal i metode. Nakon tranzijentne transfekcija Rin-5F ćelija formiranim CAT konstruktima, CAT ELISA esejem je upoređivana promotorska aktivnost *GCK* promotorskog regiona sa i bez varijantnog seta (slika 19).



Slika 19. Aktivnost promotorskog regiona gena *GCK* sa i bez ispitivanog seta varijanti (označeno sa GCKwt i GCKmut). Rin-5F ćelije su kotransfekovane odgovarajućim konstruktom i pCH110 plazmidom. Vrednosti dobijenih aktivnosti CAT enzima, merene CAT ELISA esejem, normalizovane su u odnosu na aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze poreklom sa pCH110

plazmida. Normalizovane CAT aktivnosti pojedinačnih konstrukata su izražene relativno u odnosu na normalizovanu CAT aktivnost kontrolnog pBLCAT5 plazmida, čija je aktivnost označena sa 100%. Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna devijacija dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene Studentovim t-testom. Rezultat manji od 0,05 ( $p < 0,05$ ) smatran je statistički značajnim.

Rezultati CAT ELISA eseja su pokazali trostruko manju aktivnost promotora GCKmut konstrukta (koji sadrži varijantni set -283T, -194G i 402G) u odnosu na aktivnost promotora GCKwt konstrukta (*wild-type* sekvenca), međutim ta razlika nije bila statistički značajna.

#### **4.2.2.2. Analiza vezivanja transkripcionih faktora za promotorski region GCK gena sa i bez ispitivane varijante**

##### In silico analiza promotorskog regiona gena GCK

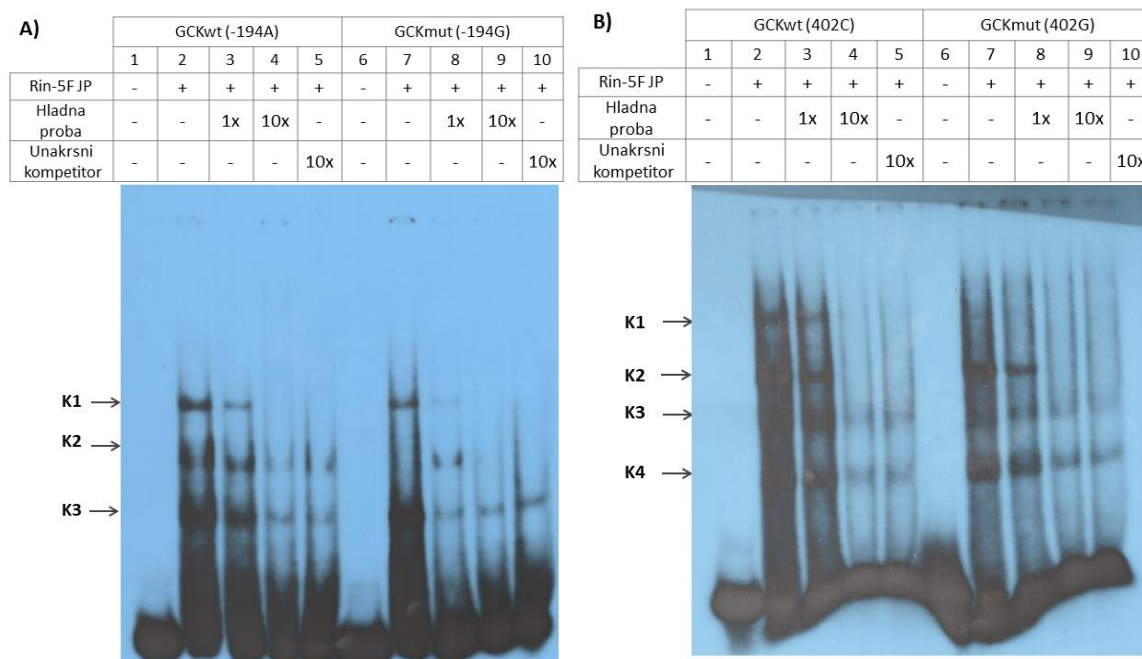
Identifikacija potencijalnih transkripcionih faktora koji se vezuju za region koji okružuje svaku varijantu ponaosob u promotorskom regionu gena *GCK* izvršena je primenom *online* prediktivnog programa *Consite*. Rezultati kompjuterske predikcije su pokazali da se za region koji sadrži varijante -194A>G i -402C>G vezuju isti transkripcioni faktori kako za *wild-type* tako i za sekvencu sa varijantnim alelom. Međutim, za varijantu na poziciji -282 (-282C>T) predikcija *Consite* programom je pokazala vezivanje transkripcionih faktora USF1 (eng. *Upstream Transcription Factor 1*) i MAX (eng. *MYC Associated Factor X*) za region koji neposredno okružuje varijantu, samo u slučaju *wild-type* alela. *In silico* predikcija je pokazala da u slučaju varijantnog alela T, ovi transkripcioni faktori izostaju.

##### Analiza interakcije promotorskog regiona gena GCK i transkripcionih faktora

Esejima usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA) analizirane su interakcije jedarnih proteina izolovanih iz Rin-5F ćelija sa probama koje su dizajnirane na način opisan u Materijal i metode. Za svaku ispitivanu varijantu -282C>T, -194A>G i 402C>G, dizajnirane su oligonukleotidne probe, dužine 30bp, koje su se razlikovale u jednom nukleotidu (*wild-type* vs. varijantni alele). Jedarni proteini za ovu analizu izolovani su iz Rin-5F ćelija. Specifičnost vezivanja jedarnih proteina je ispitana u reakcijama kompeticije dodavanjem neobeležene (hladne probe) u ekvimolarnom i 10 puta molarnom visku kao i dodavanjem unakrsne hladne probe u 10 puta molarnom visku.

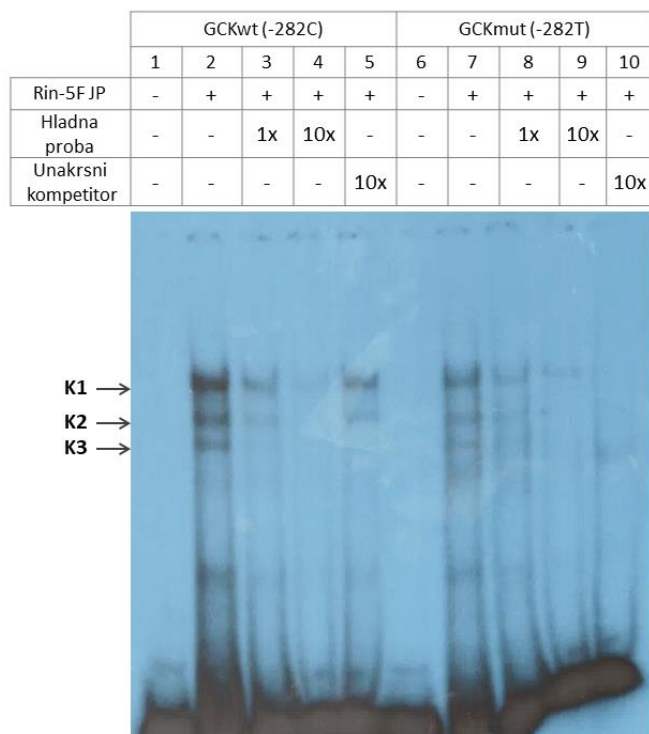
U slučaju varijanti -194A>G i 402C>G rezultati eksprimenata usporene elektroforetske pokretljivosti su pokazali vezivanje jedarnih proteina za obe probe, *wild-type* i *mut* probu. Uočeno je formiranje 3 kompleksa u slučaju varijante -194A>G (Slika 20 A) i 4 kompleksa u slučaju varijante 402C>G (Slika 20 B). Za obe varijante uočen je isti patern vezivanja jedarnih proteina kako za *wild-type* probu (GCKwt proba) tako i za probu sa varijantnim alelom (GCKmut proba) (Slika 20). Reakcije kompeticije su pokazale da su formirani kompleksi specifični, budući da je dodavanje hladne probe izazvalo „hlađenje“ kompleksa proporcionalno koncentraciji dodate neobeležene probe. U reakcijama unakrsne

kompeticije pokazano je da se formirani kompleksi „hlade“ i unakrsnom probom, što ukazuje na vezivanje istih transkripcijskih faktora kako za probu sa *wild-type* alelom, tako i za probu sa varijantnim alelom. Rezultati *in silico* analize su pokazali vezivanje istih transkripcijskih faktora i za *wild-type* i za *mut* probe u slučaju obe varijante, što je u saglasnosti sa rezultatima EMSA analize.



Slika 20. Analiza interakcije radioaktivno obeležene probe GCKwt (redovi 1-5) i GCKmut (redovi 6-10) sa jedarnim proteinima (JP) izolovanim iz Rin-5F ćelija metodom usporene elektroforetske pokretljivosti (EMSA). A) Varijanta -194A>G. Formirani kompleksi su označeni sa K1-K3. B) Varijanta 402C>G. Formirani kompleksi su označeni sa K1-K4. Specifičnost je ispitana dodavanjem hladne probe (specifični kompetitor) u ekvimolarnom odnosu (redovi 3 i 8) i u molarnom višku 10 puta (redovi 4 i 9) u odnosu na obeleženu probu, i unakrsne probe dodate u 10 puta molarnom višku (redovi 5 i 10). Redovi 1 i 6 predstavljaju kontrolu koja ne sadrži ni probu ni jedarne proteine.

Rezultati esaja usporene elektroforetske pokretljivosti za varijantu -282C>T pokazale su da se formiraju 3 kompleksa u interakciji probe i jedarnih proteina iz Rin-5F ćelija, i da su intenziteti formiranih kompleksa bili veći u slučaju *wild-type* probe u odnosu na *mut* probu (slika 21). U reakcijama kompeticije sa hladnom probom, pokazano je specifično vezivanje jedarnih proteina kako za probu koja sadrži C alel (*wild-type*), tako i za probu sa varijantnim T alelom (*mut*). U oba slučaja postojao je isti patern formiranih kompleksa. U reakcijama unakrsne kompeticije došlo je do „hlađenja“ kompleksa koji su formirali jedarni proteini i *mut* proba, ali ne i kompleksa koji su formirali jedarni proteini sa *wild-type* probom. Ovaj rezultat ukazuje da postoji vezivanje dodatnih transkripcijskih faktora koji se vezuju samo za *wild-type* probu, ali ne i za *mut* probu, što je u skladu sa *in silico* predikcijom.



Slika 21. Varijanta -282C>T. Analiza interakcije radioaktivno obeležene probe GCKwt (redovi 1-5) i GCKmut (redovi 6-10) sa jedarnim proteinima (JP) izolovanim iz Rin-5F ćelija EMSA metodom. Specifičnost je ispitana dodavanjem hladne probe (specifični kompetitor) u ekvimolarnom odnosu (redovi 3 i 8) i u 10 puta molarnom višku (redovi 4 i 9) u odnosu na obeleženu probu, i unakrsne probe dodate u 10 puta molarnom višku (redovi 5 i 10). Redovi 1 i 6 predstavljaju kontrolu koja ne sadrži ni probu ni jedarne proteine. Formirani kompleksi označeni sa K1, K2 i K3.

#### 4.2.2.3. Genotip-fenotip korelacija

Varijantni set -284C>T, -194>G i 402C>G je potvrđen kod šest od dvadesetdevet (6/29, 20,7%) pacijenata sa kliničkim karakteristikama MODY dijabetesa. U kontrolnoj grupi od 18 ispitanika identifikovan je kod 2 ispitanika (11%). Na osnovu prethodno utvrđenog efekta poznatog polimorfizma (-30G>A) u promotorskom regionu *GCK* gena da dovodi do povećanja nivoa glukoze u krvi kod nosilaca varijante, ispitano je da li i u slučaju varijantnog seta postoji povezanost prisustva varijantnog seta kod nosilaca i nivoa glukoze. Urađena je analiza asocijacija varijantnog seta i glukoze kod svih MODY pacijenata, zdravih ispitanika i kod GCK-MODY pacijenata t-testom. Rezultati analize su pokazali da ne postoji statistički značajna razlika nivoa glukoze između nosilaca varijantnog seta i „ne-nosilaca“ u grupi svih analiziranih pacijenata, kao ni u grupi zdravih ispitanika (kontrolna grupa). Međutim, u grupi GCK-MODY pacijenata u kojoj je 18,2% imalo varijantni set, pokazano je da nosioci varijantnog seta imaju statistički veće vrednosti glukoze u odnosu na GCK-MODY pacijente bez varijantnog seta (7,75 mmol/ml prema 6,57 mmol/ml; t-test  $p=0,019$ ) (Tabela 11).

Tabela 11. Analiza asocijacije varijantnog seta u GCK genu i nivoa glukoze kod pacijenata sa potvrđenom promenom u GCK genu (GCK-MODY pacijenti) i u kontrolnoj grupi ispitanika

	Vrednost glukoze našte kod nosilaca seta varijanti (sr.vr. $\pm$ SD (mmol/l))	Vrednost glukoze našte kod nosilaca normalog alela (sr.vr. $\pm$ SD (mmol/l))	p.
GCK-MODY pacijenti	7,75 $\pm$ 0,55	6,57 $\pm$ 0,16	0,019*
Kontrolna grupa	5,1 $\pm$ 0,20	4,75 $\pm$ 0,09	0,238

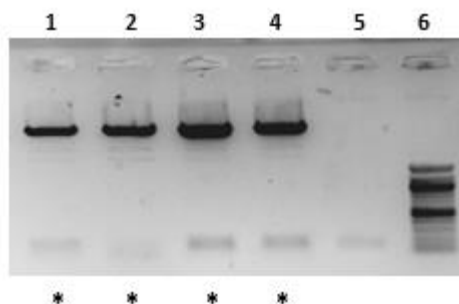
SD - standardna greška. T-test, vrednost  $P < 0,05$  je smatrana statistički značajnom.

#### 4.2.3. Analiza varijante c.-154-160insTGGGGGT u promotorskom regionu gena *HNF1A*

##### Priprema CAT konstrukata

Promotorski region gena *HNF1A* veličine 138bp (od -229 do -91 u odnosu na start translacije), koji sadrži insertciju TGGGGGT, ukloniran je u pBLCAT5 vektor. Kao matrica za umnožavanje odabranog regiona služila je DNK izolovana iz krvi nosioca varijante.

Detekcija konstrukata sa insertovanim fragmentom izvršena je elektroforetskom analizom plazmida izolovanih iz transformanata različitim metodama koje su opisane u poglavljima Materijal i metoda. Konstrukti kod kojih je uočeno zaostajanje u odnosu na pBLCAT5 kontrolni vektor su selektovani kao potencijalni nosioci insertovanog fragmenta i korišćeni u daljim analizama. Na slici 22 su prikazani rezultati digestije konstrukata koji su sadržali insertovani fragment promotora *HNF1A* gena.

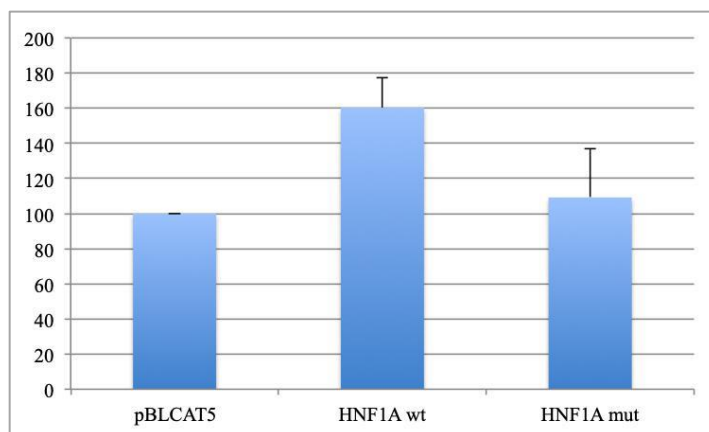


Slika 22. Detekcija insertovanog fragmenta promotorskog regiona gena *HNF1A* digestijom plazmidne DNK izolovane iz odabranog transformanta. 1-4 - plazmidna DNK potencijalnog klona digerirana restrikcijom enzimima *HindIII* i *XbaI*, 5 - fragment promotorskog regiona gena *HNF1A* umnožen PCR reakcijom (138bp), 6 - 100bp DNK marker. Zvezdica ukazuje da su svi konstrukti sadržali insertovan fragment promotorskog regiona gena *HNF1A*.

Svi CAT konstrukti kod kojih je detektovan fragment nakon digestije su izolovani *QIAprep® Spin Miniprep Kit High-Yield* kitom za izolaciju plazmidne DNK. Plazmidna DNK je sekvencirana čime je dobijena potvrda uspešnosti kloniranja željenog fragmenta u plazmidni vektor.

#### 4.2.3.1. Funkcionalna analiza varijante c.-154-160insTGGGGGT u promotorskom regionu gena *HNF1A*

Dobijeni CAT konstrukti su kotransfekovani sa pCH110 plazmidom u ćelijsku liniju HepG2 na način opisan u poglavlju Materijal i metode. Aktivnost promotora je merena CAT ELIZA esejem. Rezultati tranzijentne transfekcije HepG2 ćelija plazmidnim konstruktima su pokazali da je aktivnost konstrukta sa insercijom TGGGGGT za 30% manja u odnosu na aktivnost konstrukta koji nosi normalan alel (Slika 23), međutim razlika nije dostigla statističku značajnost.



Slika 23. Aktivnost promotorskog regiona gena *HNF1A* sa i bez insercije TGGGGGT (označeno sa HNF1Awt i HNF1Amut). HepG2 ćelije su kotransfekovane odgovarajućim konstruktom i plazmidom pCH110. Vrednosti dobijenih aktivnosti CAT enzima, merene CAT ELIZA esejem, normalizovane su u odnosu na aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze poreklom sa pCH110 plazmida. Normalizovane CAT aktivnosti pojedinačnih konstrukata su izražene relativno u odnosu na normalizovanu CAT aktivnost kontrolnog pBLCAT5 plazmida, čija je aktivnost označena sa 100%. Prikazane vrednosti predstavljaju srednju vrednost  $\pm$  standardna devijacija dobijenu iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti relativnih CAT aktivnosti su poređene Studentovim t-testom. Rezultat manji od 0,05 ( $p < 0,05$ ) smatran je statistički značajnim.



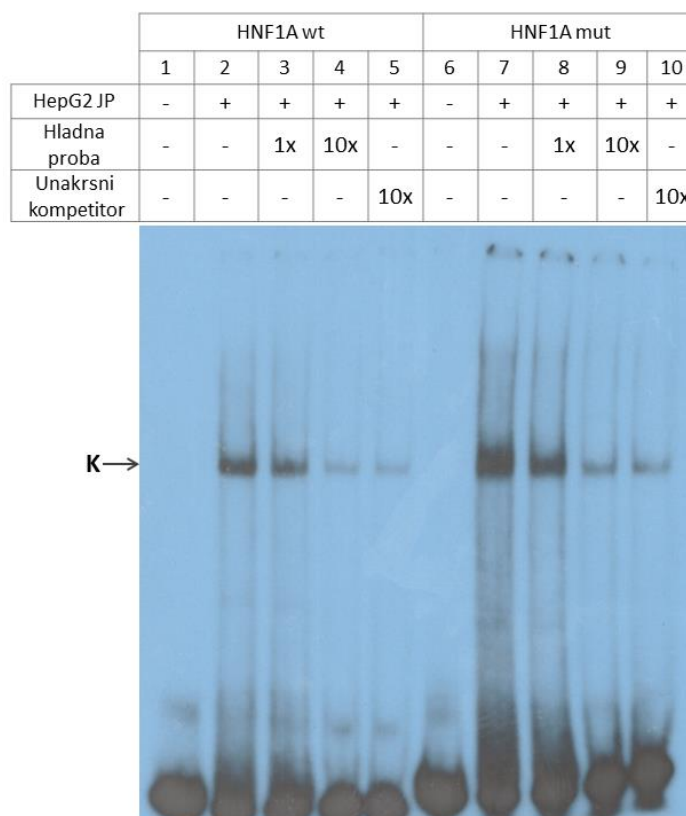
**4.2.3.2. Analiza vezivanja transkripcionih faktora za promotorski region gena HNF1A sa i bez ispitivane varijante**

In silico analiza promotorskog regiona gena HNF1A

In silico analiza je izvršena upotrebom online programa TRANSFAC® i ConSite. Rezultati predikcije oba programa su pokazali vezivanje većeg broja transkripcionih faktora. Na poziciji gde se nalazi heptanukleotid TGGGGT predikcioni programi su pokazali vezivanje transkripcionog faktora RREB1 (eng. *Ras Responsive Element Binding Protein 1, RREB1*). Wild-type sekvenca i sekvenca sa varijantom razlikuju se po prisustvu dodatnog heptanukleotida (insercije TGGGGT), a kompjuterska predikcija je i pokazala da insercije TGGGGT stvara dodatno mesto za vezivanje istog predikovanog transkripcionog faktora.

Analiza interakcije promotorskog regiona gena HNF1A sa i bez ispitivane varijante

Eskperimentima usporene elektroforetske pokretljivosti su analizirane interakcije jedarnih proteina izolovanih iz HepG2 ćelija sa probama koje su dizajnirane na način opisan u Materijal i metode. Proba koja sadrži sekvencu normalnog alela ima 2 puta ponovljen heptanukleotid TGGGGT (označeno sa HNF1Awt), a proba koja sadrži varijantu ima tri puta ponovljen heptanukleotidni TGGGGT (označeno sa HNF1Amut).



Slika 24. Analiza interakcije radioaktivno obeležene probe HNF1A wt (redovi 1-5) i HNF1A mut (redovi 6-10) sa jedarnim proteinima izolovanim iz HepG2 ćelija EMSA metodom. Specifičnost je ispitana dodavanjem hladne probe (specifični kompetitor) u ekvimolarnom odnosu (redovi 3 i 8) i u molarnom višku 10 puta (redovi 4 i 9) u odnosu na obeleženu

probu, i unakrsne probe dodate u molarnom višku 10 puta (redovi 5 i 10). Redovi 1 i 6 predstavljaju kontrolu koja ne sadrži ni probu ni jedarne proteine. Formirani kompleks označen je sa K.

Rezultati EMSA eseja pokazali su da se za obe probe, HNF1Awt i HNF1Amut, vezuju jedarni proteini iz HepG2 ćelija (Slika 24). U oba slučaja pojavio se isti patern vezivanja jedarnih proteina za probu, s tim da je intenzitet formiranog kompleksa jedarni proteini-proba bio izraženiji u slučaju HNF1Amut probe. Specifičnost vezivanja jedarnih proteina za probu analizirana je u reakcijama kompeticije u kojima je pokazano da dolazi do „hlađenja“ formiranih kompleksa srazmerno koncentraciji dodate „hladne“ neobeležene probe. Rezultati EMSA analize su pokazali da se isti transkripcioni faktori vezuju za ispitivan region, s tim što se intenzivniji kompleks formira u slučaju tripleta heptanukleotida (proba HNF1Amut).

#### **4.2.3.3. Genotip-fenotip korelacija**

Nosilac promene c.-154-160insTGGGGGT bio je pacijent kod koga je glikemija dijagnostifikovana u četrnaestoj godini života. Kliničke karakteristike nosioca varijante su bile: glikemija našte 9,1 mmol/l, HbA1c 6,3 i indeks telesne mase (ITM) 20,01 kg/m<sup>2</sup>. Hiperglikemija je kod pacijenta regulisana insuliskom terapijom. U porodici je prijavljeno postojanje dijabetesa, a varijanta je pronađena kod majke. Promena nije detektovana u kontrolnoj grupi od 20 ispitanika. Rezultat sekvenciranja metodom NGS je pokazao da je pacijent heterozigotni nosilac polimorfizma c.590C>A, p.Pro197His u genu *NEUROD1*.

## DISKUSIJA

## 5.1. MOLEKULARNO-GENETIČKA KARAKTERIZACIJA PACIJENTA SA VARIJANTAMA U MODY GENIMA

### 5.1.1. Distribucija i učestalost varijanti u MODY genima

MODY predstavlja redak oblik dijabetesa koji se odlikuje monogeniskim poremećajem funkcije  $\beta$ -ćelije pankreasa. Karakteriše se heterogenom genetičkom etiologijom imajući u vidu da je bar 13 gena odgovorno za nastanak MODY dijabetesa. Genetička i klinička heterogenost ovog oblika dijabetesa otežava prepoznavanje MODY pacijenata koji vrlo često bivaju dijagnostikovani kao jedan od dva osnovna tipa dijabetesa. Kada se na kliničkom nivou posumnja na MODY dijabetes kod pacijenata, konačna dijagnoza se može dobiti samo nakon izvršenog genetičkog testa. Genetička potvrda ima važne implikacije za ove pacijente, koje se pre svega odnose na terapiju, budući da je terapija direktno zavisna od gena uzročnika MODY dijabetesa (Urakami 2019; Urbanová et al. 2018).

U prvom delu ove studije sprovedena je molekularno-genetička karakterizacija pacijenata koji su na kliničkom nivou opisani kao MODY pacijenti. Identifikovano je 20 različitih varijanti u 4 gena uzročnika MODY dijabetesa (*GCK*, *HNF1B*, *HNF1A* i *NEUROD1*) kod 22 od 29 (75,9%) klinički suspektnih MODY pacijenata. Od 20 varijanti, 11 je identifikovano u *GCK* genu kod 11 pacijenata (50%), što čini ovaj gen glavnim uzročnikom MODY dijabetesa u ovoj grupi, dok je u genu *HNF1B* identifikovao 5 različitih varijanti kod 5 pacijenata (22,7%). U preostalim genima identifikovane su po dve varijante, u *HNF1A* genu kod 2 pacijenata (9,1%), odnosno u *NEUROD1* genu kod 4 pacijenata (18,2%).

Ova studija je ukazala da su varijante u *GCK* genu najčešće bile odgovorne za nastanak MODY dijabetesa, što čini GCK-MODY podtip najučestalijim oblikom MODY dijabetesa u ovoj grupi. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima studija sprovedih u zemljama južnijeg dela Evrope, poput Italije, Šanije, Grčke, u kojima je GCK-MODY dominantan podtip sa učestalošću od oko 50% (Delvecchio et al. 2014; Tatsi et al. 2013), pa i većom, od oko 80% (Estalella et al. 2007b; Fendler et al. 2012). U ovim zemljama, Italiji i Španiji, visoka učestalost ovog podtipa je posledica sprovođenja rutinskih testova za glukozu i kod asimptomatskih ispitanika (Thanabalasingham and Owen 2011), te su varijante u *GCK* genu češće detektovane u poređenju sa drugim MODY genima. U Poljskoj je takođe zabeležena visoka stopa GCK-MODY dijabetesa, od oko 83%, a razlog je bila nacionalna kampanja koja je imala za cilj da informiše lekare, roditelje i same pacijente o MODY dijabetesu, što je rezultovalo udvostručenjem broja pacijenata koji su upućeni na genetičku analizu pre svega za GCK-MODY dijabetes (Borowiec et al. 2012b; Fendler et al. 2012).

Varijante u *HNF1B* genu su pronađene kod 22,7 % pacijenata te predstavljaju drugi po redu uzrok MODY dijabetesa u ovoj grupi. Ovaj rezultat se razlikuje od podataka iz literature, koja navodi da su varijante u *HNF1B* genu četvrti uzrok MODY dijabetesa, sa učestalošću od 6% među MODY pacijentima (Shields et al. 2010), a razlika je verovatno posledica male grupe pacijenata u ovoj studiji. U studijama koje su, pak, obuhvatale sličan broj pacijenata kao i ova studija, i u kojima je takođe sprovedena NGS analiza, broj varijanti u *HNF1B* genu, ako su detektovane, je bio veoma mali, oko 1% (Dallali et al. 2019; Johansson et al. 2017; Johnson et al. 2019; Özdemir et al. 2018; Szopa et al. 2015), što je značajno manje nego u ovoj studiji. Jedan od razloga veće učestalosti *HNF1B* varijanti u ovoj studiji može da bude taj što je jedan od inkluzionih kriterijuma bio i prisustvo renalnih

abercija, zbog čega su pacijenti podvrgnuti analizi, a što nije navedeno u pomenutim studijama. Takođe, za razliku od pomenutih studija, u ovoj studiji je sprovedena MLPA analiza, što je doprinelo detekciji većeg broja varijanti.

Rezultati ove analize ukazali su da su varijante u *HNF1A* genu uzrok MODY dijabetesa kod 9,1% pacijenata, što je u suprotnosti sa rezultatima populacionih studija sprovedenih u Velikoj Britaniji i Norveškoj, u kojima su varijante u *HNF1A* genu bile glavni uzrok MODY dijabetesa, sa učestalošću od redom 52% i 45%. Sa druge strane, u studijama sa manjim brojem pacijenata, procenat varijanti u *HNF1A* genu je bliži rezultatima ove studije, i kretao se od 6-22% (Dallali et al. 2019; Delvecchio et al. 2014; Özdemir et al. 2018). Pacijenti sa varijantama u *HNF1A* genu se odlikuju progresivnom hiperglikemijom, te se mogu pogrešno dijagnostikovati kao DM1 pacijenti (Søvika et al. 2013), što bi moglo da objasni manju učestalost pacijenata sa varijantama u *HNF1A* genu u ovoj i prethodno pomenutim studijama.

MODY dijabetes uzrokovan varijantama u *NEUROD1* genu je veoma redak, i spada u veoma retke oblike dijabetesa sa učestalošću od 1% (Firdous et al. 2018). U ovoj studiji pronađene su dve varijante u kod 4 pacijenta (18,2%) pacijenata sa kliničkom slikom MODY dijabetesa. Nosoci ovih varijanti se otkrivaju u studijama koje ciljano sekvenciraju ovaj gen (Abreu et al. 2019; Gonsorcikova et al. 2008), ali i zahvaljujući sve većoj upotrebi NGS analize koja pokriva sve MODY gene, uključujući i *NEUROD1* gen (Ağladıoğlu et al. 2016; Chapla et al. 2015).

### **5.1.2. Spektar varijanti po MODY genima i korelacija genotipa i fenotipa nosilaca varijanti u MODY genima**

#### **5.1.2.1. Varijante u *GCK* genu – korelacija genotipa i fenotipa**

U *GCK* genu je identifikovano više od 620 različitih varijanti u više od 1440 porodica širom sveta, od čega je 97% odgovorno za nastanak GCK-MODY dijabetesa (Osbaek et al. 2009). U ovoj studiji je pronađeno 11 različitih varijanti, i sve su bile svojstvene za pojedinačne porodice. Sve varijante su bile tipa *missense*, detektovane u skoro svim egzonima *GCK* gena. Ova distribucija varijanti po svim egzonima odgovara prethodno prijavljenim podacima koji pokazuju da ne postoji „hot spot“ u *GCK* genu (Osbaek et al. 2009). Kako ne postoje podaci o učestalostima pojedinačnih varijanti u *GCK* genu, iz literature je moguće dobiti samo opisnu sliku o učestalosti pojedinih varijanti. Za dve varijante p.Gly72Arg i p.Ser383Leu, koje su pronađene i u ovoj studiji, primećeno je da su prisutne u nešto većem broju porodica, za razliku od većine prijavljenih varijanti koje su svojstvene za pojedinačne porodice (Osbaek et al. 2009). U okviru ove studije, detektovana je i nova, prethodno neprijavljena varijanta u *GCK* genu c.596T>C, p.Val199Ala u egzonu 5 (Komazec et al. 2019).

Kada se pogledaju kliničke odlike svih 11 pacijenata sa varijantama u *GCK* genu, uočava se postojanje uniformnosti fenotipa u vidu blage hiperglikemije i odsustva gojaznosti. Srednje vrednosti glukoze kod GCK-MODY pacijenata se kreću između 5,5 i 8,0 mmol/l, opseg u kome se nalazi i srednja vrednost glukoze uočena u ovoj grupi GCK-MODY pacijenata (6,78 mmol/l). Pacijenti su bili normalne težine. Blaga, ali stabilna hiperglikemija tokom celog života je specifična za GCK-MODY podtip (Osbaek et al. 2009).

Razlog se nalazi upravo u genetičkoj osnovi ovog podtipa, gde varijante u *GCK* genu pomeraju glukozni prag na višu vrednost, pri čemu je regulacija sekrecije insulina i dalje očuvana (Matschinsky FM 2004). S obzirom na to da se kod GCK-MODY pacijenata ne razvijaju mikro- i makrovaskularne komplikacije, niti dolazi do pogoršanja opšteg stanja, ovi pacijenti mogu jako dugo da ostanu neprimećeni, jer su asimptomatski. Kod ovih pacijenata dobijanje genetičke potvrde je od velikog značaja, budući da je za ovaj podtip specifično to što terapija nije potrebna, a ukoliko se primenjuje može da se ukine (Stride et al. 2014). Ovakva informacija pacijentima pruža izvesno olakšanje u pogledu porekla njihove hiperglikemije, i pozitivne prognoze u pogledu komplikacija dijabetesa koje odsustvuju kod GCK-MODY dijabetesa. Imajući u vidu da su u pitanju bili mladi pacijenti, za njih ova dijagnoza ima i dodatne implikacije u pogledu planiranja porodice.

#### Nova varijanta u *GCK* genu, c.596T>C, p.Val199Ala

U ovoj studiji je identifikovana i jedna nova varijanta u egzonu 5, c.596T>C (p.Val199Ala). Ova varijanta nije pronađena u literaturi niti dostupnim bazama podataka, te je analizirana pomoću više kompijuterskih prediktivnih programa kako bi se sa većom pouzdanošću odredila patogenost varijante. Rezultati svih *in silico* predikcija nedvosmisleno su pokazali da varijanta c.596T>C (p.Val199Ala) ima patogen efekat, označavajući je sa „oštećujuća“ ili „verovatno patogena“. Skeniranjem interne kontrolne baze koja je obuhvatala 57 genoma iz opšte populacije u Srbiji, nije pokazano prisustvo ove varijante, što, zajedno sa tim da varijanta nije bila prijavljena ni u jednoj *online* bazi, čini ovu varijantu veoma retkom. Analizom uzorka roditelja pokazan je autozomno dominantan način nasleđivanja, što zajedno sa asocijacijom varijante sa blagom hiperglikemijom predstavlja glavne odlike GCK-MODY dijabetesa. Dodatno, osim *in silico* predikcije i kliničke slike pacijenta koja se može objasniti prisustvom ove varijante, ide i to da je u istom kodonu identifikovana druga varijanta p.Val199Leu, koja je povezana sa GCK-MODY dijabetesom kod nosioca varijante (Osbak et al. 2009). Uzimajući sve u obzir, verovatno je da je novootkrivena varijanta odgovorna za nastanak dijabetesa tipa GCK-MODY kod pacijenta.

#### **5.1.2.2. Varijante u *HNF1A* genu - korelacija genotipa i fenotipa**

U ovoj grupi pacijenata samo su dve varijante identifikovane u *HNF1A* genu, c.872dupC i c.293C>T. Varijanta c.872dupC (p.Pro292fs, ili p.Pro291fsinsC) predstavlja najučestaliju varijantu u *HNF1A* genu čija je učestalost 18% (Colclough et al. 2013). Poređenja radi, 65% varijanti pripada pojedinačnim porodicama, dok, izuzimajući c.872dupC varijantu, sledeća najučestalija varijanta ima učestalost od svega 2% (Colclough et al. 2013). Naime, insercija citozina se dešava u policitozniskom regionu egzona 4 koji sadrži 8 ili 9 citozina, u zavisnosti od G/C polimorfizma na kodonu 288. Insercija citozina dovodi do pomeranja okvira čitanja (*frameshift* varijanta) i formiranja stop kodona nizvodno od mesta insercije, te se sintetiše skraćeni protein veličine 315 aminokiselina kome nedostaje veći deo transaktivacionog domena (Yamagata et al. 1998). Klinička slika nosioca ove varijante može da se objasni disfunkcijom β-ćelije koja je posledica nemogućnosti *HNF1A* heterodimera, izgrađenog od *wild-type* i mutiranog proteina kome fali transaktivacioni domen, da aktivira nishodne target gene, na šta su ukazale i funkcionalne studije na ovoj varijanti (Yamagata et al. 1998). Treba napomenuti da se promene okvira čitanja javljaju i

usled delecije citozina (c.872delC, (Ellard and Colclough 2006)) kao i duplikacije citozina (c.864delGinsCC, (Wheeler et al. 2013)) u ovom regionu, što je verovatno posledica proklizavanja replikacione mašinerije, čineći ovo mesto potencijalnim „hot spot“ mestom u *HNF1A* genu (Kaisaki et al. 1997).

Druga varijanta u *HNF1A* genu bila je varijanta c.293C>T (p.Ala98Val) detektovana kod jednog pacijenta sa kliničkom slikom MODY dijabetesa. Iako je ova varijanta povezana sa smanjenim vrednostima C-peptida i smanjenim insulinskim odgovorom pri glukoznom opterećenju (OGTT test) (Urhammer et al. 1997a), ona pokazuje inkonzistentnu i slabu povezanost sa dijabetesom (Jackson et al. 2004). Dve studije su ukazale da prisustvo varijantnog alela (T) utiče na smanjenje funkcije  $\beta$ -ćelije, što može biti povezano sa lošijom glikemijskom kontrolom kod MODY pacijenata (Anuradha et al. 2005; Bergmann et al. 2008). Zanimljivo je da su kod ovog pacijenta bile prisutne renalne abnormalnosti, simptom koji nije specifičan za *HNF1A* genu, već za *HNF1B* gen. Ni NGS ni MLPA analiza nisu pokazale prisutvo patogenih varijanti u analiziranim MODY genima, pa ni u *HNF1B* genu kod ovog pacijenta. Renalne abnormalnosti kod nosilaca genetičkih varijanti u *HNF1A* genu su prijavljene u samo dve porodice do sada, kod čijih članova je utvrđeno postojanje malih cisti na jednom bubregu, blage hipodisplazije bubrega kao i ageneza bubrega (Malecki et al. 2005). Malo je verovatno da je ova promena odgovorna za renalni fenotip pacijenata budući da ovakvi simptomi nisu karakteristika *HNF1A* gena, a takođe nisu prijavljene kod ostalih nosioca p.Ala98Val promene. Jedini renalni fenotip sa kojim je asociran *HNF1A* gen je glukozourija (Pontoglio et al. 2000).

### 5.1.2.3. Varijante u *HNF1B* genu – korelacija genotipa i fenotipa

Renalni fenotip sa različitim promenama na bubrezima je specifično svojstvo *HNF1B*-MODY dijabetesa (Alvelos et al. 2015; Bellanné-Chantelot et al. 2004). Budući da se *HNF1B* gen eksprimira veoma rano tokom embriogeneze i ključan je u diferencijaciji bubrega, promene u ovom genu za posledicu imaju pre svega renalne aberacije, a sekundarno dijabetes (Chen et al. 2010; Clissold et al. 2015; Lim and Kim 2020). Kod pet pacijenata detektovano je 5 različitih varijanti, i to dve missense (p.Val61Gly, P.His336Asp), jedna frameshift (p.Met160Terfs) i dve velike delecije koje su obuhvatale egzone 1-3 (p.Met1\_Arg181del) i egzone 3-4 (p.Gln182\_384del). Varijante u *HNF1B* genu, do sada prijavljene literaturi, su disperzno raspoređene po svim egzonima, mada je primećen trend grupisanja varijanti u prva 4 egzona (Alvelos et al. 2015; Thomas et al. 2008), u kojima se nalaze i *HNF1B* varijante detektovane kod pacijenata iz ove studije. Velike delecije predstavljaju najčešći tip varijanti u *HNF1B* genu, sa učestalošću od 34%, za kojima slede *missense* (31%) i *frameshift* (15%) varijante (Alvelos et al. 2015; Faguer et al. 2011). Ova distribucija učestalosti tipova varijanti je uočena i u ovoj studiji, gde su velike delecije i *missense* varijante bila zastupljene sa po 40%, a frameshift 20%. Ovako visoka učestalost velikih delecija kod *HNF1B* nosilaca varijanti naglašava potrebu da, ukoliko se ne utvrdi prisustvo patogene varijante u *HNF1B* genu sekvenciranjem, a klinička slika upućuje na *HNF1B*-MODY, uradi i genetička analiza na velike delecija.

Poređenjem vrednosti za glukozu našte, HbA1c, ITM, utvrđeno je da su vrednosti približne među nosiocima varijanti u *HNF1B* genu, a po pitanju renalnih abnormalnosti, svi pacijenti, osim jednog za kog nije bila dostupna informacija, imale su renalne abnormalnosti. Vrednosti glikemijskih parametara pacijenata u ovoj grupi bile su granične (srednja vrednost 5,84 mmol/l, HbA1c 5,86), što nije iznenađujuće s obzrom na to da su u

pitanju bili pedijatrijski pacijenti (prosek godina je bio 10) i da je nastanak dijabetesa kod nosilaca varijanti u *HNF1B* zabeležen kasnije u životu, u proseku oko 14. godine (Lim and Kim 2020), ili prosečno u drugoj ili trećoj deceniji (Bingham et al. 2001; Chen et al. 2010). Treba napomenuti da dijabetes ne razvijaju svi nosioci *HNF1B* varijanti, i da se dijabetes javlja kod oko 50% pacijenata sa renalnim abnormalnostima (Edghill et al. 2006). Varijante koje su detektovane u ovoj studiji su prethodno bile prijavljene u literaturi i asocirane sa različitim renalnim abnormalnostima, kao i sa dijabetesom (Edghill et al. 2013; Faguer et al. 2011; Karges et al. 2007; Yorifuji et al. 2012). Pacijenti u ovoj grupi uglavnom nisu koristili terapiju, što je u skladu sa činjenicom da dokle god je očuvana funkcija  $\beta$ -ćelije, insulinska terapija nije neophodna (Thirumalai et al. 2013). Kasnije, usled propadanja funkcije  $\beta$ -ćelija i pogoršanja glukoze homeostaze, pacijentima je neophodan insulin, budući da *HNF1B*-*MODY* pacijenti nisu osetljivi na sulfonilureu.

Kod dva pacijenta kod kojih je klinička slika ukazivala na *HNF1B*-*MODY* dijabetes, nisu detektovane varijante u *MODY* genima primenom NGS, kao ni MLPA metode. Međutim, s obzirom na to da je sprovedeno sekvenciranje kliničkog egzoma kod pacijenata, bilo je moguće analizirati gene koji su asocirani sa bolestima koji daju kliničku sliku koja može da liči na *HNF1B*-*MODY* dijabetes, poput gena *PKHD1*, *PKD1*, *UMOD*, *BBS1* i *BBS2*. Analizom rezultata sekvenciranja kliničkog egzoma kod jednog pacijenta je detektovana homozigotna varijanta u genu *BBS1* (*BBS1*(*NM\_024649.4*):*c.951+1G>A*), koji se dovodi u vezu sa sindromskim poremećajem koji se odlikuje intelektualnim smetnjama, progresivnim slabljenjem vida, renalnom displazijom, gojaznošću i dijabetesom u 50% slučajeva (Hattersley and Greeley 2018). Kod drugog pacijenta sa *HNF1B*-*MODY* fenotipom, detektovane su dve heterozigotne promene u genu *PKHD1* (*PKHD1*(*NM\_138694.3*):*c.9530T>C* (*p.Ile3177Thr*) i *c.2414C>T* (*p.Pro805Leu*)) koji se nalazi pod direktnom kontrolom *HNF1B* transkripcionog faktora. Učestalosti detektovanih varijanti bile su manja od 1% u oba slučaja, a predikcije su ukazivale da su varijante patogene. Ove varijante u genima su bile poznate u literaturi i asocirane sa odgovarajućim obolenjem. Identifikacija varijanti u ova dva gena kod pacijenata je pomogla da se objasni klinička slika kod tih pacijenata. Ovo je pokazalo još jednu prednost korišćene NGS metode, a to je da osim istovremenog sekvenciranja svih gena uzročnika *MODY* dijabetesa, po sticanju novih simptoma kod pacijenata mogu se pretražiti drugi geni, bez sprovođenja dodatnih genetičkih analiza i troškova analize.

#### 5.1.2.4. Varijante u *NEUROD1* genu - korelacija genotipa i fenotipa

U *NEUROD1* genu su pronađene četiri varijante. Kod tri pacijenta je pronađena varijanta *c.590C>A* (*p.Pro197His*) i kod jednog pacijenta *c.750C>A* (*p.Ser250Arg*). Varijanta *c.590C>A* (*p.Pro197His*) je detektovana u heterozigotnom stanju kod dva, a u homozigotnom stanju kod jednog pacijenta. Nije uočena razlika u fenotipu između nosioca homozigotne i heterozigotne varijante *p.Pro197His*. U literaturi je ova varijanta označena kao polimorfizam (Gonsorcíková et al. 2008) uprkos kompjuterskim predikcijama (*SIFT*, *Provean*, *Mutation taster*), koji ukazuju da varijanta verovatno ima patogen efekat na strukturu i funkciju proteina. Naime, *NEUROD1* gen reguliše ekspresiju gena za insulin, i u tom kontekstu pokazano je da varijanta *p.Pro197His* nema efekat na ekspresiju *INS* gena u *in vitro* uslovima (Hansen et al. 2000). Dodatno, u studiji *Maleckog i sar.* je pokazano da je učestalost ove varijante slična u dijabetičnoj (3,6%) i nedijabetičnoj (3,1%) populaciji (Malecki et al. 1999), što zajedno sa prethodnim *in vitro* rezultatima ide u prilog tome da



varijanta verovatno nema patogen efekat. Druga varijanta c.750C>A (p.Ser250Arg) je po svim programima (*SIFT*, *Polyphen2*, *Mutation taster*, *Provean*) predikovana kao benigna, tj. bez efekta na strukturu i funkciju proteina. Prijavljena je samo u bazama podataka, ali o njoj ne postoje nikakvi literaturni podaci, što je verovatno zbog predikcije o njenoj benignosti.

Pojava dijabetesa kod nosilaca varijanti u *NEUROD1* genu je veoma različita, od adolescentnog do kasnog životnog doba (Horikawa and Enya 2019). Varijante poput p.Glu110Lis, p.Ser159Pro ili p.Pro241Gln, za koje je pokazano da kosegregiraju sa dijabetesom u porodici, kod nekih članova porodice (nosici varijante) dovele su do nastanka dijabetesa u detinjstvu, a kod drugih u kasnom životnom dobu (68. godina), a takođe su postojali i normoglikemični nosioci varijanti (Gonsorcíková et al. 2008; Kristinsson et al. 2001; Liu et al. 2007). Ovakav efekat varijanti ukazuje na različitu i/ili nepotpunu penetrabilnost, što treba uzeti u obzir i za detektovane varijante u *NEUROD1* genu kod ovih pacijenata, budući da su kod dva pacijenta vrednosti za glukozu našte i HbA1c bile blizu normalne i da pacijenti nisu koristili nikakvu terapiju. Kod jednog pacijenta sa p.Pro197His varijantom su nađene ciste na bubrezima. Ciste na bubrezima do sada nisu bile asocirane sa ovom varijantom, te su verovatno posledica promena u nekim drugim genima koji deluju na renalni fenotip, budući da NGS i MLPA analize nisu pokazale prisustvo patogenih varijanti u *HNF1B* genu za ovog pacijenta, kao ni prisustvo patogenih varijanti u ostalim analiziranim genima. Sumiranjem prethodno navedenog, detektovane varijante verovatno nisu asocirane sa hiperglikemijom kod ovih pacijenata, te uzrok možda ležu u drugim genima koji nisu bili predmet ove studije ili pak regulatornim regionima koji nisu pokriveni ovim dvema analizama.

## 5.2. ANALIZA PROMOTORSKIH REGIONA GENA UZROČNIKA MODY DIJABETESA

Drugi deo studije bavio se analizom promotorskih regiona 4 najčešće odgovorna gena za MODY dijabetes. Kao što je već rečeno, u promotorskim regionima MODY gena pronađene su varijante koje takođe dovode do MODY dijabetesa, te je pored kodirajućeg regiona gena potrebno sprovesti i analizu promotorskog regiona. U ovoj studiji metodom po Sangeru sekvencirani su promotorski regioni četiri gena: *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B*. U *GCK* genu je detektovano 5 varijanti, a u *HNF1A* jedana insercija heptanukleotida kod 29 analiziranih pacijenata (Tabela 10, Rezultati) (Komazec et al. 2020). U genima *HNF4A* i *HNF1B* nije detektovana nijedna varijanta, što nije iznenađujuće budući da je u *HNF4A* genu identifikovan mali broj varijanti asociranih sa MODY dijabetesom (Anuradha et al. 2011; Colclough et al. 2013; Ek et al. 2006; Wirsing et al. 2010), i nijedna u *HNF1B* genu, i da je ovu grupu sačinjavalo svega 29 pacijenata.

### 5.2.1. Analiza promotorskog regiona *GCK* gena

Pretraživanjem literature i baza podataka nije pronađeno mnogo informacija o varijantama u *GCK* genu. Za varijantu -903C>T pronađena je samo informacija o njenoj učestalosti, koja je visoka, što smo uočili i u ovoj studiji, budući da je detektovana kod 89% pacijenta u homo- i heterozigotnom stanju. Druga varijanta, -30G>A, detektovana kod

27,6% pacijenata, je bila polimorfizam prethodno prijavljen i opisan u literaturi (Rose et al. 2005; Weedon et al. 2005). Uzevši u obzir te informacije, ove dve varijante nisu dalje razmatrane u studiji. Preostale tri varijante su pronađene kod 20% pacijenata, međutim zanimljivo je bilo to što su ove tri varijante -282C>T, -194A>G, 402C>G (Tabla 10) pronađene isključivo kao set varijanti, i nisu detektovane kao pojedinačne u ovoj grupi pacijenata. Sekvenciranjem uzoraka roditelja potvrđeno je da su varijante nasleđene zajedno od jednog roditelja u svim slučajevima. Pretraživanjem literature nije pronađena informacija ni o jednoj varijanti u kontekstu asocijacije sa nekim fenotipom niti bilo kakav drugi podatak, osim učestalosti alela koja je bila oko 5% za svaku varijantu, a pojava da se nasleđuju zajedno nije do sada prijavljena. U literaturi su do danas prijavljene samo dve varijante u uzvodnom promotoru *GCK* gena (promotor sa koga se eksprimira pankreasna glukokinaza). Jedna je varijanta -71G>C, retka varijanta, za koju je pokazano da dovodi do nastanka *GCK-MODY* dijabetesa, a druga je prethodno pomenut pomimorfizam -30G>A, sa učestalošću varijantnog alela 18% i 30% u ispitivanim populacijama (Vaxillaire et al. 2008; Weedon et al. 2005). Iako je ova varijanta česta, nekoliko studija je pokazalo da je -30G>A varijanta asociirana sa povećanim vrednostima glukoze u plazmi i povećanom porođajnom težinom (Rose et al. 2005; Vaxillaire et al. 2008; Weedon et al. 2005). Kako bi se rasvetlila uloga varijantnog seta u promotorskom regionu *GCK* gena, urađena je funkcionalna analiza, odnosno ispitano je kako varijantni set deluje na aktivnost *GCK* promotora.

### 5.2.2. Funkcionalna analiza varijantnog seta u promotorskom regionu *GCK* gena i genotip-fenotip korelacija

U cilju ispitivanja efekta ovog varijantnog seta na ekspresiju *GCK* gena napravljeni su plazmidni konstrukti koji sadrže uzvodni promotorski region *GCK* gena sa i bez varijantnog seta (*wild-type* sekvenca) i izvršena je tranzijentna transfekcija Rin-5F ćelija. Rezultati *in vitro* analize su pokazali smanjenu aktivnost promotora koji sadrži varijantni set u odnosu na aktivnost promotora sa *wild-type* sekvencom u Rin-5F ćelijama, međutim to smanjenje nije bilo statistički značajno. Ove rezultate mogli smo da uporedimo samo sa efektom varijante -71G>C, s obzirom na to da je to jedna jedina varijanta u uzvodnom *GCK* promotoru koja je *in vitro* okarakterisana i za koji je pokazano da utiče na ekspresiju *GCK* gena. Autori su pokazali da varijanta -71G>C dovodi do značajne redukcije ekspresije *GCK* gena, jer ukida mesto vezivanja transkripcionog faktora SP1. Takođe prema autorima, varijanta je detektovana kod malog broja pacijenata sa jasno uočljivim *GCK-MODY* fenotipom i nije detektovana kod zdravih ispitanika (Gasperikova et al. 2009). Suprotno tome, ispitivani varijantni set je detektovan i kod pacijenata i kod zdravih ispitanika u ovoj studiji. Sagledavanjem ovih podataka, i rezultata funkcionalne analize, zaključeno je da varijantni set nema toliko jak efekat na ekspresiju *GCK* gena da bi moglo da se smatra da dovodi do hiperglikemije i posledično dijabetesa. Sa druge strane, na osnovu onoga što je poznato o drugoj varijanti u *GCK* genu, -30G>A, postavljena je hipoteza da varijantni set možda dovodi do malih variranja nivoa glukoze kod nosilaca varijantnog seta. Varijanta -30G>A je asociirana sa porastom nivoa glukoze kod nosioca varijantnog alela i ovo je pokazano kod pacijenata sa DM2, kod trudnica, kao i kod ispitanika sa normalnom glikemijom (Rose et al. 2005; Weedon et al. 2006). Povećanje nivoa glukoze nije bilo izraženo, svega 0,06mmol/l, ali je bilo statistički značajno u svim ispitivanim grupama pacijenata i ispitanika, te su autori sugerisali da varijanta -30G>A može da bude funkcionalan polimorfizam koji dovodi do smanjenje aktivnosti *GCK* gena i slabi normalno funkcionisanje  $\beta$ -ćelije (Stone et al. 1996; Weedon et al. 2005). Nije nepoznato da

polimorfizmi u regulatornim regionima gena mogu da utiču na fenotip nocioca varijante, kao na primer *Xmnl* polimorfizman u promotoru  $\gamma$ -globin gena kod talasemija koji dovodi do povećanja nivoa fetalnog hemoglobina (Haj Khelil et al. 2011), ili *T-83C* polimorfizman u promotoru *IL21R* gena koji povećava nivo IgE nivoa kod atopija (Hecker et al. 2003). Kako bi ispitali postavljenu hipotezu, analizirana je asocijacija varijantnog seta i glukoze kod svih MODY pacijenata, zdravih ispitanika i kod GCK-MODY pacijenata. Rezultati analize su pokazali da prisustvo varijantnog seta ne dovodi do statistički značajnog povećanja nivoa glukoze kod pacijenata. Odsustvo statističke značajnosti je primećeno i u kontrolnoj grupi među zdravim ispitanicima. Međutim, u grupi GCK-MODY pacijenata uočeno je da je nivo glukoze našte kod nosilaca varijantnog seta statistički značajno veći u odnosu na GCK-MODY pacijente bez varijantnog seta („ne-nosioce“). Naime, kod GCK-MODY pacijenata funkcija  $\beta$ -ćelije je već narušena, a prisustvo dodatnog varijantnog seta bi potencijalno mogao da ima aditivan efekat povećavajući glikemiju kod pacijenta. Razlika koja je uočena kod GCK-MODY pacijenata (između nosioca i „ne-nosioce“ varijantnog seta) je značajno veća ako se uporedi sa razlikom prijavljenom za -30G>A varijantu (1,18 mmol/l vs. 0,06 mmol/l), što je verovatno posledica male grupe pacijenata. U ovoj studiji nismo detektovali varijantu -71G>C ni kod jednog pacijenta, kao ni u kontrolnoj grupi, a nosioci varijantnog seta nisu istovremeno imali i -30G>A varijantu, zbog čega možemo da isključimo da je porast nivoa glukoze posledica jedne od dve varijante (ili obe). Kako bi se dokazala postavljena hipoteza o aditivnom efektu varijantnog seta na nivo glukoze kod GCK-MODY pacijenata potrebno je sagledati ovu hipotezu na većem broju pacijenata i ispitanika. Takođe, potrebno je utvrditi da li se varijante uvek pojavljuju kao set varijanti, kao i da li je povećanje glukoze rezultat seta varijanti ili određene pojedinačne varijante.

### 5.2.3. Interakcija promotorskog regiona *GCK* gena sa transkripcionim faktorima

Analiza interakcije dela promotorskog regiona *GCK* gena koji nosi svaku varijantu pojedinačno je pokazala da se za sekvencu koja sadrži varijantni alel, za varijante -194A>G i 402C>G, vezuju isti transkripcioni faktori kao i za *wild-type* sekvencu, što je pokazala i *in silico* analiza. Razlika je uočena u slučaju varijante -282C>T gde je EMSA pokazala vezivanje jedarnih proteina za sekvencu sa *wild-type* alelom (-282C), ali ne i za sekvencu sa varijantnim alelom (-282T) u eksperimentima unakrsne kompeticije. Ovaj rezultat može da se tumači na dva načina. Prvi je da je afinitet vezivanja jedarnih proteina veći za *wild-type* sekvencu, a drugi da se drugi jedarni proteini vezuju za *wild-type*, ali ne i za sekvencu sa varijantnim alelom. *In silico* predikcija je takođe pokazala razliku između ove dve sekvence, predikujući vezivanje dva faktora u okolini -282C alela, USF1 (eng. *Upstream transcription factor 1, USF1*) i MAX (eng. *Myc associated factor X*), koji izostaju u slučaju -282T alela. USF transkripcioni faktori (USF1 i USF2) su eksprimirani u velikom broju ćelija. Formiraju homo- i heterodimere i prepoznaju specifične sekvence (*E-box* sekvence) u promotorima brojnih gena, i učestvuju u različitim ćelijskim procesima: embrionalnom razviću, metabolizmu, ćelijskom ciklusu, proliferaciji, imunom odgovoru. Dodatno, formiraju interakcije sa velikim brojem proteina, što proširuje njihovu regulatornu ulogu (Horbach et al. 2015). MAX transkripcioni faktor formira homo- i heterodimere sa članovima MYC i MXD familije transkripcionih faktora i poput prethodnog, reguliše ekspresiju velikog broja gena (Carroll et al. 2018). U slučaju oba transkripciona faktora, USF i MAX, u pitanju su transkripcioni faktori koji su deo složenih transkripcionih mreža. U zavisnosti sa kojim partnerskim proteinom interaguju mogu da imaju ulogu aktivatora ili represora. Kakvu ulogu ova dva faktora imaju u kontekstu regulacije *GCK* gena ostaje da se ispita u budućim

istraživanjima. Jedno od pitanja koje nameće ova *in silico* predikcija je da li je samo promena na poziciji -282 odgovorna za porast nivoa glukoze kod nosilaca varijantog seta.

#### 5.2.4. Funkcionalna analiza varijante c.-154-160insTGGGGGT u promotoru *HNF1A* gena

Analizom promotorskog regiona *HNF1A* gena pronađena je samo jedna varijanta, insercija heptanukleotida TGGGGGT (c.-154-160insTGGGGGT) kod jednog od 29 pacijenata, koja nije detektovana kod kontrolnih ispitanika. Iako prijavljena u literaturi, patogenost ove varijante nije razjašnjena. Naime, baze podataka (*VarSome*, *ClinVar*) je opisuju kao benignu ili kao varijantu nepoznatog značaja, dok je u literaturi asocirana sa dijabetesom kod pacijenata (Awa et al. 2011; Bennett et al. 2015; Lopez-Garrido et al. 2013). U ovoj studiji varijanta je pronađena kod pacijenata sa kliničkom slikom koja odgovara MODY dijabetesu, a kod koga nisu identifikovane patogene varijante u analiziranim MODY genima, kao ni u promotorskom regionu preostala tri gena *GCK*, *HNF4A* i *HNF1B*. Kako do sada nije ispitano kako ova varijanta deluje na ekspresiju *HNF1A* gena, u okviru ove studije izvršena je funkcionalna analiza varijante u *in vitro* sistemu u cilju rasvetljavanja patogenosti ove varijante.

U plazmidni vektor koji sadrži CAT reporterski gen ukloniran je deo *HNF1A* promotora sa i bez insercije i izvršena je tranzijentna transfekcija HepG2 ćelija. Rezultati funkcionalne analize su pokazale da prisustvo insercije smanjuje aktivnost promotorskog regiona *HNF1A* gena u HepG2 ćelijama u odnosu na aktivnost promotorskog regiona koji sadrži *wild-type* sekvencu. Smanjena aktivnost konstrukta koji sadrži inserciju heptanukleotida ukazuje da ova varijanta potencijalno dovodi do smanjenja ekspresije *HNF1A* gena. Naime, u *HNF1A* promotorskom regionu je do sada pronađeno oko 15 varijanti (Awa et al. 2011; Fang et al. 2012; Galán et al. 2011; Godart et al. 2000). Za neke varijante (c.-283A>C i c.-57-64delCACGCGGT) je pokazano da smanjuju ekspresiju *HNF1A* gena tako što narušavaju mesta za vezivanje transkripcionih faktora (Galán et al. 2011; Godart et al. 2000; Gragnoli et al. 1997). Suprotno, za druge varijante, poput c.-128T>C i c.-129-130insTTGGGG je pokazano da povećavaju ekspresiju *HNF1A* gena (Fang et al. 2012; Yoshiuchi et al. 1999). U oba slučaja, bez obzira da li su varijante povećavale ili smanjivale ekspresiju *HNF1A* gena, autori su pokazali da su pomenute varijante bile povezane sa dijabetesom kod pacijenata i u porodici. Ovakvi podaciji pokazuju da je za normalno funkcionisanje  $\beta$ -ćelije i održavanje glukoze homeostaze potrebno da postoji normalna ekspresija *HNF1A* gena.

#### 5.2.5. Interakcija promotorskog regiona koji sadrži varijantu c.-154-160insTGGGGGT *HNF1A* gena sa transkripcionim faktorima

Analiza interakcije promotorskog regiona *HNF1A* gena i transkripcionih faktora iz HepG2 ćelija je pokazala da se za region koji sadrži dvostruki ili trostruki TGGGGGT ponovak vezuju isti transkripcioni faktori. Pojava traka većeg intenziteta koja se uočava u slučaju tripleta TGGGGGT ukazuje da sam triplet stvara dodatna mesta za vezivanje istog transkripcionog faktora, što je predvidela i *in silico* analiza. Prema *in silico* analizi za ovu sekvencu, koja se odlikuje G nukleotidnim ponovcima vezuje se transkripcioni faktor RREB1 (eng. *Ras-responsive element-binding protein 1*). RREB1 je transkripcioni faktor koji

se eksprimira u velikom broju tkiva i učestvuje u procesima proliferacije ćelija, DNK reparaciji i transkripcionoj regulaciji brojnih gena. Novija istraživanja su pokazala da u zavisnosti sa kojim proteinom interaguje, RREB1 može da deluje kao aktivator ili kao represor (Deng et al. 2020). Represorna uloga RREB1 bi išla u prilog rezultatim funkcionalne analize ove studije koji pokazuju smanjenu promotorsku aktivnost *HNF1A* gena, ali bez dodatnih analiza ovo ostaje na nivou hipoteze.

Kada se pogledaju prethodno opisane varijante u promotorskom regionu *HNF1A* gena poput *HNF1A:c.-283A>C* ili *HNF1A:c.-57-64delCACGCGGT*, uočava se da one smanjuju aktivnost promotora za 50-80% u poređenju sa *wild type* sekvencom u *in vitro* sistemu (Galán et al. 2011; Godart et al. 2000; Gragnoli et al. 1997). Rezultati eksperimenata ove studije su pokazali smanjenje promotorske aktivnosti za oko 30%. Sličan rezultat je pokazan za varijantu *c.-218T>C* kod koje je redukcija aktivnosti promotorskog konstrukta iznosila oko 20% u odnosu na *wild-type* sekvencu (Godart et al. 2000). Pri ovolikom smanjenju postavlja se pitanje da li je ono dovoljno da bi se smatralo da je varijanta odgovorna za nastanak dijabetesa. Na osnovu *in vitro* analiza ove studije nije moguće izvesti direktan zaključak, ali efekat ove insercije na pojavu dijabetesa kod pacijenta ne treba da se zanemari, budući da nije pronađena nijedna patogena varijanta u analiziranim MODY genima. Za neke varijante u promotorskom regionu *HNF1A* gena, poput *c.-538G>C* i *c.-373G>C*, pokazano je da same po sebi verovatno ne dovode do dijabetesa, ali mogu da povećaju predispoziciju za njegov nastanak (Galán et al. 2011). Na osnovu varijanti u kodirajućem regionu gena zna se da nastanak dijabetesa zavisi od pozicije varijante u genu (Bellanne-Chantelot et al. 2008). Tako varijante koje se nalaze u transaktivacionom domenu dovode do kasnijeg nastanka dijabetesa, čak za 10 godina, u odnosu varijante u DNK-vezujućem ili dimerizacionom domenu, kao i lakše kliničke slike. Možda se i za varijante u promotorskom regionu može pretpostaviti da u zavisnosti koliko narušavaju ekspresiju *HNF1A* gena, zavisi stepen disfunkcije  $\beta$ -ćelije. *HNF1A* reguliše veliki broj gena u  $\beta$ -ćeliji, među kojima su i geni koji učestvuju u regulaciji glukoznog metabolizma (Haliyur et al. 2019) i verovatno je da bi se smanjena količina *HNF1A* odrazila na regulaciju njegovih target gena.

U radu Lopez-Garido i sar. ukazano je na još jedan mogući mehanizam dejstva insercije TGGGGGT (Lopez-Garrido et al. 2013). Budući da se ova varijanta nalazi u 5' netranslirajućem (5'UTR) regionu iRNK, ukazano je na mogućnost da varijanta ispoljava efekat na translacionom nivou na šta ukazuje *in silico* model sekundarne strukture iRNK sa i bez insercije koji su dali ovi autori. Prema tom modelu, insercija TGGGGGT menja sekundarnu strukturu iRNK smanjujući dužinu nesparenih nukleotida iRNK molekula. Naime, poznato je da promena dužine 5'-UTR regiona, GC sadržaja ili promena sekundarne strukture 5'UTR-a može da utiče na proces translacije. U 5'-UTR regionu nalaze se mesta za vezivanje proteina koji aktiviraju ili suprimiraju translaciju u zavisnosti od signala u ćeliji. Bilo kakve poremene unutar ovih regiona mogu da utiču na samu translacionu regulaciju, posledično dovodeći do raznih bolesti ili predispozicije za bolest (Chatterjee and Pal 2009).

Rezultati ovog istraživanja koji pokazuju da varijanta *c.-154-160insTGGGGGT* dovodi do smanjenja ekspresije *HNF1A* gena, kao i to da varijanta može da potencijalno da menja sekundarnu strukturu utičući na vezivanje regulatornih proteina, ukazuje na potencijano patogen efekat, čime bi mogao da se objasni dijabetes kod ovog pacijenta, budući da nisu identifikovane druge patogene varijante u MODY genima, kao ni u promotorskim regionima gena *GCK*, *HNF4A* i *HNF1B*.

Ova studija je pružila prvi uvid u MODY dijabetes u Srbiji. Ukazala je na potrebu da se kod klinički suspektnih MODY pacijenata potvrdi dijagnoza na genetičkom nivou kako bi se u skladu sa genetičkom etiologijom pružila najbolja briga o pacijentu, predvideo tok bolesti i dala adekvatna terapija. Ovakav pristup pacijentu, kada se najbolji tretman obezbeđuje na osnovu individualnih karakteristika u kombinaciji sa rezultatom genetičkog testa, predstavlja personalizovani pristup i osnovu za razvoj precizne medicine i kod dijabetesa, koncept koji pronalazi sve veću primenu kod monogenskog dijabetesa gde spada i MODY.

Po pitanju varijanti u promotorskim regionima, prvi rezultati funkcionalne analize su ukazali da analizirane varijante potencijalno smanjuju ekspresiju datih gena, a na osnovu *in silico* analize u kombinaciji sa EMSA rezultatima, ukazano je na prisustvo potencijalnih trnaskripcionih faktora koje ostaju predmet budućeg istraživanja. Njihovo otkriće bi doprinelo boljem razumevanja regulacije ovih gena, i posledično boljem razumevanju funkcije  $\beta$ -ćelije pankreasa.

ZAKLJUČCI

U prvom delu ove studije analizirano je 29 pacijenata sa kliničkom slikom MODY dijabetesa upotrebom NGS i MLPA metode. Na osnovu dobijenih rezultata iz ovog dela studije izvedeni su sledeći zaključci:

- Kombinovana upotreba NGS i MLPA tehnologije predstavlja sveobuhvatni pristup za analizu pacijenata sa sumnjom na MODY dijabetesa.
- Analizom rezultata molekularno genetičke analize 13 MODY gena detektovano je 20 različitih varijanti kod 22 (75,9%) pacijenata u 4 MODY gena: *GCK*, *HNF1B*, *HNF1A* i *NEUROD1*. Varijante u *GCK* genu su bile glavni uzrok MODY dijabetesa detektovane kod 50% (11/22) pacijenta.
- Budući da su varijante u *GCK* genu bile najčešći uzrok MODY-dijabetesa, opravdano bi bilo uvođenje genetičke analize detekcije varijanti u *GCK* genu kod pacijenata sa kliničkim karakteristikama GCK-MODY pacijenata.
- Drugi po redu uzročnik MODY dijabetesa u ovoj grupi bile su varijante u *HNF1B* genu detektovane kod 22% (5/22) pacijenata.
- Najmanje varijanti je detektovano u *HNF1A* genu, i to samo kod 9,1% (2/22) pacijenata.
- Varijante detektovane u *NEUROD1* genu kod 4 pacijenta (18,2%) su verovatno polimorfizmi i verovatno nisu uzrok hiperglikemije kod pacijenata.
- Detektovana je nova varijanta u *GCK* genu, p.Val199Ala, za koju su rezultati nekoliko *in silico* predikcija nedvosmisleno pokazali da ima patogen efekat, a klinička slika pacijenta je odgovarala fenotipu GCK-MODY dijabetesa. Varijanta je bila povezana sa hiperglikemijom kod pacijenta i roditelja kod koga je potvrđena promena.
- Primena NGS analize omogućila je detektovanje patogenih varijanti u dva gena *BBS1* i *PKHD* čime je omogućeno postavljanje nove dijagnoze kod dva pacijenta.

U drugom delu studije analizirani su promotorski regioni 4 gena čiji su varijantni aleli najčešći uzrok MODY dijabetesa: *GCK*, *HNF1A*, *HNF4A* i *HNF1B*, i izvršena je funkcionalna analiza odabranih varijanti. Na osnovu dobijenih rezultata iz ovog dela studije izvedeni su sledeći zaključci:

- Varijante u promotorskom regionu su detektovane u dva gena: *GCK* i *HNF1A*.
- U *GCK* genu je detektovano 5 učestalih varijanti, od kojih se tri varijante javljaju udruženo u vidu varijantnog seta -284C>T, -194A>G, i 402C>G. Ovaj varijantni set je pronađen i kod zdravih kontrolnih ispitanika.
- Funkcionalna analiza varijantnog seta je pokazala da prisustvo varijantnog seta ne dovodi do statistički značajno smanjene aktivnosti promotora.
- Analiza asocijacije varijantnog seta i nivoa glukoze pokazala da je nivo glukoze u krvi statistički značajno veći kod GCK-MODY pacijenata koji nose varijantni alel nego GCK-MODY pacijenti bez varijantnog seta.
- Promotorski varijantni set u *GCK* genu je potencijalni modifikator fenotipa kod pacijenata sa GCK-MODY dijabetesom.



- U promotoru *HNF1A* gena detektovana je jedna varijanta, insercija heptanukleotida TGGGGGT (c.-154-160insTGGGGGT). Varijanta se smatra retkom budući da je detektovana samo kod jednog suspektnog pacijenta i nije detektovana u kontrolnoj grupi pacijenata.
- Funkcionalna analiza je ukazala da insercija heptanukleotida TGGGGGT (c.-154-160insTGGGGGT) u promotoru *HNF1A* genu ima potencijal da smanji aktivnost promotora. Kako kod pacijenta koji je nosilac ove varijante u *MODY* genima nisu pronađene patogene varijante, ova promotorska varijanta može da bude asocirana sa nastankom *HNF1A*-*MODY* dijabetesa kod pacijenta.

# LITERATURA

## LITERATURA

- Aarthy R et al. (2020) Clinical features, complications and treatment of rarer forms of maturity-onset diabetes of the young (MODY) - A review *J Diabetes Complications*:107640 doi:10.1016/j.jdiacomp.2020.107640
- Abreu GM et al. (2019) The first case of NEUROD1-MODY reported in Latin America *7*:e989 doi:10.1002/mgg3.989
- Ağladioğlu SY et al. (2016) Maturity onset diabetes of youth (MODY) in Turkish children: sequence analysis of 11 causative genes by next generation sequencing *J Pediatr Endocrinol Metab* 29:487-496 doi:10.1515/jpem-2015-0039
- Althari S, Gloyn AL (2015) When is it MODY? Challenges in the Interpretation of Sequence Variants in MODY Genes The review of diabetic studies : *RDS* 12:330-348 doi:10.1900/rds.2015.12.330
- Alvelos MI, Rodrigues M, Lobo L, Medeira A, Sousa AB, Simao C, Lemos MC (2015) A novel mutation of the HNF1B gene associated with hypoplastic glomerulocystic kidney disease and neonatal renal failure: a case report and mutation update *Medicine (Baltimore)* 94:e469 doi:10.1097/md.0000000000000469
- Anik A, Catli G, Abaci A, Bober E (2015) Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update *J Pediatr Endocrinol Metab* 28:251-263 doi:10.1515/jpem-2014-0384
- Anuradha S, Radha V, Deepa R, Hansen T, Carstensen B, Pedersen O, Mohan V (2005) A prevalent amino acid polymorphism at codon 98 (Ala98Val) of the hepatocyte nuclear factor-1alpha is associated with maturity-onset diabetes of the young and younger age at onset of type 2 diabetes in Asian Indians *Diabetes Care* 28:2430-2435 doi:10.2337/diacare.28.10.2430
- Anuradha S, Radha V, Mohan V (2011) Association of novel variants in the hepatocyte nuclear factor 4A gene with maturity onset diabetes of the young and early onset type 2 diabetes *Clin Genet* 80:541-549 doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01577.x
- Arden C et al. (2007) Cell biology assessment of glucokinase mutations V62M and G72R in pancreatic beta-cells: evidence for cellular instability of catalytic activity *Diabetes* 56:1773-1782 doi:10.2337/db06-1151
- Awa WL, Thon A, Raile K, Grulich-Henn J, Meissner T, Schober E, Holl RW (2011) Genetic and clinical characteristics of patients with HNF1A gene variations from the German-Austrian DPV database *Eur J Endocrinol* 164:513-520 doi:10.1530/eje-10-0842
- Bacon S et al. (2016) Successful maintenance on sulphonylurea therapy and low diabetes complication rates in a HNF1A-MODY cohort *Diabet Med* 33:976-984 doi:10.1111/dme.12992
- Bae JS, Kim TH, Kim MY, Park JM, Ahn YH (2010) Transcriptional regulation of glucose sensors in pancreatic beta-cells and liver: an update *Sensors (Basel, Switzerland)* 10:5031-5053 doi:10.3390/s100505031
- Barnes WM (1977) Plasmid detection and sizing in single colony lysates *Science* 195:393-394 doi:10.1126/science.318764
- Barrio R, Bellanné-Chantelot C, Moreno JC, Morel V, Calle H, Alonso M, Mustieles C (2002) Nine novel mutations in maturity-onset diabetes of the young (MODY) candidate genes in 22 Spanish families *J Clin Endocrinol Metab* 87:2532-2539 doi:10.1210/jcem.87.6.8530
- Bartoov-Shifman R, Hertz R, Wang H, Wollheim CB, Bar-Tana J, Walker MD (2002) Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 alpha *J Biol Chem* 277:25914-25919 doi:10.1074/jbc.M201582200

- Bellanne-Chantelot C et al. (2008) The type and the position of HNF1A mutation modulate age at diagnosis of diabetes in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY)-3 *Diabetes* 57:503-508 doi:10.2337/db07-0859
- Bellanné-Chantelot C et al. (2004) Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations *Ann Intern Med* 140:510-517 doi:10.7326/0003-4819-140-7-200404060-00009
- Bellanne-Chantelot C et al. (2005) Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5 *Diabetes* 54:3126-3132
- Bennett JT, Vasta V, Zhang M, Narayanan J, Gerrits P, Hahn SH (2015) Molecular genetic testing of patients with monogenic diabetes and hyperinsulinism *Mol Genet Metab* 114:451-458 doi:10.1016/j.ymgme.2014.12.304
- Bergmann A et al. (2008) The A98V single nucleotide polymorphism (SNP) in hepatic nuclear factor 1 alpha (HNF-1alpha) is associated with insulin sensitivity and beta-cell function *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116 Suppl 1:S50-55 doi:10.1055/s-2008-1081492
- Bingham C et al. (2001) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene are associated with familial hypoplastic glomerulocystic kidney disease *Am J Hum Genet* 68:219-224 doi:10.1086/316945
- Bingham C, Hattersley AT (2004) Renal cysts and diabetes syndrome resulting from mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta *Nephrol Dial Transplant* 19:2703-2708 doi:10.1093/ndt/gfh348
- Bjørkhaug L, Sagen JV, Thorsby P, Søvik O, Molven A, Njølstad PR (2003) Hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene mutations and diabetes in Norway *J Clin Endocrinol Metab* 88:920-931 doi:10.1210/jc.2002-020945
- Bonnefond A et al. (2013) Reassessment of the putative role of BLK-p.A71T loss-of-function mutation in MODY and type 2 diabetes *Diabetologia* 56:492-496 doi:10.1007/s00125-012-2794-8
- Borowiec M et al. (2012a) Novel glucokinase mutations in patients with monogenic diabetes - clinical outline of GCK-MD and potential for founder effect in Slavic population *Clin Genet* 81:278-283 doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01656.x
- Borowiec M et al. (2012b) Doubling the referral rate of monogenic diabetes through a nationwide information campaign--update on glucokinase gene mutations in a Polish cohort *Clin Genet* 82:587-590 doi:10.1111/j.1399-0004.2011.01803.x
- Borowiec M et al. (2009) Mutations at the BLK locus linked to maturity onset diabetes of the young and beta-cell dysfunction *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14460-14465 doi:10.1073/pnas.0906474106
- Bowman P et al. (2012) Heterozygous ABCC8 mutations are a cause of MODY *Diabetologia* 55:123-127 doi:10.1007/s00125-011-2319-x
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem* 72:248-254 doi:10.1006/abio.1976.9999
- Caetano LA, Santana LS (2018) PDX1 -MODY and dorsal pancreatic agenesis: New phenotype of a rare disease *93:382-386* doi:10.1111/cge.13044
- Carmody D et al. (2016) GCK-MODY in the US National Monogenic Diabetes Registry: frequently misdiagnosed and unnecessarily treated *Acta Diabetol* 53:703-708 doi:10.1007/s00592-016-0859-8
- Carroll PA, Freie BW, Mathsaraja H, Eisenman RN (2018) The MYC transcription factor network: balancing metabolism, proliferation and oncogenesis *Front Med* 12:412-425 doi:10.1007/s11684-018-0650-z
- Chapla A et al. (2015) Maturity onset diabetes of the young in India - a distinctive mutation pattern identified through targeted next-generation sequencing *Clin Endocrinol (Oxf)* 82:533-542 doi:10.1111/cen.12541

- Chatterjee S, Pal JK (2009) Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases *Biol Cell* 101:251-262 doi:10.1042/bc20080104
- Chee Seng Ku, Yudi Pawitan, Mengchu Wu, Dimitrios Roukos, Cooper. DN (2013) The Evolution of High-Throughput Sequencing Technologies: From Sanger to Single-Molecule Sequencing. Springer, New York, NY. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7645-0\_1
- Chen YZ et al. (2010) Systematic review of TCF2 anomalies in renal cysts and diabetes syndrome/maturity onset diabetes of the young type 5 *Chin Med J (Engl)* 123:3326-3333
- Clissold RL, Hamilton AJ, Hattersley AT, Ellard S, Bingham C (2015) HNF1B-associated renal and extra-renal disease-an expanding clinical spectrum *Nature reviews Nephrology* 11:102-112 doi:10.1038/nrneph.2014.232
- Colclough K, Bellanne-Chantelot C, Saint-Martin C, Flanagan SE, Ellard S (2013) Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha and 4 alpha in maturity-onset diabetes of the young and hyperinsulinemic hypoglycemia *Hum Mutat* 34:669-685 doi:10.1002/humu.22279
- Dallali H et al. (2019) Genetic characterization of suspected MODY patients in Tunisia by targeted next-generation sequencing *56:515-523* doi:10.1007/s00592-018-01283-5
- de Santana LS, Caetano LA (2019) Targeted sequencing identifies novel variants in common and rare MODY genes *7:e962* doi:10.1002/mgg3.962
- Delvecchio M et al. (2014) Low prevalence of HNF1A mutations after molecular screening of multiple MODY genes in 58 Italian families recruited in the pediatric or adult diabetes clinic from a single Italian hospital *Diabetes Care* 37:e258-260 doi:10.2337/dc14-1788
- Deng YN, Xia Z, Zhang P, Ejaz S, Liang S (2020) Transcription Factor RREB1: from Target Genes towards Biological Functions *Int J Biol Sci* 16:1463-1473 doi:10.7150/ijbs.40834
- Dickens LT, Letourneau LR, Sanyoura M, Greeley SAW, Philipson LH, Naylor RN (2019) Management and pregnancy outcomes of women with GCK-MODY enrolled in the US Monogenic Diabetes Registry *Acta Diabetol* 56:405-411 doi:10.1007/s00592-018-1267-z
- Edghill EL, Bingham C, Ellard S, Hattersley AT (2006) Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes *J Med Genet* 43:84-90 doi:10.1136/jmg.2005.032854
- Edghill EL et al. (2008a) Insulin mutation screening in 1,044 patients with diabetes: mutations in the INS gene are a common cause of neonatal diabetes but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood *Diabetes* 57:1034-1042 doi:10.2337/db07-1405
- Edghill EL et al. (2008b) Hepatocyte nuclear factor-1beta gene deletions--a common cause of renal disease *Nephrol Dial Transplant* 23:627-635 doi:10.1093/ndt/gfm603
- Edghill EL, Stals K, Oram RA, Shepherd MH, Hattersley AT, Ellard S (2013) HNF1B deletions in patients with young-onset diabetes but no known renal disease *Diabet Med* 30:114-117 doi:10.1111/j.1464-5491.2012.03709.x
- Ek J et al. (2006) A novel -192c/g mutation in the proximal P2 promoter of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene (HNF4A) associates with late-onset diabetes *Diabetes* 55:1869-1873 doi:10.2337/db05-1684
- El-Khairi R, Vallier L (2016) The role of hepatocyte nuclear factor 1 $\beta$  in disease and development *Diabetes, obesity & metabolism* 18 Suppl 1:23-32 doi:10.1111/dom.12715
- Ellard S, Bellanne-Chantelot C, Hattersley AT (2008) Best practice guidelines for the molecular genetic diagnosis of maturity-onset diabetes of the young *Diabetologia* 51:546-553 doi:10.1007/s00125-008-0942-y
- Ellard S, Colclough K (2006) Mutations in the genes encoding the transcription factors hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) and 4 alpha (HNF4A) in maturity-onset diabetes of the young *Hum Mutat* 27:854-869 doi:10.1002/humu.20357
- Ellard S et al. (2013) Improved genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing *Diabetologia* 56:1958-1963 doi:10.1007/s00125-013-2962-5

- Ellard S et al. (2007) Partial and whole gene deletion mutations of the GCK and HNF1A genes in maturity-onset diabetes of the young *Diabetologia* 50:2313-2317 doi:10.1007/s00125-007-0798-6
- Estalella I et al. (2007a) Mutations in GCK and HNF-1alpha explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain *Clin Endocrinol (Oxf)* 67:538-546 doi:10.1111/j.1365-2265.2007.02921.x
- Estalella I et al. (2007b) Mutations in GCK and HNF-1alpha explain the majority of cases with clinical diagnosis of MODY in Spain *Clin Endocrinol (Oxf)* 67:538-546 doi:10.1111/j.1365-2265.2007.02921.x
- Faguer S et al. (2011) Diagnosis, management, and prognosis of HNF1B nephropathy in adulthood *Kidney Int* 80:768-776 doi:10.1038/ki.2011.225
- Fajans SS, Bell GI (2011) MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making *Diabetes Care* 34:1878-1884 doi:10.2337/dc11-0035
- Fang Q et al. (2012) Functional analyses of the mutation nt-128 T->G in the hepatocyte nuclear factor-1alpha promoter region in Chinese diabetes pedigrees *Diabet Med* 29:1456-1464 doi:10.1111/j.1464-5491.2012.03626.x
- Fendler W et al. (2012) Prevalence of monogenic diabetes amongst Polish children after a nationwide genetic screening campaign *Diabetologia* 55:2631-2635 doi:10.1007/s00125-012-2621-2
- Ferrè S, Veenstra GJC, Bouwmeester R, Hoenderop JGJ, Bindels RJM (2011) HNF-1B specifically regulates the transcription of the  $\gamma$ -subunit of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase *Biochem Biophys Res Commun* 404:284-290 doi:10.1016/j.bbrc.2010.11.108
- Firdous P, Nissar K, Ali S, Ganai BA, Shabir U, Hassan T, Masoodi SR (2018) Genetic Testing of Maturity-Onset Diabetes of the Young Current Status and Future Perspectives *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:253 doi:10.3389/fendo.2018.00253
- Flanagan SE, Clauin S, Bellanné-Chantelot C, de Lonlay P, Harries LW, Gloyn AL, Ellard S (2009) Update of mutations in the genes encoding the pancreatic beta-cell K(ATP) channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and sulfonylurea receptor 1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism *Hum Mutat* 30:170-180 doi:10.1002/humu.20838
- Fried M, Crothers DM (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis *Nucleic Acids Res* 9:6505-6525 doi:10.1093/nar/9.23.6505
- Galán M et al. (2011) Differential effects of HNF-1 $\alpha$  mutations associated with familial young-onset diabetes on target gene regulation *Mol Med* 17:256-265 doi:10.2119/molmed.2010.00097
- Gao R et al. (2014) Evaluation of a target region capture sequencing platform using monogenic diabetes as a study-model *BMC Genet* 15:13 doi:10.1186/1471-2156-15-13
- Gardner DS, Tai ES (2012) Clinical features and treatment of maturity onset diabetes of the young (MODY) *Diabetes Metab Syndr Obes* 5:101-108 doi:10.2147/dmso.s23353
- Gasperikova D et al. (2009) Identification of a novel beta-cell glucokinase (GCK) promoter mutation (-71G>C) that modulates GCK gene expression through loss of allele-specific Sp1 binding causing mild fasting hyperglycemia in humans *Diabetes* 58:1929-1935 doi:10.2337/db09-0070
- Glaser B (2008) Insulin mutations in diabetes: the clinical spectrum *Diabetes* 57:799-800 doi:10.2337/db08-0116
- Gloyn AL (2003) Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy *Hum Mutat* 22:353-362 doi:10.1002/humu.10277
- Godart F et al. (2000) Identification of seven novel nucleotide variants in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (TCF1) promoter region in MODY patients *Hum Mutat* 15:173-180 doi:10.1002/(sici)1098-1004(200002)15:2<173::aid-humu6>3.0.co;2-w

- Gonsorcikova L et al. (2008) Autosomal inheritance of diabetes in two families characterized by obesity and a novel H241Q mutation in NEUROD1 *Pediatr Diabetes* 9:367-372 doi:10.1111/j.1399-5448.2008.00379.x
- Gonsorcíková L et al. (2008) Autosomal inheritance of diabetes in two families characterized by obesity and a novel H241Q mutation in NEUROD1 *Pediatr Diabetes* 9:367-372 doi:10.1111/j.1399-5448.2008.00379.x
- Gagnoli C, Lindner T, Cockburn BN, Kaisaki PJ, Gagnoli F, Marozzi G, Bell GI (1997) Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene *Diabetes* 46:1648-1651 doi:10.2337/diacare.46.10.1648
- Haj Khelil A, Morinière M, Laradi S, Khelif A, Perrin P, Ben Chibani J, Baklouti F (2011) Xmn I polymorphism associated with concomitant activation of G $\gamma$  and A $\gamma$  globin gene transcription on a  $\beta$ 0-thalassemia chromosome *Blood Cells Mol Dis* 46:133-138 doi:10.1016/j.bcmd.2010.11.002
- Haliyur R et al. (2019) Human islets expressing HNF1A variant have defective beta cell transcriptional regulatory networks *J Clin Invest* 129:246-251 doi:10.1172/jci121994
- Hansen L et al. (2000) NeuroD/BETA2 gene variability and diabetes: no associations to late-onset type 2 diabetes but an A45 allele may represent a susceptibility marker for type 1 diabetes among Danes. Danish Study Group of Diabetes in Childhood, and the Danish IDDM Epidemiology and Genetics Group *Diabetes* 49:876-878 doi:10.2337/diabetes.49.5.876
- Harries LW, Ellard S, Stride A, Morgan NG, Hattersley AT (2006) Isoforms of the TCF1 gene encoding hepatocyte nuclear factor-1 alpha show differential expression in the pancreas and define the relationship between mutation position and clinical phenotype in monogenic diabetes *Hum Mol Genet* 15:2216-2224 doi:10.1093/hmg/ddl147
- Harries LW et al. (2008) The diabetic phenotype in HNF4A mutation carriers is moderated by the expression of HNF4A isoforms from the P1 promoter during fetal development *Diabetes* 57:1745-1752 doi:10.2337/db07-1742
- Hattersley AT, Beards F, Ballantyne E, Appleton M, Harvey R, Ellard S (1998) Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight *Nat Genet* 19:268-270 doi:10.1038/953
- Hattersley AT, Greeley SAW (2018) ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents *19 Suppl* 27:47-63 doi:10.1111/pedi.12772
- Hattersley AT, Patel KA (2017) Precision diabetes: learning from monogenic diabetes *Diabetologia* 60:769-777 doi:10.1007/s00125-017-4226-2
- Hecker M, Bohnert A, König IR, Bein G, Hackstein H (2003) Novel genetic variation of human interleukin-21 receptor is associated with elevated IgE levels in females *Genes Immun* 4:228-233 doi:10.1038/sj.gene.6363954
- Heuvel-Borsboom H, de Valk HW, Losekoot M, Westerink J (2016) Maturity onset diabetes of the young: Seek and you will find *Neth J Med* 74:193-200
- Hojny J et al. (2020) Identification of novel HNF1B mRNA splicing variants and their qualitative and semi-quantitative profile in selected healthy and tumour tissues *Sci Rep* 10:6958 doi:10.1038/s41598-020-63733-x
- Horbach T, Götz C, Kietzmann T, Dimova EY (2015) Protein kinases as switches for the function of upstream stimulatory factors: implications for tissue injury and cancer *Front Pharmacol* 6:3 doi:10.3389/fphar.2015.00003
- Horikawa Y, Enya M (2019) Genetic Dissection and Clinical Features of MODY6 (NEUROD1-MODY) *Current diabetes reports* 19:12 doi:10.1007/s11892-019-1130-9
- Irgens HU et al. (2013) Prevalence of monogenic diabetes in the population-based Norwegian Childhood Diabetes Registry *Diabetologia* 56:1512-1519 doi:10.1007/s00125-013-2916-y

- Iynedjian PB (2009) Molecular physiology of mammalian glucokinase *Cell Mol Life Sci* 66:27-42 doi:10.1007/s00018-008-8322-9
- Jackson AE et al. (2004) Polymorphic variations in the neurogenic differentiation-1, neurogenin-3, and hepatocyte nuclear factor-1alpha genes contribute to glucose intolerance in a South Indian population *Diabetes* 53:2122-2125 doi:10.2337/diabetes.53.8.2122
- Jackson M, Marks L, May GHW (2018) The genetic basis of disease 62:643-723 doi:10.1042/ebc20170053
- Jang KM (2020) Maturity-onset diabetes of the young: update and perspectives on diagnosis and treatment *Yeungnam University journal of medicine* 37:13-21 doi:10.12701/yujm.2019.00409
- Jo W, Endo M, Ishizu K, Nakamura A, Tajima T (2011) A novel PAX4 mutation in a Japanese patient with maturity-onset diabetes of the young *Tohoku J Exp Med* 223:113-118 doi:10.1620/tjem.223.113
- Johansen A, Ek J, Mortensen HB, Pedersen O, Hansen T (2005) Half of clinically defined maturity-onset diabetes of the young patients in Denmark do not have mutations in HNF4A, GCK, and TCF1 *J Clin Endocrinol Metab* 90:4607-4614 doi:10.1210/jc.2005-0196
- Johansson BB et al. (2017) Targeted next-generation sequencing reveals MODY in up to 6.5% of antibody-negative diabetes cases listed in the Norwegian Childhood Diabetes Registry *Diabetologia* 60:625-635 doi:10.1007/s00125-016-4167-1
- Johansson BB et al. (2011) Diabetes and pancreatic exocrine dysfunction due to mutations in the carboxyl ester lipase gene-maturity onset diabetes of the young (CEL-MODY): a protein misfolding disease *J Biol Chem* 286:34593-34605 doi:10.1074/jbc.M111.222679
- Johnson SR et al. (2019) Comprehensive genetic screening: The prevalence of maturity-onset diabetes of the young gene variants in a population-based childhood diabetes cohort *Diabetologia* 62:57-64 doi:10.1111/pedi.12766
- Kadri K (2019) Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In. IntechOpen. doi:DOI: 10.5772/intechopen.86491
- Kaisaki PJ et al. (1997) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4 *Diabetes* 46:528-535 doi:10.2337/diab.46.3.528
- Karges B et al. (2007) Digenic inheritance of hepatocyte nuclear factor-1alpha and -1beta with maturity-onset diabetes of the young, polycystic thyroid, and urogenital malformations *Diabetes Care* 30:1613-1614 doi:10.2337/dc06-2618
- Komazec J, Ristivojevic B, Zukic B, Zdravkovic V, Karan-Djurasevic T, Pavlovic S, Ugrin M (2020) Analysis of the promoter regions of disease-causing genes in maturity-onset diabetes of the young patients doi:10.1007/s11033-020-05734-7
- Komazec J, Zdravkovic V, Sajic S, Jesic M, Andjelkovic M, Pavlovic S, Ugrin M (2019) The importance of combined NGS and MLPA genetic tests for differential diagnosis of maturity onset diabetes of the young *Endokrynol Pol* 70:28-36 doi:10.5603/EP.a2018.0064
- Kristinsson SY et al. (2001) MODY in Iceland is associated with mutations in HNF-1alpha and a novel mutation in NeuroD1 *Diabetologia* 44:2098-2103 doi:10.1007/s001250100016
- Lachance CH (2016) Practical Aspects of Monogenic Diabetes: A Clinical Point of View *Canadian journal of diabetes* 40:368-375 doi:10.1016/j.jcjd.2015.11.004
- Lau HH, Ng NHJ, Loo LSW, Jasmen JB, Teo AKK (2018) The molecular functions of hepatocyte nuclear factors - In and beyond the liver *J Hepatol* 68:1033-1048 doi:10.1016/j.jhep.2017.11.026
- Lim SH, Kim JH (2020) Genotype and Phenotype Analyses in Pediatric Patients with HNF1B Mutations *Diabetologia* 9 doi:10.3390/jcm9072320
- Liu L, Furuta H, Minami A, Zheng T, Jia W, Nanjo K, Xiang K (2007) A novel mutation, Ser159Pro in the NeuroD1/BETA2 gene contributes to the development of diabetes in a



- 
- Chinese potential MODY family *Mol Cell Biochem* 303:115-120 doi:10.1007/s11010-007-9463-0
- Liu L et al. (2013) Mutations in *KCNJ11* are associated with the development of autosomal dominant, early-onset type 2 diabetes *Diabetologia* 56:2609-2618 doi:10.1007/s00125-013-3031-9
- Lopez-Garrido MP, Herranz-Antolin S, Alija-Merillas MJ, Giralt P, Escribano J (2013) Co-inheritance of *HNF1a* and *GCK* mutations in a family with maturity-onset diabetes of the young (MODY): implications for genetic testing *Clin Endocrinol (Oxf)* 79:342-347 doi:10.1111/cen.12050
- Malecki MT et al. (1999) Mutations in *NEUROD1* are associated with the development of type 2 diabetes mellitus *Nat Genet* 23:323-328 doi:10.1038/15500
- Malecki MT, Skupien J, Gorczynska-Kosiorz S, Klupa T, Nazim J, Moczulski DK, Sieradzki J (2005) Renal malformations may be linked to mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha (*MODY3*) gene *Diabetes Care* 28:2774-2776 doi:10.2337/diacare.28.11.2774
- Maniatis T, EF F, Sambrook J (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory,
- Massa O et al. (2001) High prevalence of glucokinase mutations in Italian children with MODY. Influence on glucose tolerance, first-phase insulin response, insulin sensitivity and BMI *Diabetologia* 44:898-905 doi:10.1007/s001250100530
- Matschinsky FM MM (2004) *Glucokinase and Glycemic Disease: From Basics to Novel Therapeutics* vol 16. doi:10.1159/000079009
- McDonald TJ et al. (2011) Islet autoantibodies can discriminate maturity-onset diabetes of the young (MODY) from Type 1 diabetes *Diabet Med* 28:1028-1033 doi:10.1111/j.1464-5491.2011.03287.x
- McDonald TJ, Ellard S (2013) Maturity onset diabetes of the young: identification and diagnosis *Ann Clin Biochem* 50:403-415 doi:10.1177/0004563213483458
- McDonald TJ et al. (2012) Lipoprotein composition in *HNF1A*-MODY: differentiating between *HNF1A*-MODY and type 2 diabetes *Clin Chim Acta* 413:927-932 doi:10.1016/j.cca.2012.02.005
- Meur G et al. (2010) Insulin gene mutations resulting in early-onset diabetes: marked differences in clinical presentation, metabolic status, and pathogenic effect through endoplasmic reticulum retention *Diabetes* 59:653-661 doi:10.2337/db09-1091
- Misra S, Hattersley AT (2016) Monogenic Causes of Diabetes. In: Holt R CC, Flyvbjerg A and Goldstein B.J. (ed) *Textbook of Diabetes*. pp 241-261. doi:10.1002/9781118924853.ch18
- Misra S, Owen KR (2018) Genetics of Monogenic Diabetes: Present Clinical Challenges *Current diabetes reports* 18:141 doi:10.1007/s11892-018-1111-4
- Murphy R (2015) Monogenic diabetes and pregnancy *Obstetric Medicine* 8:114-120 doi:10.1177/1753495X15590713
- Murphy R, Ellard S, Hattersley AT (2008) Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4:200-213 doi:10.1038/ncpendmet0778
- Naylor R, Philipson LH (2011) Who should have genetic testing for maturity-onset diabetes of the young? *Clin Endocrinol (Oxf)* 75:422-426 doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04049.x
- Neve B et al. (2005) Role of transcription factor *KLF11* and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4807-4812 doi:10.1073/pnas.0409177102
- Odom DT et al. (2004) Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors *Science* 303:1378-1381 doi:10.1126/science.1089769
- Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellanne-Chantelot C, Ellard S, Gloyn AL (2009) Update on mutations in glucokinase (*GCK*), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia *Hum Mutat* 30:1512-1526 doi:10.1002/humu.21110
-

- Ovsyannikova AK, Rymar OD, Shakhtshneider EV, Klimontov VV, Koroleva EA, Myakina NE, Voevoda MI (2016) ABCC8-Related Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY12): Clinical Features and Treatment Perspective *Diabetes Ther* 7:591-600 doi:10.1007/s13300-016-0192-9
- Owen KR (2013) Monogenic diabetes: old and new approaches to diagnosis *Clin Med (Lond)* 13:278-281 doi:10.7861/clinmedicine.13-3-278
- Özdemir TR et al. (2018) Targeted next generation sequencing in patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY) *J Pediatr Endocrinol Metab* 31:1295-1304 doi:10.1515/jpem-2018-0184
- Papadimitriou DT, Willems PJ, Bothou C, Karpathios T, Papadimitriou A (2015) A novel heterozygous mutation in the glucokinase gene is responsible for an early-onset mild form of maturity-onset diabetes of the young, type 2 *Diabetes Metab* 41:342-343 doi:10.1016/j.diabet.2015.03.009
- Pearson ER et al. (2005) Molecular genetics and phenotypic characteristics of MODY caused by hepatocyte nuclear factor 4alpha mutations in a large European collection *Diabetologia* 48:878-885 doi:10.1007/s00125-005-1738-y
- Pearson ER, Starkey BJ, Powell RJ, Gribble FM, Clark PM, Hattersley AT (2003) Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes *Lancet* 362:1275-1281 doi:10.1016/s0140-6736(03)14571-0
- Pihoker C et al. (2013) Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: results from the SEARCH for Diabetes in Youth *J Clin Endocrinol Metab* 98:4055-4062 doi:10.1210/jc.2013-1279
- Plengvidhya N et al. (2007) PAX4 mutations in Thais with maturity onset diabetes of the young *J Clin Endocrinol Metab* 92:2821-2826 doi:10.1210/jc.2006-1927
- Pontoglio M et al. (2000) HNF1alpha controls renal glucose reabsorption in mouse and man *EMBO reports* 1:359-365 doi:10.1093/embo-reports/kvd071
- Prudente S et al. (2015) Loss-of-Function Mutations in APPL1 in Familial Diabetes Mellitus *Am J Hum Genet* 97:177-185 doi:10.1016/j.ajhg.2015.05.011
- Pruhova S et al. (2010) Glucokinase diabetes in 103 families from a country-based study in the Czech Republic: geographically restricted distribution of two prevalent GCK mutations *Pediatr Diabetes* 11:529-535 doi:10.1111/j.1399-5448.2010.00646.x
- Pruhova S et al. (2003) Genetic epidemiology of MODY in the Czech republic: new mutations in the MODY genes HNF-4alpha, GCK and HNF-1alpha *Diabetologia* 46:291-295 doi:10.1007/s00125-002-1010-7
- Raeder H et al. (2006) Mutations in the CEL VNTR cause a syndrome of diabetes and pancreatic exocrine dysfunction *Nat Genet* 38:54-62 doi:10.1038/ng1708
- Raeder H et al. (2014) Carboxyl-ester lipase maturity-onset diabetes of the young is associated with development of pancreatic cysts and upregulated MAPK signaling in secretin-stimulated duodenal fluid *Diabetes* 63:259-269 doi:10.2337/db13-1012
- Rose CS et al. (2005) A -30G>A polymorphism of the beta-cell-specific glucokinase promoter associates with hyperglycemia in the general population of whites *Diabetes* 54:3026-3031 doi:10.2337/diabetes.54.10.3026
- Sagen JV, Baumann ME, Salvesen HB, Molven A, Søvik O, Njølstad PR (2005) Diagnostic screening of NEUROD1 (MODY6) in subjects with MODY or gestational diabetes mellitus *Diabet Med* 22:1012-1015 doi:10.1111/j.1464-5491.2005.01565.x
- Sakura H et al. (1992) Structure of the human glucokinase gene and identification of a missense mutation in a Japanese patient with early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus *J Clin Endocrinol Metab* 75:1571-1573 doi:10.1210/jcem.75.6.1464666
- Schober E, Rami B, Grabert M, Thon A, Kapellen T, Reinehr T, Holl RW (2009) Phenotypical aspects of maturity-onset diabetes of the young (MODY diabetes) in comparison with

- Type 2 diabetes mellitus (T2DM) in children and adolescents: experience from a large multicentre database *Diabet Med* 26:466-473 doi:10.1111/j.1464-5491.2009.02720.x
- Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells *Nucleic Acids Res* 17:6419 doi:10.1093/nar/17.15.6419
- Schwitzgebel VM (2014) Many faces of monogenic diabetes *Journal of diabetes investigation* 5:121-133 doi:10.1111/jdi.12197
- Shepherd M, Shields B, Ellard S, Rubio-Cabezas O, Hattersley AT (2009) A genetic diagnosis of HNF1A diabetes alters treatment and improves glycaemic control in the majority of insulin-treated patients *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 26:437-441 doi:10.1111/j.1464-5491.2009.02690.x
- Shields B, Colclough K (2017) Towards a systematic nationwide screening strategy for MODY *Diabetologia* 60:609-612 doi:10.1007/s00125-017-4213-7
- Shields BM, Hicks S, Shepherd MH, Colclough K, Hattersley AT, Ellard S (2010) Maturity-onset diabetes of the young (MODY): how many cases are we missing? *Diabetologia* 53:2504-2508 doi:10.1007/s00125-010-1799-4
- Søvika O et al. (2013) Monogenic diabetes mellitus in Norway *Norsk Epidemiologi* 23 doi:10.5324/nje.v23i1.1603
- Sreenan SK et al. (1998) Adaptation to hyperglycemia enhances insulin secretion in glucokinase mutant mice *Diabetes* 47:1881-1888 doi:10.2337/diabetes.47.12.1881
- Stoffel M, Duncan SA (1997) The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13209-13214 doi:10.1073/pnas.94.24.13209
- Stone LM, Kahn SE, Fujimoto WY, Deeb SS, Porte D, Jr. (1996) A variation at position -30 of the beta-cell glucokinase gene promoter is associated with reduced beta-cell function in middle-aged Japanese-American men *Diabetes* 45:422-428 doi:10.2337/diab.45.4.422
- Stride A, Shields B, Gill-Carey O, Chakera AJ, Colclough K, Ellard S, Hattersley AT (2014) Cross-sectional and longitudinal studies suggest pharmacological treatment used in patients with glucokinase mutations does not alter glycaemia *Diabetologia* 57:54-56 doi:10.1007/s00125-013-3075-x
- Szopa M et al. (2015) Genetic testing for monogenic diabetes using targeted next-generation sequencing in patients with maturity-onset diabetes of the young *Pol Arch Med Wewn* 125:845-851 doi:10.20452/pamw.3164
- Szopa M et al. (2019) Quality of life assessment in patients with HNF1A-MODY and GCK-MODY *Endocrine* 64:246-253 doi:10.1007/s12020-018-1812-0
- Tatsi C et al. (2013) The spectrum of HNF1A gene mutations in Greek patients with MODY3: relative frequency and identification of seven novel germline mutations *Pediatr Diabetes* 14:526-534 doi:10.1111/pedi.12032
- Tatsi EB, Kanaka-Gantenbein C, Scorilas A, Chrousos GP, Sertedaki A (2020) Next generation sequencing targeted gene panel in Greek MODY patients increases diagnostic accuracy *Diabetologia* 21:28-39 doi:10.1111/pedi.12931
- Tattersall RB (1974) Mild familial diabetes with dominant inheritance *Q J Med* 43:339-357
- Thanabalasingham G, Owen KR (2011) Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY) *BMJ* 343:d6044 doi:10.1136/bmj.d6044
- Thirumalai A, Holing E, Brown Z, Gilliam LK (2013) A case of hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) maturity onset diabetes of the young misdiagnosed as type 1 diabetes and treated unnecessarily with insulin *J Diabetes* 5:462-464 doi:10.1111/1753-0407.12043
- Thomas CP, Erlandson JC, Edghill EL, Hattersley AT, Stolpen AH (2008) A genetic syndrome of chronic renal failure with multiple renal cysts and early onset diabetes *Kidney Int* 74:1094-1099 doi:10.1038/ki.2008.227

- Thomas H et al. (2002) Evidence for haploinsufficiency of the human HNF1alpha gene revealed by functional characterization of MODY3-associated mutations *Biol Chem* 383:1691-1700 doi:10.1515/bc.2002.190
- Thomas H et al. (2001) A distant upstream promoter of the HNF-4 $\alpha$  gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young *Hum Mol Genet* 10:2089-2097 doi:10.1093/hmg/10.19.2089
- Torsvik J et al. (2010) Mutations in the VNTR of the carboxyl-ester lipase gene (CEL) are a rare cause of monogenic diabetes *Hum Genet* 127:55-64 doi:10.1007/s00439-009-0740-8
- Urakami T (2019) Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment *Diabetes Metab Syndr Obes* 12:1047-1056 doi:10.2147/dms0.s179793
- Urbanová J, Brunerová L, Brož J (2018) Hidden MODY—Looking for a Needle in a Haystack *Front Endocrinol (Lausanne)* 9 doi:10.3389/fendo.2018.00355
- Urhammer SA, Fridberg M, Hansen T, Rasmussen SK, Moller AM, Clausen JO, Pedersen O (1997a) A prevalent amino acid polymorphism at codon 98 in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene is associated with reduced serum C-peptide and insulin responses to an oral glucose challenge *Diabetes* 46:912-916
- Urhammer SA, Fridberg M, Hansen T, Rasmussen SK, Møller AM, Clausen JO, Pedersen O (1997b) A prevalent amino acid polymorphism at codon 98 in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene is associated with reduced serum C-peptide and insulin responses to an oral glucose challenge *Diabetes* 46:912-916 doi:10.2337/diab.46.5.912
- Ushijima K, Narumi S, Ogata T, Yokota I, Sugihara S, Kaname T, Horikawa Y (2019) KLF11 variant in a family clinically diagnosed with early childhood-onset type 1B diabetes *Diabetes* 68:712-719 doi:10.1111/pedi.12868
- Valkovicova T, Skopkova M, Stanik J, Gasperikova D (2019) Novel insights into genetics and clinics of the HNF1A-MODY *Endocr Regul* 53:110-134 doi:10.2478/enr-2019-0013
- Vaxillaire M, Abderrahmani A, Boutin P, Bailleul B, Froguel P, Yaniv M, Pontoglio M (1999) Anatomy of a homeoprotein revealed by the analysis of human MODY3 mutations *J Biol Chem* 274:35639-35646 doi:10.1074/jbc.274.50.35639
- Vaxillaire M et al. (2008) Impact of common type 2 diabetes risk polymorphisms in the DESIR prospective study *Diabetes* 57:244-254 doi:10.2337/db07-0615
- Weber S et al. (2006) Prevalence of mutations in renal developmental genes in children with renal hypodysplasia: results of the ESCAPE study *J Am Soc Nephrol* 17:2864-2870 doi:10.1681/asn.2006030277
- Weedon MN et al. (2006) A common haplotype of the glucokinase gene alters fasting glucose and birth weight: association in six studies and population-genetics analyses *Am J Hum Genet* 79:991-1001 doi:10.1086/509517
- Weedon MN et al. (2005) Genetic regulation of birth weight and fasting glucose by a common polymorphism in the islet cell promoter of the glucokinase gene *Diabetes* 54:576-581 doi:10.2337/diabetes.54.2.576
- Weinreich SS et al. (2015) A decade of molecular genetic testing for MODY: a retrospective study of utilization in The Netherlands *Eur J Hum Genet* 23:29-33 doi:10.1038/ejhg.2014.59
- Wheeler BJ, Patterson N, Love DR, Prosser D, Tomlinson P, Taylor BJ, Manning P (2013) Frequency and genetic spectrum of maturity-onset diabetes of the young (MODY) in southern New Zealand *Journal of diabetes and metabolic disorders* 12:46 doi:10.1186/2251-6581-12-46
- WHO (2019) Classification of diabetes mellitus. World Health Organization, Geneva
- Wirsing A et al. (2010) Novel monogenic diabetes mutations in the P2 promoter of the HNF4A gene are associated with impaired function in vitro *Diabet Med* 27:631-635 doi:10.1111/j.1464-5491.2010.03003.x

- Yamada S et al. (1997) Identification of mutations in the hepatocyte nuclear factor (HNF)-1 alpha gene in Japanese subjects with IDDM Diabetes 46:1643-1647
- Yamagata K (2003) Regulation of pancreatic beta-cell function by the HNF transcription network: lessons from maturity-onset diabetes of the young (MODY) Endocr J 50:491-499 doi:10.1507/endocrj.50.491
- Yamagata K et al. (1998) Mutation P291fsinsC in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1alpha is dominant negative Diabetes 47:1231-1235
- Yin L, Ma H, Ge X, Edwards PA, Zhang Y (2011) Hepatic hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  is essential for maintaining triglyceride and cholesterol homeostasis Arterioscler Thromb Vasc Biol 31:328-336 doi:10.1161/atvbaha.110.217828
- Yorifuji T et al. (2012) Comprehensive molecular analysis of Japanese patients with pediatric-onset MODY-type diabetes mellitus Pediatr Diabetes 13:26-32 doi:10.1111/j.1399-5448.2011.00827.x
- Yorifuji T et al. (2005) The C42R mutation in the Kir6.2 (KCNJ11) gene as a cause of transient neonatal diabetes, childhood diabetes, or later-onset, apparently type 2 diabetes mellitus J Clin Endocrinol Metab 90:3174-3178 doi:10.1210/jc.2005-0096
- Yoshiuchi I et al. (1999) Three new mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in Japanese subjects with diabetes mellitus: clinical features and functional characterization Diabetologia 42:621-626 doi:10.1007/s001250051204
- Yu H, Liu J, Li X, Miao F, Yang Y (2019) Identification of a novel mutation site in maturity-onset diabetes of the young in a Chinese family by whole-exome sequencing Mol Med Rep 20:2373-2380 doi:10.3892/mmr.2019.10464
- Yuan Lu, Yingjia Shen, Warren W, Walter R (2016) Next Generation Sequencing in Aquatic Models, Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges. In: Kulski JK (ed). IntechOpen. doi:DOI: 10.5772/61657
- Zhou C, Yang Y, Jong AY (1990) Mini-prep in ten minutes Biotechniques 8:172-173

**PRILOZI**

---

## BIOGRAFIJA

Jovana D. Komazec (rođena Vasiljević) je rođena 14. januara 1986. godine u Beogradu, Srbija, gde je završila osnovnu i srednju školu. Upisala je diplomatske studije školske 2005./2006. godine na Biološkom fakultetu, Univerzitet u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija. Godine 2012. je odbranila diplomski rad pod nazivom „Povezanost Asp299Gly (rs4986790) i Thr399Ile (rs4986791) polimorfizama *TLR4* gena sa pojavom sepse“ i time stekla zvanje diplomiranog biologa i fiziologa. Diplomski rad je uradila na Institutu za medicinska istraživanja na Vojnomedicinskoj akademiji. U periodu od marta 2013. do juna 2014. godine bila je zaposlena na Farmaceutskom fakultetu, Univerzitet u Beogradu, kao saradnik u nastavi na predmetu Biologija sa humanom genetikom. Upisala je doktorske studije 2014. godine na Biološkom fakultetu, Univerzitet u Beogradu, modul Molekularna biologija eukariota. Od oktobra 2014. godine radi u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo. Zaposlena je na projektu "Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti" (Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, ev. br. III41004, 2011-2019. godine). Zvanje istraživač saradnik stekla je 2016. godine (reizabrana u februaru. 2020. godine). Jovana Komazec je do sada objavila 7 radova u časopisima međunarodnog značaja i imala 11 saopštenja na međunarodnim (7) i domaćim (4) naučnim kongresima.

## Прилог 1

### Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јована Комазец

Број индекса М3008/2014

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Варијанте кодирајућих и не кодирајућих региона гена узрочника дијабетеса адултног типа  
код младих као модулатори фенотипа и регулатори генске експресије

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

Потпис аутора

У Београду, 23.10.2020.

Јована Комазец



Прилог 2

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јована Комазец

Број индекса М3008/2014

Студијски програм Молекулатна биологија; модул: молекуларна биологија еукариота

Наслов рада Варијанте кодирајућих и некодирајућих региона гена узрочника дијабетеса адултног типа код младих као модулатори фенотипа и регулатори генске експресије

Ментор др Милена Угрин, др Соња Павловић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, 23.10.2020.

Јована Комазец

## Изјава о коришћењу

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

Варијанте кодирајућих и некодирајућих региона гена узрочника дијабетеса адултног типа код младих као модулатори фенотипа и регулатори генске експресије

која је моје ауторско дело.

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


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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 23.10.2020.

  
\_\_\_\_\_

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.