

Analiza tireotropnih stanica mišje adenohipofize sekvenciranjem jednostanične RNK

Ivanko, Mateja

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:010454>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Mateja Ivanko

ANALIZA TIREOTROPNIH STANICA

MIŠJE ADENOHIPOFIZE

SEKVENCIRANJEM

JEDNOSTANIČNE RNK

Diplomski rad

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Mateja Ivanko

ANALIZA TIREOTROPNIH STANICA

MIŠJE ADENOHIPOFIZE

SEKVENCIRANJEM

JEDNOSTANIČNE RNK

Diplomski rad

Osijek, 2023.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Katedra za nuklearnu medicinu i onkologiju.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Mario Štefanić

Rad ima 32 lista, 5 tablica i 8 slika.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na velikoj podršci tijekom studija.

*Veliko hvala mentoru, izv. prof. dr. sc. Mariu Štefaniću na neizmjernom trudu i pomoći
tijekom pisanja diplomskog rada.*

SADRŽAJ

| | |
|--------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. ŠTITNA ŽLIJEZDA I HORMONI ŠTITNJAČE | 1 |
| 1.2. HIPOTALAMO-HIPOFIZNA OSOVINA I ŠTITNJAČA..... | 1 |
| 1.2.1. ANATOMIJA I EMBRIOLOGIJA OSI | 1 |
| 1.2.2. BIOLOGIJA TIREOTROPNIH STANICA | 2 |
| 1.3. SEKVENCIRANJE JEDNOSTANIČNE RNK (scRNA-seq) | 3 |
| 2. HIPOTEZA | 6 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 7 |
| 4. MATERIJAL I METODE | 8 |
| 4.1. Materijal..... | 8 |
| 4.2. Metode | 8 |
| 4.3. Statističke metode | 9 |
| 5. REZULTATI..... | 10 |
| 5.1. Deskriptivna analiza | 10 |
| 5.2. Analiza regulona | 17 |
| 6. RASPRAVA | 22 |
| 7. ZAKLJUČCI..... | 24 |
| 8. SAŽETAK | 25 |
| 9. ABSTRACT..... | 26 |
| 10. LITERATURA | 27 |
| 11. ŽIVOTOPIS | 32 |

POPIS KRATICA

| | |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| ACTH | adrenokortikotropni hormon, adrenokortikotropin |
| bp | parovi baza (engl. <i>base pair</i>) |
| cAMP | ciklički adenzin monofosfat |
| cDNA | komplementarna DNK (engl. <i>complementary DNA</i>) |
| CGA | zajednički glikoprotein A (engl. <i>common glycoprotein A</i>) |
| DAG | 1,2-diacilglicerol |
| ER | endoplazmatski retikulum |
| FDR | stopa lažno pozitivnih (engl. <i>false discovery rate</i>) |
| FSH | folikulostimulirajući hormon (engl. <i>follicle-stimulating hormone</i>) |
| GH | somatotropin (engl. <i>growth hormone</i>) |
| GO | engl. <i>Gene Ontology</i> |
| KEGG | Kyoto Enciklopedija Gena i Genoma |
| LH | luteinizirajući hormon, luteotropin |
| mRNA | glasnička RNK (engl. <i>messenger RNA</i>) |
| MsigDB | engl. <i>The Molecular Signatures Database</i> |
| NGS | sekvenciranje sljedeće generacije (engl. <i>next-generation sequencing</i>) |
| PCR | lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>) |
| PKA | protein kinaza A (engl. <i>protein kinase A</i>) |
| PLC | fosfolipaza C (engl. <i>phospholipase C</i>) |
| RNA | ribonukleinska kiselina (RNK) |
| scATAC-Seq | engl. <i>single-cell sequencing assay for transposase-accessible chromatin</i> |

| | |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| SCENIC | engl. <i>Single-Cell Regulatory Network Inference and Clustering</i> |
| scRNA-Seq | sekvenciranje jednostanične RNK (engl. <i>single-cell RNA sequencing</i>) |
| T3 | trijodtironin (engl. <i>triiodothyronine</i>) |
| T4 | tiroksin (engl. <i>thyroxine</i>) |
| TF | transkripcijski čimbenik |
| TR α | receptor za hormon štitnjače α (engl. <i>thyroid hormone receptor alpha</i>) |
| TR β | receptor za hormon štitnjače β (engl. <i>thyroid hormone receptor beta</i>) |
| TRH | tireotropin-oslobađajući hormon (engl. <i>thyrotropin-releasing hormone</i>) |
| TRHR1 | TRH receptor 1 |
| TSH | tireostimulirajući hormon, tireotropin (engl. <i>thyroid stimulating hormone</i>) |
| TSH-R | TSH receptor |
| TSS | transkripcijski start signal |
| UMAP | engl. <i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i> |
| UMI | jedinstveni molekularni identifikatori (engl. <i>Unique Molecular Identifiers</i>) |

POPIS TABLICA

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablica 1. Popis razlikovno izraženih gena u tireotropima mišje adehohipo fize..... | 12 |
| Tablica 2. Analiza bioloških pojmova u listi razlikovno izraženih gena. | 15 |
| Tablica 3. Lista najvećih regulona..... | 17 |
| Tablica 4. Lista regulona koji su aktivni u > 70 % tireotropnih stanica. | 17 |
| Tablica 5. Analiza bioloških pojmova za ciljne gene iz Bclaf1 regulona..... | 20 |

POPIS SLIKA

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1. Stanične populacije, UMAP (<i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>) reprezentacija. | 10 |
| Slika 2. Točkasti dijagram ekspresije razlikovnih biljega u pojedinim populacijama hipofiznih stanica. | 11 |
| Slika 3. Genski izražaj kanoničkih staničnih biljega (normalizirane vrijednosti) u tireotropnim stanicama (n=82). | 11 |
| Slika 4. Shematski (simbolički) prikaz staničnih postaja na putu od prepisivanja <i>Tshb</i> gena u jezgri do sortiranja Tsh u endosomima i egzocitoze u izvanstanični prostor. | 14 |
| Slika 5. Genski izražaj linijski specifičnih transkripcijskih faktora u tireotropnim stanicama. | 16 |
| Slika 6. Binarna aktivnost regulona u tireotropnim stanicama mišje adenohipofize..... | 18 |
| Slika 7. Aktivnost regulona u tireotropnim stanicama. | 19 |
| Slika 8. Bclaf1 regulon, ciljni geni s ulogom u procesiranju proteina u endoplazmatskom retikulumu. | 20 |

1. UVOD

1.1. ŠTITNA ŽLIJEZDA I HORMONI ŠTITNJAČE

Štitnjača je endokrina žlijezda folikularne građe, čije epitelne stanice proizvode hormone tiroksin (T4) i trijodtironin (T3). Hormoni štitnjače imaju mnoga djelovanja na organizam i sudjeluju u regulaciji bazalnog metabolizma, tjelesne mase, protoka krvi, srčane kontraktilnosti i neurorazvoja (1, 2).

U samoj žlijezdi, proces stvaranja hormona kreće s oksidacijom jodidnih iona koju katalizira enzim peroksidaza te se nastavlja jodiranjem tirozina u molekuli tireoglobulina. Zreli tireoglobulin pohranjuje se u folikulima kao koloid, a svaka molekula tireoglobulina sadrži do 30 molekula T4 i svega nekoliko molekula T3. Konačno oslobađanje T4 i T3 započinje endocitozom tireoglobulina i njegovom proteolitičkom razgradnjom, nakon čega novonastali T4 i T3 transmembranskim transportom napuštaju folikularne stanice i ulaze u cirkulaciju. Ondje, T4 i T3 se vežu za proteine seruma (poglavito albumin i transtiretin) koji posreduju njihov transport u periferna tkiva. Biološka aktivnost ograničena je uglavnom na minimalnu slobodnu frakciju T4/T3 koji, vezivanjem za nuklearne receptore (TR α , TR β), pokreću signalnu kaskadu. Cijeli proces reguliran je negativnom povratnom spregom na razini hipotalamusa i adenohipofize, koja osigurava uravnoteženo lučenje potrebne količine hormona štitnjače (2, 3, 4).

1.2. HIPOTALAMO-HIPOFIZNA OSOVINA I ŠTITNJAČA

1.2.1. ANATOMIJA I EMBRIOLOGIJA OSI

Hipofiza (pituitarna žlijezda) leži u udubini klinaste kosti (lat. *os sphenoidale*) imena tursko sedlo (lat. *sella turcica*), nalazi se na bazi mozga i povezana je s hipotalamusom te su zajedno anatomske i funkcionalno povezani (1). U embrionalnom razvoju dijelom se razvija od ektoderma usne šupljine, a drugi se dio razvija od živčanog sustava, prema čemu se i dijeli na adenohipofizu (prednji režanj) te neurohipofizu (stražnji režanj). Dva su dijela anatomske povezana, no različitih funkcija i građe (5). Adenohipofiza luči šest peptidnih hormona koji koordiniraju aktivnost endokrinih žlijezda: somatotropin (GH, eng. *growth hormone*), adrenokortikotropin (ACTH), tireotropin (TSH, hormon koji stimulira štitnjaču, eng. *thyroid stimulating hormone*), prolaktin, i dva gonadotropna hormona (FSH i LH,

1. UVOD

folikulostimulirajući i luteotropni hormon). Svaki peptidni hormon luči zasebna vrsta stanica koje dijele ime s hormonima koje stvara. Općenito, 30 - 40 % svih stanica čine somatotropne stanice, oko 20 % kortikotropne stanice, a 3 - 5 % pojedinačno ostale vrste stanica (2). Među posljednjima, nalazimo i malobrojne tireotropne stanice koje dijele razvojno podrijetlo sa somatotropima i laktotropima. Sva tri tipa stanica potomci su PIT-1 loze s korijenom u zajedničkom prekursoru, čije je obilježje izražaj pionirskih transkripcijskih čimbenika poput PITX1, PITX2, POU1F1, ASCL1, DACH1, RXRG i JUND. Terminalna diferencijacija tireotropa započinje izdvajanjem GATA2⁺ populacije Pre.Thy stanica iz roditeljske PIT-1 linije, s putanjom čiju progresiju prati porast izražaja barem 38 transkripcijskih čimbenika karakterističnih za zrele tireotrope (GATA2, ISL1, FOXL2, PBX1, RORB, MSX1, SIX1, NPDC1, SREBF2, HLF). Dinamika ovog procesa se razlikuje među vrstama, a u čovjeka se funkcionalni tireotropi pojavljuju u 10. tjednu gestacije (6).

1.2.2. BIOLOGIJA TIREOTROPNIH STANICA

Funkcijski, tireotropne stanice putem negativne povratne sprege reguliraju aktivnost folikularnih stanica štitnjače. U odgovoru na nedostatak T4/T3, hipotalamus otpušta TRH (hormon koji oslobađa tireotropin, engl. *thyrotropin-releasing hormone*) u hipotalamo-hipofiznu portalnu cirkulaciju, kojom TRH odlazi u distalnu adenohipofizu. Ondje, TRH stimulira otpuštanje TSH iz tireotropa u perifernu cirkulaciju. Nakon vezivanja za TSH receptor, TSH stimulira proizvodnju T4 i T3 u folikularnim stanicama štitnjače. Sam TRH proizvod je parvocelularnih, glutamatergičkih neurona paraventricularne jezgre hipotalamusa, čiji aksoni završavaju u medijanoj eminenciji u dnu treće moždane komore, gdje se TRH otpušta u fenestrirane kapilare hipofiznog portalnog sustava. TRH je trofni tripeptid-amid (piroglutamil-histidil-prolin-amid) koji se veže za TRH receptore (TRHR1) na membrani tireotropa, okidajući kaskadu signala posredovanu G-protein spregnutim receptorom. Aktivacija Gq/11 proteina dovodi do aktivacije fosfolipaze C (PLC), a PLC potom hidrolizira fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat u inozitol 1,4,5-trifosfat i 1,2-diacilglicerol (DAG). Ovi drugi glasnici mobiliziraju unutarstanične zalihe kalcija u citosol i aktiviraju protein kinazu C, što dovodi do nizvodne aktivacije gena i transkripcije TSH. Sinteza TSH regulirana je na razini transkripcije i translacije α - i β -TSH podjedinica, njihove glikozilacije i dimerizacije, a bioaktivnost oslobođenog dimera α - i β - podjedinice ovisi o glikozilacijskom obrascu. TSH- β podjedinica je jedinstvena za tireotrope, a TSH- α podjedinica (CGA, engl. *common glycoprotein A*) pojavljuje se i u LH, FSH i korionskom gonadotropinu. TSH se potom

1. UVOD

otpušta u krv i cirkulacijom stiže u štitnjaču, gdje se veže za TSH receptor na bazolateralnoj membrani folikularnih stanica. TSH-R je Gs-protein spregnuti receptor, a njegova aktivacija mobilizira adenilat-ciklazu, s posljedičnim porastom cAMP u stanici i aktivacijom protein kinaze A (PKA). PKA potom fosforilira niz proteina, ubrzavajući sve korake u proizvodnji T4/T3, od transporta joda u epitel, preko jodiranja tirozina i proteolize tireoglobulina, do sekrecije hormona i umnažanja angiofolikularnih jedinica (2, 7, 8).

Povrh ovog dominantnog sloja regulacije, koji je zadan biološkom raspoloživošću hormona štitnjače, hipotalamičke jezgre i tireotropi također posjeduju sposobnost integracije metaboličkih, okolišnih i upalnih signala. Zajednički, ovi signali odgovorni su za pojavu dnevnih i sezonskih ritmova u izlučivanju TSH, pojavu spolnog dimorfizma u funkciji tireotropa (9), i tzv. *euthyroid-sick* sindrom u kritično bolesnih ljudi (10). Mehanistički detalji ovih procesa začeđujuće su slabo poznati, kao i ukupni repertoar molekularnih zbivanja u samim tireotropima. U tom segmentu, organizacija kromatina i genskog izražaja, biljezi staničnog identiteta tireotropa i njihove interakcije sa staničnim mikrookolišem teme su koje tek treba istražiti (11, 12).

Razlog tomu je uglavnom vrlo mali broj tireotropa i nedostupnost svježeg hipofiznog tkiva, čime je značajno ograničena mogućnost primjene naprednih tehnika staničnog mapiranja, poput sekvenciranja jednostanične RNK (scRNA-Seq, *single cell sequencing*). Uredno tkivo ljudske hipofize nemoguće je etički uzorkovati za života, što ograničava istraživanje na tkivo kadaveričnih donora koje je pretrpjelo toplu ishemiju različitog trajanja i agonalne promjene različitog stupnja. U takvim uvjetima, čuvanje tkiva često uključuje pothlađivanje i smrzavanje uzoraka, što povećava količinu artefakata u analizi (13, 14, 15). Dobne razlike među takvim donorima također su problematične: funkcijski status štitnjače evoluirao s dobi (16), kao i stanični krajobraz hipotalamusa i medijane eminencije (17, 18). Raspoloživi podaci su zato malobrojni i nehomogeni, a upotreba scRNA-Seq (koja favorizira svježe tkivo i direktno procesiranje), uglavnom ograničena na životinjske modele (13, 19).

1.3. SEKVENCIRANJE JEDNOSTANIČNE RNK (scRNA-seq)

Sekvenciranje RNK genomski je pristup za detekciju i kvantifikaciju glasničke RNK (*messenger*, mRNA) u biološkim uzorcima, a korisno je za proučavanje stanične biologije i staničnog odgovora. Jednostanično sekvenciranje RNK koristi čitav transkriptom stotina i tisuća individualnih stanica za stanično profiliranje na molekularnoj razini unutar složene

1. UVOD

mješavine populacija (20, 21, 22). Moderan je to pristup za razotkrivanje transkripcijske heterogenosti i složenosti genskih prijepisa unutar individualnih stanica, kao i za razotkrivanje sastava složenih staničnih ekosustava i njihovih funkcija unutar visoko organiziranih tkiva (23). Unatoč cijeni, tehničkoj zahtjevnosti i bioinformatičkoj složenosti, tehnologija scRNA-Seq stalno napreduje i danas je zlatni standard u izradi staničnih atlasa genskog izražaja.

Sama metoda destruktivne je naravi, preferira svježije tkivo, i zahtijeva oslobađanje stanica iz tkivne slagaline (14, 15). Postoji više izvedenica metode, no svima je zajedničko nekoliko tipičnih koraka: izolacija pojedinačnih stanica (mikrodisekcija tkiva, disocijacija uzorka ili sortiranje stanica), priprema knjižnice (reverzna transkripcija, sinteza barkodirane cDNA, amplifikacija) i sekvenciranje sljedeće generacije (NGS, engl. *Next-Generation Sequencing*) (13, 24)

Na komercijalnim platformama, izdvajanje pojedinačnih stanica iz stanične suspenzije često koristi mikrofluidnu tehnologiju. Mikrofluidna tehnologija isplativa je i efikasna te zahtijeva umjerenu količinu stanica te koristi nanolitarske volumene. Mikrofluidne tehnologije kao npr. Chromium (10X Genomics), inDrop i Drop-seq bazirane su na mikrokapljicama vode u ulju, u kojima se pojedinačne stanice, reagensi za reverznu transkripciju, kuglice gela i pufer za liziranje kombiniraju na mikrofluidnom čipu u zatvorene reakcijske kapljice. Kuglice gela na svojoj površini imaju jedinstvene početnice (barkodirane oligonukleotide) koje hvataju i umnažaju transkripcijski sadržaj (14, 25). Nakon liziranja stanica kako bi se oslobodila RNK, koriste se poly[T] početnice za hvatanje poliadenilirane mRNK, a izbjegavanje ribosomske RNK. Nakon toga, slijedi reverzna transkripcija poliadenilirane RNK. Kao rezultat toga, sve cDNA iz jedne stanice imati će isti barkod koji omogućava da se očitavanja sekvenciranja preslikaju natrag na izvorne pojedinačne stanice. Ovisno o protokolu, na početnice reverzne transkripcije nadodaju se i drugi sljedovi nukleotida. To mogu biti sljedovi koji služe kao adapteri za NGS platforme, jedinstveni molekularni identifikatori (UMI-ji, engl. *unique molecular identifiers*) za označavanje jedne molekule mRNK, odnosno sljedovi za očuvanje informacija o staničnom podrijetlu. Zatim se cDNA mora amplificirati lančanom reakcijom polimerazom (PCR-om) te se nakon toga označena i amplificirana cDNA iz svake stanice združuje za pripremu knjižnice i sekvenciranje koristeći NGS (20). Nastali sekvencijski podatci potom prolaze kontrolu kvalitete i niz bioinformatičkih postupaka koji sirove podatke pretvaraju u matrice genskog izražaja. Ove matrice, koje sadrže podatak o broju očitavanja svakog detektiranog gena (redak) u svakoj pojedinačnoj stanici (stupci), polazište su za raščlambu specifičnih aspekata stanične biologije namjenskim bioinformatičkim alatima. Na

1. UVOD

taj način, metodom scRNA-Seq mogu se otkriti rijetke i visokospecijalizirane populacije stanica, raščlaniti stanična raznovrsnost, rekonstruirati genske regulacijske mreže, i pratiti razvojne putanje pojedinih staničnih vrsta (15, 26).

Koristeći ovaj analitički potencijal, u planiranom istraživanju ispitati ćemo brojnost i transkripcijsku arhitekturu tireotropnih stanica uporabom scRNA-Seq. U tu svrhu, izabrane su javno dostupne knjižnice direktnog sekvenciranja jednostanične RNK 5 mišjih hipofiza koje pripadaju homogenoj populaciji singenih životinja podjednake dobi (C57BL/6N soj, 7-10 tjedana starosti) (27). Očekivani ishod je atlas genskih modula (regulona) i bioloških procesa na kojima počiva identitet i funkcija tireotropnih stanica.

2. HIPOTEZA

Tireotropne stanice adenohipofize miša odlikuju se karakterističnom transkripcijskom arhitekturom i genskom regulacijom.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cenzus tireotropnih stanica mišje adenohipofize na jednostaničnoj rezoluciji uporabom scRNA-Seq te identifikacija razlikovnih biljega i genskih modula (regulona) u tireotropnim stanicama mišje adenohipofize.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

Sirovi cjelogenomski scRNA-Seq podatci 5 uzoraka tkiva hipofize (*Mus musculus*, C57BL/6N soj, GSE serija 161751) preuzeti su u 10X formatu (referentni genom GRCm38, 10X Genomics, Illumina HiSeq). Podatci su javno i slobodno dostupni bez ograničenja (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/, zadnji pristup 05.12.2022.). Procesni detalji su ranije objavljeni, kao i uvjeti uzgoja, smještaja i skrbi za životinje (27).

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Osijek (URBROJ: 2158-61-46-23-22, KLASA: 602-04/23-08/03, 23.veljače 2023.).

4.2. Metode

S obzirom na minimalni volumen i prinos stanica u svakom pojedinačnom uzorku tkiva, sve su stanice nakon digestije tkiva objedinjene i istodobno procesirane u jednoj sekvencijskoj traci (~ 5100 stanica, s očekivanim udjelom tireotropnih stanica od 1-2 %).

Nakon rekonstrukcije matrice očitavanja i eliminacije dubleta [DoubletFinder, (28)], tireotropne stanice su digitalno (*in silico*) sortirane korištenjem tipičnog Seurat protokola (v4.0.3, satijalab.org/seurat/) u scMiko paketu (<https://github.com/NMikolajewicz/scMiko>), uz sljedeće modifikacije: $200 < nFeature_RNA < 3000$, postotak mitohondrijske RNK < 15 , 3000 varijabilnih gena, prvih 30 glavnih komponenti, rezolucija 0,3-0,5 (29, 30). Grupiranje zadržanih stanica počiva na metodi K-najbližih susjeda [Louvain algoritam, (31)], a vizualizacija rezultata provedena je nelinearnom redukcijom dimenzionalnosti [*Uniform Manifold Approximation and Projection*, UMAP, (32)]. Za identifikaciju staničnih populacija korištena je lista kanoničkih biljega iz rada Rizzoti i sur (33). Analiza razlikovno izraženih gena u tireotropnim stanicama izvedena je neparametrijskim Wilcoxon testom (Seurat, *FindAllMarkers* funkcija, uz omjer izražaja $|\log_2FC/fold\ change| > 0,25$, dvostrani Benjamini-Hochberg $P < 0,05$ i izražaj u najmanje 25 % stanica).

Analiza bioloških putova koji su zastupljeni u listi biljega tireotropnih stanica koristi v2022.1.Mm i v2022.1.Hs verziju MSigDB zbirke (v7.51, *The Molecular Signatures Database*, Broad Institute, Cambridge, MA, SAD). Prag značajnosti definiran je kao FDR (q, *false discovery rate*) $< 0,05$, i to za genske skupove s minimalno 5 gena (34).

Rekonstrukcija genske regulacijske mreže izvedena je koristeći standardni SCENIC 1.1.2-0.1 i GENIE3 protokol (35, 36). Za rekonstrukciju regulona (TF, transkripcijski čimbenik s

4. MATERIJAL I METODE

ciljnim genima) i kvantifikaciju njihove aktivnosti u svakoj tireotropnoj stanici (SCENIC, *AUCell* funkcija) korišten je RcisTarget v1.10.0 i dvije baze *cis*-regulacijskih motiva (genomskih sekvenci za koje se vežu TF): 'mm9-500bp-upstream-7species.mc9nr.feather' [500 parova baza (bp) uzvodno od transkripcijskog start signala (TSS)] i 'mm9-tss-centered-10kb-7species.mc9nr.feather' (prozor centriran na ± 10 kbp oko TSS, <https://resources.aertslab.org/cistarget/>, ukupno 1721 TF, posljednji pristup 14.01.2023.). Za potrebe ove analize, korišteni su samo geni iz FEATHER datoteka s najmanje $0,09 \times N$ očitavanja u barem 5 stanica, gdje je N broj tireotropnih stanica (~5400 gena, ~470 TF).

Za vizualizaciju regulona je korištena pripadna LOOM datoteka (36) u SCOPE sučelju (<https://scope.aertslab.org/>) i ComplexHeatmap paket u R programu.

Za vizualizaciju bioloških putova iz Kyoto Enciklopedije Gena i Genoma (<https://www.genome.jp/kegg/>) korišten je Pathview paket (37).

Interkonverzija genskih simbola temelji se na biomaRt paketu (*The HUGO Gene Nomenclature Committee*/HGNC ↔ Ensembl/ENSMUS, http://www.ensembl.org/Mus_musculus). Genska imena predstavljaju HGNC (*The HUGO Gene Nomenclature Committee*) simbole.

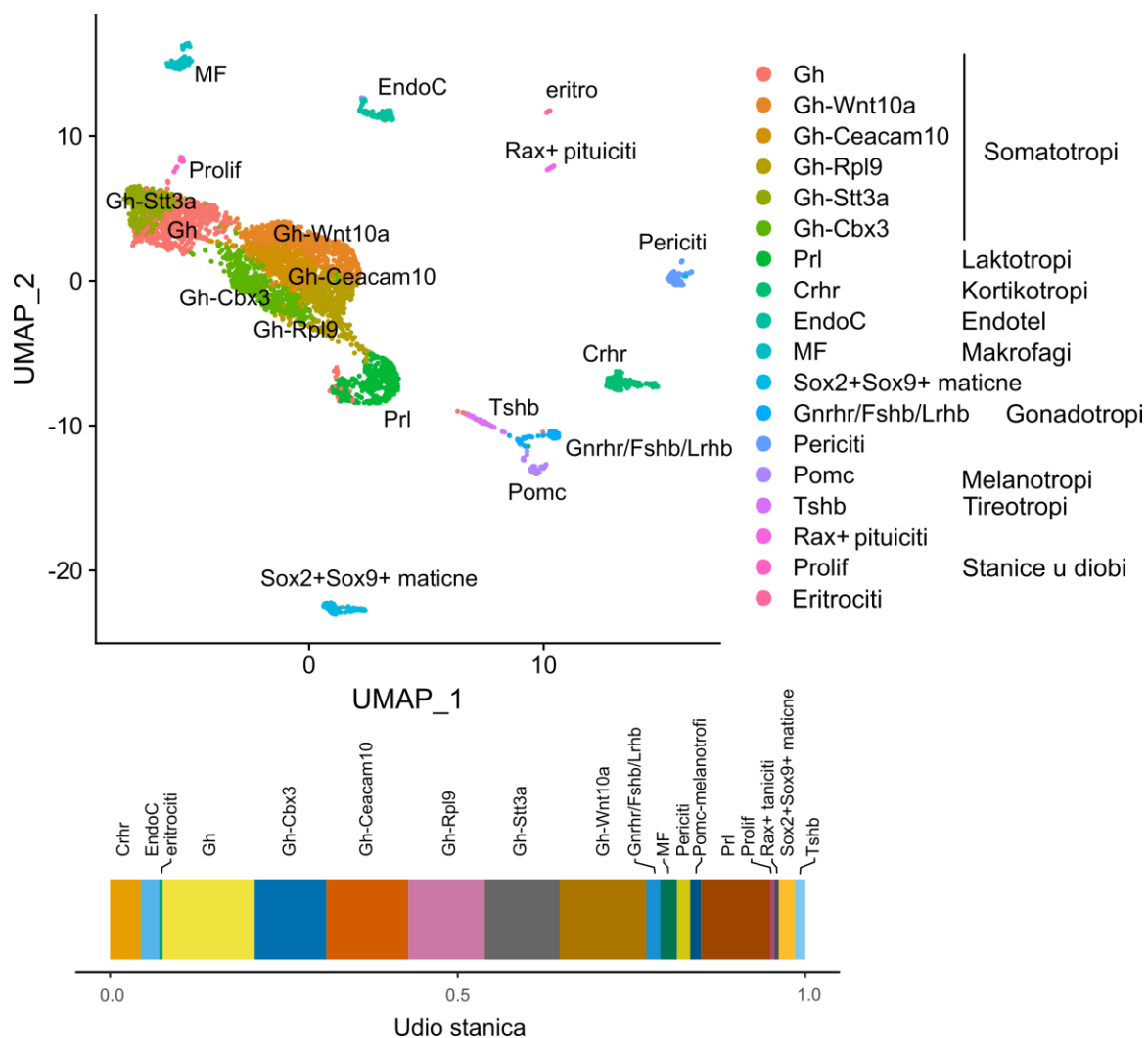
4.3. Statističke metode

Deskriptivna analiza slijedi uobičajena pravila prikaza podataka, a analiza scRNA-Seq podataka preporučena pravila (13, 14, 15). Kategoričke varijable sažete su upotrebom apsolutnih i relativnih frekvencija (postotak). Za prosječni izražaj gena korištena je aritmetička sredina. Ukoliko nije drugačije naznačeno, preprocesiranje i vizualizacija rezultata provedeni su u R4.0.3 programu (*The R Project for Statistical Computing*, Vienna, Austria, www.r-project.org). Radne bilježnice s R kodovima dostupne su na opravdan zahtjev.

5. REZULTATI

5.1. Deskriptivna analiza

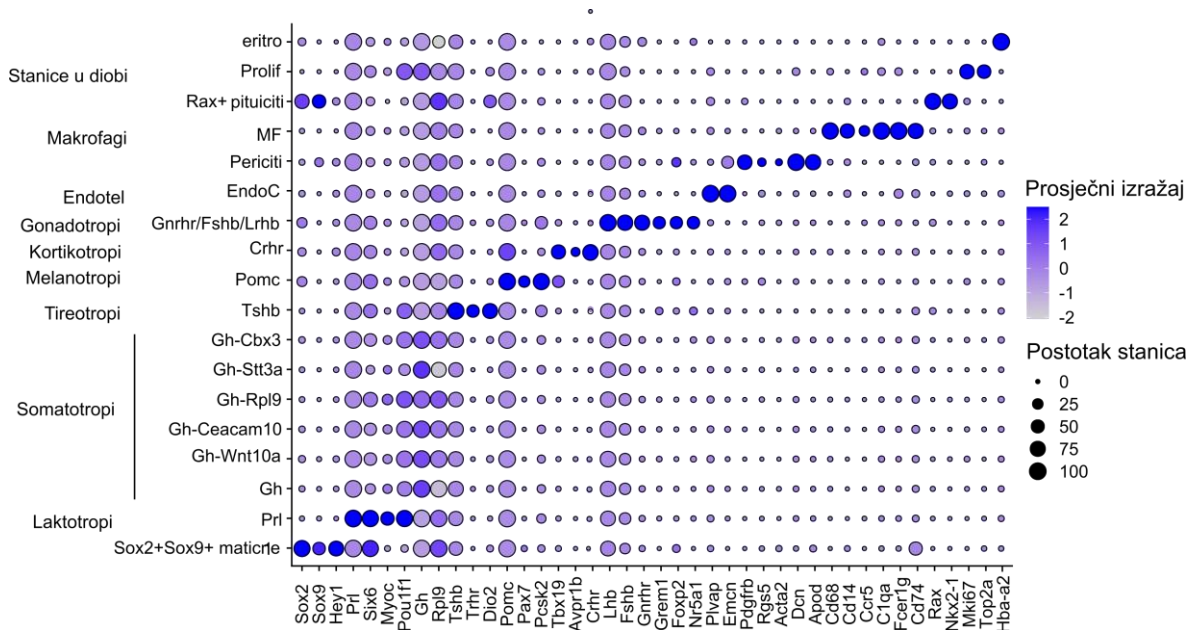
Nakon eliminacije dubleta i kontrole kvalitete, preostalih 4486 stanica mišje adenohipofize razvrstano je u 18 populacija (Slika 1).



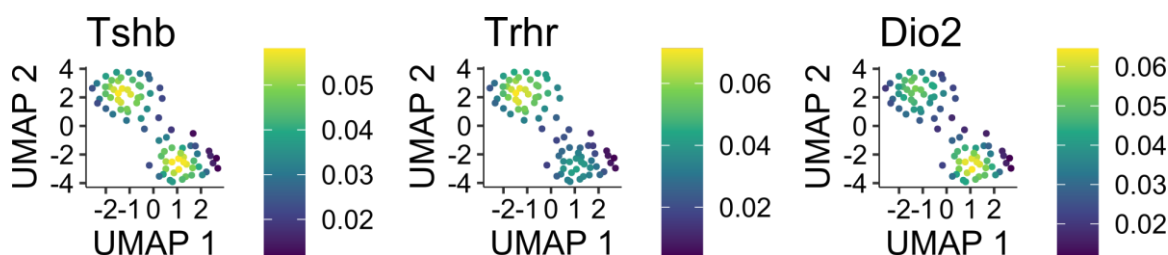
Slika 1. Stanične populacije, UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) reprezentacija. Za sve slike, rječnik genskih simbola dostupan je na <http://www.informatics.jax.org/marker> (*Mouse Genome Informatics* v6.22, 27-12-2022, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, SAD). Horizontalna vrpca: učešće pojedinih vrsta stanica u ukupnoj populaciji.

5. REZULTATI

Glavninu identificiranih stanica čine endokrine stanice, uz minimalni doprinos makrofaga, pericita, endotela i eritrocita periferne krvi. Očekivano, najbrojniju populaciju stanica čine somatotropi koji proizvode hormon rasta (6 Gh^+ skupina, 70 %), potom laktotropi koji izlučuju prolaktin (Prl^+ , 10 %, Slika 2). Tireotropi ($Tshb^+Trhr^+$ frakcija) čine svega 1,8 % ukupne populacije stanica mišje adenohipofize (n=82, Slika 1-3). Karakteristično za mišje tireotrope (9), snažan izražaj $Tshb$ prati bazalni izražaj Prl i Gh (Slika 2).



Slika 2. Točkasti dijagram ekspresije razlikovnih biljega u pojedinim populacijama hipofiznih stanica (mišja adenohipofiza, normalizirane, Z-vrijednosti). Intenzitet boje i veličina kruga proporcionalni su razini ekspresije (Prosječni izražaj) i postotnom udjelu stanica koje prepisuju gen (% stanica).



Slika 3. Genski izražaj kanoničkih staničnih biljega (normalizirane vrijednosti) u tireotropnim stanicama (n=82). UMAP = *Uniform Manifold Approximation and Projection*, rezolucija=0,3.

5. REZULTATI

Daljnjom raščlambom tireotropnih stanica identificirali smo 155 razlikovno izraženih gena, od kojih prvih 25 prikazujemo u Tablici 1 (cjelovit popis dostupan je na razuman zahtjev).

Tablica 1. Popis razlikovno izraženih gena u tireotropima mišje adehohipofize (82 stanice).

| Gen | MGI simbol | avg_log ₂ FC | p_adj |
|---------------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| ENSMUSG00000038760 | Trhr | 0,453 | 1,39x10 ⁻²⁹⁵ |
| ENSMUSG00000039579 | <i>Grin3a</i> | 0,271 | 1,00x10 ⁻¹⁷² |
| ENSMUSG00000007682 | Dio2 | 0,418 | 2,50x10 ⁻¹³² |
| ENSMUSG000000051747 | <i>Ttn</i> | 1,206 | 4,98x10 ⁻¹¹³ |
| ENSMUSG000000055409 | <i>Nell1</i> | 0,503 | 1,39x10 ⁻¹¹¹ |
| ENSMUSG000000033569 | <i>Adgrb3</i> | 0,487 | 1,84x10 ⁻⁵⁸ |
| ENSMUSG000000041710 | <i>Trpc5</i> | 0,390 | 7,86x10 ⁻⁵¹ |
| ENSMUSG000000022269 | <i>Marchf11</i> | 0,474 | 1,46x10 ⁻⁴⁸ |
| ENSMUSG000000027350 | <i>Chgb</i> | 0,504 | 2,70x10 ⁻⁴⁵ |
| ENSMUSG000000049265 | <i>Kcnk3</i> | 0,753 | 8,47x10 ⁻⁴⁵ |
| ENSMUSG000000028298 | <i>Cga</i> | 2,579 | 3,00x10 ⁻⁴³ |
| ENSMUSG000000027857 | Tshb | 0,482 | 4,67x10 ⁻⁴³ |
| ENSMUSG000000033061 | <i>Resp18</i> | 0,279 | 5,46x10 ⁻⁴³ |
| ENSMUSG000000026185 | <i>Igfbp5</i> | 1,113 | 6,18x10 ⁻⁴⁰ |
| ENSMUSG000000064341 | <i>mt-Nd1</i> | 0,562 | 1,98x10 ⁻³⁵ |
| ENSMUSG000000021194 | <i>Chga</i> | 0,489 | 8,38x10 ⁻³⁵ |
| ENSMUSG000000064354 | <i>mt-Co2</i> | 0,802 | 1,09x10 ⁻³⁴ |
| ENSMUSG000000064363 | <i>mt-Nd4</i> | 0,467 | 4,56x10 ⁻³⁴ |
| ENSMUSG000000064358 | <i>mt-Co3</i> | 0,679 | 6,47x10 ⁻³³ |
| ENSMUSG000000064345 | <i>mt-Nd2</i> | 1,236 | 1,30x10 ⁻³² |
| ENSMUSG000000064370 | <i>mt-Cytb</i> | 0,677 | 1,61x10 ⁻³² |
| ENSMUSG000000029219 | <i>Slc10a4</i> | 0,414 | 2,25x10 ⁻³² |
| ENSMUSG000000003363 | <i>Pld3</i> | 0,427 | 3,34x10 ⁻³² |
| ENSMUSG000000064357 | <i>mt-Atp6</i> | 0,528 | 6,10x10 ⁻³² |
| ENSMUSG000000036192 | <i>Rorb</i> | 0,446 | 1,42x10 ⁻³¹ |

avg_log₂FC prosječni izražaj gena, prirodni logaritam omjera izražaja (*fold change*), p_adj korigirana p-vrijednost (Wilcoxon test, Benjamini-Hochberg korekcija). Kanonički biljezi su masno otisnuti. MGI: Mouse Genome Informatics v6.22 (27-12-2022, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, SAD).

U biološkoj analizi, razlikovno izraženi geni rekapituliraju funkcijske i fiziološke odlike tireotropa. Popis predvodi Trh receptor na kojem počiva transdukcija hipotalamičkog Trh

5. REZULTATI

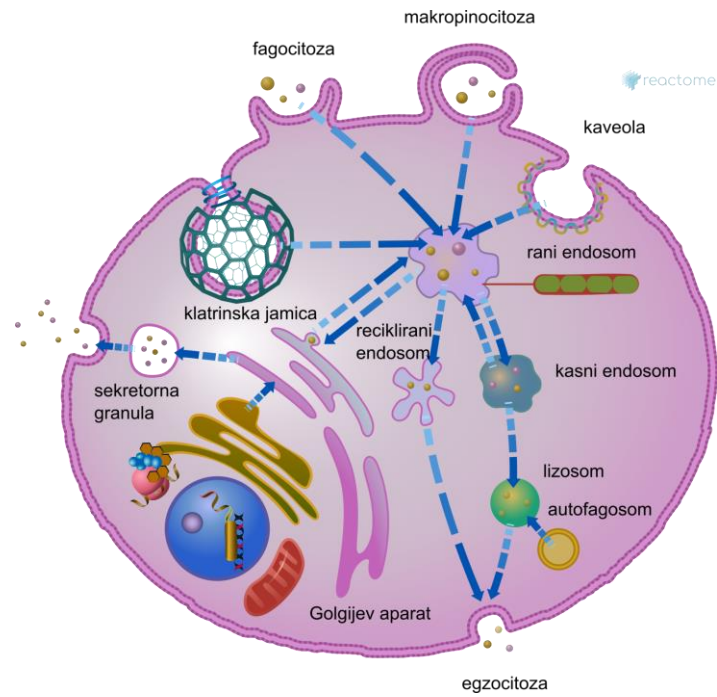
signala, a slijedi ga izražaj β -podjedinice tireotropina (*Tshb*), glavnog sekretornog produkta tireotropa (Slika 3, Tablica 1).

Nadalje, tireotropna populacija je obilježena snažnim genskim izražajem molekula koje upravljaju posttranslacijskim, proteolitičkim procesiranjem peptida (*Cpe*, *Cpq*, *Pcsk1*, *Ctsl*) i prometovanjem proteina (*Lrpap1*, *Ly6h*). *Pcsk1* je proprotein konvertaza iz subtilisin/keksin obitelji koja proteolitički aktivira polipeptidne hormone i neuropeptide poput Trh (38). *Pcsk1* procesira prekursorski preproTrh u intermedijarni peptid, proTrh, a karboksipeptidaza E (*Cpe*) potom konvertira proTrh u bioaktivni Trh uklanjanjem C-terminalnog lizina i arginina (39). Osim u tireotropima, *Cpe* je obilno prisutna i u β -stanicama gušterače, gdje slično katalizira konverziju proinzulina u inzulin (40).

Među ostalim genima, izdvaja se izražaj membranskih ionskih transportera, poput *Scn3a* (natrijski voltažni kanal), ionotropnih glutamatergičkih receptora (*Gria2*, *Grin3*) i *Kcnk3*, pH-ovisnog kalijevog kanala koji formira kompleks s Trh receptorom i čiju aktivnost snažno inhibira vezivanje Trh za Trhr (41). Karakteristično za *Gaq/11* klasu receptora poput Trhr, prisutan je snažan genski izražaj *Plcb1*, fosfolipaze $C\beta$ koja hidrolizom fosfatidilinositol 4,5-bisfosfata pokreće rani i brzi ulazak kalcija u citosol u odgovoru na aktivaciju Trhr (42). U istoj kategoriji nalazi se i *Trpc5*, kationski/kalcijski kanal koji posreduje membransku depolarizaciju i kasnu mobilizaciju skladišnog kalcija u odgovoru na Trh (43). Zajednički, ovaj rani i kasni (bifazični) pomak kalcija u citosol okida egzocitozu Tsh iz sekretornih vezikula u portalnu cirkulaciju hipofize.

Drugu značajnu skupinu razlikovnih prijepisa čine geni tipični za endokrine stanice čija sekrecija počiva na egzocitozi peptida (Slika 4). Među njima (Tablica 2), izdvajaju se geni uključeni u posttranslacijske modifikacije i sortiranje N-glikoformi β -podjedinice Tsh proteina (*Fuca1*, *Aga*, *Dad1*, *Rpn2*, *Ddost*, <https://glygen.org/protein/P01222#Glycosylation>), komponente endoplazmatskog retikuluma, Golgijeovog aparata i proteini sekretornih granula (*Chga*, sekretogranini) koji sudjeluju u transportu endosoma (*Rab27b*), egzocitozi i recikliranju vezikula (*Sv2a*). Uloga *Igfbp5*, čiji produkt regulira dostupnost inzulinskog čimbenika rasta Igf2 u prednjem režnju hipofize, je manje jasna ali potencijalno značajna. Naime, genske varijante unutar *Igfbp5* lokusa snažno su povezane sa serumskom razinom Tsh (44) u čovjeka.

5. REZULTATI



Slika 4. Shematski (simbolički) prikaz staničnih postaja na putu od prepisivanja *Tshb* gena u jezgri do sortiranja Tsh u endosomima i egzocitoze u izvanstanični prostor. Prilagođeno prema R-HSA-5653656, <https://reactome.org/>, sukladno *Creative Commons Attribution 4.0* licenci (CC-BY 4.0).

5. REZULTATI

Tablica 2. Analiza bioloških pojmova u listi razlikovno izraženih gena.

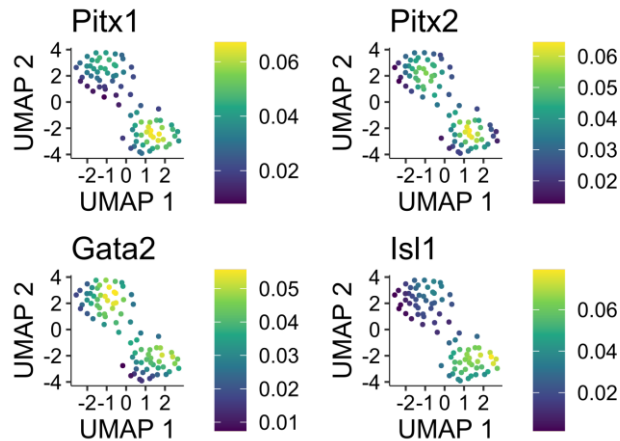
| Katalog (izvorni naziv) | N | q | Razlikovno izraženi geni |
|-------------------------------------------------------------------|----|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GOBP_SECRETION (sekrecija) | 25 | $2,48 \times 10^{-10}$ | <i>Isl1, Sdc4, Gata2, Bsg, Grin3a, Nrnx1, Gnas, Rbp4, Pcsk1, Nell2, Ttn, Cadps2, Tmed10, Rab27b, Sv2a, Ptprn, Chga, Hmg3, Scg5, Pam, Psap, Dio2, Cpe, Cga, Sdf4</i> |
| GOCC_ENDOPLASMIC_RETICULUM (endoplazmatski retikulum) | 43 | $5,79 \times 10^{-20}$ | <i>Gria2, Calr, Tmed10, Pdia3, Olfm1, Tmed3, Atp6ap1, Rpn2, Ssr4, Dad1, Ddost, Krtcap2, Emc10, Pcsk1, Sv2a, Mt3, App, Bsg, Resp18, Cst3, Nrnx1, Thy1, Brinp1, Clu, Elapor1, Pld3, Bcap31, Lrpap1, Cpq, Sdf4, Hsp90b1, Hspa5, Sdf211, Tecr, Manf, Aga, Rasd1, Cd320, Prdx4, Nenf, Rcn2, Fkbp2, Mest</i> |
| GOCC_MEMBRANE_PROTEIN_COMPLEX (membranski proteinski kompleks) | 35 | $7,05 \times 10^{-19}$ | <i>Gria2, Olfm1, Atp6ap1, Pcsk1, Sv2a, Mt3, App, Nrnx1, Clu, Grin3a, Gng3, mt-Nd2, Atp6v0e2, Ptprn, Cpe, Atp2b1, Cadm1, Cadps2, Ctnbp2, Slc10a4, Cntn1, Emb, Sdc2, Gpc4, Rabac1, Adam23, Adgrb3, Plcb1, Pak3, Nptxr</i> |
| GOCC_SECRETORY_VESICLE (sekretorna vezikula) | 26 | $3,74 \times 10^{-17}$ | <i>Calr, Tmed10, Pdia3, Pcsk1, Sv2a, Mt3, App, Bsg, Resp18, Ptprn, Cpe, Pam, Ctst, Atp2b1, Cadm1, Rab27b, Pcsk1n, Cadps2, Ctnbp2, Slc10a4, Chga, Scg3, Scg2, Chgb, Scg5</i> |
| GOCC_GOLGI_APPARATUS (Golgi aparat) | 34 | $4,44 \times 10^{-15}$ | <i>Calr, Tmed10, Tmed3, Pcsk1, App, Resp18, Cst3, Elapor1, Pld3, Bcap31, Lrpap1, Cpq, Sdf4, Gnas, Ptprn, Cpe, Pam, Ctst, Rab27b, Pcsk1n, Stmn3, Sdc2, Gpc4, Rabac1, Tmem59, Tgoln1, Dpp7, Aplp1, Tmem130, Sdc4, Parm1, Gnptg, St8sia3, Tmem59l</i> |
| GOCC_SYNAPSE (sinapsa) | 30 | $1,23 \times 10^{-12}$ | <i>Gria2, Olfm1, Atp6ap1, Pcsk1, Sv2a, Mt3, App, Nrnx1, Clu, Grin3a, Gng3, mt-Nd2, Atp6v0e2, Ptprn, Cpe, Atp2b1, Cadm1, Cadps2, Ctnbp2, Slc10a4, Cntn1, Emb, Sdc2, Gpc4, Rabac1, Adam23, Adgrb3, Plcb1, Pak3, Nptxr</i> |
| GOBP_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION (oksidativna fosforilacija) | 13 | $2,28 \times 10^{-11}$ | <i>mt-Nd4, mt-Nd5, mt-Nd1, mt-Nd3, mt-Nd2, mt-Nd4l, mt-Co2, mt-Cytb, mt-Co1, mt-Co3, Ndufb11, Ndufa13, mt-Atp6</i> |
| GOBP_REGULATION_OF_TRANSPORT (regulacija transporta) | 34 | $5,25 \times 10^{-11}$ | <i>Isl1, Sdc4, Gata2, Bsg, Grin3a, Nrnx1, Gnas, Rbp4, Pcsk1, Nell2, Ttn, Cadps2, Tmed10, Rab27b, Sv2a, Ptprn, Chga, Hmg3, Scg5, Pam, Atp1b1, Atp2b1, App, Thy1, Cntn1, Clu, Calr, Ndufa4, Plcb1, Kcnk3, Bcap31, Scn3a, Slc10a4, Lrpap1</i> |

GO *Gene Ontology*, BP *Biološki Proces*, CC *Cellular Component* (stanična komponenta), MF *Molekularna Funkcija*. N broj gena, q Benjamini-Hochberg korigirana P-vrijednost.

5. REZULTATI

Treću veliku skupinu prijepisa čine mitohondrijske komponente respirasoma, prvenstveno geni koji kodiraju kompleks I u putu oksidativne fosforilacije.

Konačno, posljednju skupinu čine prijepisi transkripcijskih faktora, njih 8, među kojima su i kanonički, *bona fide* razvojni biljezi poput *Pitx1* i *Pitx2*, *Gata2* i *Isl1* (Slika 5).



Slika 5. Genski izražaj linijski specifičnih transkripcijskih faktora u tireotropnim stanicama. UMAP = *Uniform Manifold Approximation and Projection*, rezolucija=0,3.

Osim razlikovno izraženih gena, tireotropi prepisuju i veliki broj bazičnih, “kućepaziteljskih” gena koji sudjeluju u redovitom održavanju strukture, funkcije i metabolizma stanice. Za širi uvid u transkripcijsku arhitekturu tireotropa, u idućem koraku okrenuli smo se analizi regulona koja omogućava sveobuhvatni uvid u staničnu aktivnost genskih modula i transkripcijskih čimbenika koji njima upravljaju.

5. REZULTATI

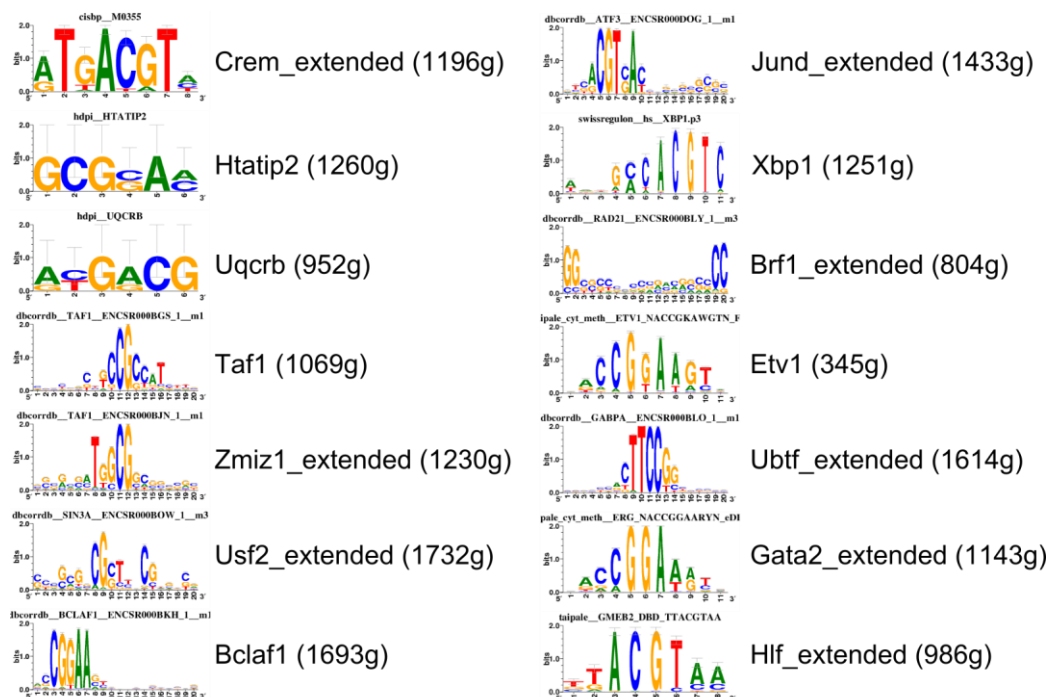
5.2. Analiza regulona

Ukupno, identificirali smo 129 regulona koji su aktivni u barem jednoj stanici, s više od 3500 ciljnih gena (detalji dostupni na zahtjev). Popis 10 najvećih regulona dostupan je u Tablici 3, a broj TF koji reguliraju izražaj kanoničkih biljega tireotropa, poput Trhr (Bclaf1, Creb3l2, Crem, Xbp1) i Dio2 (Bmyc, Crem, Htatip2, Ndpc1, Xbp1) iznosi 4-5.

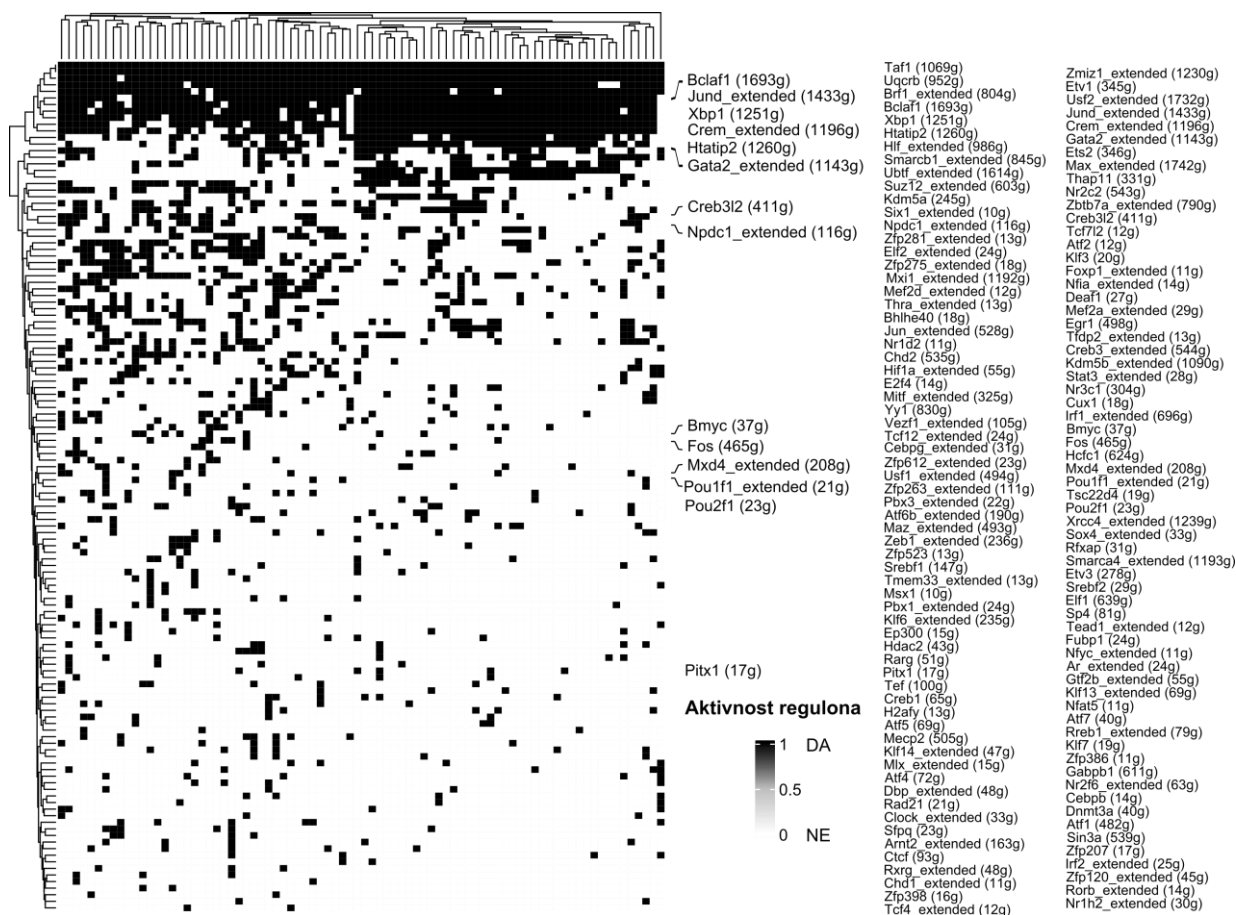
Tablica 3. Lista najvećih regulona. Regulon nosi naziv prema transkripcijskom faktoru koji kontrolira njegovu aktivnost (broj u zagradi odgovara broju ciljnih gena).

Xbp1 (580g)
 Htatip2 (458g)
 Bclaf1 (443g)
 Creb3l2 (372g)
 Ube2k (229g)
 Fos (57g)
 Crem (52g)
 Tcf4 (39g)
 Rxrg (15g)
 Jun (14g)

Tablica 4. Lista regulona koji su aktivni u > 70 % tireotropnih stanica. Broj u zagradi odgovara broju ciljnih gena, a sekvencija motivu.



5. REZULTATI



Slika 6. Binarna aktivnost regulona (da-crno, ne-bijelo) u tireotropnim stanicama mišje adenohipofize (Euklidska udaljenost, kompletna povezanost). Svaki redak odgovara jednom regulonu, svaki stupac jednoj stanici. Izdvojeni su transkripcijski čimbenici povezani sa linijskom specifikacijom tireotropa i izražajem kanoničkih biljega (Trhr). Broj u zagradi odgovara broju ciljnih gena.

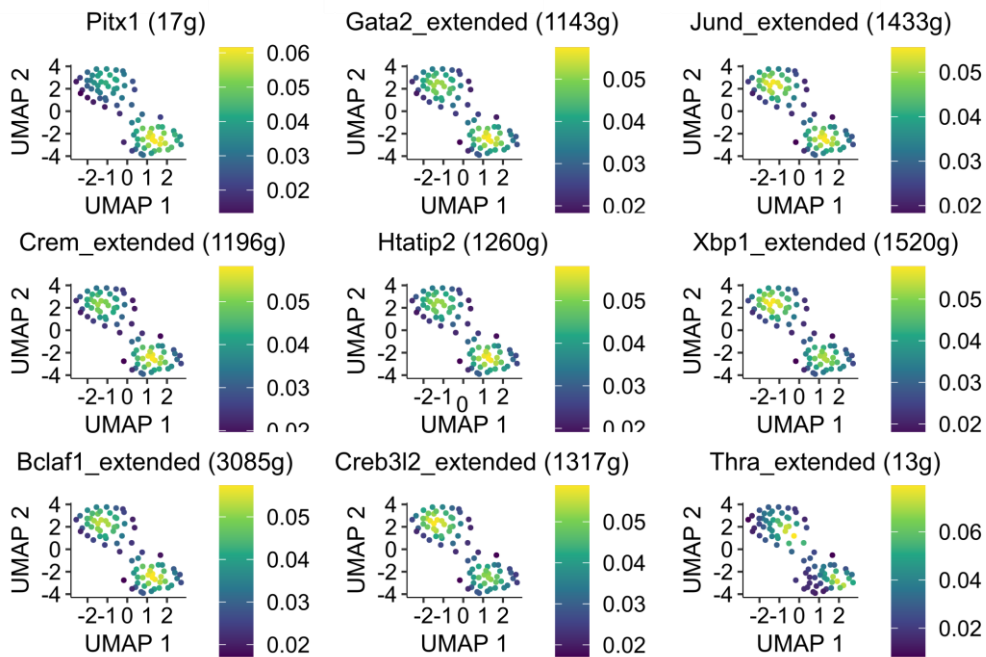
Većina najaktivnijih regulona (Tablica 4) ujedno su i reguloni s najvećim brojem ciljnih gena (Tablica 3). Među najaktivnijim regulonima nalaze se bazalni transkripcijski čimbenici poput Taf1, uz visok stupanj centralizacije genske regulacijske mreže na Jund, Xbp1 i Crem (Slika 6-7).

U širem popisu nalaze se brojni TF koji sudjeluju u održavanju zdravlja tireotropa kroz regulaciju staničnog odgovora na stres (Atf6b, Srebf1, Yy1, Xrcc4, Rad21, Taf1, Creb3l2, Jun i Cebpg). Ovu listu predvodi Xbp1, koji zajedno s Atf6 i Creb3l2 (45) upravlja biogeneom endoplazmatskog retikuluma (ER) i prilagodbenim odgovorom ER na proteostatski stres izazvan masivnim prometom nascentnih proteina (46). Creb3l2 je prisutan u mnogim sekrecijskim tkivima, uključujući otočiće gušterače, gdje kontrolira remodeliranje Golgijevog aparata, potencira translaciju proteina i povećava sekrecijski kapacitet stanice (47). Slično

5. REZULTATI

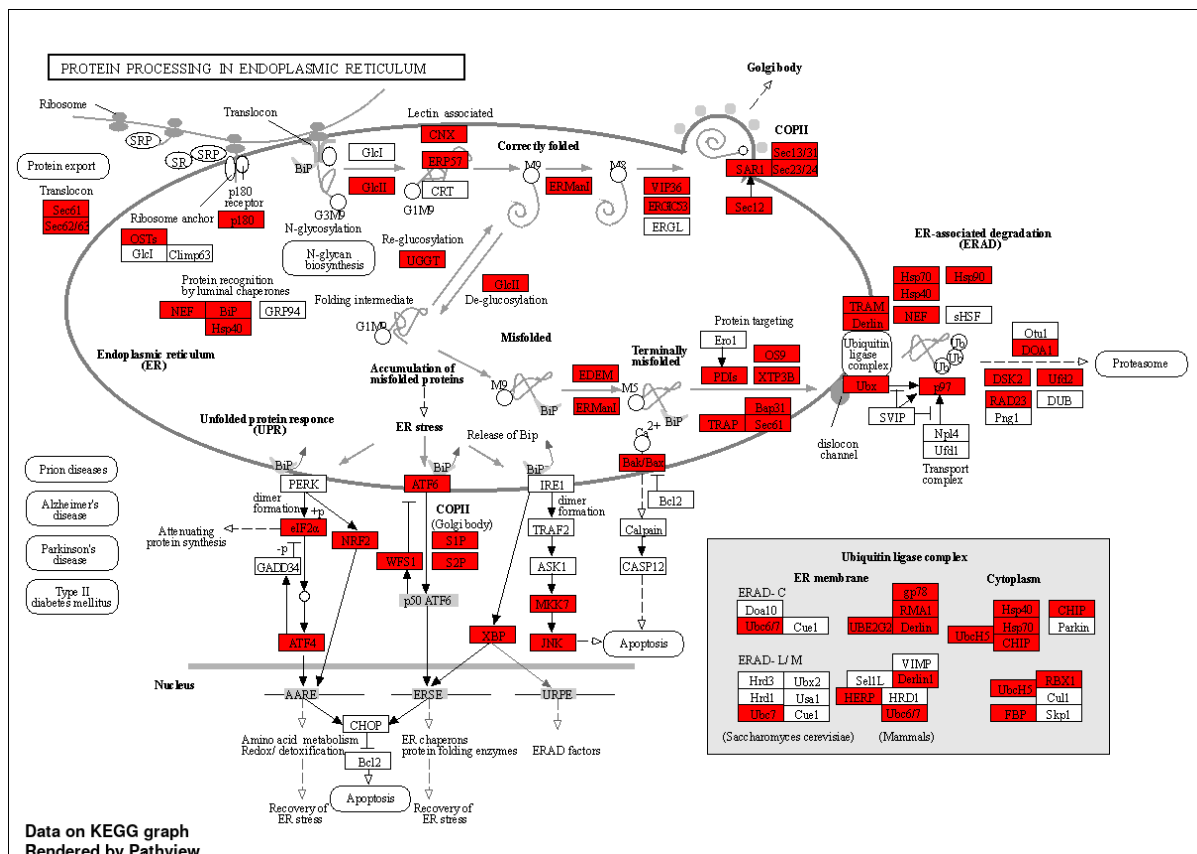
tome, *Jund*, *Xbp1*, and *Npdc1* reguloni povezani su s funkcijom i identitetom tireotropa i β -stanica (*Chga*, *Pcsk1*), sintezom proteina i ER stresom (48).

Među ostalim homeostatskim regulonima, izdvaja se *Bclaf1* koji predstavlja točku konvergencije za kontrolu translacije, kontrolu kvalitete proteina (Slika 8), N-glikozilaciju proteina, degradaciju staničnih organela autofagijom (49) i regulaciju oksidativne fosforilacije (Tablica 5). U prilog toga, *Bclaf1* regulon povezan je sa izražajem strukturnih komponenti ribosoma, proteosomskih podjedinica i regulatora alternativnog izrezivanja glasničke RNK (50).



Slika 7. Aktivnost regulona u tireotropnim stanicama. UMAP = *Uniform Manifold Approximation and Projection*, rezolucija=0,3 (broj u zagradi odgovara broju ciljnih gena).

5. REZULTATI



Slika 8. Bclaf1 regulon, ciljni geni (crveno) s ulogom u procesiranju proteina u endoplazmatskom retikulumu (Kyoto Enciklopedija Gena i Genoma).

Tablica 5. Analiza bioloških pojmova za ciljne gene iz Bclaf1 regulona.

| Katalog | q | Broj gena | Omjer obogaćenosti | Biološki put |
|----------|------------------------|-----------|--------------------|----------------------------------------------------|
| KEGG | $6,68 \times 10^{-15}$ | 31 | 4,84 | Proteasom |
| | $1,28 \times 10^{-20}$ | 64 | 3,58 | Spliceosom |
| | $7,04 \times 10^{-26}$ | 83 | 3,58 | Procesiranje proteina u endoplazmatskom retikulumu |
| | $1,46 \times 10^{-18}$ | 61 | 3,44 | Ribosom |
| | $1,52 \times 10^{-08}$ | 30 | 3,23 | Mitofagija |
| | $2,18 \times 10^{-13}$ | 56 | 2,93 | Autofagija |
| | $2,96 \times 10^{-10}$ | 49 | 2,70 | Oksidativna fosforilacija |
| | $1,73 \times 10^{-14}$ | 87 | 2,41 | Endocitoza |
| Reactome | $2,03 \times 10^{-32}$ | 98 | 3,69 | mRNA <i>splicing</i> (izrezivanje) |
| | $1,77 \times 10^{-16}$ | 93 | 2,53 | Asparagin, N-glikozilacija |

KEGG Kyoto Enciklopedija Gena i Genoma, q Benjamini-Hochberg korigirana P-vrijednost.

5. REZULTATI

Visoko na popisu nalaze se i članovi Creb/Crem obitelji koja kontrolira izražaj Trh u hipotalamusu (51), te receptori za androgene (Ar), glukokortikoidne hormone (Nr3c1), hormone štitnjače (Thra), retinoide (Rxrg) i oksisterole (Nr1h2). Šesnaest regulona pripada TF sa poznatom ulogom u hipofiznom razvoju i diferencijaciji (52), među kojima su i kanonički linijski regulatori poput Gata2, Pou1f1, Pitx1, Tcf7l2, Clock, Msx1, Six1, Pbx1 i Sox4 (Slika 5-7). Time je potvrđen funkcijski širok raspon identificiranih regulona: od pionirskih TF i linijski specifičnih autoregulatora (Gata2), preko homeostatskih procesa, do receptora za endogene i okolišne ligande iz steroidno-retinoidne i tiroidne nadobitelji.

6. RASPRAVA

Regulacija hormonske aktivnosti štitnjače dinamičan je i slojevit proces povjeren izrazito malobrojnoj populaciji hipofiznih tireotropa. Razvojna putanja ovih stanica vrlo je nejasna (6, 52), kao i način na koji ova skromna populacija dugoročno održava svoj identitet u metabolički i razvojno dinamičnom okružju.

Rezultat ovog istraživanja, koje počiva na sekvenciranju jednostanične RNK, nudi uvid u transkripcijska obilježja i gensku regulaciju zrelih tireotropa u miša. Sveukupno, pripadni atlas podupire rastuću literaturu u nekoliko detalja: I) tireotropi su stanice koje dijele multihormonalni profil (Tshb-Gh-Prl) s laktotropima i somatotropima, u prilog zajedničkog razvojnog prekursora. Sustavne manifestacije ove naravi vidljive su i prilikom aktivacije povratne sprege: u primarnoj hipotireozu, koju obilježava manjak T4 i T3 izazvan gubitkom funkcionalnog tkiva štitnjače, porast Tsh u serumu nerijetko prati i mjerljiv porast prolaktina (53). II) Tireotropi dijele niz transkripcijskih sličnosti s drugim endokrinim stanicama koje proizvode i luče peptidne hormone, uz prisustvo specifičnih odlika peptidergičke i glutamatergičke sinapse s hipotalamičkim Trh⁺ neuronima. III) U analizi dominantnih transkripcijskih čimbenika zastupljeni su već poznati (Tcf4, Rxrg, Xbp1) i novi regulatori (Bclaf1, Htatip2) koji se mogu razvrstati u pionirske i bazalne, kućepaziteljske TF. Aktivnost prvih (Pitx1/2, Pou1f1, Gata2) započinje rano tijekom razvojne specifikacije i upravlja kromatinskim remodeliranjem (Ctcf) tijekom tranzicije prekursora u funkcijski polariziranu populaciju zrelih tireotropa. Među takvima, barem 16 identificiranih regulona već ima poznatu ulogu u hipofiznoj diferencijaciji (6). Skupina bazalnih TF, koji kao dio transkripcijske mašinerije okupiraju otvoreni kromatin, posebno je istaknuta u rezultatima, čime je proširen uvid u ovaj, inače najmanjkaviji skup TF. Razlog tome je primjena SCENIC analize isključivo na tireotrope, što je dijelom uvjetovano računalnom zahtjevnosću zadatka, posebice u vidu vremenskog trajanja [$\sim O(N \log N)$ za broj stanica]. Nadalje, posebno se ističe skup nuklearnih receptora za endogene, okolišne, i farmakološke ligande iz steroidno-retinoidne nadobitelji, koji predstavlja polazište za mehanističko razumijevanje njihovih učinaka (i nuspojava) na biologiju tireotropa u zdravlju i bolesti. Općenito, prevladava slojevitost funkcija i genske regulacije, ilustrirajući snagu i informacijski potencijal scRNA-Seq u raščlambi staničnog identiteta.

Unatoč obilju informacija, ovo istraživanje ima i nekih nedostataka. Razlike među vrstama postoje, ograničavajući izravnu translaciju ovih rezultata na tireotrope čovjeka. Nadalje,

6. RASPRAVA

moćni spolni dimorfizam i dalje je otvoreno pitanje. Također, rezultati scRNA-Seq variraju preko različitih platformi, naglašavajući potrebu za tehničkom standarizacijom i usuglašavanjem nomenklature stanica. Maleni broj tireotropa posebna je zapreka na tom putu, koju dodatno usložnjavaju i biološke razlike među donorima (primjerice dobne). Maleni broj stanica jednako je zapreka i za finije profiliranje tireotropa, što otežava procjenu stanične raznolikosti (prisustva podgrupa) unutar ove populacije. Kao i uvijek u scRNA-Seq, važno je naglasiti eksploracijsku narav ovog istraživanja, kao i nužnost funkcijske validacije svih hipoteza koje imaju ishodište u ovom atlasu. Posebice je to važno za TF čija aktivnost ovisi o post-translacijskim modifikacijama. U tu svrhu, potrebne su metode molekularne biologije, poput scATAC-Seq i imunohistokemije.

U doseg ovih ograničenja, prikazani biološki resurs ilustrira i proširuje znanja o transkripcijskoj arhitekturi rijetkih populacija stanica adenohipofize.

7. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- 1) Tireotropne stanice čine <2 % ukupne populacije stanica mišje adenohipofize.
- 2) Tireotropne stanice odlikuju se karakterističnim izražajem razlikovnih biljega (n=155) koji omogućuju uvid u transkripcijska, signalna i funkcijska svojstva ovih stanica
- 3) Identifikacijom više od 100 regulona omogućen je širi uvid u transkripcijsku arhitekturu tireotropnih stanica mišje adenohipofize, razotkrivajući brojne nove i već poznate transkripcijske regulatore.

8. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA. Tireotropne stanice hipofize igraju središnju ulogu u homeostazi hormona štitnjače, ali temeljna pitanja u vezi s njihovom transkripcijskom organizacijom i regulacijom ostaju otvorena. Svrha rada je cenzus tireotropnih stanica mišje adenohipofize sekvenciranjem jednostanične RNK (scRNA-Seq), s ciljem identifikacije razlikovnih biljega i genskih regulona.

METODE. U tu svrhu, reanalizirali smo podatke scRNA-Seq iz 5 mišjih hipofiza kako bismo sveobuhvatno karakterizirali transkripcijsku dinamiku stanica koje proizvode tireotropin u homeostatskim uvjetima (*Gene Expression Omnibus* ID GSE161751, Seurat v4 alat, C57BL/6N soj u dobi 7-10 tjedana). Provedena je diferencijalna analiza genskog izražaja (Wilcoxonov test), nakon čega je uslijedila analiza obogaćenih putova (*Broad Molecular Signatures Database* v7.51). Nakon toga, aktivnost ključnih transkripcijskih čimbenika i genskih regulacijskih mreža identificirana je primjenom SCENIC algoritma na sirovim scRNA-Seq podacima.

REZULTATI. Tireotropi (n=82) čine <2 % ukupnog staničnog inventara prednjeg režnja mišje hipofize (n=4486), i odlikuju se osobitim transkripcijskim i regulacijskim obilježjima u usporedbi s drugim sekretornim stanicama. U SCENIC analizi, identificirano je 129 transkripcijskih regulona koji pokazuju najjaču aktivnost u subpopulaciji tireotropa, razotkrivajući brojne nove i arhetipske, *bona fide* regulatore.

ZAKLJUČCI. Naš jednostanični atlas tireotropa odraslih miševa nudi uvid u njihovu transkripcijsku organizaciju i regulaciju, pružajući polazište za nove analize.

Ključne riječi: analiza sekvenci; genske regulacijske mreže; jednostanična analiza; miševi, usrođeni C57BL; prednji režanj hipofize; profiliranje genskog izražaja; računalna biologija; RNK; tireotropi

9. ABSTRACT

“The analysis of murine anterior pituitary thyrotropes using single cell RNA sequencing”

AIM. Pituitary thyrotropes play a central role in thyroid hormone homeostasis, but fundamental questions remain regarding their transcriptional organization and regulation. To this purpose, we provide the census of mouse pituitary thyrotrope cells using single-cell RNA sequencing (scRNA-Seq), with the aim of identifying differentially expressed markers and gene regulons.

METHODS. We reanalyzed scRNA-Seq data from 5 murine pituitaries to comprehensively characterize the transcriptional dynamics of thyrotropin-producing cells under homeostatic conditions (Gene Expression Omnibus Identifier GSE161751, Seurat v4 pipeline, C57BL/6N strain, 7-10 weeks old). Differential gene expression analysis was performed (Wilcoxon’s test), followed by pathway enrichment profiling (Broad Molecular Signatures Database v7.51). In addition, key transcription factor activities and gene-regulatory networks were identified by running SCENIC workflow on raw scRNA-Seq data.

RESULTS. Thyrotropes (n=82) occupy <2 % of the total cellular inventory in mouse anterior pituitary (n=4486), showing distinct transcriptional and regulatory signatures as compared with other secretory cells. SCENIC analysis identified 129 transcriptional regulons that exhibit the strongest activities in thyrotrope subpopulation, revealing a number of novel and archetypal, *bona fide* regulators.

CONCLUSIONS. Our single cell atlas of adult murine thyrotropes provides an insight into their transcriptional organization and regulation, providing a starting point for novel analyses.

Keywords: Computational Biology; Gene Expression Profiling; Gene Regulatory Networks; Mice, Inbred C57BL; Pituitary Gland, Anterior, RNA; Sequence Analysis; Single-Cell Analysis; Thyrotrophs

10. LITERATURA

1. Rotim K i suradnici. Anatomija. Zagreb: Zdravstveno veleučilište; 2017. str. 121-23.
2. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. 13. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
3. Chaker L, Razvi S, Bensenor IM, Azizi F, Pearce EN, Peeters RP. Hypothyroidism. *Nat Rev Dis Primers*. 2022 May 19;8(1):30.
4. Cooper DS, Biondi B. Subclinical thyroid disease. *Lancet*. 2012 Mar 24;379(9821):1142-54.
5. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2005. str. 403-08.
6. Zhang S, Cui Y, Ma X, Yong J, Yan L, Yang M, i sur. Single-cell transcriptomics identifies divergent developmental lineage trajectories during human pituitary development. *Nat Commun*. 2020 Oct 19;11(1):5275.
7. Yamada M, Mori M. Mechanisms related to the pathophysiology and management of central hypothyroidism. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008 Dec;4(12):683-94.
8. Kondo Y, Ozawa A, Kohno D, Saito K, Buyandalai B, Yamada S, i sur. The Hypothalamic Paraventricular Nucleus Is the Center of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis for Regulating Thyroid Hormone Levels. *Thyroid*. 2022 Jan;32(1):105-114.
9. Ho Y, Hu P, Peel MT, Chen S, Camara PG, Epstein DJ i sur. Single-cell transcriptomic analysis of adult mouse pituitary reveals sexual dimorphism and physiologic demand-induced cellular plasticity. *Protein Cell*. 2020 Aug;11(8):565-583.
10. Lee S, Farwell AP. Euthyroid Sick Syndrome. *Compr Physiol*. 2016 Mar 15;6(2):1071-80.
11. Mendelev N, Zamojski M, Amper MAS, Cheng WS, Pincas H, Nair VD, i sur. Multi-omics profiling of single nuclei from frozen archived postmortem human pituitary tissue. *STAR Protoc*. 2022 Jun 7;3(2):101446.
12. Zhang Z, Zamojski M, Smith GR, Willis TL, Yianni V, Mendelev N, i sur. Single nucleus transcriptome and chromatin accessibility of postmortem human pituitaries reveal diverse stem cell regulatory mechanisms. *Cell Rep*. 2022 Mar 8;38(10):110467.

10. LITERATURA

13. Luecken MD, Theis FJ. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. *Mol Syst Biol.* 2019 Jun 19;15(6):e8746.
14. Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med.* 2018 Aug 7;50(8):1-14.
15. Andrews TS, Kiselev VY, McCarthy D, Hemberg M. Tutorial: guidelines for the computational analysis of single-cell RNA sequencing data. *Nat Protoc.* 2021 Jan;16(1):1-9.
16. Sawin CT, Castelli WP, Hershman JM, McNamara P, Bacharach P. The aging thyroid. Thyroid deficiency in the Framingham Study. *Arch Intern Med.* 1985 Aug;145(8):1386-8.
17. Hajdarovic KH, Yu D, Hassell LA, Evans S, Packer S, Neretti N, i sur. Single-cell analysis of the aging female mouse hypothalamus. *Nat Aging.* 2022 Jul;2(7):662-678.
18. Chen ZH, Li S, Xu M, Liu CC, Ye H, Wang B, i sur. Single-cell transcriptomic profiling of the hypothalamic median eminence during aging. *J Genet Genomics.* 2022 Jun;49(6):523-536.
19. Ruf-Zamojski F, Zhang Z, Zamojski M, Smith GR, Mendelev N, Liu H i sur. Single nucleus multi-omics regulatory landscape of the murine pituitary. *Nat Commun.* 2021 May 11;12(1):2677.
20. Haque A, Engel J, Teichmann SA, Lönnberg T. A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. *Genome Med.* 2017 Aug 18;9(1):75.
21. Andrews TS, Hemberg M. Identifying cell populations with scRNASeq. *Mol Aspects Med.* 2018 Feb;59:114-122.
22. Potter SS. Single-cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2018 Aug;14(8):479-492.
23. Jovic D, Liang X, Zeng H, Lin L, Xu F, Luo Y. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: A brief overview. *Clin Transl Med.* 2022 Mar;12(3):e694.
24. Chen G, Ning B, Shi T. Single-Cell RNA-Seq Technologies and Related Computational Data Analysis. *Front Genet.* 2019 Apr 5;10:317.

10. LITERATURA

25. Slovin S, Carissimo A, Panariello F, Grimaldi A, Bouché V, Gambardella G, Cacchiarelli D. Single-Cell RNA Sequencing Analysis: A Step-by-Step Overview. *Methods Mol Biol.* 2021;2284:343-365.
26. Wu Y, Zhang K. Tools for the analysis of high-dimensional single-cell RNA sequencing data. *Nat Rev Nephrol.* 2020 Jul;16(7):408-421.
27. Lopez JP, Brivio E, Santambrogio A, De Donno C, Kos A, Peters M, i sur. Single-cell molecular profiling of all three components of the HPA axis reveals adrenal ABCB1 as a regulator of stress adaptation. *Sci Adv.* 2021 Jan 27;7(5):eabe4497.
28. McGinnis CS, Murrow LM, Gartner ZJ. DoubletFinder: Doublet Detection in Single-Cell RNA Sequencing Data Using Artificial Nearest Neighbors. *Cell Syst.* 2019 Apr 24;8(4):329-337.e4.
29. Hafemeister C, Satija R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. *Genome Biol.* 2019 Dec 23;20(1):296.
30. Mikolajewicz N, Gacesa R, Aguilera-Urbe M, Brown KR, Moffat J, i sur. Multi-level cellular and functional annotation of single-cell transcriptomes using scPipeline. *Commun Biol.* 2022 Oct 28;5(1):1142.
31. Traag VA, Waltman L, van Eck NJ. From Louvain to Leiden: guaranteeing well-connected communities. *Sci Rep.* 2019 Mar 26;9(1):5233.
32. Becht E, McInnes L, Healy J, Dutertre CA, Kwok IWH, Ng LG, i sur. Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol.* 2018 Dec 3. doi: 10.1038/nbt.4314.
33. Rizzoti K, Chakravarty P, Sheridan D, Lovell-Badge R. Pituitary stem cells differ according to their position in the gland and maintenance of their progeny depends on physiological context. *bioRxiv* 2022.11.07.515440.
34. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst.* 2015 Dec 23;1(6):417-425.

10. LITERATURA

35. Aibar S, González-Blas CB, Moerman T, Huynh-Thu VA, Imrichova H, Hulselmans G, i sur. SCENIC: single-cell regulatory network inference and clustering. *Nat Methods*. 2017 Nov;14(11):1083-1086.
36. Van de Sande B, Flerin C, Davie K, De Waegeneer M, Hulselmans G, Aibar S, i sur. A scalable SCENIC workflow for single-cell gene regulatory network analysis. *Nat Protoc*. 2020 Jul;15(7):2247-2276.
37. Luo W, Brouwer C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics*. 2013 Jul 15;29(14):1830-1.
38. Stijnen P, Ramos-Molina B, O'Rahilly S, Creemers JW. PCSK1 Mutations and Human Endocrinopathies: From Obesity to Gastrointestinal Disorders. *Endocr Rev*. 2016 Aug;37(4):347-71.
39. Ji L, Wu HT, Qin XY, Lan R. Dissecting carboxypeptidase E: properties, functions and pathophysiological roles in disease. *Endocr Connect*. 2017 May;6(4):R18-R38.
40. Wasserfall C, Nick HS, Campbell-Thompson M, Beachy D, Haataja L, Kusmartseva I i sur. Persistence of Pancreatic Insulin mRNA Expression and Proinsulin Protein in Type 1 Diabetes Pancreata. *Cell Metab*. 2017 Sep 5;26(3):568-575.e3.
41. Talley EM, Bayliss DA. Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *J Biol Chem*. 2002 May 17;277(20):17733-42.
42. Hilger D, Masureel M, Kobilka BK. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol*. 2018 Jan;25(1):4-12.
43. Kolaj M, Zhang L, Renaud LP. L-type calcium channels and MAP kinase contribute to thyrotropin-releasing hormone-induced depolarization in thalamic paraventricular nucleus neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016 Jun 1;310(11):R1120-7.
44. Porcu E, Medici M, Pistis G, Volpato CB, Wilson SG, Cappola AR i sur. A meta-analysis of thyroid-related traits reveals novel loci and gender-specific differences in the regulation of thyroid function. *PLoS Genet*. 2013;9(2):e1003266.
45. Kwon J, Kim J, Kim KI. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress response and autophagy in human diseases. *Anim Cells Syst (Seoul)*. 2023 Feb 23;27(1):29-37.

10. LITERATURA

46. Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ.* 2006 Mar;13(3):363-73.
47. Khetchoumian K, Balsalobre A, Mayran A, Christian H, Chénard V, St-Pierre J i sur. Pituitary cell translation and secretory capacities are enhanced cell autonomously by the transcription factor Creb3l2. *Nat Commun.* 2019 Sep 3;10(1):3960.
48. Shrestha S, Erikson G, Lyon J, Spigelman AF, Bautista A, Manning Fox JE i sur. Aging compromises human islet beta cell function and identity by decreasing transcription factor activity and inducing ER stress. *Sci Adv.* 2022 Oct 7;8(40):eabo3932.
49. Yu Z, Zhu J, Wang H, Li H, Jin X. Function of BCLAF1 in human disease. *Oncol Lett.* 2022 Feb;23(2):58.
50. Vohhodina J, Barros EM, Savage AL, Liberante FG, Manti L, Bankhead P i sur. The RNA processing factors THRAP3 and BCLAF1 promote the DNA damage response through selective mRNA splicing and nuclear export. *Nucleic Acids Res.* 2017 Dec 15;45(22):12816-12833.
51. Chiappini F, Ramadoss P, Vella KR, Cunha LL, Ye FD, Stuart RC i sur. Family members CREB and CREM control thyrotropin-releasing hormone (TRH) expression in the hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol.* 2013 Jan 5;365(1):84-94.
52. Zhang Q, Yao B, Long X, Chen Z, He M, Wu Y i sur. Single-cell sequencing identifies differentiation-related markers for molecular classification and recurrence prediction of PitNET. *Cell Rep Med.* 2023 Feb 21;4(2):100934.
53. Hekimsoy Z, Kafesçiler S, Güçlü F, Ozmen B. The prevalence of hyperprolactinaemia in overt and subclinical hypothyroidism. *Endocr J.* 2010;57(12):10

11. ŽIVOTOPIS

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNÉ INFORMACIJE

Mateja Ivanko

01.10.1996.

Podsusedska aleja 10A, 10090 Zagreb

(+385) 95 8336 190

matejaivanko@gmail.com

OBRAZOVANJE

2021.-2023.

Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2016.-2020.

Zdravstveno veleučilište Zagreb, Prijediplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2011.-2015.

IV. gimnazija Zagreb

2003.-2011.

Osnovna škola bana Josipa Jelačića Zagreb

RADNO ISKUSTVO

2021.

DZZ-Zapad

volontiranje na uzimanju briseva na COVID-19

2019.

Katedra za anatomiju i fiziologiju, Zdravstveno veleučilište Zagreb

demonstratorica na vježbama iz kolegija

Anatomija

OSOBNÉ VJEŠTINE

engleski jezik na C1 razini (CAE diploma)

digitalne vještine (MS Office)