

NAIDA LOJO-KADRIĆ, NARIS POJSKIĆ, LEJLA POJSKIĆ

LABORATORIJSKE TEHNOLOGIJE U MOLEKULARNOJ BIOLOGIJI



ingeb



UNIVERZITET U SARAJEVU

INSTITUT ZA GENETIČKO INŽENJERSTVO I BIOTEHNOLOGIJU

Naida Lojo-Kadrić
Naris Pojskić
Lejla Pojskić

LABORATORIJSKE TEHNOLOGIJE U MOLEKULARNOJ
BIOLOGIJI

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko inženjerstvo i
biotehnologiju

Sarajevo, 2018.

Autori

Dr. sc. *Naida Lojo-Kadrić*, naučna saradnica Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu

Dr. sc. *Naris Pojskić*, naučni savjetnik Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu

Dr. sc. *Lejla Pojskić*, naučna savjetnica Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu

Izdavač

Univerzitet u Sarajevu - Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Zmaja od Bosne 8 (Kampus), 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Za izdavača

Dr. sc. *Naris Pojskić*, naučni savjetnik, direktor

Recenzenti

Dr. sc. *Kasim Bajrović*, naučni savjetnik Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu

Dr. sc. *Vesna Hadžiavdzić*, vanredna profesorica na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Tuzli

Lektorica i korektorica

Irma Grebović-Muratović, MA

Štampa

Printera d.o.o.

Tiraž

50 primjeraka

Izdanje

2018. godina

CIP - Katalogizacija u publikaciji

Nacionalna i univerzitetska biblioteka Bosne i Hercegovine, Sarajevo

577.2.082

LOJO-Kadrić, Naida

Laboratorijske tehnologije u molekularnoj biologiji / Naida Lojo-Kadrić, Naris Pojskić, Lejla Pojskić. - Sarajevo : Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, 2018. - 182 str. : ilustr. ; 25 cm

Bibliografija: str. 167-177. - Registri.

ISBN 978-9958-083-08-2

1. Pojskić, Naris 2. Pojskić, Lejla. - I. Kadrić, Naida Lojo - Lojo-Kadrić, Naida

COBISS.BH-ID [25474822](#)

<-----

SADRŽAJ

PRINCIPI MOLEKULARNO-GENETIČKE KARAKTERIZACIJE OSVRTOM NA HISTORIJAT.....	7
1.1. Kratki historijat molekularno-genetičke karakterizacije	11
1.2. Nomenklatura mutacija	14
INFRASTRUKTURA MOLEKULARNO-GENETIČKE LABORATORIJE...	19
2.1. Osnovne smjernice rada u laboratoriji.....	20
2.2. Pravilno rukovanje sa humanim materijalom	21
MOLEKULARNO-GENETIČKI MARKERI U DIJAGNOSTICIRANJU OBOLJENJA	23
UZORCI ZA MOLEKULARNO-GENETIČKU KARAKTERIZACIJU	33
4.1. Vrste uzoraka za molekularno-genetičku karakterizaciju	33
IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISELINA	39
5.1. Izolacija DNK	39
5.1.1. Prethodna obrada određenih tipova bioloških uzoraka.....	41
5.1.2. Tipovi izolacije DNK molekule	43
5.2. Izolacija RNK.....	45
KVANTITATIVNO-KVALITATIVNA ANALIZA IZOLOVANIH NUKLEINSKIH KISELINA	49
6.1. UV spektrofotometrija DNK.....	49
6.2. Gel elektroforeza nukleinskih kiselina.....	51
6.3. Fluorometrijska kvantifikacija nukleinskih kiselina	53
METODE PCR-A (POLIMERAZNA LANČANA REAKCIJA)	55
7.1. Polimerazna lančana reakcija (PCR)	55
7.1.1. PCR ciklusi	58
7.1.2. Komponente PCR reakcije	59
7.2. <i>Real-time</i> PCR	63
7.2.1. <i>TaqMan</i> sistem proba.....	63
7.2.2. <i>SYBR green</i>	65
7.3. Reverzna transkripcija – RT PCR.....	69
SPECIFIČNE PCR METODE	73
8.1. PCR-RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> PCR)....	73

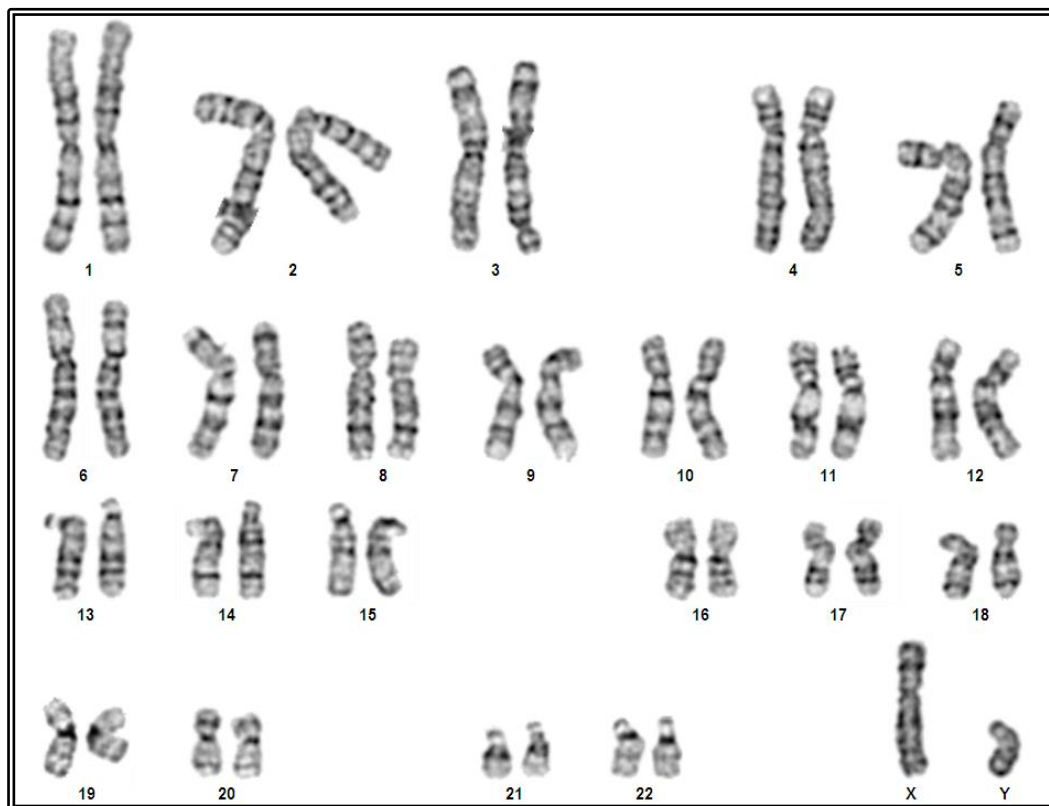
8.1.1. Nomenklatura restrikcionih endonukleaza	74
8.2. ASA PCR (<i>Allele Specific Amplification</i> PCR)	75
8.3. MLPA (<i>Multiplex Ligase-dependent Probe Amplification</i>).....	77
8.4. <i>Touch down</i> PCR	84
METODE SEKVENCIRANJA DNK.....	85
9.1. Sekvenciranje DNK molekule	85
9.1.1. <i>Maxam-Gilbert</i> sekvenciranje.....	85
9.1.2. <i>Sanger</i> metoda sekvenciranja.....	86
9.1.3. Automatsko sekvenciranje	88
9.2. Sekvenciranje nove generacije (NGS)	89
9.2.1. NGS Platforme	91
9.2.2. Priprema matrice	92
9.2.3. Sekvenciranje i snimanje	95
9.2.4. Analiza podataka	97
METODE ANALIZE NUKLEOTIDNIH SEKVENCI I BAZE PODATAKA ..	99
10.1. <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (OMIM®).....	99
10.2. <i>Ensembl Genome Database Project</i> (ENSEMBL).....	101
PRIMJENA PROTEINSKIH METODA.....	105
11.1. Izolacija proteina.....	107
11.2. Kvantifikacija proteina	108
11.3. <i>Western blot</i>	108
11.4. Enzim vezani imunosorbentni test (ELISA).....	110
DNK ČIPOVI.....	113
PRIMJERI MOLEKULARNO-GENETIČKE KARAKTERIZACIJE KOD	
OBOLJENJA	117
13.1. Hronična mijeloična leukemija	117
13.1.1. Fuzijski geni.....	118
13.1.2. Minimalna rezidualna bolest (MRB).....	120
13.2. <i>Duchenne/Becker</i> mišićna distrofija	123
13.3. Cistična fibroza	125
13.4. Hemofilija A	128
13.5. Hantingtonovo oboljenje (<i>Huntington chorea</i>).....	130

13.6. Neurofibromatoza tip 1	132
PRINCIPI GENSKE TERAPIJE	135
14.1. Metode genske terapije	139
14.2. Modeli i potencijali genske terapije kancera.....	144
14.2.1. Genska imunoterapija kancera	145
14.2.2. CAR-T ćelije	147
14.2.3. Genska imunoterapija infektivnih oboljenja	148
14.2.4. Genomsko editovanje kao oblik terapije	148
14.2.5. Matične ćelije u tretmanu oboljenja.....	150
14.3. Rizici genske terapije.....	151
PRIMJENA REKOMBINANTNE DNK TEHNOLOGIJE U PROZIVODNJI LIJEKOVA.....	153
GENETIČKO TESTIRANJE I SAVJETOVANJE	157
16.1. Genetičko testiranje	157
16.2. Genetičko savjetovanje.....	164
LITERATURA.....	167
INDEX.....	179

PRINCIPI MOLEKULARNO-GENETIČKE KARAKTERIZACIJE S OSVRTOM NA HISTORIJAT

Ako se pođe od definicije da je biologija nauka o životu, onda je molekularna biologija grana biologije koja izučava život na molekularnom nivou. U esencijalnim biološkim procesima koji se ostvaruju na nivou ćelije ili stanice učestvuju, životno važne „biomolekule“, poznate kao makromolekule, a to su nukleinske kiseline i proteini kroz procese replikacije, transkripcije i translacije, te sazrijevanja i transporta proteina. Ovi procesi su međusobno neraskidivo povezani i neophodni za život.

Genom (koju čini DNK ili RNK) je matrica ili „izvedbeni plan“ i sadrži kompletnu genetičku informaciju za realizaciju do fenotipa. Fenotip (protein) je rezultanta aktivnosti (ekspresija) gena u specifičnim uslovima okruženja. Proces genske ekspresije se ostvaruje kroz procese genske transkripcije i genske translacije (biosinteze proteina). Veoma važna činjenica je da je veličina i sastav genoma (broj gena) karakterističan i nepromjenljiv za svaku biološku vrstu. Ova se osobina genoma ostvaruje kroz strogo kontrolisani proces replikacije genoma koji prethodi svakoj ćelijskoj diobi. Mitoza je ćelijska dioba u kojoj se prije same diobe dešava proces duplikacije ćelijskog materijala (jedrovih i citoplazmatskih struktura). Na ovaj način nastaju sve somatske ćelije jedne jedinke koje imaju identičan diploidni hromosomski komplement. Kod čovjeka je taj broj 46 hromosoma (Slika 1) koje čine 22 para autosomnih homologih hromosoma i 2 polna hromosoma. Značajnija oštećenja (promjene) u nasljednom materijalu ćelije nastale u replikativnoj fazi, eliminišu se preko mitotske kontrole u procesu programirane ćelijske smrti ili apoptoze. Ćelije koje izbjegnu ćelijsku smrt nastavljaju nekontrolisano da se dijele formirajući tumorske nakupine sa potencijalom maligne transformacije.



Slika 1. Kariotip čovjeka (muški)

Kariotip žena sadrži homologi par X hromosoma, a muškaraca heterologi par hromosoma X i Y. Za mutacije polnih hromosoma vezane su brojne nasljedne bolesti kod čovjeka od kojih su najpoznatije navedene u Tabeli 1. Suptilne razlike u strukturi nukleinskih kiselina obezbjeđuju individualnu raznolikost koja se prepoznaje kao razlika u vidljivim ili mjerljivim osobinama (pripadnost određenoj krvnoj grupi, sposobnost sinteze enzima npr. alfa-galaktozidaze ili brzina metaboliziranja antipsihotika). Ipak kada se promjene u strukturi gena dese na mjestima u sekvenci DNK (genu) koji kodiraju sintezu proteina, onda one mogu dovesti do značajne promjene u fenotipu (osobini) koja se prepoznaje kao monogeniski poremećaj ili monogenska bolest (Tabela 1). Takve bolesti spadaju u tzv. rijetke bolesti, i zauzimaju važno mjesto u dijagnostici i liječenju. Najefikasniji i najbrži način za dijagnostiku genskih bolesti je genotipizacija tj. potvrda mutacije je ujedno i potvrda dijagnoze.

Tabela 1. Najpoznatije monogenске bolesti kod čovjeka

OBOLJENJE	GEN	VRSTA NASLJEĐIVANJA
Hantingtonova bolest	HTT	autosomalno dominantno
Cistična fibroza	CFTR	autosomalno recesivno
Hemofilija A	F8	X - vezano
<i>Duchenne/Becker</i> mišićna distrofija	DMD	X- vezano
Neurofibromatoza tip 1	NF1	autosomalno dominantno
Tuberozna skleroza	TSC1	autosomalno dominantno
Fragilno X	FRX	X - vezano
Ahondroplazija	FGFR3	autosomalno dominantno
Spinalna mišićna atrofija	SMN1	autosomalno recesivno

Ne mora svaka mutacija u nasljednom materijalu dovesti do patološkog procesa, ali svaki patološki proces mora imati svoj molekularni marker. Potvrđeno patološko stanje kod čovjeka rezultat je poremećaja na molekularnom nivou. Bilo kakvo odstupanje od „normalnog“ ili očekivanog molekularnog puta rezultira sa patološkim ishodom i ostavlja biljege, markere ili tragove na molekularnom nivou. U laboratorijskoj dijagnostici cilj je potvrditi prisustvo molekule povezane s određenim patološkim procesima odnosno čiji nalaz u laboratorijskom uzorku može indicirati definisano patološko stanje. Najčešći markeri u laboratorijskoj dijagnostici su proteinske prirode zbog jednostavnosti tehničke standardizacije postupka i interpretacije rezultata. Međutim, kad je riječ o heterogenim bolestima kao što su kanceri ili autoimune bolesti, vrlo često ti markeri ili nisu dovoljno senzitivni (ne otkrivaju sve pozitivne slučajeve) ili nisu dovoljno specifični (daju lažno pozitivne rezultate). Ovaj nedostatak se rješava pronalaženjem novih biomarkera ili primjenom skrining analitičkih metoda na nivou nukleinskih kiselina (analizi gena -DNK ili genskog transkripta - RNK).

Dramatičan progres u razumijevanju brojnih patoloških stanja na molekularno-biološkom nivou rezultira otkrivanjem novih markera za ranu i diferencijalnu dijagnostiku brojnih bolesti, ali i

potencijalnih novih meta u liječenju i dizajniranju novih lijekova. S tim uvezi moguće je razlikovati nekoliko nivoa genetičke analize:

- analiza pojedinačnih gena – detekcija mutacija,
- analiza genske doze pojedinačnih gena – kvantifikacija genske ekspresije
- skrining analize za identifikaciju dodatnih ili nepoznatih markera – nove mutacije ili diferencijalna ekspresija gena;

Analiza genskih mutacija nam pomaže u razumijevanju individualne predispozicije, tj. organskog okidača za pojavu i progresiju određenog patološkog stanja. Analiza gena i genske ekspresije nam pomaže razumjeti da li određena mutacija dovodi do smanjene ili povećane količine proizvedenog proteina i kako se to reflektira na ozbiljnost simptoma i progresivnost bolesti. Skrining metode transkriptoma ili genoma nam daju odgovor na pitanje da li još neki geni tj. njihovi produkti učestvuju u modifikaciji simptoma bolesti kroz tzv. genske interakcije i postaju bitni u molekularnom profiliranju i određivanju bolje i učinkovitije terapije.

Sa trenutnim trendom razvoja genetičkih tehnologija, jasno je da će molekularno-biološko profiliranje bolesti postati zlatni standard u laboratorijskoj dijagnostici i to ne samo za potvrdu/isključenje dijagnoze, nego i u procjeni rizika i određivanju personalizirane terapije sa maksimalnom očekivanom efikasnošću.

U Tabeli 2 na primjeru karcinoma pankreasa prikazano je kako pojedini genski markeri imaju različit, ali bitan značaj u ovisnosti od vrste patološkog ishoda, stadija progresije bolesti. Također su poznati i njihovi nedostaci (nedovoljna senzitivnost ili specifičnost).

Tabela 2. Genski marker povezani sa etiologijom karcinoma pankreasa

GENSKI MARKER	PREDNOST	NEDOSTATAK	PRIMJENA
KRAS	Prisutan u više od 90% slučajeva karcinoma pankreasa	Nalazi se i u nespecifičnim premalignim lezijama npr kod pušača	Rana dijagnostika karcinoma pankreasa
TP53	Visoko specifičan za neke tipove karcinoma pankreasa	Karakterističan za kasniji stadij u progresiji bolesti	Korelira sa imunohistohemijskim nalazima; potencijalno primjenjiv u analizi mikrobiopsija
DPC4	Vrlo senzitivan i specifičan	Povezuje se sa <55% slučajeva karcinoma pankreasa	Dodatni dijagnostički marker

Uvažavajući zakonitosti prenosa genetičke informacije, a prema vrsti molekule koja je u fokusu laboratorijske analize, laboratorijske markere dijelimo na:

1. DNK markeri –
 - pojedini dijelovi gena,
 - kompletni geni,
 - ciljani dijelovi genoma ili
 - kompletan genom.
2. RNK markeri –
 - kodirajuća RNK (iRNK ili mRNA),
 - nekodirajuća RNK (siRNA, lncRNA),
3. Proteinski markeri (peptidi ili složeni proteini).

1.1. KRATKI HISTORIJAT MOLEKULARNO – GENETIČKE KARAKTERIZACIJE

Naučna historija genetike se može vezati za sredinu 19-og vijeka i eksperimente *Gregora Mendela* (1822 – 1884), koji prvi pristupa eksperimentalnim metodama istraživanja nasljednosti, nasuprot

teorijskom pristupu genetici, koji je bio glavna vodilja naučnika prije Mendela. Mendelovi eksperimenti s graškom su postavili prve temelje zakonima nasljeđivanja, koji su i danas poznati kao Mendelovi zakoni i pripadaju grani genetike koja se naziva Mendelijanska genetika. *Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-Hartz* (1836 – 1921) je 1888 godine uveo u nauku termin „hromosomi“, nakon istraživanja obojenih dijelova jedra (hromatin), koje je identificirao *Walther Flemming* (1843 – 1905), poznat kao otac citogenetike, proučavajući proces ćelijske diobe. Povezanost gena s nasljednim osobinama, odnosno ispoljavanje određenog fenotipa prvi je primjetio *Thomas Hunt Morgan* (1866 – 1945), za šta je i dobio Nobelovu nagradu iz oblasti fiziologije i medicine 1933. godine.

S ranim razvojem DNK tehnologije počinje i ekspanzija novih metoda molekularne analize u medicinskoj dijagnostici određenih oboljenja, naročito s otkrivanjem strukture dvostrukog DNK heliksa 1953. godine od strane *Watsona* i *Cricka*.

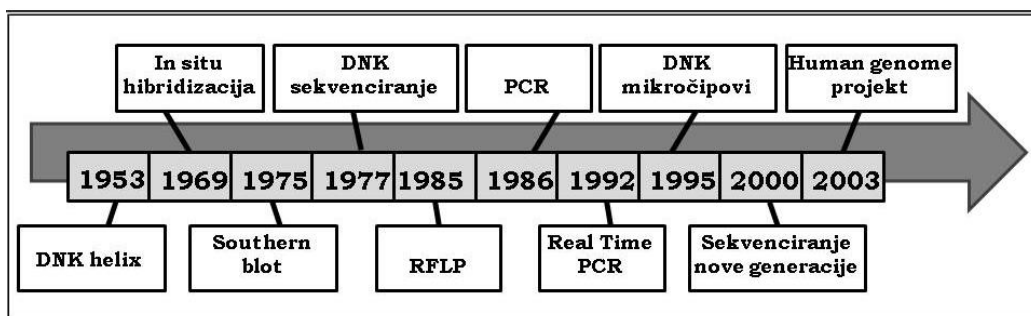
Od otkrića strukture molekule dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) pa do otkrića tehnologije lančane polimerazne reakcije (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) od strane *Mullisa* i saradnika 1986 godine, molekularna analiza se bazirala na različitim tehnikama hibridizacije kao što je *in situ* hibridizacija, *Southern Blot* i prvom DNK sekvenciranju s radioizotopima, te DNK sekvenciranju metodom terminacije lanaca, koja je preteča današnje tehnike automatskog sekvenciranja. Prije pronalaska PCR-a u molekularnoj analizi je svoje početke doživjela i tehnologija RFLP-a (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Sam pronalazak PCR tehnologije je pokrenuo revoluciju u molekularnoj genetičkoj karakterizaciji. Od tada se počinje s ubrzanom identifikacijom mutacija povezanim s određenim bolestima i s uspostavljanjem genetičkih servisa i laboratorija zaduženih za genetičko testiranje individua, pogotovo kada je riječ o monogenским svojstvima, odnosno poremećajima. Na ovoj tehnologiji se do sada bazira veliki broj metoda određivanja

polimorfizama u molekularnoj analizi. Većina ovih metoda se može ugrubo podijeliti na tri vrste pristupa:

- *Metode bazirane na enzimskim reakcijama:* u ove metode se može svrstati PCR-RFLP metoda, ligacija oligonukleotida te novija metoda MAPH (*Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation*) koje je zapravo preteča MLPA (*Multiplex Ligase-dependent Probe Amplification* metode
- *Metode bazirane na elektroforezi,* odnosno razdvajanju fragmenata: ove metode se baziraju na različitoj elektroforetskoj mobilnosti polimorfizama, pod različitim uslovima. Ovdje možemo izdvojiti najčešću SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) metodu kao i DGGE i TGGE (*Denaturing Gel Electrophoresis i Temperature Gel Electrophoresis*)
- Ostale metode u koje spadaju poznate dot-blot metode, PCR ASO (*Allele Specific Oligonucleotide*) i hibridni oligonukleotidni eseji

Osim metoda koje su svrstane u tri gornje glavne kategorije, također je dobro poznata i metoda koja se tiče selektivnog prajmera za PCR reakciju kao što je ASA PCR (*Allele Specific Amplification*), u kojoj prajmer selektivno hibridizira na mutacionom mjestu, te je prisutan svojevrsni plus/minus *output*, odnosno mutacijsko specifični prajmer će rezultirati PCR produktom samo onda kada je mutacija prisutna.



Slika 2. Vremenska linija historijata razvoja laboratorijskih tehnika u molekularnoj biologiji

Dalju revoluciju u molekularno-genetičkoj karakterizaciji, je inicirao pronalazak *real-time* PCR-a odnosno kvantitativne PCR tehnologije, koja se koristi najviše za profiliranje i ekspresiju određenih tumor markera kada se govori o medicinskoj dijagnostici. Osim upotrebe kod karakteriziranja neoplazmi, *real-time* PCR se također može koristiti i za tehnike plus-minus eseja, tj. kvalitativnih analiza.

Pored navedenih metoda, u molekularnoj analizi različitih oboljenja „zlatni standard“ je DNK sekvenciranje, zbog mogućnosti otkrivanja svih alteracija u strukturi DNK koje su potencijalno povezane sa određenom bolešću, u tom slučaju ostvarena je visoka senzitivnost i specifičnost, veća nego kod bilo koje druge metode.

Također se mogu spomenuti i posebne proteomske metode koje se baziraju na inicijalnoj PCR reakciji, a to je npr. PTT (*Protein Truncation Test*) koji se koristi kod dijagnostike neoplazmi odnosno kod oboljenja za koje postoji sumnja da ih uzrokuje alelna varijanta koja kao posljedicu ima promijenjen kodonski triplet u jedan od tri stop kodona (UAA, UAG, UGA), te se kao rezultat ove promjene dešava skraćivanje inicijalnog proteina odgovornog za nastanak ili proliferaciju osnovne bolesti.

1.2. NOMENKLATURA MUTACIJA

Prevođenjem rezultata istraživanja u kliničku praksu, odnosno u molekularno-genetičku determinaciju, potrebno je da se informacijama o mutacijama i varijacijama u ljudskom genomu razmjenjuju lako i nedvosmisleno. Imenovanje mutacija je postalo jedna od osnovnih značajki današnje molekularno-genetičke determinacije. Molekularno-genetička karakterizacija mutacija je zaista dinamično polje, međutim, za razumijevanje među naučnicima, ljekarima i inženjerima laboratorijske dijagnostike potrebno je da se mutacije imenuju prema koncensionoj nomenklaturi. Trenutna nomenklatura mutacija je dostupna na web adresi <http://varnomen.hgvs.org/> gdje također postoji i

njeno objašnjenje i tumačenje. Udruženje za varijaciju humanog genoma (*Human genome variation society* – HGVS) daje upute i preporuke kako imenovati mutacije tako da je jasno ljekarima i naučnicima koji rade i istražuju mutacije u svim dijelovima svijeta.

Imenovanje odnosno nomenklatura mutacija može biti na više nivoa, npr. na proteinskom nivou, cDNK, odnosno „*coding DNA*“ nivou, genomskom ili RNK nivou. Svaki od nivoa nomenklature ima svoja pravila koja će biti objašnjena u sljedećem dijelu ovog poglavlja.

Coding DNA sequence je sekvenca cDNK koja sadrži sve egzone plus 5' UTR i 3' UTR region. Numerisanje nukleotida počinje u odnosu na inicijalni ATG kod, gdje se broj 1 odnosi na nukleotid A u inicijalnom ATG kodu. Ova sekvenca ima prefiks **c.** ispred broja nukleotida gdje se nalazi mutacija. Nakon broja nukleotida, na kraju nomenklature mutacije se nalazi vrsta mutacije koja može naravno biti insercija, delecija ili pak supstitucija. Standardna nomenklatura je zasnovana na referentnim sekvencama genomske, cDNK ili pak RNK i zbog toga uz imenovanu mutaciju potrebno je i napisati referentnu DNK sekvencu, naročito kod cDNK nomenklature obzirom da vrlo često postoji više splajsing varijanti a potrebno je znati o kojoj se splajsing varijanti radi.

U slučaju numerisanja mutacije na proteinskom nivou, na početku nomenklature navodi se **p.** što indicira da je mutacija numerisana na proteinskom nivou. Također, numerisanje mjesta aminokiseline koja je promijenjena počinje od prve aminokiseline u proteinskom lancu. Ispred mjesta mutacije se piše referentna aminokiselina a nakon mjesta mutacije aminokiselina koja u slučaju mutacije mijenja referentnu aminokiselinu. Opis mutacije na nivou aminokiseline, bez korespondirajućeg naziva mutacije na cDNK nivou može biti nejasan, jer promjena aminokiseline može biti uzrokovana s više od jedne promjene, obzirom da većina aminokiseline ima više komplementarnih kodona (Tabela 3 i 4). Također, većinu nepoznatih varijanti, koje su numerisane sa

jednim slovom aminokiseline (npr. alanin – A, cistein - C, glicin – G, treonin - T), moguće je zamijeniti sa cDNK kodom u žurbi ili nepažnji. Međutim, kod kliničkih mutacija bitno je napomenuti i mutaciju na proteinskom nivou, naročito ako takva mutacija uzorkuje skraćenje proteina (stop kodon) ili pak jako promijenjenu strukturu. Aminokiseline mogu biti pisane prema nomenklaturi aminokiselina, koja se može naći na *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) – www.iupac.org.

Tabela 3. IUPAC kodovi nukleotidnih baza

IUPAC NUKLEOTID KOD	BAZA
A	Adenin
C	Citozin
G	Guanin
T (or U)	Timin (ili uracil)
R	A ili G
Y	C ili T
S	G ili C
W	A ili T
K	G ili T
M	A ili C
B	C ili G ili T
D	A ili G ili T
H	A ili C ili T
V	A ili C ili G
N	bilo koja baza

Tabela 4. IUPAC kodovi aminokiselina i mogući kodoni

IUPAC KOD	SKRAĆENI KOD	AMINOKISELINA	MOGUĆI KODON
A	Ala	Alanin	GCA, GCC, GCG, GCT
C	Cys	Cistein	TGC, TGT
D	Asp	Asparaginska kiselina	GAC, GAT
E	Glu	Glutaminska kiselina	GAA, GAG
F	Phe	Fenilalanin	TTC, TTT
G	Gly	Glicin	GGA, GGC, GGG, GGT
H	His	Histidin	CAC, CAT
I	Ile	Izoleucin	ATA, ATC, ATT
K	Lys	Lizin	AAA, AAG
L	Leu	Leucin	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
M	Met	Metionin	ATG
N	Asn	Asparagin	AAC, AAT
P	Pro	Prolin	CCA, CCC, CCG, CCT
Q	Gln	Glutamin	CAA, CAG
R	Arg	Arginin	AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGT
S	Ser	Serin	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
T	Thr	Treonin	ACA, ACC, ACG, ACT
V	Val	Valin	GTA, GTC, GTG, GTT
W	Trp	Triptofan	TGG
Y	Tyr	Tirozin	TAC, TAT
X	Xaa	nepoznata AK	NNN
*	* (Ter)	Terminacija	TAA, TAG, TGA

U slučaju numerisanja mutacije na genomskom nivou, na početku nomenklature stoji **g.** gdje se jasno vidi da je numerisanje učinjeno prema genomskoj klasifikaciji. Numerisanje u tom slučaju počinje od prvog nukleotida u databazi, i potrebno je napomenuti i koja baza je uzeta u obzir. Numerisanje na genomskom nivou se koristi rijetko, u slučajevima gdje nije moguće jasno razdvojiti splajsing varijante odgovarajuće kodirajuće DNK, ili postoji više mogućih mutacija koje utiču na odgovarajuću proteinsku strukturu.

Intronske varijante također trebaju biti uzete u obzir kada govorimo o nomenklaturi mutacija. Obzirom da kodirajuća DNK ne sadrži intronske sekvence, potrebno je ili koristiti genomsku sekvencu, odnosno nomenklaturu na genomskom nivou ili pak posebno numerisanje na nivou kodirajuće DNK. Intronska mutacija se najčešće obilježava znakom + ili – uz numerisanje početka ili kraja susjednog egzona, odnosno kao razdaljina mutiranog intronskog nukleotida do najbližeg egzonskog nukleotida. Također je na početku intronske sekvence potrebno dodati prefiks referentne varijante gena koji se koristi za numerisanje intronske varijante.

PRIMJER NOMENKLATURE MUTACIJE

BRCA1 c.190T>G; pCys64Gly (p.C64G)

Gen na kojem je mutacija je BRCA1 gen

Mutacija se nalazi na 190 mjestu od početka ATG kodona prvog egzona, i mutacija je supstitucija timina (T) u guanin (G).

Mutacija uzrokuje promjenu aminokiseline cistein (Cys/C) u glicin (Gly/G) na 64 mjestu proteinskog lanca BRCA1 proteina.

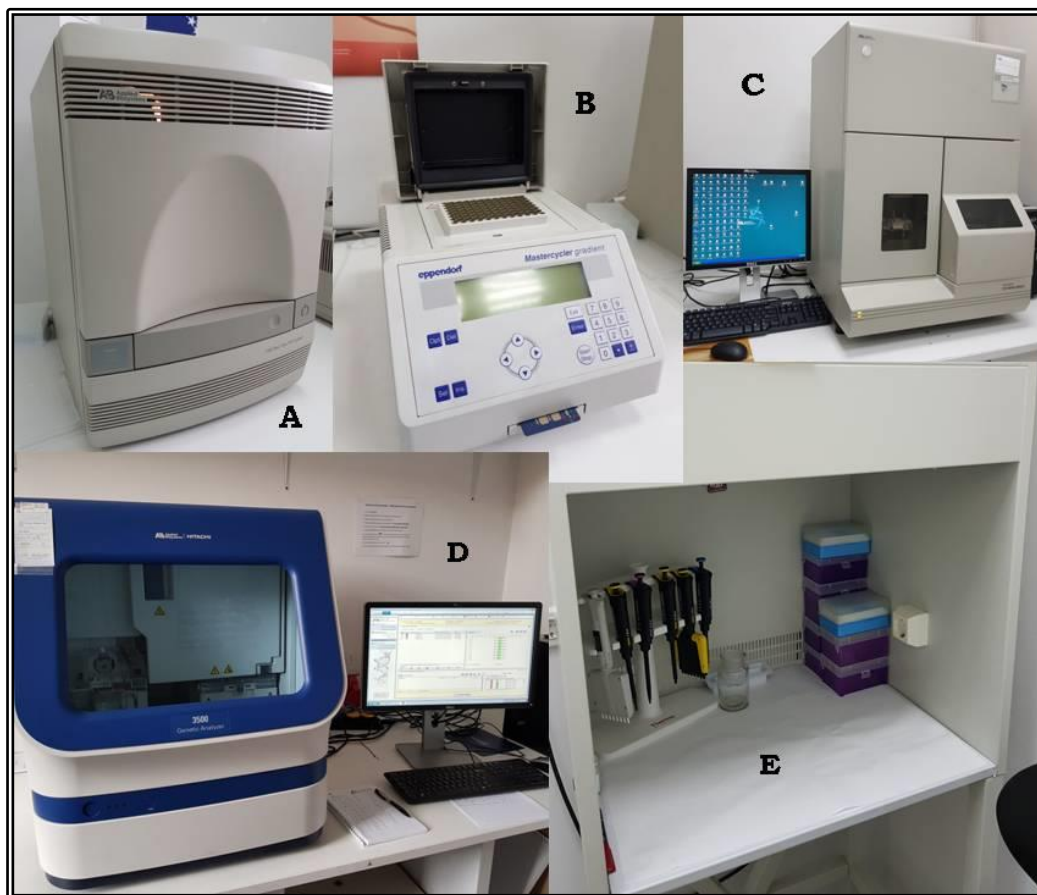
INFRASTRUKTURA MOLEKULARNO-GENETIČKE LABORATORIJE

Molekularno-genetička laboratorija, kao i svaka laboratorija sastoji se od nekoliko različitih uvezanih prostorija s odgovarajućim tokom, najčešće od dijela laboratorije za prijem i uzimanje uzoraka, do post-amplifikacije i analize. Priprema PCR reakcija je najčešće odvojena od sobe za izolaciju nukleinskih kiselina, gdje također dio laboratorije treba biti odvojen za rad sa RNK molekulom, koja je nestabilna i potrebne su posebne smjernice za rad sa njom.

Najčešća oprema (Slika 3) koja se može naći u molekularno – genetičkoj laboratoriji je:

- centrifuga
- poluautomatske i elektronske precizne pipete
- orbitalni šejker
- vortex aparat
- termoblok
- PCR aparati
- genetički analizatori – sekvenceri
- *real-time* PCR aparati
- UV spektrofotometar
- fluorometar
- sistem za elektroforezu
- sistem za slikanje i analizu nakon elektroforeze

Sva oprema koja se koristi u molekularno-genetičkoj laboratoriji se mora redovno servisirati i kalibrirati te treba voditi računa o kros – kontaminaciji. Nakon svake upotrebe opremu je potrebno očistiti. Sav otpad se mora smatrati biohazardnim otpadom, odbaciti na predviđeno mjesto za biohazardni otpad, kao i voditi računa o smjernicama za odlaganje opasnog otpada.



Slika 3. Specifična oprema koja se može naći u molekularno-genetičkoj laboratoriji: A – *real-time* PCR aparat, B – PCR aparat, C – genetički analizator ABI 310, D – genetički analizator ABI 3500, E – PCR kabinet sa poluautomatskim jednokanalnim i multikanalnim pipetama.

2.1. OSNOVNE SMJERNICE RADA U LABORATORIJI

Osnovne smjernice pravila rada u laboratoriji podrazumijeva sljedeće:

- u laboratoriji se ne jede, ne pije i ne puši,
- nema posjetitelja,
- hemikalije ne smiju doći u dodir s kožom niti odjećom,
- ne zavirivati u reakcione posude,
- provjeriti naziv hemikalije na boci,

- rad u digestoru ako se radi o lako isparljivim hemikalijama,
- pri radu sa staklenim priborom biti pažljiv.
- mantil je obavezan, ako je kraći mantil, obavezne su hlače,
- rukavice, bez pudera
- stopala zaštititi sa svih strana – bez sandala i papuča,
- duga kosa se treba skupiti prije vježbe,
- ukoliko je potrebno, nositi masku za lice
- hemikalije se čuvaju u staklenim ili plastičnim posudama,
- boce su uvijek zatvorene čepom,
- čvrste hemikalije se vade metalnom ili plastičnom spatulom,
- višak tečnih hemikalija se ne vraća natrag u bocu,
- zahtjeva se red i tišina,
- prije početka rada pročitati upute za eksperiment,
- ne počinjati rad dok nije pripremljen sav pribor i reagensi,
- voditi računa o koncentracijama hemikalija,
- štetni otpad se odlaže u za to namijenjena mjesta,
- po završenom radu radno mjesto dovesti u red.

2.2. PRAVILNO RUKOVANJE S HUMANIM MATERIJALOM

Skupljanje, procesiranje i skladištenje bioloških uzoraka uvijek predstavljaju rizik za osobu koja rukuje uzorcima, zbog infektivnih agenasa koje mogu biti prisutni u biološkom uzorku. Također, nepravilno rukovanje biološkim uzorcima nosi mogućnost kros-kontaminacije uzoraka, te se pri rukovanju uzorcima potrebno voditi strogo određenim smjernicama koje su prisutne u svakoj laboratoriji koja se bavi molekularno-genetičkom karakterizacijom, a neke od tih smjernica su:

- Uvijek nositi laboratorijski mantil u laboratoriji, i skidati ga kada je osoba izvan laboratorije. Mantili moraju biti dostupni na samom ulazu u laboratorije.
- Obavezne su rukavice (jednokratne, nitril ili vinil, bez pudera). Rukavice se nose samo u laboratoriji, i moraju se skidati pri rukovanju mobitelima, telefonima, kompjuterskom tastaturom ili mišem i slično.

- Uvijek oprati ruke prije i poslije stavljanja rukavica.
- Opcionalno se mogu nositi i hirurške maske te plastični rukavi za dodatnu sigurnost.
- Sve površine na mjestu uzimanja uzoraka se moraju dezinficirati otopinom 5% varikine, te 20% etanola prije rada, nakon rada, i u slučaju prolijevanja biološkog uzorka.
- Sav otpad (kao što su tube ili vacutaineri, iskorištene igle i slično) se mora propisno odložiti u kese obilježene kao biohazardni materijal i autoklavirati.
- Uzorci se ne smiju ostaviti bez nadzora.
- Odmah nakon skupljanja uzorka, uzorak označiti, dodijeliti mu laboratorijski broj i upisati u laboratorijsku knjigu protokola.
- Uzorak odložiti na predviđeno mjesto.

BITNA NAPOMENA

**SAV BIOLOŠKI MATERIJAL SE UVIJEK SMATRA
POTENCIJALNO BIOHAZARDNIM MATERIJALOM**

MOLEKULARNO-GENETIČKI MARKERI U DIJAGNOSTICIRANJU OBOLJENJA

Markeri su nasljedne varijante specifičnih pokazatelja koji omogućavaju genotipsku i fenotipsku identifikaciju organizma ili grupe organizama (Tabela 5).

Tabela 5. Klasifikacija molekularnih markera (preuzeto iz Bajrović i sar., 2014)

TIP	KRITERIJ PODJELE	NAZIV MARKERA
I	Vrsta biološkog materijala	<ul style="list-style-type: none"> - DNK - ako se vrši direktno ispitivanje genetičkog materijala - Protein - ako se genetička istraživanja sprovode indirektno preko proteina
II	Porijeklo molekule	<ul style="list-style-type: none"> - Čelijski produkti (DNK, protein, enzim) - Produkti PCR amplifikacije (PCR tehnologija za umnožavanje određenog DNK regiona) - DNK sekvence (analiza slijeda nukleotida, odnosno baza u DNK)
III	Vrsta genetičke varijacije	<ul style="list-style-type: none"> - Dužina fragmenata (npr. RFLP) - Specifični izgled elektroforetskog profila (npr. RAPD) - Promjene u pojedinačnim nukleotidima (npr. sekvenciranje)
IV	Preanalitičko poznavanje sekvence	<ul style="list-style-type: none"> - Potrebno određeno predznanje o sekvencama ili lokusima ispitivanog organizma (npr. minisateliti, mikrosateliti) - Nije potrebno predznanje o sekvencama ili lokusima (npr. RAPD)
V	Simultano ispitivanje većeg broja lokusa	<ul style="list-style-type: none"> - Pojedinačnih lokusa (npr. "single-locus" mikrosateliti) - Većeg broja lokusa istovremeno, tzv. multiplih lokusa i to: <ul style="list-style-type: none"> a. DNK fingerprinting (npr. istraživanje minisatelita ili "multiplex" mikrosatelita) b. generalno pretraživanje genoma (npr. RFLP tehnologija i restrikcione mape) c. korištenje anonimnih markera (npr. RAPD)
VI	Na osnovu fenotipa markera	<ul style="list-style-type: none"> - dominantni (npr. RAPD) - kodominantni (npr. minisateliti, aloenzimi)

Pojmovi genetički markeri i molekularni markeri se vrlo često upotrebljavaju kao sinonimi. Generički markeri se mogu definisati i kao segmenti DNK s identifikovanom fizičkom lokacijom na hromosomu i čije se nasljeđivanje može pratiti. Marker može biti gen ili neki dio DNK sa nepoznatom funkcijom. Da bi se mogli uopšte koristiti neki genetički markeri, neophodna je pretpostavka da su polimorfni, jer samo tako mogu odraziti različitost. U smislu broja promatranih individua, pretpostavljamo da su geni polimorfni ukoliko se najrjeđi aleli ne javljaju suviše rijetko (ne manje od 5%). Markeri se obično klasificiraju prema tehnikama i tkivima na kojima se primjenjuju. Genetički markeri su uglavnom "otporni" na uticaje okoline za razliku od većine kvantitativnih fenotipskih mjera. Ponašaju se u skladu s jednostavnim očekivanjima teorije evolucije. Kada su u pitanju genetička testiranja u medicinske svrhe, genetički marker definira dijagnostički karakter individue što je posebno značajno u procjenama nasljedne predispozicije za neku bolest ili je pokazatelj potvrde oboljevanja.

Prema svojim karakteristikama i specifičnostima, markere možemo svrstati u tri tipa:

- morfološke (morfometrijski, meristički, i sl.)
- biohemijske (proteinski - npr. krvne grupe, alozimi i sl.)
- genetičke (svi pokazatelji na nivou nasljednog materijala kariotip, mtDNK, autosomalni i gonosomalni fragmenti DNK i na kraju kompletan genom).

Na osnovu nivoa promatranja varijacije, markere možemo podijeliti na indirektno i direktno. Kada promatramo fenotipsku varijaciju (npr. morfološku osobinu, protein), mi na osnovu poznavanja modela nasljeđivanja tih osobina možemo zaključiti o njihovoj genetičkoj varijaciji. U principu to znači da posmatranjem fenotipske varijacije indirektno zaključujemo o genetičkoj varijaciji. Savremena primjena procjene varijacije genetičkih markera podrazumijeva da direktno promatramo nasljedni materijal i zaključujemo o varijantnosti. Karakteristike

dobrog markera su: polimorfnost (više alelnih varijanti), reproducibilnost (stabilnost rezultata u eksperimentalnim uslovima), kodominatnost (direktna detekcija heterozigota), diskriminativnost (detektibilnost među srođnicima), neovisnost od uticaja sredine, neutralnost (nije pod dejstvom selekcije) i jednostavnost za detekciju i ekonomičnost za upotrebu. Naravno, kada je u pitanju molekularno-genetička dijagnostika promatraju se kodirajući segmenti koji su pod selekcionim pritiskom. Testiraju se geni čije mutacije mogu dovesti do potpunog odsustva, smanjene ili prevelike produkcije proteina što za posljedicu dovodi do patoloških stanja.

Proteinski marker sistemi su se počeli koristiti mnogo prije DNK markera, jer su tehnološka rješenja detekcije bila prije razvijena nego što je slučaj s DNK. Proteinski markeri se još uvijek mnogo koriste u dijagnostičke svrhe, jer pokazuju trenutno stanje organizma, te se mogu detektovati patološke promjene. Korištenje proteinskih markera ima značajnih prednosti i pogodnosti u odnosu na druge marker sisteme, jer:

- zahtjeva jeftiniju tehnologiju,
- proces izolacije proteina iz ispitivanih tkiva je jednostavnije,
- može se analizirati veliki broj uzoraka u relativno kratkom vremenskom periodu,
- jasno se može statističkim putem analizirati rezultati i interpretirati.

Primjena proteinskih markera ima i ozbiljnih nedostataka, kao što su:

- ograničenost otkrivanja polimorfizma samo u kodirajućim regionima DNK,
- uglavnom se ne radi o adaptivno neutralnim markerima, jer se nalaze pod pritiskom selekcije – to se posebno odnosi na proteine od izuzetnog metaboličkog ili ontogenog značaja za organizam,
- alelizam je ponekad teško determinisati,

- osjetljivost proteina i uzoraka na temperaturne promjene,
- kompliciranost transporta i osjetljivost,
- nemogućnost otkrivanja „skrivenih varijacija“, tj. proteinski markeri ponekad nisu u mogućnosti da detektuju sve promjene u DNK, jer svaka nukleotidna promjena se ne ogleda u promjenama aminokiselina, niti u promjenama elektroforetske mobilnosti proteina,
- pokriva samo mali dio genoma koji uglavnom ne sadrže velike varijacije.

Proteinske markere možemo podijeliti na (Bajrović i sar., 2014):

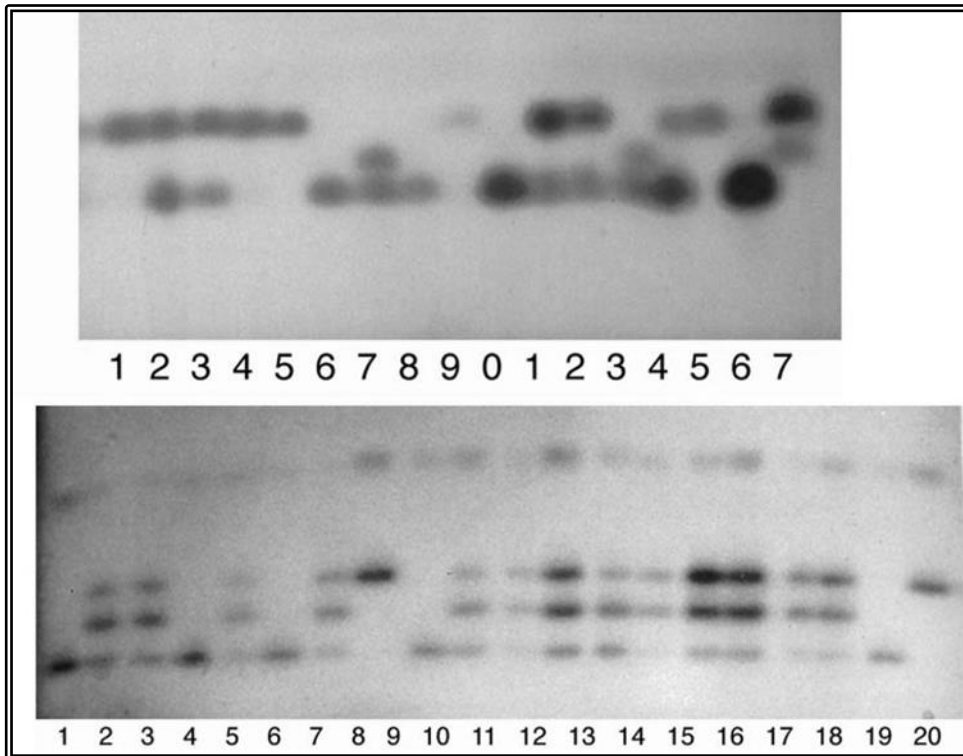
a) Elektroforetskom metodom separirane peptide-tehniku ispitivanja pojedinačnih lokusa (*single locus technique*). Tehnika se sastoji u tome da se uzorci krvi ili tkiva individua puštaju kroz gel gdje se različite forme proteina razdvajaju ovisno od njihovog električnog naboja, a vizuelizacija se vrši korištenjem specifičnih boja koje su karakteristične za određenu vrstu proteina. Ovaj marker sistem se može koristiti i za utvrđivanje heterozigota koji imaju alele s odnosom kodominantnosti. Jedan od nedostataka ovih, i drugih proteinskih markera, je osjetljivost proteina na promjene temperature, ili druge vanjske faktore, što može značajno utjecati na elektroforetsku mobilnost proteina. Također, rezolucija proteinske elektroforeze nije uvijek adekvatna za detekciju razlika između populacija, ili individua.

b) Analizu izoenzima (Slika 4) što predstavlja analizu i istraživanje različitih formi enzima koji su funkcionalno slični, a determinisani su sa jednim ili više gena koji su smješteni na jednom ili više lokusa.

c) Analizu aloenzima što predstavlja analizu izoenzima koji su produkt različitih alela, ali koji su smješteni isključivo samo na jednom lokusu.

U principu, za interpretaciju dobijenog obrasca proteinskih bendova na gelu (raspored bendova na gelu) i njihovog

upoređivanja, potrebno je prethodno predznanje o strukturi subjedinica i genetičkoj kontroli određenog enzimatskog sistema. Nadalje, problem je da neka tkiva mogu limitirati ekspresiju određenog broja genskih produkata ili subjedinica. Izvjestan broj enzima je izražen kao monomerni protein sastavljen od jednog polipeptidnog lanca, ali većina njih je sa multimernom strukturom što podrazumijeva da su sastavljeni od dva ili više polipeptidnih lanaca.



Slika 4. Izgled gela prilikom analize izozima

Genetički markeri su nasljedne varijante genotipa čija specifičnost može omogućiti *genotipsku*, odnosno, *fenotipsku* identifikaciju organizma ili grupe organizama. Genotip je genetička konstitucija organizma, odnosno, ukupna genetička informacija koja se ogleda u specifičnom slijedu nukleotida u DNK. Genotip se izražava u fenotipu, ali kompletan genotip ne mora biti u potpunosti ispoljen na nivou fenotipa (npr. kod heterozigota sa odnosom dominantnosti jednog od alela, recesivni

alel nije fenotipski izražen, tj. individue nose i mogu prenijeti recesivne alele na potomstvo, a da fenotipski nisu bili izraženi kod tih individua). Nasljeđivanje krvnih grupa ABO sistema, ili boje očiju su primjeri da isti fenotip može imati različit genotip (npr. $I^A I^A$ i $I^A i$ genotipovi se ogledaju u istom fenotipu – A krvna grupa). Konsekventno tome, svaka genotipska promjena – promjena u ukupnom nasljednom materijalu organizma, tj. promjene u ukupnoj DNK ne moraju da se reflektuju i na promjene u fenotipu (morfološkim i biohemijskim promjenama organizma, ili grupe organizama). Ovo se posebno odnosi na nekodirajući region DNK koji ne nosi informaciju za određeni protein. Međutim, promjene u DNK se akumuliraju i u određenom momentu mogu biti izražene u fenotipu, ali ne moraju biti izražene u fenotipu, već uzrokuju specifičnosti genotipa organizma, ili grupe organizama. Na taj način moguće je razlikovati molekularne markere. Striktno govoreći, molekularni markeri bi se mogli smatrati nešto širim pojmom od genetičkih markera, jer obuhvataju i proučavanje proteina (uključujući izoenzime i aloenzime) gdje se na osnovu teoretskih i statističkih procjena i modela može izvršiti procjena o alelnim kombinacijama koji se nalaze na tim lokusima. Međutim, danas se za gore navedene termine sve više koristi samo pojam molekularni markeri bez tendencije za striktno definisanje terminologije, što je i razumljivo s obzirom na preklapanje područja istraživanja koja je teško jasno definisati i izdvojiti kao zasebne discipline.

Markeri nam pokazuju grupnu varijaciju, a posebno određenu varijantnost individue. Varijacije nastaju u procesima rekombinacije i mutacije.

Rekombinacije mogu biti:

a) „Slučajne“ rekombinacije i krosingover koje se dešavaju u toku gametogeneze tj. u mejotičkoj diobi, kada dolazi do rearanžiranja dijelova DNK sekvenci između dvije DNK molekule. Dakle, krosingover uvjetuje rekombinaciju gena na nivou genotipa, a što se na nivou fenotipa ispoljava rekombinacijom

osobina, odnosno, uzrokuje rearanžiranje DNK sekvenci, a što se fenotipski može, ali i ne mora ispoljiti;

b) Aditivne rekombinacije (*additive recombination*) koje uključuju ubacivanje nove DNK sekvence u postojeći genom bez ikakvog recipročnog gubitka DNK. Takve dodatne rekombinacije mogu nastati sparivanjem kratkih sekvenci DNK, a koja je ista onoj odakle je inicirana. Kod eukariota je to slučaj kada viralni genom postane integrisan u genom domaćina. Poseban vid vještačkog manipulisanja je već poznat i koristi se u genetičkom inženjerstvu, ali tačan mehanizam dodatnih rekombinacija u prirodnim uslovima još uvijek nije u potpunosti razjašnjen.

Mutacije su promjene u nasljednom materijalu individue, ili grupe organizama. Zavisno od količine genetičkog materijala koji je obuhvaćen promjenama, mutacije možemo podijeliti na:

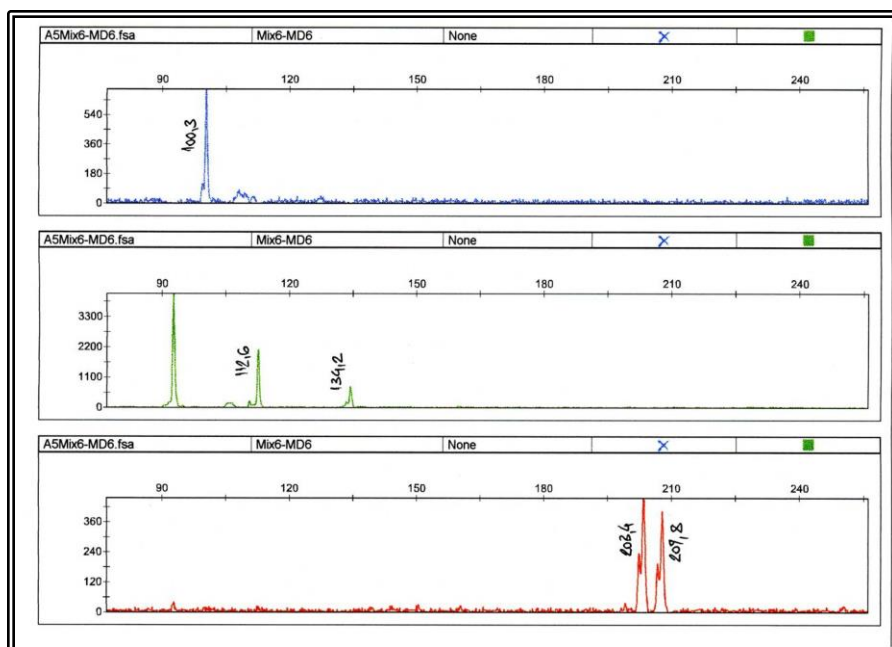
1) Genomske mutacije - ukoliko se pojavljuje manjak ili višak čitavih haploidnih hromosomskih garnitura.

2) Hromosomske mutacije - promjene u broju hromosoma ili strukturi hromosoma. Često se promjene u broju većeg broja hromosoma, tj. dijelova genoma nazivaju hromosomsko-genomskim mutacijama.

3) Molekularne, tj. nukleotidne mutacije koje obuhvataju male promjene na nivou DNK. Dugo vremena su se ove mutacije nazivale genskim mutacijama podrazumijevajući „sitne“ promjene na nivou DNK, ali takav naziv nije potpuno opravdan, s obzirom na to da se promjene ne dešavaju samo u području gena (egzona), tj. dijelu DNK koji nosi određenu genetičku informaciju, već se promjene mogu dešavati u bilo kojem dijelu DNK molekule bez obzira da li nosi ili ne nosi genetičku informaciju (intronu, ili egzonu).

Mutacije se ne moraju nužno ispoljiti na nivou fenotipa, i to kada se nalaze u nekodirajućem segmentu genoma (repetativnom dijelu DNK sekvence), ili kada se dese tihe mutacije koje jesu promjene u kodu, ali nisu dovele do promjene genetičke šifre za aminokiselinu koja ostaje ista. Ta činjenica je pogodna, jer su

takve repetativne DNK sekvence (mikrosateliti i minisateliti) adaptivno neutralni markeri koji nisu pod selekcionim pritiskom, nasljeđuju se mendelijanski, pa se koriste u genetičkom određivanju srodnosti između individua (Slika 5). Jedan poseban oblik ponavljajućih sekvenci su trinukleotidna ponavljanja s motivima (CGG, GCC, GAA, CTG i CAG). Oni se nalaze unutar gena i veliko povećanje njihovog broja dovodi do različitih oboljenja (Hantingtonovo oboljenje, Fridrihova ataksija, fragilni X sindrom, miotonična distrofija, juvenilna mioklonična epilepsija, spinocerebralna ataksija itd.). Detekcijom broja ponavljanja možemo izvršiti dijagnostičku molekularno-genetičku analizu u cilju predikcione procjene i potvrde oboljenja.

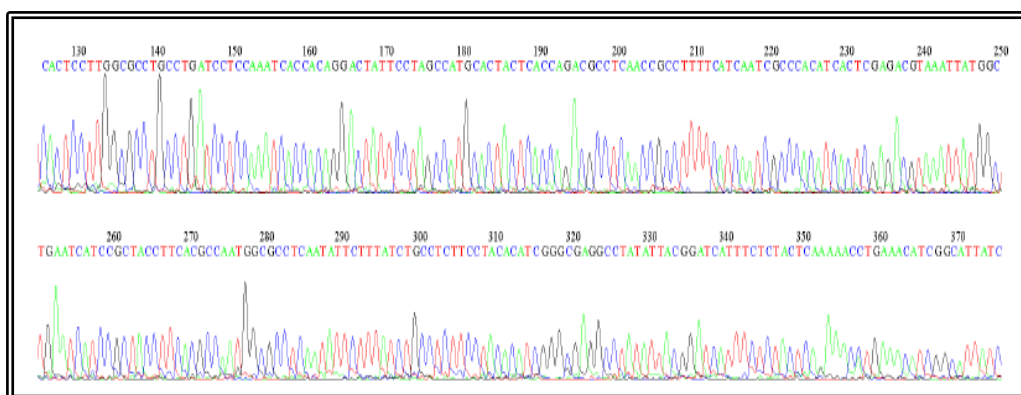


Slika 5. Elektroferogram dobijen fragment analizom mikrosatelitnih ponavljajućih sekvenci

Kada su u pitanju markeri značajni za molekularno-genetičku proceduru, možemo ih podijeliti na mitohondrijalne i nuklearne. Svaki od tih gena ima određene specifičnosti i mogu sadržati određene vrste informacija koje nisu prisutne u drugom genomu. Pod genetičkim markerima se u užem smislu podrazumijevaju sve

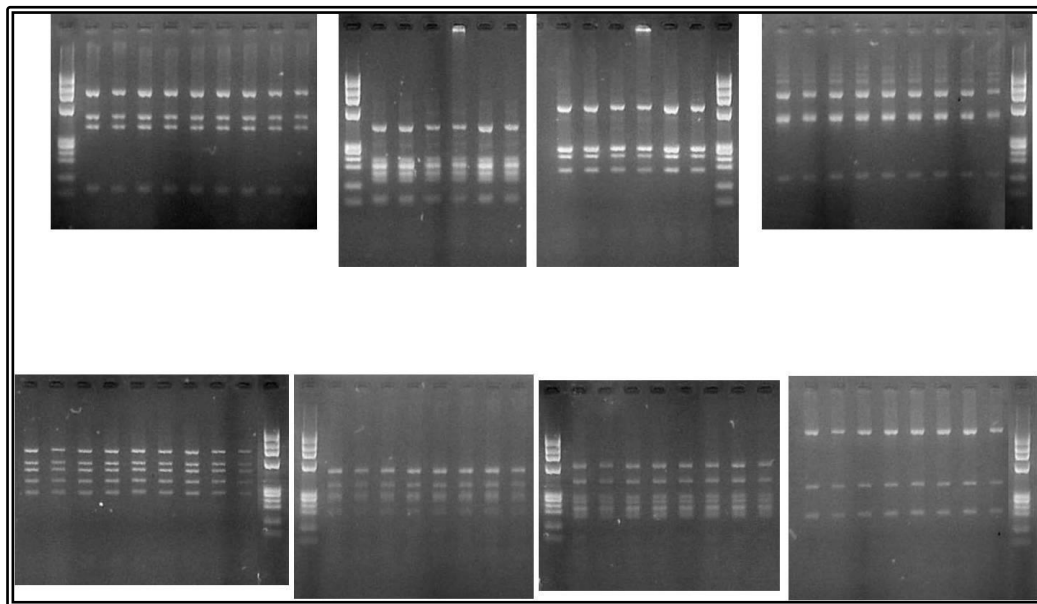
alelne varijante jednog gena ili DNK polimorfizmi kojim se može procijeniti sličnost tj. različitost.

To znači da su genetički markeri bilo koje obilježje koji mogu predstavljati znak ili signal prisustva ili lokacije gena, ili bilo kojih drugih nasljednih karakteristika individue ili skupine (populacije). Savremena molekularno-genetička dijagnostička procedura podrazumijeva detekciju DNK sekvence gena ili njenog dijela (najčešće egzona) ako se zna u kojem dijelu gena se nalazi najčešće mutacije (Slika 6).



Slika 6. Izgled elektroferograma regiona DNK nakon sekvenciranja

No ako nismo detektovali te promjene na traženom mjestu, tj. ne znamo gdje se nalazi mutacija kao uzrok oboljevanja, onda sekvenciramo cijeli gen kada on postaje marker. Naravno da molekularno-genetička dijagnostika podrazumijeva veliki raspon promatranja genetičkih promjena kao uzročnika oboljevanja: chromosome, kompletne gene, dijelove gena, promjene jednog nukleotida, do dužinske varijantnosti fragmenata DNK (Slika 7).



Slika 7. Izgled gela u okviru fragment analize dužinskog polimorfizma mtDNK ND1 i ND5/6 regiona

Svaki pokazatelj trenutnog ili budućeg stanja pacijenta kada je neko oboljenje u pitanju postaje marker. Ako se radi o direktnoj detekciji nasljednog materijala, onda možemo govoriti o genetičkim markerima. Načini detekcije varijantnosti i njihove interpretacije su objašnjene u ostalim poglavljima ove knjige.

UZORCI ZA MOLEKULARNO-GENETIČKU KARAKTERIZACIJU

4.1. VRSTE UZORAKA ZA MOLEKULARNO-GENETIČKU KARAKTERIZACIJU

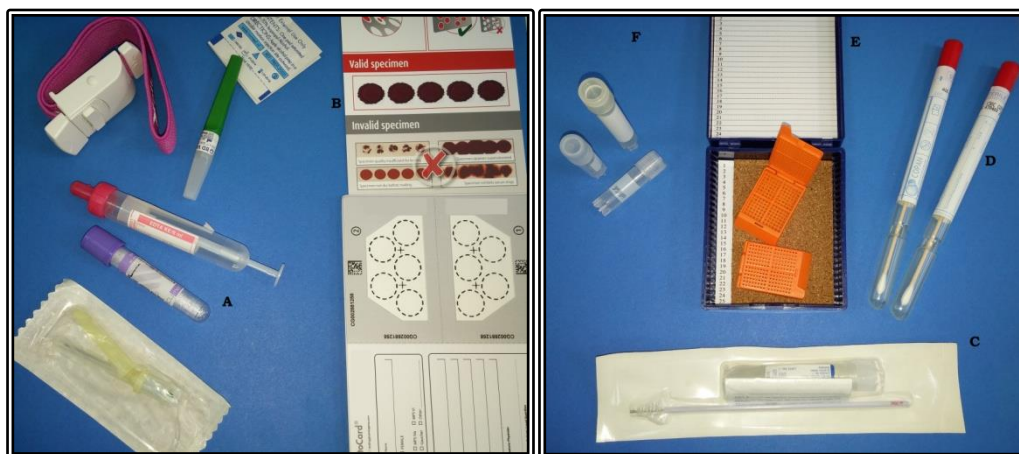
Izolacija DNK i RNK je teoretski moguća iz svake ćelije ljudskog organizma koja sadrži jedro u kojem se nalazi DNK molekula. Imajući to na umu, postoji više različitih bioloških uzoraka koji se koriste u molekularno-genetičkoj karakterizaciji za različite vrste analiza, a to su:

- puna krv,
- koštana srž,
- osušene mrlje krvi na papiru (*dried blood spots*),
- tkivo – biopsija,
- FFPE slajdovi (*Formalin Fixed, Paraffin Embedded*)
- kost,
- zub,
- bukalna sluznica – bris,
- pljuvačka,
- urin,
- feces,
- sperma,
- amnionska tekućina,
- horionske čupice,
- abortivni material.

Svaki od ovih uzoraka se koristi za različitu analizu, i pri tome se drugačije skupljaju, procesuiraju i skladište.

Puna krv se uzima venepunkcijom, po mogućnosti putem vakuum sistema, u vacutainer s EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) antikoagulansom (ljubičasti čep) za molekularno-genetičke analize, bilo za izolaciju DNK ili RNK molekule. Vakutaineri sa ostalim antikoagulansima, naročito heparinom, se izbjegavaju zbog inhibicije PCR reakcije. Naročito treba izbjegavati

vakutainere sa gel sistemom, obzirom da nakon centrifugiranja svi krvni elementi bivaju ispod sloja gela, te je u tom slučaju teško izdvojiti bijela krvna zrnca iz kojih se izoliraju DNK i RNK molekula. U slučaju da se radi o analizi DNK molekule, uzorci pune krvi se mogu čuvati kratko vrijeme na sobnoj temperaturi ili u frižideru (2°C-8°C), najčešće od 24-72 sata, nakon čega je potrebno procesirati uzorak. U slučaju da je potrebno dugotrajno skladištenje pune krvi, može se skladištiti na -20°C u periodu od godinu dana, no u tom slučaju najbolje je skladištiti samo suspenziju leukocita (odnosno odvojiti bijela krvna zrnca od ostalih elemenata pune krvi), zbog kontaminacije uzorka hemoglobinom, koji je jedan od inhibitora PCR reakcije. U slučaju da je za analizu potrebna RNK molekula, uzorak pune krvi je potrebno procesirati odmah nakon uzimanja, zbog degradacije RNK molekule, a najkasnije 4 sata nakon vađenja krvi. Postoje komercijalno dostupni vakutaineri koji se koriste u slučaju da se radi o analizi RNK molekule koji u sebi sadrže stabilizirajući agens (*PAXgene*, *Qiagen*), te se u tom slučaju može odložiti izolacija RNK do 24 sata, ili pak zalediti uzorak na -80°C, nakon odvajanja leukocita.



Slika 8: A – pribor i tubice za prikupljanje uzoraka krvi i koštane srži. B – Guthrieve kartice, C – pribor za prikupljanje briseva, D – pribor za prikupljanje bukalne sluznice, E – kutije za FFPE slajdove, F – kriotubice za prikupljanje biopsije tkiva

Koštana srž se uzima aspiracijom, nakon čega se aspirat stavlja u vakutainer s EDTA, kao i puna krv. Skladištenje i procesuiranje koštane srži je jednako skladištenju pune krvi.

Osušene mrlje krvi na papiru (dried blood spots) ili tzv. *Guthrie* kartice se koriste u slučaju da nije moguće ili je otežano uzimanje uzorka pune krvi (npr. novorođenčad, starije osobe, osobe koje primaju hemoterapiju). Ovakva vrsta uzorka se uzima kada je potrebno raditi određene analize koje ne zahtijevaju veliku količinu izolirane DNK molekule, i u principu se ne uzimaju kada je potrebno izolirati RNK molekulu. Obično se radi o krvi iz prsta, ili pete kod novorođenčadi, gdje se zatim prave mrlje krvi na filter papiru, najčešće kružne i odgovarajućeg promjera. Nakon skupljanja krvi, kartice se moraju osušiti na zraku i zatim skladištiti u odvojene kesice na -20°C , u slučaju da je potrebno dugotrajno skladištenje. U slučaju da se uzorak procesira odmah nakon skupljanja, mora se sačekati da se kartice potpuno osuše na zraku.

Tkivo nakon biopsije je također čest uzorak za molekularno-genetičku karakterizaciju. Takvo tkivo bi se trebalo zalediti na -80°C odmah nakon biopsije (uz pomoć tečnog nitrogena), i kao takvo prenijeti u laboratoriju na procesiranje. U slučaju da nije dostupan tečni nitrogen ili zamrzivač na -80°C , uzorak bioptičkog tkiva treba odložiti u plastičnu (*RNAse free*) tubicu napunjenu 70% etanolom ili nekim od komercijalno dostupnih stabilizirajućih agenasa, kao što su *RNALater* ili *AllProtect* (*Qiagen*). Tkivo u etanolu ili stabilizirajućem reagensu (u kriotubicama) se skladišti na -80°C , i na toj temperaturi se može čuvati duže vrijeme (nekoliko godina).

FFPE slajdovi (Formalin Fixed, Paraffin Embedded) su uzorci koji se skupljaju u slučaju da nije dostupno svježe zamrznuto tkivo, ili je potrebno izolirati DNK molekulu direktno iz tumorskih stanica koje je potrebno označiti na FFPE slajdu. Proces fiksacije tkiva u formalinu, i parafiniziranje dijela tkiva ima veliki uticaj na kvalitet DNK molekule, i mogućnost izolacije DNK iz takve vrste uzoraka. Postotak degradacije DNK i RNK, u ovakvom tipu uzorka uvelike

zavisi od hemijskog sastava fiksativa, dužine trajanja fiksacije, veličine uzorka i permeabilnosti uzorka u odnosu na fiksativ, te dužine trajanja skladištenja uzorka u parafinskim blokovima. Formaldehid inducira hidrosimetilaciju DNK i RNK molekule, koja je nakon zagrijavanja u jednolančanoj formi, te na taj način izaziva degradaciju tokom vremena provedenom u fiksativu. Također, zbog ovog procesa, nakon hlađenja je spriječeno stvaranje vodikovih veza između metiliranih baza, te DNK ostaje u jednolančanoj nestabilnoj formi, koja je i dodatno podložna procesu degradacije. Iako postoje različiti protokoli za ekstrakciju DNK molekule iz FFPE slajdova, takva DNK nakon izolacije je najčešće ekstremno degradirana te se može koristiti samo za određeni broj analiza. FFPE blokovi se dugotrajno skladište na sobnoj temperaturi.

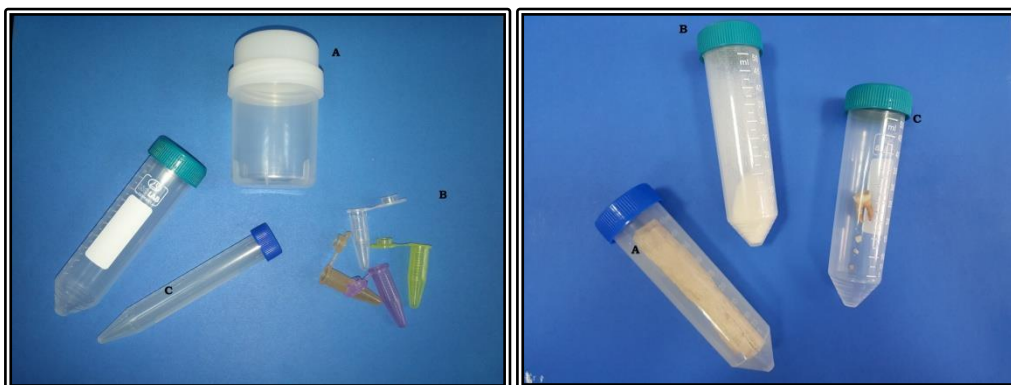
Bris bukalne sluznice se sakuplja u slučaju kada nije potrebna velika količina DNK molekule, te kada nije potrebna puna krv. Također se bukalna sluznica sakuplja kod osoba koje su prošle transplantaciju koštane srži, kod kojih primarni biološki uzorak nije puna krv. Bukalna sluznica se sakuplja putem trljanja unutrašnjosti obraza sa posebnim vatiranim štapićem koji ima svoju pripadajuću plastičnu epruvetu. Nakon sušenja uzorka na zraku, uzorak bukalne sluznice se kratkotrajno skladišti na sobnoj temperaturi ili u frižideru (2°C – 8°C), najduže mjesec dana. U slučaju dugotrajnog skladištenja bukalne sluznice, potrebno je uzorak zalediti na -20°C.

Pljuvačka se skuplja u posebno prilagođene komercijalne tubice. Pri samom skupljanju uzorka, potrebno je voditi računa da osoba koja skuplja uzorak ne konzumira hranu vodu i cigarete 30 minuta prije samog skupljanja uzorka. Najčešće se skuplja 2 ml pljuvačke, bez balončića. Takav uzorak se može skladištiti na sobnoj temperaturi ili u frižideru (2 °C – 8°C) do mjesec dana, ili pak na -20°C za dugotrajno skladištenje.

Urin se skuplja u tubice od 50 ml, ili *cuvette* za urin. Nakon skupljanja urina, potrebno je uzorak podvrgnuti centrifugi radi odvajanja elemenata urina koji su nakon centrifuge u talogu.

Talog se može odmah procesirati, ili u slučaju da izolacija DNK ili RNK nije moguća odmah nakon prikupljanja uzorka, talog urina treba zalediti na -20°C za kratkotrajno skladištenje, ili na -80°C za dugotrajno skladištenje.

Feces nakon skupljanja u tube sa širokim grlom treba izvagati na količinu 1 gram, prenijeti u tubicu od 1,5 ml (ili eventualno 15 ml) i zalediti na temperaturu od -20°C . Procesiranje uzorka fecesa se vrši kada je uzorak zaleđen, posredstvom posebnih komercijalnih kitova za DNK ili RNK ekstrakciju, obzirom da je kritičan momenat ekstrakciji DNK ili RNK iz fecesa čišćenje nepoželjnih kontaminanata. Feces se dugotrajno skladišti na temperaturi od -80°C .



Slika 9 – lijevo A tubica za prikupljanje urina, B – tubice za prikupljanje uzoraka fecesa, C – Tubice za prikupljanje sperme; desno A – uzorak kosti, B – uzorak kosti u prahu nakon mljevenja, C – uzorak zuba.

Sperma se prikuplja u tubicu sa širokim grlom, kao što je slučaj sa urinom i fecesom. Nakon prikupljanja uzorka sperme, takav uzorak se treba alikvotirati u volumenu od maksimalno 250 μl u plastične tubice od 1,5 ml ili kriogene tubice od 1 ml. Alikvotirani uzorak se koristi za dalju proceduru, bilo da je procesiranje uzorka ili kratkotrajno skladištenje na -20°C . U slučaju dugotrajnog skladištenja, uzorak sperme se skladišti u zamrzivaču na -80°C .

Kosti i zubi se nakon skupljanja trebaju manuelno očistiti od bilo kakvih ostataka, zatim isprati u 10% varikini, destilovanoj vodi te apsolutnom etanolu, sa ponavljanjima tri puta. Poslije mehaničkog čišćenja, pristupa se usitnjavanju ili mljevenju koštanih uzoraka i pretvaranju u koštani prah. Koštani prah se čuva na sobnoj temperaturi na suhom i tamnom mjestu. Skladištenje procesirane kosti nema vremensko ograničenje.

Amnionska tekućina se procesira odmah nakon uzimanja uzorka, odnosno dopremanja amnionske tekućine nakon amniocenteze. Ako se aminociti žele sačuvati i skladištiti, potrebno ih je kultivirati prije skladištenja u posebnom mediju za rast i dijeljenje amniocita u kulturi. Kultivisani amniociti se mogu dugotrajno skladištiti na -80°C , ili u posebnim kanisterima sa tečnim nitrogenom.

Horionske čupice i abortivni material se uzimaju, procesiraju i skladište kao i tkivo nakon biopsije.

IZOLACIJA NUKLEINSKIH KISELINA

Izolacija nukleinskih kiselina je osnov bilo kojeg tipa analize u molekularnoj genetici. Nukleinske kiseline, kao što je već spomenuto, mogu biti izolirane iz bilo kojeg tipa biološkog uzorka (Poglavlje 3). Tehnologija izolacije nukleinskih kiselina je napredovala tokom vremena, u prošlosti taj proces je bio dugotrajan, kompliciran, i podložan kontaminaciji. Danas je tehnologija izolacije nukleinskih kiselina jednostavnija i kratkotrajnija, te omogućava visok prinos (koncentraciju) nukleinskih kiselina u zavisnosti od tipa biološkog uzorka, čistoću nukleinskih kiselina, reproducibilnost te minimalnu mogućnost kontaminacije uzorka.

5.1. IZOLACIJA DNK

Prvi korak u molekularno-genetičkoj karakterizaciji je izolacija nukleinskih kiselina. Svaki protokol za izolaciju DNK molekule se bazira na nekoliko osnovnih koraka, bez obzira na vrstu početnog biološkog uzorka ili pak tip protokola za DNK izolaciju. Osnovni koraci izolacije DNK obuhvataju:

- lizu ćelija,
- odvajanje DNK molekule od ostataka ćelije i proteina,
- precipitacija DNK molekule,
- čišćenje i resolubilizacija DNK molekule.

Liza ćelija, se najčešće postiže uz pomoć otopine koja sadrži različite pufere, 20% SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) i različite proteinaze. Ovakva otopina sa materijalom za izolaciju DNK se inkubira, najčešće u različitim vremenskim intervalima na temperaturama od 37 °C - 60°C, u zavisnosti od početne vrste materijala. Pufferi za lizu ćelija se koriste u svrhu razbijanja membrana ćelije i ćelijskog jedra, zbog lakšeg pristupanja DNK molekuli koja se nalazi u ćelijskom jedru. Pufferi za lizu ćelija

najčešće sadrže Tris-HCl i EDTA, koji regulišu osmotsku aktivnost lizata. Osim dvije navedene komponente, vrlo često se u pufere za lizu dodaju i soli kao što je amonij hlorid (NH_4Cl), natrij hlorid (NaCl) ili kalij hidrogen karbonat (KHCO_3), koji se koriste u svrhu promjene jonskog statusa pufera i neutraliziranja jonskog naboja molekula unutar ćelije. Za disrupciju ćelijskih membrana se koriste različiti deterdženti, od kojih su najčešće korišteni SDS (*sodium dodecyl sulfate*) ili Tween 20, koji osim discupcije ćelijske membrane denaturišu pozitivno nabijene proteine, dodatno pomažući oslobađanje DNK molekule iz ćelijskog jedra. Proteinaze se dodaju radi dodatne denaturacije proteina koji su nepoželjni u fazi izolacije DNK molekule, gdje je najčešća proteinaza koja se dodaje u smjesu za inkubaciju proteinaza K, koja je proteaza širokog spektra i koja prekida peptidne veze u svim proteinima sa kojima dođe u kontakt, uključujući različite vrste DNAza (koje degradiraju DNK molekulu), i histona (koji su spiralizovani zajedno sa DNK molekulom u ćelijskom jedru).

Odvajanje DNK molekule od ostataka ćelije i proteina se vrši nakon liza ćelija i ovaj korak se može vršiti na nekoliko različitih načina. Najčešće se koristi sol kao što je natrij hlorid (NaCl), organski rastvarači kao što je mješavina fenol/hloroform ili pak filterisane kolone.

*Precipitacija DNK molekule se nakon prečišćavanja vrši uz pomoć hladnog apsolutnog etanola (99,6%, *pro analisi ethanol*), koji spiralizuje i precipitira DNK molekulu. U ovom koraku, ako je početna količina biološkog uzorka dovoljno velika, moguće je DNK molekulu vidjeti golim okom, te je moguće također pokupiti putem zašiljene staklene cjevčice ili plastičnog nastavka za pipete.*

Čišćenje i resolubilizacija DNK molekule se vrši nakon precipitacije. Dodatno čišćenje DNK molekule se vrši serijom ispiranja izolovane DNK putem 70% etanola. Nakon čišćenja, i kratkotrajnog sušenja DNK molekule da bi isparili zaostaci etanola, vrši se resolubilizacija DNK molekule u sterilnoj, destilovanoj i dejoniziranoj vodi (koja u sebi ne sadrži DNAze), ili

TE puferu, koji se sadrži od Tris i EDTA, najčešće pH 8.0 što vodi dodatnoj stabilizaciji DNK.

Skladištenje DNK molekule uvelike zavisi od resuspendacije DNK. U slučaju da je potrebno kratkotrajno skladištenje DNK, moguće je koristiti vodu pri resuspendiranju DNK, jer voda promovira spontanu separaciju DNK molekule i degradaciju putem rezidualne aktivnosti nukleaza, te je pogodna samo za kratkotrajno skladištenje. Sa druge strane, TE pufer pruža dodatnu stabilnost DNK molekuli, gdje EDTA lijepi različite katione i sprječava aktivnost nukleaza, a Tris sprječava spontano razdvajanje DNK lanaca. Purificirana DNK može biti skladištena do 26 sedmica na sobnoj temperaturi, do godinu dana u frižideru na temperaturama od 2°C - 8°C, te preko 7 godina na temperaturama od -20°C ili -80°C. Također je potrebno obratiti pažnju da je DNK molekula podložna degradaciji pri odmrzavanju i ponovnom zamrzavanju, te je *freeze-thaw* cikluse (odmrzavanje i ponovno zamrzavanje) potrebno svesti na najmanju moguću mjeru za uspješno dugotrajno skladištenje DNK molekule.

5.1.1. Prethodna obrada određenih tipova bioloških uzoraka

Prvi korak lize ćelija je kod svih tipova izolacije DNK molekule isti. Određeni tipovi bioloških uzoraka, prije koraka lize ćelije zahtijevaju dodatnu pripremu uzorka za izolaciju, kao što su naprimjer puna krv, tkivo (uključujući horionske čupice i abortivni materijal), feces, kost i zub, urin i sperma, kao i FFPE blokovi. Neki od tipova bioloških uzoraka zahtijevaju i dodatno čišćenje DNK nakon izolacije od inhibitora PCR reakcije, kao što je feces i FFPE blokovi.

Puna krv (i koštana srž) se mora prethodno pripremiti za lizu ćelija, obzirom da su u punoj krvi sadržani svi elementi krvi, uključujući crvena krvna zrnca i krvne pločice iz kojih se ne može izolirati DNK molekula obzirom da su za izolaciju DNK potrebne ćelije sa jedrom. Također, crvena krvna zrnca sadrže hemoglobin u svom sastavu, koji je poznati inhibitor PCR reakcije. DNK

izolacija iz pune krvi podrazumijeva izolaciju iz bijelih krvnih zrnaca, koji u svom sastavu imaju jedro, odnosno DNK molekulu. Princip izolacije bijelih krvnih zrnaca iz pune krvi prije izolacije DNK se bazira na odvajanju krvne plazme i ostalih krvnih elemenata putem lize eritrocita i centrifugiranja, te ispiranja leukocita. Nakon ispiranja leukocita pristupa se klasičnoj DNK izolaciji.

Tkivo nakon biopsije (uključujući horionske čupice i abortivni materijal) se mora mehanički ili hemijski usitniti (macerirati) do pojedinačnih ćelija, te nakon homogenizacije tkiva nastaviti sa lizom ćelija. Homogenizacija tkiva se može vršiti na više načina, dok je najčešći način manuelna maceracija tkiva koristeći avan, tučak i tečni nitrogen, ili pak mehanički homogenizator.

Urin i sperma se moraju najprije centrifugirati, obzirom da nije potreban vodeni sastojak ovih bioloških uzoraka, jer je u njima prisutan veći broj proteina koji su nepoželjni u izolaciji DNK molekule. Nakon centrifugiranja i odvajanja ćelija, vrši se liza ćelija kao prvi korak DNK izolacije.

Feces se priprema ispiranjem etanolom, ponavljajući korak ispiranja više puta, i manuelnom maceracijom biološkog uzorka prije ispiranja etanolom. Nakon centrifugalnog odvajanja ćelija prisutnih u fecesu može se pristupiti lizi ćelija. Uklanjanje inhibitora PCR reakcije koje se nalaze u fecesu se vrši putem posebnih hemikalija, ili pak silica-baziranih kolona nakon precipitacije DNK molekule u većini protokola za izolaciju DNK iz fecesa.

FFPE blokovi se prije lize ćelija moraju podvrgnuti procesu deparafinizacije, ili putem visoke temperature ili putem hemijskih agenasa kao što su ksilol ili etanol. Nakon deparafinizacije, i maceracije tkiva, moguće je pristupiti lizi ćelija. Obzirom da je tkivo fiksirano u formalinu, nije preporučljiva klasična metoda isoljavanja, već se u ovom procesu preporučuje organska izolacija DNK.

5.1.2. Tipovi izolacije DNK molekule

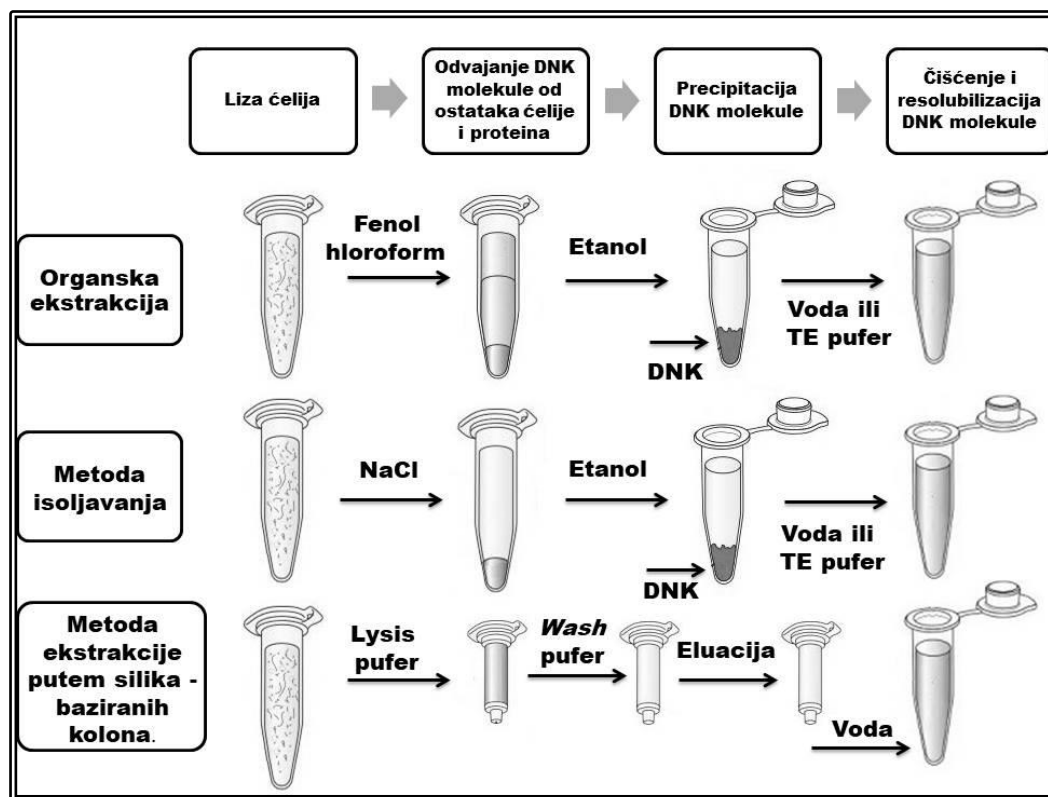
Nakon lize ćelija, u svakoj metodi DNK izolacije, pristupa se odvajanju molekule DNK od ostataka ćelija i proteina. Ovaj korak se može vršiti na različite načine, i prema načinu odvajanja mogu se identificirati tri tipa izolacije DNK molekule (Slika 10):

- organska ekstrakcija
- metoda izoljavanja
- metoda ekstrakcije putem silika-baziranih kolona.

Organska ekstrakcija (ili fenol/hloroform bazirana izolacija) koristi organske rastvarače kao što je mješavina fenol/hloroform/izoamilni alkohol. Hemijska i fizička svojstva nukleinskih kiselina, kada su podvrgnuta organskom rastvaraču migriraju prema vodenoj fazi, a ne organskoj fazi nakon centrifugiranja uzorka. U vodenoj fazi se mogu naći DNK i RNK molekula, koja je dodatno stabilizirana izoamilnim alkoholom. Za DNK izolaciju, potrebno je da miks fenol/hloroform ima pH između 7 i 8, jer u slučaju zakiseljene sredine, DNK molekula će se izdvojiti iz vodene faze i preći u organsku fazu (što se dešava prilikom RNK izolacije organskom metodom). Nakon centrifugiranja i razdvajanja vodene i organske faze, pristupa se pažljivim odvajanjem vodene faze putem sterilne pipete te ispiranja čistim hloroformom. Nakon ispiranja, pristupa se nastavku klasične DNK izolacije koja obuhvata precipitaciju DNK sa hladnim (0°C) apsolutnim etanolom i kasnijim čišćenjem i resolubilizacijom DNK molekule. Organska ekstrakcija se koristi u slučaju kada je početni biološki uzorak nepovoljan za metodu izoljavanja, kao što su kosti ili FFPE blokovi.

Metoda izoljavanja (neorganska ekstrakcija) koristi zasićenu soluciju NaCl-a za odvajanje molekule DNK od ćelijskog debris i proteina, putem čega NaCl lijepi ćelijske ostatke i proteine jedan za drugi, pri čemu oni centrifugiranjem čine talog na dnu tubice, dok DNK molekula ostaje u supernatantu. Metoda izoljavanja je najčešća metoda izolacije DNK molekule iz većine bioloških uzoraka koji se koriste u molekularno-genetičkoj karakterizaciji.

Osim što je relativno jeftina metoda, koristi se stabilni reagent (NaCl) koji ima duže vrijeme skladištenja od organskog fenol/hloroforma te pri tome nije opasna hemikalija kao što je to organski rastvarač, i ne moraju se koristiti posebni protokoli za odvajanje i neutraliziranje ostataka nakon DNK izolacije. Nakon izdvajanja ćelijskih ostataka i proteina putem centrifugiranja, pristupa se klasičnoj precipitaciji, čišćenju i resolubilizaciji DNK molekule.



Slika 10. Različiti tipovi izolacije DNK molekule

Metoda ekstrakcije putem kolona se vrši uz pomoć komercijalnih paketa gdje je odvajanje putem filterisanih, silika-baziranih kolona. Ovakva vrsta izolacije DNK molekule je najbrža i najjednostavnija, ali u isto vrijeme je i najskuplja, obzirom da ovakvu vrstu izolacije DNK molekule nije moguće izvesti bez komercijalnih kitova.

5.2. IZOLACIJA RNK

Ribonukleinska kiselina (RNK), za razliku od DNK, je nestabilna molekula i jako brzo podliježe procesima degradacije. Nakon izolacije RNK ima jako kratak životni vijek, obzirom da su u vanjskom okruženju ribonukleaze, koji su glavni uzročnici degradacije RNK molekule, prisutne u svakom trenutku. Ribonukleaze su također prisutne i u svakom tipu biološkog uzorka, te je zbog toga potrebno pristupiti izolaciji RNK molekule odmah nakon prikupljanja uzorka (unutar 4 sata). Ribonukleaze pripadaju klasi termostabilnih enzima, koji se nakon temperaturne inaktivacije ponovno konformišu, i nisu im potrebni koenzimi, te je inaktivacija ovakvih enzima komplikovana. Postiže se uglavnom pomoću korištenja različitih denaturanata, kao što je dietilpirokarbonat (DEPC) koji zaustavlja aktivnost ribonukleaza.

Pri radu sa RNK molekulom, potrebno se pridržavati nekoliko osnovnih smjernica u laboratoriji:

- obavezno je korištenje laboratorijskog mantila, jednokratnih rukavica, maske, kape i plastičnih rukava,
- potrebno je odvojiti prostor u laboratoriji u kojem će se vršiti jedino izolacija RNK molekule,
- svo posuđe (stakleno i plastično) koje će se koristiti za RNK izolaciju je potrebno tretirati sa DEPC prema standardnim smjernicama rada sa RNK,
- potrebno je koristiti isključivo sterilne filterisane nastavke za poluautomatske pipete i to certificirano bez nukleaza,
- nakon skupljanja biološkog uzorka, izolacija RNK molekule se mora početi odmah po skupljanju uzorka, a najkasnije nakon 4 sata (biološki uzorak mora biti ohlađen na temperaturu od 2°C-8°C),
- u slučaju da nije moguće započeti izolaciju RNK odmah, biološki uzorak se mora tretirati nekim od reagensa za stabilizaciju, kao što je D+ otopina, *RNA Later (ThermoFisher)* ili *AllProtect (Qiagen)* reagens prema uputama proizvođača,

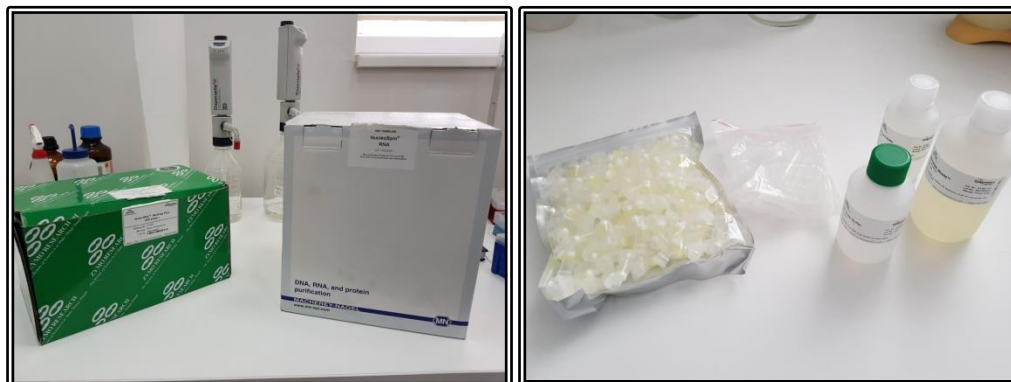
- u slučaju skladištenja uzorka za izolaciju RNK molekule, uzorak se skladišti u reagensu za stabilizaciju prema uputama proizvođača,
- rad sa RNK molekulom se mora uvijek odvijati na ledu, i u hladnim uslovima, što uključuje i hladne centrifuge i nisku temperaturu prostorije u kojoj se radi sa RNK molekulom.

Postoji više metoda izolacije RNK molekule, kao što su organska ekstrakcija, metoda pomoću spin kolona, i metoda magnetnih perli.

Organska ekstrakcija RNK molekule, se bazira na fenol/hloroform/izoamilni alkohol mješavini. Ovaj metod (odnosno varijaciju metoda) su prvi put primijenili *Chomczynski* i *Sacchi* 1987. godine, gdje su osnovni reagensi gvanidium izotiocijanat koji zaustavlja aktivnost ribonukleaza tako što ih denaturiše i stabilizuje DNK molekulu te fenol koji uz dodatak hloroforma a po potrebi izoamilnog alkohola particionira nukleinske kiseline u različite faze razdvajanja nakon centrifugiranja, vodeći računa o pH samog reagensa. Fenol koji se koristi u izolaciji RNK molekule mora biti kiseo, odnosno imati niži pH od 7, jer pri neutralnom pH u vodenu fazu razdvajanja izdvaja se DNK molekula, a ne RNK molekula (kao što je opisano u dijelu izolacije DNK). U ovoj metodi najčešće se koristi komercijalno dostupni reagens *Trizol (Invitrogen)*, ili *TriReagent (Sigma-Aldrich)*. Oba komercijalno dostupna reagensa u svom sastavu imaju fenol i gvanidin izotiocijanat, dok se hloroform (ili hloroform/izoamilni alkohol) dodaje nakon kratke inkubacije biološkog uzorka u *Trizolu*. Kod organske izolacije RNK iz većine bioloških uzoraka (osim FFPE blokova i fecesa) ne postoji prethodni korak pripreme uzorka, već se trizol dodaje direktno na uzorak i vrši se mehaničko usitnjavanje uzorka u trizolu i kratka inkubacija do 5 minuta na sobnoj temperaturi. Alternativno u slučaju čvrstog tkiva, moguće je prethodno macerirati zaleđeni uzorak pomoću tečnog nitrogena, avana i tučka, ili nekog od homogenizator aparata, ako je isti dostupan. Nakon dodavanja

trizol reagenta i hloroforma, te centrifugiranja, odvajaju se jasno vidljive tri faze – vodena faza, u kojoj se nalazi RNK molekula, međufaza – u kojoj se nalazi genomska DNK i organska faza u kojoj se nalazi dio genomske DNK, proteini i lipidi, te ostaci ćelija. Vodena faza se nakon pažljivog skupljanja dodatno čisti sa hloroformom, te precipitira sa ohlađenim izopropanolom. Nakon precipitacije, RNK molekula se dodatno čisti 70% etanolom, kao i DNK molekula. Nakon kratkotrajnog sušenja, RNK molekula se resolubilizira u sterilnoj destilovanoj vodi. U slučaju dugotrajnog skladištenja RNK molekule, potrebno je skladištiti suhu RNK molekulu (prije resolubilizacije) na -80°C , ili pak dodati apsolutni etanol te je skladištiti na -80°C .

Metoda spin kolona kod RNK izolacije je slična istoj metodi izolacije DNK molekule. U ovoj metodi koriste se komercijalni paketi s filterisanim silika baziranim kolonama i reagensima dostupnim od proizvođača komercijalnog kita (Slika 11). Pri početku ove metode potrebno je izvršiti lizu ćelija, najčešće sa reagensom koji osim klasičnih reagenasa za lizu uključuje i gvanidin izotiocijanat kao stabilizator RNK molekule, a zatim se lizirane ćelije podvrgavaju seriji centrifugiranja kolona, gdje se nukleinske kiseline vežu za membranu kolone, dok ostali debris i proteini prolaze u lizatu i odbacuju se u procesu izolacije. Kod ove metode izolacije RNK molekule potrebno je najčešće izvršiti međukorak inkubiranja membrane sa dezoksiribonukleazama, koje će degradirati DNK molekulu, a koja će zatim zajedno sa puferima za ispiranje biti isprana sa membrane na kojoj je vezana RNK molekula. Nakon serije ispiranja i čišćenja, RNK molekula se eluira sa membrane pomoću sterilne vode ili pufera, prema uputstvima proizvođača komercijalnog paketa.



Slika 11: Kitovi za izolaciju RNK

Metoda magnetnih perli se bazira na korištenju mini perli (dijametra 0,5 – 1 μm) koje imaju namagnetisano središte i omotač kojem je moguće vezati RNK molekulu putem hemijskih procesa. Magnetne perle migriraju prema magnetnom polju koje se uspostavlja putem magnetnih stalaka, što čini odvajanje nepoželjnih materija u procesu izolacije RNK jednostavnim i efikasnim. Biološki uzorak, zajedno sa puferima koji sadrže reagense koji stabiliziraju RNK molekulu i vrše denaturaciju ribonukleaza se miješa s magnetnim perlama, pri čemu se u procesu homogenizacije RNK molekula veže za magnetne perle, odnosno omotač magnetnih perli. Pri korištenju magnetnih stalaka, perle se lijepe uz pomoć magnetnog polja, i nepoželjne materije se uklanjaju pipetiranjem. Nakon odvajanja od magnetnog polja, perle na kojima je vezana RNK molekula se ispiraju u više serija, i nakon ispiranja RNK molekula se odvaja od magnetnih perli uz pomoć elucijskog pufera. Perle se vežu za magnetno polje u stalku, i resuspendirana RNK molekula se može prebaciti u novu čistu tubicu bez magnetnih perli, i tako spremiti za dalju analizu.

KVANTITATIVNO-KVALITATIVNA ANALIZA IZOLOVANIH NUKLEINSKIH KISELINA

Kvantitativna i kvalitativna metoda analize izolovane DNK i RNK molekule (ili PCR produkta) se može vršiti na više načina. Najčešći način određivanja koncentracije nukleinskih kiselina je spektrofotometrija (i to UV spektrofotometrija), ili pak fluorometrija nukleinskih kiselina. UV spektrofotometrijom se može mjeriti i količina (kvantitativna analiza) i čistoća (kvalitativna analiza) izolirane nukleinske kiseline. Za kvalitativnu analiza nukleinskih kiselina, u kojoj se želi odrediti stepen degradacije DNK ili RNK molekule, se također koristi i elektroforeza nukleinskih kiselina na agaroznom gelu. Elektroforeza na agaroznom gelu predstavlja i završnu metodu molekularno-genetičke karakterizacije kod mnogih vrsta analiza DNK ili RNK molekule, gdje se koristi za vizualizaciju PCR produkta (ili grupe produkata), njihovu prisutnost/odsutnost kada je u pitanju plus-minus esej, ili pak veličinu kada su u pitanju ostale vrste analiza.

6.1. UV SPEKTROFOTOMETRIJA DNK

Kvantitativna analiza DNK molekule, odnosno određivanje njene koncentracije u određenom rastvoru se vrši putem metode UV spektrofotometrije. Nukleinske kiseline, kao i proteini, ne apsorbiraju svjetlo u vidljivom regionu (400-760 nm), ali zato efikasno apsorbiraju UV svjetlo (200-400 nm), što omogućava određivanje koncentracije DNK ili RNK u nekom uzorku čak i do 2,5 ng/ μ l.

DNK i RNK imaju maksimalnu apsorpciju UV svjetlosti na 260 nm. Proteini, odnosno aromatske aminokiseline (tiozin, triptofan i fenilalanin) imaju maksimalnu apsorbanču UV svjetla na 280 nm talasne dužine te se apsorbanča uzorka nakon DNK izolacije

izmjerena i na toj talasnoj dužini uzima u obzir za izračun čistoće DNK uzorka.

Proteini također imaju još jedan vrh apsorbance UV svjetla, odnosno njihove peptidne veze imaju maksimalnu apsorbancu na 215 - 230 nm, te se i ta apsorbancia određenog uzorka uzima u izračunu čistoće DNK uzorka. Maksimum apsorbance na 230 nm imaju također i tiocijanati i ostali organski sastojci pufera za izolaciju DNK.

Koncentracija DNK se može izračunati po sljedećoj formuli:

$$C_{\text{DNK}}(\text{ng}/\mu\text{l}) = A_{260} \times R \times 50$$

U ovoj formuli C je koncentracija DNK, A je očitana apsorbancia na 260 nm, R je razblaženje uzorka, a 50 je ekstinkcijski koeficijent kada uzmemo da koncentracija DNK od 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ima optičku gustoću od 1.

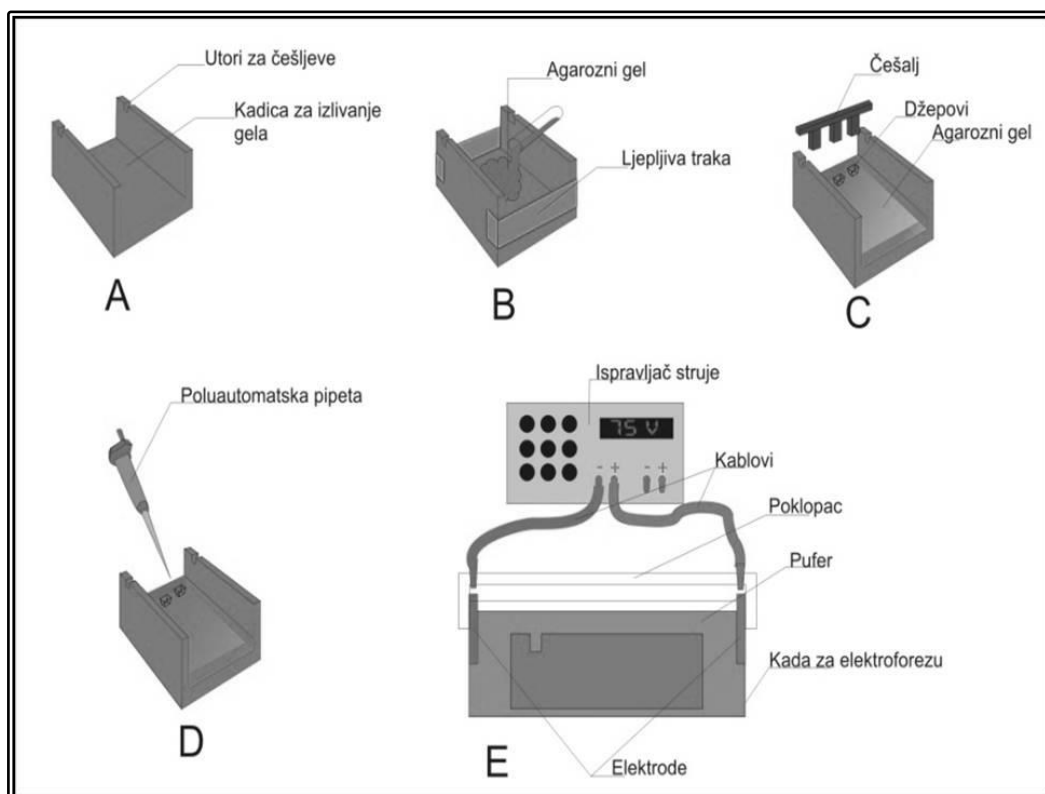
Čistoća DNK uzorka se računa preko odnosa između apsorbance na 260 nm i apsorbance na 280 nm, odnosno maksimalne apsorbance DNK i maksimalne apsorbance proteina. U slučaju da je 260/280 odnos veći od 1,8 pa do 2,0, možemo zaključiti da u uzorku izolirane DNK imamo čistu DNK molekulu. U slučaju da je ovaj odnos niži od 1,8 u uzorku je prisutna kontaminacija proteinima, te se uzima da što je ovaj odnos niži, kontaminacija proteinima je veća, odnosno u uzorku ima više proteina nego DNK.

Drugi odnos koji se uzima u obzir kod estimacije čistoće DNK je odnos apsorbance izmjeren na 230 nm u odnosu na apsorbancu izmjerenu na 260 nm. 230/260 odnos pokazuje kontaminaciju proteinima, i organskim ostacima pufera koji su se koristili za izolaciju DNK molekule. U slučaju da je ovaj odnos iznad 0,5, možemo konstatovati da je došlo do kontaminacije uzorka te je potrebno napraviti ponovno čišćenje izolirane DNK.

6.2. GEL ELEKTROFOREZA NUKLEINSKIH KISELINA

Kvalitativna analiza DNK se najčešće vrši putem jednostavnog procesa elektroforeze bioloških molekula. U slučaju gel elektroforeze DNK, ona se može vršiti uz pomoć agaroznih ili poliakrilamidnih gelova, u zavisnosti od veličine fragmenata koje želimo elektroforetski separirati, odnosno vrste metode koju želimo koristiti.

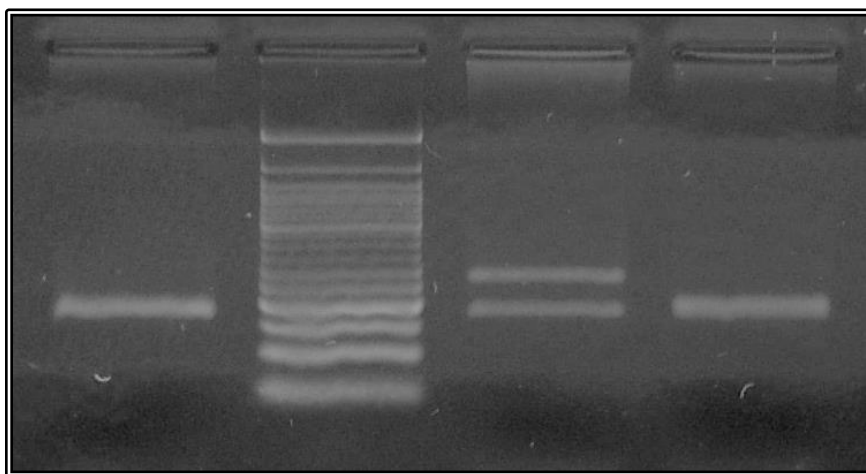
Gel elektroforeza predstavlja proces prostorne separacije molekula na gelu (koji u ovim slučajevima može biti agarozni ili poliakrilamidni, uz male preinake) u električnom polju. Putovanje DNK ili RNK fragmenata kroz matiks (gel) se odvija u zavisnosti od njihove relativne molekulske mase i električnog naboja (slika 12).



Slika 12. Shematski prikaz gel-elektroforeze

Fosfatni skelet nukleinskih kiselina daje ovim molekulama jednak električni naboj po jedinici dužine. Zbog ove činjenice, molekule DNK i RNK se kreću uniformno kroz gel u zavisnosti od njihovog naboja, a ne njihove sekvence. DNK i RNK su negativno nabijene molekule i kreću se ka pozitivnoj katodi (anodi) u toku gel elektroforeze.

Kroz pore agaroznog, odnosno poliakrilamidnog gela, manji fragmenti DNK ili RNK se kreću brže od većih fragmenata. Agarozni gel koji se koristi u horizontalnoj gel elektroforezi je prigodan za razdvajanje DNK fragmenata veličine od 20 - 50 baznih parova (bp)(Slika 13).



Slika 13. Prikaz PCR produkta na 2% agaroznom gelu

Ako želimo razdvojiti manje fragmente, od 5 baznih parova (bp) pa naviše, ili fragmente koji se međusobno razlikuju u manje od 20 bp, tada treba koristiti poliakrilamidni gel odnosno vertikalnu gel elektroforezu. U slučaju da trebamo razdvojiti fragmente koji se međusobno razlikuju u samo jednom baznom paru, trebamo koristiti sekvencer uređaj koji se uvelike bazira na principu vertikalne gel elektroforeze, samo zavisi koju vrstu matriksa koristi – poliakrilamidni gel ili određeni tečni polimer.

Nakon elektroforeze, potrebno je obojiti fragmente DNK ili RNK u gelu da bi ih locirali. Najpoznatija i najučinkovitija boja za ovu namjenu je etidijum-bromid, nepolarna molekula koja se

interkalarno veže za DNK, odnosno RNK molekulu. Etidijumbromid fluorescira pod UV svjetlom, te je zbog toga nakon elektroforeze potrebno gel izložiti UV svjetlu preko UV lampi da bi se dobila željena slika DNK i RNK separacije.

Kod agaroznog gela, osim agaroze koji je glavni sastojak, potrebno je odabrati i odgovarajući pufer koji će služiti kao puferski sistem u gel elektroforezi. Najčešći puferi za elektroforezu nukleinskih kiselina koriste tris, kao što su TAE¹ i TBE² pufer. Osim ova dva najčešća pufera postoji i više varijanti pufera koji ne koriste tris kao baznu supstancu kao što je SB³ pufer.

Agarozni gelovi se, u zavisnosti od veličine fragmenata, prave u koncentracijama od 0,3 do 2,5%. Osim izbora najboljeg pufera i procenta agaroznog gela, također je bitno i odrediti pravu voltažu za gel elektroforezu. Najčešće se maksimalna rezolucija DNK fragmenta postiže na voltaži od 5V po cm gela, u zavisnosti koliko je gel dugačak.

6.3. FLUOROMETRIJSKA KVANTIFIKACIJA NUKLEINSKIH KISELINA

Fluorometrijska kvantifikacija nukleinskih kiselina podrazumijeva korištenje fluorescentnih boja koje se mogu vezati za DNK ili RNK. Spektrofotometrijska kvantifikacija nukleinskih kiselina može biti neopuzdana u miješanim uzorcima i/ili kontaminiranim uzorcima obzirom da apsorbcija na 260 nm nije selektivna, odnosno ne mogu se tačno razlikovati DNK, RNK ili proteini. Vrijednosti absorbance vrlo lako variraju što zavisi od kontaminanata kao što su slobodni nukleotidi, soli, i organska jedinjenja. Također, senzitivnost spektrofotometrije često zna biti manja u slučaju manjih koncentracija nukleinskih kiselina, te manja koncentracija često zna biti pogrešno izmjerena putem UV

¹ TAE – tris, sirćetna kiselina i EDTA

² TBE – tris, borna kiselina i EDTA

³ SB – natrij hidroksid i borna kiselina

spektrofotometrije. Fluorometrijska kvantifikacija, s druge strane, obzirom da koristi fluorescentne boje koje se selektivno vežu za DNK, RNK ili proteine, može odrediti tačnu koncentraciju različitih nukleinskih kiselina.



Slika 14. Qubit 2.0. fluorometar

Za fluorometrijsko određivanje koncentracije bioloških makromolekula, potreban je fluorometar ili spektrofotometar koji ima mogućnost očitavanja fluorescencije. Jedan od takvih aparata, specifično prilagođen za očitavanje koncentracije DNK, RNK ili proteina je *Qubit* aparat (*Life Sciences*)(Slika 14). Princip rada *QUBIT* aparata je na očitavanju fluorescentnih boja koje se vežu specifično za jednu vrstu molekule: DNK, RNK ili protein. Ove boje imaju izuzetno nisku fluorescenciju dok se ne vezuju za svoje mete (DNK, RNA ili protein). Nakon vezivanja postaju intenzivno fluorescentni. Naprimjer, *Qubit* DNK boja koja se koristi za analizu visoke senzitivnosti ima izuzetno nisku fluorescenciju dok se ne vezuje za DNK. Posle vezivanja za DNK, interkalarno između baza DNK, supstanca postaje intenzivno fluorescentna. Jednom dodan u rastvor DNK, *Qubit* DNK boja se vezuje za DNK za nekoliko sekundi i dostigne ravnotežu za manje od dva minuta. *Qubit* fluorometar također koristi DNK standarde da bi se izračunao odnos između koncentracije DNK i fluorescencije.

METODE PCR-A (POLIMERAZNA LANČANA REAKCIJA)

7.1.POLIMERAZNA LANČANA REAKCIJA (PCR)

Razvoj polimerazne lančane reakcije (PCR) je usmjerio razvoj metoda u molekularnoj biologiji u novi smjer. Iako je prvi put ova metoda zvanično opisana 1986. godine od strane *Mullisa* i saradnika, njeni temelji su postavljeni godinu dana ranije od strane *Saiki* i saradnika.

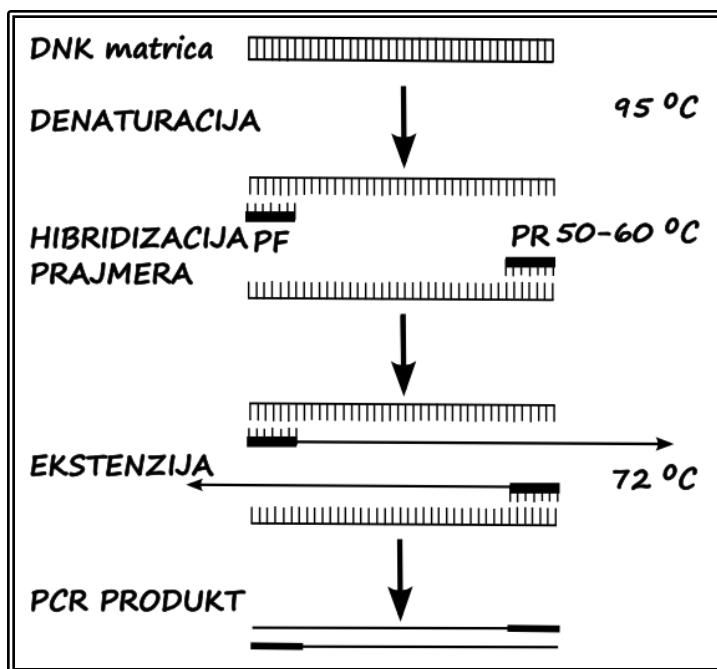
Isprva se u PCR reakciji koristila termolabilna DNK polimeraza izolirana iz bakterije *Escherichia coli*, no reakcija postaje stabilnija godinu dana poslije otkrićem i upotrebom termostabilne DNK polimeraze (Taq polimeraze) izolirane iz bakterije *Thermus aquaticus*. Upotrebom termostabilne DNK polimeraze postiže se mogućnost automatizacije PCR procesa i dalji razvoj metoda baziranih na ovom procesu.

PCR je metoda (tehnika) bazirana na eksponencijalnoj amplifikaciji DNK molekule *in vitro* posredstvom određenih hemikalija koji podražavaju prirodni replikacioni proces DNK molekule u ćeliji. Pomoću ove metode moguće je, u samo nekoliko sati, amplificirati (umnožiti) ciljani DNK sekvencu od interesa.

PCR reakcija je poznata i pod nazivom «molekularno fotokopiranje», što objašnjava zapravo značaj ovog otkrića u odnosu na razvoj molekularne dijagnostike. Najvažnije značajke PCR reakcije su njena jednostavnost, robusnost, brzina i fleksibilnost.

Osnovna PCR reakcija se sastoji iz tri koraka: razdvajanja dvostrukog lanca DNK (denaturacija DNK lanca), hibridizacije prajmera (početnica) za ciljani dio DNK sekvence (*annealing*) i elongacija DNK lanca uz pomoć DNK polimeraze (Taq polimeraze). Ova tri glavna koraka se ciklično ponavljaju u toku PCR reakcije

30-40 puta (ciklusa) u zavisnosti od produkta amplifikacije (Slika 15).



Slika 15. Shema PCR reakcije

Denaturacija DNK lanca, odnosno razdvajanje dvostrukog lanca DNK molekule je prvi korak u PCR reakciji. Prije početka ciklusa PCR-a, potrebno je aktivirati Taq polimerazu na 94 °C -95°C, što se naziva inicijalna denaturacija. Nakon inicijalne denaturacije slijedi denaturacija DNK molekule, gdje pod visokom temperaturom od 94 °C -95°C pucaju slabe vodikove veze između dva lanca DNK, što uzrokuje oslobađanje krajeva azotnih baza DNK molekule koje imaju afinitet ka ponovnom vezivanju. Korak denaturacije traje od 30 – 60 sekundi, i primarni je korak PCR reakcije. Različite temperature denaturacije unutar PCR reakcije mogu polučiti različite rezultate. Prema određenim autorima potrebno je smanjiti temperaturu denaturacije za 1 °C -2 °C od inicijalne temperature denaturacije poslije 10 ciklusa PCR reakcije zbog postepene denaturacije Taq polimeraze. Smatra se da je poluživot aktivnosti Taq DNK polimeraze više od 2 sata na 92,5°C, 40 – 60 minuta na 95°C i 5 minuta na 97,5°C. Pored

opisanih procesa u koraku denaturacije DNK lanca, dešava se još jedan bitan proces za PCR reakciju – na 94 °C – 95 °C prestaju sve ostale enzimatske aktivnosti, kao što je na primjer elongacija DNK lanca u prethodnom ciklusu.

Annealing, odnosno hibridizacija prajmera (početnica) u PCR reakciji se odvija na 45 °C – 65 °C. U toku *annealinga*, prajmeri hibridiziraju sa komplementarnim dijelovima DNK matrice, odnosno, za nju se vezuju vodikovim vezama. Kada se tačna komplementarna sekvenca prajmera veže za odgovarajući dio DNK matrice, ona biva stabilna, te daje polaznu tačku za proces elongacije. Temperatura hibridizacije prajmera zavisi od dužine prajmera te njihove strukture i rasporeda azotnih baza. G i C (guanin i citozin) baze imaju višu tačku topljenja od A i T (adenin i timin) baza, te kao posljedica višeg sadržaja GC baza u sastavu prajmera imamo i višu temperaturu *annealinga*. Također, što je prajmer duži, potrebna je veća temperatura da se pravilno veže za DNK matricu. Uzima se da je temperatura od 55°C polazna tačka za prajmere koje imaju oko 50% GC sadržaja baza i dugi su od 18 – 30 nukleotida. Vrijeme *annealinga* također zavisi od dužine prajmera i sastava prajmera. Tako za prajmer od 18 – 30 nukleotida i 50% GC sadržaja baza potrebno je oko 45 – 60 sekundi za pravilnu hibridizaciju na DNK matricu. Odabir pravilne temperature *annealinga* je kritičan za uspješnu PCR reakciju. U slučaju previsoke temperature *annealinga*, dešava se da prajmeri ne hibridiziraju za matricu uspješno, čineći tako mali ili nikakav prinos PCR reakcije, a u slučaju niske *annealing* temperature dešava se nespecifična hibridizacija prajmera, koja rezultira u amplifikaciji nepoželjnih «ne-ciljnih» dijelova DNK matrice. Optimalna temperatura *annealinga* se postiže serijom jednakih PCR reakcija, gdje je jedina varijabla 2 °C – 10 °C različita temperatura *annealinga*, odnosno 2 °C – 10 °C niža temperatura od izračunate “*melting*” temperature oba prajmera (gradijentni PCR).

Elongacija (ekstenzija) prajmera, odnosno DNK lanca se odvija na temperaturi od 72°C, što je optimalna temperatura (72 °C – 78 °C)

pogodna za aktivnost Taq polimeraze. Prije početka elongacije potrebna je hibridizacija prajmera zbog činjenice da se DNK polimeraza može vezati samo na dvostruki DNK lanac, a ne jednostruki DNK lanac, tako da se polimeraza vezuje za mjesta gdje su hibridizirali prajmeri na DNK matrici. Elongacija se uvijek odvija u 5' ka 3' smjeru DNK molekule. Smatra se da je vrijeme ekstenzije od 60 sekundi dovoljno za ekstenziju produkta od 2 kilobaze (2000 baza). U toku elongacije DNK lanca slobodni nukleotidi se vežu vodikovim vezama za matricu počevši od 3' kraja prajmera koji je već u prethodnom koraku PCR-a vezan za matricu. U isto vrijeme, Taq polimeraza povezuje nukleotide jonskim vezama čineći čvrste veze i novi PCR produkt. U toku prva dva ciklusa PCR-a, ekstenzija jednog prajmera se ne zaustavlja na komplementarnom mjestu drugog prajmera već se nastavlja i izvan te kritične tačke. Prva molekula čija je dužina određena prajmerima (ciljna sekvenca) se pojavljuje tek u trećem ciklusu PCR reakcije. Od tog ciklusa pa nadalje, broj ciljanih sekvenci raste eksponencijalno.

7.1.1. PCR ciklusi

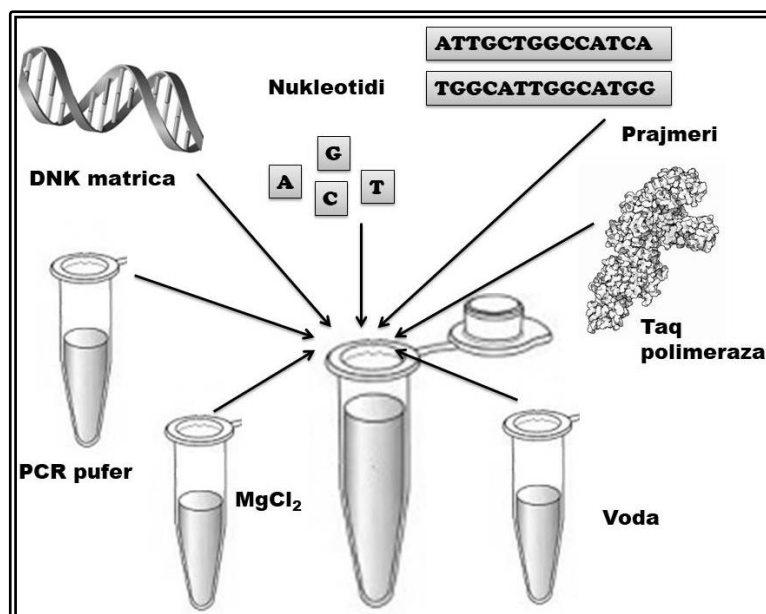
Broj PCR ciklusa koji su potrebni u jednoj PCR reakciji uvelike zavisi od dvije stvari: broja DNK molekula koje ulaze u PCR reakciju i potrebnog broja molekula PCR produkta nakon PCR reakcije. Teoretski, u slučaju da imamo 10^5 DNK molekula na početku PCR reakcije potrebo je 25 ciklusa da bi dobili dovoljno PCR produkta koji bi bio vidljiv na agaroznom gelu, u slučaju da imamo 10^4 DNK molekula, potrebno je 30 ciklusa, 10^3 molekula DNK potrebno je 35 ciklusa i u slučaju početnih 10^2 molekula DNK, bilo bi potrebno 40 ciklusa PCR reakcije. Pokazano je da je moguće dobiti PCR produkt od samo jedne DNK molekule, gdje bismo teorijski nakon 30 ciklusa PCR-a imali $2^{30} = 1\,073\,741\,824$ molekula PCR produkta. Maksimalni teorijski prinos PCR-a se može računati po formuli: $2^n \times y$ gdje bi n bio broj ciklusa a y broj početnih molekula DNK.

7.1.2. Komponente PCR reakcije

Uspješna PCR reakcija zavisi od mnogo faktora, kao što su denaturacija, temperatura *annealniga*, vrijeme elongacije, ali i koncentracije i količine komponenata koje čine PCR reakciju. Osnovne komponente koje su potrebne za uspješno izvođenje PCR reakcije su (Slika 16):

1. termostabilna DNK polimeraza,
2. oligonukleotidni prajmeri,
3. dezoksinukleotid trifosfati (dNTP),
4. PCR pufer,
5. Mg^{2+} ,
6. Voda,
7. DNK matrica.

Osim osnovnih komponenti PCR reakcije, može se nabrojati još nekoliko opcionalnih komponenti (koje se koriste kod posebno dizajniranih PCR reakcija) kao što su deterdženti, različite soli, različiti proteini, glicerol, želatin, 2-merkaptoetanol, BSA i slično.



Slika 16. Komponente PCR reakcije

7.1.2.1. Termostabilna DNK polimeraza

Prva polimeraza korištena u PCR reakcijama je bila DNK polimeraza iz *E.coli*, koja je bila termolabilna polimeraza i njeno korištenje je prestalo otkrićima termostabilnih polimeraza zbog same praktičnosti PCR reakcije. Dok se koristila polimeraza izolirana iz *E.coli*, male količine polimeraze su morale biti dodavane prije svakog ciklusa, odnosno koraka elongacije, jer bi se prethodno dodata polimeraza denaturisala u stepenu denaturacije u PCR reakciji. Danas postoji više poznatih termostabilnih polimeraza koje se koriste u PCR reakciji, no najpoznatija je *Taq* polimeraza koja se rutinski koristi u većini PCR reakcija. Ova polimeraza je izolirana iz bakterije toplinskih vrela *Thermus aquaticus* U rutinskim PCR reakcijama, koristi se od 0.5 do 2.5 jedinica polimeraze na 25 – 50 µl volumena PCR reakcije.

7.1.2.2. Oligonukleotidni prajmeri

Oligonukleotidni prajmeri ili početnice su bitna komponenta PCR reakcije. Bez ove komponente nije moguće uspješno amplificirati ciljenu sekvencu DNK. Prajmeri utiču na efikasnost i specifičnost PCR reakcije, te je njihov pravilan dizajn krucijalan za uspješnu PCR reakciju. Osnovna činjenica koja treba biti poštovana pri dizajnu prajmerskih parova je da prajmeri moraju biti dovoljno dugi da imaju jedinstvenu sekvencu koja će omogućiti amplifikaciju samo ciljanog regiona DNK – ciljane sekvence. Najčešći prajmeri koji daju dobar odnos između specifičnosti i efikasnosti su dugi od 20 do 30 baza. Struktura baza u prajmerima je također značajna, i optimalni prajmeri imaju sekvencu u kojoj su jednako zastupljene sve baze, heterogeno. Ne bi trebalo odabrati prajmere koji imaju visoko repetitivne motive kao npr. 5` - ATCATCATCATC - 3`, ili jednostavne sekvence prajmera kao npr. 5` - GGGGGGGGGG - 3`. Prajmeri ne bi trebali biti homologni nepoželjnim sekvencama kao što su repetitivne sekvence genomske DNK ili mitohondrijalna DNK. Osim toga, ne bi trebali biti komplementarni unutrašnjoj sekvenci, naročito 3` kraj prajmera, a trebalo bi izbjegavati i

komplementarnost 3' krajeva prajmerskih parova, jer je u tom slučaju velika mogućnost pojave prajmer dimera, odnosno artefakata PCR reakcije (prajmer – dimer je poseban amplifikat PCR reakcije gdje se komplementarno vežu prajmerski parovi jedan za drugi čineći nepoželjne nespecifične PCR produkte). Prjmer – dimeri se većinom mogu javiti u multiplex PCR reakcijama (PCR reakcija koja u svom sastavu ima više parova prajmera i više očekivanih ciljanih sekvenci), zbog prisutnosti više različitih prajmera u PCR reakciji. Danas je poznato više kompjuterskih programa kao što su *Primer3* (Primer3, *Whitehead Institute for Biomedical Research*), *Oligo Primer Analysis Software* (*Molecular Biology Insights, Inc*) ili *Primer Premier* (*Premier Biosoft*). U rutinskoj PCR reakciji obično koncentracija PCR prajmera bude oko 10 – 20 μM , a stavlja se od 1 – 2,5 μl u reakciji od 50 μl .

7.1.2.3. Dezoksinukleotid trifosfati

Dezoksinukleotid trifosfati (skraćeno nazvani nukleotidi) su osnovni gradivni elementi PCR reakcije. Bez nukleotida u PCR reakciji ne bismo mogli dobiti amplifikat na kraju reakcije. Nukleotidi se ugrađuju u nove lance DNK molekule u trećoj fazi ciklusa PCR-a – u fazi elongacije nukleotidnog lanca. Nukleotidi se u PCR reakciju mogu dodavati u mješavini sva četiri nukleotida (dATP, dGTP, dCTP i dTTP) ili pojedinačno, mada je uvriježen način dodavanja dNTP-ova u PCR reakciju dodavanje u mješavini sva 4 nukleotida. U bilo kojem slučaju jedan od najvažnijih parametara PCR reakcije koji se veže za dNTP-ove je količina dNTP-ova u PCR reakciji. Smatra se da je potrebno oko 800 μM mješavine nukleotida za proizvodnju 13 μg DNK u reakciji od 50 μl . Bitno je također da koncentracija i količina svakog od nukleotida bude tačno jednaka ostalim nukleotidima. Također je poznato da su dezoksinukleotid trifosfati otporni na zagrijavanje te su kao takvi pogodni za korištenje u PCR reakciji.

7.1.2.4. PCR pufer

PCR pufer se koristi u PCR reakciji u svrhu postizanja optimalnih uslova za odvijanje ove reakcije. Osim što se koristi kao medij u kome su otopljene sve ostale komponente PCR reakcije, također

se koristi i za regulaciju pH PCR reakcije te koncentracije soli u reakciji. pH potrebna za optimalan rad Taq polimeraze je 7,0-7,5 na 72°C. Za postizanje ove pH uglavnom se koristi Tris. U PCR puferima se mogu naći i razni deterdženti kao što su Triton X-100 ili Tween-20 za stabilizaciju Taq polimeraze u PCR reakciji. Osim Trisa i deterdženata, mogu se naći i ostale komponente kao što su 2-merkaptoetanol ili ditriotreitol za stabilizaciju proteina, zatim želatin, glicerol ili GSA (goveđi serum albumin).

7.1.2.5. Mg^{2+}

Mg^{2+} joni se nalaze u PCR reakciji posredstvom magnezij hlorida koji se obavezno dodaje u svaku PCR reakciju. Ovi joni se ponašaju kao aktivatori Taq polimeraze, i potrebni su Taq polimerazi za nastavak njene aktivnosti u PCR reakciji. Mg^{2+} joni također utiču i na hibridizaciju prajmera za DNK matricu, i u pravilu, njihova koncentracija je uvijek viša od koncentracije nukleotida za nekoliko milimola.

7.1.2.6. *Voda*

Voda u PCR reakciji služi kao medij u kome su otopljene sve komponente PCR reakcije i kao stabilizator cijele PCR reakcije.

7.1.2.7. *DNK matrica*

DNK matrica je također osnovna komponenta PCR reakcije. Nakon izolacije, DNK se uglavnom resolubizira u čistoj destilovanoj dejoniziranoj vodi ili u TE puferu. Na uspješnost PCR reakcije ne utiče čistoća ili degradiranost DNK matrice. Koncentracije DNK koja se stavlja u PCR reakciju ne treba biti prevelika, najčešće je dovoljno od 20 – 100 ng DNK za uspješnu amplifikaciju. Veća koncentracija DNK matrice može zagušiti PCR reakciju, odnosno onemogućiti uspješnu amplifikaciju PCR produkta od interesa.

Osim osnovnih komponenti PCR reakcije, može se nabrojati još nekoliko opcionalnih komponenti (koje se koriste kod posebno dizajniranih PCR reakcija) kao što su deterdženti, različite soli, različiti proteini, glicerol, želatin, 2-merkaptoetanol, BSA i slično.

7.2. REAL-TIME PCR

U doba razvoja PCR reakcije, ova reakcija je predstavljala *end-point* PCR analizu, što označava analizu amplificiranog fragmenta DNK molekule nakon same amplifikacije, gdje je za samu analizu spomenutog fragmenta potrebno koristiti neke druge metode kao što je horizontalna gel elektroforeza na agaroznom gelu u slučaju neobilježenih prajmera ili genotipizacija na sekvenceru u slučaju fluorescentno obilježenih prajmera. U novije vrijeme razvile su se i druge metode razdvajanja i analize PCR produkta amplifikacije kao što je npr. bioanalizator (*Agilent 2100 Bioanalyser*) koje se također baziraju na elektroforetskom razdvajanju različitih veličina DNK molekule, no u drugačijem mediju i na drugačijem principu nego što je gel elektroforeza na agaroznom gelu. Ova tehnika je do sada ostala najkorištenija tehnika za analizu *end-point* PCR reakcija.

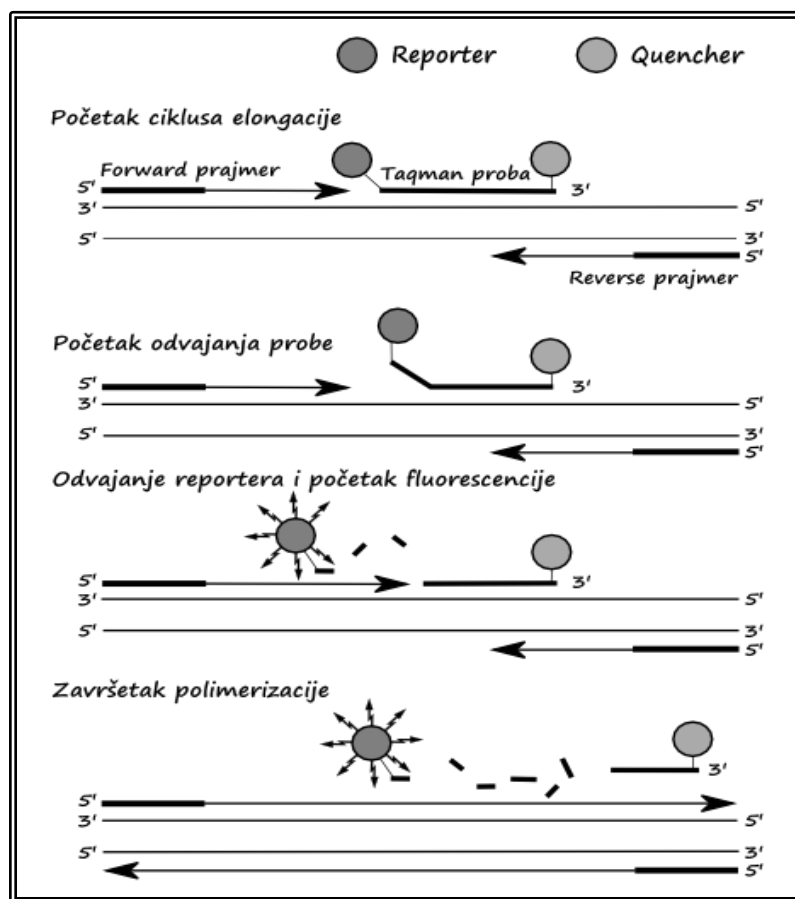
Osnovni problem *end-point* PCR reakcije je u tome što je kvantifikacija PCR produkta nakon amplifikacije komplikovana i nedovoljno precizna, te se nije moglo tačno odrediti količina PCR produkta. Osnovna analiza nakon konvencionalne PCR reakcije je plus/minus esej, gdje analiza označava očitavanje prisutnosti ili odsutnosti PCR amplifikacije fragmenta DNK molekule.

Real-time PCR prati amplifikaciju PCR produkta u realnom vremenu uz pomoć određenih fluorogenskih reportera. Reporteri mogu biti različiti, a dva najpoznatija reportera su *SYBR green* koji je ustvari fluorescentna boja koja se interkalarno veže za DNK molekulu i *TaqMan* sistem proba.

7.2.1. TAQMAN sistem proba

TaqMan sistem proba se sastoji od oligonukleotidne probe koja je komplementarna određenom dijelu DNK od interesa, reporter boje na 5` kraju i *quencher* boje na 3` kraju. Također u *TaqMan* sistem proba ulaze i PCR prajmeri za određeni dio DNK od interesa. *Quencher* boja služi za apsorpciju fluorescencije reporter boje kada proba nije komplementarno vezana za DNK molekulu.

Temperatura vezivanja *TaqMan* probe za DNK molekulu je za 10 stepeni viša od temperature vezivanja prajmera, te se sama proba veže tek u ciklusu elongacije DNK lanca, nakon hibridizacije prajmera na DNK molekulu. U slučaju da se *TaqMan* proba komplementarno veže za DNK molekulu, u ciklusu ekstenzije *Taq* polimeraza hidrolizacijom odstranjuje reporter i quencher probu te se fluorescencija reporter probe pojačava u svakom ciklusu nakon vezivanja probe za DNK molekulu (Slika 17). Pošto je povećanje florescencije u korelaciji sa povećanjem broja PCR produkta u reakciji možemo odrediti tačnu količinu PCR produkta u toku i nakon amplifikacije.



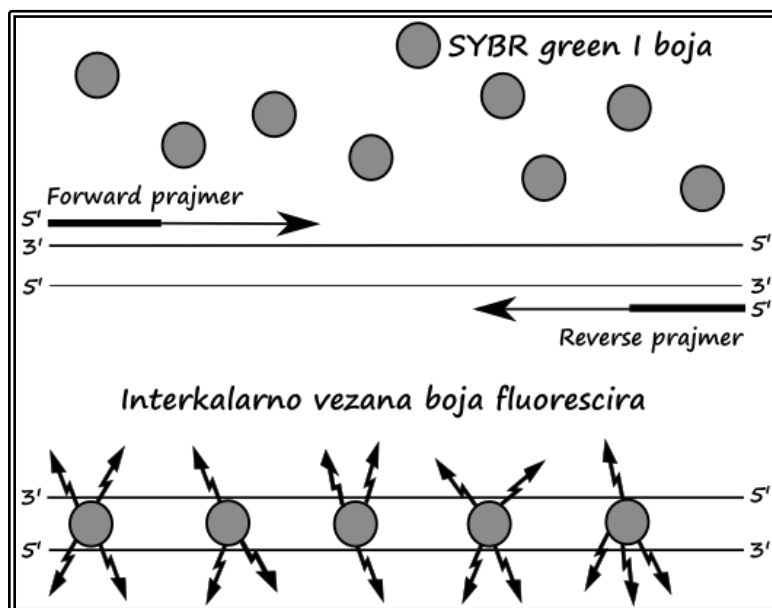
Slika 17. Princip *TaqMan* reakcije

Najčešća reporter boja koja se koristi kod *TaqMan* sistema je 5-FAM (6-carboxyfluorescein) boja (520 nm), a mogu se koristiti i

TET (*tetrachloro-6-carboxyfluorescein*) (536 nm), JOE (*2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein*) (555 nm), HEX (*hexachloro-6-carboxyfluorescein*) (554 nm), VIC (554 nm) i još neke druge boje. Najčešća *quencher* boja koja se koristi kod *TaqMan* sistema je TAMRA (*6-carboxy-tetramethylrhodamine*) (583 nm). *Quencher* ne mora biti boja, nego može biti i *non-fluorescent quencher* (NFQ) na čijem kraju je MBG (*minor binding groove*) molekula koja stabilizuje DNK molekulu tako što se veže za mali utor (*minor groove*) na DNK molekuli i omogućava korištenje dužih i više specifičnih *TaqMan* proba.

7.2.2. SYBR GREEN

Druga metoda koja se najčešće koristi u *real-time* PCR tehnologiji je interkalarno vezivanje fluorescentnih boja za DNK molekulu. Postoji više fluorescentnih boja koje se interkalarno vezuju za DNK molekulu kao što su etidijum bromid, *SYBR green I*, te od novijih interkalarnih boja možemo spomenuti BEBO i BOXTO boje, koje se vežu za mali utor molekule DNK. Princip korištenja fluorescentnih boja koje se interkalarno vežu za mali utor DNK molekule počiva na činjenici da se boja može vezati samo za dvolančanu molekulu DNK, odnosno novonastali PCR produkt u PCR reakciji te da ova boja emituje fluorescenciju samo kada je vezana za mali utor dvolančane DNK molekule. U tom slučaju se sa svakim ciklusom PCR reakcije i eksponencijalnim umnožavanjem PCR produkta shodno tome eksponencijalno uvećava i fluorescencija koju *real-time* PCR aparat očitava u nekom dijelu ciklusa PCR reakcije, u zavisnosti gdje je zadato očitavanje, a najčešće u procesu elongacije DNK molekule (Slika 18).

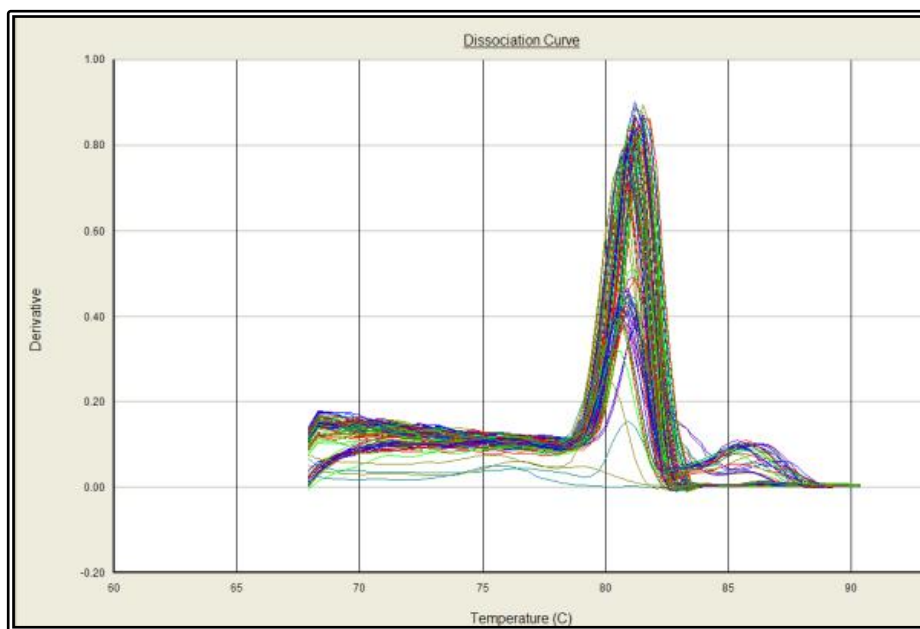
Slika 18. Princip *SYBR green* reakcije

Real-time SYBR green I PCR ima nekoliko nedostataka i prednosti u odnosu na *TaqMan* sistem proba. Najveća prednost *SYBR green I* PCR sistema je u tome što se može koristiti bilo koji par prajmera u ovoj metodi, s tim da prajmeri ne moraju biti prilagođeni *real-time* PCR tehnologiji. Također, sama metoda je dosta robusnija i finansijski isplativija od *TaqMan* sistema proba.

Nedostatak ove metode se vezuje na prednost, jer je metoda manje specifična od *TaqMan* proba koje su uskospecifično vezane za određeni dio DNK molekule od interesa. Zbog toga, potrebno je uraditi *melting curve* analizu nakon *real-time* PCR-a sa *SYBR green I* interkalarnom bojom.

Melting curve analiza (disocijaciona kriva) (Slika 19) je obavezna odmah nakon završetka *real-time SYBR green* PCR-a, te ako se ne provede, rezultati ne mogu biti pravilno očitani, odnosno ova analiza predstavlja internu kontrolu kod ove metode. *Melting curve* analiza se izvodi tako što se temperatura u PCR aparatu povećava postepeno (za 1 stepen) od 60 do 95 stepeni celzijusa, pri čemu se bilježi nivo fluorescencije. Na nižim temperatura fluorescencija *SYBR green*a je niska, dok se postepeno povećava dok ne dostigne

najvišu vrijednost na temperaturi topljenja prajmera (*primer melting temperature*) nakon čega gradualno otpada. Pri završetku disocijacije može se primijetiti pik na temperaturi topljenja određenog prajmerskog para, odnosno, ovom dodatnom metodom moguće je identifikovati više prajmerskih parova, odnosno primer-dimera te je moguće uraditi kontrolu reakcije.

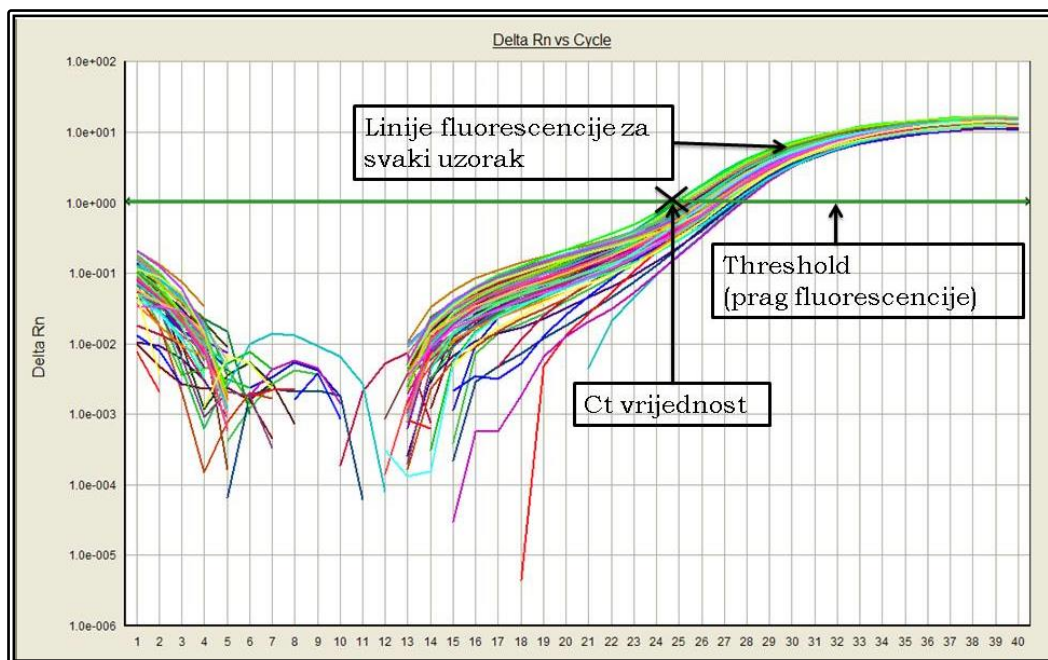


Slika 19. Disocijaciona kriva

Postoji više metoda analize rezultata *real-time* PCR-a: apsolutna kvantifikacija, relativna kvantifikacija (komparacija Ct ili Pfaffl metoda) te plus/minus esej.

Svaka od ovih metoda se bazira na nivou fluorescencije koju očitava PCR aparat u toku PCR reakcije. S obzirom da je u prvih 3-15 ciklusa PCR-a fluorescencija zanemarljivo mala, a nakon toga eksponencijalno raste pri svakom ciklusu, postoji bazna linija (*baseline*) i prag fluorescencije (*threshold*) (Slika 20). Prag fluorescencije se može odrediti automatski putem pre-instaliranog softvera ili se može odrediti manualno gdje se treba voditi računa o visini bazne linije i veličini eksponencionalnog rasta krivulje te lag faze krivulje gdje već dolazi do disocijacije prajmera u PCR reakciji. Nakon određivanja praga fluorescencije, trenutak u

kojem je fluorescencija prešla taj prag naziva se Ct vrijednost. Ova Ct vrijednost je osnov pomenutih analiza rezultata *real-time* PCR-a.



Slika 20. Amplifikacija na *real-time* PCR aparatu s predstavljenim *threshold* i Ct linijama

Kod apsolutne kvantifikacije, osim Ct vrijednosti potrebno je imati i seriju standarda poznate DNK odnosno RNK koncentracije koji se podvrgavaju istim uslovima kao i uzorci nepoznate koncentracije. Nakon završenog PCR-a preračunava se standardna kriva putem serije standarda te se koncentracije uzoraka izračunavaju putem standardne krive.

Relativna kvantifikacija ne daje tačan broj molekula, već odnos između dva nepoznata uzorka. Kod relativne kvantifikacije potrebno je imati *housekeeping* gen (npr. β -aktin, GAPDH i slično) koji se koristi pri normalizaciji uzoraka. Relativna kvantifikacija se računa putem $2^{-\Delta\Delta Ct}$ gdje je $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{uzorak1(vrijeme\ 1)} - \Delta Ct_{uzorak2(vrijeme\ 2)}$ a ΔCt označava formulaciju $Ct_{target\ gen} - Ct_{housekeeping\ gen}$. Pored komparacije Ct, relativnu kvantifikaciju

moguće je izračunati i putem Pfaffl metode koja osim komparacije Ct uzima u obzir i efikasnost *real-time* PCR reakcije.

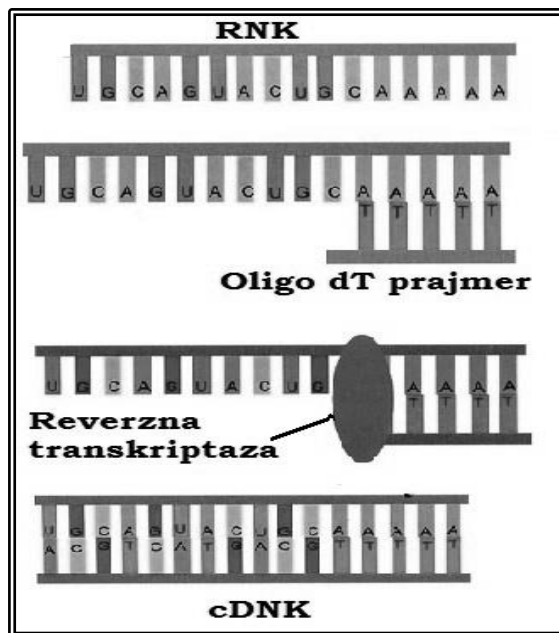
Plus/minus esej je najjednostavnija metoda analize *real-time* PCR-a, jer u ovom slučaju nije potrebno kvantificirati uzorak nego je potrebno samo odrediti da li je PCR produkt prisutan ili ne, što je vrlo slično *end-point* PCR-u, no povećana specifičnost i senzitivnost ove metode, te kraće vrijeme izvođenja i manje *hands-on time*, odnosno manipuliranje materijalom opravdavaju korištenje *real-time* PCR metode u plus/minus esejima.

7.3. REVERZNA TRANSKRIPCIJA – RT PCR

Reverzni PCR (RT PCR) je jedna od najčešće korištenih tehnika PCR. Koristi se u određivanju niskog nivoa genske ekspresije preko analize PCR produkta cDNK. Teoretski, jedna molekula iRNK bi mogla biti umnožena, ali praktično je to veoma teško postići. U pomenutom procesu početni korak je kopiranje iRNK posredstvom reverzne transkriptaze. PCR prajmeri su onda korišteni kao i u standardnoj PCR reakciji. Reverzna transkripcija je proces sintetiziranja DNK preko matrice RNK uz prisustvo katalizatora enzima reverzne transkriptaze.

Za sintezu cDNK potrebni su prajmeri, nukleotidi i reverzna transkriptaza, te matrica iRNK. Najčešće korištene reverzne transkriptaze su MMLV - RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) i AMV-RT (*Avian Myoblastosis Virus Reverse Transcriptase*). Postoje tri tipa prajmera koji se koriste u konstruisanju cDNK: random prajmeri, oligo (dT) prajmeri i gen specifični prajmeri. Random prajmeri ili random heksanukleotidi sadrže kratki niz (6-10 baza) deoksinukleotida u slučajnom rasporedu koji se vežu za iRNK molekulu u slučajnom rasporedu te na taj način iniciraju sintezu komplementarnih polulanaca na više mjesta istovremeno. Oligo (dT) prajmeri sadrže kratki niz (12-18 baza) timinskih oligonukleotida koji hibridiziraju sa iRNK poliadenilnim repom. Gen specifični prajmeri su kratki nizovi deoksinukleotida sintetiziranih u sekvenci komplementarnoj

određenom genu. Ovi prajmeri povećavaju detekciju *single-copy* ili *low-copy* gena (Slika 21).



Slika 21. Shematski prikaz RT-PCR

Oligo (dT) prajmer se veže za poliadenilni rep, a zatim uz prisustvo nukleotida i reverzne transkriptaze stvara komplementarni lanac cDNK. Zatim se dodaje oligo (dG) prajmer koji sa nukleotidima i reverznom transkriptazom daje drugi lanac cDNK.

Svaka molekula iRNK predstavlja direktan “produkt” jednog gena. β -aktin gen (ACTB – gen) je ubikvitaran gen, dakle, sveprisutan je u ćelijama, te se uzima kao relevantna vrijednost za kontrolu izolacije RNK i dobijanja cDNK. Pošto je sekvenca za pomenuti gen poznata, moguće je izvršiti amplifikaciju ovog gena. Pozitivna amplifikacija tj. dobijeni PCR produkt direktna je mjera kvaliteta i kvantiteta cDNK.

PCR analiza fuzijskih gena je bazirana na dizajnu oligonukleotidnih prajmera na suprotnim stranama fuzijskih regiona tako da PCR produkt sadrži tumor-specifične fuzijske

sekvence. Za detekciju fuzijskih gena potrebna je RNK kao početna matrica za RT PCR.

Reverzna transkripcija je proces sinteze dvolančanih DNK struktura (komplementarna DNK - cDNK) *in vitro* u prisustvu enzima reverzne transkriptaze, gdje se kao matrica koristi informaciona RNK. Komplementarna DNK dalje služi kao matrica u standardnoj lančanoj reakciji polimerizacije koja se označava kao reverzni PCR (RT-PCR). Umnožavanjem ishodišne sekvence moguće je vršiti dalju analizu transkripata, kao što je kvalitativna - analiza genske strukture ili prisustva ekspresije i kvantitativna - utvrđivanje broja kopija tj. intenziteta ekspresije. RT-PCR povezuje reverznu transkripciju iRNK matrice i PCR amplifikaciju analiziranog gena i omogućava otkrivanje prisutnosti transkripta, procjenu nivoa ekspresije i kloniranje cDNK produkata bez pravljenja banke gena.

Za identifikaciju fuzijskih gena u određenom uzorku koristi se nested PCR. Nested PCR je metoda u kojoj se koriste dva (ponekad i četiri) seta PCR prajmera za amplifikaciju jednog lokusa. Prvi set prajmera amplificira određeni lokusa kao i u konvencionalnom PCR. Drugi set prajmera (nested prajmeri) se vežu za produkt iz prvog PCR-a i produciraju sekundarni produkt koji je kraći od primarnog produkta.

Nakon PCR reakcije potrebno je izvršiti identifikaciju PCR produkata na agaroznom gelu. Pored samog kontrolnog i nested produkta potrebno je imati pozitivnu i negativnu probu te veličinski marker posredstvom kojeg možemo odrediti tačnu veličinu PCR produkta od interesa.

Ova metoda se često koristi i pri inicijalnoj dijagnozi i pri praćenju minimalne rezidualne bolesti. Metoda je visoko senzitivna te većina stručnjaka smatra da je bolje koristiti ovu metodu nego FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*), jer je senzitivnija od te metode. Međutim, ovom metodom se može odrediti samo da li je pacijent pozitivan ili negativan na određenu

translokaciju, a ne i trend kretanja malignih ćelija u krvi ili koštanoj srži.

SPECIFIČNE PCR METODE

8.1. PCR-RFLP (*RESTRICTION FRAGMENT LENGHT POLYMORPHISM* PCR)

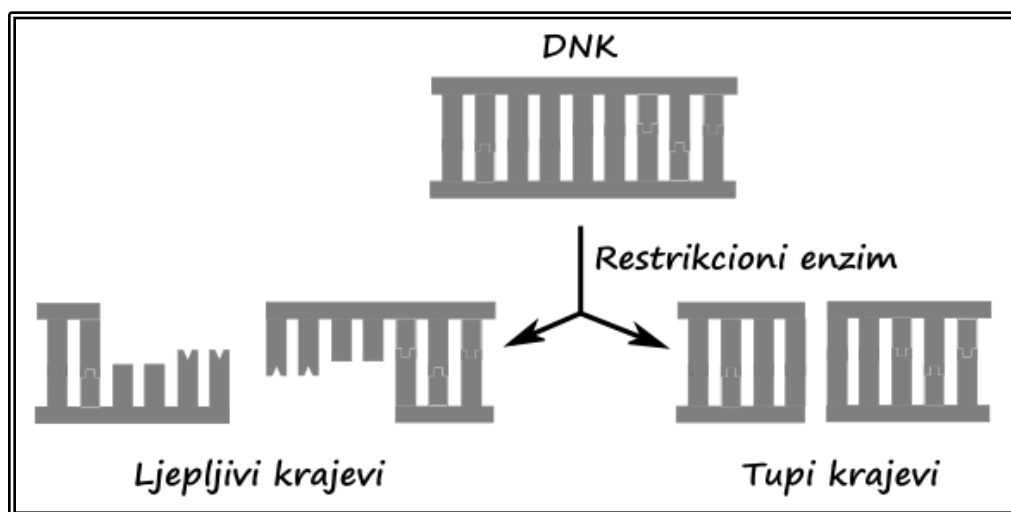
Jedna od prvih korištenih analiza za detekciju mutacionih mjesta je RFLP (*Restriction Fragment Lenght Polymorphism*) analiza. Ova metoda se bazira na upotrebi restrikcijskih enzima, odnosno restrikcijskih endonukleaza.

Restrikcijski enzimi su otkriveni kod bakterija i Archaea. Prvi put se spominju 1952. godine kao enzimi kojima se bakterije brane od bakteriofaga i u tom obliku su bili nazivani *host-induced variations*. Smatra se da su bakterije evolucijski razvile mehanizam za odbranu od bakteriofaga i virusa tako što su selektivno rezale stranu DNK u procesu restrikcije, dok je DNK bakterije domaćina bivala sačuvana od restrikcionih endonukleaza procesom metilacije od strane metilaza u bakterijskoj ćeliji. Nažalost, restrikcioni enzimi koji su otkriveni u ovom slučaju nisu bili od pomoći u standardnim tehnologijama otkrića mutacija, naime oni pripadaju sada poznatim restrikcionim endonukleazama tipa I koje cijepaju DNK nespecifično te se ne mogu koristiti za kloniranje i molekularne modifikacije. Tek 1970. godine su otkrivene restrikcione endonukleaze koje cijepaju DNK molekulu uvijek na tačno određenim mjestima, te su pogodne za otkrivanje mutacija na tačno određenim mjestima u genomu. *Smith* i *Wilcox* su tada otkriveni enzim nazvali endonukleaza R, koja je otkrivena kod bakterije *Haemophilus influenzae*.

Klasifikacija i imenovanje restrikcionih enzima su predloženi 1973. godine, a do danas su pretrpili nekoliko izmjena i dopuna. Svaki restrikcioni enzim u svom nazivu nosi ime, rod i bakterijsku liniju, tako npr. restrikcioni enzim *EcoRI* je izolovan iz bakterije *Escherichia coli* linije RY13. Do danas je poznato oko 3500 restrikcionih endonukleaza.

8.1.1. NOMENKLATURA RESTRIKCIONIH ENDONUKLEAZA

Svaki od restrikcionih enzima ima posebno mjesto prepoznavanja (*recognition site*), koje predstavlja specifična sekvenca nukleotida DNK molekule, najčešće u slijedu 4 - 8 nukleotida. Restrikcioni enzimi cijepaju veze između šećera dezoksiriboze i fosfatne grupe na oba lanca DNK molekule. Restrikcioni enzimi nakon cijepanja DNK molekule mogu ostaviti dvije vrste krajeva, to su ljepljivi (*sticky*) krajevi i tupi (*blunt*) krajevi (Slika 22). Koji tip krajeva će ostaviti restrikciona endonukleaza zavisi od mjesta prepoznavanja i mjesta cijepanja određene restrikcione endonukleaze.



Slika 22. Ljepljivi i tupi krajevi nakon presijecanja DNK od strane restrikcionih endonukleaza

Osnovna RFLP tehnika je korištena prije upotrebe PCR tehnologije na genomskoj DNK, gdje je određeni restrikcioni enzim apliciran direktno na izolovanu DNK molekulu bez prethodne pripreme i umnožavanja specifičnog DNK fragmenta putem PCR reakcije. U tom slučaju je sama specifičnost RFLP tehnike bila dosta niža nego danas kada se restrikcioni enzimi apliciraju na PCR amplifikat dijela DNK molekule od interesa.

PCR-RFLP označava tehniku rezanja PCR produkta od interesa sa restrikcionim endonukleazama, te je zapravo spoj između PCR i RFLP tehnike.

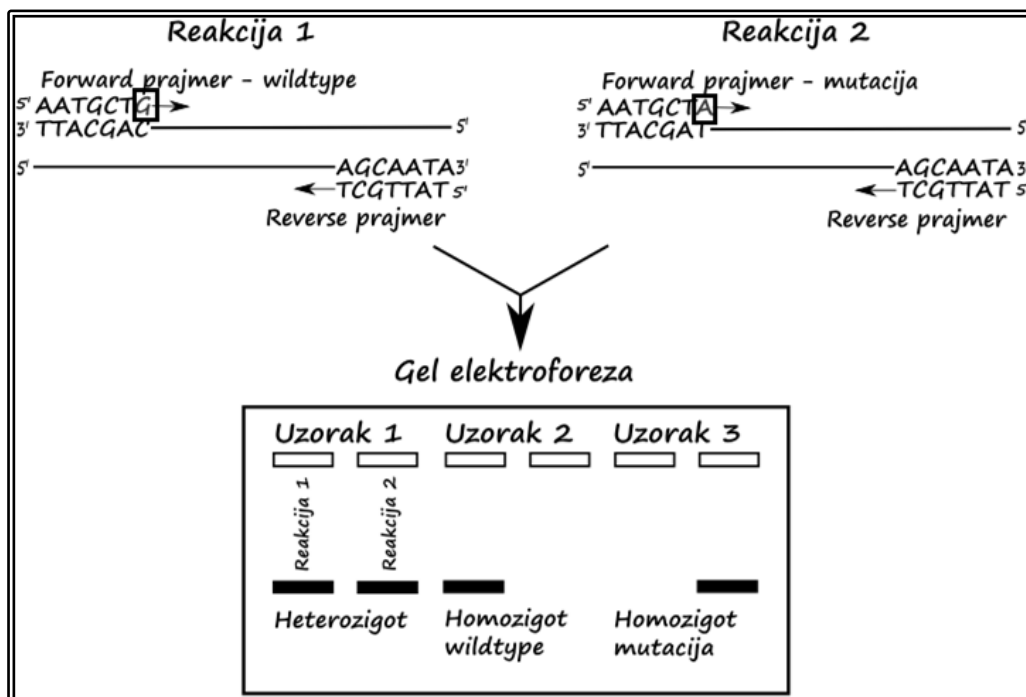
8.2. ASA PCR (*ALLELE SPECIFIC AMPLIFICATION PCR*)

Potreba za jednostavnom i brzom detekcijom tačkastih mutacija i SNP-ova (*Single Nucleotid Polymorphisms*) je od samog otkrića PCR reakcije zanimala naučnike koji su se bavili ovim tehnologijama. U toku 80-ih godina 20. vijeka otkrivena je tehnika koja je omogućavala upravo vrlo jednostavno i brzo otkrivanje tačkastih mutacija, koja je poznata pod nazivima ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*), PASA (*PCR Amplification of Specific Alleles*), AS-PCR (*Allele Specific PCR*) ili ASA PCR (*Allele Specific Amplification PCR*). Ova tehnika se danas koristi u brojnim laboratorijama rutinski jer ne zahtjeva skupo obilježavanje proba fluorescentnim ili radioaktivnim bojama niti korištenje drugih aparata osim bazičnog PCR aparata. Također, većina poznatih SNP-ova se može detektovati pomoću ASA PCR metode.

Princip ASA PCR tehnike se zasniva na činjenici da je DNK amplifikacija potpuno neefikasna ako postoji nekomplementarnost na 3' kraju prajmera prema DNK matrici. Pošto je za uspješnu PCR reakciju potrebna potpuna komplementarnost prajmera sa matricom na 3' kraju da bi Taq polimeraza mogla djelovati u PCR reakciji, ovom tehnikom se može diskriminirati mutacija ili polimorfizam na DNK matrici. Kod ASA PCR tehnike se koriste tri prajmera umjesto dva (dva *forward* prajmera i jedan *reverse* prajmer), *forward* prajmer koji je potpuno komplementaran *wildtype* alelu, drugi *forward* prajmer koji je potpuno komplementaran mutantnom alelu i jedan *reverse* prajmer koji se koristi u oba slučaja (Slika 21).

Reakcija se može izvoditi u jednoj ili dvije tubice. U slučaju da želimo raditi protokol u jednoj tubici, *forward* prajmeri moraju biti obilježeni na neki način (najčešće različitim fluorescentnim bojama, jer je veličina fragmenta koji se amplificira u zadanoj PCR reakciji ista i za mutanti alel i za *wildtype* alel. U slučaju da ne želimo prajmere obilježavati, protokol se mora izvoditi u dvije tubice i to tako da ćemo u jednu dodati *forward* prajmer koji je komplementaran *wildtype* alelu i *reverse* prajmer, a u drugu

forward prajmer koji je komplementaran mutantnom alelu i *reverse* prajmer (Slika 23). Na taj način u slučaju da je individua *wildtype* homozigot (odnosno ima obje kopije *wildtype* alela) dobićemo amplifikaciju samo u tubici s *wildtype* prajmerom, u slučaju da je osoba heterozigot (posjeduje i *wildtype* i mutantni alel) imaćemo amplifikaciju u obje tubice, a ako je individua homozigot s mutacijom (ima obje kopije mutantnog alela) imaćemo amplifikaciju samo u tubici s prajmerom koji je komplementaran mutantnom alelu.



Slika 23. Princip ASA PCR reakcije

Kao i svaka druga tehnika, ASA PCR ima svoje prednosti i nedostatke. Prednost ASA PCR tehnike je u njenoj jednostavnosti i mogućnosti preciznog otkrivanja tačkastih mutacija i polimorfizama, kao i u tome što ova tehnika ne zahtjeva rad sa sofisticiranim aparatima te nije radioaktivna niti zahtjeva posebno obilježavanje prajmera. Nedostatak je u tome što je ova tehnika pogodna samo za već poznate polimorfizme i tačkaste mutacije, te što je neprilagođena za veliki protok uzoraka, kada se

ova tehnika treba kombinirati sa nekim drugim tehnikama kao što je *real-time* PCR ili sekvenciranje.

8.3. MLPA (*MULTIPLEX LIGASE-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION*)

MLPA omogućava formiranje kopija do 45 nukleotidnih sekvenci u jednoj reakciji, pri čemu kao matricu može koristiti i DNK i iRNK. U reakciji se koristi jedan par prajmera, te reakcija rezultira u reproducibilnim gel paternima, sa fragmentima veličine od 100 do 500 bp. Preteča ove metode je MAPH – *Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation*, koja za razliku od oligonukleotidnih proba koristi specifične sekvence nukleinskih kiselina, te zbog toga zahtijeva imobilizaciju nukleinskih kiselina i ispiranje nehibridiziranih proba. Imobilizacija i ispiranje nije slučaj kod MLPA reakcije, koja je zbog toga dosta jednostavnija, zahtijeva manje vremena za izvođenje reakcije i ekonomski je pristupačnija. MLPA probe mogu razlikovati sekvence koje se razlikuju u samo jednom nukleotidu. Prvi korak u ovoj metodi je denaturacija genomske DNK i hibridizacija proba, a zatim kao drugi korak slijedi ligacija hibridiziranih proba. Treći korak je PCR amplifikacija, nakon koje slijedi gel elektroforeza na sistemu za sekvenciranje. Posljednji korak je obrada podataka uz pomoć jednog od specijalizovanih programa za MLPA analize, ili pak MS Excel programa. Pri korištenju ove metode moguće je detektovati tačkaste mutacije (u slučaju da se nalaze na mjestu hibridizacije i ligacije oligonukleotidnih proba) te velike genomske delecije, duplikacije i rearanžmane.

MLPA – *Multiplex Ligase – dependent Probe Amplification* je metoda kojom se detektuje aberantni broj kopija većeg broja specifičnih sekvenci nukleinskih kiselina u samo jednoj PCR reakciji, koristeći jedan prajmerski par. Razvila ju je kompanija MRC-Holland, a prvi put je opisana 2002. godine. Kod obične multipleks PCR reakcije potreban je poseban prajmerski par za svaki fragment koji želimo amplificirati. Kod MLPA, upotrebljava se samo jedan prajmerski par za sve fragmente koje želimo

amplificirati jer se detekcija specifične sekvence koja sadrži mutaciju bazira na hibridizaciji probe sa univerzalnim PCR produktom. U metodi baziranoj na MLPA optimiziranoj za karakterizaciju BRCA1 gena, vrši se simultana hibridizacija s 34 različitih fluorescentno označenih proba koje hibridiziraju sa DNK matricom. Iako je validizirana, MLPA ima svoje prednosti i nedostatke, od kojih će biti navedene sljedeće:

Prednosti MLPA analize

- moguće je detektovati do 45 DNK sekvenci u jednom uzorku, te se može koristiti za različite aplikacije, npr. BRCA1 i BRCA2 gen, MSH2, DMD..., pri čemu se u različitim testovima razlikuju samo probe,
- reakcija bazirana na PCR multiplex reakciji,
- relativno jeftina analiza,
- visoko reproducibilna,
- potrebno je samo 20 ng humane DNK,
- moguće je koristiti lizat ćelija umjesto purificirane DNK,
- prepoznaje sekvence koje se razlikuju u samo jednom nukleotidu,
- rezultati se dobiju za 24 sata,
- potreban je samo termocikler (PCR mašina) i sistem za elektroforezu podešen za sekvencioniranje.

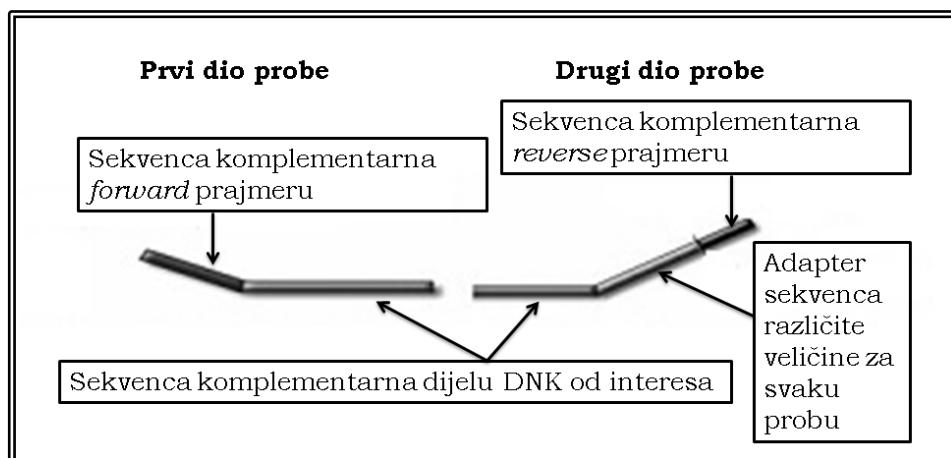
Nedostaci MLPA analize

- MLPA reakcije su osjetljivije na kontaminante (npr. PCR inhibitore) nego obične PCR reakcije,
- za razliku od FISH analize, MLPA se ne može koristiti za proučavanje pojedinačnih ćelija. MLPA analiza DNK uzoraka iz smjese ćelija će dati prosječni broj kopija po ćeliji,
- MLPA je metoda koja identificira genomske delecije/insercije, i nije pouzdan metod za detekciju nepoznatih tačkastih mutacija. Međutim, MLPA može pokazati poznatu tačkastu ili bilo koju drugu mutaciju, pošto se probe dizajniraju da mjesto ligacije bude tačno na mjestu tačkaste mutacije.

MLPA testovi su dizajnirani na način da je veličina svakog fragmenta jedinstvena kako bi se kao uzorak za analizu mogli koristiti DNK i RNK. Ova metoda sadrži elemente više tehnika koje se koriste u molekularnoj biologiji, a to su hibridizacija, ligacija, PCR i separacija fragmenata u elektroforetskom sistemu (genotipizacija). Sama tehnika nije posebno zahtjevna, ne iziskuje previše vremena i hemikalija, te je pogodna za razvijanje različitih dijagnostičkih testova. U principu, MLPA analiza se može podijeliti na 5 povezanih cjelina:

1. hibridizacija,
2. ligacija,
3. PCR reakcija,
4. separacija fragmenata na sekvenceru,
5. obrada podataka.

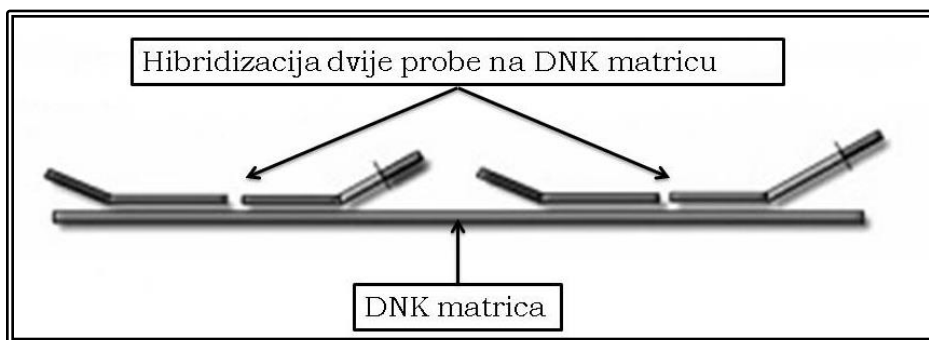
Pošto je za MLPA analizu potrebna jednolančana DNK da bi probe hibridizirale, potrebno ju je denaturisati, što se postiže zagrijavanjem uzorka na 95°C u trajanju od 5 minuta. Svaka od MLPA proba se sastoji od dva dijela: prvi dio je kratka oligonukleotidna sekvenca, a drugi dio je duga oligonukleotidna sekvenca derivirana iz M-13 faga (Slika 24).



Slika 24. MLPA proba

Kratka sekvenca sastoji se od target – specifične sekvence (21–30 bp) na 3' kraju i sekvence od 19 baznih parova koja je identična obilježenom PCR prajmeru na 5' kraju. Duga sekvenca sadrži target-specifičnu (25 – 43 bp) sekvencu na 5' fosforilisanom kraju, 36 baznih parova dugu sekvencu koja je komplementarna neobilježenom PCR prajmeru na 3' kraju, i adaptersku sekvencu koja je različite dužine u različitim probama, a nalazi se između ove dvije sekvence.

MLPA probe su visoko specifične, da čak i promjena u jednom nukleotidu (tačkasta mutacija) na hibridizacijskom mjestu uzrokuje nemogućnost vezanja probe za hibridizacijsko mjesto (Slika 25).



Slika 25. Hibridizacija MLPA proba na matricu

Ligacija dvaju dijelova određene probe (Slika 26) će se desiti samo u slučaju da su oba dijela hibridizirana za targetnu sekvencu. U slučaju da jedan dio probe ne hibridizira, ligacija neće biti moguća.



Slika 26. Ligacija dva dijela MLPA probe nakon hibridizacije

Nakon ligacije pristupa se PCR reakciji. Kao što je već rečeno, u MLPA reakciji se koristi samo jedan prajmerski par za amplifikaciju do 45 sekvenci u jednoj PCR reakciji, što je omogućeno samim dizajnom MLPA proba. Prajmerski par za sve SALSA kitove je:

SALSA *forward* primer (označen FAM bojom):
*GGGTTCCCTAAGGGTTGGA

SALSA *reverse* primer: GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA

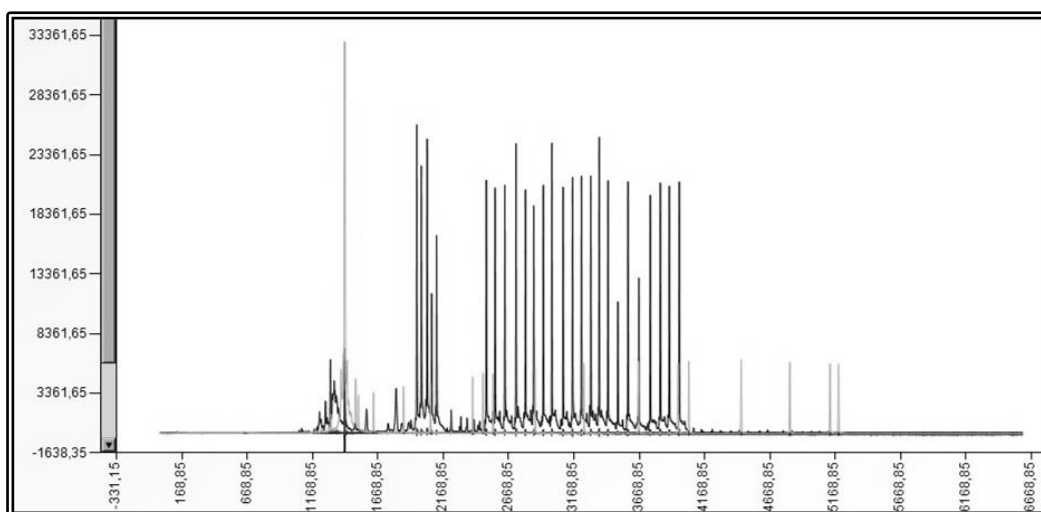
Pri završenoj hibridizaciji i ligaciji amplificiraju se uspješno hibridizirane probe koje u sebi sadrže sekvence komplementarne prajmerskom paru, a ne sama DNK matrica. Svaka od proba je različite dužine zahvaljujući adapterskoj sekvenci na dužem dijelu probe, tako da svaka proba daje različite dužine fragmenata koji se razlikuju u 9–12 nukleotida. Broj PCR produkata zavisi od broja ciljanih sekvenci u uzorku.

Preferirani sistem za separaciju amplificiranih fragmenata nakon PCR reakcije je kapilarni sekvencer ili sekvencer s poliakrilamidnim gelom. Zbog broja amplificiranih fragmenata i razlike u njihovoj veličini (9–12 baznih parova) nije moguće vršiti separiranje fragmenata na agaroznom gelu. Također, za ovu analizu indikativan je parametar i visina fluorescencije (RFU), zbog čega nije moguće raditi s agaroznim gelom. Nakon separacije fragmenata u sistemu za elektroforezu dobije se visina i relativna oblast pika.

Iako je MLPA reakcija visoko reproducibilna, uvijek će biti sekvenci čija je stopa amplifikacije po ciklusu za 1-2% niža, što rezultira u nižem piku na elektroferogramu. Profili pikova uzoraka se uvijek trebaju komparirati sa sličnim profilima dobivenim na kontrolnim uzorcima. Pri poređenju sa kontrolnom reakcijom, relativna oblast pika svakog amplificiranog produkta reflektira relativni broj kopija ciljane sekvence određene probe u analiziranom uzorku. Delecija jednog ili više egzona je pokazana

kao smanjenje u relativnoj oblasti pika amplificiranog produkta proba tih egzona.

Nakon dobijenog elektroferograma (Slika 27) i RFU, pristupa se samoj obradi podataka. Podaci se mogu obrađivati i ručno primjenom metoda normalizacije i regresije te intercepta, a mogu se i obraditi nekim od dostupnih programa (*Coffalyser-MRC Holland, GeneMarker®-Softgenetics, Sequence Pilot®-JSI medical systems*) ili uz pomoć dostupnih Microsoft Excel obrazaca (*NGRL, Manchester analysis sheets; CMG Leeds analysis sheets*).



Slika 27. Elektroferogram MLPA reakcije

Elektroferogram i tabele dobivene separacijom fragmenata na sekvenceru obrađuju se u Coffalyser.net programu koji je dostupan preko MRC - Holland internet stranice. U radu sa Coffalyser-om za polazne podatke mogu se koristiti visina pika ili relativna oblast pika (najčešće se koristi relativna oblast pika koja je manje varijabilna). Coffalyser program radi po sljedećem principu:

1. Prvi korak u obradi podataka je normalizacija pikova (zbog razlike u oblasti pikova, koji nastaju zbog individualne varijabilnosti između uzoraka te izvođenja reakcije). Postoje

dva načina normalizacije: globalna normalizacija i blokirana normalizacija. Razlika je u tome što se u globalnoj normalizaciji dijeli oblast pika svakog amplificiranog produkta s kombiniranom oblasti pika svih pikova tog uzorka, dok se u blokiranoj normalizaciji dijeli oblast pika svakog amplificiranog produkta s totalnom oblasti pika samo kontrolnih proba. Drugi korak je komparacija normaliziranih oblasti pika sa središnjom vrijednosti referentnih (kontrolnih) uzoraka, ili rjeđe sa središnjom vrijednosti svih uzoraka. U toku ovog koraka, normalizirana oblast pika određene probe X u uzorku A se dijeli sa središnjom vrijednosti iste probe (X) referentnih uzoraka. Uzorci s nepouzdanim rezultatima bi trebali biti uklonjeni iz daljnjih analiza.

2. U sljedećem koraku se s dobijenim podacima računa regresioni koeficijent i intercept, te *student t-test*, za normalan broj kopija, deletiran broj kopija te dupliciran broj kopija. Nakon toga se računaju odnosi *normal:deleted* i *normal:duplicated*. Ako je taj odnos 1 (0,85 – 1,15) imamo *normalan broj kopija* određenog egzona, ako je odnos 0,5 (0,35 – 0,65) prisutna je *delecija* određenog egzona, ako je odnos 1,5 (1,35 – 1,65) prisutna je *duplikacija* određenog egzona.

Također, rezultati iz prethodnog koraka mogu biti vizualizirani grafičkim prikazom u *Excel*-u. Delecija jedne kopije ciljane sekvence (kod autosomalnih hromosoma) će biti vidljiva kao redukcija u relativnoj oblasti pika za taj amplificirani produkt od 35 do 55%. Duplikacija u broju kopija u diploidnom genomu će uglavnom biti vidljiva kao povećanje u relativnoj oblasti pika za 30–55%.

Standardna devijacija oblasti pikova treba biti manja od 0,15 za sve probe, kada se smatra da su rezultati relevantni, dok se kod uzoraka sa standardnom devijacijom većom od 0,15 preporučuje ponavljanje očitavanja.

8.4. TOUCH DOWN PCR

Touch down PCR je metoda za povećanje specifičnosti PCR reakcija. U cikličnom programu *touch down* PCR-a temperatura *annealinga* se postepeno smanjuje (npr. 1°C -2°C / svaki drugi ciklus). Početna temperatura hibridizacije prajmera treba da bude nekoliko stepeni iznad procijenjenog T_m prajmera. Zatim se postepeno smanjuje temperatura hibridizacije sve dok se ne dostigne izračunata temperatura hibridizacije prajmera ili nekoliko stepeni ispod. Amplifikacija se zatim nastavlja korišćenjem ove temperature hibridizacije prajmera.

Ova metoda PCR specifične amplifikacije je pogodna za upotrebu kada je nespecifično vezivanje prajmera problem, ili kada je potrebno amplificirati sekvencu koja zavisi od broja ponavljanja, kao što je slučaj sa amplifikacijom dijela HD gena kod osoba sa suspektnom dijagnozom Hantingtonovog oboljenja.

METODE SEKVENCIRANJA DNK

9.1. SEKVENCIRANJE DNK MOLEKULE

DNK sekvenciranje je proces utvrđivanja redoslijeda baza unutar lanca DNK i predstavlja jednu od osnovnih metoda na kojima počiva genetičko inženjerstvo, kao i genetika i molekularno-genetička karakterizacija uopće. Određivanje redoslijeda nukleotida, odnosno baza je krucijalni korak u razvoju raznih disciplina koje se oslanjaju na molekularnu genetiku, molekularnu biologiju, mikrobiologiju i slične discipline. Trenutno se kao zlatni standard koristi *Sanger*-bazirano automatsko sekvenciranje, iako je u prošlosti bilo poznato više metodologija koje su kao ishod imale spoznaju redoslijeda baza u DNK lancu ili dijelu DNK lanca od interesa. Dakle, postoji više tehnika sekvenciranja koje se međusobno razlikuju po svojim osnovnim principima:

- *Maxam-Gilbertova* metoda,
- *Sangerova* metoda,
- automatsko sekvenciranje,
- pirosekvenciranje,
- next generation sequencing – sekvenciranje nove generacije.

9.1.1. MAXAM-GILBERT SEKVENCIRANJE

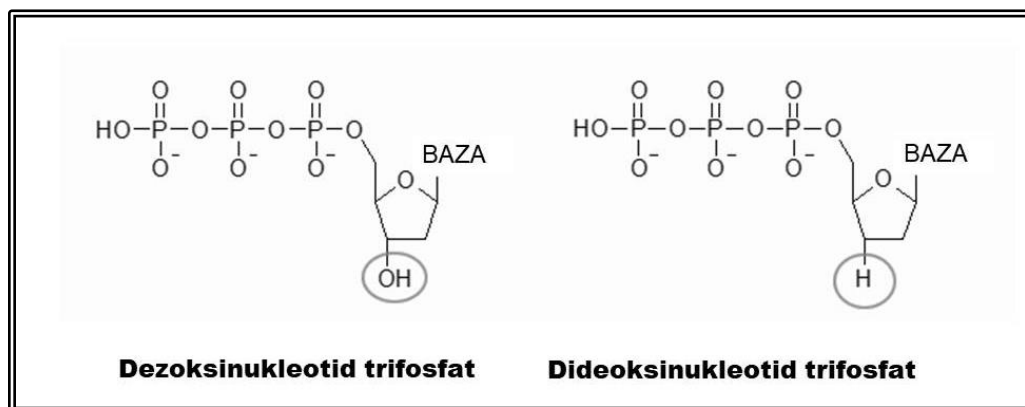
Maxam-Gilbertova metoda je koristila radioaktivno označavanje na jednom 5' kraju DNK fragmenta od interesa (obično reakcijom kinaze pomoću gamma- ^{32}P ATP) i prečišćavanja DNK. Hemijski tretman generiše prekide u malom procentu jedne ili dvije od četiri nukleotidne baze u svakoj od četiri reakcije (G, A + G, C, C + T). Naprimjer, purini (A + G) se depuriniraju koristeći mravlju kiselinu, guanini (i do određene mjere adenini) se metilizuju dimetil sulfatom, a pirimidini (C + T) se hidrolizuju pomoću hidrazina. Dodavanje soli (natrijum hlorid - NaCl) u reakciju hidrazina inhibira se reakcija timina. Modifikovane DNK se onda

odvajaju na poziciji modifikovane baze. Koncentracija modifikovanih hemikalija se kontroliše, odnosno u prosjeku se uvodi jedna modifikaciju po molekuli DNK. Tako se generiše niz označenih fragmenata, od radioobilježenog kraja do prve "rezane" stranice u svakoj molekuli.

Fragmenti u četiri reakcije se elektroforetski razdvajaju jedan pored drugog u poliakrilamidnom denaturirajućem gelu. Za vizuelizaciju fragmenata, gel je izložen rentgenskom filmu za autoradiografiju, pri čemu se u seriji tamnih traka pokazuje identična radioaktivno obilježena DNK molekula. Iz prisustva i odsustva određenih fragmenata može se zaključiti sekvenca.

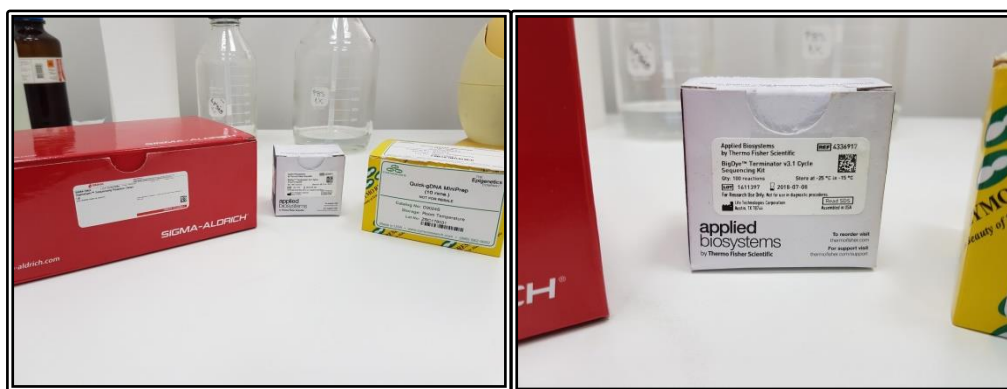
9.1.2. SANGER METODA SEKVENCIRANJA

Ova metoda se bazira na dobijanju serije fragmenata DNK korištenjem četiri specifična dideoksinukleotida, kojima nedostaje OH grupa na poziciji 3-dezoksiriboze (ddNTP). Osnova *Sangerove* metode sekvenciranja je dideoksinukleotid. Naime, OH grupa na poziciji 3 na 3` kraju (Slika 28) je ključna za vezivanje jednog nukleotida za drugi fosfodiesterским vezama. U slučaju da na tom mjestu nedostaje OH grupa, sljedeći nukleotid se neće moći vezati bez OH grupe na 3` kraju. Takvi nukleotidi se nazivaju dideoksinukleotidi. Pri inkorporaciji dideoksinukleotida u DNK lanac, reakcija vezivanja prestaje na tom mjestu.



Slika 28. Razlika između dezokinukleotid fosfata i dideoksinukleotid fosfata

Prije same reakcije sekvenciranja, odnosno ugrađivanja dideksinukleotida u lanac, potrebno je uraditi amplifikaciju dijela DNK molekule od interesa, obzirom da je potrebna velika količina DNK matrice za uspješno DNK sekvenciranje. Nakon PCR reakcije, odnosno amplifikacije dijela DNK od interesa, potrebno je prečistiti reakciju, odnosno odvojiti PCR produkt koji postaje matrica za dalju reakciju sekvenciranja, od polimeraze, zaostalih nukleotida, prajmera i slično. Čišćenje PCR produkta se može vršiti putem centrifugiranja, komercijalnih kitova ili Na-acetat/etanol precipitacije PCR produkta (Slika 29).



Slika 29. Kitovi za čišćenje PCR produkata i reakcije sekvenciranja lijevo, desno – *Big Dye Terminator* za reakciju sekvenciranja.

Nakon čišćenja, PCR produkt se podvrgava reakciji sekvenciranja. Kod *Sangerovog* sekvenciranja, u reakciju sekvenciranja se stavljaju PCR produkt, klasične PCR komponente (polimeraza, nukleotidi, Mg, voda, prajmer) i naravno mala količina dideksinukleotida (ddNTP), i to u četiri razdvojene tubice, gdje će se u svaku od tubica dodati različiti ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP i ddTTP). PCR reakcija (reakcija sekvenciranja) se odvija u tri standardne faze: denaturacija, vezivanje prajmera i elongacija, koja je ključna faza u ovom procesu. Elongacija, tj. proces izduživanja amplificiranog segmenta, prestaje inkorporacijom jednog od ddNTP-a, jer se, kao što je već napomenuto, ddNTP ne može vezati fosfodiesterskim vezama za sljedeći nukleotid, odnosno nedostatak OH grupe onemogućava dalju aktivnost DNK

polimeraze. Krajnja analiza separiranih fragmenata odvija se na poliakrilamidnom gelu, gdje manuelno sekvenciranje DNK fragmenata podrazumijeva četiri odvojene reakcije, separirane u četiri odvojene linije na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu i autoradiografsko detektiranje.

9.1.3. AUTOMATSKO SEKVENCIRANJE

Automatsko sekvenciranje je postalo moguće pojavom fluorescentnih markera te boljih mašina koje omogućavaju brže i preciznije sekvenciranje. Principi svakog sekvenciranja počivaju na *Sangerovoj* metodi, zato se i nazivaju *Sanger*-bazirano sekvenciranje. U suštini, automatsko sekvenciranje, kao i *Sangerovo* sekvenciranje koristi dideoksinukleotide kao bazu same tehnike. Kod automatskog sekvenciranja, dideoksinukleotidi su obilježeni različitim fluorescentnim bojama, te ih je moguće očitati putem laserske ekscitacije fluorescentne boje i očitavanja te fluorescencije putem kamere. Svaki protokol automatskog sekvenciranja ima određene zajedničke korake:

1. PCR amplifikacija dijela DNK od interesa koji se želi sekvencirati, odnosno kojem se želi odrediti redoslijed nukleotida u DNK lancu. PCR reakcija se odvija kao klasična PCR reakcija, uz sve potrebne komponente PCR-a, i dva prajmera koji ograničavaju dio koji će se podvrgnuti reakciji sekvenciranja.
2. Čišćenje PCR reakcije, odnosno, odvajanje čistog PCR produkta koji će služiti kao matrica za reakciju sekvenciranja od komponenti PCR-a. Najčešće se koriste komercijalni kitovi sa metodologijom filter spin kolona ili pak precipitacija PCR produkta uz pomoć Na-acetata i apsolutnog etanola.
3. Reakcija sekvenciranja, koja je u principu PCR reakcija s komponentama PCR-a i naravno fluorescentno obilježenih dideoksinukleotida. U ovoj PCR reakciji se koristi samo jedan prajmer, zavisno od toga da li želimo sekvencirati jedan ili drugi lanac DNK. Također, obzirom da je glavni korak inkorporacija ddNTP-ova u lanac, elongacija može biti duža nego kod obične

PCR reakcije. Nakon određenog broja ciklusa, output reakcije sekvenciranja su milioni PCR produkata različite veličine u koje su ugrađeni ddNTP-ovi na krajevima fragmenata, a čiju fluorescenciju može očitati određeni aparat kao što je genetički analizator (*Applied Biosystems*).

4. Čišćenje reakcije sekvenciranja, koje se mora provesti nakon reakcije sekvenciranja, a time želimo da odvojimo PCR fragmente od ostalih komponenti reakcije sekvenciranja. Obzirom da se koriste fluorescentno obilježeni ddNTP-ovi u reakciji sekvenciranja, potrebno je dobro očistiti PCR produkte od bilo kakve rezidualne fluorescencije. Kao i kod čišćenja prvog PCR produkta, mogu se koristiti komercijalni kitovi ili pak Na-acetat/alkohol precipitacija.

5. Razdvajanje PCR fragmenata na sekvencer mašini, gdje se kao output može dobiti sekvenca. Osnovna prednost ove metode je što se reakcija ne mora separirati u četiri tubice, dok se krajnja detekcija odvija prilikom elektroforeze, tokom prolaska markiranog fragmenta kroz polje djelovanja detektora.

9.2. SEKVENCIRANJE NOVE GENERACIJE (NGS)

Sekvenciranje je metoda za određivanje tačnog redoslijeda nukleotida u DNK ili RNK sekvenci. Naravno, kao što je već ranije spomenuto, postoji više različitih metoda sekvenciranja, gdje je još uvijek *Sanger*-bazirano automatsko sekvenciranje zlatni standard u molekularnoj biologiji, kao i u laboratorijskoj tehnologiji baziranoj na DNK i RNK molekulama. Sekvenciranje nove generacije (NGS) omogućava masivno paralelno sekvenciranje miliona fragmenata DNK u isto vrijeme. Masivno paralelno sekvenciranje obuhvata određivanje stalnog redoslijeda nukleotida DNK ne samo u jednom lancu odnosno dijelu DNK od interesa, nego u milionima istih lanaca DNK tj. dijelova DNK koje želimo sekvencirati.

Prednosti sekvenciranja nove generacije:

- brzo (sekvenca čitavog genoma je dostupna u kraćem roku od jednog dana),
- jeftinije u odnosu na tradicionalne tehnike (*Sanger* sekvenciranje),
- omogućava sekvenciranja kompletnog egzoma ili genoma,
- potrebna je manja količina DNK molekule u odnosu na tradicionalno *Sanger*-bazirano sekvenciranje.

Sanger-bazirano sekvenciranje traje od jednog do dva dana za jedan fragment od interesa koji može biti veličine od 300 – 1200 baznih parova maksimalno. Prosjek veličine fragmenta koji se može uspješno sekvencirati kod *Sanger*-baziranog sekvenciranja je od 500 do 700 baznih parova. Da bismo uspješno sekvencirali jedan gen (odnosno egzone jednog gena putem *Sanger*-baziranog sekvenciranja), potrebno je sekvencirati do 100 fragmenata (u zavisnosti od veličine gena koji želimo sekvencirati, odnosno broja i veličine egzona). Što je gen koji sekvenciramo veći, to je i čitava procedura *Sanger*-baziranog sekvenciranja duža i kompleksnija, te može trajati više dana, čak i sedmica ako uključimo potrebna ponavljanja sekvenciranja dijelova gena.

Cijena sekvenciranja nove generacije u odnosu na tradicionalne tehnike je niža, obzirom da je moguće sekvencirati milione fragmenata u jednoj reakciji sekvenciranja, što nije moguće raditi kod *Sanger*-baziranog sekvenciranja. Međutim, u slučaju da je potrebno sekvencirati samo jedan fragment, odnosno jedan dio nekog gena, *Sanger*-bazirano sekvenciranje bi bilo dosta jeftinije. Sekvenciranje nove generacije je ekonomski isplativo u slučaju sekvenciranja većeg broja gena u isto vrijeme tzv. paneli gena koji najčešće obuhvataju gene koji su na neki način povezani (npr. u slučaju asocijacije više gena kod nekog oboljenja kao što su karcinomi, infantilne epilepsije ili pak različiti sindromi kod djece koji dijele iste simptome ali različitu genetičku podlogu), zatim sekvenciranja kompletnog egzoma čovjeka (egzom čovjeka

obuhvata sve egzone svih gena koji su poznati), ili pak sekvenciranje kompletnog genoma koji obuhvata i egzone i introne svih gena koji su poznati kod čovjeka ili pak kod drugih organizama, što također spada u domenu molekularne biologije.

Nedostaci sekvenciranja nove generacije:

- ogromna količina podataka, analiza je komplikovana u odnosu na *Sanger*-bazirano sekvenciranje;
- potrebni su sofisticirani bioinformatički softveri za analizu podataka nakon sekvenciranja nove generacije, kao i brzi kompjuterski sistemi za pohranjivanje i procesiranje podataka proisteklih iz primjene ove metode;
- interpretacija dobijenih rezultata, naročito kod analize vezane za kliničke parametre je komplikovana zbog velike količine polimorfizama nepoznate kliničke signifikantnosti.

Sekvenciranje nove generacije rezultira ogromnom količinom podataka nakon završenog sekvenciranja, odnosno podacima o dijelovima sekvenciranih fragmenata koji nakon sekvenciranja trebaju biti bioinformatički obrađeni da bi se složila sekvenca gena kojima je određen redoslijed nukleotida. Ta količina podataka može obuhvatati tekstovne podatke veličine nekoliko gigabajta te je potrebno da podatke dobijene primjenom NGS sekvenciranja, obrađuje obučeno osoblje. S druge strane, kod *Sanger*-baziranog sekvenciranja, analiza je uglavnom jednostavna, odnosno nije potrebna posebna bioinformatička obrada sirovih podataka.

9.2.1. NGS PLATFORME

Postoji više platformi na kojima se bazira sekvenciranje nove generacije, gdje se mogu spomenuti i tehnologije koje više nisu kompetitivne kao što je Roche 454, AB Solid i tehnologije koje se koriste, ali imaju dodatne limitacije u odnosu na dvije najpoznatije platforme sekvenciranja nove generacije, kao što je

Pacbio RSII. Dvije najpoznatije platforme sekvenciranja nove generacije su:

- Ion Torrent PGM™ (*LifeTechnologies, Carlsbad, CA*),
- MiSeq™ (*Illumina, San Diego, Kalifornija*).

Iako kompetitori, obje platforme imaju vrlo sličan specificitet, produktivnost i senzitivnost te nije moguće reći koja je bolja ili ima bolje rezultate, što se može vidjeti i u studijama koje su komparirale različite NGS platforme. Obje metodologije zapravo imaju zajedničku bazu, iako se same metodologije razlikuju u nekoliko glavnih tačaka. Zajednička baza obje NGS metodologije obuhvata:

- priprema matrice,
- sekvenciranje i snimanje i
- analiza podataka.

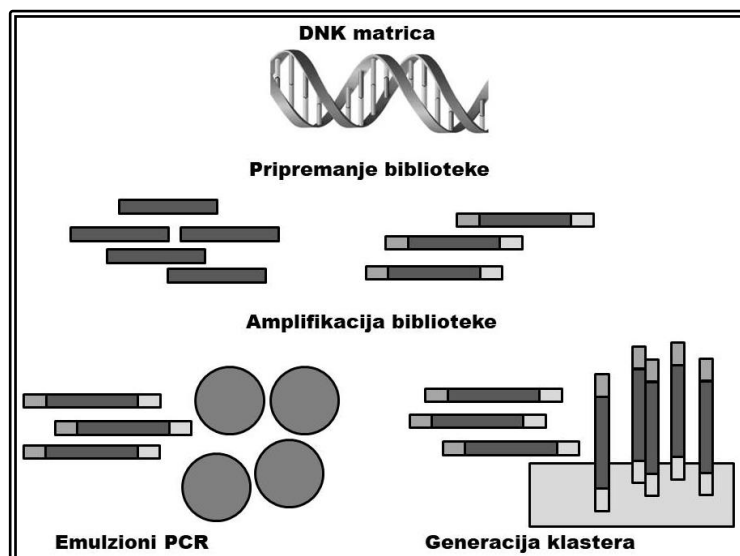
U okviru svakog koraka, pojedine platforme imaju metodološke razlike koje ih čine jedinstvenim.

9.2.2. PRIPREMA MATRICE

Jedna od bitnih koraka, ako ne i najbitniji, u sekvenciranju nove generacije, je priprema matrice za sekvenciranje, odnosno priprema DNK molekule i pravljenje biblioteka (*library*) fragmenata DNK (Slika 30). Početna matrica koju želimo sekvencirati treba biti kompatibilna s metodologijom sekvenciranja nove generacije koja će se koristiti. Početna matrica za kompoziciju biblioteke (*library*) za NGS može biti DNK ili pak RNK.

Prvi korak u pripremi matrice je fragmentiranje matrice. DNK ili RNK koja se koristi kao matrica se mora fragmentirati da bi sekvenciranje bilo uspješno. Fragmentacija nukleinske kiseline može biti postignuta pomoću ultrazvučnog cijepanja molekule ili pak enzimatskog cijepanja molekule uz pomoć DNAze I koja

fragmentira DNK molekulu na fragmete veličine do 20 kilobaza. Veličina samih fragmenata može biti od 100 do 1500 baznih parova, ali i veličina potrebnih fragmenata zavisi od metodologije koja će biti korištena. RNK nakon fragmentacije mora biti transferirana u cDNK da bi se uspješno sekvencirala RNK molekula.



Slika 30. Priprema matrice za NGS

Nakon fragmentacije, potrebno je takozvano „tupljenje“ 5` kraja i fosforilacija 3` kraja, da bi se uspješno ligirali adapteri, odnosno poznate kratke nukleotidne sekvence, na oba kraja fragmentirane DNK. Najjednostavniji način, u slučaju da se biblioteka priprema za Illumina aparate, je upotreba Nextera kita za preparaciju DNK za NGS koji je komercijalno dostupan od proizvođača Illumina. Osnovni cilj u preparaciji i konstrukciji biblioteke je da se postigne što veća replikativnost biblioteke i što manji PCR bazirani bias, odnosno bias povezan s amplifikacijom. Adapteri koji se ligiraju na oba kraja DNK fragmenta su potrebni za uspješno povezivanje s medijumom u kojem se odvija NGS sekvenciranje odnosno klonalna aplikacija, i to mikroperlice kod Ion Torrent aparata, odnosno stakleni slajd kod Illumina aparata. Obje platforme na medijima za sekvenciranje odnosno klonalnu amplifikaciju već imaju fabrički zakačene oligonukleotidne

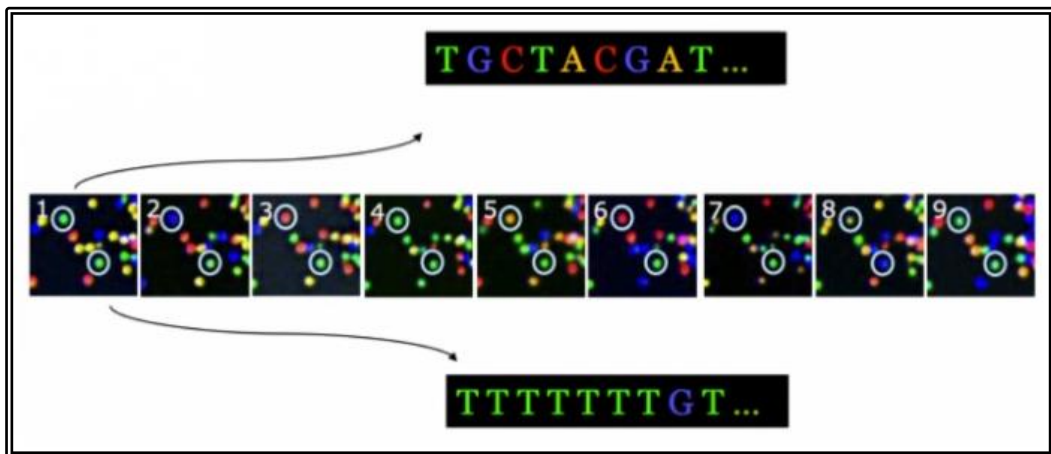
sekvence koje su komplementarne adapterima koji se koriste u pripremi biblioteke.

Pripremljena biblioteka (*library*) se klonalno amplificira i to kod Ion Torrent™ metodologije koristi se emulzijski PCR, dok se kod MiSeq™ tehnologije koristi generacija klastera.

Emulzijski PCR je u stvari PCR koji sadrži sve komponente ali se odvija u mikrokapljici. Iz jednog mililitra PCR reakcije moguće je uz dodavanje ulja i uz posebni aparat raspršiti jednu PCR reakciju u 10¹⁰ mikro reakcija. Mikro reakcije su stabilne na visokoj temperaturi tako da se svaka kapljica ponaša kao normalna PCR reakcija u zasebnoj PCR tubici. U idealnoj reakciji kod emulzijskog PCR-a, u jednoj kapljici bi trebale biti sadržane komponente PCR-a i samo jedna DNK matrica, odnosno jedan lanac DNK. Kod Ion Torrent tehnologije, u jednoj kapljici emulzijskog PCR-a prisutna je i perlica od hidrogela, promjera 1 μm, na kojoj su fabrički zakačene oligonukleotidne sekvence komplementarne adapterima koji se koriste u pripremi fragmenata DNK za sekvenciranje. Nakon emulzijskog PCR-a, perlica u jednoj kapljici sadrži milione kopija jedne DNK sekvence.

Generacija klastera se odvija na staklenom slajdu za koji su zakačene oligonukleotidne sekvence komplementarne adapterima korištenim u pripremi matrice za NGS biblioteku, vrlo slično kao i kod emulzijskog PCR-a, osim što se za mikroperlicu kači jedna DNK molekula, odnosno jedan lanac, dok se za slajd može komplementarno vezivati više različitih DNK fragmenata. Amplifikacija vezanih DNK fragmenata se odvija putem tzv. mostovne amplifikacije, uz sve potrebne komponente PCR reakcije. Svaki vezani fragment biva amplificiran u jasni klonalni klaster istih DNK fragmenata. Amplifikacija ovih fragmenata je potrebna zbog senzitivnosti Illumina aparata, gdje nije moguće očitati fluorescento obilježje samo jednog lanca, odnosno potrebno je da lanci budu u grupama (klonalnim klasterima), da bi očitavanje fluorescencije bilo moguće.

Dakle, sekvenciranje se odvija u ciklusima, gdje se ciklično ponavlja preplavlivanje slajda, slikanje, uklanjanje terminatora i fluorescentnog signala i pranje slajda, nakon čega počinje novi ciklus. Sekvenciranje počinje tako što je slajd preplavljen nukleotidima i DNK polimerazom. Ovi nukleotidi su fluorescentno označeni, s bojom koja odgovara jednoj bazi. Oni također imaju terminator, tako da se samo jedna baza dodaje u određenom trenutku. Slajd se potom slika. U svakom slikanju, evidentirani fluorescentni signal ukazuje da je baza dodana. Nakon slikanja, slajd se priprema za sljedeći ciklus. Terminatori se uklanjaju, dopuštajući dodavanje nove baze, a fluorescentni signal se uklanja. Proces se ponavlja, dodajući jedan nukleotid u jednom ciklusu uz snimanje između ciklusa (Slika 32). Kompjuterski se otkrivaju baze na svakom mjestu u svakoj slici i koriste se za izgradnju sekvence. Sve sekvence će biti iste dužine, zato što dužina čitanja ovisi o broju ciklusa.

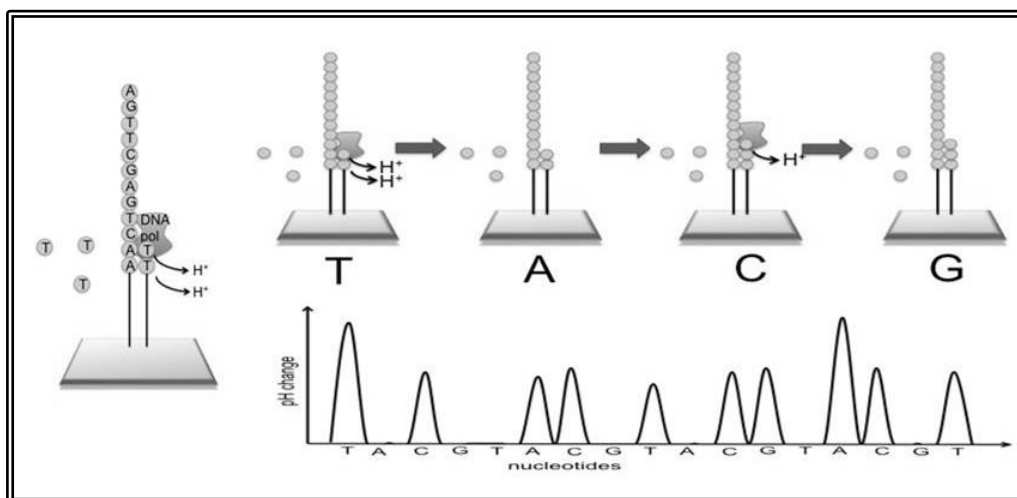


Slika 32. Prikaz slajdova nakon slikanja kod Illumine⁵

Za razliku od Illumine, Ion torrent ne koristi optičke signale. Umjesto toga, iskorištena je činjenica da dodavanje dNTP na DNK oslobađa H⁺ jon (slika 33). U ovom slučaju, koriste se mikoperlice na koje se ligira po jedna molekula. Amplifikacija se događa putem metode emulzijskog PCR-a. Nakon PCR-a, svaka

⁵ Slika preuzeta sa <https://www.ebi.ac.uk/training/online> (Dostupno 20.02.2018)

mikroperlica se dodaje na jedan dio (*well* – bunarčić, jažica) staklenog slajda. Slajd biva preplavljen s jednom vrstom dNTP, uz polimerazu, i to jedan NTP u jednom trenutku. pH se mjeri u svakom od bunarčića, jer svaki otpušteni H⁺ jon će smanjiti pH. Promjene u pH omogućuju da se utvrdi da li je baza, i koliko njih, u sekvenci DNK.



Slika 33. Prikaz NGS reakcije kod Ion Torrent aparata⁶

9.2.4. ANALIZA PODATAKA

Analiza podataka nakon sekvenciranja nove generacije, tj. bilo koje metodologije predstavlja najobimniju fazu sekvenciranja. Kao što je već napomenuto, obzirom da je rezultat sekvenciranja nove generacije ogromna količina podataka odnosno sekvenci, za analizu se koriste posebni sofisticirani bioinformatički softveri, a i osoblje mora biti obučeno da radi na tim softverima. Sekvence moraju proći nekoliko koraka analiza, gdje se moraju ukloniti adapter sekvence i sekvence niskog kvaliteta čitanja te se uraditi poravnanje sa referentnom sekvencom ili *de novo* poravnanje.

⁶ Slika preuzeta sa <https://www.ebi.ac.uk/training/online> (Dostupno 20.02.2018)

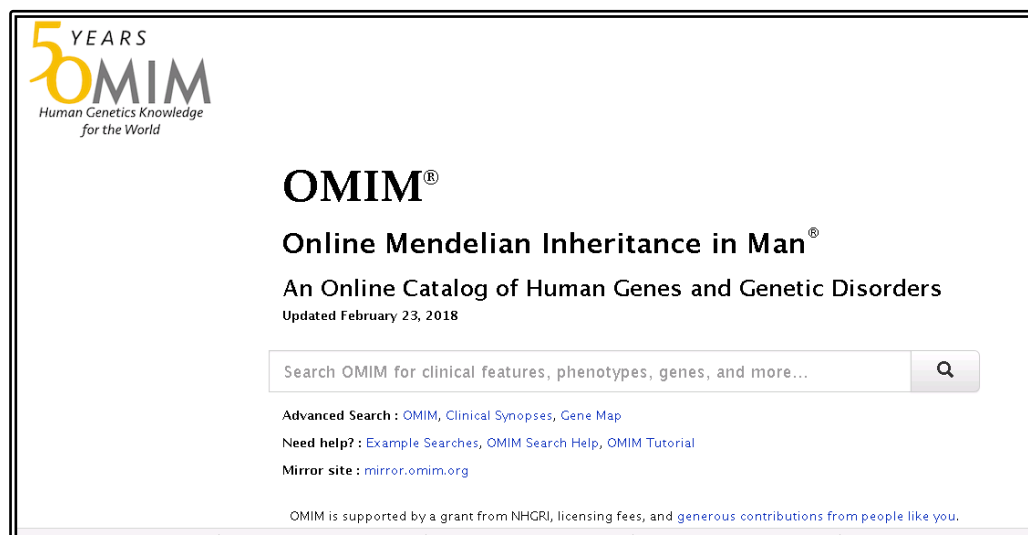
METODE ANALIZE NUKLEOTIDNIH SEKVENCI I BAZE PODATAKA

Današnje metode molekularno-genetičke dijagnostike uključuje primjenu većeg broja različitih analiza, pri čemu se neke vezane za usporedne analize sekvenci i biološke baze podataka. Da bismo znali gdje se nalazi mutacija u datom genu, moramo za usporednu imati sekvencu normalne kopije. Također, moramo znati koje su mutacije datog gena već detektovane i kakav ima uticaj na fenotip. U ovom poglavlju ćemo opisati dva osnovna tipa molekularno-genetičkih baza podataka koje jedan molekularno-genetički dijagnostičar treba da koristi.

10.1. ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN (OMIM®)

OMIM (<http://www.omim.org/>) je baza podataka koja u sebi sadrži veoma veliki opseg različitih informacija o preko 15000 ljudskih gena, svih do sada opisanih genetičkih poremećaja i načine njihovog nasljeđivanja. Poseban fokus u okviru ove baze podataka stavljen je na molekularni odnos između genetičkih varijacija i fenotipske ekspresije.



Ova baza podataka je digitalizirana verzija kolekcije informacija koji je posložio dr. *Victor A. McKusick* 60-ih godina prošlog stoljeća, kao katalog mendelijanskih osobina i poremećaja kojeg je nazvao *Mendelian Inheritance in Man* (MIM, Mendelijansko nasljeđivanje kod čovjeka). Njegova vizija je bila uspostaviti na jednom mjestu sve poznate relevantne informacije kada su u pitanju oboljenja čovjeka, kao i modele nasljeđivanja ljudskih osobina. U periodu od 1966. do 1998. godine objavljen je u vidu dvanaest tomova, dok je njegova online verzija, dostupna široj javnosti, zaživjela 1987. godine. Danas OMIM bazu podataka održava i dopunjuje *McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine* u okviru *Johns Hopkins University School of Medicine*.



Slika 34. Početno sučelje OMIM baze podataka

Ono što je posebno značajno je činjenica da u svom sadržaju osim opisa i relevantnih informacija o varijantama gena i istraživanjima, postoje i linkovi na druge biološke baze podataka koji imaju sadržaj za taj gene ili oboljenje, a u pitanju su npr. DNK, proteinske sekvence, kao i proteinske strukture. Pretraživanje je u principu vrlo jednostavno, kroz web sučelje možemo pretraživati po nazivu oboljenja, naziva gena, osobine itd (Slika 34). U principu svaki OMIM unos ima svoj jedinstveni šestoziemenkasti broj prema sljedećem ključu: 1----- (100000-) 2----- (200000-) autosomalni lokusi ili fenotipovi (unosi napravljeni prije 15.05.1994.); 3----- (300000-) X-vezani lokusi ili fenotipovi; 4----- (400000-) Y-vezani lokusi ili fenotipovi; 5----- (500000-) mitohondrijalni lokusi ili fenotipovi; 6----- (600000-) autosomalni lokusi ili fenotipovi (unosi napravljeni poslije 15.05.1994.).

Sve alelne varijante koje uključuju i mutacije imaju tzv. MIM broj unosa, a iza njega slijedi decimalni zarez i jedinstveni četveroznamenasti varijanti broj. npr., alelne varijante gena faktora IX (300746) označene su brojevima od 300746.0001 do 300746.0101 (Slika 35).

Table of Contents for *300746	.0002 HEMOPHILIA B LEYDEN	External Links
Title	F9, -6G-A - [ClinVar]	• Genome
Gene-Phenotype Relationships	Fahner et al. (1988) found a G-to-A change at nucleotide -6 as the cause of hemophilia B Leyden (see 306900), in which a severe bleeding disorder in childhood becomes mild after puberty.	• DNA
Text		• Protein
Description		• Gene Info
Cloning and Expression	Crossley et al. (1990) also identified a G-to-A change at position -6 as the cause of hemophilia B Leyden. 	• Clinical Resources
Gene Structure		• Variation
Gene Function		• Animal Models
Mapping		• Cellular Pathways
Molecular Genetics	.0003 HEMOPHILIA B LEYDEN	
Genotype/Phenotype Correlations	F9, -6G-C - [ClinVar]	
Animal Model	Attree et al. (1989) found a G-to-C change at nucleotide -6. Vidaud et al. (1993) cited evidence indicating that the G-C transversion at position -6 produces much milder hemophilia B Leyden (see 306900) than does the G-A transition at the same position (300746.0002). 	
Allelic Variants		
Table View	.0004 HEMOPHILIA B LEYDEN	
See Also	F9, 1-BP DEL, +13A - [ClinVar]	
References	Reitsma et al. (1989) studied the F9 gene in a Greek patient and an American patient of Armenian descent with hemophilia B Leyden (see 306900). In one they found deletion of A at position +13 of the factor IX gene and in the other an A-to-G mutation at the same position (300746.0090), 32 bp downstream of the point mutation in the Dutch kindred (Reitsma et al., 1988). See also Crossley et al. (1989), Crossley and Brownlee (1990) identified a binding site for the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) extending from +1 to +18. They showed that the A-to-G mutation	
Contributors		
Creation Date		
Edit History		
MIMmatch (login)		

Slika 35. Alelne varijante gena koji kodira za koagulacijski faktor IX

Dodatna objašnjenja i informacije o ovoj bazi podataka se nalaze u Help sekciji na OMIM web stranici (<http://www.omim.org/>).

10.2. ENSEMBL GENOME DATABASE PROJECT(ENSEMBL)

ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>) je baza podataka kojom se mogu pretraživati (*genome browser*) genomi kičmenjaka u cilju usporedbe, spoznaje o varijaciji sekvenci, evoluciji i transkripcionalnoj regulaciji. Osim anotacije gena, u okviru ove baze podataka možemo vršiti višestruka poravnanja sekvenci (usporedbe), kao i predikcije regulatornih funkcija, te kolekcije podataka o oboljenja. U svom internetskom skriptovnom okruženju sadrži niz alata kao što su BLAST, BLAT, BioMart i *Variant Effect Predictor* (VEP). Za molekularno-genetičkog dijagnostičara poseban aspekt ove baze je dio ljudskog genoma (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index).

The screenshot shows the Ensembl genome browser interface for the BRCA2 gene. The top navigation bar includes links for BLAST/BLAT, BioMart, Tools, Downloads, Help & Documentation, Blog, and Mirrors. A search bar is located in the top right corner. The main content area is divided into several sections:

- Gene-based displays:** A sidebar menu with options like Summary, Splice variants, Transcript comparison, Gene alleles, Sequence, Secondary Structure, Comparative Genomics, Genomic alignments, Gene tree, Gene gain/loss tree, Orthologues, Paralogues, Ensembl protein families, Ontologies, Phenotypes, Genetic Variation, Variant table, Variant image, Structural variants, Gene expression, Regulation, External references, Supporting evidence, ID History, and Gene history.
- Gene: BRCA2 ENSG00000139618:** The main heading for the gene page.
- Description:** BRCA2, DNA repair associated [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:1101].
- Synonyms:** FAD1, FANCD1, FAD, BRCC2, XRCC11, FANCD, FADC.
- Location:** Chromosome 13: 32,315,474-32,400,266 forward strand. GRCh38: CM000675.2.
- About this gene:** This gene has 7 transcripts (splice variants), 88 orthologues, is a member of 1 Ensembl protein family and is associated with 93 phenotypes.
- Transcripts:** A button to 'Show transcript table'.
- Summary:** A section with various identifiers and descriptions.
- Name:** BRCA2 (HGNC Symbol).
- CCDS:** This gene is a member of the Human CCDS set: CCDS9344.1.
- UniProtKB:** This gene has proteins that correspond to the following UniProtKB identifiers: P51587.
- RefSeq:** Overlapping RefSeq Gene ID 676 matches and has similar biotype of protein_coding.
- LRG:** LRG_793 provides a stable genomic reference framework for describing sequence variants for this gene.
- Ensembl version:** ENSG00000139618.14.
- Other assemblies:** This gene maps to 32,889,611-32,974,403 in GRCh37 coordinates. View this locus in the GRCh37 archive: ENSG00000139618.
- Gene type:** Protein coding.
- Annotation method:** Annotation for this gene includes both automatic annotation from Ensembl and Havana manual curation, see article.
- Annotation Attributes:** overlapping locus [Definitions].

Slika 36. Sučelje dijela ENSEMBL baze podataka o ljudskom genomu (primjer BRCA2 gen)

ENSEMBL je u potpunosti integriran s drugim biološkim bazama podataka, što se manifestira u činjenici da se informacije o nekom genu, njegovom proteinskom produktu dijeli između baza i time se dobija na validnosti. Samo pretraživanje je grafički uređeno (Slika 36), a rezultati jasno razumljivi i prezentirani (Slika 37). Broj dostupnih podataka je enorman i uključuje raspon od informacionih, historijskih, anotacijskih, pa sve do kompleksnih kao što je npr. usporedba genske ekspresije u različitim tkivima (Slika 38) ili genske usporedbe s drugim sisarima (naročito primatima).

PRIMJENA PROTEINSKIH METODA

Proteomika proučava strukturu, funkciju i interakcije proteina u organizmu. Proteinskim metodama se smatra svaka metoda koja se bavi karakterizacijom velikih setova proteina. Proteinske metode u procesu dijagnosticiranja oboljenja su brojne, a najpoznatije i najčešće korištene proteinske metode su:

- western blot,
- 2DE (dvodimenzionalna elektroforeza proteina),
- dvo-hibridne tehnike,
- ELISA,
- kompjuterske analize i metode za procesiranje, analizu i interpretaciju podataka.

Sama riječ proteomika potiče od riječi proteom, kao što genomika (koja se bavi istraživanjem strukture i funkcije gena) potiče od riječi genom. Riječ proteom je izvedena iz riječi protein i genom, i odnosi se na sve proteine producirane od strane organizma, kao što genom predstavlja sve gene jednog organizma. Naprimjer, ljudski organizam može sadržavati više od 2 miliona različitih proteina, što predstavlja ljudski proteom. Naučnici i istraživači pokušavaju da dizajniraju mapu ljudskog proteoma, koja bi pomogla u identifikaciji novih proteina, proteinskih interakcija i signalnih puteva.

Proteomika i genomika se mogu prikazati kao paralelne nauke, dok jedna proučava gene, druga proučava produkte tih gena, dakle proteine. Međutim, za razliku od genoma, koji je relativno statičan i ne mijenja se tako često, proteom je dinamičan sistem koji se mijenja iz minute u minutu, nastaju novi proteini, stupaju u vezu s drugim proteinima i slično. Proteom varira u zdravoj osobi koliko i u bolesnoj, također varira u svakom pojedinačnom tkivu, pojedinim fazama ćelijskog ciklusa ili pod uticajem određene terapije.

Također, genomika «počinje» od gena i onda od tih rezultata izvodi zaključke o produktima tih gena (proteinima), dok proteomika «počinje» s funkcionalno modificiranim proteinom, te od tog početka istražuje gene odgovorne za produkciju tog proteina.

Koristeći proteomiku, možemo izvesti zaključke o proteinima prisutnim u jednoj ćeliji ili tkivu, ili čak u organizmu u datom trenutku. Dakle, istražujemo koji su proteini prisutni u ćeliji, a ne koji bi mogli biti prisutni, što možemo zaključiti iz istraživanja na genima. Služeći se proteomskim metodama, moguće je identificirati proteine koji su posttranslacijski modificirani, što nije moguće odrediti putem genomike. Naprimjer, ako poredimo nivo ekspresije određenih proteina u dva uzorka tkiva karcinoma dojke, koji imaju različitu dijagnozu, trebali bi koristiti proteomske metode, jer je moguće da u genomu nema mutacija već da su određeni proteini posttranslacijski modificirani. Također, ako za naše istraživanje koristimo informacionu RNK, ne mora značiti da ćemo naći isti nivo ekspresije kao kad bismo koristili proteine, mada je to često slučaj. Prisutnost iRNK, za koju znamo da prenosi informaciju za određeni protein, ne mora značiti da je i taj protein prisutan u ćeliji, ili da je prisutan u određenim količinama.

Proteomika je već našla primjenu u medicini, u ispitivanju poznatih lijekova i kreiranju novih. Tako se vrše opsežna proteomska istraživanja kancera, psihosomatskih oboljenja, srčanih oboljenja i metaboličkih poremećaja sa ciljem da se nađu novi lijekovi i da se poboljša kvaliteta života ljudi. Razvoj proteomike bi mogao pomoći naučnicima da kreiraju lijekove koji su prilagođeni različitim individuama, da bi se poboljšalo liječenje i izbjegle nuspojave.

Također, razvoj proteinskih biomarkera je u porastu. Tako naprimjer postoje proteinski markeri koji su u široj upotrebi, kao prostata-specifični antigen (PSA) koji se koristi za dijagnostiku kancera prostate kod muškaraca. Nažalost, mnogi biomarkeri su se pokazali nepouzdanim te se pokušavaju razviti tehnike za poboljšanje markera.

11.1. IZOLACIJA PROTEINA

Prvi korak u bilo kojoj proteomskoj metodi je uspješna izolacija proteina. Proteini su jako nestabilne molekule i brzo podliježu denaturaciji i degradaciji, metilaciji, fosforilaciji i sličnim procesima, te se mora s njima pažljivo postupati. Jedna od nedostataka proteomskih metoda je ta što izolat proteina mora biti skoro apsolutno čist od bilo koje materije koja bi mogla kontaminirati izolat i prikazati lažne rezultate, kao naprimjer lipidi, nukleinske kiseline, urea, razni deterdženti koji se koriste za izolaciju i slično. Najčešće se za proteomske metode koristi izolat proteina iz ćelija u kulturi, ili iz krvi i plazme, a nešto rjeđe iz tkiva, mada se i sa takvim izolatima dobivaju reprezentativni rezultati. Za izolaciju proteina koriste se razni puferi za lizu ćelija koji imaju određene zajedničke elemente:

- urea,
- deterdžent,
- amfoliti,
- reducirajući agensi,
- inhibitori proteaza,
- RE H₂O.

Urea je neutralni kaotrop koji denaturira proteine kidajući nekovalentne i jonske veze između aminokiselinskih ostataka. U pufer za lizu se dodaje u koncentracijama od 5M do 9,8M.

Deterdženti vrše solubilizaciju proteina. Najčešće se koriste nejonski deterdženti kao Tween 80, NP-40 i Triton X-100 (komercijalni deterdženti), kao i CHAPS.

Amfoliti pomažu pri razgradnji cijanatnih jona koji se stvaraju razgradnjom uree i pomažu u precipitaciji nukleinskih kiselina u toku centrifugiranja. Najčešće se dodaje oko 2% komercijalnih amfolita na cjelokupni volumen lizata.

Reducirajući agensi reduciraju disulfidne veze i pomažu u solubilizaciji kompleksnog miksa proteina. Najčešće se koristi DTT (*dithiothreitol*) ili β -mercaptoethanol.

Inhibitori proteaza se najčešće dodaju puferu za lizu pred samu upotrebu, kao i DTT. Proteaze često mogu degradirati čitav uzorak proteina te ih je bitno koristiti pri izolaciji proteina.

Pri izolaciji treba dodati i miks nukleaza, da bi se oslobodili nukleinskih kiselina koje mogu prouzrokovati velike probleme, naročito ako se koristi 2-DE metoda. Nakon liziranja uzorci se centrifugiraju i alikvotira se supernatant koji sadrži proteine. Lizat proteina se čuva na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

11.2. KVANTIFIKACIJA PROTEINA

Kvantifikacija proteina se vrši spektrofotometrijom pri čemu se mjeri apsorbancija na 750nm. Za kvantifikaciju se koriste komercijalni kitovi: Lowryeva i Bradfordova metoda. Prije kvantifikacije se određena količina lizata proteina istaloži 100% acetonom preko noći, jer pufer za lizu nije kompatibilan s reagensima za kvantifikaciju i mogao bi pokazati lažne rezultate.

Istaloženi talog proteina se prije kvantifikacije otopi u puferu za proteine (u sastavu: Tris-HCL, SDS, glicerol), a zatim se pristupa pravljenju razblaženja uzorka i standarda. Za standard se koristi *Bovine Serum Albumin* (BSA) u različitim razblaženjima. Nakon spektrofotometrije pristupa se računanju koncentracije proteina u uzorku putem pravljenja standardne krive i *forecast* funkcije. Koncentracija proteina zavisi od vrste i količine uzorka, a optimalna koncentracija u uzorku je 2-10 mg/ml.

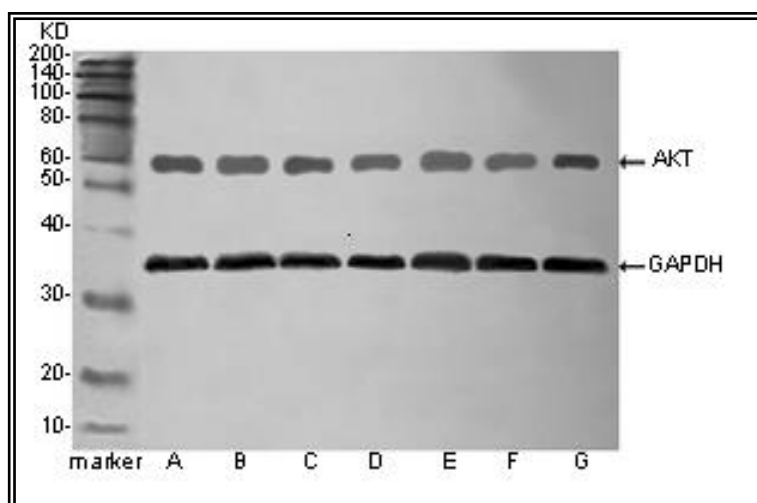
11.3. WESTERN BLOT

Western blot je metoda hibridizacije proteina s određenim antitijelima od interesa. Ovom metodom se može pronaći samo jedan protein od interesa iz miksa proteina u uzorku, ako za njega imamo dizajnirano antitijelo. Koristeći *Western blotting*

možemo odrediti da li je određeni protein više ili manje eksprimiran u određenom uzorku u odnosu na neki određeni vremenski period ili na neki drugi uzorak.

Tehnika *Western blota*:

- separiranje proteina putem SDS – PAGE (tj. separiranje proteina po njihovoj veličini),
- prenošenje separiranih proteina sa poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu,
- inkubiranje membrane sa primarnim antitijelom,
- inkubiranje membrane sa sekundarnim antitijelom,
- vizualizacija rezultata.



Slika 39: Tipičan izgled *Western blota* nakon vizualizacije

Separiranje proteina putem SDS – PAGE, kao što sam naziv kaže, se vrši na denaturirajućem poliakrilamidnom gelu sa SDS deterdžentom. Proteini se separiraju po svojoj veličini putem klasične vertikalne gel elektroforeze. U uzorak proteina se dodaje β -mercaptoethanol, koji sprječava stvaranje disulfidnih veza između proteina, i *bromphenol blue* za vizualizaciju toka elektroforeze.

Prenošenje separiranih proteina s poliakrilamidnog gela na nitroceluloznu membranu se vrši također putem elektroforeze. U

ovom slučaju se naprave «sendviči» tj., u posebne kadice se određenim redoslijedom slože filter papiri, poliakrilamidni gel i nitrocelulozna membrana. Negativni naboj se uključuje na stranu gela, a pozitivni naboj se uključuje na stranu membrane, tako da pri uslovima niskog strujnog napona proteinski bendovi sa gela pređu na nitroceluloznu membranu.

Inkubiranje membrane s primarnim antitijelom se vrši preko noći na +4°C. Primarno antitijelo predstavlja specifično antitijelo za određeni protein koje se veže za taj protein.

Inkubiranje membrane sa sekundarnim antitijelom. Sekundarno antitijelo predstavlja kompleks protein – enzim i dodaje se zbog vizualizacije rezultata. Sekundarno antitijelo je najčešće konjugirano sa preoksidazom iz hrena (komercijalni kit).

Vizualizacija rezultata se vrši putem posebnih aparata ili putem razvijanja rentgenskog filma. Za vizualizaciju bendova proteina potrebno je prije slikanja dodati luminol da se pokrene hemiluminiscencija.

11.4. ENZIM VEZANI IMUNOSORBENTNI TEST (ELISA)

Enzim-vezani imunosorbentni test (ELISA) je test koji koristi antitijela i promjenu boje u identifikaciji određene supstance. Pomoću ELISA testa može se identificirati protein, obično antigen, u tečnom uzorku ili vlažnom uzorku.

ELISA se koristi kao dijagnostički alat u medicini i biljnoj patologiji, kao i kontrolu kvaliteta u različitim industrijama.

Ukratko, antigeni iz uzorka trebaju biti pričvršćeni na određenu površinu. Tada se nad površinom nanosi još specifično antitijelo tako da se može vezati za antigen. Ovo antitijelo je povezano s enzimom, a u posljednjem koraku dodaje se supstanca koja sadrži supstrat enzima. Sljedeća reakcija proizvodi detektabilni signal, najčešće promjenu boje u podlozi.

Izvođenje ELISA testa uključuje najmanje jedno antitijelo sa specifičnostima za određeni antigen. Uzorak s nepoznatom količinom antigena je imobilizovan na čvrstoj podlozi (obično polistirol mikrotitar ploča) ili nespecifično (putem apsorpcije na površinu) ili specifično (putem hvatanja od strane drugih antitijela specifičnih za isti antigen, u "sendviču" "ELISA"). Nakon što je antigen imobilizovan, detektujuće antitijelo se dodaje, formirajući kompleks sa antigenom. Antitijelo za detekciju može biti kovalentno vezano za enzim, ili može biti sekundarno antitijelo koje je povezano s enzimom putem biokonjugacije. Između svakog koraka, ploča se ispira blagim rastvorom deterdženta za uklanjanje bilo kojih proteina ili antitijela koja nisu specifično vezana. Poslije finalnog koraka pranja, ploča se razvija dodavanjem enzimskog supstrata kako bi se napravio vidljivi signal, što ukazuje na količinu antigena u uzorku.

DNK ČIPOVI

Microarray (ili DNK čip) predstavlja metodologiju koja se koristi za detekciju ekspresije hiljada gena istovremeno, ili pak hiljade različitih polimorfizama na jednom genu ili više gena u isto vrijeme. *Mikroarray* je tehnika koja je naročito korisna u linkage studijama ili pak istraživanjima asocijacije određenih polimorfizama, ekspresije gena ili slično sa različitim oboljenjima ili stanjima.

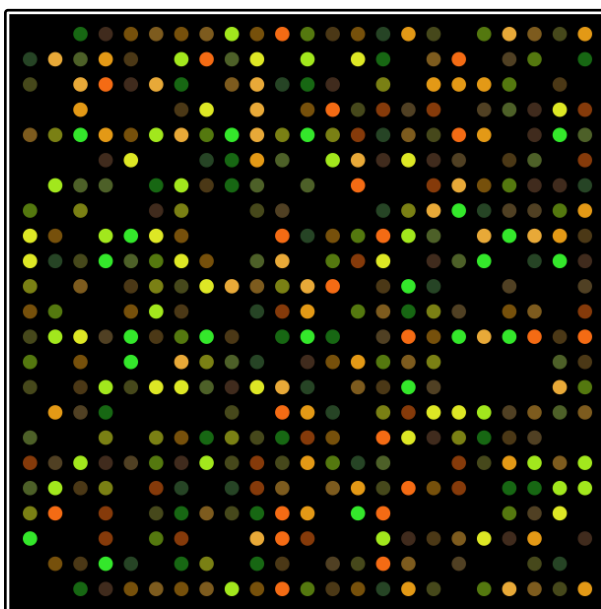
Mikroarray tehnika se ugrubo može podijeliti na:

1. *Mikroarray* tehnika determinacije ekspresije gena od interesa - u tom slučaju početna matrica za ovu analizu je informaciona RNK, dok je na staklenim slajdovima vezana cDNK molekula od interesa,
2. Mikroarray tehnika determinacije polimorfizama u jednom ili više gena, gdje je početna matrica DNK molekula,
3. Komparativna genomska hibridizacija – mikroarray tehnika koja se koristi za otkrivanje broja kopija određenog gena ili egzoma određenih gena od interesa.

DNK čipovi su mikroskopski slajdovi koji se štampaju s hiljadama sitnih tačaka u definiranim položajima, pri čemu svako mjesto sadrži DNK sekvencu od interesa ili gen od interesa. Molekule DNK vezane za svaki slajd djeluju kao reference za otkrivanje ekspresije gena, odnosno dijela transkriptoma (skup transkripata iRNK od grupe gena). Specifične sekvence od interesa se vezuju za površinu mikročipa za koju će kasnije biti hibridizirane cDNK izolirane iz uzorka od interesa, koje će biti fluorescentno obilježene. Treba naglasiti da se cDNK sekvence od interesa obilježavaju ili zelenom bojom – fluorohrom boja Cy3 ili crvenom bojom – fluorohrom boja Cy5. Nakon obilježavanja cDNK s fluorescentnom bojom, one hibridiziraju na staklenom slajdu s

DNK sekvencama od interesa. Nakon hibridizacije slajdovi se ispiru i fluorescencija se mjeri, najčešće laserskom kamerom koja može očitati ekscitiranu fluorescenciju.

Za izvođenje analize, iRNK molekule se tipično prikupljaju i iz eksperimentalnog uzorka i od referentnog uzorka (naprimjer, referentni uzorak bi mogao biti uzorak iRNK od zdravih dobrovoljaca, a eksperimentalni uzorak bi se mogao prikupiti od pojedinaca koji su oboljeli od bolesti koje se istražuju). Informaciona RNK mora biti transferirana u komplementarnu DNK (cDNK), a svaki uzorak mora biti označen fluorescentnom bojom (naprimjer, eksperimentalni cDNK uzorak može biti označen crvenom fluorescentnom bojom, dok referentna cDNK može biti označena zelenom fluorescentnom bojom)(Slika 40).



Slika 40. Prikaz DNK mikročipa nakon analize

Dva uzorka se zatim miješaju zajedno i vezuju za slajdove mikročipa, odnosno dešava se hibridizacija cDNK od interesa sa zakačenom referentnom DNK u slajdu. Nakon hibridizacije, softver očitava fluorescentne boje koje se nalaze u tačkama slajda, i to tako da: ako je ekspresija određenog gena veća u eksperimentalnom uzorku nego u referentnom uzorku, tada

odgovarajuća tačka na mikrostrukturi postaje crvena. Nasuprot tome, ako je ekspresija u eksperimentalnom uzorku manja nego u referentnom, tačka se pojavljuje zeleno. Na kraju, ako u oba uzorka postoji jednaka ekspresija, onda se tačka na mikroslijedu pojavljuje u žutoj boji.

Podaci koji se prikupljaju pomoću mikročipova mogu se koristiti za kreiranje profila za ekspresiju gena, koji pokazuju istovremene promjene u ekspresiji mnogih gena kao odgovor na određeno stanje ili tretman.

Upotreba *microarray* tehnike je raznovrsna te je možemo svrstati u nekoliko različitih područja:

- Determinacija novih gena: DNK *Microarray* tehnologija pomaže u identifikaciji novih gena, njihovom funkcionisanju te nivoima ekspresije u različitim uslovima ili pak različitim tkivima.
- Pomoć pri dijagnostici bolesti: DNK *Microarray* tehnologija pomaže istraživačima da saznaju više o različitim bolestima kao što su bolesti srca, mentalne bolesti, zarazne bolesti, a naročito karcinomima. Uz pomoć *microarray*-a, moguće je klasificirati vrste karcinoma po genskoj ekspresiji u ćelijama karcinoma u odnosu na zdrave ćelije.
- Razvoj novih „pametnih“ lijekova: *Microarray* ima široku primjenu u farmakogenomici, odnosno proučavanju korelacija između terapijskih odgovora na lijekove i genskih profila pacijenata.
- Genotoksikologija: *Microarray* tehnologija može pomoći u određivanju korelacija djelovanja određenih ekstrakata ili hemijskih spojeva na gensku regulaciju ćelija.

PRIMJERI MOLEKULARNO-GENETIČKE KARAKTERIZACIJE KOD OBOLJENJA

13.1. HRONIČNA MIJELOIČNA LEUKEMIJA

Leukemija je maligna bolest (kancer) koštane srži i krvi. Karakterizirana je nekontrolisanom akumulacijom krvnih ćelija. Leukemija je podijeljena u četiri kategorije:

1. akutna limfatična leukemija,
2. hronična limfatična leukemija,
3. akutna mijeloična leukemija,
4. hronična mijeloična leukemija.

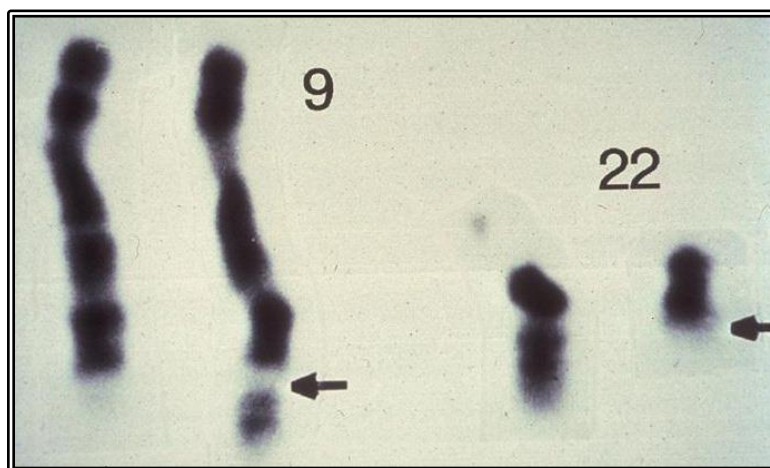
Najčešći tip leukemije kod odraslih osoba je akutna mijeloična leukemija (AML), zatim hronična limfatična leukemija (CLL), dok je kod djece najzastupljenija akutna limfatična leukemija (ALL). Hronična mijeloična leukemija (CML) se javlja u nešto manjem broju slučajeva. Leukemije zauzimaju 26% svih kancera među djecom. CLL se najčešće javlja kod osoba starijih od 50 godina, dok se AML i CML najčešće javljaju kod osoba starijih od 60 godina. Ovi kanceri su najčešći u sedamdesetim, osamdesetim i devedesetim godinama života. Oko 41% svih leukemija su hronične leukemije.

Prvi simptomi leukemije su često nespecifični i slabi. Oni uključuju: zamor, prekomjerno krvarenje, slabost, gubitak tjelesne težine, bol u zglobovima, povećanu slezenu, limfne čvorove i jetru. Pri kontrolisanju krvne slike, mogu se primjetiti abnormalnosti kao što su: anemija, leukopenija, granulocitopenija, trombocitopenija ili trombocitoza u slučaju hronične mijeloične leukemije. Mnoge ćelijske promjene su povezane sa leukemijama, a još uvijek nije tačno poznato zašto se te promjene dešavaju. Smatra se da je u razvoj leukemije uključeno dosta faktora kao što su: starost, radijacija, hemijski agensi, virusi, pušenje, neki lijekovi te naravno genetički faktori.

Rizik za leukemiju je povećan 15 puta kod djece sa *Downovim* sindromom, kao i kod osoba sa rijetkim poremećajima kao što su *Fanconi* anemija, *Blooms* sindrom i *ataxia telangiectasia*. Danas je poznato da svi kanceri, uključujući i leukemije, počinju kao mutacije u genetičkom materijalu, odnosno DNK, u pojedinim ćelijama. Vrlo često se kod leukemija mogu naći različite translokacije – izmjene segmenata između hromosoma.

13.1.1. FUZIJSKI GENI

Fuzijski geni su hibridni geni formirani od dva ili više prethodno odvojenih gena. Mogu se javiti kao rezultat translokacije, delecije ili hromosomske inverzije. Prva korelacija između hromosomske aberacije i malignog oboljenja ustanovljena je 1960. godine. Kod bolesnika sa hroničnom mijeloičnom leukemijom otkriven je jedan mali hromosom nazvan Filadelfija (Ph) hromosom, nastao translokacijom između hromosoma 9 i 22 $t(9q34/22q11)$ (Slika 41).



Slika 41. Prikaz translokacije 9:22

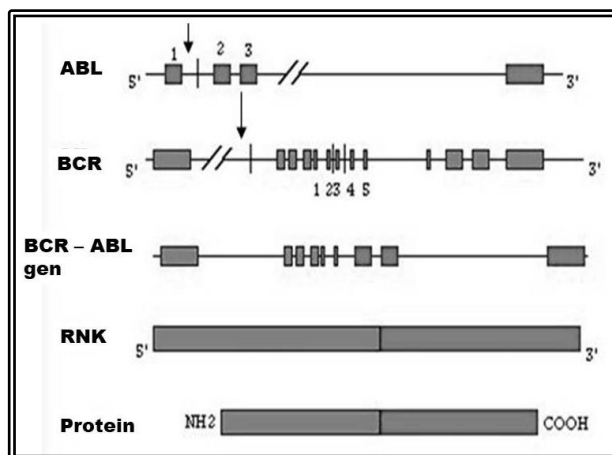
Zadnjih godina je primijećeno povećanje broja hromosomskih translokacija i fuzijskih gena kod leukemija koje su karakterizirane na molekularnom nivou.

13.1.1.1. VMLL/AF4 fuzijski gen (T(4;11)(Q21;Q23))

Molekularne studije su pokazale da t(4;11)(q21;q23) uključuje MLL i AF4 gene. MLL-AF4- pozitivne leukemije su primijećene u 50-70% kod novorođenčadi s ALL, te 5% u pedijatrijskim i adultnim slučajevima ALL. Prisutnost t(4;11)(q21;q23) je asocirano sa pro-B-ALL fenotipom i s koekspresijom mijeloidnih antigena (CD15 i CD65), te sa NG2 antigenom.

13.1.1.2. BCR/ABL fuzijski gen (T(9;22)(Q34;Q11))

Philadelphia hromosom (Ph), iako je tipičan za CML, javlja se u oko 5% dječjih ALL, te 20-50% svih odraslih osoba sa ALL (Slika 42).



Slika 42. Prikaz fuzije BCR-ABL gena

13.1.1.3. TEL/AML1 fuzijski gen (T(21;21)(P13;Q22))

Fuzijski gen t(12;21)(p13;q22) je prvi put opisan 1995. godine. Mnoge kasnije studije su pokazale da je ova translokacija, iako nedetektabilna posredstvom konvencionalne citogenetike, najčešća translokacija kod djece sa ALL

13.1.1.4. PML/RARA fuzijski gen (T(15;17)(Q22;Q21))

Fuzijski gen t(15;17) je asociran sa akutnom promijelocitnom leukemijom (APL), AML subsetom sa M3 citomorfologijom. Geni koji su uključeni u ovu translokaciju su PML (*putative novel*

transcription factor) na genu 15, i RARA (*retinoic acid receptor - α*) na hromosomu 17.

13.1.1.5. AML1/ETO fuzijski gen (T(8;21)(Q22;Q22))

Fuzije gena t(8;21)(q22;q22) prvi put opisane 1973 godine, gdje t(8;21) spaja AML1 gen za ETO gen. AML1/ETO fuzijski transkripti su nađeni u svim t(8;21) pozitivnim AML, kao i u slučajevima kompleksnih translokacija i velikom dijelu t(8;21) negativnim AML.

13.1.2. MINIMALNA REZIDUALNA BOLEST (MRB)

Kad se leukemija dijagnosticira kod pacijenta, broj leukemijskih ćelija je oko 10¹²-10¹³. Većina pacijenata dostigne potpunu remisiju oko 4 sedmice posije hemoterapije. Potpuna remisija ne znači da leukemičnih ćelija više nema u organizmu, nego znači da je njihov broj ispod detektabilnog nivoa pri korištenju tradicionalnih metoda (npr. od 1-5%). Za to vrijeme, otprilike 10¹⁰ malignih ćelija je prisutno u organizmu pacijenta. Takve ćelije predstavljaju minimalnu rezidualnu bolest (MRB). Testovi na MRB mogu pokazati prisustvo tumora u veoma ranom stadiju. Kod pacijenata koji su već na terapiji, prisustvo MRB indicira da tretman nije bio potpun ili je tretman bio neodgovarajući. Detekcija rezidualnih ćelija omogućava duže praćenje tumora prilikom i poslije hemoterapije. Pokazano je da nivo minimalne rezidualne bolesti predstavlja važan prognostički faktor. Također, detekcija povećanja nivoa MRB omogućava predviđanje neminovnog relapsa bolesti.

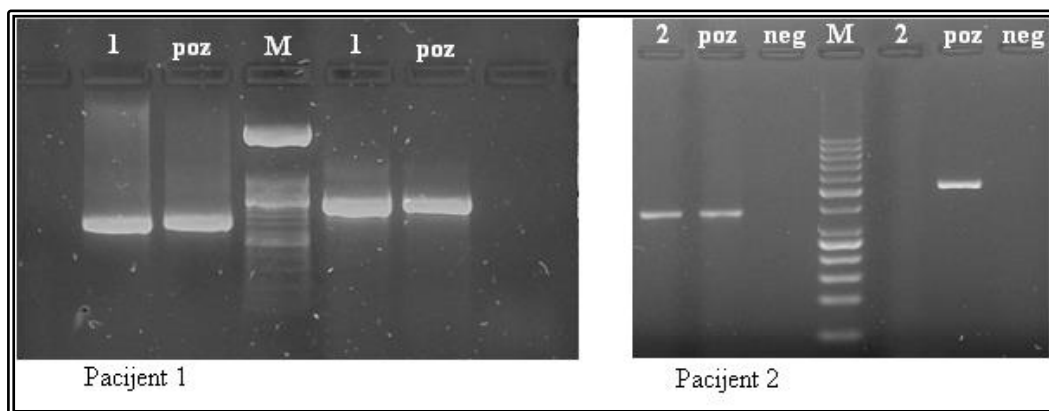
Metode koje se koriste za otkrivanje minimalne rezidualne bolesti počivaju na detekciji odgovarajućih markera specifičnih za maligne ćelije u leukemiji. Takvi markeri moraju biti detektovani s visokom osjetljivošću, trebaju biti prisutni u svim malignim ćelijama i biti stabilni prilikom razvoja bolesti.

U PCR metode za otkrivanje minimalne rezidualne bolesti spadaju:

1. reverzna transkripcija – RT PCR,

2. kvantitativni *real-time* PCR.

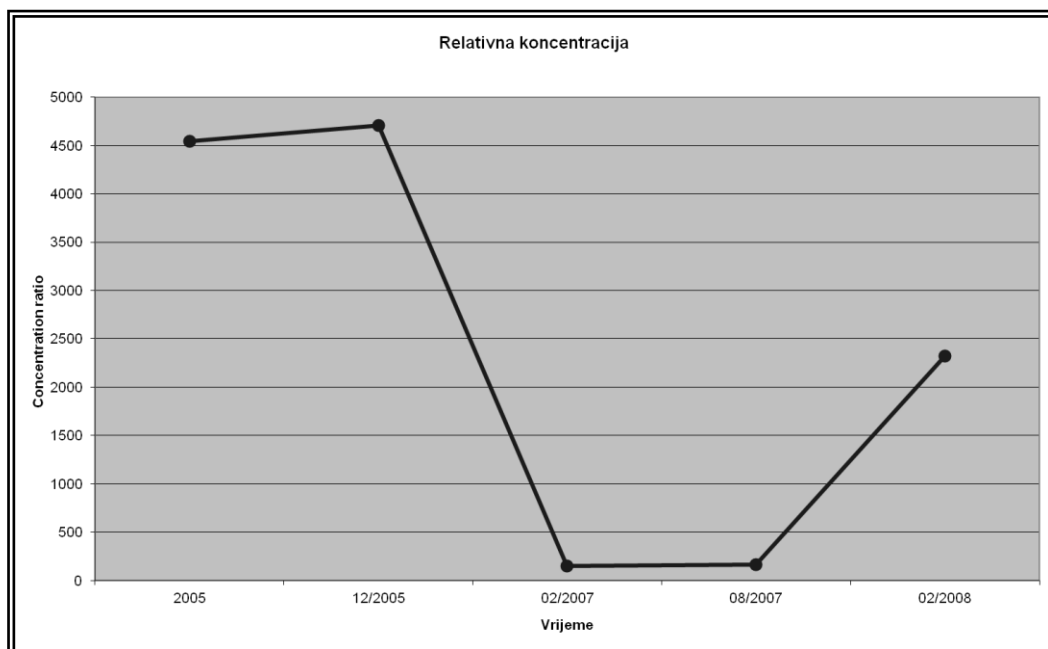
Molekularno genetička karakterizacija BCR-ABL gena, odnosno hronične mijeloične leukemije se vrši preko analize reverzne transkripcije i nested PCR-a. Početna matrica za ovu analizu je RNK molekula, odnosno nova informacijska RNK koja nastaje fuzijom BCR-ABL gena. Početna analiza se može vidjeti na agaroznom gelu (Slika 43).



Slika 43. Agarozni gelovi nested PCR amplifikacije kod dva pacijenta koji imaju suspektanu dijagnozu CML.

Dva pacijenta, sa sličnim simptomima koji vode ka dijagnozi hronične mijeloične leukemije su se javili na analizu s preporukom ljekara. Nakon izolacije RNK molekule i nested PCR-a, može se jasno vidjeti da je kod pacijenta 1 potvrđena dijagnoza hronične mijeloične leukemije, odnosno u liniji jedan iza markera (M) na slici iznad jasno se vidi da je amplificiran BCR-ABL gen. Uz svaki uzorak za ovu analizu, potrebno je amplificirati i pozitivnu i negativnu probu (uzorak), te *housekeeping* gen (u ovom slučaju betaaktin), koji potvrđuje da je izolacija i amplifikacija bila uspješna. Kod pacijenta 2, gdje je betaaktin prije markera, a BCR-ABL gen poslije markera, jasno se vidi da se u ovom slučaju ne može potvrditi dijagnoza hronične mijeloične leukemije, jer nije amplificiran BCR-ABL gen, iako je izolacija i amplifikacija bila uspješna, što se može vidjeti po amplificiranom beta aktin genu (linija jedan na slici desno).

Osim početne dijagnoze, odnosno pozitivnog BCR-ABL transkripta, također je molekularno-genetičkim metodama moguće i pratiti minimalnu ostatnu bolest. U tom slučaju, potrebno je tijekom određenog vremena uzimati uzorak krvi i/ili koštane srži od pacijenta, izolirati RNK molekulu i uraditi reverznu transkripciju i *real-time* PCR. Nakon analize relativne ekspresije moguće je u bilo kojem programu grafički obraditi relativnu ekspresiju i pratiti minimalnu ostatnu bolest (Slika 44).



Slika 44. Praćenje minimalne ostatne bolesti kod pacijenta sa dijagnozom CML

Na Slici 44 se vidi da je pacijentu kome je dijagnosticirana CML praćena minimalna ostatna bolest u pet vremenskih tačaka. Prva tačka na grafikonu označava vrijeme inicijalne dijagnoze. Nakon skoro godinu dana, u drugoj vremenskoj tački, primijećeno je povećanje koncentracije BCR –ABL fragmenta, i u tom trenutku pacijent prima *Gleevec*® lijek. Nakon godinu dana, u trećoj vremenskoj tački vidi se jasan pad koncentracije BCR-ABL fragmenta, gdje je skoro neprimjetna koncentracija ovog gena. Taj trend se nastavlja i nakon 6 mjeseci, u vremenskoj tački četiri, gdje pacijent nastavlja s primanjem lijeka, ali manje doze nego

prije. U petoj vremenskoj tački vidi se povećanje koncentracije BCR-ABL fragmenta, što ukazuje na potrebu za novim titriranjem doze lijeka koji pacijent prima.

13.2. *DUCHENNE/BECKER* MIŠIĆNA DISTROFIJA

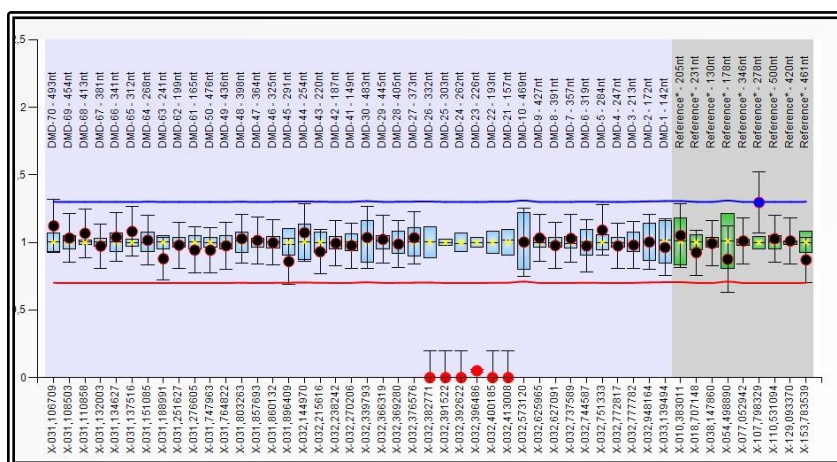
Duchenne/Becker mišićna distrofija je progresivno oboljenje mišića koje primarno zahvata skeletne mišiće i srčani mišić. *Duchenne* mišićna distrofija se razvija u ranom djetinjstvu sa zaostajanjem u motornom razvoju i slabosti proksimalnih mišića.

Kod mišićne distrofije tipa *Duchenne* i tipa *Becker*, u pitanju je X vezano nasljeđivanje, odnosno majke su nosioci, a sinovi oboljevaju od ove vrste bolesti. Tu pojavu uočili su *Becker* i *Kiener* 1955. godine. *Eric Hoffman* je 1987. godine definirao produkt gena lociran na Xp21 koji je nazvan distrofin pa se i gen naziva distrofin (DMD). U usporedbi s ostalim genima DMD je veliki i najčešća promjena koja se na njemu nalazi je delecija, što znači da gen može u cijelosti manjkati ili manjkaju samo pojedini dijelovi gena.

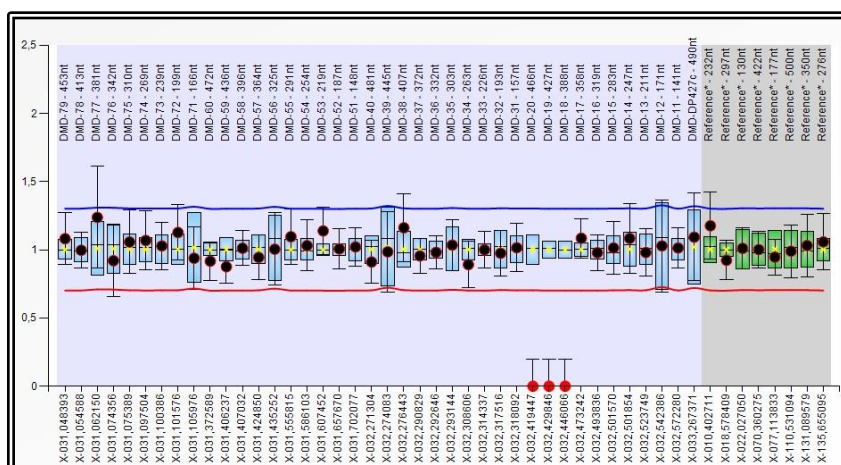
Moguće su i druge promjene na distrofin genu, ali su ispitivanja pokazala da u 70% bolesnika s mišićnom distrofijom tipa *Duchenne* može se dokazati potpuna delecija distrofin gena što dovodi i do odsutnosti distrofina u stanicama skeletnih mišića. Kod *Beckerovog* oblika mišićne distrofije delecija je smještena na kraju DMD gena i dokazuje se u 80% bolesnika. Distrofin je bjelančevina koja se nalazi ispod membrane mišićnog vlakanca. Težina kliničke slike *Duchenneovog* i *Beckerovog* oblika mišićne distrofije proporcionalna je s opsegom delecije distrofin gena. Što je delecija opsežnija to je manjak distrofina veći i to je klinička slika teža pa je *Duchenneov* oblik mišićne distrofije teži od *Beckerovog* oblika.

Najbolji način za identifikaciju delecija na DMD genu je MLPA analiza. Probe koje se koriste za ovu analizu su P034 i P035 SALSA MLPA probe (*MRC-Holland*), i obuhvataju svih 79 egzona DMD gena.

Nakon uzimanja prikladnog biološkog uzorka (u ovom slučaju tri ml pune krvi) te prigodne DNK izolacije, pristupa se MLPA analizi. Za MLPA analizu je potrebno kvantificirati izoliranu DNK i razblažiti je na 20 ng/ μ l, gdje će početna DNK količina u jednoj MLPA reakciji biti 100 ng (optimalna količina). Uz uzorak koji se analizira, potrebno je dodati i minimalno tri referentno negativna uzorka (najčešće DNK zdravih dobrovoljaca, muškog spola, koji nemaju simptome *Duchenne/Becker* mišićne distrofije). Nakon MLPA analize, i razdvajanja fragmenata na sekvenceru, uzorak se analizira pomoću *Coffalyser.net* programa, da bi se identificirale moguće delecije DMD gena (Slika 45 i 46).

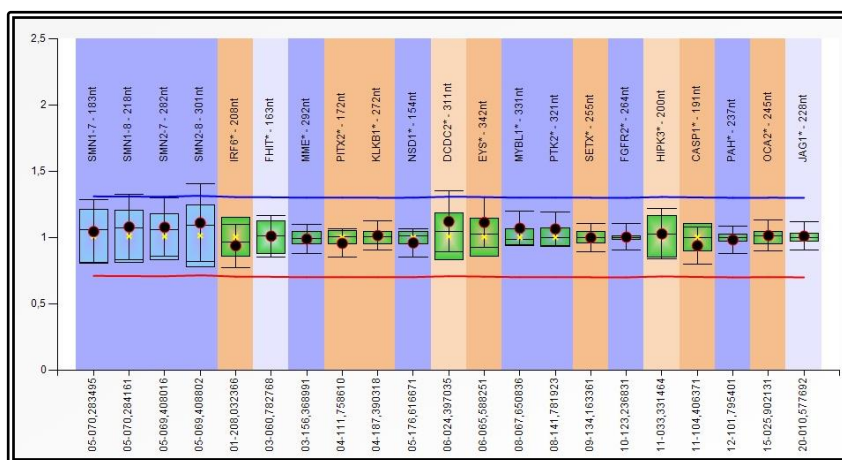


Slika 45. DMD miks 1 MLPA kit P034 – delecija egzona 21-26



Slika 46. DMD miks 2 MLPA kit P035 – delecija egzona 18-20

Po preporuci ljekara, urađena je molekularno-genetička karakterizacija DMD gena za dječaka, 6 godina, sa simptomima koji se mogu povezati sa *Duchenne* mišinom ditrafijom. Od biohemijskih parametara, primjećen je visok nivo kreatinin kinaze što je jedan od glavnih pokazatelja *Duchenne* mišićne distrofije. MLPA analiza, što se može vidjeti na slikama 45 i 46 je pokazala da je kod dječaka prisutna hemizigotna delecija 9 egzona, od egzona 18 do egzona 26. U ovom slučaju, potvrđena je dijagnoza *Duchenne* mišićne distrofije. U slučaju da je analiza negativna, odnosno da ne postoje delecije na ovom genu, analiza bi izgledala kao na Slici 47.



Slika 47. Prikaz normalnog genotipa, u ovom slučaju SMN gena, MLPA kit P060

13.3. CISTIČNA FIBROZA

Cistična fibroza je nasljedna bolest koja uzrokuje da neke žlijezde stvaraju nenormalne lučevine radi čega dolazi do pojave nekoliko simptoma od kojih najvažniji zahvaćaju probavni sistem i pluća. Cistična fibroza utječe na ćelije koje proizvode sluz, znoj i probavne sokove. Ove izlučevine su normalno po gustoći rijetke i neljepljive. Kod osoba koji boluju od cistične fibroze, mutacije na CFTR genu uzrokuju da sekret postane ljepljiv i gust. Umjesto da izlučevine djeluju kao lubrikant, one se lijepe za kanale i prolaze, posebno u plućima i gušterači. Znakovi i simptomi cistične fibroze

variraju, ovisno o težini bolesti. Čak i kod iste osobe, simptomi se mogu pogoršati ili poboljšati kako vrijeme prolazi. Neke osobe čak ne razviju simptome do adolescencije ili odrasle dobi. Osobe sa cističnom fibrozom imaju viši od normalnog nivoa soli u znoju te je prvi test za dijagnozu cistične fibroze znojni test. Cistična fibroza najčešće utiče na respiratorni sistem i digestivni sistem, iako su mogući i ponavljajući upalni procesi gušterače, upala pluća i sterilnost.

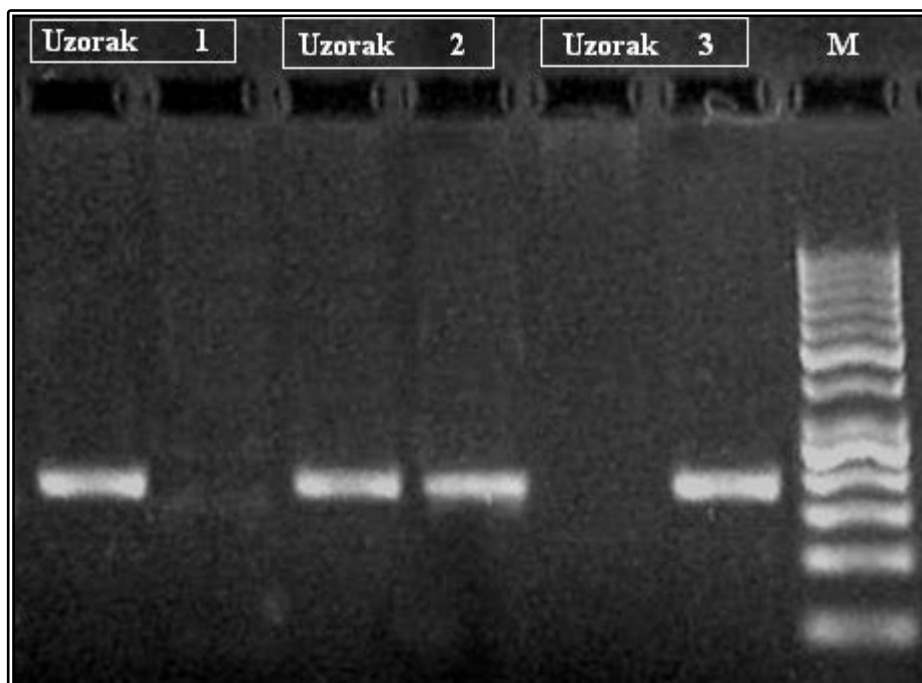
Uzrok cistične fibroze su mutacije u CFTR genu koji sadrži upute za izradu transmembranskih proteinskih kanala koji prevoze negativno nabijene čestice (hlorid jone) u i iz ćelija. Mutacije CFTR gena remete funkciju hloridnih kanala, sprečavajući ih da regulišu protok hloridnih iona i vode kroz ćelijske membrane. Najčešća mutacija na CFTR genu identificirana kod oboljelih od cistične fibroze je delecija 3 bazna para CTT u egzonu 10 ovog gena, koja je nađena kod oko 70% oboljelih od cistične fibroze (poznatija kao $\Delta F508$ mutacija, odnosno delecija fenilalanina na mjestu 508). Ovu mutaciju je moguće identificirati putem ASA PCR metode.

Nakon uzimanja prikladnog biološkog uzorka (u ovom slučaju tri ml pune krvi) te prigodne DNK izolacije, potrebno je uraditi dvije PCR reakcije kojom će se amplificirati dva fragmenta za jedan uzorak (mutantni i *wildtype*). Fragmenti se razvlače na 2% agaroznom gelu (jedan uzorak u dvije linije), i očitava se rezultat. Prajmeri koji se koriste u reakciji su dva *forward* i jedan *reverse* prajmer:

<i>Forward</i> deletion	5'-ACCATTAAGAAAATATCATCTT-3
<i>Forward</i> normal	5'-ACCATTAAGAAAATATCATTGG-3
<i>Reverse</i>	5'-CTCTTCTAGTTGGCATGCT-3

Prema preporuci ljekara, majka koja ima dijete sa suspektnom dijagnozom cistične fibroze se javila za molekularno – genetičku karakterizaciju ove bolesti, odnosno delta F508 mutacije. Nakon izolacije DNK molekule i ASA PCR analize, mogu se vidjeti sljedeći rezultati (Slika 48), gdje je u prve dvije linije negativan uzorak kao

kontrola, u trećoj i četvrtoj liniji DNK majke, a u petoj i šestoj liniji DNK djeteta sa suspektnom dijagnozom. Zadnja linija je DNK marker.



Slika 48. Prikaz CFTR slučaja na agaroznom gelu nakon ASA PCR-a.

Prema laboratorijskom protokolu, u prvoj liniji je uvijek PCR s *wildtype forward* prajmerom, a u drugoj liniji PCR s mutacionim prajmerom. Kao što se može primijetiti, u prvom uzorku prisutan je samo *wildtype* fragment (jedna vrsta kontrolnog uzorka), dok je u uzorku 2 prisutan i *wildtype* i mutacioni fragment, što znači da je u ovom slučaju majka heterozigot, odnosno nosi i *wildtype* (normalni) alel i mutacioni alel. Kod uzorka 3, gdje je amplificirana DNK djeteta sa suspektnom cističnom fibrozom, vidi se samo mutacioni fragment, što znači da je potvrđena dijagnoza cistične fibroze u ovom slučaju, jer ne postoji *wildtype* fragment kod djeteta. U slučaju gdje se utvrđuje autosomalno recesivna bolest, potrebno je testirati i uzorak oca, ali u ovom slučaju taj uzorak nije bio dostupan.

13.4. HEMOFILIJA A

Hemofilija A je X-vezani, recesivni poremećaj uzrokovan nedostatkom funkcionalnog faktora zgrušavanja VIII (FVIII) u plazmi. Ovaj poremećaj je najčešće nasljedan, mada su moguće i *de novo* mutacije na F8 genu. Hemofilija je jedna od najstarijih opisanih bolesti, povezanih sa genotipom organizma. Moderna historija hemofilije počinje 1803. godine s opisom porodice sa više članova oboljelih od hemofilije te prvim opisom hemofilije 1820 godine. Nedostatak FVIII proteina ili disfunkcionalni FVIII dovodi do poremećaja normalne kaskade koagulacije, što rezultira prekomjernim krvarenjem kao odgovorom na traumu i u težim slučajevima spontanim krvarenjima. Krvarenje se može pojaviti u zglobovima (npr, koljena, lakat); mišićima; centralnom nervnom sistemu probavnom, genitourinarnom, plućnom i kardiovaskularnom sistemu.

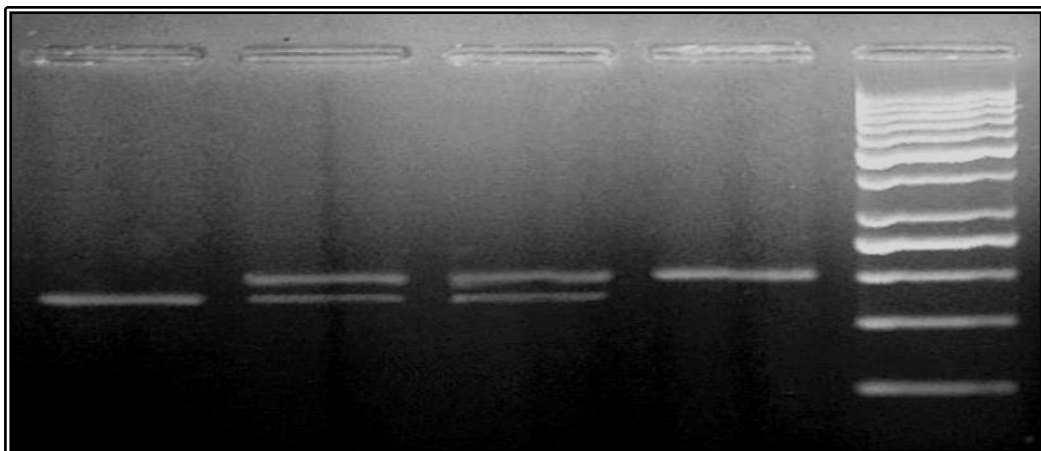
Gen koji kodira FVIII (F8) se nalazi na dugom kraku kromosoma X, na lokusu Xq28. Sastoji se od 26 egzona i 25 introna. Zreli FVIII protein sadrži 2332 aminokiseline. Tačkaste mutacije, manje delecije i duplikacije obuhvataju oko 50-60 % mutacija na F8C genu, dok veliki rearanžmani obuhvataju preostalih 40% mutacija na ovom genu. *Missense* mutacije, kao što je zamjena citozina u timin, mijenja sastav aminokiselina FVIII proteina, proizvodeći disfunkcionalni protein (FVIII smanjene aktivnosti). Ova mutacija je povezana s blagim, umjerenim ili teškim smanjenjem aktivnosti faktora VIII.

Mutacija c.6403C>T (p.Arg2135Stop) uzrokuje tešku hemofiliju A. Ovu mutaciju je moguće identifikovati putem RFLP PCR analize, koristeći restrikcioni enzim BclI (*Bacillus caldolyticus* I).

Nakon uzimanja prikladnog biološkog uzorka (u ovom slučaju tri ml pune krvi) te prigodne DNK izolacije, potrebno je uraditi PCR reakciju kojom će se amplifikirati egzon 22 F8 gena (unutar kojeg se nalazi navedena mutacija), veličine 159 bp. Nakon PCR reakcije, i provjere PCR produkta na 2% agaroznom gelu, potrebno je inkubirati PCR produkt s BclI enzimom i to tako što

se pomiješa 8 μ l PCR produkta s 2 μ l enzima i inkubira na 50°C preko noći. Nakon inkubacije, fragmenti se razvlače na 2% agaroznom gelu, i očitava se rezultat (Slika 49).

Restriksijski BclI enzim je izoliran iz bakterije *Bacillus caldolyticus* i prepoznaje sljedeću sekvencu: TGATCA, te je reže na mjestu između prvog timina i guanina: T GATCA. U ovom slučaju, *wildtype* (normalni) alel je C (citozin), a mutirani alel je T (timin), tako da u slučaju *wildtype* homozigota (bez mutacije), genotipa CC, PCR produkt neće biti izrezan enzimom, u slučaju heterozigota, pola PCR produkta će biti izrezano, genotip CT, a u slučaju mutiranog homozigota (mutacija na oba hromosoma), sav PCR produkt će biti izrezan – genotip TT.



Slika 49. Prikaz slučaja F8 mutacije kod porodice

Porodica (majka, dvije kćerke i sin) po preporuci ljekara su radili molekularno-genetičku karakterizaciju hemofilije A, gdje je sinu određena dijagnoza hemofilije A. Nakon RFLP analize, na slici iznad može se vidjeti sljedeći rezultat: u liniji jedan je DNK sina, koji ima hemizigotnu mutaciju, obzirom da je izrezan kompletan fragment i dijagnoza hemofilije A je potvrđena. Majka – linija 2 je nosilac mutacije – heterozigot, kao i jedna kćerka – linija 3, što se može vidjeti po tome da je izrezano 50% PCR fragmenta te se prikazuju dva fragmenta na agaroznom gelu. Druga kćerka, čija je amplificirana DNK u četvrtoj liniji, je homozigot i nije nosilac

mutacije, što se vidi po tome da PCR fragment nije izrezan posredstvom *BclI* enzima.

13.5. HANTINGTONOVO OBOLJENJE (*HUNTINGTON CHOREA*)

Huntingtonova bolest je progresivni poremećaj mozga koji uzrokuje nekontrolisano kretanje, emocionalne probleme i gubitak sposobnosti razmišljanja (kognicija). Učestalost Huntingtonove bolesti je 3 do 7 na 100.000 osoba evropskog porijekla.

Huntingtonova bolest kod odraslih je najčešći oblik ovog poremećaja, obično se pojavljuje u tridesetoj ili četrdesetoj godini života. Rani znaci i simptomi mogu uključiti razdražljivost, depresiju, male nehotične pokrete, lošu koordinaciju i probleme u učenju novih informacija ili donošenju odluka. Mnogi ljudi s Huntingtonovom bolesti razvijaju nehotično kretanje ili trzaje pokreta poznatih kao horea. Kako bolest napreduje, ovi pokreti postaju izraženiji. Pojedinci mogu imati problema sa hodom, govorom i gutanjem. Osobe s ovim poremećajem doživljavaju i promjene u ličnosti i smanjenje sposobnosti razmišljanja i rasuđivanja. Pojedinci s dijagnozom Huntingtonove bolesti obično žive oko 15 do 20 godina nakon početka znakova i simptoma.

Manje česti oblik Huntingtonove bolesti poznat je kao maloljetni oblik, te počinje u djetinjstvu ili adolescenciji. Također uključuje probleme kretanja i mentalne i emocionalne promjene. Dodatni znaci maloljetničkog oblika uključuju spore pokrete, nespretnost, česte padove, rigidnost te nejasni govor.

Hantigtonova bolest se nasljeđuje autozomalno dominantno, i svaki potomak ima 50% šanse za razvoj bolesti, međutim, ova mutacija se ne prenosi po općim zakonima nasljeđivanja, odnosno često je primjetno povećanje CAG sekvence u sljedećim generacijama. Studije rađene 1993. godine identificirale su gen asociran s Hantigtonovom bolešću, imenovan kao *interesting transcript 15* – IT 15, ili HD (HTT) gen. Ovaj gen je prvi put

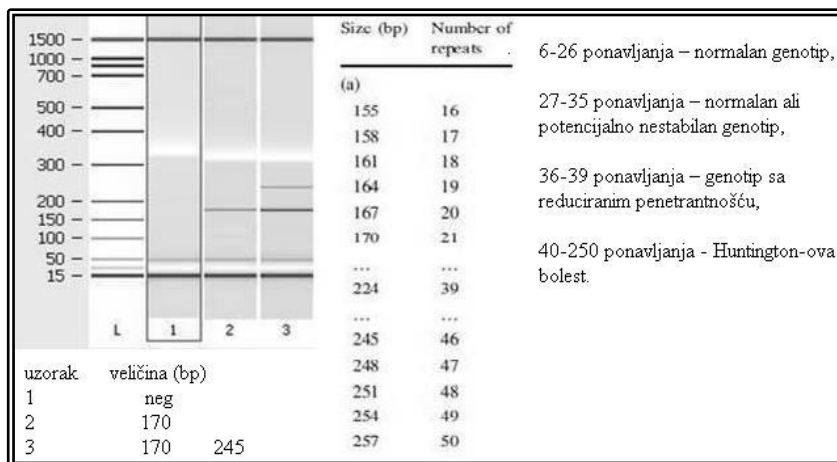
mapiran 1983. godine na p kraku hromozoma 4. HTT gen kodira protein hantingtin, koji je eksprimiran u mozgu, ali čija tačna funkcija nije još uvijek sasvim poznata.

Mutacija na HTT genu koja uzrokuje Huntingtonovu bolest uključuje DNK segment koji se naziva CAG trinukleotidni ponovak. Ovaj segment sastoji se od serije tri DNK nukleotida (citozin, adenin i guanin) koji se ponavljaju više puta zaredom. Obično se CAG segment ponavlja 10 do 35 puta unutar gena. Kod osoba sa Huntingtonovom bolesti, segment CAG se ponavlja 36 do više od 120 puta. Osobe sa 36 do 39 CAG ponavljanja mogu ili ne moraju razviti znake i simptome Huntingtonove bolesti, dok osobe sa 40 ili više ponavljanja gotovo uvijek razvijaju poremećaj.

Povećanje veličine segmenta CAG dovodi do proizvodnje neobično dugačke verzije proteina hantingtina koji je disfunkcionalan i dovodi do smrti neurona, a time i pojave simptoma bolesti.

Molekularno-genetičko testiranje bazira se na PCR amplifikaciji gena potencijalno zahvaćenog mutacijom.

Poslije *touch down* PCR-a, i elektroforeze, na osnovu veličine dobijenog amplifikata određuje se broj CAG ponavljanja, a time i stepen oboljenja (Slika 50).



Slika 50. Prikaz slučaja Huntingtonovog oboljenja

Na Slici 50 se mogu vidjeti analiza 2 uzorka i negativnog uzorka na liniji 1, gdje je analiza rađena putem *touch down* PCR-a i elektroforeza putem aparata Bioanalizator 2100. Prema središnjoj tabeli na Slici 50 se može odrediti broj ponavljanja CAG fragmenta prema veličini fragmenta na bioanalizatoru. Kod uzorka 2 vidi se jedan fragment veličine 170 baznih parova, što odgovara 21 broju ponavljanja, te u tom slučaju, uzorak 2 je negativan tako da u tom slučaju nije dijagnosticirana Huntingtonova bolest. Kod uzorka 3 s druge strane jasno se vide dva fragmenta i to jedan od 170 baznih parova a drugi od 245 baznih parova, što znači da je na jednom hromosomu kod ovog pacijenta prisutno 21 ponavljanje, a na drugom 46 ponavljanja CAG fragmenta. Obzirom da je Huntingtonova bolest autosomalno dominantna bolest potreban je veliki broj ponavljanja samo na jednom hromosomu da bi se bolest razvila te u slučaju kod pacijenta 2 može se sa sigurnošću reći da broj ponavljanja korelira sa simptomima Huntingtonove horee te je dijagnoza potvrđena.

13.6. NEUROFIBROMATOZA TIP 1

Neurofibromatoza tip 1 je stanje koje karakterisano promjenom boje kože (pigmentacija) i rastom tumora duž nerva u koži, mozgu i drugim dijelovima tijela. Znaci i simptomi ovog stanja u velikoj mjeri variraju među pogođenim osobama. Neurofibromatoza tip 1 ima incidencu od 1 od 3000 do 4000 osoba.

Počevši od ranog djetinjstva, skoro sve osobe sa neurofibromatozom tipa 1 imaju *caffe-au-lait* mrlje, što su ravne mrlje na koži koje su tamnije od okoline. Ove mrlje povećavaju se u veličini i broju kako pojedinac postaje stariji.

Većina odraslih s neurofibromatozom tipa 1 razvija neurofibrome, koji su (benigni) tumori i obično se nalaze na ili ispod kože. Ovi tumori mogu se javiti i kod nerva blizu kičmene moždine ili uz nerve drugdje u tijelu. Neke osobe sa neurofibromatozom tipa 1 razvijaju kancerozne tumore koji rastu duž nerva. Ovi tumori, koji

se obično razvijaju u adolescenciji ili odraslom dobu, nazivaju se malignih tumori perifernih nervnih organa. Ljudi s neurofibromatozom tipa 1 također imaju povećan rizik od razvoja drugih karcinoma, uključujući tumore mozga i kancer krvotvornog tkiva (leukemija).

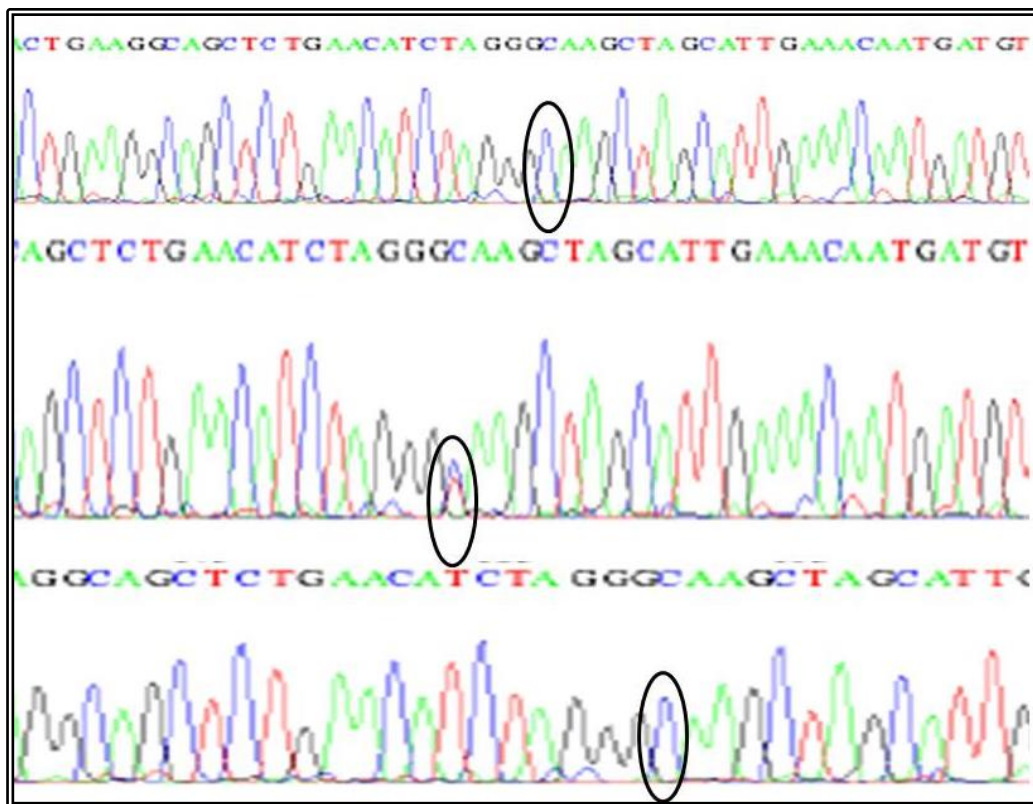
Tokom djetinjstva, benigni *Lisch* noduli često se pojavljuju u obojenom dijelu očiju (iris). *Lisch* noduli ne ometaju vid. Pojedini pogođeni pojedinci također razvijaju tumore koji rastu duž nerva koji vode od očiju do mozga (optički nerv). Ovi tumori, koji se nazivaju optički gliomi, mogu dovesti do smanjenog vida ili potpunog gubitka vida. U nekim slučajevima, optički gliomi ne utiču na vid.

Dodatni znaci i simptomi neurofibromatoze tipa 1 uključuju visok krvni pritisak (hipertenziju), neuobičajeno veliku glavu (makrocefaliju) i abnormalnosti skeleta kao što je abnormalna krivina kičme (skolioza). Iako većina osoba s neurofibromatozom tipa 1 ima normalnu inteligenciju, teškoće u učenju i poremećaj hiperaktivnosti deficita (ADHD) često se javljaju kod pogođenih.

Mutacije u genu NF1 uzrokuju neurofibromatozu tipa 1, koji se nalazi na hromosomu 17. NF1 gen daje uputstva za pravljenje proteina koji se naziva neurofibromin. Ovaj protein se proizvodi u mnogim ćelijama, uključujući nervne ćelije i specijalizovane ćelije koje okružuju živce (oligodendrocite i *Schwannove* ćelije). Neurofibromin djeluje kao supresor tumora, što znači da održava ćelije od rasta i dijeljenja previše brzo ili na nekontrolisan način. Mutacije u genu NF1 dovode do proizvodnje nefunkcionalne verzije neurofibromina koja ne može regulisati rast i podjelu ćelija. Kao rezultat, tumori poput neurofibroma mogu se formirati duž nerva širom tijela. Nejasno je kako mutacije u genu NF1 dovode do drugih osobina neurofibromatoze tipa 1, kao što su tačke *caffé-au-lait* i poteškoće u učenju.

Neurofibromatoza tip 1 nasljeđuje se autosomalno dominantno. Smatra se da je 50% mutacija na ovom genu *de novo* mutacije. Mutacije na ovom genu se zbog njihove karakteristike da se

rijetko ponavljaju (odnosno, ne postoje najčešće mutacije na ovom genu) identificiraju putem sekvenciranja (Slika 51).



Slika 51. Prikaz mutacije c.2953C>T na NF1 genu

Porodica s dječakom kojemu je dijagnosticirana neurofibromatoza tip 1 (otac, majka, dijete) su radili molekularno-genetičku karakterizaciju NF1 gena što se može vidjeti na Slici 51. U ovom slučaju, kod dječaka je potvrđena heterozigotna c.2953C>T mutacija i to *de novo* mutacija, obzirom da ta mutacija nije potvrđena kod roditelja. Prva sekvenca na slici je sekvenca majke, druga je sekvenca sina, a treća je sekvenca oca. Jasno se vidi heterozigotna mutacija kod sina, koja nije prisutna kod roditelja.

PRINCIPI GENSKE TERAPIJE

Ubrzani razvoj rekombinantne DNK tehnologije je otvorio mogućnost primijene novih terapijskih metoda, naročito u oblasti genske terapije i transplantacije. Već danas su u primijeni različiti pristupi genske terapije u liječenju širokog spektra oboljenja: karcinoma, neurodegenerativnih oboljenja, nasljednih monogenih i autoimunih bolesti.

Šta je genska terapija? Između mnoštva definicija, možemo izdvojiti onu koja definiše da su to svi oblici prevencije i liječenja u kojima se pacijentu inkorporiraju normalni geni koji korigiraju disfunkciju ili malfunkciju mutantnih gena odgovornih za određene bolesti. Za realizaciju navedenog potrebno je ostvariti sljedeće preduvjete:

- genski defekt mora biti jasno karakteriziran, a raspoloživi gen kloniran u formi koja je primjenjiva u namjenskim kliničkim programima (postaviti u npr. plazmidne vektore);
- neophodno je osigurati adekvatan sistem apliciranja gena u ciljno tkivo pacijenta – unošenjem DNK sekvence (putem odgovarajućeg viralnog ili neviralnog vektora) u ciljane (*“target”*) ćelije;
- nezaobilazan je i pogodan mehanizam pristupa ciljnom tkivu ili organu, koji može uključiti i inhalaciju, injektiranje ili druge slične metode.

Ako su prethodni uvjeti ispunjeni, tj. ekspresija nefunkcionalnog gena “korigirana”, u ciljnim ćelijama će se ispoljiti produkt insertiranog gena.

Ovakva procedura podrazumijeva unos gena ili gensku modifikaciju u cilju dobijanja željenog terapijskog rezultata. Dakle, introdukcijom vektora “unose” se korigovane kopije “pogrešnih” gena u ćelije domaćina (Tabela 6). Pod pojmom genska terapija vrlo često se podrazumijeva i „terapija ćelijama“, gdje se introduciraju matične ćelije koje se kasnije dijele i

diferenciraju u željeni tip ćelija zamjenjujući degenerativne. Takav je slučaj kod tretmana pacijenata sa *Parkisonovom* i *Alzheimerovom* bolesti, ali i u reduciranju neželjenih posljedica degradacija ćelija. Cilj ovakvih procesa nije kloniranje integralnih ljudskih organizama, nego “uzgajanje” stem (matičnih, neizdiferenciranih) ćelija koje se mogu koristiti za razvoj terapijskih programa u novim pristupima tretiranju oboljenja. Matične ćelije predstavljaju izvor regenerativnih ćelija jer mogu generirati gotovo sve naknadno specijalizirane ćelije u ljudskom organizmu. Izdvajaju se nakon pet dana od iniciranja diobe – u fazi blastocita. Proces ekstrakcije, međutim, razara embrio, što sve češće postaje tema pravnih, etičkih i drugih rasprava. Zbog toga, su detektovana mjesta ovih ćelije unutar adultnih organizama (npr. masno tkivo) ili kod novorođenčadi (pupčana vrpca).

Dakle kada govorimo o genskoj terapiji, danas možemo izdvojiti više „pravaca“:

- genska terapija u užem smislu (podrazumijeva transfer gena u cilju korekcije mutacije);
- introdukcija gena u cilju dobijanja željenog odgovora na različita infektivna oboljenja, kao i tretmanu karcinoma (CART, vakcine protiv tumora i sl.);
- introdukcija matičnih ćelija (genetički modificiranih ili nemodificiranih) u organe i tkiva s ciljem terapijskog odgovora. Prilikom primjene većine navedenih tretmana potreban je prenosnik (vektor), „transporter“ koji može prenijeti gen do ciljane ćelije.

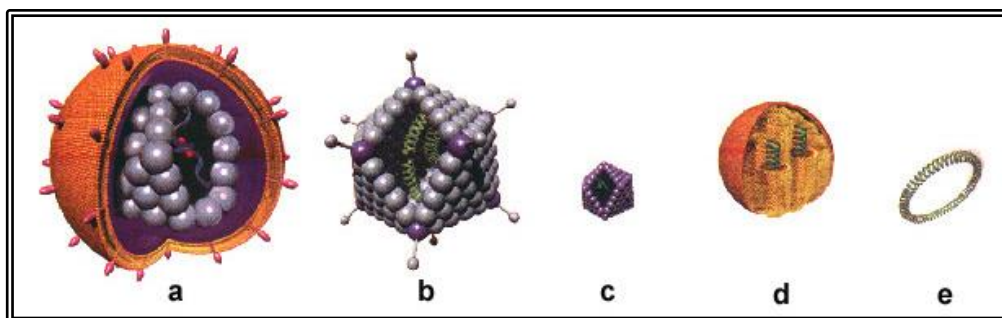
Vektori u genskoj terapiji mogu biti viralnog i neviralnog porijekla. U većini slučajeva se koriste virusni vektori, jer oni imaju „sposobnost“ penetracije u ćelije domaćina i ugradnju svojih gena u ćelijski genom. Naravno, prilikom ovakvog procesa potrebno je izbjeći litičku fazu, jer onda dolazi do ruptуре ćelije recipijenta i rezultat izostaje. U tu svrhu virusi se modificiraju u formu koja ne predstavlja prijetnju za ćelije domaćina.. Najčešći i najprikladniji viralni vektori su retrovirusi, adenovirusi, adenoasocirani i herpes virusi, a od neviranih – liposomi, lipopleksi i “gola” DNK (Slika 52). Liposomi su mikroskopski sitni mjehurići

koji se formiraju spontano kada se lipoproteini rasprše u tečnosti. U lipidne micele se mogu inkapsulirati molekule DNK (geni), a lipopleksi su mnogo kompleksnije – virusolike strukture. Direktna upotreba “gole” DNK realizira se samo u nekim slučajevima, jer je nedostatno učinkovita. Mikroinjektiranje, biolistika, elektroporacija i infuzija su novije tehnike genske terapije, koje predstavljaju specifične oblike genskog transfera. Direktno injektiranje DNK u tkivo primaoca obavlja se putem specifičnih igala. Alternativni metod takve procedure je tehnika specifičnog bombardovanja mikroprojektilima (biolistika). Vrlo mali fragmenti (4 μm) načinjeni od zlata ili volframa se oblože (inkapsuliraju) molekulama DNK i, specifičnim “pištoljem” (uz veliku početnu brzinu), “upucavaju” u ćelije ili tkiva. Metalne partikule (mikroprojektili) prodiru kroz staničnu stijenku i membranu i ne oštećuju ih, a pri tome se formiraju pore koje su dovoljnih dimenzija za ulazak strane DNK u unutrašnjost ciljane stanice.

Tabela 6. Mogući vektori u genskoj terapiji (izvor: Hadžiselimović i Pojskić, 2005)

VEKTOR		PREDNOSTI	NEDOSTACI
VIRALNI	RETROVIRUS	<ul style="list-style-type: none"> - veoma su dobro proučeni i efikasni u procesu transfera DNK u ćelije - dugotrajna ekspresija - rekombinacija malo vjerovatna 	<ul style="list-style-type: none"> - mala veličina inserta (do 8 kb DNK) - transfekcija samo onih ćelija koje su u aktivnoj diobi - rizik od insercione mutagenoze
	ADENOVIRUS	<ul style="list-style-type: none"> - transfekcija replicirajućih i nereplicirajućih ćelija - visoka ekspresija insertiranih gena - idealni za plućno tkivo - mogućnost aerosolne aplikacije - rijetka intergracija u genom domaćina 	<ul style="list-style-type: none"> - mala veličina inserta (7–8 kb DNK) - signifikantni rizik od upalnog odgovora - kratkotrajna genska ekspresija - vektor se gubi tokom ćelijske diobe - rizik od rekombinacije u domaćinu - ekspresija drugih proteina

	ADENO- ASOCIRANI VIRUS	<ul style="list-style-type: none"> - dugotrajna ekspresija i njena visoka sigurnost - transfekcija replicirajućih i nereklicirajućih ćelija - specijalno dobar za nervno tkivo 	<ul style="list-style-type: none"> - mala veličina inserta (7–8 kb DNK) - neproduktivna - infekcija bez virusa “pomagača” (<i>helper virus</i>)
	HERPES VIRUS	<ul style="list-style-type: none"> - rijetka intergracija u genom domaćina - insercija veličine do oko 30 kb 	<ul style="list-style-type: none"> - rizik od rekombinacije u domaćinu - kratkotrajna genska ekspresija
NEVIRALNI	LIPOSOMI	<ul style="list-style-type: none"> - ne nose viralne gene, pa ne izazivaju oboljenja 	<ul style="list-style-type: none"> - pri transferu gena, manja je efikasnost nego kod virusa - problemi sa veličinom vektora, što limitira količinu transferirane DNK
	LIPOPLEKSI	<ul style="list-style-type: none"> - nemaju imunogeno djelovanje, pa su podobniji za transfer nego virusi 	<ul style="list-style-type: none"> - veličina limitira količinu transferirane DNK
	“GOLA” DNK	<ul style="list-style-type: none"> - veoma korisna za konstrukciju vakcina - korisna u posebnim slučajevima 	<ul style="list-style-type: none"> - neefikasna u transferu gena - u većini tkiva je nestabilna
	MIKRO- INJEKTIRANJE	<ul style="list-style-type: none"> - sigurnost, preciznost i jednostavnost transfera 	<ul style="list-style-type: none"> - moguća neregularna proliferacija u tkivima - potrebno ponovno injektiranje
	BIOLISTIKA	<ul style="list-style-type: none"> - sigurnost transfera - visoka uspješnost transfera genetičkog materijala u različita tkiva 	<ul style="list-style-type: none"> - limitirana efikasnost genskog transfera - nedostatna integracija injektovane DNK
	RECEPTOR- MEDIJACIJSKA ENDOCITOZA	<ul style="list-style-type: none"> - laka infuzija putem jetre preko žučnog kanala, gdje ih preuzimaju hepatociti i transportuju u proliferirajuće ćelije hematopoetskog tkiva 	<ul style="list-style-type: none"> - nije dizajniran za integraciju transferiranih gena - <i>Protein-DNK</i> kompleks nestabilan u serumu

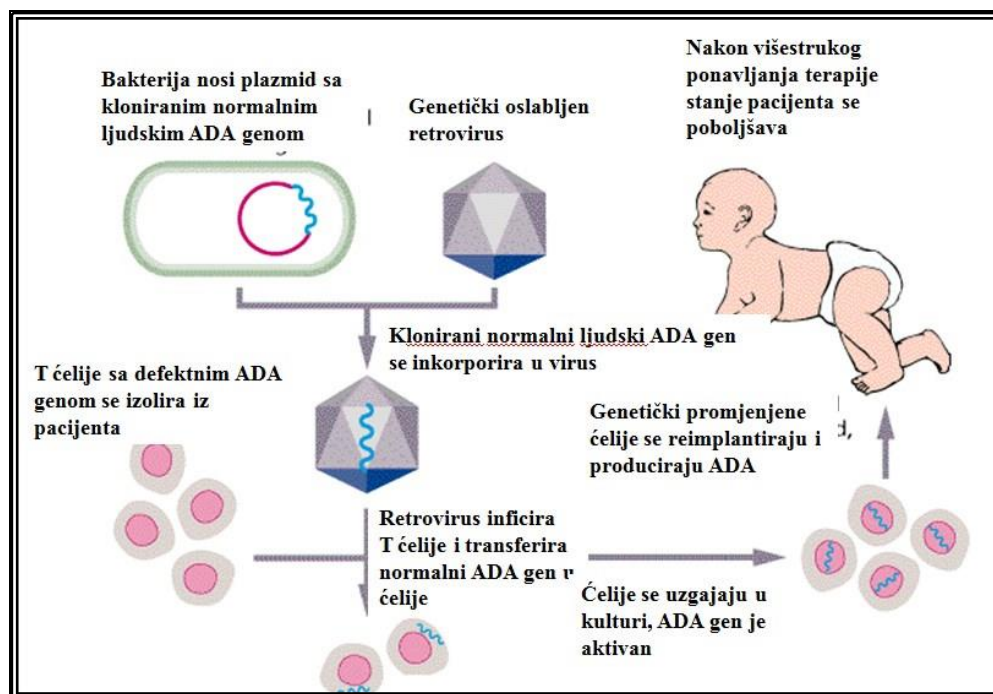


Slika 52. Najčešći vektori u genskoj terapiji (izvor: Hadžiselimović i Pojskić, 2005): a – Retrovirus; b–Adenovirus; c. adeno-asocirani virus; d –Liposom; e –gola DNK.

14.1. METODE GENSKE TERAPIJE

Većina oboljenja počinje na molekularnom nivou, pri čemu možemo razlikovati ona koja su posljedica naslijeđenog mutiranog gena, koji dovodi do produciranja defektnog proteina ili potpune odsutnosti produkcije, što na kraju ima za posljedicu bolest. Međutim, oboljenja mogu početi sa genetičkom promjenom koja nije naslijeđena, već je nastala interakcijom niza okolinskih i genetičkih faktora. Postavlja se pitanje, da li je moguće „vratiti“ taj proces time što ćemo „popraviti“ mutirani gen, ili „molekularno zbuniti“ tumorsku ćeliju i na taj način onemogućiti proliferaciju takvih ćelija. Djelovanjem na sam uzrok oboljevanja, a ne na simptome, otklanjamo posljedice, a to je oboljevanje. Prve dvije primijene genske terapije su obavljene u periodu 1990 - 1993. godine. Postupak je podrazumijevao tretiranje mutiranog ADA gena, koji kodira adenzin deaminazu odgovornu za metabolizam purina. Mutacija ADA gena dovodi do sinteze defektnog proteina koji nema funkcionalnost, što za posljedicu dovodi do kombinovane imunodeficijencije (SCID - *Severe Combined ImmunoDeficiency*). Uspješno je korišten *ex vivo* oblik genske terapije koji je podrazumijevao primijenu rekombinovane DNK tehnologije. U sklopu terapije uspješno su ekstrahovane T ćelije iz tijela pacijentica *Ashi DeSilve* i *Cindy Kisik*, a zatim modificirane virusnim vektorom koji je u svom genomu nosio normalnu kopiju ADA gena. Transformisane ćelije se uzgajane u kulturi, a zatim su

vraćene u tijela pacijentica. Nakon introdukcije u pacijentice, transformisane T ćelije su preuzimale funkciju u smislu produkcije adenozin deaminaze čime su i posljedice oboljenja reducirane (Slika 53).

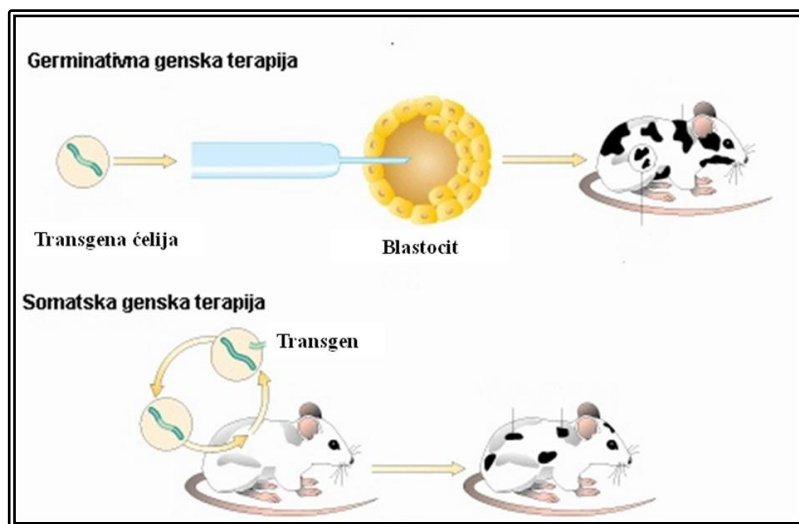


Slika 53. Model prve uspješno primijenjene genske terapije

Somatska genska terapija podrazumijeva da se transfer terapijskog gena vrši u somatske, a u drugom slučaju u germinativne ćelije (Slika 53). Genska terapija se može podijeliti prema funkcionalnoj ulozi ubačenog gena na gensko–zamjensku i gensko–adicijsku terapiju. U prvom slučaju, ubačeni gen u potpunosti zamjenjuje funkciju postojećeg gena, dok kod gensko–adicijske terapije nisu potrebni uvjeti recipročne zamjene genskih sekvenci, jer se funkcije insercijskog gena samo pridružuju efektima postojećeg. Sljedeća podjela je prema načinu aplikacije.

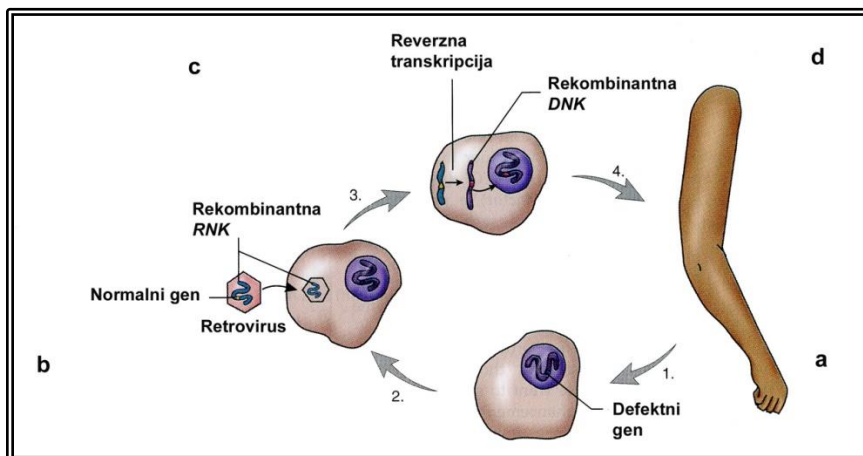
Moguće je izdvojiti ćelije iz pacijenta i manipulirati njima vantjelesno (introducirati gen od interesa u ćelije koje su izvan tijela), a zatim tako transformirane ćelije vratiti u organizam pacijenta koje onda preuzimaju normalnu funkciju (Slika 54).

Takav oblik se naziva *ex vivo* genska terapija. Ovaj model genske terapije se primjenjuje u tretmanu AIDS-a, kancera (npr. CAR-T ćelije), cistične fibroze, hiperholesterolemije, kombinovane imunodeficijencije ADA tipa i drugih monogenских bolesti. U slučaju kada npr. virusne vektore koje sadrže gen od interesa („terapeutski gen“) apliciramo direktno u tijelo pacijenta tj., organ koji ne može normalno da obavlja funkciju, takav oblik se naziva *in vivo* genska terapija (Slika 55). Na ovaj način direktno mijenjamo gensku strukturu ćelija u cilju postizanja normalne funkcije. Ovaj oblik genske terapije se veže za liječenje Parkinsonove bolesti, AIDS-a, autoimunih oboljenja, mišićne distrofije, dijabetesa, različitih oblika karcinoma, kao i mnogih drugih.

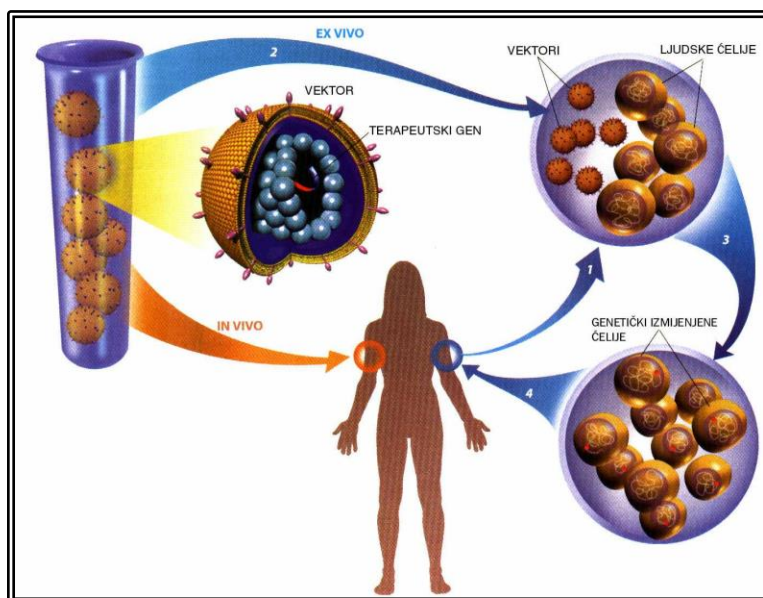


Slika 54. Klasifikacija genske terapije s obzirom na tipove ćelija

Treba naglasiti da izbor metoda genskog transfera ovisi o prirodni ciljanog tkiva i metoda aplikacije: posredstvom ćelija u kulturi (*ex vivo*) ili direktno u ćelije pacijenta (*in vivo*). Svaki od navedenih sistema genskog transfera ima specifične mane i ograničenja. S obzirom na tip primijenjenih vektora, genska terapija se može podijeliti na viralnu i neviralnu. Kao što proizilazi iz navedenog, viralna genska terapija podrazumijeva primjenu virusnih vektora u genskom transferu, za razliku od neviralnih.



Slika 55. Model genske terapije *ex vivo*: a – biopsija stem ćelija; b – aplikacija retrovirusnog vektora za transfer normalnog gen; c – rekombinantna DNK sa transferiranim normalnim genom; d – inkorporiranje genetički transformiranih ćelija



Slika 56. Komparacija genske terapije *in vivo* i *ex vivo* (izvor: Hadžiselimović i Pojskić, 2005)

Dakle, oblici genske terapije mogu biti različiti. Klasičan primjer je primjena rekombinantne DNK tehnologije koja podrazumijeva unošenje u pacijenta normalnu kopiju gena koji će zamijeniti u

potpunosti ili nadopuniti defektni gen u genomu pacijenta. U tom procesu, vektor koji koristimo za prenos sadrži gene koji inače nema te mu rekombinantnom tehnologijom „ugradimo“ taj strani gen u genom. Takav vektor inkorporira normalnu kopiju gena koju nosi u genom ćelije domaćina (pacijenta). Vrlo je bitno da taj inkorporirani gen postane funkcionalan, tj. da se eksprimira i omogućiti produkcija normalnog proteina. Na ovaj način smo u stanju liječiti širok opseg različitih, naročito monogenских bolesti (Tabela 7). Danas možemo mijenjati različite tipove ćelija u skladu s njihovom ulogom u produkciji proteina (npr. hepatocyte, beta ćelije Langerhansovih ostrvaca, T-ćelije itd.). Genomsko ili gensko editovanje je poseban oblik promjene genetičke informacije koje ima ogromne terapijske mogućnosti. Ovim načinom mijenjamo postojeći genom u ćelijama pacijenta tako što izravno „popravljamo“ pogrešnu genetičku informaciju time dovodeći gene u stanje normalnog funkcionisanja.

Tabela 7. Odabrane bolesti koje su klinički tretirane klasičnim oblikom genske terapije

BOLEST	
Karcinom *	Alfa-1 antitripsin deficijencija
SCID **	Fanconijeva anemija
Cistična fibroza	Hunterov sindrom
Gaucher-ova bolest	Hronična granulomatozna bolest
Familijarna hiperholesterolemija	Reumatoidni artritis
Hemofilija	Periferna vaskularna bolest
Deficijencija purin-nukleozid-fosforilaze	AIDS

* Melanom, neuroblastom, malignomi mozga, glave i vrata, pluća, jetre, bubrega, ovarija, dojke, kolona, prostate, mezoteliom, leukemija, limfom, multipli mijelom

** SCID = *severe combined immunodeficiency* – kombinovana imunodeficijencija

14.2. MODELI I POTENCIJALI GENSKE TERAPIJE KANCERA

Genska terapija kancera uključuje mnoštvo različitih pristupa koji su u rasponu od sprečavanja dijeljenja tumorskih ćelija pa do radikalnih, kao što je njihova reverzna transformacija. Polako se izdvajaju tri posebna pristupa, a to je „gensko prepoznavanje“ ciljanih tumorskih ćelija s tendencijom njihovog uništenja različitim tipovima terapije. Drugi pristup je već pokazao svoje rezultate, a to „gensko opremanje“ imunih ćelija koji prepoznaju sve tumorske ćelije u tijelu i uspješno ih unište (npr. CAR-T ćelije). U zadnje vrijeme sve više istraživanja uključuju tkz. vakcine protiv tumora, koji omogućavaju organizmu da se uspješno „nosi“ sa pojavom tumorskih ćelija. Posljednja dva opisana metoda su bazirana na postulatu da treba pustiti imuni sistem da uradi svoj dio posla u borbi protiv tumorskih ćelija, a da ih treba opremiti, u smislu boljeg prepoznavanja i uništavanja. Najčešći primjeri kancera koji se tretiraju genskom terapijom su tumori mozga, rak dojke, debelog crijeva, maligni melanomi, mijelogenska leukemija, neuroblastomi, mikrocelularni i nemikrocelularni rak pluća, rak jajnika te razni čvrsti tumori.

Činjenica da je genska terapija frekventnija u tretmanu kancera, nego nekih drugih oboljenja istovremeno svjedoči o letalnosti ove bolesti i ogromnim investicijama u istraživanja. Relativno jednostavniji pristup u uništavanju ciljanih malignih stanica je vještačko osposobljavanje imunog sistema za samoodbranu organizma. U nekoliko najpoznatijih slučajeva primjene genske terapije ciljani su pojedinačni geni, kao što su npr. TP53, augmentacijska terapija i aktivacija antisens KRAS gena u nekim slučajevima mikrocelularnog kancera pluća. No, u najvećem broju slučajeva, pristupa se ciljanom uništavanju ćelija raka, bez prethodnog poznavanja njegove molekularne etiologije.

Kada je upitanju genska terapija raka možemo izdvojiti dvije osnovne strategije, Prva je redukcija tumora koja je motivirana činjenicom da brojni oblici genske, kao ni bilo koje druge terapije raka, ne rezultiraju potpunim uništenjem ciljanih tumorskih

ćelija. Naprimjer, terapija direktnog genskog transfera u tumorske stanice ne osigurava potpunu (100%) uspješnost kao ni bilo koji drugi vid transformacije ćelija. Zbog toga je ovaj pristup, u suštini, rafiniranje klasičnog tretmana u liječenju raka (konvencionalne terapije i hirurškog uklanjanja), a ne novi, zasebni oblik liječenja. Drugi je eliminacija tumora, koja teži ka potpunom uništavanju ćelija raka. Ako se, naprimjer, imuno-ćelije uspiju stimulirati na specifični imuni odgovor, onda je moguće govoriti o potpunom izliječenju. Bez obzira na primijenjenu terapiju, potpuna eliminacija ćelija raka je prava rijetkost, jer njegove ćelije rapidno proliferiraju, uz selektivno preživljavanje onih najotpornijih. One se kasnije dijele i postaju potpuno rezistentne na propisanu terapiju.

14.2.1. GENSKA IMUNOTERAPIJA KANCERA

Princip genetičke transformacije limfocita u genskoj terapiji raka, bazira se na ciljanom uništavanju tumora stranim proteinom. Ovakva terapija se smatra vidom adaptivne imunoterapije, budući da se gen za citokin – faktor nekroze tumora α (TNF α) unosi u tumor–filtrirajuće limfocite (TILs) i pospješuje njihovu antitumorsku efikasnost. TIL-ovi su, ustvari, normalno prisutni T–limfociti koji imaju sposobnost da prepoznaju i filtriraju tumorske depozite kao što su, primjerice, metastaze melanoma. T–ćelije produciraju TNF α protein koji, injiciran u dovoljnim količinama, dovodi do eliminacije tumora. U čistom stanju, TNF α je toksična supstanca, pa nakon direktnog injiciranja u organizam čovjeka uzrokuje brojne negativne nuspojave. Zato se alternativno pristupa direktnoj primjeni TIL–ova u tumor (kao svojevrsnih prenosilaca antitumorskog proteina). Cijela postavka bazira se na tome da nakon injiciranja transformiranih TIL–limfocita, koji nose gen za antitumorski protein, dolazi do lokalizirane aktivacije TIL–limfocita i produkcije antitumorskog proteina te, shodno tome, i regresije tumora. Ograničavajući faktor jeste (ne)uspješnost transformacije TIL–limfocita i *down*–regulacija ekspresije introduciranog gena za antitumorski protein.

Adaptivna imunoterapija genetičkom modifikacijom tumorskih ćelija je zasnovana na rezultatima laboratorijskih istraživanja genetički modificiranih tumorskih ćelija eksperimentalnih životinja. Dokazano je da transformirane ćelije s insertom kodirajućeg gena za različite tipove citokina (interleukine, TNF α , interferone itd.), otvaraju nove mogućnosti genske terapije. U svakom slučaju, genetički promijenjene ćelije tumora ili više ne rastu ili u početku rastu, a zatim degradiraju. Pored toga, reimplantacija netransformiranih tumora dovodi do sistemskog imunog odgovora na nemodificirane tumore. Ovaj pristup je pokazao manju efikasnost kad se eksperimentiralo većim i već formiranim tumorima. Ipak, modifikacija tumora i njihovo korištenje kao svojevrsnih antitumorskih vakcina (indukcija vlastitog imunog odgovora na specifične tumorske produkte) i dalje je predmet intenzivnog istraživanja u liječenju raka.

Uvođenje specifičnih gena retroviralnom transformacijom tumora kao što su određeni HLA antigeni također je usmjereno ka indukciji imunog odgovora na tumor. Retrovirus posredovanom inkorporacijom gena za HLA-57 antigen u tumor kod osoba koji ne posjeduju HLA-57 antigen dovodi do indukcije imunog odgovora prema HLA-57 proteinu. Ciljani imuni odgovor konsekventno biva usmjeren na tumor koji producira strani antigen. Kasnije se stečeni imunitet može aktivirati u slučajevima kada se javlja isti tip tumora, čak i ako ne producira strani antigen (HLA-57).

Adaptivna imunoterapija genetičkom modifikacijom fibroblasta je razvijena na temelju iskustava da je otežana kultivacija tumorskih ćelija *in vitro* i jedan od delikatnijih problema u *ex vivo* terapiji tumorskih oboljenja. U dugotrajnoj kulturi tumora opstaje manje od 50% ćelija. Kao zamjena za tumorske ćelije najčešće se koriste fibroblasti. Introdukcijom gena za citokine IL-2 i IL-4 u genom fibroblasta kože stvara se osnova za klinička istraživanja raka dojke, kolorektalnog kancera, melanoma i karcinoma renalnih ćelija. Transformirani fibroblasti (sa kapacitetom sinteze citokina) se injiciraju subkutano u smjesi sa ozračenim

autolognim tumorskim ćelijama. Očekuje se da će lokalna produkcija citokina u transgenim fibroblastima inducirati imuni odgovor usmjeren i na okolne, ozračene tumorske ćelije, odnosno razviti sistemski antitumorski imuni odgovor. Brojne su tehnike transformacije koje za cilj imaju modifikaciju tumorskih stanica *in vivo*. Najčešće je u upotrebi adaptivna imunoterapija kad se u čvrste tumore direktno apliciraju modificirane liposome koji sadrže gene za HLA-B7. Tumorske ćelije fagocitiraju liposome i ekspimiraju strane antigene. U nekim slučajevima primijenjuje se retroviralna transformacija tumora sa proterapeutikom, koji slabi tumorske ćelije i izlaže ih destruktiji nakon aplikacije glavnog terapeutika. Jedan od krunskih primjera uspješnosti genske terapije *in vivo* koji je uspio izbalansirati neophodne uslove preciznosti i specifičnosti djelovanja jeste direktna imunoterapija multiformnog glioblastoma putem ćelija fibroblasta, koje produciraju retroviralne faktore. Oni opet, ciljano djeluju samo na ćelije u fazi dijeljenja (tumorske), ali ne i na već diferencirane stanice (okolne stanice mozga).

14.2.2. CAR-T ĆELIJE

Jedna od revolucionarnih metoda genske terapije je CAR-T ćelije, koja predstavlja oblik imunoterapije kancera. CAR (*Chimeric Antigen Receptors* – himerni antigenski receptori) su vještački receptori T-ćelija dobijeni genetičkom modifikacijom u cilju specifičnog imunog odgovora (Srivastava et al., 2015). Receptori su hibridni, jer su sastavljeni iz različitih izvora. Za modifikaciju se koristi virusni vektor, najčešće retrovirus (u početku je to bio modificirani laboratorijski HIV) koji transportuje gen do ciljane ćelije. Ovaj vid terapije kancera se bazira na promjeni T-ćelija koji se odstrane iz tijela pacijenta, a zatim genetički modificiraju u smislu omogućavanja ekspresije receptora specifičnih za tip kancera, a zatim se takve ćelije vrte u pacijenta. Na taj način T-ćelije su sada sposobne da prepoznaju tumorske ćelije i da ih u potpunosti unište. U većini slučajeva, nisu primijećeni recidivi i pacijenti uglavnom ostaju u remisiji. Prvi, na ova način, uspješno liječeni oblik tumora je bio limfom. Danas se pretpostavlja da se

na ovaj način mogu liječiti akutna limfoblastična leukemija (ALL), hronična limfoblastična leukemija (CLL), kao i Hodgkinson limfom. U kasnijim fazama je istraživana mogućnost da se ne uzimaju T-ćelije iz pacijenta, već da se upotrebljavaju univerzalne modificirane T-ćelije. Time se stvaraju preduvjeti za transgenu ekspresiju na duži period bez rizika mutagenze ili genotoksičnosti. Ovakva istraživanja su dala pozitivne rezultate i u toku je veliki broj kliničkih studija primijene ovakvog terapijskog pristupa.

14.2.3. GENSKA IMUNOTERAPIJA INFEKTIVNIH OBOLJENJA

Genska imunoterapija infektivnih oboljenja podrazumijeva provociranje specifičnog imunog odgovora koji, u slučaju infektivnih oboljenja, inhibira ćelijski ciklus infektivnog agensa, i time onemogućavaju širenje infekcije. Neki infektivni agensi su genetički stabilniji, dok drugi, pak, brzo evoluiraju u rezistentne sojeve i otežavaju opći pristup u liječenju. Jedan od najeklatantnijih primjera ovakvog infektivnog agensa je HIV-1, dobro poznati uzročnik AIDS-a koji ima visoku stopu mutacija i brzu evoluciju.

14.2.4. GENOMSKO EDITOVANJE KAO OBLIK TERAPIJE

Genomsko ili gensko editovanje kao molekularno-biološka metoda sve više zauzima posebno mjesto s ogromnim potencijalnom u genskoj terapiji. Editovanje kao pojam možemo shvatiti kao montaža tj. oblik manipulacije genoma, odnosno njegovom genetičkom informacijom (slijed nukleotida). U principu, to znači da možemo sklapati različite dijelove gena tj. da ih prekomponujemo. Takve manipulacije se mogu raditi u svim ćelijama. Da bismo mogli upotrebljavati gensko editovanje, moramo u potpunosti poznavati strukturu i funkciju gena.

Sama metodologija uključuje enzimatski kompleks karakterističan za bakterijske ćelije. Taj model se naziva CRISPR/Cas9. CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Taj sistem ustvari imaju bakterije u cilju

borbe protiv bakterijskih virusa (bakteriofaga). Ove DNK sekvence se nalaze u pravilnim ponavljanjima, a između njih se nalaze druge sekvence porijeklom od virusa koji su inkorporirale svoje genomske dijelove. Te sekvence su palindromske (čitaju se u oba pravca istovjetno) i povezane su sa Cas genima koji kodiraju istoimene Cas proteine. Oni su po svom tipu nukleaze, što znači da vrše isijecanje DNK. Ovo je jedan tip odbrane bakterije od bakteriofaga na način da Cas nukleazama isijeca viralnu (bakteriofagnu) DNK koja je napala bakteriju. Pomoću CRISPR/Cas9 sistema bakterije mogu izbaciti strani viralni genom.

Ovaj sistem se može koristiti za izmjenu genetičke informacije u svim tipovima ćelije, što ga čini adekvatnim za primjenu u genskoj terapiji. Cas9 endonukleaze su građene od četiri komponente koje uključuju dvije male molekule RNK: a) CRISPR RNK (*crRNA*) i b) trans-aktivirajuća CRISPR RNK (*tracrRNA*). Naučnici su kombinirali ove dvije komponente u jednu vodeću RNK (single-guide RNA) koja kombinirana sa Cas9 može prepoznati i isijeci ciljanu sekvencu specificiranu od strane vodeće RNK. Na ovaj način se može programirati sistem za prepoznavanja bilo koje ciljane sekvence.

Prvi mogući oblik korištenja ovog sistema u genskoj terapiji je inaktivacija određenog gena. Naime, Cas9 enzim kada se modificira izgubi mogućnost rezanja DNA, ali zadržava sposobnost vezanja za specifičnu DNA sekvencu (određeni dio gena), zahvaljujući vodećoj RNA molekuli. To ima isti efekt kao i fizičko blokiranje vezivanja RNK polimeraze, a time se kontroliše transkripcija gena. Ali sa druge strane, isti sistem možemo iskoristiti da modificiramo transkripcione faktore u cilju aktivacije specifičnih gena. Drugi oblik primijene je da se CRISPR/Cas9 sistem koristi za izmjenu genske informacije tako da „popravimo“ grešku (mutaciju) naročito kod monogenskih oboljenja. Treći oblik je uređivanje gena na embrijima životinja sa ciljem dobivanja što sigurnijih organa za transplantaciju kod čovjeka. Iako takav pristup nosi sa sobom i etičke konotacije, na

ovaj način bi se drastično umanjio hroničan nedostatak donora organa za transplantaciju.

14.2.5. MATIČNE ĆELIJE U TRETMANU OBOLJENJA

Terapija ćelijama podrazumijeva njihovu introdukciju u organizam pacijenta u cilju liječenja. Sama ideja potiče iz 19. stoljeća, ali bez pozitivnih rezultata, a svoj pravi razvoj dostiže tek nakon naučnog i tehnološkog razvitka krajem prošlog stoljeća. Širok je spektar moguće primjene od jednostavne introdukcije, do dobijanja T-ćelija sposobnih za borbu protiv kancerskih ćelija u sklopu imunoterapije.

Danas možemo govoriti o terapiji alogenim ćelijama (od stranog donora) i terapiji matičnim (*stem*) ćelijama. U prvom slučaju, problem je pronaći imunogenetički kompatibilne „donorske ćelije“, dok je za matične ćelije, problem u pronalasku depona unutar organizma. Prevažilaženje problema imunokompatibilnosti kod tretmana alogenim ćelijama se nastoji riješiti genetičkom modifikacijom ćelija kojom se neutrališe genetička podloga nekompatibilnosti. Kada je riječ o matičnim ćelijama, prvi izbor su bile rane embrionske ćelija dobijene kloniranjem pacijenta. No, to je otvorilo niz etičkih i moralnih nedoumica, te su naučnici bili prinuđeni pronaći druge izvore matičnih ćelija (npr. masno tkivo, pupčana vrpca itd.), što je omogućilo snažniji razvoj njihove primjene u terapiji.

Matične ćelije koje mogu biti od pacijenta, ali i alogene (uzete od strane druge individue) se uzgajaju u posebnim *ex vivo* uvjetima. Na njima se može vršiti genetička transformacija insercijom specifičnog gena koji ima terepeutsku funkciju. Na ovaj način se dobijaju ćelije sa novim genetičkim varijantaama, koji omogućavaju ciljanu terapiju.

U principu razlikujemo dva oblika pluripotentnih ćelija. Mezenhimalne matične ćelije kao imunomodulatori, a multipotentne i brzo proliferirajuće ćelije mogu biti korištene u različitim terepeutskim procedurama, kao što su regeneracija

hrskavice i kostiju, imunoterapija, regeneracija miokarda te različitih neuroloških oboljenja. Hematopoetske matične ćelije imaju sposobnost samoobnove i diferenciraju u različite tipove krvnih ćelija, naročito one povezane sa imunim sistemom. U skladu s tim, ovaj vid terapije pokazuje dobre rezultate u presađivanju koštane srži, kao i rekonstituiranju imunološkog sistema. Kada je u pitanju primjena ove terapije, razlikuju se tri tipa: singerična (između jednojajčanih blizanaca), alogenična (između različitih jedinki) i autogenična (recipijent je ujedno i donor).

Najidealniji sistem je da pacijent ujedno bude donor matičnih ćelija za autotransplantaciju. Time se otklanja rizik odbacivanja presađenog organa ili tkiva. Genetičkom transformacijom možemo obezbijediti da novonastale ćelije nemaju istu „genetičku grešku“ koja dovodi do oboljevanja. Poseban pravac u „uzgoju tkiva i organa“ je tkivno inženjersvo. Podrazumijeva primjenu različitih tehnoloških rješenja u uzgoju ćelija i formiranju organa iz matičnih ćelija. Formirani organi npr. u *ex vivo* uvjetima se vraćaju u organizam pacijenta i time preuzima svoju funkciju. Za zadovoljenje ovog cilja koriste se različita tehnološka rješenja, kao što su nosači, na koje se formira kultura ćelija i tkiva. Sve više se istražuju novi materijali kao npr. 3D štampači koji postaju idealni u dobijanju adekvatne konstrukcije organa.

14.3. RIZICI GENSKE TERAPIJE

Primjena bilo kojeg oblika genske terapije nije bez potencijalnog rizika. Svaka introdukcija gena i ćelija u živi sistem čovjeka sa sobom nosi i određene moguće komplikacije. Najčešće komplikacije su vezane za ”ponašanje” virusnih vektora. Budući da virusi vrlo često imaju povećan stepen mutabilnosti, u određenim slučajevima se mogu desiti promjene koje im daju patogeni kapacitet. Osnovni rizici su vezani za neželjeni imuni odgovor (organizam virusne vektore tretira kao invazivne), virus vrši isporuku gena od interesa u pogrešne ćelije oštećujući ih i dovodeći do oboljevanja, infekcija od strane virusnog vektora i

tumorogeneze uslijed introdukcije gena na pogrešno mjesto u genomu ćelije.

Kod primjene terapije matičnim ćelijama, glavni rizici su uglavnom vezani za formiranje tumora, odbacivanje ćelija, diferencijaciju u neželjeni tip ćelija i povećanu prijemčivost za oboljenja. Ti faktori se mogu podijeliti na unutrašnje i spoljašnje. Unutrašnji faktori su vezani za karakteristike ćelija, a spoljašnje za proizvodnju i manipuliranje matičnim ćelijama.

PRIMJENA REKOMBINANTNE DNK TEHNOLOGIJE U PROZIVODNJI LIJEKOVA

U okviru kliničkih laboratorija za dijagnostiku, danas širom svijeta djeluju tzv. farmakogenetičke laboratorije. Farmakogenetika je komplementarno područje genetike i farmakologije koja proučava individualnu specifičnost farmakološkog odgovora. Varijabilnost farmakološkog odgovora je univerzalna pojava koja proističe iz varijabilnosti aktivne (terapeutske) supstance, ali i mete na koju ona djeluje u organizmu. Također, individualna varijacija u metaboliziranju lijekova – konverzije lijeka u aktivnu formu izvor je varijabilnosti odgovora na lijek.

Farmakogenetika se posebno bavi (1) polimorfizmom gena koji kodiraju za određene enzime ili supstrate koji su meta djelovanja lijeka i (2) polimorfizmom jetrenih enzimskih sistema – intermedijernih faktora koji vrše aktivaciju lijeka.

Farmakogenetika je svoj procvat doživjela nakon sekvenciranja ljudskog genoma (HGP, 2003) što je rasvijetlilo i dugo poznatu varijabilnost uspješnosti različitih oblika antikoagulantne terapije ali i izvora same hiperkoagulabilnosti kod čovjeka. Najčešće se koriste testovi za profiliranje varijabilnosti citohrom enzima i procjenu odgovora na terapiju antipsihoticima, antiokoagulansima i sl. tj. redukciju rizika od neželjenih reakcija na lijekove. Za neke druge lijekove poput antitumorskih lijekova nove generacije, genetičko profiliranje pacijenata je neophodno za kvalifikaciju prije određene vrste terapije sa monoklonalnim antitijelima.

Biotehnološki postupak je svaki industrijski proces koji podrazumijeva korištenje bioloških molekula. U medicini i zdravstvu razlikujemo dva oblika biotehnoloških primjena: biotehnološki lijekovi i biotehnološka sredstva (Tabela 8).

Tabela 8. Biotehnološki lijekovi i biotehnološka sredstva, podjela

BIOTEHNOLOŠKI LIJEKOVI	BIOTEHNOLOŠKA SREDSTVA
terapijski proteini (insulin, imunoglobulin)	<i>in vitro</i> dijagnostička sredstva
pametni ili biotehnološki lijekovi nove generacije	biosenzori i biočipovi
terapijske nukleinske kiseline	

U osnovi biotehnološke produkcije lijekova leži rekombinantna DNK tehnologija. To znači da se ćelije koriste u dirigovanoj biosintezi proteina na način da im se u jedro ugradi gen koji kodira za sintezu ciljnog proteina. Ovaj postupak se sastoji iz nekoliko faza:

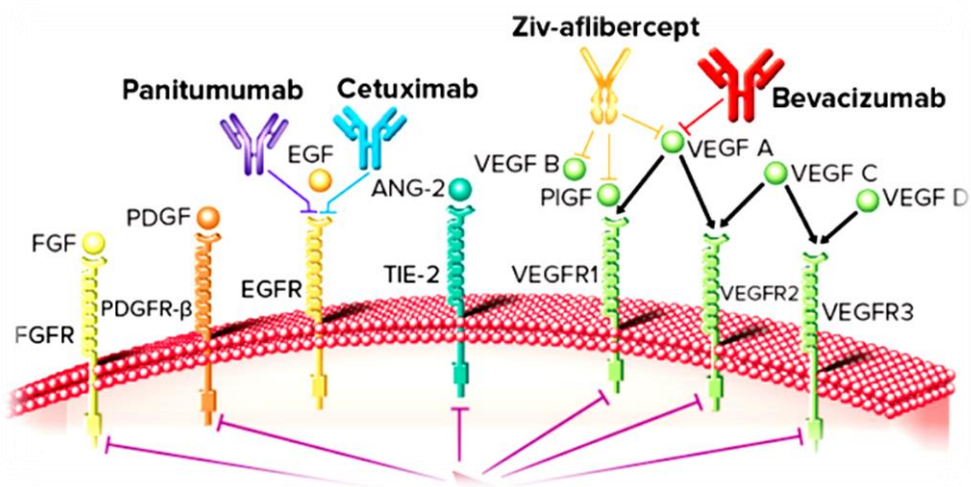
1. sinteza gena (DNK sekvence) od interesa – ova sekvenca je plan za sintezu terapijskog proteina;
2. uvođenje konstrukta u vektor – gen se ugrađuje u vektor za prenos informacije u ćelije koje će producirati protein od interesa;
3. transfekcija ćelija – vektor se kokultivira sa ćelijskom linijom koja će se koristiti u biotehnološkoj produkciji;
4. provjera uspješnosti transformacije – samo ćelije koje sadrže stabilno inkorporirani gen i vrše sintezu željenog proteina se selektiraju i koriste u proizvodnji;
5. masovna sinteza terapijskog proteina od interesa – u bioreaktorima za proizvodnju biotehnoloških molekula;
6. izolacija, prečišćavanje i karakterizacija terapijskog proteina od interesa – struktura i čistoća proteina se testira u odnosu na zadati standard i tek kad je čistoća >99% terapijski proteini se pakuju za dalju upotrebu.

Biotehnologija je donijela ogroman progres u medicini iz više razloga. Produkcija rekombinantnih proteina, dovela je do masovne i jeftine sinteze molekula poput insulina i vakcina koje su iskorijenile smrtonosne bolesti poput dijabetesa, poliomijelitisa i dizenterije. Nova dijagnostička sredstva i metode analize nukleinskih kiselina razvijeni na bazi povećanog razumijevanja molekularno-biološke osnove bolesti dovele su da ranijeg otkrivanja bolesti i konsekvantno veće terapijske učinkovitosti brojnih oboljenja poput reumatoidnog artritisa, nekih oblika leukemije itd. Nadalje, produbljivanje znanja o patofiziologiji bolesti omogućilo je dizajniranje novih lijekova u tzv. personaliziranom pristupu liječenja koje se dalje produbljuje i razvija.

Tabela 9. Mete i načini djelovanja pametnih antitumorskih lijekova (monoklonalna antitijela) i vezani laboratorijski test koji je neophodan za terapijsku kvalifikaciju

NAZIV LIJEKA	MOLEKULARNA META	NAČIN DJELOVANJA	PREDTERAPIJSKI TEST
Trastuzumab	Her2/Neu	Inhibitor tirozin kinaze	Imunohistohemija kvantitativni PCR
Alemtuzumab		Inhibitor hematopoeze B-limfocita	PCR
Lintuzumab/ Gemtuzumab	Anti CD-33	Inhibitor hematopoeze	PCR imunohistohemija
Imatinib mezilat	Bcr/abl	Inhibitor tirozin kinaze	PCR, kariogram, imunohistohemija
Bevacizumab	Vegf-alfa	Inhibitor citokina	Imunohistohemija PCR
Cetuximab	Egfr	Inhibitor aktivnosti receptora	Kvantitativni PCR, imunohistohemija
Vemurafenib	Braf (V600F)	Inhibitor tirozin kinaze	PCR

S aspekta laboratorijske dijagnostike bitno je naglasiti da princip djelovanja biotehnološkog lijeka podrazumijeva postojanje određenog molekularnog markera u testiranom biološkom materijalu. Biotehnološki lijekovi nove generacije, naprimjer, dizajnirani su prema jasno definisanim molekularnim metama. Primjera radi, marker hronične mijeloidne leukemije (CML) fuzijski protoonkogen (bcr/abl) djeluje kao tirozin kinaza u koštanoj srži. Biotehnološki lijek imatinib mezilat specifično se veže za ovaj fuzijski protein i reducira njegovu aktivnost sa efikasnošću većom od 95%. (Slika 57). Ovaj lijek, međutim ima 0% učinkovitost u slučajevima mijeloidne leukemije gdje je uzrok druge prirode. Štaviše, u takvim slučajevima rizici od nuspojava terapije rastu, kao i nepotrebni troškovi liječenja. Za racionalnu i informativnu upotrebu biotehnoloških lijekova, kliničke laboratorije trebaju raspolagati tehnologijama za detekciju prisustva komplementarnih meta ciljane terapije. Bez toga primjena personaliziranog pristupa u liječenju neće biti moguća.



Slika 57. Biotehnološki lijekovi

GENETIČKO TESTIRANJE I SAVJETOVANJE

16.1. GENETIČKO TESTIRANJE

Genetičko testiranje (ili molekularno-genetička karakterizacija) se može definisati kao skup različitih laboratorijskih tehnika kojima se otkrivaju specifične promjene (mutacije) u nasljednom materijalu čovjeka na nivou genoma, hromosoma, gena, DNK ili proteina. Genetičko testiranje se koristi kao jedan od alata pri postavljanju pravilne medicinske dijagnoze, kao i u predviđanju rizika za oboljevanje od određene bolesti u toku života, ili identifikacija nosioca rizičnog alela pri planiranju potomstva. U zadnje vrijeme, pri razvoju farmakogenomike, genetičko testiranje se može koristiti i za predviđanje odgovora na terapiju, naročito u sferi „pametnih lijekova“.

Sami počeci genetičkog testiranja se mogu pratiti od 1800-ih godina pri otkriću hromosoma, iako je tek 1900-ih otkrivena veza između hromosoma i nasljednih bolesti. Prvo zabilježeno genetičko testiranje u historiji je 1960-ih godina kada se vršila prva kariotipizacija osoba s dijagnosticiranim sindromom *Down*, gdje je genetička karakterizacija korištena kao pomoć pri potvrdi medicinske dijagnoze sindroma *Down*, kao i kariotipizacija fetusa radi sumnje na isto oboljenje. Istih godina se vršila i prva proteinska analiza na fenilketonuriju kod novorođenčadi. Otkrićem PCR tehnike, i ubrzanog tehnološkog napretka u polju molekularne biologije, razvija se veliki broj testova koji su danas dostupni široj javnosti. Prema posljednjim podacima, trenutno je moguće uraditi molekularno-genetičku karakterizaciju više od 2800 različitih gena. Razvojem sekvenciranja nove generacije, razvija se i pristup genetičkom testiranju, gdje simultano sekvenciranje više desetaka gena preuzima primat u polju molekularno-genetičke karakterizacije, kao i sekvenciranje čitavog egzoma, ili pak čitavog genoma. Uz povećan dotok informacija, javlja se i poteškoća interpretiranja rezultata

sekvenciranja nove generacije, zajedno s novim etičkim pitanjima koje genetičko testiranje prate od samih začetaka.

Postoji više tipova genetičkih testiranja, koji se mogu podijeliti na:

Dijagnostičko testiranje: Provodi se za potvrdu ili isključenje određene dijagnoze, odnosno identifikaciju određene mutacije koja je asocirana s određenom bolesti – npr. prisutnost translokacije t(9:22) kod pacijenata s hroničnom mijeloičnom leukemijom, mutacije na ATP7B genu kod *Wilsonove* bolesti, mutacije na SMN genu kod spinalne mišićne atrofije, mutacije na DMD genu kod *Duchenne* mišićne distrofije itd. Dijagnostičko testiranje može biti provedeno prenatalno ili u bilo kojem periodu života, ali se mora obratiti pažnja da se ovakva vrsta testiranja trenutno provodi isključivo kod monogenskih oboljenja (gdje je jasna veza uzrok - posljedica mutacije i razvoja oboljenja). Također, moguće je da je potrebno više od jednog testa za potvrdu ili isključenje određene dijagnoze. Dijagnostičko testiranje može imati psihosocijalne i/ili reproduktivne implikacije za testiranu individuu, kao i za članove porodice (npr. *Duchenne* mišićna distrofija).

Prediktivno i presimptomatsko testiranje: Provodi se kod individue koja nije razvila simptome određenog oboljenja, a koja u porodici ima potvrđenu ili nepotvrđenu mutaciju, odnosno bolest koja se može pratiti kroz generacije. Prediktivno testiranje se odnosi na testiranje individue koja u porodici ima oboljenje koje se može pratiti kroz generacije, ali nije razvila simptome oboljenja. U slučaju pozitivnog testa, individua ima povećanu predispoziciju da razvije oboljenje, ali neće sve individue sa poznatom mutacijom razviti oboljenje u toku njihovog života. Jedan od poznatijih oboljenja na koji se vrši prediktivno testiranje je karcinom dojke i ovarija, odnosno mutacije na BRCA1 i BRCA2 genu. Presimptomatsko testiranje je slično prediktivnom testiranju, odnosno, u ovom slučaju ako osoba nosi mutaciju, ona će razviti bolest u toku svog života. Ovakvo testiranje se vrši kod individua u čijim je porodicama prisutno oboljenje koje se manifestira kasno u toku života, kao naprimjer Hantingtonovo

oboljenje ili pak miotonična distrofija. Ovakva vrsta genetičkih testova treba biti ponuđena nakon genetičkog savjetovanja i eventualne potvrde mutacije koja je prisutna u porodici kod indeks pacijenata (koji već imaju razvijeno oboljenje). Prediktivno i presimptomatsko testiranje se ne bi trebalo nuditi osobama koje nemaju pozitivnu porodičnu historiju u odnosu na određeno oboljenje.

Prenatalno testiranje: Provodi se u trudnoći, da bi se odredio zdravstveni status fetusa, kod slučajeva povećanog rizika od razvoja određenih oboljenja zbog majčine starosti, očeve starosti, nepravilnosti kod fetalnog ultrazvuka i slično. Ovo testiranje se provodi nakon amniocenteze ili horiocenteze. Nažalost, ovaj tip testiranja ne može otkriti sve urođene dismorfologije ili urođena oboljenja. Najčešće se prenatalno testiranje provodi kao *screening* testiranje na najčešće hromosomske poremećaje (trisomija 21, trisomija 18, monosomija X) ili pak ciljano testiranje na već poznatu mutaciju kod roditelja (u slučaju cistične fibroze ili *Duchenne* mišićne distrofije). Osim klasičnog prenatalnog testiranja gdje je uzorak za testiranje amnionska tekućina ili horionske čupice, također se može vršiti i *neinvazivno prenatalno testiranje*, gdje je uzorak cirkulirajuća fetalna DNK koja se nalazi u krvi majke. Ovakva vrsta testiranja se provodi u prvom trimestru trudnoće.

Perinatalno testiranje (newborn screening): Provodi se kod novorođenčeta u slučaju sumnje na određeno oboljenje, kao što je npr. fenilketonurija. Ovakva vrsta testiranja se provodi kada su u pitanju oboljenja koja se mogu liječiti u ranoj fazi života ili su prijetnja životu nakon rođenja. Najčešće pripada preventivnom dijelu medicine, i najčešće je obavezno u zakonski uređenim okvirima u razvijenim zemljama svijeta.

Testiranje nosioca (carrier testing): Provodi se kod parova koji u porodici imaju određenu bolest (najčešće autosomalno recesivnu) koja se prati kroz generacije, te se vrši testiranje radi započinjanja porodice, ili kod parova koji započinju proces *in vitro* fertilizacije (IVF). Najčešće se provodi u odnosu na određeni broj poznatih

autosomalno recesivnih oboljenja, i ne može biti sveobuhvatno (odnosno trenutno nije moguće uraditi testiranje nosioca na sve poznate mutacije koje se prenose autosomalno recesivno).

Preimplantacijsko testiranje: Provodi se u slučaju *in vitro* fertilizacije (IVF), na ranom embrionu gdje se vrši testiranje na određena oboljenja, najčešće se vrši identifikacija već poznatih mutacija kod roditelja, te se nakon testiranja (i negativnog nalaza) embriji implantiraju i vrši se nastavak IVF procedure.

Forenzičko testiranje: Provodi se za identifikaciju individue najčešće u legislativnim procedurama. Ovakva vrsta testiranja se ne provodi za identifikaciju mutacija povezanih s oboljenjima kao ostale vrste genetičkog testiranja, već isključivo za identifikaciju osobe preko DNK sekvence, odnosno profila DNK. Najpoznatiji primjer forenzičkog testiranja je utvrđivanje očinstva, majčinstva i srodstva, te forenzičko testiranje u kriminalnim slučajevima.

Osim navedenih testova, u genetičko testiranje se može ubrojati i novija grana genetike, *farmakogenetika*, gdje se testiranje provodi radi određivanja individualne terapije za određenog pacijenta.

Genetičko testiranje se provodi nakon genetičkog savjetovanja, koje najčešće obuhvata multidisciplinarnu timove u čijem sastavu su ljekari, genetičari, psiholozi i medicinske sestre. U Evropi, postoji edukacija za genetičke savjetnike. Genetičko testiranje počinje davanjem uzorka krvi ili bukalne sluznice, ili pak ostalih vrsta uzoraka ako je to specificirano u pojedinačnoj molekularno genetičkoj analizi.

Prije svakog genetičkog testa, osoba koja se testira mora razumjeti prednosti i nedostatke odgovarajućeg testa, limitacije testa, šta znači pozitivan a šta negativan nalaz i koje su moguće posljedice nakon genetičkog testa. Ova pitanja su posebno obrađena u obrascu "Informiranog pristanka", koji je sastavni dio procedure genetičkog testiranja u svakoj laboratoriji koja se bavi molekularno-genetičkom karakterizacijom.

Informirani pristanak se odnosi sa proces koji se provodi prije svakog genetičkog testa. U procesu informiranog pristanka, osoba koja se testira mora dobiti sve informacije koje se odnose na odgovarajući test i to:

- opis testa koji se provodi, uključujući razlog testa i namjenu provođenja testa;
- koja vrsta uzorka je potrebna za genetičko testiranje i kako će se taj uzorak sakupiti;
- šta znače rezultati testa, uključujući pozitivan i negativan rezultat, kao i procenat lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata te mogućnost slučajnih pronalazaka;
- da li postoji mogućnost fizičkih ili emocionalnih posljedica testa;
- da li će se rezultati koristiti za naučna istraživanja;
- da li rezultat može otkriti informacije o drugim osobama kao što su roditelji ili potomci testirane osobe;
- kome će se izdati rezultat testa i da li je moguće test izdati dodatnim osobama (npr. ljekarima);
- šta će se desiti sa uzorkom osobe nakon testiranja.

Sve informacije osoba mora dobiti prije samog testiranja, i odlučiti da li želi nastaviti s genetičkim testom. Te informacije osoba potvrđuje svojim potpisom na informiranom pristanku, nakon čega se smatra da je osoba informirana i da shvata sve navedene implikacije genetičkog testiranja. Obrazac informiranog pristanka mogu potpisati samo punoljetne osobe koje su sposobne da samostalno donose odluke. U slučaju testiranja maloljetnika ili osoba sa smanjenim sposobnostima, informirani pristanak potpisuje njihov roditelj ili zakonski staratelj, što se i navodi u obrascu informiranog pristanka.

Rezultati genetičkog testiranja nisu uvijek jednostavni za interpretaciju, i često su za pravilnu interpretaciju nalaza potrebne i dodatne informacije, kao npr. porodična historija ili pak različiti literaturni podaci o frekvenciji ili incidenci odgovarajuće mutacije, kao i predikcije proteinske sekvence ili strukture na koju utiče odgovarajuća mutacija.

Pozitivan nalaz uglavnom znači da je u toku testiranja identificirana promjena u strukturi DNK molekule (koja može biti višestruka) ili promjena u nivou transkripcije odgovarajuće informacione RNK. U zavisnosti od namjene testa, ovakav nalaz može pomoći pri potvrđivanju odgovarajuće medicinske dijagnoze, indicirati da je osoba nosilac odgovarajuće mutacije koju može prenijeti na svoje potomke, identificirati povećan rizik obolijevanja od odgovarajuće bolesti u budućnosti ili sugerirati dodatno testiranje.

Negativan nalaz znači da nisu identificirane varijacije u strukturi DNK molekule na posmatranom regionu. Međutim, to ne mora značiti da osoba nema varijaciju u strukturi izvan posmatranog regiona, ili pak varijaciju koju nije moguće otkriti odgovarajućom metodom (naprimjer, tačkaste mutacije se najčešće ne mogu otkriti MLPA analizom, jer je takva vrsta analize prilagođena za identifikaciju većih delecija/duplikacija određenog gena ili grupe gena. S druge strane, sekvenciranjem kompletnog gena je teško identificirati veće rearanžmane koji se mogu identificirati MLPA metodom). U slučaju negativnog rezultata, a prisutnih kliničkih simptoma odgovarajućeg oboljenja, najčešće je potrebno dodatno testiranje.

Neinformativan, dvosmislen nalaz je mogući rezultat kod genetičkog testiranja. Određenim brojem testova moguće je identificirati česte varijacije DNK sekvence u populaciji koji se nazivaju polimorfizmi, koji mogu biti povezani sa odgovarajućim oboljenjem ali i ne moraju. U tom slučaju nalaz ne može biti pozitivan jer varijanta može biti normalna za tu osobu, ali i ne mora, a u isto vrijeme ne može biti negativan, jer je identificirana promjena na nivou strukture DNK molekule. U ovom slučaju najčešće se vrši dodatno testiranje članova porodice da bi se odredio status identificirane varijante, iako ni tada rezultat ne mora biti jasan.

Od 2006. godine, moguće je naručiti genetičko testiranje bez liječničkog nadzora, u komercijalnim kompanijama koje omogućavaju genetičko testiranje direktno potrošaču bez

posrednika. Takva vrsta genetičkih testova se naziva *direct-to-consumer* testovi, i odnosi se na testiranje poznatih mutacija i polimorfizama, koji mogu, ali i ne moraju biti od značaja za razvoj odgovarajućeg oboljenja, ili pak za promjenu odgovarajućeg stila života. Ovakva vrsta genetičkog testiranja se prodaje putem reklama, najčešće na internetu, gdje kompanija osobi zainteresovanoj za testiranje nakon plaćanja šalje kit za kolekciju uzorka (najčešće bukalna sluznica ili pljuvačka), a osoba nakon nekoliko sedmica rezultate dobija e-mailom ili poštom. Iako ovakva vrsta genetičkih testova može imati pozitivne reakcije kao što je povećana svijest o genetičkom testiranju ili pak povećana briga za zdravlje osobe, postoje veliki rizici i nedostaci takozvanih kućnih genetičkih testova. Naime, postoji mogućnost da su rezultati nevalidirani, te neinterpretirani od strane stručnjaka, i ostavljeni na interpretaciju samoj osobi koja se testirala, gdje je povećana mogućnost sakupljanja netačnih informacija koje bi se koristile nepravilno a u sklopu želje za brigom za zdravlje individue. Također, bez interpretacije od strane stručnjaka, osobe mogu donijeti važne odluke o svom životu i zdravlju koje su bazirane na netačnim, nekompletnim ili nejasnim informacijama. Genetički testovi nisu, niti mogu biti medicinske dijagnoze. Genetičko testiranje je samo jedan segment u kompletnoj medicinskoj dijagnostici, što osim rezultata genetičkog testa uključuje kliničku sliku, porodičnu i ličnu historiju, vanjske okolišne faktore, brigu za zdravlje i stil života i slično.

Genetičko testiranje ima potencijalne prednosti u smislu da li su nalazi genetičkog testa pozitivni ili negativni. Rezultati testiranja mogu otkloniti nesigurnost i pomoći osobama da donesu informirane odluke o svom zdravlju, naprimjer, u slučaju pozitivnog rezultata, moguće je provesti korake izmjene životnog stila i prevencije oboljenja, a u slučaju negativnog rezultata moguće je smanjiti potrebu za nepotrebnim, često invazivnim procedurama. Također jedna od prednosti je i bolje planiranje potomstva, naročito kod osoba koje imaju historiju autosomalno recesivnih oboljenja u porodici. Osim prednosti, postoje i nedostaci genetičkog testiranja. Fizički genetičko testiranje

uglavnom ne zahtjeva ništa više invazivnu proceduru od klasičnog vađenja pune krvi, ili nose nizak rizik od pobačaja u slučaju amniocenteze ili horiocenteze. Najveći rizici povezani s genetičkim testiranjem su emocionalne, socijalne i finansijske genetičkog testiranja. Osobe koje razmišljaju o genetičkom testiranju često imaju sljedeće probleme:

- nerazumijevanje značenja povećanog ili smanjenog rizika;
- projiciranje jakih osjećaja straha ili nelagode od boli ili smrti;
- osjećanje krivice zbog prenošenja mutacija na potomke, ili nemogućnosti pomaganja osoba koje vole;
- povećan stres;
- nemogućnost rješavanja problema, osjećaj bespomoćnosti;
- pokušaj pronalaženja efektivne strategije nošenja sa određenom bolesti, te optimistično gledanje na razvoj bolesti.
- osobe čije je genetičko testiranje rezultiralo negativno, mogu osjećati određenu vrstu krivnje što nisu naslijedili mutacije, naročito ako je bolest prisutna u većini generacija te porodice, te tako mogu prouzrokovati napetost i narušene porodične veze.

Genetičko testiranje bi trebalo uvijek provoditi pod kontrolom stručnjaka ili tima stručnjaka, koji mogu pomoći osobi da prevaziđe navedene probleme. Jedan od načina je i institucija genetičkog savjetovanja, koja je krucijalna kod genetičkog testiranja, i ne može se posmatrati odvojeno.

16.2. GENETIČKO SAVJETOVANJE

Genetičko savjetovanje se najčešće provodi u multidisciplinarnom timu koji obuhvata liječnike – najčešće specijalizante medicinske genetike, genetičare – stručnjake, psihologe ili genetičke savjetnike. U razvijenim zemljama svijeta postoje genetički savjetnici – profesionalci, educirani u genetici i specijalizirani u psihoterapiji, koji mogu pomoći osobama da dobiju sve

informacije o genetičkom testiranju, kao i da se nose sa rezultatima genetičkih testova kao individue, ili u sklopu porodičnih sesija. Proces genetičkog savjetovanja može pomoći osobama da dobiju informacije o tome kako nasljedne bolesti mogu uticati na njih same ili njihove porodice, koji je značaj porodične i lične historije u odnosu na genetičko testiranje i rezultate genetičkog testiranja, koji genetički test se treba provesti za koju osobu i šta odgovarajući rezultat može značiti. Također genetičko savjetovanje može pomoći parovima u planiranju potomstva, i kako napraviti informiran izbor u smislu genetičkih testova, kao i cjelokupne brige za svoje zdravlje i zdravlje svoje porodice.

Svaki član tima za genetičko savjetovanje pridonosi boljem razumijevanju genetičkog testiranja osobe koja traži informacije. Medicinski genetičar – ljekar obično upućuje osobu na genetičko testiranje ako smatra da je takvo testiranje potrebno za potvrdu ili isključivanje određene medicinske dijagnoze te savjetuje osobu na koji način i zašto se takav test treba provesti, i također objašnjava rizike i nedostatke genetičkog testiranja, odnosno šta može značiti pozitivan a šta negativan nalaz genetičkog testiranja u smislu kompletne kliničke obrade te osobe. Genetičar – stručnjak najčešće ima ulogu izvršavanja samog genetičkog testa i interpretacije nalaza genetičkog testiranja, koji će nakon testiranja ljekar staviti u kontekst medicinske dijagnoze, moguće promjene životnog stila ili pak odgovarajuće terapije. Psiholog ili genetički savjetnik može pomoći osobi u svakom koraku procesa genetičkog savjetovanja, kao i procesa obrađivanja informacija kroz psihosocijalne aspekte genetičkog testiranja.

LITERATURA

Ahmad A.I. (2007) BOXTO as a real-time thermal cycling reporter dye. *J Biosci* 32: 229–239.

Andrews A.T. (1991) Electrophoresis of nucleic acids. In: Brown, TA. (ed.) *Essential molecular biology*. Volume 1: A practical approach. Oxford University Press, Oxford. pp 89-126. ISBN: 978-0199-6364-2-6.

Amberger J.S., Bocchini C.A., Schiettecatte F., Scott A.F., Hamosh A. (2015) OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acid Res* 43: D789-798.

Arber W. (1965) Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli* V. The role of methionine in the production of host specificity. *J Mol Biol* 11: 247-256.

Arber W. (1965) Host-controlled modification of bacteriophage. *Annu Rev Microbiol* 19: 365-78.

Armour J.A., Sismani C., Patsalis P.C., Cross G. (2000) Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res* 28: 605-609.

Auman J.T. (2010) Gene therapy: Have the risks associated with viral vectors been solved? *Curr Opin Mol Ther* 12(6): 637-8.

Bajrović K., Kapur Pojskić L., Haverić S., Pojskić N., Marjanović D., Durmić-Pašić A. (2014) *Osnove manipulacije nasljednim materijalom ili genetičko inženjerstvo (potpoglavlje Molekularno-biološki markeri)*. Poglavlje u *Uvod u genetičko inženjerstvo i biotehnologiju 2 izdanje* (Editor: Pojskić Kapur, L.), Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo, Bosna i Hercegovina. ISBN: 978-9958-9344-8-3.

Baris I., Koksal V., Etlik O. (2004) A combined allele-specific PCR and RFLP assay to detect the 35delG mutation in the Connexin 26 gene. *Genet Test* 8(4): 384-6.

Barrangou R. (2015) Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines. *Gen Biol* 16: 247.

Battler A., Leor J. (Eds.) (2006) *Stem Cell and Gene-Based Therapy: Frontiers in Regenerative Medicine*. Springer, UK. ISBN 978-1846-2814-2-6.

Beutler E., Gelbart T., Kuhl W. (1990) Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 9: 166.

Bickle T.A., Krüger, D.H. (1993) *Biology of DNA Restriction*. *Microbiol Rev* 57(2): 434-50.

Boyanton B.L., Crisan D. (2012) Sample Collection, Processing, and Storage for Molecular Genetic Testing, in *Laboratory Hematology Practice* (eds Kottke-Marchant K., Davis B.H.), Wiley-Blackwell, Oxford, UK. ISBN: 978-1405-1621-8-0.

Buongiorno-Nardelli M., Amaldi F. (1969) Autoradiographic detection of molecular hybrids between rRNA and DNA in tissue sections. *Nature* 225: 946-7.

Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339 (6121): 819-23.

Danna K., Nathans D. (1971) Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 68(12): 2913-7.

Don R., Cox P., Wainwright B., Baker K., Mattick J. (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19(14): 4008.

Durmaz A., Karaca E., Demkow U., Toruner G., Schoumans J., Cogulu O. (2015) Evolution of Genetic Techniques: Past, Present, and Beyond. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 461524, 7 pages.

Durmić-Pašić A., Kapur L., Pojskić N., Hadžiselimović R. (2005) Molekularni markeri. Poglavlje u Uvod u genetičko inženjerstvo i biotehnologiju (Editori: Bajrović K., Hadžiselimović R., Jevrić-Čaušević A.), Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Sarajevo, Bosna i Hercegovina. ISBN:9958-9344-1-8.

Fischer S.G., Lerman L.S. (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16(1):191-200.

Fischer S.G., Lerman L.S. (1980) Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. *PNAS* 77: 4420-4424.

Fischer S.G., Lerman L.S. (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *PNAS* 80: 1579-1583.

Flori P., Bellete B., Durand F., Raberin H., Cazorla C., Hafid J., Lucht F., Sung RT. (2004) Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jiroveci* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol* 53(Pt 7): 603-7.

Gall J.G., Pardue M.L. (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *PNAS* 63: 378-383.

Genetics Home Reference - <https://ghr.nlm.nih.gov/GeneticTesting>

Gibson U.E.M., Heid CA., Williams PM. (1996) A novel method for Real-Time Quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6: 995-1001.

Govindarajan R., Duraiyan J., Kaliyappan K., Palanisamy M. (2012) Microarray and its applications. *J Pharm Bioallied Sci (Suppl 2)*: S310-S312.

Hadžiselimović R., Pojskić N. (2005) Uvod u humanu imunogenetiku. Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju (INGEB), Sarajevo, ISBN 9958-9344-3-4.

Haliassos A., Chomel J.C., Grandjouan S., Druh J., Kaplan J.C., Kitzis A. (1989) Detection of minority point mutations by modified PCR technique: A new approach for a sensitive diagnosis of tumor progression markers. *Nucl Acids Res* 17:8093-8099.

Head S.R., Komori H.K., LaMere S.A., Whisenant T., Van Nieuwerburgh F., Salomon D.R., Ordoukhanian P. (2014) Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTechniques* 56(2): 61–77.

Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. (1996) Real-Time Quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986–994.

Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10: 413–417.

Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. (1993) Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026–1030.

Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand, D.H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' – 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7276–7280.

Huberman J.A. (1995) Importance of measuring nucleic acid absorbance at 240 nm as well as at 260 and 280 nm. *BioTechniques* 4:636.

Human genetics society of Australasia, March 2014. Pre-symptomatic and Predictive Testing for Genetic Disorders – guideline. Document Number 2014GD02.

Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157 (6): 1262–78.

Innis M.A., Myambo K.B., Gelfand D.H., Brow M.A. (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc Natl Acad Sci USA 85(24): 9436-40.

Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. Nature 314: 67-73.

Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L. (1985) Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. Nature 316: 76-79.

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337 (6096): 816-21.

Jones H.D.L., Elizabeth W. (1998) Genetics: Principles and Analysis. 4th edition. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts, USA. ISBN: 978-0073-5252-8-0.

Jones L.J., Yue S.T., Cheung C.Y., Singer V.L. (1998) RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. Anal Biochem 265(2):368-74.

Kalamujić Stroil B., Dorić S., Lukić Bilela L., Pojskić N. (2018) Aplikativna bioinformatika - Praktikum. Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo, Bosna i Hercegovina. ISBN: 978-9958-083-00-6.

Kanagal-Shamanna R. (2016) Emulsion PCR: Techniques and applications. In Methods in Molecular Biology (Vol. 1392, pp. 33-42). Humana Press Inc.

Kapuscinski J. (1995) DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. Biotech Histochem 70(5):220-33.

Kircher M., Kelso J. (2010) High-throughput DNA sequencing — concepts and limitations. Bioessays 32, 524-536.

Korbie D., Mattick J. (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. Nature Protocols 3: 1452-1456.

Landegren U., Kaise R., Sanders J., Hood L. (1988) A ligasemediated gene detection technique. *Science* 241: 1077 – 1080.

Lashkari D.A., DeRisi J.L., McCusker J.H., Namath A.F., Gentile C., Hwang S.Y., Brown P.O., Davis, R.W. (1997) Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *PNAS* 94 (24): 13057–13062.

Li H.H., Gyllensten U.B., Cui X.F., Saiki R.K., Erlich H.A., Arnheim N. (1988) Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 335: 414–417.

Liu L., Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M. (2012) Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 251364.

Lo, Y.M.D., Chan K.C.A. (2006) Introduction to the Polymerase Chain Reaction. In: Lo Y.M.D., Chiu R.W.K., Chan K.C.A. (ed.) *Clinical Applications of PCR*. 2nd Edition. Humana Press Inc., New Jersey, USA. ISBN: 978-1-59745-074-4.

Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339 (6121): 823–6.

Manchester K.L. (1996) Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *Biotechniques* (6):968-70.

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. ISBN: 978-1936-1134-2-2.

Mardis E.R. (2013) Next-generation sequencing platforms. *Annu Rev Anal Chem* 6: 287–303.

Marjanović D., Primorac D., Čakar J., Kovačević L., Hadžić N., Džehverovic M., Pilav A. (2014) DNK tehnologije u forenzičkoj i sudskoj praksi. Poglavlje u *Uvod u genetičko inženjerstvo i biotehnologiju* 2 izdanje (Editor: Pojskić Kapur L.), Institut za genetičko inženjerstvo i

biotehnologiju, Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo, Bosna i Hercegovina. ISBN: 978-9958-9344-8-3.

Martin B., Jonas K., Gunnar W., Mikael K. (2003) A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 31: e45.

Matsunaga J., Tomita Y., Tagami H. (1995) Detection of point mutations in human tyrosinase gene by improved allele-specific amplification. *Exp Dermatol* 4(6): 377-81.

Matsubara Y., Fujii K., Rinaldo P., Narisawa K. (1999) A fluorogenic allele-specific amplification method for DNA-based screening for inherited metabolic disorders. *Acta Paediatr Suppl* 88(432): 65-8.

Maxam A.M, Gilbert W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (2): 560–564.

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3): 1215.

McKusick V.A. (1998) *Mendelian Inheritance in Man: A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders*, Baltimore Johns Hopkins University Press. ISBN: 978-0801857423.

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology* 51: 263-73.

Mullis K., Faloona F. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.

Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., Powell S.J., Summers C., Kalsheker N., Smith J.C., Markham A.F. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17: 2503 – 2516.

Ogino S., Gulley M.L., den Dunnen J.T., Wilson R.B. and the Association for Molecular Pathology Training and Education Committee. (2007) Standard Mutation Nomenclature in Molecular Diagnostics: Practical and Educational Challenges. *J Mol Diagn* 9(1): 1–6.

Orita M., Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K. (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5(4):874-9.

Patrinos G.P., Ansong W. (2010) Molecular Diagnostics: Past, Present, and Future. In: Patrinos G.P., Ansong W. (ed.) *Molecular diagnostics*. 2nd edition. Academic press, Elsevier Ltd. ISBN: 9780123745378.

Pesole G., Saccone C. (2003) *Handbook of comparative genomics: principles and methodology*. New York: Wiley-Liss. ISBN: 9780471391289.

Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical method for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.

Primrose S.B., Twyman R.M. (2006) *Principles of gene manipulation and genomics*. 7th edition. Blackwell publishing, Oxford, UK. ISBN: 978-1405135443.

Rainen L., Arbique J.C., Asthana D. (2006) Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline MM13 - A. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Reece J.B., Urry L.A., Cain M.L., Wasserman S.A., Minorsky P.V., Jackson R.B. (2011) Dideoxy chain termination method for sequencing DNA. In *Campbell biology* (10th ed., p. 410). San Francisco, CA: Pearson. ISBN: 978-0321775658.

Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245: 154-160.

Roest P.A., Roberts R.G., Sugino S., van Ommen G.J., den Dunnen J.T. (1993) Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum Mol Genet* 2(10): 1719-21.

Roberts R.J., Belfort M., Bestor T., Bhagwat A.S., Bickle T.A., Bitinaite J., Blumenthal R.M., Degtyarev S.Kh., Dryden D.T., Dybvig K., Firman K., Gromova E.S., Gumport R.I., Halford S.E., Hattman S., Heitman J., Hornby D.P., Janulaitis A., Jeltsch A., Josephsen J., Kiss A., Klaenhammer T.R., Kobayashi I., Kong H., Krüger D.H., Lacks S., Marinus M.G., Miyahara M., Morgan R.D., Murray N.E., Nagaraja V., Piekarowicz A., Pingoud A., Raleigh E., Rao D.N., Reich N., Repin V.E., Selker E.U., Shaw P.C., Stein D.C., Stoddard B.L., Szybalski W., Trautner T.A., Van Etten J.L., Vitor J.M., Wilson G.G., Xu S.Y. (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucl Acids Res* 31(7): 1805-1812.

Roberts R.J., Vincze T., Posfai J., Macelis D. (2003) REBASE: restriction enzymes and methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 31(1): 418-20.

Rozen S., Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-86.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.

Sambrook J., Russel D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. ISBN: 978-0-87969-576-7.

Sanger F., Coulson A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94 (3): 441-448.

Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 (5235): 467-470.

Schleiff R. (1993) Genetics and molecular biology. 2nd edition. The John Hopkins University Press London, Addison-Wesley Publishing Company. ISBN: 978-0801846748.

Schouten J.P., McElgunn C.J., Waaijer R., Zwijnenburg D., Diepvens F., Pals G. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30(12):e57.

Singer V.L., Jones L.J., Yue S.T., Haugland R.P. (1997) Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal Biochem* 249(2):228-38.

Singh V.K., Mangalam A.K., Dwivedi S., Naik S. (1988) Primer premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence. *Biotechniques* 24(2):318-9.

Smith H.O., Wilcox, K.W. (1970) A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae* I. Purification and general properties. *J Mol Biol* 51(2): 379-91.

Smith H.O., Nathans D. (1973) Letter: A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. *J Mol Biol* 81(3): 419-23.

Sobel M.E., Bagg A., Caliendo A.M., Ladanyi M., Zehnbauser B. (2008) The Evolution of Molecular Genetic Pathology. Advancing 20th-Century Diagnostic Methods into Potent Tools for the New Millennium. *J Mol Diagn* 10(6): 480-483.

Sommer S.S., Cassady J.D., Sobell J.L., Bottema C.D. (1989) A novel method for detecting point mutations or polymorphisms and its application to population screening for carriers of phenylketonuria. *Mayo Clin Proc* 64: 1361-1372.

Sommer S.S., Groszback A.R., Bottema C.D. (1992) PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes. *Biotechniques* 12: 82-87.

Srivastava S., Riddell S.R. (2015) Engineering CAR-T Cells: Design Concepts. *Trends in immunology* 36 (8): 494–502.

Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98(3): 503–517.

Szybalski W., Blumenthal R.M., Brooks J.E., Hattman S., Raleigh E.A. (1988) Nomenclature for bacterial genes coding for class-II restriction endonucleases and modification methyltransferases. *Gene* 74(1): 279–80.

Quail M.A., Smith M., Coupland P., Otto T.D., Harris S., Connor T.R., Bertoni A., Swerdlow H.P., Gu Y. (2012) A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13:341.

Watson J.D., Crick F.H. (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171(4356): 737–738.

Yap E.P., McGee J.O. (1991) Short PCR product yields improved by lower denaturation temperatures. *Nucleic Acids Res* 19: 1713.

Youssoufian H., Kazazian H.H., Phillips D.G., Aronis S., Tsiftis G., Brown V.A., Antonarakis S.E. (1986) Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. *Nature* 324: 380 – 382.

INDEX

A

abortivni materijal · 33, 38, 41, 42
alel · 24, 25, 76, 127, 129, 157
amnionska tekućina · 33, 38, 159
amplifikacija · 56, 63, 64, 68, 70, 75, 77, 81, 84, 87, 88, 94, 96, 121
annealing · 55, 57
apsolutna kvantifikacija · 67
ASA PCR · 13, 75, 76
ASO PCR · 13

B

bazna linija (*baseline*) · 67
biološki uzorak · 36, 43, 45
bukalna sluznica · 33, 36, 163

C

cDNK · 15, 69, 70, 71, 93, 113, 114
CFTR · 125, 126
Cistična fibroza · 125

D

de novo mutacija · 128, 133, 134
dezoksinukleotid trifosfati · 59, 61
dezoksiribonukleaza · 47

dezoksiribonukleinska kiselina · 12

dideoksinukleotidi · 86, 87, 88

dietilpirokarbonat · 45

dijagnostičko testiranje: · 158

distrofin · 123

DNK · 5, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 18, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 33, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 65, 66, 68, 69, 71, 73, 74, 75, 77, 78, 79, 81, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 100, 113, 114, 115, 118, 124, 126, 127, 128, 129, 131, 135, 136, 137, 138, 139, 142, 149, 153, 154, 157, 159, 160, 162, 172

DNK čip · 113

DNK sekvenciranje · 14, 85, 87

dNTP · 59, 61, 96

Duchenne/Becker mišićna distrofija · 123

E

elongacija · 57, 87, 88

emulzijski PCR · 94

end-point PCR · 63, 69

etidijum-bromid · 52

ex vivo · 139, 141, 142, 146, 150, 151

F

farmakogenetika · 153, 160

feces · 33, 37, 41, 42, 46
fenotip · 7, 8, 12, 23, 24, 27, 28,
29, 99, 100, 119
fetalna DNK · 159
FFPE slajdovi · 33, 35
fluorometrijska kvantifikacija ·
53, 54
forenzičko testiranje · 160
forward prajmer · 75, 76
fuzijski geni · 118
FVIII · 128

G

gel elektroforeza · 51, 52
gen · 68, 69, 70, 78, 90, 113,
119, 120, 123
generacija klastera · 94
genetičko savjetovanje · 164
genetičko testiranje · 12, 131,
157, 158, 160, 162, 163, 164,
165
genom · 7, 10, 11, 14, 15, 18,
23, 24, 26, 29, 30, 38, 47, 73,
83, 90, 91, 101, 102, 103,
105, 106, 136, 137, 138, 139,
142, 143, 146, 148, 149, 152,
153, 157
genotip · 8, 23, 27, 28, 125,
128, 129
genotipizacija · 63, 79
genska terapija · 135, 136, 140,
141, 144

H

hemofilija A · 128
heterozigot · 27, 76, 127, 129,
134
heterozigotna mutacija · 134
hibridizacija · 57, 58, 77, 78, 79,
113, 114
homozigot · 76, 129

horionske čupice · 33, 38, 41,
159
hromosom · 7, 8, 12, 24, 29, 31,
83, 118, 119, 129, 132, 133,
157, 159
hromosomske mutacije · 29
hromosomske translokacije ·
118

I

in vitro · 55, 71, 146, 159, 160
in vivo · 141, 142, 147
informirani pristanak · 161
IUPAC · 16, 17
IVF · 159, 160

K

koncentracija DNK · 50, 62
kost · 33, 38, 41, 43
koštana srž · 33, 35

L

leukemija · 117
ligacija · 13, 77, 79, 80
liza ćelija · 39, 40, 42

M

MAPH · 13, 77
MBG (*minor binding groove*) · 65
metoda ekstrakcije putem
kolona · 44
metoda izolovanja · 42, 43
Mg²⁺ · 59, 62
microarray · 113, 115
mitohondrijalna DNK · 60
MLPA · 13, 77, 78, 79, 80, 81,
123, 124, 162

mutacija · 9, 10, 12, 13, 14, 15,
18, 25, 28, 29, 31, 73, 75, 76,
77, 78, 99, 100, 106, 118,
126, 128, 129, 130, 131, 133
mutantni alel · 76

N

neinvazivno prenatalno
testiranje · 159
neurofibromatoza tip 1 · 133
nomenklatura mutacija · 14, 15
nukleinske kiseline · 7, 39, 46,
47, 49, 92, 107
nukleotidne mutacije · 29

O

obrada podataka · 77, 79, 82
odvajanje DNK · 40
organska ekstrakcija · 43, 46
osušene mrlje krvi na papiru ·
33, 35

P

PCR · 12, 13, 14, 33, 41, 42, 49,
55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62,
63, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71,
73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80,
81, 120, 122, 126, 128, 129,
157
perinatalno testiranje · 159
plus/minus esej · 63, 67
pljuvačka · 33, 36, 163
prag fluorescencije (*threshold*) ·
67
prajmer · 13, 57, 61, 70, 75, 87,
88, 126
precipitacija DNK · 39, 40
prediktivno i presimptomatsko
testiranje · 158, 159

preimplantacijsko testiranje ·
160
prenatalno testiranje · 159
primer – dimer · 61
puna krv · 33, 35, 36, 41

Q

quencher boja · 63, 65

R

real-time PCR · 14, 19, 63, 65,
66, 67, 68, 69, 77, 122
relativna kvantifikacija · 67, 68
reporter boja · 63, 64
restriksijski enzimi · 73
reverse prajmer · 75
reverzna transkripcija · 69, 71
reverzna transkriptaza · 69, 71
RFLP · 12, 73, 74, 128, 129
ribonukleaze · 45
ribonukleinska kiselina · 45
RNK · 15, 33, 35, 37, 43, 45, 46,
47, 48, 49, 51, 52, 53, 54, 68,
69, 70, 71, 79, 89, 92, 113,
114, 162

S

Sanger-bazirano sekvenciranje ·
88, 90, 91
sekvenciranje nove generacije ·
90, 91, 92, 97, 157, 158
skladištenje DNK · 41
SNP · 75
spektrofotometrija · 49
sperma · 33, 37, 41, 42
SYBR green · 63, 65, 66

T

Taq polimeraza · 55, 56, 58, 62
TaqMan · 63, 64, 66
testiranje nosioca · 159
tkivo · 33, 35, 38, 41, 42, 135,
136, 137, 150
touch down PCR · 84, 131

U

urin · 33, 36, 37, 41, 42

UV svjetlost · 49

W

wildtype alel · 75

Z

zub · 33