

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



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



GODINA OD OTKRIĆA  
SEKUNDARNE STRUKTURE MOLEKULA DNK



Beograd • Belgrade • 2023.  
IMGGI • IMGGE

<b>70 godina od otkrića sekundarne strukture molekula DNK</b> .....	8
The 70 <sup>th</sup> anniversary of the discovery of DNA secondary structure	
Goran Brajušković	
<b>Varijabilnost mitohondrijskog genskog pula stanovnika Republike Srbije</b> .....	18
Mitochondrial gene pool variability of the residents of the Republic of Serbia	
Slobodan Davidović, Jelena M. Aleksić, Milena Stevanović i Nataša Kovačević Grujičić	
<b>Sekvenciranje dugih fragmenata – sledeći nivo genomskih istraživanja</b> .....	38
Long read sequencing – the next level in genomic research	
Dušanka Savić-Pavićević, Lana Radenković, Luka Velimirov, Nemanja Radovanović, Anastasija Ninković, Nemanja Garai, Miloš Brkušanin, Marko Panić, Jovan Pešović	
<b>Stereotipija B-ćelijskog receptora u hroničnoj limfocitnoj leukemiji</b> .....	58
B-cell receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia	
Teodora Karan-Đurašević	
<b>Sadašnjost i budućnost primene sekvenciranja nove generacije za retke bolesti</b> .....	78
Present and future of next-generation sequencing application for rare diseases	
Maja Stojiljković i Jovana Komazec	
<b>Uloga vazopresinskog sistema paraventrikularnog jedra u razvoju hipertenzije</b> .....	90
The role of paraventricular nucleus vasopressin system in development of hypertension	
Bojana Stevanović, Nina Japundžić-Žigon	
<b>Antioksidativni i antiinflamatorni efekti suplementacije orasima (<i>Juglans regia</i> L.) na srce u metaboličkom sindromu izazvanom ishranom bogatom fruktozom</b> .....	106
Antioxidative and antiinflammatory effects of walnut supplementation ( <i>Juglans regia</i> L.) on heart with fructose-rich diet-induced metabolic syndrome	
Maja Bubić, Maja Živković	
<b>PHACTR1 u kardiovaskularnim bolestima: od studija asocijacije na celokupnom genomu do funkcionalnih studija</b> .....	122
PHACTR1 in cardiovascular disease: from genome-wide association studies to functional studies	
Jovana Kuveljić, Tamara Djurić	
<b>Uloga ciljanih (epi)genetičkih modifikacija u potencijalnoj terapiji dijabetesa</b> .....	138
The role of targeted (epi)genetic modifications in potential diabetes therapy	
Marija Đorđević, Svetlana Dinić, Mirjana Mihailović, Aleksandra Uskoković, Nevena Grdović, Jelena Arambašić Jovanović, Melita Vidaković	
<b>Uticaj delecije gena <i>Mif</i> na razvoj gojaznosti i steatoze jetre kod miševa na režimu ishrane obogaćene fruktozom</b> .....	151
The effects of deletion of the <i>Mif</i> gene on the development of obesity and hepatic steatosis in mice on fructose enriched diet	
Ljupka Gligorovska i Ana Djordjevic	
<b>Varijante i transkripcija gena koji kodiraju komponente leptinskog signalnog puta, inflamacije i antioksidativne zaštite u patogenezi multiple skleroze</b> .....	168
Variants and transcription of genes of the leptin signaling pathway, inflammation and antioxidant protection in pathogenesis of multiple sclerosis	
Ivana Kolić, Ljiljana Stojković	
<b>Parkinsonova bolest – dokle se stiglo?</b> .....	184
Parkinson's disease – state of the art	
Jadranka Miletić Vukajlović, Dunja Drakulić	
<b>Značaj farmakogenetike u terapijskom pristupu akutnog ishemijskog moždanog udara rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena</b> .....	205
Importance of pharmacogenetics for ischemic stroke therapy with recombinant tissue plasminogen activator	
Marija Dušanović Pjević	
<b>Beta-adrenergički receptori i kinaze uključene u proces njihove nishodne regulacije u eksperimentalnom modelu kardiomiopatije izazvane doksorubicinom</b> .....	218
Beta-adrenergic receptors and kinases involved in the process of their downregulation in experimental model of cardiomyopathy induced by doxorubicin	
Marija Kosić, Zorica Nešić, Nina Žigon	
<b>Uticaj genetičkih faktora na efikasnost i toksičnost terapije metotreksatom kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom</b> .....	232
Genetic factors impacting the efficacy and toxicity of methotrexate therapy in rheumatoid arthritis patients	
Milka Grk	
<b>Ekstrakti briofita kao imunomodulatori</b> .....	245
Bryophyte extracts as immunomodulators	
Tanja Lunić, Bojan Božić, Biljana Božić Nedeljković	
<b>Struktura, funkcija i regulacija ekspresije gena za akvaporine pri suši kod biljaka</b> .....	256
Structure, function and regulation of aquaporin gene expression during drought in plants	
Marija Đurić	
<b>Identifikacija gena za arabinogalaktanske proteine (AGP) biljaka korišćenjem metoda mašinskog učenja</b> .....	269
Identification of AGP genes of plants using machine learning methods	
Danijela Paunović	

## **Predgovor**

Prošlo je 70 godina od otkrića sekundarne strukture molekula DNK. Od tog momenta molekularna biologija se razvija neverovatnom brzinom. „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ u svakom poglavlju pokazuju fascinantne domete koje dostiže molekularna biologija našeg vremena. I Nobelove nagrade se skoro svake godine dodeljuju za postignuća iz ove naučne discipline. A naši molekularni biolozi drže korak sa modernim trendovima. Jedan od autora ovog Zbornika govori : „Bez sumnje, ono što je otkriće elektrona bilo za 20. vek to su otkrića genomike za 21. vek.“ Autori „Trendova u molekularnoj biologiji 3“ ni najmanje ne sumnjaju u to.

Ove godine TMB3 prati i suplement, Knjiga apstrakata Drugog kongresa molekularnih biologa Srbije (CoMBoS2). Pod pokroviteljstvom Srpskog društva za molekularnu biologiju, Beograd je bio 2023. godine mesto susretanja molekularnih biologa Srbije, regiona i Evrope. Doprinos Kongresu, koji su obeležila inspirativna predavanja i inovativne naučne ideje, dali su svi molekularni biolozi Srbije. Formula uspešnosti i ovde je bila aktuelna:

**„Svi za jednog, jedan za svi!“**

**Sonja Pavlović**

## Iz recenzija Tematskog zbornika *Trendovi u molekularnoj biologiji*

Treći broj *Trendova u molekularnoj biologiji* predstavlja nastavak dobre prakse prikazivanja najboljih naučnih radova mladih istraživača Republike Srbije u oblasti molekularne biologije, kao i najznačajnijih otkrića i metodoloških pomaka u ovoj oblasti. Osim ovog glavnog cilja, *Trendovi* ne zaboravljaju značajne godišnjice i podsećanja na najznačajnija dostignuća i prekretnice u razvoju molekularne biologije. Tako je u ovom trećem broju prikazan jedan od temeljnih radova u ovoj oblasti – 70 godina od otkrića sekundarne strukture DNK. Radovi koji su obeležili prošlu godinu i koji su ovde prikazani odnose se na proučavanje genoma starih humanih populacija i evolucije (Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 2022), a metodološki pomak je sekvenciranje dugih fragmenata DNK.

*Trendovi u molekularnoj biologiji* 3 svojim sadržajem u potpunosti su opravdali naziv koji nose – prikazani radovi su tematski aktuelni, inspirativni i veoma značajni u naučnom i širem društvenom smislu. Ova publikacija predstavlja svojevrsni presek stanja u molekularnoj biologiji u Srbiji i deo je napora da se prate trendovi i drži korak sa molekularnom biologijom u svetu. Zbog značaja koji ima, nadam se da će se trend objavljivanja *Trendova* nastaviti i narednih godina.

**Dr Svetlana Radović, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu**

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ je treći broj u nizu izdanja koje ima za cilj da prikaže naučne rezultate iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije u prethodnoj godini. Sačinjen je od 18 poglavlja, od kojih 12 predstavljaju revijske radove proizašle iz doktorskih disertacija mladih doktora nauka u kojima je prikazan njihov doprinos određenoj naučnoj oblasti molekularne biologije koja je povezana sa temom njihove disertacije. Preostalih 6 poglavlja su prikazi aktuelnih tema iz molekularne biologije u kojima su naši naučnici dali svoj značajni doprinos. Uvodno poglavlje je posvećeno jubileju, sedamdesetogodišnjici od otkrića strukture molekula DNK, momentu kad je molekularna biologija krupim koracima krenula ka budućnosti, u kojoj je uz ITK tehnologije postala vodeća nauka.

Veliki broj poglavlja iz Zbornika (12) je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. To je, očigledno, najznačajnija tema za naše istraživače koji se bave molekularnom biologijom. Tu su i 3 poglavlja iz oblasti farmakogenomike, koja predstavlja najnoviji trend u medicini – personalizovana (precizna) medicina. Ova 3 rada svedoče o tome da naši naučnici prate najnovija stremljenja u medicini. Posebno treba istaći doprinos mladih istraživača iz grupe medicinskih fakulteta ovom izdanju. Čak četvoro istraživača sa Medicinskog fakulteta i jedan sa Stomatološkog fakulteta su priložili poglavlja nastala iz njihovih doktorskih disertacija. Ovo pokazuje da medicina u Srbiji prati svetske trendove. Ovaj broj Tematskog zbornika svedoči i o tome da su značajna postignuća molekularnih biologa u Srbiji donela napredak našoj medicini. Prva dva broja Tematskog zbornika „Trendovi u molekularnoj biologiji 1 i 2“ su doživela veliko interesovanje. Imala su i svoju promociju na Sajmu knjiga. Interesovanje autora da objave svoje rezultate u tematskom zborniku „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ govori da je ovaj tip publikacije nedostajao našoj naučnoj zajednici.

**Dr Vesna Škodrić Trifunović, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu**

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ sadrži prikaze nekih od najznačajnijih tema u molekularnoj biologiji, počev od ovogodišnjeg jubileja - 70 godina od otkrića sekundarne strukture molekula DNK, preko odabira aktuelnosti koje su obeležile prethodnu godinu u svetu, do naučnih rezultata iz ove oblasti koje su ostvarili istraživači iz Srbije. U okviru Aktuelnih tema, sumirani su rezultati istraživanja iz oblasti fiziologije i medicine za koje je u 2022. godini dodeljena Nobelova nagrada, a odnose se na genomiku starih humanih populacija i evoluciju. Takođe, dat je i prikaz metode sekvenciranja dugih fragmenata, koja je po časopisu *Nature Methods* odabrana za metodu 2022. godine. Preostale teme su iz oblasti kojima se bave istraživači iz Srbije, a koje uključuju istraživanja iz biomedicine, farmakogenomike, kao i molekularne biologije biljaka. Važno je istaći da su mladi doktori nauka aktivno učestvovali u izradi ovog Zbornika, tako da 12 poglavlja u okviru navedenih oblasti predstavljaju revijske radove proizašle iz njihovih doktorskih disertacija odbranih u prethodnoj godini.

Značajno je da se ovaj Tematski zbornik objavljuje već treću godinu za redom, kao i to da su u njegovoj realizaciji ove godine učestvovali istraživači iz različitih naučnih instituta (3) i fakulteta (3) Univerziteta u Beogradu. Ove činjenice ohrabruju, ukazujući da u našoj zemlji postoji kontinuitet u istraživanjima u molekularnoj biologiji koja su aktuelna u svetu, uz to da su dobijeni rezultati iz ove oblasti dostupni i široj javnosti na maternjem jeziku. „Trendovi u molekularnoj biologiji 3“ je tematski zbornik u kome su objedinjeni rezultati fundamentalnih i primenjenih istraživanja u molekularnoj biologiji ostvarenih u našoj zemlji, iz tematskih oblasti koje su prepoznate i aktuelne u svetu.

**Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu**

## Sekvenciranje dugih fragmenata – sledeći nivo genomskih istraživanja

Dušanka Savić-Pavićević,<sup>1</sup> Lana Radenković,<sup>1</sup> Luka Velimirov,<sup>1</sup> Nemanja Radovanović,<sup>1</sup>  
Anastasija Ninković,<sup>1</sup> Nemanja Garai,<sup>1</sup> Miloš Brkušanin,<sup>1</sup> Marko Panić,<sup>2</sup> Jovan Pešović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet, Centar za humanu molekularnu genetiku, Beograd

<sup>2</sup>Institut za virusologiju, vakcine i serume „Torlak“ Beograd

Kontakt: duska@bio.bg.ac.rs

### Apstrakt

Sekvenciranje dugih fragmenata ili treća generacija sekvenciranja u realnom vremenu produkuje očitavanja pojedinačnih molekula DNK dužine od 1 kb do nekoliko Mb sa očuvanim epigenetičkim oznakama. Dostupne tehnologije su sekvenciranje pojedinačnih molekula u realnom vremenu (eng. *single-molecule real-time sequencing*, *PacBio*) i sekvenciranje kroz proteinske nanopore (*Oxford Nanopore Technologies*). *PacBio* tehnologija zasnovana je na detekciji ugradnje nukleotida od strane pojedinačnog molekula DNK polimeraze u realnom vremenu, korišćenjem fluorescencije kao surogat markera. *PacBio HiFi* očitavanja su dužine ~15 kb sa tačnošću >99,9%. *Oxford Nanopore* tehnologija izvodi sekvencu nukleotida iz promena u intenzitetu jonske struje dok DNK prolazi kroz stohastički senzor – proteinsku nanoporu. Može sekvencirati fragmente DNK u rasponu od pet redova veličina (20 bp do nekoliko Mb) sa tačnošću dupleks očitavanja >99,9% kada se koriste R10.4.1 nanopore. Sa elektronskim „čitanjem“ nukleinskih kiselina, inovacije kao što su minijaturni uređaj veličine dlana sa cenom <1000 dolara, sekvenciranje na terenu, digitalno obogaćivanje ciljnih sekvenci (adaptivno uzorkovanje) i direktno sekvenciranje RNK, postali su stvarnost. Sekvenciranje dugih fragmenata omogućilo je kompletiranje sekvence genoma čoveka, objavljivanje drafta ljudskog pangena i ubrzalo je sekvenciranje genoma eukariota. Od uvođenja metode 2011. godine sekvencirano je ~1000 od 1065 genoma deponovanih u *NCBI* bazi. Puni potencijal metode u izučavanju transkriptoma i epigenoma biće vidljiv u godinama koje slede. Sekvenciranje dugih fragmenata postaje osnova precizne medicine efikasne za sve ljudske populacije i očuvanja biodiverziteta, i završilo je da bude metoda 2022. godine prema časopisu *Nature Methods*.

**Ključne reči:** sekvenciranje dugih fragmenata, treća generacija sekvenciranja, sekvenciranje kroz nanopore, *SMRT* sekvenciranje, genomika

## Long read sequencing – the next level in genomic research

Dužanka Savić-Pavićević,<sup>1</sup> Lana Radenković,<sup>1</sup> Luka Velimirov,<sup>1</sup> Nemanja Radovanović,<sup>1</sup>  
Anastasija Ninković,<sup>1</sup> Nemanja Garai,<sup>1</sup> Miloš Brkušanin,<sup>1</sup> Marko Panić,<sup>2</sup> Jovan Pešović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Belgrade-Faculty of Biology, Center for Human Molecular Genetics, Belgrade

<sup>2</sup>Institute of Virology, Vaccines and Sera “Torlak”, Belgrade

Correspondence: duska@bio.bg.ac.rs

### Abstract

Long read or third-generation sequencing produces reads from 1 kb to several Mb in length with preserved epigenetic marks, at the single-molecule level and in real-time. Single-molecule real-time sequencing (PacBio) and protein nanopore sequencing (Oxford Nanopore Technologies) are available technologies. PacBio technology is based on monitoring the nucleotide incorporation by a single DNA polymerase molecule in real time using fluorescence as a surrogate marker. PacBio HiFi reads are ~15 kb in length with >99.9% accuracy. Oxford Nanopore sequencing infers nucleotide sequence from the changes in ion current intensity while DNA passes through a stochastic sensor – a protein nanopore. It can sequence DNA fragments ranging in five orders of magnitude (20 bp to several Mb), with duplex read accuracy >99.9% when using R10.4.1 nanopores. Innovations such as a miniature device of the palm-size with a price <1000 dollars, sequencing in the field, digital enrichment of target sequences (adaptive sampling) and direct RNA sequencing have become a reality with the electronic „reading“ of nucleic acids. Long read sequencing enabled completing the human genome sequence and releasing a draft of the human pangenome reference. It has also accelerated genome sequencing of eukaryotic species. Out of 1065 genomes deposited in the NCBI database, ~1000 were sequenced since its development. The full potential of the method in studying transcriptome and epigenome will be visible in the years to come. Long read sequencing is becoming the basis of precision medicine effective for all human populations and biodiversity conservation and was announced as the method of the year 2022 according to Nature Methods.

**Key words:** long read sequencing, third-generation sequencing, nanopore sequencing, SMRT sequencing, genomics



Otkriće sekundarne strukture DNK 1953. godine omogućilo je razumevanje principa prenošenja i korišćenja genetičkog materijala. Za obuhvatnije razumevanje sadržaja, funkcije i varijabilnosti genetičke informacije bilo je potrebno odrediti redosled nukleotida u genomima. Imperativ je ubrzo postao razvoj metoda za sekvenciranje DNK ili kolokvijalno „čitanje“ DNK. Svedoci smo da je svaki napredak u tehnologijama sekvenciranja DNK omogućavao revolucionarne korake napred koji su bili i ostali ključni za razumevanje bioloških fenomena i impakt koji biologija ima u nauci i društvu.

## Tehnologije sekvenciranja DNK – konstantno pomeranje granica

### Prva generacija sekvenciranja

Prve metode sekvenciranja DNK, Maksam-Gilbertova [Maxam-Gilbert] [1] i Sangerova [Sanger] [2], razvijene su sredinom sedamdesetih godina prošlog veka. Sangerovom metodom je 1977. godine prvo pročitani genom faga  $\phi$ -X174 dužine 5386 nukleotida (nt) [3]. Zatim je 1981. godine sekvenciran mitohondrijski genom čoveka dužine 16569 baznih parova (bp) [4], a 1982. godine genom  $\lambda$  faga dužine 48502 bp [5]. Sangerova metoda oslanja se na enzimsku sintezu DNK uz korišćenje obeleženih dideoksi nukleotida (terminatora sinteze) i elektroforetsko razdvajanje fragmenta DNK. Metoda sekvencira jedan po jedan fragment DNK dužine 200-800 bp [2], a tačnost sekvenciranja (procenat ispravno očitanih nukleotida nakon poravnjanja na referentnu sekvencu, eng. *sequencing accuracy*) je veća od >99,9% i uzima se kao standard za sekvenciranja visoke tačnosti. Automatizacija Sangerove metode, koju je komercijalizovala kompanija *Applied Biosciences*, kulminirala je 2003. godine objavljivanjem prve referentne sekvence 92% genoma čoveka dužine 2,86 gigabaze (Gb ili  $10^9$  bp) i završetkom Projekta „Genom čoveka“ (eng. *Human Genome Project*) [6]. Projekat slovi za najambiciozniji poduhvat u biologiji, trajao je čitavih 13 godina i koštao oko 3 milijarde dolara. Vodeći naučnici projekta, Francis Kolins [Francis Collins] i Kreg Venter [Craig Venter], složili su se da je ovo izuzetno dostignuće samo početak napora da se razume genom (čoveka) i složenost bioloških sistema, kao i da se stečena znanja primene za dobrobit čovečanstva. Od tog perioda, najpropulzivnija grana biologije postaje genomika.

### Druga generacija sekvenciranja

Niska propusnost i visoka cena Sangerove metode predstavljali su ograničenje za sekvenciranje genoma velikog broja bioloških vrsta i sekvenciranje na populacionoj skali u cilju razumevanja genetičke varijabilnosti. Progres je stimulisan već 2004. godine kada su američki Nacionalni instituti za zdravlje (eng. *National Institutes of Health, NIH*) objavili poziv za Projekat revolucionarnih tehnologija za sekvenciranje genoma, vredan 70 miliona dolara sa ciljem da se u narednih 15 godina dostigne cena sekvenciranja genoma čoveka od 1000 dolara. Projekat je doprineo razvoju raznovrsnih i inovativnih tehnologija sekvenciranja DNK, uključujući i današnje vodeće tehnologije druge i treće generacije [7-9].

Prva komercijalizovana i dominantna tehnologija druge generacije sekvenciranja, poznatija kao sekvenciranje sledeće generacije (eng. *next generation sequencing, NGS*) je *Solexa-Illumina* tehnologija. Njena ključna novina bila je visoka propusnost zbog masivnog paralelnog sekvenciranja miliona fragmenata DNK omogućenog klonalnom amplifikacijom na čvrstoj podlozi koja pravi klastere sastavljene iz ogromnog broja identičnih fragmenata DNK [10,11]. Sledi enzimaska sinteza DNK u svakom klasteru tokom koje DNK polimeraza kao supstrate koristi fragmente DNK iz klastera i fluorescentno obeležene nukleotide koji imaju blokiranu 3'-OH grupu (reverzibilne terminatore) [12]. Nakon ugradnje jednog nukleotida, sinteza se zaustavlja da bi se fluorescentni signal paralelno detektovao u milionima klastera. Sledi uklanjanje blokatora sa 3'-

OH grupe ugrađenog nukleotida i proces se ponavlja kako bi se odredila sekvenca DNK u svakom od klastera [7,8]. Sekvenca fragmenata od 50 do 500 bp može se odrediti sa tačnošću >99,9% [12,13], tako da metoda zajedno sa Sangerovom spada u grupu tehnologija sekvenciranja kratkih fragmenata (eng. *short-read sequencing*).

U poslednjih desetak godina *Illumina* tehnologija omogućila je konstantan rast obima sekvenciranja i postala je zlatni standard. Od sekvenciranja 1,3 genoma čoveka sa pokrivenošću od 30 puta na prvim aparatima, danas samo jedan aparat iz serije *NovaSeqX* može sekvencirati više od 20000 humanih genoma godišnje po ceni jednog genoma od 200 dolara. Povećanje propusnosti metode omogućilo je i prve populacione projekte poput „1000 genoma“ [14]. Tehnologija je primenjena i za očitavanje metoda funkcionalne genomike koje izučavaju strukturu hromatina, interakciju genoma i transkripcionih faktora, transkriptom, interakciju RNK i RNK-vezivnih proteina, kovalentne modifikacije RNK i translatom [15-18], omogućivši ne samo brz napredak genomike, već i razvoj transkriptomike, epigenomike i epitranskriptomike. Neverovatan prodor i široka dostupnost tehnologije rezultovali su ogromnim brojem naučnih otkrića vezanih za funkcionisanje i varijabilnost genoma, koji su bezmalo obeležili poslednjih 10-15 godina. Dobri primeri za to su prepoznavanje funkcionalnosti nekodirajućih regiona genoma eukariota, uključujući i gene za duge nekodirajuće RNK [15,19], ili razumevanje evolucije čoveka kroz otkrića vezana za genome praištorskih ljudi koja su Svante Pabu [Svante Pääbo] donela Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu 2022. godine [20]. *Illumina* tehnologija je sekvenciranje DNK učinila i glavnom kliničkom alatkom u dijagnostici retnih bolesti i personalizovanoj medicini, pružajući nova znanja o genetici humanih bolesti i postavljajući osnov za razvoj inovativnih terapeutika [21,22]. Potencijal druge generacije sekvenciranja prepoznao je časopis *Nature Methods* proglašivši je još u njenom ranom razvoju za metodu 2007. godine [23].

### Treća generacija sekvenciranja

Iako je impakt *NGS* tehnologije na nauku i društvo impresivan, tempo tehnoloških inovacija u sekvenciranju nukleinskih kiselina nije opao ni u jednom trenutku. Težilo se razvoju tehnologija sekvenciranja dugih fragmenata (eng. *long-read sequencing*) kako bi se prevazišla ograničenja tehnologije kratkih fragmenata u sekvenciranju genoma viših eukariota i razumevanju transkriptoma. Dve dominantne tehnologije sekvenciranja dugih fragmenata su sekvenciranje pojedinačnih molekula u realnom vremenu (eng. *single-molecule real-time, SMRT*) kompanije *Pacific Biosciences (PacBio)* [24] i sekvenciranje kroz proteinske nanopore kompanije *Oxford Nanopore Technologies (ONT)* [25]. Nedavno su *PacBio HiFi* (eng. *high-fidelity*) očitavanja dužine ~15 kb [26] i veoma duga dupleks *ONT* očitavanja dužine ~100 kb (eng. *ultra-long reads*) dobijena kroz nanopore R10.4.1 [27] dostigli tačnost >99,9%. Ovaj metodološki napredak omogućio je Konzorcijumu od telomere do teleomere (eng. *Telomere-to-Telomere Consortium, T2T*) da pročita preostalih 8% genoma čoveka i učini dostupnim prvi kompletan referentni genom čoveka T2T-CHM13 dužine 3055 Gb [28]. Zbog ovog dostignuća i potencijala sa širokom primenom u svim oblastima genomskih istraživanja, sekvenciranje dugih fragmenata zavredelo je bude metoda 2022. godine prema časopisu *Nature Methods* [29].

Konceptualne novine koje treća generacija sekvenciranja donosi su: sekvenciranje pojedinačnih molekula nukleinskih kiselina, sekvenciranje u realnom vremenu, sekvenciranje dugih fragmenta od 1 kilobaze (kb,  $10^3$  bp) do čak nekoliko megabaza (Mb,  $10^6$  bp) i sekvenciranje nativnih molekula DNK sa očuvanim epigenetičkim modifikacijama [9]. Dodatne novine jedinstvene za sekvenciranje kroz nanopore su elektronsko sekvenciranje, minijaturizacija aparata do veličine dlana, sekvenciranja na terenu, digitalno obogaćivanje ciljnih fragmenata DNK (eng. *adaptive sampling*) i direktno sekvenciranje RNK [25]. Razvoje treće generacije sekvenciranja otvara neverovatne mogućnosti za dalji progres u genomici i srodnim oblastima, pomerajući

granice u biološkim istraživanjima i oblastima u kojima primena bioloških dostignuća unosi konceptualne promene. Pored toga, primena nanopora ima potencijal da sekvenciranje nukleinskih kiselina učini dostupnim u meri uporedivom sa dostupnošću kompjuterskih tehnologija nakon uvođenja prenosivih računara.

## **SMRT sekvenciranje – jedan molekul DNK polimeraze kao mašina za sekvenciranje jednog molekula DNK u realnom vremenu**

### **Razvoj i princip SMRT sekvenciranja**

Slično Sangerovoj i *Illumina* tehnologijama, *SMRT* tehnologija koristi enzimsku sintezu DNK i sekvencu određuje koristeći fluorescenciju kao surogat marker. Međutim, ono što joj omogućava sekvenciranje pojedinačnih, nativnih, dugih fragmenata DNK u realnom vremenu je korišćenje procesivnosti i realne brzine polimerizacije DNK polimeraze [24]. Dve inovacije su bile ključne za razvoj tehnologije. Prva je vezana za nukleotide sa fluorobojom vezanom preko linkera za 5'- $\gamma$ -fosfat (eng. *phospholinked nucleotides*), koji obezbeđuju kontinuiranu sintezu DNK [30,31]. Druga inovacija je čip sa talasovodima nultog moda (eng. *zero-mode waveguides*, *ZMW*) koji paralelno detektuje aktivnost na hiljade pojedinačnih molekula DNK polimeraza u prisustvu visoke koncentracije nukleotida u vremenskoj skali u milisekundama [32]. Ovako dizajnirani čip bio je neophodan za prećenje sinteze DNK u realnom vremenu i visoku propusnost metode. *ZMW* čipove razila je kompanija *PacBio* pod nazivom *SMRT* ćelije (eng. *SMRT cell*), a potom i komercijalizovala metodu 2011. godine.

*SMRT* ćelija sadrži na stotine hiljada ili nekoliko miliona *ZMW*-ova u kojima se fluorescencija paralelno detektuje. Sam *ZMW* je nanofotonska struktura čiji dizajn rešava problem detekcije aktivnosti pojedinačnih molekula DNK polimeraza koji nastaje zbog inherentnog svojstva enzima da interval između ugradnje dva nukleotida stohastički varira. Predstavlja minijaturni cilindar perforiran u tanki metal, ima providno dno i prečnik od nekoliko desetina nanometara (nm) koji je manji od talasne dužine svetlosti kojom se ekscitiraju fluoroboje (slika 1A) [32]. Kada se laserskom svetlošću osvetli *ZMW*, talasna dužina svetlosti je velika da bi prošla kroz providno dno. Međutim, svetlost se ne zaustavlja na samom providnom dnu već oslabljena prodiire u donji deo *ZMW*-a do njegove visine od 20-30 nm, čime se stvara opservaciona zapremina od svega dvadesetak zeptolitara ( $10^{-21}$  litara). Minijaturna opservaciona zapremina, za više od tri reda veličine manja u odnosu na konfokalnu fluorescentnu mikroskopiju, obezbeđuje detekciju ekscitacije jedne fluoroboje uprkos relativno visokim koncentracijama obeleženih nukleotida (mM do mM) potrebnih DNK polimerazi za brzu, tačnu i procesivnu sintezu DNK [32]. Tako, u *ZMW* prečnika 100 nm, prosečna zauzetost opservacione zapremine je ~0,01 do 1 molekula obeleženog nukleotida. Pored navedenih osobina *ZMW*-a, specifična površinska hemija na providnom dnu favorizuje imobilizaciju DNK polimeraze dok je inhibirana nespecifična adsorpcija obeleženih nukleotida [33].

U instrumentu za *SMRT* sekvenciranje kontinuirano se vrši multilaserska ekscitacija i detekcija koja verno diskriminiše četiri spektralno različite fluoroboje, paralelno u ogromnom broju *ZMW*-ova. Puls fluorescencije detektuje se pri emitovanju 99% upadne svetlosti [34]. Puls počinje vezivanjem obeleženog nukleotida za DNK polimerazu, traje dok je nukleotid vezan za polimerazu i završava nakon ugradnje nukleotida u rastući DNK lanac (slika 1A). Oslobođeni pirofosfat sa vezanom fluorobojom brzo difunduje iz opservacione zapremine *ZMW*-a. Zadržavanje ispravnog nukleotida u aktivnom centru DNK polimeraze je mnogo duže od vremena zadržavanja neispravnog nukleotida (<1 ms) ili difuzije slobodnih nukleotida, prisutnih u visokim, biološki relevantnim koncentracijama, u opservacionu zapreminu (2 do 10 ms), što se detektuje kao kon-

stantan pozadinski signal koji je mnogo niži u odnosu na puls fluorescencije (slika 1A). Nakon ugradnje jednog nukleotida, sledi translokacija matrice, a DNK polimeraza u aktivno mesto vezuje sledeći nukleotid, što označava početak sledećeg pulsa. Redosled pulsa fluorescencije zabeležen u dijagramu zavisnosti intenziteta pulsa u od vremena prevodi se u redosled nukleotida (slika 1A). Trajanje pulsa fluorescencije zavisi od brzine ugradnje nukleotida DNK polimerazom, dok je trajanje interpulsa kombinacija vremena translokacije i vezivanja sledećeg ispravnog nukleotida. U dokazu koncepta metode korišćena je j29 polimeraza jer je izuzetno procesivna i sastoji se od jedne subjedinice [24].

Biblioteka za sekvenciranje se sastoji od topološki kružnih molekula DNK nastalih ligiranjem oba kraja nativnog dvolančanog DNK fragmenta sa jednolančanim adapterima koji imaju strukture ukosnice, te svako očitavanje sadrži sekvencu oba lanca DNK fragmenta. Za formirane kružne molekule vezuju se DNK polimeraza i prajmer komplementaran adapteru. Nakon nalivanja biblioteke na *SMRT* ćeliju po jedan kružni molekul DNK ulazi u *ZMW*, a DNK polimeraza se pozicionira na njegovo dno. Dodavanjem obeleženih nukleotida počinje sinteza DNK i detektuje se fluorescencija svakog ugrađenog nukleotida. S obzirom na to da se za pripremu biblioteke koriste nativni molekuli DNK i da DNK polimeraza sporije ugrađuje nukleotide ako se u matrici nalazi modifikovani nukleozid, prisustvo dužeg interpulsa u odnosu na referentnu amplifikovanu DNK, ukazuje na prisustvo epigenetičkih oznaka (slika 1A). Do sada su uspešno detektovani N6-metilendozin, 5-metilcitidin, 5-hidroksimetilcitidin i 4-metilcitidin [35].

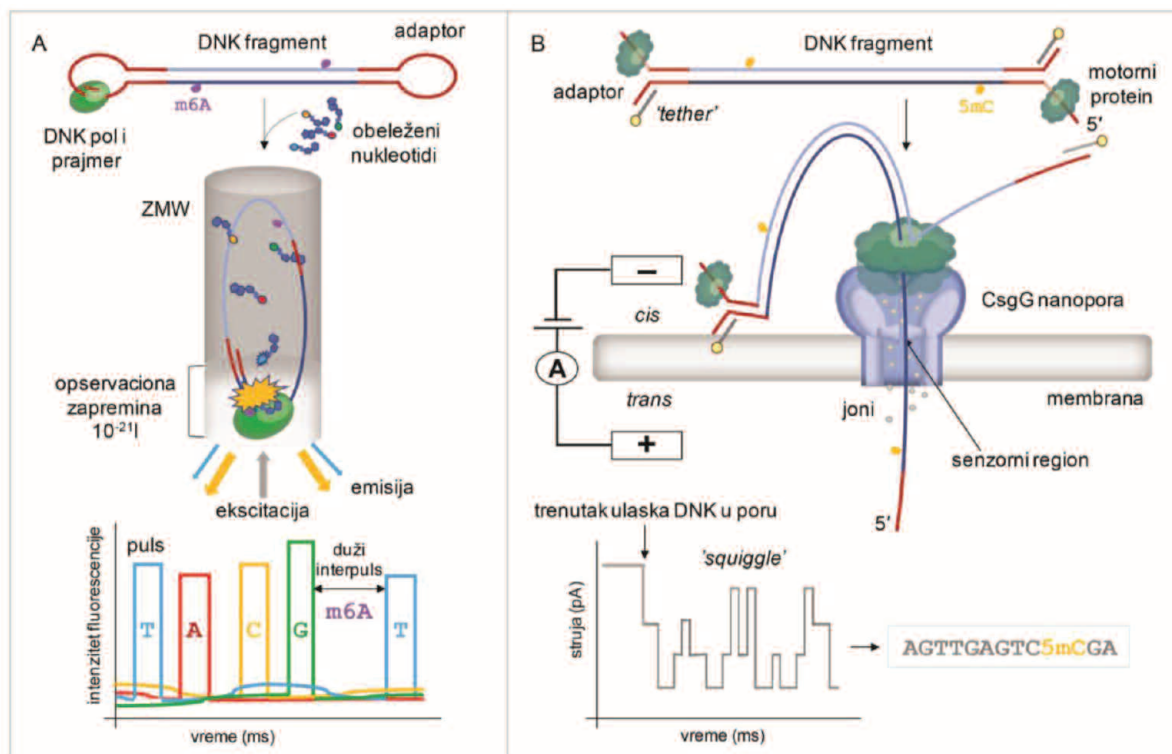
### Dužina očitavanja, tačnost i prinos *SMRT* sekvenciranja

Prosečna dužina očitavanja *SMRT* sekvenciranja iznosi od jedne do nekoliko stotina kb, a glavni ograničavajući faktor je procesivnost DNK polimeraze. Metoda se prvo oslanjala na duga kontinuirana očitavanja (eng. *continuous long reads, CLR*). Zbog dužine DNK fragmenta >30 kb, DNK polimeraza je mogla uglavnom jednom ili ređe par puta da iskoristi kružni molekul DNK kao matricu, stvarajući tako *CLR*-ove sastavljene iz podočitavanja (eng. *subreads*). Tačnost sekvenciranja po podočitavanju (eng. *subread accuracy*) iznosi 85–92% [9]. Obrazac grešaka je nasumičan sa izuzetkom homopolimernih nizova dužih od pet nukleotida, koji se čitaju sa tačnošću od ~85%. Bioinformatičkim poliranjem (eng. *polishing*) podočitavanja pomoću sirovih podataka fluorescentnih pulseva dobijala se konsenzusna sekvencija veće tačnosti, ali standard od >99,9% tačnosti nije mogao biti dostignut. Još u originalnom radu o *SMRT* sekvenciranju predloženo je da bi kružno konsenzusno sekvenciranje (eng. *circular consensus sequencing, CCS*) moglo da poboljša tačnost metode. Uočeno je da poravnanje 15 očitavanja eliminiše slučajne, ali ne i sistemske greške u pojedinačnim očitavanjima dajući konsenzusnu sekvenciju tačnosti 99,3% (eng. *consensus accuracy*) [24]. *CCS* podrazumeva da DNK polimeraza više puta iskoristi kružni molekul DNK kao matricu dajući jedno očitavanje sastavljeno iz podočitavanja koja i dalje imaju tačnost od 85–92%. Kako bi se postiglo da konsenzusna sekvencija izvedena iz podočitavanja dostigne tačnost >99,9% uveden je korak pre-ekstenzije u kome DNK polimeraza započinje sintezu DNK bez laserskog očitavanja [26]. Na ovaj način „eliminišu“ se oštećeni fragmenti DNK na kojima polimeraza biva zarobljena. Na osnovu zapažanja da DNK polimeraza u *ZMW*-u uspešno sintetiše fragmente od ~150 kb i da je potrebno da ~10 puta prepíše jednolančanu kružnu DNK kako bi se postigla tačnost od 99,9%, procenjeno je da bi optimalna dužina fragmenata DNK u *SMRT* biblioteci trebalo da bude 10-15 kb. Danas se ovim pristupom sekvenciraju fragmenti prosečne dužine ~15 kb, a maksimalno 25 kb sa tačnošću konsenzusne sekvence >99,9%, zbog čega se naziva *HiFi* očitavanje. Korišćenjem *HiFi* očitavanja moguće je *de novo* asemblirati genom čoveka sa prosečnom tačnošću >99,8% [26].

Do sada je proizveden nekoliko generacija aparata za *SMRT* sekvenciranje. Aparat *RSII* koristio je *SMRT* ćeliju sa ~150000 *ZMW*-ova. Prinos sekvenciranja (količina dobijenih podataka po jednoj ćeliji/eksperimentu,

eng. *sequencing yield*) po jednoj *RSII* ćeliji tokom *CLR* sekvenciranja iznosila je 1-10 Gb [9]. *Sequel II* aparat iz sledeće generacije koristi *SMRT* ćeliju sa 8 miliona *ZMW*-ova sa prinosom *CLR* sekvenciranja od 160 Gb i *CCR* sekvenciranja od 15-25 Gb [9]. Verzija *Sequel IIe* može primiti pet *SMRT* ćelija, što godišnje omogućava sekvenciranje 300 genoma čoveka. Aparat poslednje generacije, *Revio* čija je prodaja počela u prvoj polovini 2023. godine, koristi *SMRT* ćelije sa 25 miliona *ZMW*-ova i prinosom sekvenciranja od 90 Gb. Jedna ćelija je dovoljna za sekvenciranje genoma čoveka po ceni od 750-1000 dolara, a pošto aparat prima četiri ćelije, godišnje može da sekvencira 1300 genoma čoveka [36].

Razvoj tehnologija sekvenciranja dugih fragmenata prati razvoj različitih pristupa za izolovanje i prečišćavanje DNK visoke molekulske težine (eng. *high molecular weight, HMW*) jer integritet DNK predstavlja dodatni ograničavajući faktor za dužinu sekvenciranih fragmenata. Tako, većina kompanija koje proizvode komplete za izolovanje DNK u ponudi ima i one za izolovanje *HMW* DNA. Vrlo često se koriste i različite metode za eliminaciju kratkih fragmenata ili odabir fragmenata željene veličine kako bi se dobila određena distribucija fragmenata i/ili poboljšao prinos sekvenciranja, imajući u vidu da kraći fragmenti brže difunduju kroz protočnu ćeliju i smeštaju se u *ZMW*. S obzirom da tehnologije dugih očitavanja koriste native molekule DNK, njihova mana je potreba za mikrogramskim (mg) količinama DNK.



Slika 1. Sekvenciranje dugih fragmenata. A) *SMRT* sekvenciranje (eng. *single-molecule real-time sequencing, Pacific Bioscience*). Biblioteka za sekvenciranje formira se ligiranjem dvolančanih nativnih fragmenata DNK i adaptera u obliku ukosnice. Nastaju kružni jednolančani molekuli DNK što omogućava sekvenciraju oba lanca datog fragmenata DNK. Nakon dodavanja DNK polimeraze i prajmera komplementarnog adapteru, biblioteka se naliva na protočnu ćeliju koja sadrži na milione talasovoda nultog moda – *ZMW*-ova (eng. *zero-mode waveguides*). Samo jedan kružni molekul DNK sa polimerazom i prajmerom staje u jedan *ZMW*, a sama polimeraza se privezuje za njegovo dno. Nakon dodavanja nukleotida oboleženih fluorobojama vezanim za 5'-g-fosfat, polimeraza započinje sintezu DNK. Zbog opservacione zapremina *ZMW*-a od svega dvadesetak pikolitara ( $10^{-21}$  l) detektuje se ugradnja pojedinačnih nukleotida u jednom molekulu DNK kroz kontinuiranu multilasersku ekscitaciju i detekciju emitovane svetlosti iz pojedinačnog *ZMW*-a. Iz dijagrama zavisnosti intenziteta fluorescencije od vremena izvodi se sekvenca DNK. Na osnovu dužih interpulsa mogu se direktno, "čitati" epigenetičke oznake molekula DNK, npr. N6-metiladenozin i 5-metilcitolidin, jer modifikovani nukleozidi usporavaju kinetiku ugradnje nukleotida DNK polimerazom. B) Sekvenciranje kroz proteinske nanopore (eng. *Oxford nanopore sequencing, Oxford Nanopore Technologies*). Biblioteka za sekvenciranje se sastoji od nativnih dvolančanih fragmenata DNK ligiranih za adaptore koji sadrže motorni protein i hibridizuju sa 'privezivačem' (eng. *tether*). Nakon nalivanja na protočnu ćeliju 'privezivač' olakšava DNK fragmentu da stigne do pore i pridržava je za električno otpornu membranu urojnenu u rastvor elektrolita. Funkcija motornog proteina je da topi dvolančanu DNK i usporava kretanje jednolančane DNK kroz nanoporu. Nakon primene konstantnog napona, jednolančana DNK prolazi kroz nanoporu a intenzitet struje opada. Promene intenziteta struje su najizraženije pri prolasku DNK kroz senzorni region nanopore. Iz strujnog zapisa u funkciji vremena sastavljenog iz kontekstualne informacije nastale kada se nekoliko (pet) nukleotida istovremeno nađe u senzornom regionu, izvodi se sekvenca DNK. Iz strujnog zapisa moguće je, "čitati" epigenetičke oznake, jer svaka modifikacija nukleozida doprinosi promeni struje na specifičan način.



## Sekvenciranje kroz proteinske nanopore – elektronsko „čitanje“ pojedinačnih molekula nukleinskih kiselina

### Razvoj i princip sekvenciranja kroz proteinske nanopore

Dejvid Dimer [David Deamer] je još 1989. godine zabeležio ideju o direktnom sekvenciranju DNK: „Koncept – DNK će biti vođena kroz mali kanal, bilo razlikom u električnom potencijalu ili pH. Kanal će provoditi struju usled razlike u potencijalu. Kako svaka baza bude prolazila kroz kanal, dešavaće se promena u struji. Pošto su baze različite veličine, promena struje će biti proporcionalna (odgovarajućoj bazi), čime će davati indicaciju o kojoj je bazi reč. Detalji – Membrana mora biti veoma tanka. Kanal mora biti dimenzija preseka DNK, približno 1-2 nm. Porin? Komplement?“ [37]. Ova naizgled jednostavna ideja direktnog elektronskog „čitanja“ pojedinačnih molekula nukleinskih kiselina, a ne njihovih sintetičkih kopija ili fluorescencije kao surogat markera, razvijala se oko 25 godina. Trebalo je dostići veći broj tehnološki veoma izazovnih prekretnica. Razvoj tehnologije počeo je razvojem stohastičkih senzora koji na osnovu promene struje nastale usled prisustva ili prolaza nekog analita kroz sam senzor mogu identifikovati prirodu i koncentraciju analita [38]. Bilo je potrebno razviti i tehnike za detekcije strujnih promena reda veličine pikoampera (pA) u pojedinačnim senzorima (eng. *stochastic sensing*). Zbog biofizičke osobine provođenja jonske struje i nanometarskih dimenzija, membranske proteinske pore su bili kandidati za stohastičke biosenzore. Prvi stohastički biosenzor ili proteinska nanopora korišćena za detekciju nukleinskih kiselina bio je  $\alpha$ HL bakterije *Staphylococcus aureus* i njegove genetički dizajnirane varijante [39-41]. Tokom razvoja sekvenciranja kroz nanopore, nešto kasnije korišćen je i porin A *Mycobacterium smegmatis* (MspA) [42]. Imajući u vidu da je najuži prečnik pore 1,4 nm kod  $\alpha$ HL i 1,2 nm kod MspA moglo se očekivati da samo jednolančane nukleinske kiseline prolaze kroz poru. Ovi najuži regioni pora predstavljaju senzorni region (ili eng. *reading head*) odgovoran za diskriminaciju analita. Zatim je usledio dokaz da jednolančane DNK i RNK mogu da se kreću kroz poru  $\alpha$ HL kada se primeni razlika potencijala dovodeći do blokade struje [39]. Određivanjem najverovatnijeg vremena translokacije nukleinskih kiselina, reda veličine mikrosekunda, i rezidualne struje tokom translokacije, pokazano je da je moguće razlikovati bazni sastav homopolimernih nukleinskih kiselina, kao i bazni sastav različitih homopolimernih segmenata u jednom molekulu RNK [30,40]. Nakon ovog uspeha, trebalo je skoro još 10 godina da se pokaže da je moguće identifikovati pojedinačne nukleotide u molekulu DNK imobilizovanom na modifikovanoj nanopori  $\alpha$ HL [41], ali i 5-metilцитидин kada je upotrebljena modifikovana nanopora MspA [42]. Sledeći veliki izazov bilo je određivanje sekvence iz strujnih zapisa nastalih izuzetno brzim prolazom slobodnih nukleinskih kiselina kroz poru. Trebalo je, naime, rešiti problem smanjenja vremena njihovog kretanja za čak tri reda veličine, sa skale u mikrosekundama na skalu u milisekundama. Za „usporenje“ provlačenja DNK kroz nanopore prvo su iskorišćene egz nukleaze [43,44], ali je tek upotrebom  $\phi$ 29 polimeraze pokazano da je moguće dobiti informaciju o redosledu nukleotida u slobodnom molekulu DNK tokom njegovog prolaženja kroz proteinsku nanoporu [45,46]. Korišćenje procesivnih enzima koji manipulišu sa DNK, označenih kao motorni proteini u tehnologiji sekvenciranja kroz nanopore, ne samo da je omogućilo kontrolu kretanja slobodnih molekula DNK već i razdvajanje dvolančane DNK i održavanje jednolančanog regiona DNK u istegnutom stanju kao kada je jednolančana DNK imobilisana na poru. Zbog dužine senzornog regiona pore, trenutni signali struje ne odgovaraju zapisu jednog nukleotida već nizu od nekoliko nukleotida tako da milisekundni signali struje zavise od konteksta, odnosno tokom sekvenciranja čitaju se „reči“ a ne „slova“. Identifikacija nukleotida u strujnim signalima sa dodatnim informacijama, tzv. „pokretnim prozorima“, zahtevala je razvoj sofisticiranih algoritama kako bi se oni preveli u sekvencu nukleinske kiseline [49]. Sva ova akademska dostignuća, rezultovala su komercijalizacijom metode kada je kompanija *ONT* omogućila paralelizaciju identifikacije strujnog zapisa iz ogromanog broja

pojedinačnih pora (eng. *single-channel recording*) u cilju postizanja konkurentne propusnosti metode. Kroz program rane dostupnosti tehnologije 2014. godine (eng. *MinION Access Program*) i koncept otvorenog razvoja sa brzom razmenom podataka, poboljšani su protokoli za pripremu uzoraka i softveri za analizu podataka. Tehnologija je postala široko dostupna 2016. godine [25]. U poređenju sa ostalim tehnologijama, čini se da je *ONT* komercijalizovala tehnologiju u ranijoj fazi razvoja, što je čini težom ali i izazovnijom za implementaciju u istraživanjima.

Aparat za *ONT* sekvenciranje *MinION* je prvi prenosivi uređaj za sekvenciranje, veličine mobilnog telefona, težine 90 grama, napaja se preko USB priključka i košta >1000 dolara [25,48]. Aparat može primiti jednu *MinION* protočnu ćeliju (eng. *MinION flow cell*) koja sadrži 2048 nanopora utisnutih u električno otpornu polimernu membranu koja je uronjena u rastvor elektrolita. Po četiri pore su organizovane u 512 kanala, a svaki kanal je povezan sa posebnom elektrodom na senzornom čipu čija se aktivnost kontroliše pomoću mikroelektronskog čipa *ASIC* (eng. *application-specific integration circuit*) [48]. Zbog ove osobine, u jednom trenutku paralelno se detektuje aktivnost maksimalno 512 pora.

Priprema biblioteke za sekvenciranje podrazumeva ligiranje dvolančanih adaptera za čiji je jedan lanac privezan motorni protein, a za drugi je hibridizovan privezivač (eng. *tether*) (slika 1B). Privezivač je oligonukleotid sa holesterolom koji fragmentu DNK pomaže da stigne do pore i pridržava ga za membranu. Pri primeni konstantnog napona, kroz nanopore teče jonska struja koja omogućava da se negativno naelektrisani jednonančani molekul DNK kreće kroz nanopore od negativne (*cis*) ka pozitivnoj (*trans*) strani (slika 1B). Motorni protein provlači (usporava kretanje) nukleinsku kiselinu kroz nanoporu i ujedno topi sekundarne strukture tako da jednonančani „istegnuti“ molekul DNK prolazi kroz nanoporu. Tokom prolaza jednonančane nukleinske kiseline kroz nanoporu dolazi do trenutnih promena jonske struje koje uzrokuje nekoliko uzastopnih nukleotida prisutnih u senzornom regionu pore (slika 1B). Zapisi jonske struje, tzv. vijugave škrobotine (eng. *squiggle*), iz svake pojedinačne pore i to za svaki pojedinačni molekul DNK koji je prošao kroz datu poru, analiziraju se primenom algoritama mašinskog učenja, omogućavajući dobijanje sekvence pojedinačnih molekula nukleinskih kiselina u realnom vremenu (slika 1B). Modifikovani DNK nukleozidi uzrokuju karakteristične promene struje u poređenju sa nepromenjenim, tako da se epigenetičke oznake DNK, kao što su 5-metilcitolin i 5-hidroksimetilcitolin, mogu takođe detektovati u realnom vremenu (slika 1B) [49,50].

Korišćenjem algoritama i kontrolisanjem napona u pojedinačnim nanoporama moguće je raditi digitalno obogaćivanje, odnosno preferencijalno sekvenciranje ciljnog fragmenta u uzorku DNK, poznato pod nazivom adaptivno uzorkovanje [25,51]. Dok lanac DNK prolazi kroz nanoporu, u realnom vremenu nastaje strujni zapis koji se poredi sa očekivanim obrascem strujnog zapisa ciljne sekvence. U slučaju njihovog poklapanja sekvenciranje se nastavlja, dok se u slučaju nepoklapanja menja napon u datoj pori (kanalu), lanac DNK se izbacuje iz pore tako da ona može primiti drugi lanac DNK. Adaptivno uzorkovanje uspešno je urađeno za ciljne regione u genomu  $\lambda$  faga i čoveka [51,52]. Digitalno obogaćivanje skraćuje vreme pripreme biblioteke i samog sekvenciranja. S obzirom da je aktivni „vek“ proteinskih nanopora oko 72 sata, skraćanjem trajanja jedne analize povećava se ukupan broj analiza koji se može uraditi na jednoj protočnoj ćeliji.

### Dužina očitavanja, tačnost i prinos sekvenciranja DNK kroz proteinske nanopore

Superiornost sekvenciranja kroz nanopore je dužina očitavanja jer se metoda oslanja na fizičku translokaciju nukleinske kiseline i u teoriji bi mogla da bude neograničena. Ipak, prosečna dužina očitavanja iznosi 1-50 kb, N50 (dužina očitavanja na 50% svih dobijenih očitavanja sortiranih prema dužini) je 1-100 kb, maksimalne dužine su >1 Mb dok rekordna iznosi 4,2 Mb [53]. U praksi je limitirajući faktor za dužinu očitavanja

vanja integritet molekula DNK koji zavisi od očuvanosti biološkog uzorka i metoda za izolovanje DNK. Za izolovanje *HMW* DNK i obogaćivanje dugih fragmenata koriste se iste metode kao za *SMRT* sekvenciranje, dok se za ultra-duga očitavanja (>100 kb) preporučuje fenol-hloroformska ekstrakcija [9]. Eliminisanje kratkih fragmenata je preporučljivo jer zastupljeniji kraći fragmenti efikasnije ligiraju sa adapterima i prolaze kroz pore. Sa daljim poboljšanjem sadašnjeg pristupa u sekvenciranju kroz proteinske nanopore, limitirajući faktor bi mogla da bude i procesivnost motornog proteina. Iako je *ONT* metoda prepoznata kao tehnologija koja sekvencira duge i ultra-duge fragmente, od 2022. godine postala je jedina dostupna tehnologija koja sekvencira fragmente DNK u opsegu od pet redova veličina – od 20 bp do nekoliko Mb, na istim aparatima i sa istim načinom pripreme uzoraka [54].

Kroz kontinuirano poboljšanje senzitivnosti proteinskih nanopora, hemije za sekvenciranje i algoritama za pozivanje baza (eng. *basecalling*) iz strujnih zapisa, *ONT* je postala tehnologija koja po tačnosti parira drugim tehnologijama. Procenat ispravno očitanih nukleotida po jednom očitavanju (eng. *raw read accuracy*) iznosio je 61,8% za R6 nanopore (2015. godine) [55], zatim 98,3% za R9.4.1 nanopore i hemiju 110 (2019. godine) i 99,5% za R10.4.1 nanopore i hemiju V14 (2022. godine) [56]. Poslednja navedena verzija pora i hemije sa verovatnoćom >20% omogućava sekvenciranje oba lanca jednog molekula DNK (jednog po jednog) kroz istu poru, tako da sa razvojem algoritama za dupleks očitavanja tačnost sekvenciranja jednog molekula (eng. *single molecule accuracy*) iznosi >99,9% [56]. Sa povećanjem tačnosti pojedinačnog očitavanja povećava se tačnost konsenzusnih sekvenci (izvedenih iz preklapajućih pojedinačnih očitavanja) koja eliminiše nasumične greške. Konsenzusna sekvenca izvedena kombinovanjem pojedinačnih očitavanja pri targetnom sekvenciranju (eng. *single molecule consensus accuracy*) za R9.4.1 i R10.3 nanopore iznosi 99,995% pri pokrivenosti rRNK amplikona od 25 i 15 puta, redom [56], dostižući tačnost *HiFi* očitavanja, iako se konsenzusne sekvence generišu na različite načine. Pri asembliranju genoma tačnost konsenzusne sekvence (eng. *consensus accuracy*) izvedene na osnovu delimično preklapljenih očitavanja dobijenih kroz 10.4.1 nanopore iznosi 99,999% za bakterijski genom pri pokrivenosti 10-20 puta i 99,994% za genom čoveka pri pokrivenosti 40 puta [56].

Najznačajniji napredak u tačnosti tehnologije postignut je uvođenjem R9 nanopora 2016. godine [57] koje predstavljaju membranski protein CsgG (eng. *Curli production assembly/transport component*) bakterije *E. coli* genetički modifikovan na takav način da je prečnik senzornog regiona smanjen sa 1,2 na 0,9 nm [58-60]. Dužina senzornog regiona je 2,0 nm i u jednom trenutku ga istovremeno okupira pet nukleotida. R10.4.1 je prva nanopora sa dva senzorna regiona (eng. *dual-constriction nanopore*). Jedan senzorni region je u proteinu CsgG, dok se drugi nalazi u 35 aminokiselina dugom N-terminalnom delu CsgF proteina [59]. CsgF protein je partner proteina CsgG, a njegov N-terminalni deo se „umeće“ u deo CsgG pore orijentisane ka *trans* strani membrane u protočnoj ćeliji. Dodavanje drugog senzornog regiona omogućava visoko tačno sekvenciranje homopolimernih regiona dužine do 10 nukleotida [59], što je poznata greška obe tehnologije sekvenciranja dugih fragmenta [9,25], a trenutno osobina po kojoj *ONT* očitavanja nadmašuju *HiFi* očitavanja.

*ONT* je tehnologija koju odlikuje široka skalabilnost. Prosečan prinos sekvenciranja po *MinION* ćeliji je 10-15 Gb, a maksimalna 50 Gb za 72 sata pri brzini sekvenciranja od 420 nt/sec [48]. Razvijen je adapter za *MinION* aparat koji prima *Flongle* ćelije sa svega 128 pora i maksimalnim prinosom sekvenciranja od 2,8 Gb za 16 sati [48]. Aparati veće propusnosti su *GirdION* i *PromethION* [48]. *GirdION* prima pet *MinION* ili *Flongle* ćelija koje se mogu nezavisno koristiti, tako da je maksimalni prinos sekvenciranja 250 Gb. *PromethION* je namenjen za projekte na populacionoj skali sa dostupnošću verzija koje primaju 2, 24 ili 48 *PromethION* ćelija sa ~6000 nanopora organizovanih u 2675 kanala. Poseban prinos sekvenciranja *PromethION* ćelija je 208 Gb, što odgovara količini po-



dataka dobijenih sekvenciranjem dva genoma čoveka pokrivenosti 30 puta [53], a na godišnjem nivou sa maksimalnim iskorišćenim resursima može sekvencirati ~15000 genoma. Sa maksimalnim prinosom sekvenciranja ćelija od 290 Gb i uz paralelno korišćenje 48 ćelija *PromethION* može se proizvesti ~14 Tb podataka za 72 sata.

### Sekvenciranje native RNK kroz proteinske nanopore

Primenom *ONT* tehnologije mogu se direktno sekvencirati nativni molekuli RNK sa poli(A) repom, uključujući i epitranskriptomске oznake [35,60,61]. Za pripremu biblioteke koriste se specifičan adapter sa jednonančananim poli(T) nizom koji hibidizuje sa poli(A) repom nativnih RNK i dalje omogućava ligiranje adaptera za sekvenciranje sa motornim proteinom, nakon čega se biblioteka naliva na protočnu ćeliju. U cilju dobijanja stabilnije biblioteke i povećanja prinosa sekvenciranja može se uraditi reverzna transkripcija nakon vezivanja adaptera sa poli(T) nizom, a nastali RNK-cDNK hibrid se ligira za adapter za sekvenciranje. Motorni protein je tako orijentisan, da i u ovom slučaju kroz nanoporu prolazi nativna RNK. Dužina sekvenciranih molekula RNK odgovara dužini nativnih RNK. Jedna *MinION* protočna ćelija sa R9 porama daje 1000000 očitavanja, prinos sekvenciranja je 1-3 Gb, brzina ~70 nt/s i tačnost 83–86% [48]. Očekuje se da se brzina sekvenciranja RNK poveća na 120nt/s kroz R10.4. pore.

### Genomika – ulazak u novu brzinu

Genomi viših eukariota, čiji je prototip genom čoveka, sadrže duge nizove ponovljenih sekvenci i segmentalne duplikacije (nizove >1 kb koji su prisutni na više mesta u genomu i dele >90% identičnosti u sekvenci) koje su slabo izučene zbog ograničenja u dužini očitavanja Sangerovog i *Illumina* sekvenciranja. Jedan od glavnih motiva razvoja metoda sekvenciranja dugih fragmenata upravo je bilo sekvenciranje složenih genoma viših eukariota. Teži se uvidu u strukturu genoma i dubljem razumevanju funkcije, evolucije i varijabilnosti genoma. Od posebnog interesa su genetičke varijante za koje su tehnologije kratkih očitavanja „slepe“. Takve su strukturne varijante (nizovi nukleotida >50 bp koji uključuju insercije, delecije, inverzije ili translokacije DNK segmenata, eng. *structural variants*) i varijante u broju kopija (nizovi nukleotida koji se razlikuju u broju kopija, eng. *copy number variants*). Već sada se može reći da su metode sekvenciranja dugih fragmenata unele revoluciju u genomiku eukariota. Od 2022. godine dostupan je prvi kompletan referentni genom čoveka T2T-CHM13 [22], dok je u maju 2023. godine objavljen prvi draft ljudskog pangenoma [62]. Od ukupno 1065 deponovanih genoma eukariota u *NCBI* (eng. *National Center for Biotechnology Information*) bazi, ~1000 je sekvencirano nakon razvoja sekvenciranja dugih fragmenata, a broj sekvenciranih genoma u prvoj polovini 2023. godine je skoro dostigao broj sekvenciranih u prethodnoj godini [63].

„Nepročitanih“ 8% genoma čoveka nakon završetka Projekta „Genom čoveka“ sastojao se iz ponovljenih sekvenci u centromerama (2%), sekundarnim suženjima u hromozomima 1q, 9q, 16q (1%), akrocentričnim ručicama hromozoma 13p, 14p, 15p, 21p, 22p (2%), distalnom regionu hromozoma Yq (1%) i euhromatinskom regionu (1%) [6]. Ovi regioni genoma ostali su prisutni u poslednjoj verziji donedavno jedine dostupne referentne sekvence genoma GRCh38 (eng. *Genome Reference Consortium build 38*) sastavljene iz 998 kontiga (kontinuiranih sekvenci dobijenih slaganjem preklapajućih očitavanja, eng. *contig*) [64]. Konzorcijum *T2T* radio je na asembliranju kompletnog genoma čoveka u kome jedna kontiga odgovara jednom celom hromozomu (eng. *telomere-to-telomere chromosome assemblies*), a ključnu ulogu imalo je *ONT* sekvenciranje ultra-dugih fragmenata sa visokom pokrivenošću genoma [22]. Referentni T2T-CHR13 genom dobijen je iz trofoblastnih ćelija sa kompletnom hidatidiformnom molom (eng. *complete hydatidiform mole*), poremećajem usled koga su izgubile genom majke i duplicirale genom oca. Suštinski, priroda genoma 46, XX CHR13 je haploidna, a uz stabilan kariotip bio je logičan izbor *T2T* konzorcijuma. T2T-CHR13 referentni

genom čoveka je dužine 3,055 Gb sa skoro 200 Mb dodate sekvence koja potpuno pokriva 8% nedostajuće sekvence (sa izuzetkom nekih nizova ribozomske DNK koje treba razrešiti). Dodata sekvenca obuhvata centromerne  $\alpha$ -satellite, pericentromerne *HSat1-3* satellite, koji zajedno čine 5,7% genoma, oko 400 gena za ribozomske RNK i druge sekvence. Sadrži 1956 predikcija za gene, od kojih su 99 protein-kodirajući, i 3,7 miliona novih tačkastih varijanti (eng. *single-nucleotide variants*). Nedavnim objavljivanjem T2T sekvence hromozoma Y, dobijena je potpuna i sveobuhvatna referentna sekvenca za sva 24 hromozoma čoveka [65]. Y hromozom je dobio >30 Mb nedostajuće sekvence u regionima sastavljenim iz dugih palindroma, tandemski ponovljenih sekvenci i segmentalnih duplikacija, kao i 41 protein-kodirajući gen. T2T-CHR13 referentni genom dopunjen T2T sekvencom hromozoma Y prvi put omogućava izučavanje funkcije, varijabilnosti i evolucije ponovljenih centromernih regiona genoma na nivou pojedinačnih nukleotida.

Iako dostignuća od ogromnog značaja, GRCh38 i T2T-CHR13 referentni genomi ne daju verodostojnu informaciju o genetičkoj varijabilnosti ljudskih populacija, posebno strukturnim varijantama koje imaju visoku stopu mutacije [66] i važne su sa biomedicinskog i evolucionog značaja. Npr., *de novo* asembliranje genoma Tibetanaca pokazalo je da strukturne varijante specifične za ovu populaciju imaju važnu ulogu u njenom prilagođavanju na veliku nadmorsku visinu [67], dok 22q11.2 delecioni sindrom sa učestalošću ~1 u 1000 fetusa [68] i mutacija vezana za spinalnu mišićnu atrofiju sa učestalošću nosilaca 1 u 40 [69] nastaju usled nehomologne *de novo* mejotičke rekombinacije u regionima segmentalnih duplikacija. Zato međunarodni Konzorcijum za referentni ljudski pangenom (eng. *Human Pangenome Reference Consortium*) ima za cilj da sekvencira genome 350 osoba različitog porekla do sredine 2024. godine korišćenjem sekvenciranja dugih fragmenata i konstruiše referentni ljudski pangenom koji će sadržati veliki broj varijantnih sekvenci i bolje reprezentovati populacionu varijabilnost. Na osnovu *de novo* asembliranih genoma 47 osoba sa razdvojenim kopijama majčinih i očevih hromozoma (eng. *phased de novo genome assembly*) dobijena je prva draft sekvenca ljudskog pangenoma [62]. Iako je njegova tačnost od 99% za barem jedan red veličine manja od tačnosti referentnih genoma GRCh38 i T2T-CHR13, broj identifikovanih strukturnih varijanti po uzorku iznosi 25000 u odnosu na 7500 identifikovanih *Illumina* tehnologijom [66]. Očekuje se da će referentni ljudski pangenom omogućiti uključivanje desetina hiljada dodatnih alela strukturnih varijanti u studije asocijacije na nivou genoma, da će uz pristupačnije sekvenciranje dugih fragmenata povećati dijagnostički prinos, poboljšati predviđanje i lečenje bolesti, a preciznu medicinu učiniti efikasnom za sve populacije.

Izučavanje varijanti u broju kopija, čak i na nivou samo jednog gena imalo je velikih metodoloških ograničenja koja mogu biti prevaziđena primenom sekvenciranja dugih fragmenata. Kao primer se mogu navesti bolesti uzrokovane ekspanzijama tandemskih ponovljenih motiva, koje su uzrok >50 neuroloških bolesti [70]. Uzročni geni za ove bolesti otkriveni su uglavnom ili devedesetih godina prošlog veka korišćenjem mapa vezanosti genetičkih markera i *Southern blot* metode ili tek poslednjih par godina primenom sekvenciranja dugih fragmenata [70]. Sekvenciranje dugih fragmenata je od pomoći i za bolje razumevanje fenotipske varijabilnosti ovih bolesti. Na primer, miotonična distrofija tipa 1 je jedna od fenotipski najvarijabilnijih monogenetskih bolesti. Izučavanje individualne varijabilnosti bolesnika zasniva se na primeni *small-pool* PCR-a kojim se detektuje broj ponovljenih motiva, glavna ali ne i jedina genetička varijabla koja doprinosi razvoju fenotipa [71-73]. Obogaćivanjem ciljnog lokusa pomoću Cas9 usmerene ligacije adaptera i sekvenciranjem kroz nanopore [74] moguće je u jednom eksperimentu meriti i druge (epi)genetičke varijable koje oblikuju fenotip miotonične distrofije tipa 1: stepen somatske nestabilnosti ekspanzije, strukturne varijacije u ekspanzijama i nivo metilacije DNK [71-73].

Sekvenciranje dugih fragmenata i kompletna metodologija koja se koristi za poboljšanje sekvence genoma čoveka primenjuje se za sekvenciranje genoma životinja i biljaka. U toku je međunarodni Projekat

„Genomi kičmenjaka“ (eng. *Vertebrate Genomes Project*) čije je cilj asebliranje visoko kvalitetnih, kompletnih referentnih genoma za ~70000 današnjih vrsta kičmenjaka [75], kao i globalni Projekat „Org.one“ kompanije ONT čiji je cilj sekvenciranje genoma kritično ugroženih vrsta u cilju očuvanja biodiverziteta [76]. Sekvence pangenaoma paradajza i krompira, objavljene 2022. godine, ukazuju da strukturne varijante povećavaju moć identifikacije genetičkih faktora koji se nalaze u osnovi osobina važnih za poljoprivredu [77,78].

## Transkriptomika i epitranskriptomika – na horizontu

Karakterizacije transkriptoma i epitranskriptoma su od suštinskog značaja za razumevanje korišćenja genetičke informacije tokom razvića i u odgovoru ćelije na signale u fiziološkim uslovima i patološkim stanjima. RNK sekvenciranje zasnovano na reverznoj transkripciji, amplifikaciji PCR-om i *Illumina* sekvenciranju fragmenata od 150-200 bp, omogućilo je katalogizaciju transkriptoma ogromnog broja ćelija praćenu identifikacijom novih gena i uvidom u diferencijalnu ekspresiju genoma, alternativnu obradu RNK i opštu zastupljenost određenih epitranskriptomskih oznaka [15,18,19]. Stečena nova znanja iz biologije RNK eukariotske ćelije traže integraciju kako bi se dobio kompletniji uvid u složenost i plastičnost (epi)transkriptoma. Sekvenciranje dugih fragmenata, posebno direktno sekvenciranje RNK, upravo omogućava izučavanje međusobne zavisnosti i dinamičnosti različitih varijabli molekula RNK, uključujući i modifikacije nukleozida od kojih su mnoge slabo izučene.

SMRT i ONT sekvenciranje cDNK omogućavaju sekvenciranje kompletnih molekula RNK [79,80]. Senzitivnost i specifičnost obe metode zavisi od integriteta molekula RNK [16]. U poređenju sa *Illumina* metodom čija je propusnost  $10^9$ - $10^{10}$  očitavanja po eksperimentu, tehnologije dugih očitavanja su na početku imale za tri reda veličine manju propusnost ( $10^6$ - $10^7$ ) koja je bila dovoljna da se identifikuju ali ne i da se verodostojno kvantifikuju izoforme transkripata [16]. Početne studije su stoga donele pomak u identifikaciji alternativnih izoformi transkripata na nivou tkiva, uključujući rekorde u broju alternativnih izoformi (*Dsam* kod drozofile, imunoglobulini, neureksin) i ukazale da su alternativne izoforme značajan izvor varijabilnosti ne samo između različitih tipova ćelija već i između ćelija istog tipa [81-84]. Primena sekvenciranja dugih fragmenata doprinela je i identifikaciji gena za duge nekodirajuće RNK, koji se anotiraju na osnovu identifikovanih transkripata, i uslovlila reanotaciju intergenskih dugih nekodirajućih RNK čoveka i miša u bazi GENCODE [85].

Direktno sekvenciranje nativne RNK kroz proteinske nanopore olakšava određivanje orijentacije transkripta u genomu (eng. *strand specific RNA sequencing*), omogućava detekciju modifikacija nukleozida i „čitanje“ varijabli jednog molekula RNK iz istog seta podataka [60,61]. Time se prvi put pruža mogućnost otkrivanja kombinacija varijabli kao što su mesto početka transkripcije, kombinacija egzona (i introna), dužina poli(A) repa, epitranskriptomске oznake i alel-specifična ekspresija, koje mogu biti jedinstvene za dati transkript. Na primer, studija humanog transkriptoma pokazala je razliku u distribuciji dužine poli(A) repa između gena jedarnog i mitohondrijskih genoma, gena jedarnog genoma i različitih izoformi transkripata jednog gena, zatim različitu distribuciju N6-metiladenozina između izoformi transkripata jednog gena i skoro potpunu alel-specifičnu ekspresiju gena sa majčinog X hromozoma [61]. Dalji izazovi u „čitanju“ RNK korišćenjem tehnologija dugih očitavanja su priprema RNK ili cDNK biblioteka svih vrsta RNK pune dužine, kao i razvoj bioinformatičkih alatki za tačnije mapiranje 5' i 3' netraslatirajućih regiona.

Uspeh primene antisens oligonukleotida u terapiji smrtonosne bolesti kao što je spinalna mišićna atrofija [86] i RNK vakcina na COVID-19 bolest doprineli su propulzivnom razvoju RNK terapeutika. RNK terapeutici obavezno sadrže modifikovane nukleozide, posebno N-metilpseudouridin. Primenom direktnog RNK sekvenciranja pokazano je da je efikasnost ugradnje N-metilpseudouridina zavisna od konteksta sekvence tokom *in vitro* transkripcije [87]. Ovo nameće potrebu ne samo za rigoroznom kontrolom čistoće i kvantiteta

RNK terapeutika već i kontrolom ugradnje modifikovanih nukleozida, zbog čega direktno sekvenciranje RNK ima potencijal da postane ključna metoda za kontrolu kvaliteta RNK terapeutika [35].

### **Sekvenciranje na terenu**

Minijatura veličina i prenosivost *MinION* aparata koji se napaja preko USB kabla, razvoj prenosivih aparata za izolovanje DNK i pripremu biblioteke (*VolTRAX* kompanije *ONT*, aparati kompanije *BentoLab*), kompleti za pripremu biblioteke za svega 10 minuta, pozivanje baza u realnom vremenu i vršenje drugih bioinformatičkih analiza bez internet konekcije omogućavaju sekvenciranje na terenu (eng. *in field, point of care*). Ova aplikacija sekvenciranja kroz nanopore je od posebnog interesa kada je genomsku informaciju potrebno dobiti u veoma kratkom vremenskom periodu, kada ne postoje adekvatni genomske resursi i kada je teško sačuvati uzorke ili kultivisati mikroorganizme [88]. Tokom epidemije uzrokovane Ebola virusom 2015. godine u Gvineji prvi put je pokazano da je sekvenciranjem kroz nanopore moguće uspostaviti genomske praćenje epidemije u državi sa ograničenim resursima [89]. Rezultati su dobijani za manje od 24 sata, a samo sekvenciranje trajalo je 15 do 30 minuta. Metoda je u kombinaciji sa *LAMP* izotermalnom amplifikacijom nukleinskih kiselina (eng. *loop-mediated isothermal amplification*) primenjena tokom pandemije uzrokovane SARS-CoV2 virusom [90]. Među brojnim primerima primene na terenu vredno pomena je sekvenciranje urađeno u svemirskom brodu, što otvara potpuno nove mogućnosti astrobioloških istraživanja [91]. Zbog skraćanja vremena analize adaptivno uzorkovanje savršeno komplementira sekvenciranje na terenu. Demonstrirana je klinička primena u dijagnostici retkih bolesti, uključujući i nerešene slučajeve primenom standardnih genomske metoda [92], kao i obogaćivanje malo zastupljenih vrsta u metagenomskim zajednicama [93]. Ipak, ono je zasada kompjuterski veoma zahtevno, čak i kada se radi na osnovu pozivanja baza [94], a ne strujnih zapisa [51,52].

### **Zaključak**

Od komercijalizacije tehnologija dugih očitavanja težnja je bila poboljšanje tačnosti i propusnosti sekvenciranja, kao i razvoj adekvatnih bioinformatičkih algoritama. Dostizanjem tačnosti >99,9% i proizvodnjom aparata visoke propusnosti, *SMRT* i *ONT* tehnologije su sazrele. Dosadašnja primena u punom svetlu pokazuje njihov transformativan potencijal u sekvenciranju genoma i primeni u biomedicinskim istraživanjima i istraživanjima biodiverziteta. Studije dokaza koncepta o njihovoj primeni u izučavanju transkriptoma i epigenoma ukazuju da nas u periodu koji sledi čeka dublje razumevanje složenosti, dinamičnosti i međusobnog odnosa hromatina, transkripata i epigenetičkih oznaka RNK, sa mogućnošću dobijanja podataka o kombinacijama varijabli jedinstvenih za pojedinačne molekule RNK, zatim o prostornoj distribuciji pojedinačnih RNK u jednoj ćeliji i dinamičnosti u odgovoru na signale koje primaju. Za očekivati je da pored unapređenja tehnologija i bioinformatičkih analiza, jednako važna težnja postane smanjenje troškova. Time bi se poboljšala njihova dostupnost i ubrzalo dobijanje odgovora na nova pitanja koja se nameću kako bi se razumela složenost bioloških sistema.

Elektronsko sekvenciranje nukleinskih kiselina ima veliki potencijal za dalji razvoj. Kao alternativa proteinskim nanoporama, razvijaju se i tehnologije zasnovane na čvrstim nanoporama (eng. *solid-state nanopores*) koje imaju mogućnost optimizacije prečnika pora od nekoliko nm do nekoliko mm i već daju rezultate u polju identifikacije nukleinskih kiselina, proteina, virusa [95-97]. U odnosu na proteinske nanopore, čvrste nanopore su robusnije, jeftinije i imaju veći potencijal za integraciju ogromnog broja pora u elektronskim mikročipovima. Glavni tehnološki izazovi za detekciju pojedinačnih nukleotida pomoću čvrstih nanopora, koji su pre dvadesetak godina stajali i pred proteinskim nanoporama, su kontrola velike brzine kretanja nu-

kleinskih kiselina kroz samu poru, potreba za ultra-malim porama i ultra-tankim membranama. Pomaci se postižu sa grafenskim nanoporama koje se smatraju perfektnim materijalom za DNK sekvenciranje jer imaju debljinu od 0,35 nm koja je skoro uporediva sa rastojanjem između nukleotida u DNK [98]. Dalji progres u elektronskom sekvenciranju nukleinskih kiselina sa svojom prenosivišću i mogućnošću sekvenciranja u rasponu od pet redova veličina ima potencijal za svakodnevna, brza i rutinska sekvenciranja (epi)genoma, (epi)transkriptoma i veštačkih nukleinskih kiselina kako u laboratorijama tako i na terenu.

## Zahvalnica

Istraživanje sprovedeno uz podršku Fonda za nauku Republike Srbije, #7754217, Understanding repeat expansion dynamics and phenotype variability in myotonic dystrophy type 1 through human studies, nanopore sequencing and cell models – READ-DM1

## Literatura

1. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(2):560-4.
2. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.
3. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 1977;265(5596):687-95.
4. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290(5806):457-65.
5. Sanger F, Coulson AR, Hong GF, Hill DF, Petersen GB. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J Mol Biol*. 1982;162(4):729-73.
6. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931-45.
7. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010;11(1):31-46.
8. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016;17(6):333-51.
9. Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet*. 2020;21(10):597-614.
10. Adessi C, Matton G, Ayala G, Turcatti G, Mermod JJ, Mayer P, et al. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(20):E87.
11. Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(3):e22.
12. Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008;456(7218):53-9.
13. Fox EJ, Reid-Bayliss KS, Emond MJ, Loeb LA. Accuracy of Next Generation Sequencing Platforms. *Next Gener Seq Appl*. 2014;1:1000106.
14. 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
15. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature*. 2012;489(7414):101-8.
16. Stark R, Grzelak M, Hadfield J. RNA sequencing: the teenage years. *Nat Rev Genet*. 2019;20(11):631-656.
17. Park PJ. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet*. 2009;10(10):669-80.
18. Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, et al. Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*. 2012;485(7397):201-6.
19. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57-74.



20. Prüfer K, Racimo F, Patterson N, Jay F, Sankararaman S, Sawyer S, et al. The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature*. 2014;505(7481):43-9.
21. Boycott KM, Vanstone MR, Bulman DE, MacKenzie AE. Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. *Nat Rev Genet*. 2013;14(10):681-91.
22. Brown NA, Elenitoba-Johnson KSJ. Enabling Precision Oncology Through Precision Diagnostics. *Annu Rev Pathol*. 2020;15:97-121.
23. Method of the year. *Nat Methods*. 2008;5(1):1.
24. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*. 2009;323(5910):133-8.
25. Jain M, Olsen HE, Paten B, Akeson M. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol*. 2016;17(1):239.
26. Wenger AM, Peluso P, Rowell WJ, Chang PC, Hall RJ, Concepcion GT, et al. Accurate circular consensus long-read sequencing improves variant detection and assembly of a human genome. *Nat Biotechnol*. 2019;37(10):1155-1162.
27. Oxford Nanopore Tech Update: new Duplex method for Q30 nanopore single molecule reads, PromethION 2, and more. [Accessed date 31 July 2023]. <https://nanoporetech.com/about-us/news/oxford-nanopore-tech-update-new-duplex-method-q30-nanopore-single-molecule-reads-0>
28. Nurk S, Koren S, Rhie A, Rautiainen M, Bizikadze AV, Mikheenko A, et al. The complete sequence of a human genome. *Science*. 2022;376(6588):44-53.
29. Method of the Year 2022: long-read sequencing. *Nat Methods*. 2023;20(1):1.
30. Kumar S, Sood A, Wegener J, Finn PJ, Nampalli S, Nelson JR, et al. Terminal phosphate labeled nucleotides: synthesis, applications, and linker effect on incorporation by DNA polymerases. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2005;24(5-7):401-8.
31. Sood A, Kumar S, Nampalli S, Nelson JR, Macklin J, Fuller CW. Terminal phosphate-labeled nucleotides with improved substrate properties for homogeneous nucleic acid assays. *J Am Chem Soc*. 2005;127(8):2394-5.
32. Levene MJ, Korfach J, Turner SW, Foquet M, Craighead HG, Webb WW. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science*. 2003;299(5607):682-6.
33. Korfach J, Marks PJ, Cicero RL, Gray JJ, Murphy DL, Roitman DB, et al. Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nanostructures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(4):1176-81.
34. Lundquist PM, Zhong CF, Zhao P, Tomaney AB, Peluso PS, Dixon J, et al. Parallel confocal detection of single molecules in real time. *Opt Lett*. 2008;33(9):1026-8.
35. Lucas MC, Novoa EM. Long-read sequencing in the era of epigenomics and epitranscriptomics. *Nat Methods*. 2023;20(1):25-29.
36. PacBio Announces Revio, a Revolutionary New Long Read Sequencing System Designed to Provide 15 Times More HiFi Data and Human Genomes at Scale for Under \$1,000. 25 October. 2022. [Accessed 31 July 2023]. Available from: [https://www.pacb.com/press\\_releases/pacbio-announces-revio-a-revolutionary-new-long-read-sequencing-system-designed-to-provide-15-times-more-hifi-data-and-human-genomes-at-scale-for-under-1000/](https://www.pacb.com/press_releases/pacbio-announces-revio-a-revolutionary-new-long-read-sequencing-system-designed-to-provide-15-times-more-hifi-data-and-human-genomes-at-scale-for-under-1000/)
37. Deamer D, Akeson M, Branton D. Three decades of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol*. 2016;34(5):518-24.
38. Bayley H, Cremer PS. Stochastic sensors inspired by biology. *Nature*. 2001;413(6852):226-30.
39. Kasianowicz JJ, Brandin E, Branton D, Deamer DW. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(24):13770-3.
40. Akeson M, Branton D, Kasianowicz JJ, Brandin E, Deamer DW. Microsecond time-scale discrimination among polycytidylic acid, polyadenylic acid, and polyuridylic acid as homopolymers or as segments within single RNA molecules. *Biophys J*. 1999;77(6):3227-33.
41. Stoddart D, Heron AJ, Mikhailova E, Maglia G, Bayley H. Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(19):7702-7.
42. Manrao EA, Derrington IM, Pavlenok M, Niederweis M, Gundlach JH. Nucleotide discrimination with DNA immobilized in the MspA nanopore. *PLoS One*. 2011;6(10):e25723.
43. Hornblower B, Coombs A, Whitaker RD, Kolomeisky A, Picone SJ, Meller A, Akeson M. Single-molecule analysis of DNA-protein complexes using nanopores. *Nat Methods*. 2007;4(4):315-7.
44. Cockroft SL, Chu J, Amarin M, Ghadiri MR. A single-molecule nanopore device detects DNA polymerase activity with single-nucleotide resolution. *J Am Chem Soc*. 2008;130(3):818-20.
45. Cherf GM, Lieberman KR, Rashid H, Lam CE, Karplus K, Akeson M. Automated forward and reverse ratcheting of DNA in a nanopore at 5-Å precision. *Nat Biotechnol*. 2012;30(4):344-8.

46. Manrao EA, Derrington IM, Laszlo AH, Langford KW, Hopper MK, Gillgren N, et al. Reading DNA at single-nucleotide resolution with a mutant MspA nanopore and phi29 DNA polymerase. *Nat Biotechnol.* 2012;30(4):349-53.
47. Stoddart D, Maglia G, Mikhailova E, Heron AJ, Bayley H. Multiple base-recognition sites in a biological nanopore: two heads are better than one. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49(3):556-9.
48. Wang Y, Zhao Y, Bollas A, Wang Y, Au KF. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol.* 2021;39(11):1348-1365.
49. Simpson JT, Workman RE, Zuzarte PC, David M, Dursi LJ, Timp W. Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. *Nat Methods.* 2017;14(4):407-410.
50. Rand AC, Jain M, Eizenga JM, Musselman-Brown A, Olsen HE, Akeson M, et al. Mapping DNA methylation with high-throughput nanopore sequencing. *Nat Methods.* 2017;14(4):411-413.
51. Loose M, Malla S, Stout M. Real-time selective sequencing using nanopore technology. *Nat Methods.* 2016;13(9):751-4.
52. Payne A, Holmes N, Clarke T, Munro R, Debebe BJ, Loose M. Readfish enables targeted nanopore sequencing of gigabase-sized genomes. *Nat Biotechnol.* 2021;39(4):442-450.
53. At NCM, announcements include single-read accuracy of 99.1% on new chemistry and sequencing a record 10 Tb in a single PromethION run. 3 December 2020. [Accessed date 10 August 2023]. Available from: <https://nanoporetech.com/about-us/news/ncm-announcements-include-single-read-accuracy-991-new-chemistry-and-sequencing>
54. One technology, one platform for all your biology. [Accessed date 10 August 2023]. Available from: <https://nanoporetech.com/applications/techniques/short-fragment-mode>
55. Laver T, Harrison J, O'Neill PA, Moore K, Farbos A, Paszkiewicz K, et al. Assessing the performance of the Oxford Nanopore Technologies MinION. *Biomol Detect Quantif.* 2015;3:1-8.
56. Accuracy. [Accessed date 10 August 2023]. Available from: <https://nanoporetech.com/accuracy>
57. Brown CG, Clarke J. Nanopore development at Oxford Nanopore. *Nat Biotechnol.* 2016;34(8):810-1.
58. Cao B, Zhao Y, Kou Y, Ni D, Zhang XC, Huang Y. Structure of the nonameric bacterial amyloid secretion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(50):E5439-44.
59. Van der Verren SE, Van Gerven N, Jonckheere W, Hambley R, Singh P, Kilgour J, et al. A dual-constriction biological nanopore resolves homonucleotide sequences with high fidelity. *Nat Biotechnol.* 2020;38(12):1415-1420.
60. Garalde DR, Snell EA, Jachimowicz D, Sipos B, Lloyd JH, Bruce M, et al. Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nat Methods.* 2018;15(3):201-206.
61. Workman RE, Tang AD, Tang PS, Jain M, Tyson JR, Razaghi R, et al. Nanopore native RNA sequencing of a human poly(A) transcriptome. *Nat Methods.* 2019;16(12):1297-1305.
62. Liao WW, Asri M, Ebler J, Doerr D, Haukness M, Hickey G, et al. A draft human pangenome reference. *Nature.* 2023;617(7960):312-324.
63. Eukaryotic Genome Annotation at NCBI. [Accessed 15 August 2023]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_euk/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/)
64. Schneider VA, Graves-Lindsay T, Howe K, Bouk N, Chen HC, Kitts PA, et al. Evaluation of GRCh38 and de novo haploid genome assemblies demonstrates the enduring quality of the reference assembly. *Genome Res.*;27(5):849-864.
65. Rhie A, Nurk S, Cechova M, Hoyt SJ, Taylor DJ, Altemose N, et al. The complete sequence of a human Y chromosome. *Nature.* doi: 10.1038/s41586-023-06457-y.
66. Collins RL, Brand H, Karczewski KJ, Zhao X, Alföldi J, Francioli LC, et al. A structural variation reference for medical and population genetics. *Nature.* 2020;581(7809):444-451.
67. Ouzhuluobu; He Y, Lou H, Cui C, Deng L, Gao Y, et al. De novo assembly of a Tibetan genome and identification of novel structural variants associated with high-altitude adaptation. *Natl Sci Rev.* 2020;7(2):391-402.
68. McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman JA, et al. 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Primers.* 2015;1:15071
69. D'Amico A, Mercuri E, Tiziano FD, Bertini E. Spinal muscular atrophy. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:71.
70. Chintalaphani SR, Pineda SS, Deveson IW, Kumar KR. An update on the neurological short tandem repeat expansion disorders and the emergence of long-read sequencing diagnostics. *Acta Neuropathol Commun.* 2021;9(1):98.
71. Savić D, Rakovic-Stojanovic V, Keckarevic D, Culjkovic B, Stojkovic O, Mladenovic J, et al. 250 CTG repeats in DMPK is a threshold for correlation of expansion size and age at onset of juvenile-adult DM1. *Hum Mutat.* 2002;19(2):131-9.

72. Pešović J, Perić S, Brkušanić M, Brajušković G, Rakočević-Stojanović V, Savić-Pavićević D. Repeat Interruptions Modify Age at Onset in Myotonic Dystrophy Type 1 by Stabilizing DMPK Expansions in Somatic Cells. *Front Genet.* 2018;9:601.
73. Pešović J, Perić S, Radenković L, Rakočević-Stojanović V, Savić-Pavićević D. Genetička i epigenetička karakterizacija varijantnih DMPK ekspanzija kao modifikatora fenotipa miotonične distrofije tipa 1. In: Pavlović S, editor. *Trendovi u molekularnoj biologiji*. Beograd (Srbija): IMGGI; 2021. P. 60-70.
74. Gilpatrick T, Lee I, Graham JE, Raimondeau E, Bowen R, Heron A, et al. Targeted nanopore sequencing with Cas9-guided adapter ligation. *Nat Biotechnol.* 2020;38(4):433-438.
75. Rhie A, McCarthy SA, Fedrigo O, Damas J, Formenti G, Koren S, et al. Towards complete and error-free genome assemblies of all vertebrate species. *Nature.* 2021;592(7856):737-746.
76. Genomes of 50 critically endangered species are sequenced in successful pilot of conservation project ORG.one. [Accessed 26 August 2023]. Available from: <https://nanoporetech.com/about-us/news/genomes-50-critically-endangered-species-are-sequenced-successful-pilot-conservation>
77. Zhou Y, Zhang Z, Bao Z, Li H, Lyu Y, Zan Y, et al. Graph pangenome captures missing heritability and empowers tomato breeding. *Nature.* 2022;606(7914):527-534.
78. Tang D, Jia Y, Zhang J, Li H, Cheng L, Wang P, et al. Genome evolution and diversity of wild and cultivated potatoes. *Nature.* 2022 Jun;606(7914):535-541.
79. Sharon D, Tilgner H, Grubert F, Snyder M. A single-molecule long-read survey of the human transcriptome. *Nat Biotechnol.* 2013;31(11):1009-14.
80. Oikonomopoulos S, Wang YC, Djambazian H, Badescu D, Ragoussis J. Benchmarking of the Oxford Nanopore MinION sequencing for quantitative and qualitative assessment of cDNA populations. *Sci Rep.* 2016;6:31602.
81. Bolisetty MT, Rajadinakaran G, Graveley BR. Determining exon connectivity in complex mRNAs by nanopore sequencing. *Genome Biol.* 2015;16:204.
82. Treutlein B, Gokce O, Quake SR, Südhof TC. Cartography of neurexin alternative splicing mapped by single-molecule long-read mRNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(13):E1291-9.
83. Byrne A, Beaudin AE, Olsen HE, Jain M, Cole C, Palmer T, et al. Nanopore long-read RNAseq reveals widespread transcriptional variation among the surface receptors of individual B cells. *Nat Commun.* 2017;8:16027.
84. Karlsson K, Linnarsson S. Single-cell mRNA isoform diversity in the mouse brain. *BMC Genomics.* 2017;18(1):126.
85. Lagarde J, Usczyńska-Ratajczak B, Carbonell S, Pérez-Lluch S, Abad A, Davis C, et al. High-throughput annotation of full-length long noncoding RNAs with capture long-read sequencing. *Nat Genet.* 2017;49(12):1731-1740.
86. Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF, et al. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues neurodegeneration in a type III SMA mouse model. *Genes Dev.* 2010;24(15):1634-44.
87. Fleming AM, Burrows CJ. Nanopore sequencing for N1-methylpseudouridine in RNA reveals sequence-dependent discrimination of the modified nucleotide triphosphate during transcription. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(4):1914-1926.
88. Runtuwene LR, Tuda JSB, Mongan AE, Suzuki Y. On-Site MinION Sequencing. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1129:143-150.
89. Quick J, Loman NJ, Duraffour S, Simpson JT, Severi E, Cowley L, et al. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature.* 2016;530(7589):228-232.
90. Peto L, Rodger G, Carter DP, Osman KL, Yavuz M, Johnson K, et al. Diagnosis of SARS-CoV-2 Infection with LamPore, a High-Throughput Platform Combining Loop-Mediated Isothermal Amplification and Nanopore Sequencing. *J Clin Microbiol.* 2021;59(6):e03271-20.
91. McIntyre ABR, Rizzardi L, Yu AM, Alexander N, Rosen GL, Botkin DJ, et al. Nanopore sequencing in microgravity. *NPJ Microgravity.* 2016;2:16035.
92. Miller DE, Sulovari A, Wang T, Loucks H, Hoekzema K, Munson KM, et al. Targeted long-read sequencing identifies missing disease-causing variation. *Am J Hum Genet.* 2021;108(8):1436-1449.
93. Martin S, Heavens D, Lan Y, Horsfield S, Clark MD, Leggett RM. Nanopore adaptive sampling: a tool for enrichment of low abundance species in metagenomic samples. *Genome Biol.* 2022;23(1):11.
94. Edwards HS, Krishnakumar R, Sinha A, Bird SW, Patel KD, Bartsch MS. Real-Time Selective Sequencing with RUBRIC: Read Until with Basecall and Reference-Informed Criteria. *Sci Rep.* 2019;9(1):11475.
95. Bošković F, Keyser UF. Nanopore microscope identifies RNA isoforms with structural colours. *Nat Chem.* 2022;14(11):1258-1264.
96. Bošković F, Zhu J, Tivony R, Ohmann A, Chen K, Alawami MF, et al. Simultaneous identification of viruses and viral variants with programmable DNA nanobait. *Nat Nanotechnol.* 2023;18(3):290-298.



97. Patiño-Guillén G, Pešović J, Panic M, Savic-Pavicevic D, Bošković F, Keyser UF. Single-Molecule RNA Sizing Enables Quantitative Analysis of Alternative Transcription Termination. *bioRxiv* 2023.07.14.549052. doi: 10.1101/2023.07.14.549052
98. Wasfi A, Falah Awwad F, Ayesb AI. DNA sequencing via Z-shaped graphene nano ribbon field effect transistor decorated with nanoparticles using first-principle transport simulations. *New J. Phys.* 2020; 22:063004.



**BIOMEDICINA**

**BIOMEDICINE**





“Trendovi u molekularnoj biologiji 3”  
su podržani od  
**Ministarstva nauke, tehnološkog  
razvoja i inovacija Republike Srbije**

## IMPRESUM

### Trendovi u molekularnoj biologiji, 2023.

Izdavač

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
Univerzitet u Beogradu**

Urednik

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

Uređivački odbor

Dr **Ivana Strahinić**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr **Ivana Novaković**, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr **Duška Savić Pavićević**, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Ana Đorđević**, naučni savetnik,  
Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja  
„Siniša Stanković“

Recenzenti

Dr **Svetlana Radović**, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Vesna Škodrić Trifunović**, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Gordana Nikčević**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Štampa

**Curent Print**, Beograd

Periodičnost izlaženja publikacije

**Godišnje**

Tiraž

**100 primeraka**

# t tmb

Trendovi u molekularnoj biologiji  
Trends in Molecular Biology

## Autori

Aleksandra Uskoković.....	138
Ana Djordjevic .....	151
Anastasija Ninković .....	38
Biljana Božić Nedeljković .....	245
Bojan Božić.....	245
Bojana Stevanović .....	90
Danijela Paunović.....	269
Dunja Drakulić .....	184
Dušanka Savić-Pavičević.....	38
Goran Brajušković.....	8
Ivana Kolić .....	168
Jadranka Miletić Vukajlović.....	184
Jelena Arambašić Jovanović .....	138
Jelena M. Aleksić.....	18
Jovan Pešović .....	38
Jovana Komazec.....	78
Jovana Kuveljić .....	122
Lana Radenković .....	38
Ljiljana Stojković .....	168
Ljupka Gligorovska .....	151
Luka Velimirov .....	38
Maja Bubić.....	106
Maja Stojiljković.....	78
Maja Živković .....	106
Marija Đorđević .....	138
Marija Đurić .....	256
Marija Dušanović Pjević .....	205
Marija Kosić.....	218
Marko Panić.....	38
Melita Vidaković.....	138
Milena Stevanović.....	18
Milka Grk.....	232
Miloš Brkušanin.....	38
Mirjana Mihailović .....	138
Nataša Kovačević Grujičić .....	18
Nemanja Garai.....	38
Nemanja Radovanović .....	38
Nevena Grdović.....	138
Nina Japundžić-Žigon .....	90
Nina Žigon.....	218
Slobodan Davidović.....	18
Svetlana Dinić .....	138
Tamara Djurić .....	122
Tanja Lunić .....	245
Teodora Karan-Đurašević .....	58
Zorica Nešić .....	218

CIP - Каталогизacija y publikaciji  
Народна библиотека Србије, Београд

577.2

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

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