

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

70 godina od otkrića sekundarne strukture molekula DNK	8
The 70 th anniversary of the discovery of DNA secondary structure	
Goran Brajušković	
Varijabilnost mitohondrijskog genskog pula stanovnika Republike Srbije	18
Mitochondrial gene pool variability of the residents of the Republic of Serbia	
Slobodan Davidović, Jelena M. Aleksić, Milena Stevanović i Nataša Kovačević Grujičić	
Sekvenciranje dugih fragmenata – sledeći nivo genomskih istraživanja	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	
Stereotipija B-ćelijskog receptora u hroničnoj limfocitnoj leukemiji	58
B-cell receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia	
Teodora Karan-Đurašević	
Sadašnjost i budućnost primene sekvenciranja nove generacije za retke bolesti	78
Present and future of next-generation sequencing application for rare diseases	
Maja Stojiljković i Jovana Komazec	
Uloga vazopresinskog sistema paraventrikularnog jedra u razvoju hipertenzije	90
The role of paraventricular nucleus vasopressin system in development of hypertension	
Bojana Stevanović, Nina Japundžić-Žigon	
Antioksidativni i antiinflamatorni efekti suplementacije orasima (<i>Juglans regia</i> L.) na srce u metaboličkom sindromu izazvanom ishranom bogatom fruktozom	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	
PHACTR1 u kardiovaskularnim bolestima: od studija asocijacije na celokupnom genomu do funkcionalnih studija	122
PHACTR1 in cardiovascular disease: from genome-wide association studies to functional studies	
Jovana Kuveljić, Tamara Djurić	
Uloga ciljanih (epi)genetičkih modifikacija u potencijalnoj terapiji dijabetesa	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	
Uticaj delecije gena <i>Mif</i> na razvoj gojaznosti i steatoze jetre kod miševa na režimu ishrane obogaćene fruktozom	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	
Varijante i transkripcija gena koji kodiraju komponente leptinskog signalnog puta, inflamacije i antioksidativne zaštite u patogenezi multiple skleroze	168
Variants and transcription of genes of the leptin signaling pathway, inflammation and antioxidant protection in pathogenesis of multiple sclerosis	
Ivana Kolić, Ljiljana Stojković	
Parkinsonova bolest – dokle se stiglo?	184
Parkinson's disease – state of the art	
Jadranka Miletić Vukajlović, Dunja Drakulić	
Značaj farmakogenetike u terapijskom pristupu akutnog ishemijskog moždanog udara rekombinovanim tkivnim aktivatorom plazminogena	205
Importance of pharmacogenetics for ischemic stroke therapy with recombinant tissue plasminogen activator	
Marija Dušanović Pjević	
Beta-adrenergički receptori i kinaze uključene u proces njihove nishodne regulacije u eksperimentalnom modelu kardiomiopatije izazvane doksorubicinom	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	
Uticaj genetičkih faktora na efikasnost i toksičnost terapije metotreksatom kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom	232
Genetic factors impacting the efficacy and toxicity of methotrexate therapy in rheumatoid arthritis patients	
Milka Grk	
Ekstrakti briofita kao imunomodulatori	245
Bryophyte extracts as immunomodulators	
Tanja Lunić, Bojan Božić, Biljana Božić Nedeljković	
Struktura, funkcija i regulacija ekspresije gena za akvaporine pri suši kod biljaka	256
Structure, function and regulation of aquaporin gene expression during drought in plants	
Marija Đurić	
Identifikacija gena za arabinogalaktanske proteine (AGP) biljaka korišćenjem metoda mašinskog učenja	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**

Sadašnjost i budućnost primene sekvenciranja nove generacije za retke bolesti

Maja Stojiljković i Jovana Komazec

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: maja.stojiljkovic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

Svaka bolest čija je učestalost manja od 1 u 2000 ljudi definiše se kao retka bolest. Iz tog razloga, broj retkih bolesti je veliki. Do sada je opisano preko 6000 različitih retkih bolesti. Preko 80% retkih bolesti ima genetičku osnovu i to je razlog zašto su znanja iz molekularne biologije od neprocenjivog značaja za istraživanje molekularne osnove retkih bolesti, postavljanje tačne dijagnoze i razvoj inovativnih terapija. Cilj ovog rada je da objasni važnost otkrivanja molekularno-genetičke osnove retkih bolesti i da prikaže desetogodišnje iskustvo primene sekvenciranja nove generacije u Srbiji (2014.-2023.) u tu svrhu. U prethodnom periodu za istraživanje retkih bolesti korišćeni su sekvenciranje kliničkog egzoma, sekvenciranje kompletnog egzoma i sekvenciranje kompletnog genoma. Takođe, date su i perspektive za budućnost gde će genomika biti kompletirana tehnologijom sekvenciranja dugačkih fragmenata i komplementirana upotrebom transkriptomike, proteomike, metabolomike i drugih „omika“.

Ključne reči: retke bolesti, sekvenciranje nove generacije, sekvenciranje kliničkog egzoma, sekvenciranje kompletnog egzoma, sekvenciranje kompletnog genoma, genetičke varijante

Present and future of next-generation sequencing application for rare diseases

Maja Stojiljković and Jovana Komazec

Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade

Correspondence: maja.stojiljkovic@imgge.bg.ac.rs

Abstract

Any disease found in less than 1 person out of 2000 people is defined as a rare disease. For this reason, the number of rare diseases is high. Over 6,000 different rare diseases have been described so far. More than 80% of rare diseases have a genetic basis, and this is the reason why knowledge of molecular biology is invaluable for research into the molecular basis of rare diseases, establishing an accurate diagnosis and developing innovative therapeutics. The aim of this paper is to explain the importance of discovering the molecular genetic basis of rare diseases and to present the ten-year experience of applying new generation sequencing in Serbia (2014-2023) for this purpose. During this period, clinical exome sequencing, complete exome sequencing and complete genome sequencing were used for research of rare diseases. In the future, it is expected that genomics, which until now was based mainly on the technology of short-read fragments, will be broadened with the long-reads sequencing technology, and complemented by the use of transcriptomics, proteomics, metabolomics and other omics.

Keywords: rare diseases, next generation sequencing, clinical exome sequencing, whole exome sequencing, whole genome sequencing, genetic variants

Retke bolesti i važnost postavljanja dijagnoze

Svaka bolest čija je učestalost manja od 1 u 2000 ljudi definiše se kao retka bolest. Iz tog razloga, broj retkih bolesti je veliki. Do sada je opisano preko 6000 različitih retkih bolesti i taj broj se iz godine u godinu povećava [1]. Povećanje broja opisanih retkih bolesti ne znači da je došlo do nastanka novih retkih bolesti, već da su nova znanja iz medicine, kao i razvoj preciznijih dijagnostičkih metoda omogućili bolju stratifikaciju već opisanih bolesti kao i dijagnostiku onih bolesti za koje prethodno nije bilo moguće uspostaviti dijagnozu.

Velika većina tih međusobno različitih bolesti, koje se samo na osnovu svoje učestalosti svrstavaju u retke, ipak imaju nešto zajedničko. Smatra se da oko 80% retkih bolesti ima monogensku genetičku osnovu. To je upravo i razlog zašto su znanja iz molekularne genetike od neprocenjivog značaja za istraživanje molekularne osnove retkih bolesti, postavljanje tačne dijagnoze i identifikaciju novih meta koje će poslužiti kao osnov za razvoj inovativnih terapeutika.

Pojedinačne retke bolesti su retke, ali su oboleli od retkih bolesti brojni. Broj obolelih od retkih bolesti u Evropi se procenjuje na 30 miliona, a u celom svetu na 330 miliona [2]. Procenjuje se da 6-8% populacije u toku života razvije neku retku bolest. Na osnovu takvih procena, smatra se da bi u Srbiji moglo biti registrovano između 300 000 i 500 000 osoba sa nekom retkom bolešću (Slika 1).

Međutim, previše često se dešava da se do dijagnoze retke bolesti dolazi nakon dugog niza godina, mnogobrojnih poseta lekarima i brojnih dijagnostičkih pregleda. Ovaj proces koji se naziva i „dijagnostička odiseja“ zavisi od specifičnosti fenotipa i uzrasta pacijenta, kao i dostupnosti dijagnostičkih metoda i eksperata. Zato je glavni cilj Internacionalnog konzorcijuma za istraživanje retkih bolesti (eng. *International Rare Diseases Research Consortium*, IRDiRC) da se svim ljudima koji žive sa nekom retkom bolešću omogući tačna dijagnoza, nega i postojeća terapija pre nego što se navrší godinu dana od kako su prvi put posetili lekara [3]. Ujedinjene Nacije su u decembru 2021. godine usvojile rezoluciju u kojoj prepoznaju značaj problema osoba obolelih od retkih bolesti uz poruku da „niko ne sme biti zaboravljen“ [4]. U decembru 2022. godine završen je prvi nacionalni Program za retke bolesti koji je kao prioritet stavio poboljšanje dijagnostike i lečenja za sve osobe sa naslednim retkim bolestima (*Sl. glasnik RS*, broj 30/18) [5]. Prema podacima iz ovog Programa, u Srbiji svega 10.3% osoba sa retkom bolešću dobije tačnu dijagnozu u toku prve godine od pojave prvih simptoma, 19.6% u toku prve 3 godine, dok čak 70.1% osoba na dijagnozu čeka duže od 3 godine ili je nikada ne dobije. Prema tim podacima, prosečno vreme do postavljanja dijagnoze retke bolesti u Srbiji iznosi 7 godina. Ovo vreme je duže od vremena koje je za postavljanje dijagnoze retke bolesti potrebno u zemljama Evropske Unije, a koje prema podacima Eurordis-a (eng. *EURORDIS-Rare Diseases Europe*, EURORDIS) iznosi 4.1 godinu [6].

Najtačnija dijagnoza genetičkih retkih bolesti se postavlja genetičkim testiranjem. Međutim, dugi niz godina je primena genetičkog testiranja u dijagnostičke svrhe bila sputana malim kapacitetom Sangerovog DNK sekvenciranja, kao i visokim troškovima ove metode. Testiranje je u praksi rađeno za one monogenske bolesti za koje se na osnovu kliničkih manifestacija i/ili biohemijskih i drugih testova mogao odabrati ciljani genetički test, ciljana analiza jednog gena ili najčešćih genetičkih varijanti primenom Sangerovog DNK sekvenciranja i metoda baziranih na PCR-u.

Primer bolesti za koju je na osnovu biohemijskog testiranja sa velikom verovatnoćom moguće odrediti gen-uzročnik je fenilketonurija [7]. Za fenilketonuriju je u većini razvijenih zemalja, počevši od 60-tih godina prošlog veka, uspostavljen novorođenački skrining koji se bazira na biohemijskom određivanju nivoa fenilalanina u krvi novorođenčeta, a u Srbiji se ovaj skrining sprovodi od 1983. godine [8–10]. Kod 98% beba

kod kojih se na novorođenačkom biohemijskom skriningu utvrdi hiperfenilalaninemija, genetičkim testiranjem će biti pronađene patogene genetičke varijante u genu za fenilalanin hidrosilazu. Međutim, u 2% slučajeva ispitanici bi ostajali bez dijagnoze, jer sem defekta enzima fenilalanin hidrosilaze, do hiperfenilalaninemije dovode i defekti u enzimima odgovornim za biosintezu (GTP ciklohidrolaza I i 6-piruvil-tetrahidropterin sintaza) i regeneraciju (pterin-4a-karbinolamin dehidrogenaza 1 i dihidropteridin reduktaza) tetrahidrobiopterina, kofaktora fenilalanin hidrosilaze [11]. U takvim slučajevima bilo bi neophodno raditi dodatne biohemijske testove (ukoliko su oni uopšte dostupni u određenoj zemlji) ili sprovesti genetičko testiranje dodatnih gena (*GCH1*, *QDPR*, *PCBD1* i *PTS*), sve dok se ne detektuju uzročne genetičke varijante. Ovo je primer da čak i u slučajevima u kojima je proces testiranja jasan i jednoznačan, mali broj pacijenata bi ipak prolazio kroz dijagnostičku odiseju. Mnogo veći problem i duže traganje za tačnom dijagnozom prati one bolesti za koje ne postoje specifični biohemijski ili drugi testovi koji bi opredelili ciljano genetičko testiranje, zatim bolesti koje imaju heterogenu genetičku osnovu, bolesti kod kojih postoji fenotipsko preklapanje, kao i bolesti kod kojih se prvo javljaju nespecifični simptomi na osnovu kojih se ne može odabrati odgovarajući genetički test.

Sem toga, iako je za monogenske bolesti karakteristično da varijante u jednom određenom genu dovode do određene bolesti, situacija je u nekim slučajevima kompleksnija. Na primer, u slučaju propionske acidemije koja je uzrokovana deficijencijom dimernog enzima propionil-CoA karboksilaze, uzrok bolesti treba tražiti u jednom od dva gena (*PCCA* i *PCCB*) sa kojih se sintetišu 2 enzimske subjedinice [12]. Situacija u kojoj su dva ili više gena odgovorni za određeni fenotip označava se kao genetička heterogenost. Nasuprot tome, čak u preko 30% bolesti koje su registrovane na OMIM-u (eng. *Online Mendelian Inheritance in Man*, OMIM), različite genetičke varijante koje se nalaze u različitim regionima istog gena mogu biti povezane sa različitim bolestima/stanjima i to prateći različite tipove nasleđivanja [13]. Primer za to su varijante u *LMNA* genu koje su povezane sa 11 fenotipova sa preklapajućim karakteristikama (fenotipska heterogenost) [14].

Sekvenciranje nove generacije

Masovno paralelno sekvenciranje ili takozvano sekvenciranje nove generacije (eng. *Next generation sequencing*, NGS) je u potpunosti transformisalo dijagnostiku retkih bolesti. Zahvaljujući velikom kapacitetu ove metode, kao i smanjenju troškova, moguće je istovremeno sekvenciranje velikog broja gena i time skraćivanje vremena do postavljanja tačne dijagnoze. U zavisnosti od potreba, koriste se različiti genski paneli, kao i sekvenciranje kompletnog egzoma (eng. *Whole exome sequencing*, WES) ili sekvenciranje celog genoma (eng. *Whole genome sequencing*, WGS). Jedan od najčešće korišćenih, komercijalno dostupnih panela je onaj koji uključuje 4813 klinički relevantnih gena, poznat pod nazivom „klinički egzom“ (*TruSight One Gene Panel*, *Illumina*). Dok se primenom sekvenciranja kliničkog egzoma identifikuje oko 10 000 genetičkih varijanti koje su različite u odnosu na humani referentni genom, sekvenciranjem kompletnog egzoma se identifikuje oko 500 000, a sekvenciranjem kompletnog genoma preko 3,2 miliona genetičkih varijanti. Zbog kompleksnosti interpretacije velikog broja varijanti, sekvenciranje kliničkog egzoma i kompletnog egzoma su i dalje opcije koje se koriste u rutinskoj dijagnostici, dok je sekvenciranje kompletnog genoma rezervirano za slučajeve koji metodama manjeg opsega nisu bili uspešno rešeni.

S obzirom na to da je genomika veoma dinamično polje u kome se neprekidno poboljšavaju bioinformatički algoritmi, a baze podataka pune novim podacima, veoma je važno vršiti periodičnu re-analizu podataka dobijenih masivnim paralelnim sekvenciranjem, pogotovu u slučaju pojave novih specifičnih simptoma kod obolele osobe [15].

Desetogodišnje iskustvo primene sekvenciranja nove generacije u Srbiji (2014.-2023.)

U Srbiji je sekvenciranje nove generacije u svrhu istraživanja i otkrivanja molekularno-genetičke osnove kod pacijenata obolelih od retkih bolesti otpočelo 2014. godine, i to primenom panela za klinički egzom. Sekvenciranje kliničkog egzoma izvršeno je kod preko 1500 bolesnika kod kojih je postojala sumnja da bolest ima genetičku osnovu. Sekvence kodirajućih egzona i egzon-intron granica 4813 klinički relevantnih gena su dobijene korišćenjem *TruSight One* panela i upoređene sa sekvencom referentnog humanog genoma (hg19) kao što je prethodno opisano [16–19]. Ova analiza isključuje detekciju varijanti u promotorskim i intronskim regionima, detekciju velikih delecija i duplikacija tj. detekciju varijacija u broju ponovaka (eng. *Copy number variation*, CNV), kao i detekciju ekspanzije kratkih i dugačkih tandemskih ponovaka. Bioinformatički fajlovi (FASTQ, BAM i VCF) se generišu na samoj mašini (MiSeq, NextSeq 550, NextSeq 2000, Illumina). Prilikom interpretacije bioinformatičkih fajlova, koristi se softver za anotaciju i prioritizaciju detektovanih varijanti (npr. Variant Interpreter, Illumina). S obzirom na to da se traži uzrok retke bolesti, tokom analize se odbacuju genetičke varijante koje su u bazama podataka zdravih punoletnih ispitanika (GnomAD i 1000 Genomes, itd) prisutne sa učestalošću većom od 1%. Preostale retke varijante se dalje analiziraju uzimajući u obzir njihov efekat na protein, kao i odgovarajući model nasleđivanja za svaki gen. Genetičke varijante od interesa se na osnovu *in silico*, *in vitro* i *in vivo* dokaza klasifikuju prema pravilima Američkog koledža za medicinsku genetiku i genomiku i Udruženja za molekularnu patologiju (eng. *American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*, ACMG) kao patogene, verovatno patogene, varijante neodređenog značaja, verovatno benigne i benigne varijante [20]. Varijante neodređenog značaja (eng. *Variants of uncertain significance*, VUS) za koje ne postoji dovoljno dokaza da budu klasifikovane kao patogene / verovatno patogene ili benigne / verovatno benigne se dalje klasifikuju prema verovatnoći da u budućnosti budu klasifikovane kao patogene [21]. Praksa koja je trenutno ustaljena je da se patogene, verovatno patogene, i varijante neodređenog značaja koje imaju verovatnoću >50% da u budućnosti budu okarakterisane kao patogene mogu smatrati varijantama uzročnicima bolesti, dok se VUS varijante sa <50% kao i verovatno benigne i benigne varijante ne mogu smatrati uzročnicima bolesti.

Osim naučne literature, osnovni resursi koji olakšavaju povezivanje gena sa kliničkim manifestacijama bolesti su OMIM i ORPHANET [1,13]. U ovim otvorenim bazama nalaze se podaci o načinu nasleđivanja, kao i pregled detalja kliničkih manifestacija za svaku bolest. Dodatni značaj ORPHANET-a je što je razvio nomenklaturu i enciklopediju koja uključuje sve opisane retke bolesti i koja je u tom aspektu bogatija i detaljnija od trenutno važeće Međunarodne Klasifikacije Bolesti, MKB-11 (eng. *International classification of diseases 11th Revision*, ICD-11) [22]. Sem ova dva resursa, Ontologija ljudskog fenotipa (eng. *Human Phenotype Ontology*, HPO) je koristan resurs za sistematizaciju i univerzalno korišćenje termina koji se odnose na opis fenotipskih karakteristika [23].

Dok je tačna sekvenca referentnog humanog genoma neophodna za identifikaciju i pravilnu anotaciju svih varijanti u analiziranom uzorku, baze podataka koje sadrže podatke o učestalosti varijanti kod zdravih osoba (1000 Genome Project, GnomAD exome, GnomAD genome) su ključne kako bi se izdvojile retke varijante, one varijante čija je učestalost manja od 1% u zdravoj populaciji [24,25].

Ogroman značaj za pravilnu funkcionalnu interpretaciju retkih varijanti imaju baze podataka koje saкупljaju informacije o fenotipskom efektu varijanti (ClinVar, LOVD i druge) [26,27]. Ove baze su dragoceni otvoreni resursi, jer omogućavaju da se dokazi o identifikaciji iste varijante kod obolelih osoba, ma gde na svetu da se nalaze, prikupljaju na jednom centralnom mestu. Još jedna značajna ali komercijalna baza podataka je „*Human Gene Mutation Database*” (HGMD) koja sadrži informacije o publikacijama u kojima je ge-

netička varijanta opisana, bilo da se radi o kohortama pacijenata, pojedinačnim prikazima slučaja ili funkcionalnim *in vitro* studijama [28]. Sličnu ulogu ima i Mastermind pretraživač koji je osmišljen da olakša pretraživanje literature koja sadrži genetičke podatke [29].

Postoji veliki broj *in silico* kompjuterskih programa koji olakšavaju predikciju efekta tačkastih varijanti koje dovode do aminokiselinske zamene, kao i varijanti koje dovode do nepravilnog iskrajanja introna (CADD, GERP, Mutation Assessor, MutPred2, PolyPhen-2, REVEL, SIFT, i druge) [30–36]. Sem toga, korisni su i alati u kojima se procenjuje konzerviranost aminokiselinske sekvence poređenjem različitih vrsta kičmenjaka (npr. Clustal Omega) [37]. Takođe, trodimenzionalni modeli proteina koji nose aminokiselinsku zamenu ili malu deleciju/inserciju mogu se napraviti korišćenjem AlphaFold algoritma, Phyre2 web portala ili Swiss-Pdb Viewer-a [38–40]. Ovi alati zahtevaju da se šifra za određeni protein nađe u proteinskim bazama podataka kako bi se teorijski proteinski model (po mogućstvu humani) upotrebio za dalje modeliranje i predikciju efekta varijante. Na ovaj način moguće je vizuelizovati promenu u strukturi polipeptidnog lanca (uspostavljanje ili ukidanje vodoničnih veza, posttranslacionih modifikacija, itd.) [12,41].

Izuzetno važan i koristan dokaz kojim se utvrđuje efekat genetičke varijante na protein dobija se iz različitih *in vitro* eseja u kojima se određuju stabilnost proteina, sklonost ka degradaciji, rezidualna enzimaska aktivnost kao i potencijal da se na defekt utiče upotrebom farmakoloških šaperona [12,42,43].

Uzevši sve u obzir, može se zaključiti da su važni faktori koji utiču na postizanje visokog stepena detekcije varijanti pažljiva interpretacija svake varijante u kontekstu kliničkog fenotipa pacijenta i uzimanje u obzir svih dostupnih podataka iz literatura kako bi i geni koji su nedavno povezani sa određenim fenotipom bili uzeti u obzir. Sem toga, pokazano je da se istovremenom analizom deteta i oba roditelja (trijada) i do deset puta smanjuje broj genetičkih varijanti koje treba interpretirati [44] i duplira dijagnostička efikasnost u odnosu na situaciju u kojoj se genetička analiza radi samo za dete [45]. Ukoliko ne postoji mogućnost istovremene analize deteta i oba roditelja, naknadna segregaciona analiza kojom se utvrđuje da li je varijanta kod deteta nastala *de novo*, ili da li se dve varijante identifikovane kod deteta nalaze na različitim hromozomima, takođe ima veliki značaj za finalnu potvrdu dijagnoze.

Od 2022, u Srbiji je otpočela i primena sekvenciranja kompletnog egzoma i kompletnog genoma u svrhu genotipizacije pacijenata obolelih od retkih bolesti. Vremenom, kako cena kompletnog egzoma bude opadala, a bioinformatički alati za analizu budu dostupniji, očekivano je da će analiza kliničkog egzoma u potpunosti biti zamenjena analizom kompletnog egzoma i kompletnog genoma.

Perspektive za budućnost

Sekvenciranje nove generacije je tehnologija koja napreduje izuzetno brzo. Na tržištu su dostupne platforme koje funkcionišu po različitim principima (*Illumina, BGI Genomics, Oxford Nanopore Technologies, Pacific Biosciences*) [46–49], konstantno se uvode novi instrumenti sa povećanim kapacitetom i kvalitetom, kao i hemija koja će imati bolje performanse i biti pogodnija za transport i rad u raznovrsnim uslovima. Sve ove promene dovode do potrebe laboratorija da se konstantno prilagođavaju novim uslovima kako bi zadržale visok kvalitet analize i obezbedile visoku senzitivnost i specifičnost dobijenih rezultata. Preduslov za visoku senzitivnost (minimalizovanje lažno negativnih rezultata) je potpuna i uniformna pokrivenost svih regiona koji se sekvenciraju, bilo da se radi o panelu gena, egzomu ili genomu. Potrebno je da svaki nukleotid bude sekvenciran, i to najmanje 20 puta. Problem su visoko repetitivni, kao i GC bogati regioni koji su tradicionalno komplikovani za sekvenciranje. Visoka specifičnost (minimalizovanje lažno pozitivnih rezultata) zavisi od preciznosti procesa amplifikacije DNK i veća je kada se ne koristi PCR amplifikacija. Specifični pro-

blemi prate i identifikaciju insercija i delecija, identifikaciju tačkastih varijanti u regionima bogatim ponovcima ili u regionima koji imaju nisku pokrivenost [50]. Takođe, tačna identifikacija varijanti u genima za koje postoje visoko homologni pseudogeni takođe predstavlja izazov za bioinformatičku analizu.

Sekvenciranje kompletnog egzoma je superiornija analiza u odnosu na klinički egzom jer podrazumeva analizu svih, a ne samo klinički relevantnih gena. Sem toga, velika prednost kompletnog egzoma u odnosu na klinički egzom je mogućnost detekcije CNV [51,52]. Analiza CNV se pre svega preporučuje u slučaju neurazvojnih oboljenja i/ili multiplih kongenitalnih anomalija, kao i za fetuse sa strukturnim anomalijama primćenim u toku ultrazvučnih pregleda [53]. Većina CNV su retke i jedinstvene što komplikuje razumevanje njihovog efekta na razvoj bolesti. Nedavno su date preporuke koje imaju za cilj da omoguće konzistentnu i pravilnu interpretaciju CNV [53].

Ograničenja koja su inherentna sekvenciranju kompletnog egzoma, ne-uniformna pokrivenost svih egzona, GC bogatih regiona, posledica su specifičnosti proba koje se koriste za izdvajanje protein-kodirajućih regiona [54]. Sekvenciranje kompletnog genoma nema ova ograničenja, pa se postiže uniformna pokrivenost svih euhromatskih regiona što otvara velike mogućnosti. Zahvaljujući tome što se vrši analiza i nekodirajućih regiona, moguće je identifikovati duboke intronske varijante, varijante u promotorima i drugim regulatornim elementima gena koje mogu biti uzročnici ili modifikatori bolesti. Sem toga, uniforma pokrivenost omogućava identifikaciju varijanti u kodirajućim regionima koji nisu adekvatno pokriveni egzomskom analizom, ali i strukturnih varijanti (delecije, duplikacije, insercije, inverzije, translokacije i drugi kompleksni rearanžmani veličine preko 50bp) [55], i kratkih tandemskih ponovaka (eng. *Short tandem repeats*, STR) dugih 1-6 bp i ponovljenih veći broj puta [56]. Ekspanzija kratkih tandemskih ponovaka je uzrok nekih retkih bolesti (Fragilni X sindrom, Fridrihova ataksija, Hantingtonova bolest, amiotofična lateralna skleroza, itd.), pa mogućnost da se ekspanzije kratkih tandemskih ponovaka detektuju NGS metodama omogućava da ne moraju da se rade dodatne komplementarne metode kao što je mikroerej [57]. Upravo zbog mogućnosti da se različiti tipovi varijanti (tačkaste varijante, male insercije/delecije, velike insercije/delecije, ekspanzije ponovaka i strukturne varijante) koje se nalaze u različitim regionima (protein-kodirajućim i nekodirajućim) detektuju jednim jedinstvenim genetičkim testom, sekvenciranje kompletnog genoma je omogućilo postavljanje dijagnoze kod pacijenata kod kojih je sekvenciranje kompletnog egzoma bilo neuspešno [58]. Međutim, zbog i dalje visokih troškova sekvenciranja kompletnog genoma, količine podataka koju treba analizirati (preko 3,2 miliona varijanti), količine podataka koju treba skladištiti, kao i nedovoljne razvijenosti bioinformatičkih alata za prioritizaciju velikog broja varijanti, sekvenciranje kompletnog genoma u ovom momentu nije spremno da postane rutinska dijagnostička metoda. Jedan od konkretnih problema za širu primenu sekvenciranja kompletnog genoma je interpretacija efekta varijanti u nekodirajućim regionima, kao i velikih kompleksnih varijanti [59], drugim rečima mogućnost da se proceni efekat detektovanih varijanti na nastajanje određenog fenotipa.

Iako je veoma moćna metoda, sekvenciranjem kompletnog genoma koje se bazira na sekvenciranju kratkih fragmenata DNK (eng. *Short-read sequencing*), nije moguće identifikovati velike kompleksne strukturne varijante i ekspanzije dugih tandemskih ponovaka (eng. *Long tandem repeats*, LTR) [60]. Ovo ograničenje je posledica toga što se prilikom bioinformatičke obrade, fragmenti dužine 100-300bp moraju svrstati na određeno mesto u genomu pa velike strukturne varijante i ekspanzije dugih ponovaka ne mogu biti prepoznate. Varijante ovog tipa mogu se detektovati jedino sekvenciranjem koje je bazirano na sekvenciranju dugačkih fragmenata (eng. *Long-read sequencing*) kod kojih je svrstavanje fragmenata na određeno mesto u genomu umnogome olakšano velikom dužinom fragmenata. Takođe, na ovaj način moguće je precizno odrediti tačke prekida kod kompleksnih rearanžmana. Prvu platformu za sekvenciranje dugačkih fragmenata

razvio je *Oxford Nanopore Technologies* [61], a zatim su usledili *Pacific Biosciences* [62], a od nedavno i *Illumina*. Već su opisani brojni slučajevi otkrivanja molekularno-genetičke osnove genetičke retke bolesti kod pacijenata kod kojih su sve prethodne metode sekvenciranja bile neuspešne [63].

Sem sekvenciranja DNK, sekvenciranje iRNK (kodirajući transkriptom), ima značajnu ulogu u otkrivanju molekularne osnove retkih bolesti kod pacijenata kod kojih su sekvenciranje egzoma/genoma bili neinformativni [64]. Fresard i saradnici su prijavili da sekvenciranje kompletne kodirajuće iRNK podiže dijagnostičku uspešnost za i do 34% ukazujući da bi ovu vrstu analize trebalo uraditi kao komplementarnu metodu ukoliko predhodno urađeni egzom/genom nisu doveli do postavljanja dijagnoze [65,66]. Međutim, u slučaju sekvenciranja iRNK mora se uzeti u obzir da nisu sve iRNK eksprimirane u svim tkivima, niti su eksprimirane sve u svakom trenutku. To predstavlja otežavajuću okolnost jer može da zahteva biopsiju određenih tkiva (mišića, jetre itd.).

Podaci koji se dobijaju sekvenciranjem iRNK mogu se analizirati na više načina, a to su diferencijalna analiza ekspresije, analiza nepravilnog iskrcavanja introna, alel-specifična ekspresija i analiza strukturnih varijanti [67]. Sem toga, sekvenciranje iRNK primenom sekvenciranja dugačkih fragmenata uvodi novu dimenziju, a to je detekcija različitih izoformi, kao i produkata genskih fuzija [68]. Mogućnost identifikacije različitih izoformi je posebno važna kod kompleksnih gena i genskih familija.

Pored transkriptomike, i druge tehnologije, kao što su epigenomika, proteomika ili metabolomika, mogu da obezbede komplementarne podatke sekvenciranju egzoma/genoma i tako doprinesu postavljanju dijagnoze retke bolesti ili razjašnjavanju molekularnih mehanizama njenog nastanka. Kombinovanje podataka dobijenih primenom različitih „omika“, omogućava bolje razumevanje efekta pojedinačnih varijanti na ekspresiju ili metilaciju gena, na proteinske mreže ili metabolizam tkiva. Koja od navedenih „omika“ će komplementirati neinformativno DNK sekvenciranje zavisice na prvom mestu od fenotipa pacijenta. Za neke retke bolesti (npr. *Rubinstein-Taybi*) jedini način za postavljanje dijagnoze je analiza metilacionog profila [69]. Kod urođenih bolesti metabolizma, metabolomika može imati ključnu ulogu za razumevanje mehanizma bolesti, pogotovo kada je genetička varijanta detektovana u genu čija uloga nije dovoljno istražena [70]. Proteomika daje direktnu informaciju o deficijenciji proteina, bilo da se radi o njegovoj sintezi, njegovoj stabilnosti, ili povećanoj podložnosti degradaciji. Proteomska analiza ukazuje na proteinsku mrežu koja je pogođena i u čijem je centru aberantni protein. U nekim slučajevim rezultati dobijeni iz različitih „omika“ mogu da ukažu na defekt koji nije identifikovan prethodnim sekvenciranjem egzoma/genoma, i da se tek ponovnom reanalizom/re-sekvenciranjem dobije potvrda postojanja genetičke varijante u odgovarajućem genu, varijante koja prvobitnom analizom nije bila detektovana usled greške ili metodološkog ograničenja [71].

Zaključak

Razvoj tehničkih mogućnosti će i u budućnosti pomerati granice identifikacije genetičkih varijanti koje su uzročnici monogenetskih bolesti. Detekcija varijante koja je uzročnik bolesti je neprocenjiva za obolelu osobu i njenu porodicu. Međutim saznanje koja genetička varijanta dovodi do bolesti je najčešće nedovoljno za potpuno razumevanje molekularne patofiziologije bolesti. Neophodno je ići u dalja istraživanja i utvrditi promene u ćelijskim procesima na nivou RNK, proteina i metabolita. Takva detaljna istraživanja su ključna za potpuno razumevanje molekularnih karakteristika bolesti. Nova znanja o genetičkom uzroku bolesti, kao i procesima koji su poremećeni u okviru ćelije su neophodna baza za razvoj novih ideja koje će kroz translaciona istraživanja dovesti do inovativnih lekova i ultimativno omogućiti lečenje retkih bolesti.

Napomena: Ovaj rad je podržan projektom Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (451-03-47/2023-01/ 200042). Rad je rezultat naučne aktivnosti Centra za genetičku dijagnostiku retkih bolesti IMGGI.

Literatura

1. Orphanet [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>
2. Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, et al. Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet.* 2020;28:165–73.
3. IRDiRC – International Rare Diseases Research Consortium [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://irdirc.org/>
4. United Nations. Addressing the challenges of persons living with a rare disease and their families : resolution / adopted by the General Assembly [Internet]. Available from: <https://www.rarediseasesinternational.org/wp-content/uploads/2022/01/Final-UN-Text-UN-Resolution-on-Persons-Living-with-a-Rare-Disease-and-their-Families.pdf>
5. Program za retke bolesti i akcioni plan [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.zdravlje.gov.rs/tekst/343045/program-za-retke-bolesti-i-akcioni-plan.php>
6. EURORDIS [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.eurordis.org/>
7. Stojiljkovic M, Jovanovic J, Djordjevic M, Grkovic S, Cvorkov Drazic M, Petrucev B, et al. Molecular and phenotypic characteristics of patients with phenylketonuria in Serbia and Montenegro. *Clinical Genetics.* 2006;70:151–5.
8. Djordjevic M, Klaassen K, Sarajlija A, Tosic N, Zukic B, Kecman B, et al. Molecular Genetics and Genotype-Based Estimation of BH4-Responsiveness in Serbian PKU Patients: Spotlight on Phenotypic Implications of p.L48S. *JIMD Rep.* 2013;9:49–58.
9. Zerjav Tasek M, Groselj U, Angelkova N, Anton D, Baric I, Djordjevic M, et al. Phenylketonuria screening and management in southeastern Europe - survey results from 11 countries. *Orphanet J Rare Dis.* 2015;10:68.
10. Groselj U, Tasek MZ, Smon A, Angelkova N, Anton D, Baric I, et al. Newborn screening in southeastern Europe. *Mol Genet Metab.* 2014;113:42–5.
11. Stojiljković-Petrović M, Klaassen K, Pavlovic S. Molecular Characteristics, Phenotypic Diversity and Genotype-Estimated Therapeutic Responsiveness of Serbian Patients with Phenylketonuria. *Journal of Medical Biochemistry.* 2014;33.
12. Stojiljkovic M, Klaassen K, Djordjevic M, Sarajlija A, Brasil S, Kecman B, et al. Molecular and phenotypic characteristics of seven novel mutations causing branched-chain organic acidurias. *Clin Genet.* 2016;90:252–7.
13. OMIM - NCBI [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
14. Worman HJ, Bonne G. “Laminopathies”: a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res.* 2007;313:2121–33.
15. Denommé-Pichon A-S, Matalonga L, de Boer E, Jackson A, Benetti E, Banka S, et al. A Solve-RD ClinVar-based reanalysis of 1522 index cases from ERN-ITHACA reveals common pitfalls and misinterpretations in exome sequencing. *Genet Med.* 2023;25:100018.
16. Komazec J, Zdravkovic V, Sajic S, Jescic M, Andjelkovic M, Pavlovic S, et al. The importance of combined NGS and MLPA genetic tests for differential diagnosis of maturity onset diabetes of the young. *Endokrynol Pol.* 2019;70:28–36.
17. Andjelkovic M, Minic P, Vreca M, Stojiljkovic M, Skakic A, Sovtic A, et al. Genomic profiling supports the diagnosis of primary ciliary dyskinesia and reveals novel candidate genes and genetic variants. *PLoS One.* 2018;13:e0205422.
18. Anđelković M, Spasovski V, Vreća M, Sovtić A, Rodić M, Komazec J, et al. The importance of genomic profiling for differential diagnosis of pediatric lung disease patients with suspected ciliopathies. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo.* 2019;147:160–6.
19. Skakic A, Djordjevic M, Sarajlija A, Klaassen K, Tosic N, Kecman B, et al. Genetic characterization of GSD I in Serbian population revealed unexpectedly high incidence of GSD Ib and 3 novel SLC37A4 variants. *Clin Genet.* 2018;93:350–5.
20. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405–24.
21. Ellard S, Baple E, Berry I, Forrester N, Turnbull C, Owens M, et al. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification 2019. 2019 [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/ACGS-Best-Practice-Guidelines-for-Variant-2019-Ellard-Baple/86fa75f316823ef358a804fe1e45a98a85351bf9>
22. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://icd.who.int/browse11/l-m/en>
23. Human Phenotype Ontology [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://hpo.jax.org/app/>

24. 1000 Genomes | A Deep Catalog of Human Genetic Variation [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.internationalgenome.org/>
25. Gudmundsson S, Singer-Berk M, Watts NA, Phu W, Goodrich JK, Solomonson M, et al. Variant interpretation using population databases: Lessons from gnomAD. *Human Mutation*. 2022;43:1012–30.
26. ClinVar [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
27. LOVD - An Open Source DNA variation database system [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.lovd.nl/>
28. HGMD® home page [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>
29. Mastermind Genomic Search Engine [Internet]. [cited 2023 Sep 8]. Available from: <https://www.genomenon.com/mastermind/>
30. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet*. 2016;99:877–85.
31. UCSC Genome Browser: Citing Us [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://genome.ucsc.edu/cite.html>
32. MutationAssessor.org /// functional impact of protein mutations [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <http://mutationassessor.org/r3/>
33. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:D886–94.
34. Pejaver V, Urresti J, Lugo-Martinez J, Pagel KA, Lin GN, Nam H-J, et al. Inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants with MutPred2. *Nat Commun*. 2020;11:5918.
35. Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, Sikic M, Ng PC. SIFT missense predictions for genomes. *Nat Protoc*. 2016;11:1–9.
36. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7:248–9.
37. Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
38. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 2006;22:195–201.
39. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*. 2015;10:845–58.
40. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596:583–9.
41. Milacic I, Barac M, Milenkovic T, Ugrin M, Klaassen K, Skakic A, et al. Molecular genetic study of congenital adrenal hyperplasia in Serbia: novel p.Leu129Pro and p.Ser165Pro CYP21A2 gene mutations. *J Endocrinol Invest*. 2015;38:1199–210.
42. Stojiljkovic M, Pérez B, Desviat LR, Aguado C, Ugarte M, Pavlovic S. The Missense p.S231F phenylalanine hydroxylase gene mutation causes complete loss of enzymatic activity in vitro. *Protein J*. 2009;28:294–9.
43. Pecimonova M, Polak E, Csicsay F, Reblova K, Stojiljkovic M, Levarski Z, et al. Functional and structural characterisation of 5 missense mutations of the phenylalanine hydroxylase. *Gen Physiol Biophys*. 2017;36:361–71.
44. Wright CF, Fitzgerald TW, Jones WD, Clayton S, McRae JF, van Kogelenberg M, et al. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet*. 2015;385:1305–14.
45. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, Tan TY, White SM, Dimmock D, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genom Med*. 2018;3:16.
46. Illumina | Sequencing and array-based solutions for genetic research [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.illumina.com/>
47. BGI Genomics - Global [Internet]. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.bgi.com/global>
48. Oxford Nanopore Technologies [Internet]. Oxford Nanopore Technologies. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://nanoporetech.com>
49. PacBio - Sequence with confidence [Internet]. PacBio. [cited 2023 Sep 11]. Available from: <https://www.pacb.com/>
50. Corominas J, Smeekens SP, Nelen MR, Yntema HG, Kamsteeg E-J, Pfundt R, et al. Clinical exome sequencing-Mistakes and caveats. *Hum Mutat*. 2022;43:1041–55.
51. Hong CS, Singh LN, Mullikin JC, Biesecker LG. Assessing the reproducibility of exome copy number variations predictions. *Genome Medicine*. 2016;8:82.

52. Yamamoto T, Shimojima K, Ondo Y, Imai K, Chong PF, Kira R, et al. Challenges in detecting genomic copy number aberrations using next-generation sequencing data and the eXome Hidden Markov Model: a clinical exome-first diagnostic approach. *Hum Genome Var.* 2016;3:1–6.
53. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genetics in Medicine.* 2020;22:245–57.
54. Wang Q, Shashikant CS, Jensen M, Altman NS, Girirajan S. Novel metrics to measure coverage in whole exome sequencing datasets reveal local and global non-uniformity. *Sci Rep.* 2017;7:885.
55. Sanchis-Juan A, Stephens J, French CE, Gleadall N, Mégy K, Penkett C, et al. Complex structural variants in Mendelian disorders: identification and breakpoint resolution using short- and long-read genome sequencing. *Genome Medicine.* 2018;10:95.
56. Qaiser F, Sadoway T, Yin Y, Zulfiqar Ali Q, Nguyen CM, Shum N, et al. Genome sequencing identifies rare tandem repeat expansions and copy number variants in Lennox–Gastaut syndrome. *Brain Communications.* 2021;3:fcab207.
57. Kvarnung, M., Nordgren, A. (2017). Intellectual Disability & Rare Disorders: A Diagnostic Challenge. In: Posada de la Paz, M., Taruscio, D., Groft, S. (eds) *Rare Diseases Epidemiology: Update and Overview. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1031. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67144-4_3
58. Souche E, Beltran S, Brosens E, Belmont JW, Fossum M, Riess O, et al. Recommendations for whole genome sequencing in diagnostics for rare diseases. *Eur J Hum Genet.* 2022;30:1017–21.
59. Krude H, Mundlos S, Øien NC, Opitz R, Schuelke M. What can go wrong in the non-coding genome and how to interpret whole genome sequencing data. *Medizinische Genetik.* 2021;33:121–31.
60. 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 Neuropathologica Communications.* 2021;9:98.
61. Clarke J, Wu H-C, Jayasinghe L, Patel A, Reid S, Bayley H. Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol.* 2009;4:265–70.
62. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, Otto G, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science.* 2009;323:133–8.
63. de la Morena-Barrio B, Stephens J, de la Morena-Barrio ME, Stefanucci L, Padilla J, Miñano A, et al. Long-Read Sequencing Identifies the First Retrotransposon Insertion and Resolves Structural Variants Causing Antithrombin Deficiency. *Thromb Haemost.* 2022;122:1369–78.
64. Kremer LS, Bader DM, Mertes C, Kopajtich R, Pichler G, Iuso A, et al. Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. *Nat Commun.* 2017;8:15824.
65. Cummings BB, Marshall JL, Tukiainen T, Lek M, Donkervoort S, Foley AR, et al. Improving genetic diagnosis in Mendelian disease with transcriptome sequencing. *Sci Transl Med.* 2017;9:eaal5209.
66. Frésard L, Smail C, Ferraro NM, Teran NA, Li X, Smith KS, et al. Identification of rare-disease genes using blood transcriptome sequencing and large control cohorts. *Nat Med.* 2019;25:911–9.
67. Marwaha S, Knowles JW, Ashley EA. A guide for the diagnosis of rare and undiagnosed disease: beyond the exome. *Genome Medicine.* 2022;14:23.
68. Oliver GR, Tang X, Schultz-Rogers LE, Vidal-Folch N, Jenkinson WG, Schwab TL, et al. A tailored approach to fusion transcript identification increases diagnosis of rare inherited disease. *PLoS One.* 2019;14:e0223337.
69. Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet.* 2013;132:359–83.
70. Abela L, Simmons L, Steindl K, Schmitt B, Mastrangelo M, Joset P, et al. N(8)-acetylspermidine as a potential plasma biomarker for Snyder-Robinson syndrome identified by clinical metabolomics. *J Inherit Metab Dis.* 2016;39:131–7.
71. Grabowski P, Hesse S, Hollizeck S, Rohlf M, Behrends U, Sherkat R, et al. Proteome Analysis of Human Neutrophil Granulocytes From Patients With Monogenic Disease Using Data-independent Acquisition. *Mol Cell Proteomics.* 2019;18:760–72.



Slika 1. Pregled osnovnih podataka o retkim bolestima



“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