

**SAŽETCI SKUPA**

***MOLEKULARNA GENETIKA – NOVOSTI U  
DIJAGNOSTICI I TERAPIJI***

16.10.2017, Knjižnica HAZU, Strossmayerov trg 14, Zagreb

# **GENOMIKA I PRECIZNA MEDICINA**

## **GENOMICS AND PRECISION MEDICINE**

Stjepan Gamulin

Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti

E-adresa: [sgamulin@hazu.hr](mailto:sgamulin@hazu.hr)

Upoznavanje humanog genoma potaknuo je koncept personalizirane medicine u kojoj se podatci o genomici, proteomici i okolišu svake pojedine osobe integriraju i primjenjuju u osobnoj zdravstvenoj skrbi, dijagnostici, prevenciji i liječenju.

Naziv personalizirana medicina sve više se zamjenjuje nazivom precizna medicina, jer je oduvijek pristup bolesniku bio individualan, pa je i medicina oduvijek u odgovarajućoj mjeri bila personalizirana.

Realizacija koncepta personalizirane ili precizne medicine veoma zaostaje u usporedbi s ogromnim spoznajnim i tehnološkim napretkom humane genomike jer na putu realizacije bezbroj prepreka. Njihovo svladavanje traži među ostalim razvoj personalne genomike, translacijskih istraživanja koja će bazična saznanja prenijeti u kliničku primjenu, novu taksonomiju bolesti zasnovanu na molekularnim poremećajima, reviziju kliničkih pokusa s podskupnima bolesnika prema novim prognostičkim i prediktivnim čimbenicima, stvaranje genomskih, proteomskih i tkivnih biobanaka, prikupljanje uniformiranih kliničkih podataka („big data“) te razvoj bioinformatičkih sustava koji će integrirati kliničke podatke sa svekolikim saznanjima o etiopatogenetskim čimbenicima i izgraditi funkcijsku mrežu etiopatogeneze bolesti na populacijskom i individualnom planu.

K tome valja dodati i pravnu osnovu korištenja individualnih podataka koji će biti dostupni realizacijom koncepta precizne medicine.

# SKRIVENE GENOMSKE SIMETRIJE – TREĆI KLJUČ EVOLUCIJE I FUNKCIJE GENOMA? HIDDEN GENOMIC SYMMETRIES – THE THIRD PRINCIPLE OF EVOLUTION AND GENOME FUNCTION?

Marija Rosandić<sup>1</sup>, Ines Vlahović<sup>2</sup>, Matko Glunčić<sup>2</sup>, Ivica. Martinjak<sup>1</sup>, Vladimir Paar<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti

<sup>1</sup>Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Fizički odsjek

E-adresa: [paar@hazu.hr](mailto:paar@hazu.hr)

U dijelu ovih istraživanja tema su velike primarne i sekundarne repeticije (HOR-ovi) kao simetrijske strukture, pomoću našega originalnog kompjutorskog algoritma GRM (Global Repeat Map) koji omogućuje efikasnu identifikaciju širokog spektra repeticija neograničenih duljina i znatnih odstupanja HOR-kopija od koncezusne duljine, koje mogu biti po volji međusobno udaljene (nelokalne) u sekvencama velikim poput humanih kromozoma. Efikasnost GRM-a se temelji na našoj uporabi kompletnog skupa ansambla K-stringova što omogućuje nova metoda direktnog preslikavanja simboličke DNA sekvence u frekventnu domenu, s izravnom identifikacijom repeticija kao uskog vrha (maksimuma) u GRM dijagramu. Tako GRM koristi frekventnu domenu, ali pritom izbjegavši potrebu preslikavanja simboličke DNA sekvence u u numeričku sekvencu, i primjenjuje pridruživanje K-stringova, ali izbjegavši statističke metode lokalnog optimiziranja individualnih K-stringova. Pomoću GRM algoritma klasificiramo kompletni ansambl alfa satelita i njihove HOR-ove u humanom genomu (NCBI baza), i genomima Neandertalca (MPI Leipzig) i čimpanze (NCBI). Na primjer, otkrili smo po prvi put velike HOR jedinice u 47 kopija u humanom kromozomu 1 (u intronu "Neuroblastoma breakpoint family" NBPF gena), dok je taj HOR potpuno odsutan u čimpanzinom kromozomu 1, i samo fragmentaran u genomu Neandertalca. Iznijeli smo hipotezu o mogućoj ulozi tih HOR jedinica kao humanih akceleriranih HOR-ova (HAHOR), s mogućom evolucijskom ulogom u evolucijski brzom razvoju kognitivnih sposobnosti čovjeka, a njihovog potpunog odsustva kod čimpanze. Zbog svog akcelerirajućeg karaktera također bi mogli imati ulogu u nastanku karcinoma.

U drugom dijelu istraživanja razmatramo otvoreno pitanje inicijalnog podrijetla života na Zemlji koji se ogleda u nastanku genetskog koda (preslikavanje trinukleotida u 20 aminokiselina). Tom problemu pristupamo konstrukcijom nove visoko simetrijske sheme. U našoj shemi ulogu inicijalne amino kiseline ima šesterostruko degenerirani serin.

U trećem dijelu istraživanja uvodimo novi koncept utemeljen na 20 trinukleotidnih kvadrupleta i pripadnim zrcalnim simetrijama. U tom okviru svaka vrsta/organizam je karakterizirana s 3-D kvadrupletnim frekventnim dijagramom. Tako smo dobili iznenađujuće rezultate da je ta nova signatura visoko invarijantna duž evolucijskog lanca, sve od najnižih bakterija do najviše razine složenosti humanog genoma. Na temelju 2. Chargaffovog pravila pariteta (A-T i C-G pravila pariteta unutar istog DNA lanca, što je empirijski dobro poznato, ali do danas nije razumljeno teorijski). Mi objašnjavamo tu pravilnost kao signaturu novoga, trećeg evolucijskog pokretača, kao dodatnog novoga prirodnog zakona pored dva poznata načela neodarvinizma, slučajnih mutacija i prirodne selekcije. Zbog toga zakona, svaki mono/oligonukleotid koji uđe u jedan lanac DNA molekule mora također ući i u drugi lanac. Mi smatramo da taj prirodni zakon igra fundamentalnu ulogu u evolucijskom razvoju čovjeka. Daljnja istraživanja u tom okviru mogu otvoriti novi pogled na temeljnu evolucijsku zagonetku: Što kontrolira i sprečava očekivani porast neuređenosti entropijskog tipa u evoluciji genoma? Naš odgovor je: simetrije.

# LJUDSKA ALFA SATELITSKA DNA KAO REGULATOR GENSKE AKTIVNOSTI

## HUMAN ALPHA SATELLITE DNA AS A REGULATOR OF GENE ACTIVITY

Isidoro Feliciello, Đurđica Ugarković

Institut Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu biologiju

E-adresa: [djurdjica.ugarkovic@irb.hr](mailto:djurdjica.ugarkovic@irb.hr)

Satelitske DNA su uzastopno ponovljene sekvence organizirane u duge sljedove smještene u konstitutivnom heterokromatinu. Kod mnogih vrsta uključujući i čovjeka, elementi satelitskih DNA su osim u heterokromatinu raspršeni i u eukromatinu, unutar ili u susjedstvu gena. Mi smo pokazali da takva organizacija satelitske DNA omogućuje djelomičnu supresiju gena smještenih u susjedstvu raspršenih elemenata satelitske DNA. Supresija gena je naglašena u uvjetima termičkog stresa kada je ekspresija satelitske DNA povećana. Ovaj novootkriveni oblik genske regulacije je zajednički glavnoj ljudskoj alfa satelitskoj DNA kao i glavnoj satelitskoj DNA kukca *Tribolium castaneum*. Djelomična supresija genske ekspresije je izazvana „heterokromatinizacijom“ elemenata satelitske DNA smještenih u susjedstvu gena koja je posredovana transkriptima satelitske DNA. Varijacija u inserciji elemenata satelitske dovodi do razlike u genskoj ekspresiji između individua što može potaknuti adaptivnu evoluciju dok pojedine insercije mogu poremetiti normalnu funkciju gena i eventualno potaknuti nastanak bolesti.

Satellite DNAs are tandemly repeated sequences preferentially assembled into large arrays within constitutive heterochromatin. In many species, including humans, satellite DNA repeats are in addition to heterochromatin dispersed in the vicinity of genes within euchromatin. Here we reveal that such genomic organization enables partial suppression of genes located nearby dispersed satellite DNA repeats. The gene suppression effect is pronounced after heat stress when satellite transcription is significantly enhanced, and this novel mode of gene regulation is common to both human alpha satellite DNA and the insect *Tribolium castaneum* major satellite DNA. Satellite DNA-mediated gene repression is based on enrichment of silent histone marks at dispersed satellite repeats which is guided by satellite DNA transcripts. Variation in insertion of satellite repeats generates gene expression diversity among individuals which could facilitate adaptive evolution while some insertions could affect proper gene function and cause a disease.

# **GLIKOZILACIJA PROTEINA KAO BIOMARKER U PERSONALIZIRANOJ MEDICINI**

## **PROTEIN GLYCOSYLATION AS A BIOMARKER IN PERSONALIZED MEDICINE**

Gordan Lauc

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Genos d.o.o.

E-adresa: [glauc@pharma.hr](mailto:glauc@pharma.hr)

Gotovo svi membranski i izvanstanični proteini su glikozilirani te su za njihovo ispravno funkcioniranje nužni i polipeptidni i glikanski dijelovi molekule. Za razliku od polipeptidnog dijela koji je u potpunosti određen slijedom nukleotida u odgovarajućem genu, glikanski dijelovi nisu izravno zapisani u genomu, te je njihova struktura određena i genskim i okolišnim čimbenicima. Kako je i većina kompleksnih bolesti pod značajnim utjecajem okolišnih faktora, glikani su puno bolji biomarkeri za te bolesti od genskih polimorfizama. Glikoanalitički laboratorij Genosa vodeći je laboratorij za visokoprotočnu glikomiku u svijetu, te smo u posljednjih nekoliko godina analizirali više od 50,000 uzoraka u sklopu različitih kliničkih i epidemioloških studija. U većini bolesti koji smo analizirali (uključujući dijabetes, upalne bolesti crijeva, kolorektalni karcinom, reumatoidni artritis, sistemski eritemski lupus i druge) pronašli smo značajna odstupanja u sastavu glikoma. Neke od tih razlika vidljive su i nekoliko godina prije pojave prvih simptoma bolesti i omogućuju vrlo ranu, u nekim slučajevima čak i preventivnu dijagnostiku.

## THE FUTURE OF CARTILAGE REPAIR

Dragan Primorac<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>

<sup>1</sup>Eberly College of Science, The Pennsylvania State University, University Park, PA, USA

<sup>2</sup>University of New Haven, West Haven, CT, USA

<sup>3</sup>St. Catherine Specialty Hospital, Zabok/Zagreb, Croatia

<sup>4</sup>University of Osijek, School of Medicine, Osijek, Croatia

<sup>5</sup>University of Split, School of Medicine, Split, Croatia

<sup>6</sup>University of Rijeka, Department of Biotechnology, Rijeka, Croatia

<sup>7</sup>Children's Hospital Srebrnjak, Zagreb, Croatia

E-adrese: [draganprimorac2@gmail.com](mailto:draganprimorac2@gmail.com); [office@draganprimorac.com](mailto:office@draganprimorac.com)

Worldwide, arthritis is considered to be a major cause of disability and chronic pain. Mechanical injury to a joint is the main risk factor for developing osteoarthritis. Understanding the biological processes that occur during the deterioration of cartilage in osteoarthritis (OA) is of utmost importance. At the microscopic level, there is evidence of both structural (chondrocyte cell death, duplication of the tidemark, etc.) and biochemical changes (decreased proteoglycan content and altered proteoglycan structure) during the progression of OA. Cartilage proteoglycans decrease in mass and size and their concentration in tissue diminishes. Achieving treatment adherence in OA is a great challenge. Adipose Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are a promising therapeutic tool. It has been shown earlier that AdMSCs did not affect the proliferation of chondrocytes but significantly decreased apoptosis. In addition, we also shown that intra-articular administration of autologous microfragmented fat tissue with Ad-MSCs in patients with knee osteoarthritis was not associated with any adverse events including chondrotoxicity, and our results are in line with other studies that demonstrate that this treatment concept is safe for treating osteoarthritis. Our study has shown that an efficient response of chondrocytes and proteoglycan synthesis can be expected with the treatment by autologous transplantation of microfragmented fat tissue. Obviously, this tissue serves as a good therapeutic vehicle, leaving Ad-MSCs and pericytes viable and effective in their niche. The viability of MSCs and pericytes throughout the surgical procedure is crucial for any expected biological effect. Once the active MSCs and pericytes get and sense the surrounding of the targeted knee joint, they start to secrete bioactive factors that are immunomodulatory, anti-scarring, anti-apoptotic, angiogenic and trophic (regenerative), meaning that these cells make therapeutic drugs *in situ*. During my lecture, I will present the results of our recent study and the influence of Ad-MSC in patients with knee OA to glycosaminoglycans (GAGs) content in hyaline cartilage.

# MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA U PATOLOGIJI

## MOLECULAR DIAGNOSTICS IN PATHOLOGY

Marija Mišić<sup>1</sup>, Diana Hrg<sup>1</sup>, Kristina Meljanac Salopek<sup>1</sup>, Gordana Bubanović<sup>2</sup>, Sania Kuzmac<sup>2</sup>, Marina Cindrić<sup>1</sup>, Damir Babić<sup>1,2</sup>, Sven Seiwert<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

<sup>2</sup> Klinički zavod za patologiju i citologiju, Klinički bolnički centar Zagreb

E-adresa: [sven.seiwert@mef.hr](mailto:sven.seiwert@mef.hr)

Molekularna patologija je grana patologije koja se izrazito brzo razvija, a bez koje je moderna patologija trenutno nezamisliva. Njena je uloga analiza biološki važnih molekula (DNA, RNA, proteini...) i povezivanje dobivenih saznanja s određenim bolestima. Osim vrijednih dijagnostičkih podataka, može pružiti i prognostičke te prediktivne informacije.

Laboratorij za molekularnu patologiju Medicinskog fakulteta i KBC-a Zagreb započeo je s radom 2000. godine uvođenjem HPV dijagnostike. U narednim je godinama uvedena i dijagnostika različitih tipova sarkoma (Ewingov sarkom, sinovijalni sarkom, alveolarni rabdomiosarkom, mikroidni liposarkom i dr.), a 2010. god. započela je analiza tumorskih markera u svhu odabira ciljane terapije. Naime, prilikom postavljanja dijagnoze za određene bolesti potrebno je analizirati gene od interesa kako bi se odredio najdjelotvorniji terapijski protokol za određenog pacijenta. Prvi takav tip testiranja bila je analiza mutacija *KRAS* gena za bolesnike s metastatskim kolorektalnim karcinomom koja je vremenom proširena detekcijom mutacija *NRAS* gena. Obzirom da se ukazala potreba za analizom *EGFR* gena za karcinome pluća, odnosno *BRAF* gena za metastatske melanome, u kratkom je roku zaživjela i ta dijagnostika. U prošloj je godini uvedena analiza nekih tumora središnjeg živčanog sustava, a nedavno je započeto testiranje karcinoma jajnika na mutacije *BRCA1* i *BRCA2* gena.

Obzirom da su rezultati navedenih pretraga od iznimne važnosti, one moraju biti napravljene precizno i brzo kako bi se pacijentu pružila najbolja moguća skrb.



# SEKVENCIRANJE NOVE GENERACIJE (NGS) U DIJAGNOSTICI I LIJEČENJU MALIGNIH BOLESTI

## APPLICATION OF NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) IN DIAGNOSTICS AND TREATMENT OF MALIGNANT DISEASES

Irena Drmić Hofman<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> KBC Split, Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju

<sup>2</sup> Medicinski fakultet u Splitu, Katedra za medicinsku kemiju i biokemiju

E-adresa: [irena.drmic.hofman@mefst.hr](mailto:irena.drmic.hofman@mefst.hr)

Napredak u razvoju tehnika sekvenciranja doveo je do sve veće primjene sekvenciranja nove generacije (engl. *next-generation sequencing*, NGS) te omogućio bolje razumijevanje prirode mnogih bolesti i unaprijedio mogućnosti njihovog liječenja, posebice malignih bolesti.

Brojne su prednosti NGS tehnologije, prije svega mogućnost istovremene analize golemog broja uzoraka, kojom je omogućeno masivno paralelno sekvenciranje ogromnog broja ciljnih regija gena i otkrivanje višestrukih mutacija u istoj analizi. Još jedna značajna prednost očituje se u skraćenom vremenu analize te u znatno manjoj količini DNA/RNA potrebne za reakciju (bilo one izolirane iz krvi, svježeg tkiva ili tkiva uklopljenog u parafin).

Troškovi sekvenciranja DNA danas su znatno smanjeni, a trenutno dostupne tehnologije omogućavaju provedbu različitih pristupa sekvenciranju. Nekoliko pristupa uključuje cjelogenomsko sekvenciranje (engl. *whole genome sequencing*, WGS), odnosno analizu varijacija u pojedinačnom nukleotidu i razlika broja kopija u svim parovima baza DNA; cjeloegzomsko sekvenciranje (engl. *whole exome sequencing*, WES) za analize mutacija i razlika u broju kopija prepisanih eksona; sekvenciranje RNA (analize ekspresije gena, dorade RNA i stvaranja fuzijskih transkripata) te detekciju epigenetičkih promjena. U rutinskoj primjeni su već i brojni genski paneli za ciljana testiranja, namijenjena za dokazivanje najčešćih promjena u genskim i intronskim sekvencama karakterističnim za određene tumore, a dobiveni rezultati pružaju izbor nekih novih terapijskih opcija. Izlaganje donosi pregled recentnih spoznaja u primjeni tehnika NGS u analizi tumora, od predanalitičkog dijela (dobivanje adekvatnog uzorka za analizu) do izbora informatičkih alata potrebnih za obradu goleme količine podataka, stvorenih tijekom sekvenciranja. Poblje se razmatraju i izazovi u anotiranju genetičkih varijacija povezanih s njihovom klinički relevantnom interpretacijom.

# MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA VEKTORIMA PRENOSIVIH BOLESTI

## MOLECULAR DIAGNOSTICS OF VECTOR BORNE DISEASES

Alemka Markotić, Ivan-Christian Kurolt, Lidija Cvetko Krajinović, Petra Svoboda, Željka Mačak Šafranko

Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

E-adresa: [alemka.markotic@gmail.com](mailto:alemka.markotic@gmail.com)

Tijekom zadnjih osamdesetak godina u svijetu se pojavilo preko 350 novih zaraznih bolesti od kojih je visoki postatak bolesti koje svrstavamo u zoonoze (>60%). To su bolesti koje se prenose sa životinja na čovjeka (moguće i obrnuto) direktnim kontaktom sa životinjama, preko izlučevina, svježeg mesa, krvi i sl. Oko 25% zoonoza se prenosi vektorima kao što su: krpelji, komarci i mušice. Veći dio spomenutih bolesti se prenosi s divljih životinja, a osobito tu mislimo na sitne glodavce. Taj prijenos je povezan s različitim ekološkim, okolišnim, ali i socio-ekonomskim čimbenicima, koji mogu imati veliko značenje u javnom zdravstvu i globalnoj ekonomiji. Od 2014. godine, velike epidemije denge, malarije, žute groznice chikungunye i Zike izazvale su globalni zdravstveni problem, ugrozile brojne živote i destabilizirale zdravstvene sustave u mnogim zemljama. Neke od vektorima prenosivih bolesti (VPB) od javnozdravstvenog značenja u Hrvatskoj su: borelioza, erlihioza, krpeljni meningoencefalitis, rikecioze, tularemija, denga, encefalitis zapadnog Nila, lišmanijaza, ali i mnoge druge. Brza i pouzdana dijagnostika je od iznimne važnosti kako za pravovremeno zbrinjavanje i liječenje bolesnika, tako i u prevenciji širenja navedenih bolesti. Molekularni testovi su postali široko dostupni za većinu VPB. Na žalost, većina molekularnih testova za detekciju VPB temelji se još uvijek na nestandardiziranim metodama koje su razvijene u pojedinim laboratorijima, a standardizirani i validirani testovi su općenito ograničeni na centralizirane referentne laboratorije i specijalizirane istraživačke institucije koje imaju složenu i skupu laboratorijsku infrastrukturu, osigurana adekvatna financijska sredstva te visoko kvalificirano laboratorijske osoblje. Sekvenciranje slijedeće generacije te tzv. „omics metode“ su napravile značajan iskorak u dijagnostici VPB, ali kao i u drugim područjima istaknule i nužnost razvoja bioinformatičkih alata za kvalitetnu analizu dobivenih podataka. U izlaganju ćemo dati pregled moderne molekularne dijagnostike VPB kao i naša dijagnostička iskustva u detekciji VPB u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu.

# **NOVE GENOMSKE METODE U DIJAGNOSTICI NEUROLOŠKIH POREMEĆAJA**

## **NOVEL GENOMIC METHODS IN DIAGNOSTICS OF NEUROLOGICAL DISORDERS**

Fran Borovečki

Odjel za poremećaje pokreta i kretanja, Klinika za neurologiju, KBC Zagreb

Centar za translacijska i klinička istraživanja, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i  
KBC Zagreb

E-adresa: [fran.borovecki@mef.hr](mailto:fran.borovecki@mef.hr)

Epilepsija je jedan od najčešćih neuroloških poremećaja s kompleksnom patofiziološkom pozadinom. Veliki broj nedavnih istraživanja ukazuje na jasnu ulogu genetskih mehanizama u nastanku epilepsije. Genetski čimbenici igraju važnu ulogu u velikom broju slučajeva, bilo kroz poznate mutacije gena koje uzrokuju bolest ili kroz genske varijante koje povećavaju rizik za razvoj bolesti snižavanjem praga za epileptičke napadaje. Epilepsije s primarnim genetskim uzrokom uključuju slučajeve gdje se bolest pojavljuje zbog poremećaja u razvoju mozga i neurodegeneracije, ali i slučajeva gdje je očuvana makroskopska struktura mozga i u kojima je epilepsija često jedina klinička značajka. Iako su brojni geni odgovorni za pojavu monogenetskih epilepsija, uključujući mutacije koje dovode do povećane podražljivosti neurona, narušenog sinaptičkog prijenosa i poremećenog razvoja neurona, u većini slučajeva epilepsija je genetski složena i javlja se kroz interakciju više gena i okoliša. Novi genomske pristupi, kao što su genski čipovi ili sekvenciranje sljedeće generacije, pružaju bolji uvid u genske čimbenike rizika koji su odgovorni za epilepsiju. Iako genski čipovi omogućuju otkrivanje velikih kromosomskih aberacija te su postali novi standard u citogenetskoj dijagnozi, aplikacije temeljene na sekvenciranju sljedeće generacije, poput sekvenciranje cjelokupnog genoma, egzoma i panel sekvenciranje, uvelike su poboljšale našu sposobnost otkrivanja genetskih uzroka epilepsije. Navedeni pristupi dostupni su svim pacijentima u Republici Hrvatskoj od 2015. i do sada su omogućili ispravnu dijagnozu za veliki broj pojedinaca. Novi genomske pristupi omogućit će ne samo otkrivanje novih patogenih genetskih varijanti, nego će također pridonijeti povećanju učinkovitosti liječenja i smanjiti učestalost neželjenih reakcija na postojeće i buduće terapije.

# **STRATEGIJA MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE I TERAPIJSKE PERSPEKTIVE MIŠIĆNIH I ŽIVČANIH BOLESTI U HRVATSKOJ**

## **STRATEGIES OF MOLECULAR DIAGNOSTICS AND THERAPEUTIC PERSPECTIVES OF MUSCLE AND NERVE DISEASES**

Nina Canki-Klain

Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Društvo za kliničku genetiku Hrvatske

E-adresa: [nina.canki.klain@mef.hr](mailto:nina.canki.klain@mef.hr)

Eksplozivan razvoj tehnologije sekvenciranja novih generacija (NGS) započeo 2005. omogućuje očitavanja sve većeg broja paralelno sekvenciranih uzoraka u što kraćem vremenu. To dovodi do drastičnog pada troškova i posljedično do znatnog povećanja zahtjeva za genetskim testovima. Sekvenciranja novih generacija prvotno rezervirana za upotrebu u istraživanju, danas se progresivno šire na bolničke laboratorije u dijagnostičke svrhe. Realno možemo očekivati da će te nove tehnologije u bliskoj budućnosti predstavljati osnovno sredstvo u molekularnoj dijagnostici u medicinskoj genetici. Postoje mnoga pitanja na koja genomska medicina čeka odgovor. Tko će postavljati indikaciju i redoslijed za određenu analizu: npr. čitav genom (WGS), čitav egzom (WES) ili panel gena t.j. izabrane gene odgovorne za određenu patologiju? Da li će to biti klinički genetičar, drugi liječnik-specijalist s edukacijom iz genomske medicine, oba ili...? Tko će interpretirati nalaz i davati genetsko savjetovanje? Osim medicinskih, kadrovskih, tehničkih i financijskih problema, potrebno je voditi računa o pravnim i etičkim pitanjima.

Otkriće gena koji uzrokuje bolest predstavlja točnu dijagnozu. Međutim, postoje tisuće drugih gena bolesnika te njegova okolina koji utječu na ekspresiju tog bolesnog gena i tako određuju prognozu. Zbog toga je nemoguće sve predvidjeti iz genomskih podataka koje neki smatraju „kristalnom kuglom“.

Što se tiče liječenja bolesnika, koje su realne koristi razvoja genetike? Parafrazirajući A. Munnicha, odgovor učenika i studenata će sigurno biti „genska terapija i kloniranje“. Očarani, ne bez razloga, tim perspektivama, naši suvremenici će istovremeno prije zaboraviti napredak uobičajenih danas raspoloživih vrsta liječenja i utjecaj simptomatske skrbi na kvalitetu i trajanje života bolesnika s genetskom bolešću. Naši bolesnici ne trpe zbog svojih mutacija već zbog funkcionalnih posljedica tih mutacija. Razumijevanje mehanizma neke genetske bolesti često

se pokazuje korisnijim za simptomatsku terapiju nego za tehnički vrlo složenu zamjenu mutiranog gena.

Genetske metode liječenja danas postoje za vrlo ograničen broj genetskih bolesti. Napominjem, da uz mali broj iznimaka, nema dugotrajnijeg praćenja efekata terapije. Isto tako naglašavam da pristup toj terapiji kao i vrlo važnom simptomatskom liječenju nalaže egzaktnu i što raniju molekularnu dijagnozu kako bi se usporilo ireverzibilno propadanje zahvaćenog ili zahvaćenih tkiva. Zbog toga je neophodno planirati koje bolesti želimo molekularno detaljno dijagnosticirati. Osvrnut ću se na patologiju s kojom imam najviše iskustva i prikazati nekoliko bolesnika.

# **MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA GENETIČKIH BOLESTI I EUROPSKA MREŽA ZA KVALITETU MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE**

## **MOLECULAR DIAGNOSIS OF GENETIC DISEASES AND EUROPEAN MOLECULAR QUALITY NETWORK**

Sertić J<sup>1,2</sup>, Ljubić H<sup>2</sup>, Merkle A<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

<sup>2</sup>Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb

E-adresa: [jadranka.sertic@kbc-zagreb.hr](mailto:jadranka.sertic@kbc-zagreb.hr)

Molekularna dijagnostika genetičkih bolesti je napredak u medicini radi usmjerenja precizne dijagnostike i ciljane terapije u zdravstvenu skrb koja vodi od intervencije prema prevenciji. Modeli složenih korelacija genotipa i fenotipa rijetkih monogenских bolesti, poligenских i multifaktorskih poremećaja temelje se na rezultatima istraživanja genskih varijanti i rizičnih čimbenika putem integrirane uloge genetike, genomike, proteomike, metabolomike, farmakogenomike, nutrigenetike i nutrigenomike. Monogenske bolesti imaju visok stupanj nasljeđivanja, dok za poligenske i multifaktorske bolesti kao što su metabolički poremećaji i kardiocerebrovaskularni događaji postoji genetička heterogenost. Predikcija i stratifikacija rizika ovih poremećaja ovisi o interakciji gena inflamacije, fibrinolize, dislipidemije, hiperglicemije, pretilosti, te prehrani. Molekularno genetičko istraživanje, ciljano liječenje i personalizirana prehrana u razvijenom svijetu potaknuto je od akademske zajednice, parlamenta i predsjednika s ciljem širenja spoznaje o ranim rizičnim biljezima, njihovoj interakciji, moderatorskom učinku i signalnim mrežama u sklopu koncepta precizne medicine. Za razumijevanje molekularne osnove bolesti potrebno je istražiti pojavnost genskih patogenih varijanti kako bi precizna dijagnoza omogućila ciljanu terapiju lijekovima, oligonukleotidima (neuroprotekcija) ili operativnim zahvatom u sklopu preventivne medicine i modificiranja tijeka bolesti (monogenски dijabetes, spinalna mišićna atrofija, multipla endokrina neoplazija). Rezultati analize genske i mitohondrijske DNA sekvenciranjem i hibridizacijskim tehnikama omogućuje utvrđivanje prevalencije kliničkih entiteta u pojedinim zemljama i pomaže uključivanju bolesnika u međunarodne registre. Translacijska istraživanja predhode

molekularno genetičkoj dijagnostici uključujući sekvenciranje gena za multiple endokrine neoplazije, nasljedne neuropatije, Wilsonovu bolest, imunodeficijencije i precizni dijabetes, a provode se u Kliničkom bolničkom centru Zagreb i Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Također se istražuju presimptomatski genski i biokemijski rizični čimbenici ranog razvoja ateroskleroze i cerebrovaskularne bolesti. Europske mreže EMQN (engl. *European Molecular Quality Network*), RfB (engl. *Reference Institute for Bioanalytics*), te *Instand* putem programa vanjske procjene kvalitete laboratorijske medicine harmoniziraju molekularnu dijagnostiku u Europskim zemljama uključujući točnost genotipizacije i interpretacije rezultata analize prema međunarodnim smjernicama i pravilima Društva za varijacije u humanom genomu, HGVS (engl. *Human Genome Variation Society*). Vanjska procjena kvalitete potiče na istraživanje, održava kvalitetu, slijedi nove trendove u analitici i dijagnostici, omogućuje povezivanje nacionalnih i EU registara bolesnika, te može unaprijediti i racionalizirati zdravstvenu skrb.

## MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA U HEMATOLOGIJI

### MOLECULAR DIAGNOSTICS IN HEMATOLOGY

Blaženka Grahovac

Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci

E-adresa: [blazenka.grahovac@medri.uniri.hr](mailto:blazenka.grahovac@medri.uniri.hr)

Kronična mijeloična leukemija (KML) je klonalna bolest matičnih krvotvornih stanica i prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) ubraja se u mijeloproliferativne zloćudne tumore . KML je prva humana neoplazija za koju je dokazana specifična stečena genetska lezija – recipročna t(9;22)(q34;q11) translokacija koja se prepoznaje kao skraćeni 22. kromosom nazvan Philadelphia (Ph) kromosome. U osnovi genetskog preuređenja je novonastali fuzijski gen *BCR-ABL1* koji kodira fuzijski onkoprotein s konstitutivno aktiviranom tirozin kinazom koja u citoplazmi fosforilira niz staničnih proteina uključenih u regulaciju proliferacije, blokiranja apoptoze, neučinkovitu adheziju i genomsku nestabilnost. Liječenje kronične mijeloične leukemije bitno je napredovalo tijekom posljednjeg desetljeća, uvođenjem prve generacija inhibitora tirozin kinaze (TKI) - imatinib mezilata u kliničku praksu 1998/2000. godine. Imatinib selektivno inhibira ABL1 kinazu i inducira hematološku i citogenetsku remisiju.

Već 2001. god. kod prvih imatinib-rezistentnih slučajeva, pokazano je kako točkaste mutacije u domeni kinaze *BCR-ABL1* fuzijskog gena mogu narušiti ili čak potpuno onemogućiti vezanje imatiniba. Ubrzo je postalo evidentno da oko 20-40% pacijenata koji su liječeni imatinibom u prvoj liniji, razvijaju rezistenciju na terapiju. Studije su pokazale da je rezistencija na imatinib koja se očitovala u gubitku hematološkog, citogenetskog i molekularnog terapijskog odgovora uzrokovana u oko 90% slučajeva mutacijama u ABL1 kinaznoj domeni i u oko 10% slučajeva amplifikacijom *BCR-ABL1* gena . Do danas je opisano više od 60 različitih mutacija u ABL1 kinaznoj domeni. Pokazano je da se ovisno o tipu aminokiseline koja je definirana određenom mutacijom, mijenja stupanj rezistencije/osjetljivosti na terapiju imatinibom. Ove spoznaje potaknule su razvoj novih TK inhibitora, od kojih su u kliničkoj primjeni dasatinib i nilotinib, tzv. TKI druge generacije, veće učinkovitost u inhibiciji proliferacije *BCR-ABL1* mutiranih



varijanti. Kliničko iskustvo u liječenju s dasatinibom i nilotinibom je pokazalo da puno uži spektar mutacija pokazuje neosjetljivost na te lijekove i da se te mutacije ne preklapaju. Izuzetak je mutacija T315I budući da izaziva rezistenciju (neosjetljivost) na sva tri lijeka i tada je terapijska opcija transplantacija hematopoetskih matičnih stanica.

Prema preporukama ekspertne grupe European Leukemia Net (ELN) iz 2011. metoda direktnog sekvenciranja je metoda izbora kojom se postiže osjetljivost detekcije mutacija prisutnih u 10 do 15 % Ph<sup>+</sup> stanica. Područje analize mutacija i njihovog kliničkog značaja je vrlo dinamično, posebno u svjetlu najnovijih tehničkih mogućnosti koje pružaju uređaji nove generacije sekvencera (NGS). Oni će vrlo brzo omogućiti tzv. „deep sequencing“, analize podižući osjetljivost detekcije mutacija u granično područje „deep molecular response“. Budućnost i studije koje su u tijeku, pokazat će relativno brzo značaj novih mogućnosti analize mutacija za kliničku praksu.

# FARMAKOGENOMIKA

## PHARMACOGENOMICS

Nada Božina  
Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu  
KBC Zagreb  
E-adresa: [nbozina@kbc-zagreb.hr](mailto:nbozina@kbc-zagreb.hr)

Koncept "Personalizirana medicina" je u posljednjih nekoliko godina značajno prisutan u medicinskoj praksi. S boljim razumijevanjem interindividualnih razlika na razini DNA sekvence, unaprijeđena je naša sposobnost povezivanja učinka nekog lijeka s određenim varijantama gena. Sve to je rezultiralo i većim fokusiranjem akademske zajednice, zdravstvenih profesionalaca, farmaceutske industrije te regulatornih tijela na istraživanja genetičke osnove varijabilnosti odgovora na farmakoterapiju. Da bi se ubrzao prijenos znanja iz područja farmakogenetike/farmakogenomike u kliničku praksu osnovana je mreža društava s glavnim ciljem donošenja preporuka i jasnih smjernica kako prilagoditi liječenje na osnovi rezultata farmakogenetičkih analiza.

U svrhu individualizacije terapije, postoje sve veći naponi za razvoj lijekova prikladnih za specifične subpopulacije bolesnika. Niz je primjera koji govore o prednostima individualiziranog pristupa u odabiru lijeka i doze u odnosu na pristup koji se temelji na rezultatima farmakokinetičkih studija na populacijskoj razini. Farmakogenomika predstavlja važnu kariku "personalizirane medicine" s naglaskom na genomske i epigenomske čimbenike koji utječu na farmakokinetiku i farmakodinamiku, a bitna je i u razumijevanju interakcija lijekova. Dok je naše znanje o epigenomici kao modulatoru učinkovitosti farmakoterapije još uvijek u razvojnoj fazi, velika količina znanja o utjecaju genomskih čimbenika već je dostupna. Smatra se da čimbenik genetičke varijabilnosti može doprinosti s udjelom od 25% - 50% u ukupnoj neočekivanoj reakciji na lijek. Može negativno utjecati na učinkovitost lijeka te povećati rizik razvoja nuspojava.

Genomski podaci su postali važni u procjeni djelotvornosti i sigurnosti lijeka i u regulatornom procesu njihovog odobrenja. Stoga se informacije o genomskim biljezima sve više uključuju u informacije o lijeku. Regulatorna tijela uvođenjem farmakogenomičkih informacija u Sažetke opisa svojstava lijeka (engl. *Summaries of product characteristics -SmPCs*) nastoje istaknuti ulogu i važnost genomskih varijabilnosti u farmakoterapiji. Također se navodi kojoj kategoriji te farmakogenetičke informacije pripadaju, tj. smatra li se testiranje obveznim, ima ulogu preporuke ili je informativnog karaktera.

Integriranje genomskih biomarkera u kliničke i druge studije, kao i podatci o metodologijama koje se koriste moraju slijediti određene principe koji uvažavaju i razmatraju utjecaj biomarkera na studiju i ishode analiza s intencijom maksimizacije koristi za pacijenta. Važan naglasak u asocijacijskim studijama je i na fenotipskim podacima koji trebaju udovoljiti međunarodnim standardiziranim kriterijima. Povezivanje farmakogenomike s farmakovigilancijom ima značajnu ulogu i u praćenju pojavnosti postmarketinških nuspojava. U izlaganju će biti prikazani i rezultati studije pod nazivom „Farmakogenomika i farmakovigilancija- sprječavanje nuspojava u individualizaciji terapije“ koja je provedena u suradnji Agencije za lijekove i medicinske proizvode s Kliničkim bolničkim centrom Zagreb i Medicinskim fakultetom Sveučilišta u Zagrebu.

# D VITAMIN U ZDRAVLJU I BOLESTI

## VITAMIN D - SIGNIFICANCE IN HEALTH AND DISEASE

Vesna Kušec

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb

E-adresa: [vkusec@kbc-zagreb.hr](mailto:vkusec@kbc-zagreb.hr)

Suvremena saznanja ukazuju na važnost D vitamina u organizmu nezavisno od metabolizma kalcija i kosti. Stvara se u koži iz preteča izlaganjem sunčevom svjetlu. Manje važan izvor su neke namirnice (masna riba, ulje riblje jetre, shi-take gljive). U jetri se sintetizira 25-OHD, važan za procjenu statusa D vitamina u organizmu, a u bubregu učinkom 1-hidroksilaze (CYP27B1) u biološki aktivan oblik 1,25-OH<sub>2</sub>D s osobitostima hormona. Inaktivacija u stanju dostatnosti se odvija učinkom 24,25-hidroksilaze (CYP24A1).

Receptori za D vitamin i enzimi sinteze 1,25-OH<sub>2</sub>D dokazani su u mnogim tkivima (kolon, dojka, makrofazi, prostata, koža) i staničnim linijama zloćudnih tkiva. Kompleks receptora za D vitamin i 1,25-OH<sub>2</sub>D ima dvije funkcije, vezanje na specifični dio DNA (VDRE) ili uključivanje koregulatornih sklopova za modulaciju gena. Procjenjuje se da 1,25-OH<sub>2</sub>D regulira više od 200 gena i 3% genoma.

Najbolje poznat učinak je aktivna apsorpcija kalcija i fosfora iz tankog crijeva, te poticaj lučenja PTH i razgradnju kosti s otpuštanjem kalcija.

Hipovitaminoza D je dokazana kod multiple skleroze, autoimunih bolesti, reumatoidnog artritisa, šećernoj bolesti (tip 1 i tip 2), Crohnovoj i Addisonovoj bolesti, autoimunoj bolesti štitnjače i ostalim. Pojavnost bolesti (primjerice multipla skleroza) se povezuje s geografskom širinom, količinom sunčevog svjetla i nedostatnom sintezom D vitamina u koži. Koncentracije 25-OH D se dovode u vezu sa smrtnošću od svih uzroka, ali ne uslijed određene bolesti. Hipovitaminoza D se smatra važnom u etiopatogenezi mnogih bolesti, a mehanizam djelovanja je samo djelomice razjašnjen. U zloćudnim stanjima 1,25-OH<sub>2</sub>D koči proliferaciju, potiče diferencijaciju i apoptozu, sprječava širenje i metastaziranje. U imunskom sustavu D vitamin potiče prirodenu imunost, a koči stečenu te upalotvorne citokine. U eksperimentalnih životinja 1,25-OH<sub>2</sub>D sprječava nastanak autoimunog encefalitisa i tiroiditisa, SLE, te upalnu bolest crijeva. Sinteza 1,25-OH<sub>2</sub>D u makrofazima potiče lučenje katelicidina koji uništava *Mycobacterium tuberculosis*. U metaboličkom sindromu hipovitaminoza D je povezana s neosjetljivošću na inzulin, poremećajem lučenja inzulina i slabom regulacijom glukoze.

Pojavnost hipovitaminoze D u mnogih stanjima za sada nema dokaze o biološkoj povezanosti u prospektivnim kliničkim istraživanjima i meta-analizama. Za primjenu D vitamina na populacijskoj razini za sprječavanje bolesti i smanjenja troškova zdravstva nema znanstvenih dokaza te je izvjesno da je hipovitaminoza posljedica bolesti.

## EPIGENETIKA U MEDICINI

## EPIGENETICS IN MEDICINE

Floriana Bulić-Jakuš

Zavod za medicinsku biologiju / CERRM Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

E-adresa: [floriana.bulic@mef.hr](mailto:floriana.bulic@mef.hr)

U suvremenoj medicini upravo se otvara važno područje dijagnostike i terapije bazirano na epigenetičkim istraživanjima. Epigenetika proučava mitotički ili mejotički nasljedne promjene genske ekspresije ili staničnog fenotipa uzrokovane mehanizmima koji ne zadiru u osnovnu sekvencu DNA (metilacija DNA, posttranslacijske modifikacije histona i RNA interferencija). Epigenetički mehanizmi posrednici su između mikro ili makrookoliša i organizma. Temeljem klasičnih i novijih istraživanja Zagrebačke embriološke škole posvećenih razvojnim procesima i eksperimentalnom teratokarcinomu te suvremenih istraživanja genoma i epigenoma nekih pedijatrijskih tumora, pretpostavlja se da epigenetička deregulacija leži u osnovi razvoja raka i prethodi brojnim mutacijama koje se pronalaze u individualnim tumorima. Feinberg i sur. su 2016. predložili novu klasifikaciju gena važnih za razvoj raka (epigenetički medijatori, modifikatori i modulatori) kao pomoć za dizajn novih dijagnostičkih i terapijskih strategija. Obrasci metilacije DNA često su poremećeni u brojnim bolestima i koreliraju s podtipovima bolesti, prognozom i odgovorom na terapiju. Kao biomarkeri u dijagnostici već se koriste jednoznačne DNA-metilacijske oznake koje su binarne, stabilnije od RNA, a otkrivaju se i u degradiranom materijalu i parafinskim blokovima. Nedavna kvantitativna usporedba relevantne analitike metilacijskih oznaka među suvremenim metodama ističe bisulfitno sekvenciranje amplikona i bisulfitno pirosekvenciranje (konzorcij *BLUEPRINT/IHEC*, 2016). Za terapiju različitih bolesti i humanih malignoma važna je činjenica da su epigenetičke oznake reverzibilne, pa se već koriste DNA-demetilacijska sredstva (npr. Vidaza) ili inhibitori histonskih deacetilaza (npr. Valproat) u terapiji malignih bolesti. U budućnosti predviđa se i upotreba ciljanog epigenetičkog editiranja genoma putem CRISP-cas9 sustava. Za napredak koji ide prema personaliziranoj i preciznoj medicini, potrebna su još mnoga preklinička i klinička istraživanja u području epigenetike koja će se dijelom provoditi na Zavodu za medicinsku biologiju/ CERRM-u Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

# GENSKO OBILJEŽAVANJE I PRAĆENJE DIFERENCIJACIJE LJUDSKIH KARDIOMIOCITA

## GENETIC MARKING AND DIFFERENTIATION MONITORING OF HUMAN CARDIOMYOCYTES

Filip Sedlić<sup>1</sup>, Ana Šepac<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra za patofiziologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

<sup>2</sup>Zavod za patologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

E-adresa: [filip.sedlic@mef.hr](mailto:filip.sedlic@mef.hr)

Srčano zatajivanje se ubraja među vodeće uzroke smrti u razvijenim zemljama. Obećavajući eksperimentalni pristupi uključuju poticanje regeneracije srca transplantiranim matičnim stanicama ili poticanje diobe i umnažanja postojećih kardiomiocita. Unatoč nedovoljno ohrabrujućim rezultatima pojedinih kliničkih studija, prvenstveno baziranih na terapiji matičnim stanicama, znanstveno-klinički interes za razvijanjem i poboljšanjem ovakvih potencijalnih terapijskih pristupa ne jenjava. Naš rad uključuje izradu i primjenu genskih biljega za obilježavanje i praćenje živih kardiomiocita diferenciranih iz matičnih stanica, te istraživanje genskih biljega koji omogućuju promatranje napredovanja kardiomiogene diferencijacije.

Usmjerena, *in vitro* kardiomiogena diferencijacija pluripotentnih matičnih stanica je postignuta primjenom kombinacije čimbenika rasta, aktivina A (50 ng/ml) i koštanog morfogenetskog proteina-4 (10 ng/ml) u RPMI/B27 staničnom mediju. Pojava sveobuhvatnih područja spontanih i ritmičnih kontrakcija upućivala je na nazočnost diferenciranih kardiomiocita, što je potvrđeno različitim metodama detekcije izražaja gena i elektrofiziološkim metodama.

Praćenje živih kardiomiocita nakon *in vitro* diferencijacije omogućila nam je izrada lentivirusnog vektora koji je posredovao prijenos reporterskog gena za *pojačani zeleni fluorescentni protein* koji je bio pod transkripcijskom kontrolom promotora gena *lakog lanca miozina-2v*. Vektor je proizveden podkloniranjem reporterskog konstrukta u lentivirusni transfer plazmid *pHR(+).c.Ub.MCSoligo.R(-)W(+)*. Primjenom ovog načina označavanja kardiomiocita potvrđena je visoka učinkovitost kardiomiogene diferencijacije, koja iznosi 65-85%, ovisno o staničnoj liniji, uz učinkovitost transdukcije od 98%.

Sam tijekom *in vitro* diferencijacije različitih pluripotentnih staničnih linija je praćen uz pomoć kvantitativnog PCR-a, pri čemu je određivan izražaj skupa gena karakterističnih za pojedine stadije kardiomiogeneze, i to: OCT4 (genski biljeg pluripotentnosti), *brachyury* (T; biljeg mezendoderma), MESP1, NKX2.5 i ISL1 (biljezi rane faze indukcije kardiomiogeneze), GATA4, MEF2C, TNNT2 i MYL7 (biljezi kasne faze diferencijacije) te HCN4, SCN5A, CACNA1C, KCNH2, KCNJ2 i KCND3 (ionski kanali u kardiomiocitima). Analizom je utvrđeno da se vremenski obrazac izražaja ovih genskih biljega podudara s pojedinim fazama kardiomiogene diferencijacije.

U zaključku, primjena ovih pristupa genskog obilježavanja kardiomiocita predstavlja platformu za razvoj znanstveno-dijagnostičkih pomagala uz pomoć kojih bi se mogla pratiti terapijska regeneracija srca koju bismo mogli očekivati u budućnosti.



**PRIMJENA TEHNIKA GENETIČKOG INŽENJERSTVA U  
INDUSTRIJSKOJ BIOTEHNOLOGIJI - DVA PRIMJERA  
POVEZANOST STRUKTURE I FUNKCIJE OKSIDAZE D-  
AMINOKISELINA I FIZIOLOGIJA BAKTERIJE *LACTOBACILLUS*  
*AMYLOVORUS* DSM 20531<sup>T</sup>**

**IMPLEMENTATION OF GENETIC ENGINEERING TECHNIQUES IN  
INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY - TWO EXAMPLES: STRUCTURE-  
FUNCTION RELATIONSHIP IN D-AMINO ACID OXIDASE AND  
PHYSIOLOGY OF BACTERIUM *LACTOBACILLUS* *AMYLOVORUS*  
DSM 20531<sup>T</sup>**

Anita Slavica<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

<sup>2</sup>Hrvatsko društvo za biotehnologiju

E-adresa: [aslavica@pbf.hr](mailto:aslavica@pbf.hr)

Biotehnologija pripada ključnim tehnologijama održivog razvoja i rastuće bio-ekonomije u Europskoj uniji. Osim proizvodnje hrane, lijekova, kemikalija, materijala, transportnih goriva i novih proizvoda i usluga, industrijska biotehnologija osigurava neovisnost europske bio-ekonomije u smislu proizvodnje dovoljnih količina tradicionalnih sirovina i povećanja spektra obnovljivih sirovina, zatim otvara milijune novih radnih mjesta, prihoduje desetke milijardi eura dodane vrijednosti i značajno doprinosi dugotrajnoj održivosti kvalitete života Europljana. Pri tome se velika pozornost posvećuje multidisciplinarnom obrazovanju i istraživanju, potiče inovativnost i primjena stečenih znanja i vještina u sinergiji akademske zajednice, malih i srednjih tvrtki, industrije i lokalnih i nacionalnih tijela uprave.

Tehnike genetičkog inženjerstva dio su spektra nešto jednostavnijih i kompleksnijih tzv. hibridnih metoda i postupaka kojima se, između ostalog, pokušava poboljšati funkcija i stabilnost različitih biokatalizatora i istražiti fiziologija višestruko primjenjivih industrijskih mikroorganizama.

Okidaza D-aminokiselina, koju proizvodi kvasac *Trigonopsis variabilis*, koristi se u industrijskoj proizvodnji cefalosporinskih antibiotika. U reakciji koju katalizira ovaj enzim molekularni kisik se koristi kao akceptor elektrona i tako se proizvodi vodikov peroksid. Kisik i vodikov peroksid oksidiraju oksidazu D-aminokiselina i zbog toga se mijenja struktura ali i aktivnost i stabilnost ovog industrijskog biokatalizatora. Primjenom cijelog niza metoda utvrđeno je da se tijekom opisane reakcije oksidaza D-amino kiselina oksidira i to da se cistein (-SH)-108 prevodi u cistein (-SO<sub>3</sub>H)-108. Uvođenjem točkastih mutacija potvrđeni su prethodni rezultati i povećana stabilnost ovog enzima u uvjetima farmaceutske industrijske proizvodnje. Nositelj prava intelektualnog vlasništva odobrio je objavu rezultata ovih istraživanja.

Bakterija *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> pripada grupi potencijalnih industrijskih mikroorganizama čiji je metabolički kapacitet slabo istražen, pa još nije primijenjen u industrijskoj biotehnologiji. Ovaj soj neistraženih osnovnih fizioloških karakteristika ima hidrolitičku (amilolitičku i proteolitičku) aktivnost i može koristiti različite supstrate, a od posebne važnosti su pentoze i polimerni supstrati. *L. amylovorus* DSM 20531<sup>T</sup> proizvodi D- i L-mliječnu kiselinu, važne industrijske kemikalije koje su i tzv. platformske molekule iz kojih se već proizvode brojne druge kemikalije, zelena otapala i biorazgradljivi polimeri. Istražuje se i proizvodnja amilaze, vrlo važnog industrijskog enzima, s pomoću ovog soja. Tehnike genetičkog inženjerstva se koriste u istraživanju: (i) transportnih sustava za različite supstrate, (ii) regulacije metaboličkih puteva ugljikohidrata i aminokiselina, i (iii) proizvodnje amilaze. Dio rezultata zaštićen je patentom.