

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Marina Z. Anđelković

**GENOMSKI PROFIL PACIJENATA DEČIJEG
UZRASTA SA PRIMARNOM CILIJARNOM
DISKINEZIJOM: KORELACIJA GENOTIPA I
FENOTIPA I FUNKCIONALNA
KARAKTERIZACIJA NOVIH GENETIČKIH
VARIJANTI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Marina Z. Andjelkovic

**GENOMIC PROFILING OF PEDIATRIC PATIENTS
WITH PRIMARY CILIARY DYSKINESIA:
GENOTYPE- PHENOTYPE CORRELATION AND
FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF NOVEL
GENETIC VARIANTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

MENTORI:

dr Vesna Spasovski, naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

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

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Vesna Spasovski, naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

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

Prof. dr Svetlana Radović, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Goran Brajušković, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Predrag Minić, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____2019. godine

Genomski profil pacijenata dečijeg uzrasta sa primarnom cilijarnom diskinezijom: korelacija genotipa i fenotipa i funkcionalna karakterizacija novih genetičkih varijanti

Rezime

Primarna cilijarna diskinezija (PCD) predstavlja retku bolest koja se nasleđuje na autozomno recesivan način ili je nasleđivanje vezano za hromozom X, i predominantno utiče na funkcionisanje pluća, reproduktivnih organa i na lateralnost unutrašnjih organa. PCD je klinički i genetički veoma heterogen poremećaj koji se javlja odmah po rođenju, a karakteriše se promenama na motornim cilijama koje su posledica patogenih varijanti u genima koji kodiraju za proteine koji su neophodni za pravilnu strukturu i funkciju ovih organela. Do sada je opisano 38 gena uzročnika bolesti koje su odgovorne za nastanak PCD-a, a smatra se da je taj broj mnogo veći s obzirom da 2500 proteina učestvuje u izgradnji i pravilnom funkcionisanju cilija. Velika raznolikost kliničke slike PCD pacijenata često dovodi do odloženog uspostavljanja precizne dijagnoze ove bolesti, a nije retkost i da pacijenti sa drugim bolestima pluća budu okarakterisani kao PCD pacijenti. Genetički profil ove bolesti kod pacijenata sa teritorije Srbije do sada nije utvrđen, pa je identifikacija gena uzročnika neophodna. Stoga je u okviru ove teze urađeno genomsko profilisanje pacijenata sa primarnom cilijarnom diskinezijom u cilju razvoja genetičkog algoritma koji bi, osim opisanih patogenih genetičkih varijanti i gena uzročnika, obuhvatio i novootkrivene varijante u kodirajućim regionima gena uzročnika PCD-a i gena kandidata za PCD. Sve ovo omogućava razvoj strategije za diferencijalnu dijagnozu PCD-a i drugih bolesti pluća suspektnih na ciliopatije koji se klinički manifestuju kao PCD. Takođe, pristupljeno je funkcionalnoj karakterizaciji novootkrivenih patogenih varijanti u već poznatim genima koji su odgovorni za razvoj PCD-a i/ili u genima koji do sada nisu asocirani sa PCD-om, a koji bi mogli da dovedu do karakterističnog fenotipa kod pacijenta.

Jedna od glavnih odlika PCD pacijenata je strukturna i/ili funkcionalna promena na cilijama, pa su one nepokretne, slabo pokretne, promenjen im je obrazac kretanja ili odsustvuju. Promene u cilijarnoj pokretljivosti mogu dovesti do promena u transportu

mukusa što ukazuje na to da su mehanizmi koji regulišu frekvenciju kretanja cilija odgovorni za regulaciju mukocilijarnog transporta. U cilju ispitivanja frekvencije kretanja cilija kao i tretmana različitim malim molekulima koji bi mogli da dovedu do prolaznog ili trajnog ubrzavanja kretanja cilija, pristupljeno je optimizaciji kultivacije ćelijske linije A549 radi diferencijacije u cilijarnu ćelijsku liniju, koji bi predstavljao novi model-sistem za praćenja markera ciliogeneze i testiranja molekula cikličnog adenzin monofosfata (cAMP), kao potencijalnog terapijskog agensa.

Analiza genetičke osnove bolesti kod 21. pacijenta suspektnog na PCD, urađena je metodom sekvenciranja nove generacije na platformi sa 4813 gena uzročnika različitih kliničkih fenotipova. Detektovane su patogene genetičke varijante u šest gena uzročnika PCD-a (*CCDC40*, *DNAI1*, *DNALI1*, *DNAH5*, *DNAH11* i *LRRC6*) i dva nova gena kandidata za PCD (*SPAG16* i *SPAG17*), od 29 analiziranih gena, i uspostavljena je dijagnoza PCD-a kod 52.38% pacijenata. U okviru ove studije ukupno je identifikovano 12 novih, do sada neopisanih varijanti u genima uzročnicima i genima kandidatima za PCD. Urađena je i molekularna karakterizacija jedne novootkrivene homozigotne varijante c.947_948insG, p.Thr318TyrfsTer11, detektovane u genu *DNAI1*, koja je obuhvatila *in vitro* analizu sekvence DNK, profila ekspresije iRNK i imunodetekciju proteina, kao i *in silico* analizu molekula RNK i proteina.

Kako bi se objasnila genetička osnova bolesti kod 47.62% nerazjašnjenih pacijenata, dizajnirana je strategija za diferencijalnu dijagnozu PCD pacijenata i pacijenata sa drugim pedijatrijskim plućnim bolestima koji imaju istu kliničku prezentaciju PCD-a. Strategija je pored 29 gena relevantnih za PCD obuhvatila još 45 gena koji su asocirani sa individualnim simptomima PCD-a, kao što su bronhiektazije, atopična astma, sinuzitis i neonatalni respiratorni distres, kao i 19 gena odgovornih za senzorne ciliopatije. Finalno, strategija je obuhvatila analizu 93 gena, a patogene genetičke varijante su detektovane u sledećim genima: *ABCA3*, *CFTR*, *MUC2*, *SCNN1A* i *SLC26A9*. Ukupno je detektovano 6 patogenih genetičkih varijanti, od kojih je 5 (83.33%) novootkriveno u našoj studiji. Ovi geni odgovorni su za razvoj izolovanih bronhiektazija, neonatalnog respiratornog distres sindroma i atopične astme. Korišćenjem navedene strategije, stopa detektovanih mutacija dostigla je 95.23% (20/21 pacijenata), dok stopa uspostavljenih dijagnoza iznosi 80.95% (17/21 pacijenata).

Kako je ovo prva studija koja izučava proces ciliogeneze na adenokarcinomskoj humanoj alveolarnoj bazalnoj epitelnoj ćelijskoj liniji A549, bilo je neophodno uspostaviti optimalne uslove za njenu kultivaciju u dvofaznom sistemu, na *transwell* filter membranama, i utvrditi koliko je vremena potrebno za proces ciliogeneze. Optimizacija kultivacije ćelijske linije A549 obuhvatila je određivanje optimalne gustine ćelija zasejanih na *transwell* filter membranama, optimizaciju vremena potrebnog za adherenciju za invertovane *transwell* inserte i procenu dostignute konfluentnosti. Utvrđeni su uslovi za propagaciju ove ćelijske linije na *transwell* membranama u cilju diferencijacije u motorne cilijarne ćelije. Nakon 15 dana kultivacije ćelija na *transwell* filter membranama pod optimalnim uslovima, procenjen je tok procesa ciliogeneze u ovim ćelijama.

U cilju utvrđivanja faze ciliogeneze u kojoj se ćelijska linija A549 nalazi, analizirani su ekspresioni profili markera ciliogeneze *RFX3*, *FOXJ1*, *CCNO*, *MCIDAS*, *GEMCI* i *NOTCH1* i upoređeni sa ekspresionim profilama istih markera ciliogeneze dobijenih na drugim ćelijskim linijama. Ovi rezultati su iskorišćeni za procenu stadijuma ciliogeneze u ćelijskoj liniji A549 i faze u kojoj se ove ćelije nalaze u različitim vremenskim tačkama za vreme gajenja u dvofaznom sistemu. Analizirani markeri ciliogeneze ukazuju na započet proces diferencijacije ćelijske linije A549 u cilijarnu ćelijsku liniju, ali je potrebno dodatno optimizovati dužinu kultivacije ove ćelijske linije u dvofaznog sistemu.

Tretman ćelijske linije A549 molekulom cAMP podrazumevao je optimizaciju načina unosa malog molekula, doze primenjenog molekula i dužine trajanja tretmana. Nakon optimizacije tretmana, analizan je uticaj primenjenog cAMP na aktivaciju protein kinaze A (PKA) i nishodnu fosforilaciju serina celokupnih proteina izolovanih iz ćelijske linije A549. Dobijeni rezultati su pokazali da je stepen fosforilacije serina u svim tretiranim uzorcima bio veći u odnosu na netretirani uzorak, čime je potvrđen ulazak molekula u ćeliju i aktivacija PKA. Uočena fosforilacija sugerise na potencijalnu ulogu ovog molekula u stimulisanoj brzini kretanja cilija. Ali, kako je detektovana fosforilacija tranzijentna, neophodni su dodatni eksperimenti kako bi se utvrdio tačan uticaj ovog molekula na brzinu kretanja cilija u multicilijarnoj ćelijskoj liniji.

Poslednjih godina, razumevanje genetičke osnove primarne cilijarne diskinezije je uznapredovalo i pokazano je da je velika klinička heterogenost ove bolesti zapravo rezultat velike heterogenosti genetičke osnove ove bolesti. Genomsko profilisanje pacijenata suspektih na PCD sa teritorije Srbije, obuhvaćenih ovom studijom, dovelo je do bržeg i preciznijeg uspostavljanja dijagnoze ove bolesti, ali je takođe omogućilo dizajniranje strategije za uspostavljanje dijagnoze drugih retkih plućnih bolesti kod pacijenata sa kliničkom prezentacijom PCD-a. Ova studija je obuhvatila i izučavanje procesa ciliogeneze u ćelijskoj liniji A549 u cilju diferencijacije bazalne plućne ćelijske linije u cilijarnu ćelijsku liniju, koja će poslužiti kao model sistem za izučavanje ove bolesti. Osim toga, rezultati ove studije su ukazali da egzogena primena cAMP aktivira signalni put PKA i povećava stepen fosforilacije nishodnih proteina u bazalnoj plućnoj ćelijskoj liniji, a u narednim eksperimentima će se utvrditi njegov uticaj na brzinu kretanja cilija i njegov terapijski potencijal.

Ključne reči: PCD, pedijatrijske bolesti pluća, sekvenciranje nove generacije, dizajniranje strategije za genetičku analizu, novootkrivene genetičke varijante, markeri ciliogeneze, molekul cAMP, fosforilacija PKA

Naučna oblast: Molekularna biologija eukariota

Uža naučna oblast: Molekularna genetika

UDK broj [547.963.3+577.337]:[616-056.7:616.24]

Genomic profiling of pediatric patients with primary ciliary dyskinesia: genotype- phenotype correlation and functional characterization of novel genetic variants

ABSTRACT

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare disease that is inherited in autosomal recessive manner or the inheritance is X-linked, and predominantly affects the functioning of the lungs, reproductive organs and the laterality of the internal organs. PCD is clinically and genetically very heterogeneous disorder that occurs immediately after birth, and is characterized by alterations in motor cilia due to pathogenic variants in genes encoding proteins that are necessary for the proper structure and function of these organelles. So far, there have been described 38 PCD-causative genes, and this number is considered to be much higher given that 2500 proteins participate in the formation and functioning of the cilia. Clinical heterogeneity of PCD patients often leads to the delayed establishment of a precise diagnosis of the disease, and it is not unusual that patients with other lung diseases are classified as PCD patients. The genetic background of the disease in patients with Serbian descent has not been established so far, so the mutational profile involved in the pathogenesis of PCD is necessary. Therefore, within this thesis, genomic profiling of patients with primary ciliary dyskinesia was performed in order to develop a genetic algorithm that, in addition to the described disease-causing pathogenic genetic variants and genes, would include novel variants in the coding regions of PCD-causative and candidate genes. This approach allows the establishment of a strategy for the differential diagnosis of PCD and other lung diseases suspected to ciliopathies that are clinically manifested as PCD. Functional characterization of a novel potentially pathogenic variant in PCD disease-causing genes and genes that have not been associated with PCD so far, but could be associated with the characteristic phenotype of PCD, was performed.

One of the main features of PCD is ultrastructural defects of cilia leading to ciliary immotility, abnormal motility, or their absence. Alterations in ciliary motility can lead to changes in the transport of mucus, which indicates that the mechanisms that regulate the

ciliary beat frequency are responsible for the regulation of mucociliary transport. In order to establish a novel model system for the analysis of PCD features, optimization of the differentiation of A549 cell line into ciliary cell line was performed. In addition, the cell line was treated with small molecule, cyclic adenosine monophosphate (cAMP), in order to examine its therapeutic potential.

Genetic profiling of 21 patients suspected to PCD, was performed using next generation sequencing technology and panel with 4813 genes associated with numerous pathological conditions. Analysis of obtained results revealed pathogenic genetic variants in six of twenty-nine PCD disease-causing genes (*CCDC40*, *DNAI1*, *DNALI1*, *DNAH5*, *DNAH11* and *LRRC6*), and pointed two possible novel PCD candidate genes (*SPAG16* and *SPAG17*). The PCD diagnosis was established in 52.38% of patients. Within this study, a total of twelve novel, uncharacterized variants in PCD-causing and candidate genes, have been identified. Molecular characterization of a newly discovered homozygous variant c.947_948insG, p.Thr318TyrfsTer11, within the *DNAI1* gene was performed, and included an *in vitro* analysis of the DNA sequence, the expression profile of mRNA and protein immunodetection, as well as *in silico* analysis of the RNA molecule and the protein.

In order to explain the genetic basis of the disease in 47.62% of unexplained patients, a strategy was developed for the differential diagnosis of PCD patients and patients with other pediatric lung diseases that share the same clinical presentation of PCD. The designed strategy included, in addition to the 29 PCD-related genes, another 45 genes associated with individual symptoms of PCD, such as bronchiectasis, atopic asthma, sinusitis, and neonatal respiratory distress, as well as 19 genes responsible for sensory ciliopathies. Finally, the strategy included 93 genes, and pathogenic genetic variants were detected in the following genes: *ABCA3*, *CFTR*, *MUC2*, *SCNNIA*, and *SLC26A9*. In total, 6 pathogenic genetic variants were detected, of which 5 (83.33%) were found the first time in our study. These genes are responsible for the development of isolated bronchiectasis, neonatal respiratory distress syndrome, and atopic asthma. Using this strategy, the rate of detected mutations reached 95.23% (20/21 patients), while the rate of established diagnosis was 80.95% (17/21 patients).

This is the first study which investigates the process of ciliogenesis on the adenocarcinoma human alveolar basal epithelial cell line A549. For that purpose it was

necessary to establish the optimal conditions for cultivation of the cells in the two-phase system using transwell filter membranes, and determination of the time required for the ciliogenesis process. The optimization of A549 cell line cultivation also included assessment of the optimal cell density planted on the transwell filter membranes, the adequate time required for adherence to the inverted transwell insert, and assessing the achieved confluence. After 15 days of cell culture on transwell filter membranes under optimal conditions, the course of the ciliogenesis in these cells was estimated by analysis of expression of the genes relevant for ciliogenesis.

In order to determine the phase of ciliogenesis in which the cell line A549 is, the expression profiles of the ciliogenesis markers *RFX3*, *FOXJ1*, *CCNO*, *MCIDAS*, *GEMC1*, and *NOTCH1* were analyzed, and compared with the expression profiles of the same ciliogenesis markers obtained on other cell lines. These results were used to evaluate the stage of the ciliogenesis in the cell line A549, and the phase in which these cells are at different time points during cultivation in the two-phase system. Analyzed ciliogenesis markers indicate that the process of differentiation of the A549 cell line in the ciliary cell line was initiated, but further optimization of the duration of cultivation of this cell line in the two-phase system is necessary.

The treatment of the A549 cell line with a molecule of cAMP included optimization of the application of the molecule, the dose of the applied molecule, and the duration of treatment. Following optimization, the effect of applied cAMP on the activation of protein kinase A (PKA) and consequent phosphorylation of serine in the whole isolate of proteins from the cell line A549, was analyzed. The obtained results showed that the amount of serine phosphorylation in all treated samples was higher than the untreated sample, which confirmed the entry of the molecule into the cell and subsequent activation of the PKA. The observed phosphorylation suggests the potential role of this molecule in stimulating ciliary beat frequency. But, as detected phosphorylation was transient, additional experiments are needed to determine the exact influence of this molecule on the ciliary beat frequency in the multicillary cell line.

In the recent years, understanding of the genetic basis of primary ciliary dyskinesia has been upgraded and it has been shown that the high clinical heterogeneity of the disease is actually result of its genetic heterogeneity. The genomic profiling of patients suspected to have PCD, included in this study, led to faster and more precise

diagnosis of the disease, but also enabled the design of a strategy for establishing the diagnosis of other rare lung diseases in patients with overlapping clinical presentation. This study included the analysis of the ciliogenesis process in the A549 cell line in order to differentiate the basal lung cell line into a ciliary cell line, which will serve as a model system for the study of this disease. In addition, the results of this study have indicated that exogenous application of cAMP activates the PKA signaling pathway and increases the amount of phosphorylation of downstream proteins in the basal pulmonary cell line, and in subsequent experiments, it will be determined its effect on the ciliary beat frequency and its therapeutic potential.

Keywords: PCD, pediatric lung disease, NGS, design of strategy for genomic analysis, novel mutations, ciliogenesis markers, molecule cAMP, phosphorylation of PKA

Research area: Molecular biology of eukaryotes

Area of special interest: Molecular genetics

UDK number [547.963.3+577.337]:[616-056.7:616.24]

LISTA SKRAĆENICA:

AC- adenil ciklaza

ACMG- američki koledž za medicinsku genetiku i genomiku

ALI sistem- dvofazni, tečno-vazdušni sistem

AMP- udruženje za molekularnu patologiju

ATP- adenzin trifosfat

cAMP- ciklični adenzin monofosfat

CBF- frekvencija kretanja cilija

CBP- obrazac kretanja cilija

CF- cistična fibroza

CP- centralni par

DC- proteini za asembliranje ODA

ECL- hemiluminescentni detekcioni sistem

Hh- hedžhog signalni put

IC- intermedijarni lanci

IDA- unutrašnje dineinske ručice

IFT- intraflagelarni transport

LC- lakih lanaca

MCC- multicilijarne ćelije

MT- mikrotubularnih dubleta

MTBD- vezivni domen za mikrotubule

N-DRC- neksinsko-dineinski regulatorni kompleksi

NGS- sekvenciranje nove generacije

nNO- nazalni azot oksid

ODA- spoljašnje dineinske ručice

PCD- primarna cilijarna diskinezija

PCR- reakcija lančanog umnožavanja

PKA- protein kinaza A

PPI- interakcije protein-protein

qPCR- PCR u realnom vremenu

RS- radijalne strukture

RT-qPCR- PCR u realnom vremenu kome prethodi reverzna transkripcija

SBS- tehnologija sekvenciranja sintezom

SDS-PAGE- SDS poliakriamidna gel elektroforeza

SECIS- inserciona sekvenca selenocisteina

SNVs- pojedinačne nukleotidne varijante

TEM- transmisiona elektronska mikroskopija

TES- targetovano sekvenciranje obogaćivanjem

Wb- Western blot

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. BIOGENEZA I GRAĐA CILIJA	2
1.1.1. Podela cilija kod kičmenjaka prema strukturi i funkciji.....	4
1.1.2. Kretanje cilija i transport unutar njih.....	5
1.1.2.1. Mikrotubularni motorni proteini	6
1.2. CILIOPATIJE KAO POSLEDICA CILIJARNIH ALTERACIJA.....	7
1.2.1. Primarne (senzorne) ciliopatije	8
1.2.2. Motorne ciliopatije	8
1.3. PRIMARNA CILIJARNA DISKINEZIJA.....	9
1.3.1. Istorijat	10
1.3.2. Klinička prezentacija bolesti kod PCD pacijenata	11
1.3.2.1. Slična klinička manifestacija senzornih i motornih ciliopatija.....	12
1.3.2.2. Slična klinička manifestacija ciliopatija i drugih pedijatrijskih plućnih bolesti. 12	
1.3.3. Dijagnostički testovi.....	13
1.4. GENI UZROČNICI PCD.....	15
1.4.1. Geni koji kodiraju proteine spoljašnjih i unutrašnjih dineinskih ručica (ODA i IDA)	16
1.4.2. Geni koji kodiraju komponente radijalnih struktura (RS).....	18
1.4.3. Geni koji kodiraju za proteine regulatornog kompleksa neksin-dinein (N-DRC).....	19
1.4.4. Geni odgovorni za promene u cilijarnom kretanju sa nepromenjenom ultrastrukturom	20
1.5. GENI ODGOVORNI ZA PROCES CILIOGENEZE I FORMIRANJE MULTICILIJARNIH ČELIJA.....	20
1.5.1. Gen <i>RFX</i> i njegova uloga u multiciliogenezi	21
1.5.2. Gen <i>FOXJ1</i> i regulacija ciliogeneze pokretnih cilija	21
1.5.3. Gen <i>CCNO</i> i smanjenje broja cilija	22
1.5.4. Proteinski produkt gena <i>MCIDAS</i> kao ključni uzvodni regulator ciliogeneze	23
1.5.5. Gen <i>GEMC1</i> i diferencijacija multicilijarnih ćelija.....	24
1.5.6. Gen <i>NOTCH1</i> i diferencijacija bazalnih plućnih ćelija	24
1.6. CIKLIČNI ADENOZIN MONOFOSFAT I CILIJARNA AKTIVNOST	25
2. CILJEVI	27
3. MATERIJAL I METODE	30
3.1. ISPITANICI	31
3.2. ČELIJSKE LINIJE	32
3.3. METODE ZA GENOMSKO PROFILISANJE PACIJENATA	32

3.3.1. Izolacija molekula DNK iz periferne krvi i njegova kvantifikacija	32
3.3.2. Sekvenciranje nove generacije	33
3.3.2.1. <i>TruSight One</i> protokol za pripremu biblioteke.....	33
3.3.2.2. Targetovano NGS sekvenciranje.....	35
3.3.2.3. Analiza podataka	35
3.4. VERIFIKACIJA DETEKTOVANIH VARIJANTI.....	39
3.4.1. Prajmer sekvence.....	39
3.4.2. Lančana reakcija polimerizacije	41
3.4.3. Analiza produkata PCR reakcije na agaroznom gelu	42
3.4.4. Sekvenciranje fragmenata molekula dnk.....	42
3.5. METODE ZA FUNKCIONALNU KARAKTERIZACIJU NOVOOTKRIVENIH VARIJANTI.....	44
3.5.1. Metode korišćene za analizu ekspersionih profila ciljnih gena	44
3.5.1.1. Izolacija molekula RNK iz mononuklearnih ćelija	44
3.5.1.2. Kvantifikacija molekula RNK.....	45
3.5.1.3. Reverzna transkripcija.....	45
3.5.1.4. PCR u realnom vremenu (qRT-PCR).....	46
3.5.1.5. Apsolutna i relativna kvantifikacija gena <i>DNAIL</i>	47
3.6. METODE KORIŠĆENE ZA ANALIZU PROTEINA	48
3.6.1. Izolacija i merenje koncentracije proteina.....	48
3.6.2. SDS-PAGE.....	49
3.6.3. Western blot metoda.....	49
3.6.4. Programi za <i>in silico</i> karakterizaciju novootkrivene varijante	51
3.6.4.1. Modelovanje tercijarne strukture proteina <i>DNAIL</i>	51
3.6.4.2. <i>In silico</i> translacija proteina <i>DNAIL</i>	52
3.6.4.3. Analiza evolucione konzerviranosti regiona proteina <i>DNAIL</i> sa novootkrivenom varijantom.....	52
3.6.4.4. Analiza sekundarnih RNK struktura	53
3.7. USPOSTAVLJANJE MODEL SISTEMA ZA TESTIRANJE MALIH MOLEKULA ..	54
3.7.1. Metode korišćene za diferencijaciju bazalne ćelijske linije A549 u cilijarnu ćelijsku liniju	54
3.7.1.1. Kultivacija ćelijske linije A549 na <i>transwell</i> filterima.....	55
3.7.1.2. Analiza profila ekspresije markera za ciliogenezu	56
3.8. OPTIMIZACIJA APLIKACIJE MOLEKULA cAMP I IMUNODETEKCIJA FOSFORILISANIH PROTEINA.....	57
3.8.1 Metode za permeabilizaciju ćelijske membrane.....	58
3.8.2. Tretman ćelijske linije A549 molekulom cAMP.....	58

3.8.3. Detekcija fosforilisanih proteina	59
4. REZULTATI	60
4.1. GENOMSKO PROFILISANJE PACIJENATA SUSPEKTIH NA PCD U SRBIJI	61
4.1.1. Demografski i klinički opis ispitanika uključenih u studiju	61
4.1.2. Determinacija genetičke osnove PCD pacijenata u srbiji.....	62
4.1.2.1. Varijante detektovane u genima uzročnicima i genima kandidatima za PCD....	64
4.1.3. Verifikacija patogenih genetičkih varijanti i segregaciona analiza	71
4.2. IDENTIFIKACIJA MUTACIONOG PROFILA PACIJENATA KOD KOJIH NISU DETEKTOVANE VARIJANTE U GENIMA RELEVANTNIM ZA PCD.....	74
4.2.1. Varijante detektovane u genima odgovornim za pojedinačne simptome PCD	76
4.3. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVE VARIJANTE c.947_948insG, p.Thr318TyrfsTer11 U KODIRAJUĆEM REGIONU GENA <i>DNAI1</i>	79
4.3.1. Analiza ekspresionog profila i imunodetekcija proteina <i>DNAI1</i>	79
4.3.1.1 qRT-PCR.....	79
4.3.1.2. SDS-PAGE.....	80
4.3.1.3. Western blot	81
4.3.2. <i>In silico</i> analiza varijante c.947_948insG, p.Thr318TyrfsTer11 <i>DNAI1</i>	82
4.3.2.1. Modelovanje tercijarne strukture proteina <i>DNAI1</i>	82
4.3.2.2. Interakcije protein-protein i evoluciona konzerviranost regiona od interesa proteina <i>DNAI1</i>	83
4.3.2.3. <i>In silico</i> translacija proteina <i>DNAI1</i>	85
4.3.2.4. Analiza sekundarne RNK strukture regiona od interesa gena <i>DNAI1</i>	86
4.4. DIFERENCIJACIJA BAZALNE ĆELIJSKE LINIJE A549 U CILIJARNU ĆELIJSKU LINIJU I EKSPRESIONI PROFILI MARKERA CILIOGENEZE	88
4.4.1. Kultivacija ćelijske linije a549 na <i>transwell</i> filter membranama	88
4.4.2.1. Relativna ekspresija gena <i>RFX3</i>	89
4.4.2.2. Relativna ekspresija gena <i>FOXJ1</i>	90
4.4.2.3. Relativna ekspresija gena <i>CCNO</i>	90
4.4.2.4. Relativna ekspresija gena <i>MCIDAS</i>	92
4.4.2.5. Relativna ekspresija gena <i>GEMC1</i>	92
4.4.2.6. Relativna ekspresija gena <i>NOTCH1</i>	93
4.5. OPTIMIZACIJA TRETMANA ĆELIJSKE LINIJE A549 CIKLIČNIM ADENOZIN MONOFOSFATOM I IMUNODETEKCIJA FOSFORILISANIH SERINA	94
5. DISKUSIJA	95
5.1. PRIMARNA CILIJARNA DISKINEZIJA – OPŠTE KARAKTERISTIKE.....	96
5.1.1. Opšte karakteristike analizirane grupe pacijenata	97

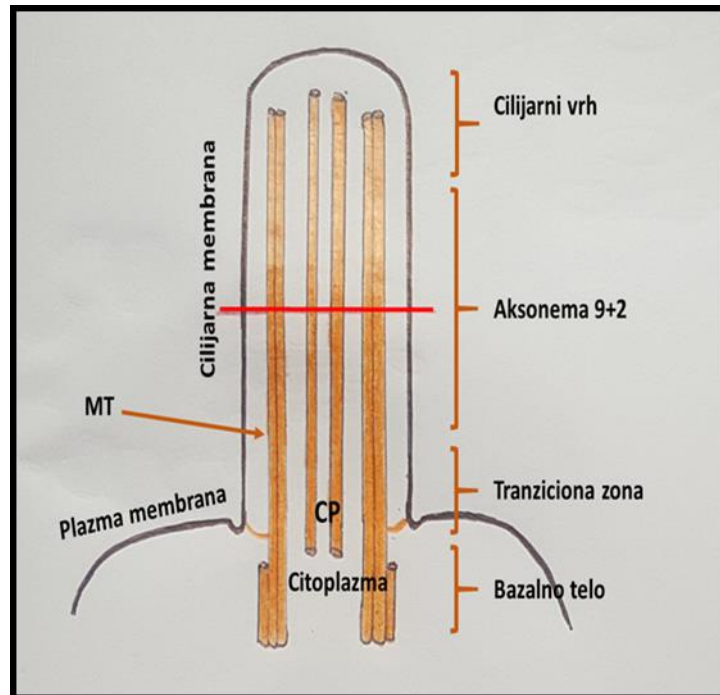
5.2. GENOMSKO PROFILISANJE PACIJENATA SUSPEKTIH NA PCD U SRBIJI I FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA NOVOOTKRIVENE VARIJANTE	98
5.2.1. Spektar gena uzročnika i gena kandidata za pcd u kojima su detektovane patogene genetičke varijante u populaciji srbije	98
5.2.1.1. Geni kandidati za PCD	100
5.2.1.2. Spektar genetičkih varijanti detektovanih u genima uzročnicima i genima kandidatima za PCD	101
5.2.3. Strategija za uspostavljanje dijagnoze kod pacijenata kod kojih nisu detektovane genetičke varijante u pcd genima	101
5.2.4. Funkcionalna analiza nove varijante c.947_948insg, p.thr318tyrfster11 u kodirajućem regionu gena <i>DNAI1</i>	105
5.2.4.1. Molekularna karakterizacija genetičke varijante c.947_948insG <i>DNAI1</i>	105
5.2.4.2. <i>In silico</i> analiza genetičke varijante c.947_948insG <i>DNAI1</i>	106
5.3. DIFERENCIJACIJA BAZALNE ĆELIJSKE LINIJE A549 U CILIJARNU ĆELIJSKU LINIJU, EKSPRESIONI PROFILI MARKERA CILIOGENEZE I TRETMAN ĆELIJSKE LINIJE A549 MOLEKULOM cAMP	108
5.3.2. Ekspresioni profili markera ciliogeneze	109
5.3.3. Optimizacija tretmana ćelijske linije a549 cikličnim adenzin monofosfatom i imunodetekcija fosforilisanih serina	115
6. ZAKLJUČCI	118
7. LITERATURA	122

1. UVOD

1.1. BIOGENEZA I GRAĐA CILIJIA

Prisustvo specijalizovanih organela za određene funkcije u ćeliji je jedno od glavnih odlika eukariotskih ćelija. Specijalizovanim organelama pripadaju i cilije i flagele, strukture koje se izdižu sa ćelijske površine, prisutne u brojnim eukariotskim ćelijama, sa izuzetkom gljiva i viših biljaka [1]. Identifikovane od strane Antonia van Leeuwenhoek-a 1676. godine, cilije su prve otkrivene organele.

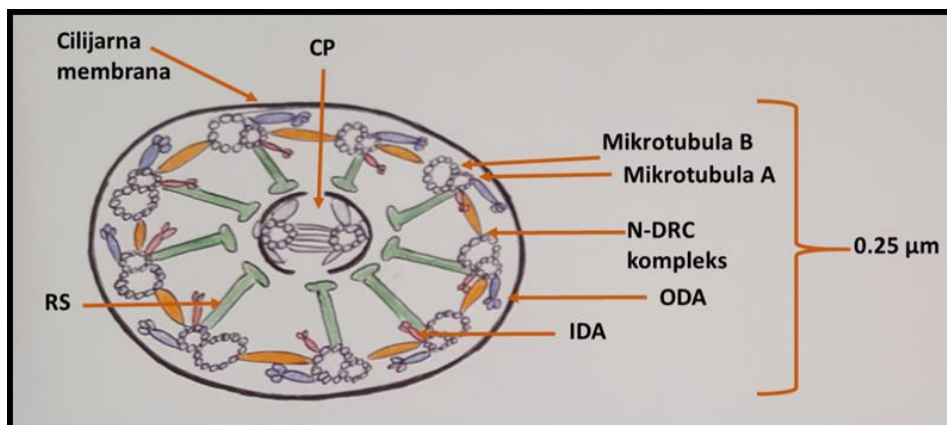
Osnovna struktura cilija i flagela je aksonema (Slika 1), koja se sastoji od mikrotubula i asociranih proteina [2]. Osim aksoneme, koja je obavijena posebnim tipom plazma membrane, cilije poseduju i bazalno telo (Slika 1), mikrotubularnu strukturu koja formira bazu cilija. Bazalno telo je poreklom od centrozoma i smatra se njegovim diferenciranim oblikom. Centrozom se sastoji od majke i ćerke centriole oko kojih se nalaze brojni proteini koji formiraju pericentriolarni matriks. Centrozom ima ulogu organizacionog centra mikrotubula ili služi kao deobno vreteno za vreme ćelijske deobe. Kada ćelije izađu iz ćelijskog ciklusa, centrozom se diferencira u bazalno telo omogućavajući mu da se učvrsti za plazma membranu [3, 4]. Zatim, bazalno telo služi kao matrica za vezivanje tubulinskih heterodimera koji će formirati cilijarnu aksonemu [3, 4]. Svaki periferni par mikrotubularnih dubleta (MT) nastaje kao izdužavanje dve od tri prisutne mikrotubule u bazalnom telu [2]. Posttranslacione modifikacije aksonemalnih tubulina, uključujući acetilaciju, detirozinaciju, poliglutamilaciju i glicilaciju omogućavaju strukturnu rigidnost mikrotubula [5, 6]. Tokom formiranja cilija, formiraju se i dodatne strukture, kao što je tranziciona zona (Slika 1) koja se sastoji od fibroznog materijala i lokalizovana je po ivicama bazalnog tela i aksoneme, gde ima ulogu u filtriranju cilijarnih proteina iz citoplazme [3, 7].



Slika 1. Shematski dijagram cilijarne aksoneme. Uzdužni presek cilije na kome se uočava položaj bazalnog tela, cilijarnog vrha, tranzicione zone, mikrotubularnih dubleta (MT), kao i centralnog para (CP) mikrotubula.

Dve fuzionisane mikrotubule (mikrotubularni dubleti) se međusobno razlikuju: jedna je označena kao tubula A i sastoji se od 13 protofilamenata; druga, spoljašnja mikrotubula, je označena kao tubula B i ona se sastoji od 10 do 11 protofilamenata koji su fuzionisani sa tubulom A. Periferni mikrotubularni dubleti su povezani sa centralnim parom (CP) mikrotubula radijalnim strukturama (eng. *radial spokes*, RS), dok su međusobno povezani neksinskim proteinima, i regulisani neksinsko-dineinskim regulatornim kompleksima (eng. *nexin-dynein regulatory complexes*, N-DRC) (Slika 2) [2].

Eukariotske cilije i flagele su dve veoma slične strukture, dijametra $0.25 \mu\text{m}$ (Slika 2). Brojni tipovi ćelija su prekriveni mnogobrojnim cilijama prosečne dužine od $10 \mu\text{m}$, pa se te ćelije nazivaju multicilijarnim ćelijama (MCC). Cilije se pokreću na veoma koordinisan način i omogućavaju kretanje ćelija kroz tečnost ili pokreću tečnost sa površine ćelija. Flagele se razlikuju od cilija prvenstveno u dužini (dugačke su i do $200 \mu\text{m}$), po talasastom obrascu kretanja i služe za kretanje spermatozoida.



Slika 2. Shematski poprečni presek cilije. Cilija dijametra $0.25 \mu\text{m}$, je obavijena cilijarnom membranom. Devet pari mikrotubularnih dubleta (MT) okružuje centralni par mikrotubula (CP). MT dubleti se sastoje od dva tipa mikrotubula A i B, i međusobno su povezani regulatornim kompleksima neksin-dinein (N-DRC), dok su sa CP povezani radijalnim strukturama (RS). Na mikrotubuli A se nalaze spoljašnje i unutrašnje dineinske ručice (ODA i IDA) koje stvaraju energiju za pokretanje cilija.

1.1.1. PODELA CILIJAKOD KIČMENJAKA PREMA STRUKTURI I FUNKCIJI

Cilije se kod kičmenjaka u odnosu na strukturu dele na dva osnovna tipa:

- 9+2 tip aksoneme (devet perifernih mikrotubularnih dubleta koje okružuju centralni par mikrotubula). Ovaj tip aksoneme poseduju motorne cilije i kinocilije [8-12].
- 9+0 tip aksoneme (devet perifernih mikrotubularnih dubleta bez centralnog para mikrotubula i bez dineinskih ručica). Ovaj tip aksonema je prisutan u ventralnom čvoru tokom procesa embriogeneze i u senzornim primarnim cilijama [13-16].

Cilije se u odnosu na pokretljivost dele na:

- Pokretne cilije sa 9+2 tipom aksoneme, tzv. motorne cilije prisutne na apikalnoj strani epitelijalnih ćelija (respiratorna cilija), mozgu (ependimalne cilije), ženskom reproduktivnom sistemu (cilije u falopijevoj tubi) i muškom reproduktivnom sistemu (flagela spermatozoida) [8-11]. Upravo zbog ovakve lokalizacije, motorne cilije izvršavaju brojne funkcije u ćeliji, uključujući lokomociju spermatozoida, kretanje jajnih ćelija kroz Falopijeve tube i usmereno kretanje ekstraćelijskog materijala (MCC koje održavaju prohodnost disajnih puteva) [17].

- Pokretne cilije sa 9+0 tipom aksoneme, prisutne su u embrionalnoj, nodalnoj ciliji [13, 14]. Nodalne cilije nemaju centralni par mikrotubula, ali ipak spadaju u pokretne cilije, kreću se cirkularno i imaju ulogu u uspostavljanju levo-desne asimetrije tela tokom ranog razvića pokretanjem tečnosti u levu stranu kroz nodularni čvor [18].
- Nepokretne cilije sa 9+2 tipom aksoneme prisutne u unutrašnjem uhu (kinocilija) [14].
- Nepokretne cilije sa 9+0 tipom aksoneme, tzv primarne senzorne cilije, koje imaju ulogu u mehanorecepciji i hemorecepciji. Prisutne su u bubrežima (renalne cilije) [15], žučnom kanalu (holangiocitna cilija) [16], pankreasu (cilije u pankreasnom kanalu), [19] u kostima ili hrskavici (cilije u osteocitama i hondrocitama) [20, 21] i u očima (fotoreceptorna konektujuća cilija) [22]. Lokalizacija senzornih cilija omogućava im da detektuju mehaničku silu (npr. protok tečnosti kroz bubrežne tubule), signalne molekule (npr. faktori rasta), hemijska jedinjenja (npr. olfaktorni molekuli) i fizičke signale (npr. svetlosni signal na retini) [1].

1.1.2. KRETANJE CILIJA I TRANSPORT UNUTAR NJIH

Unutar cilija ne postoji *de novo* sinteza proteina, već se svi cilijarni proteini sintetišu u ćelijskom telu i bivaju transportovani u cilije putem visoko konzervisanog procesa koji se naziva intraflagelarni transport (IFT) [23, 24]. IFT je aktivni proces zasnovan na bidirekcionom kretanju multiproteinskih partikula koji formiraju dva kompleksa, A i B, i koji dobijaju energiju zahvaljujući motornim proteinima [23]. IFT kompleks A je uglavnom povezan sa retrogradnim motornim proteinima, dok je IFT kompleks B asociran sa anterogradnim motornim proteinima. Opsežna istraživanja na zelenoj algi, *C. reinhardtii*, su pokazala da su kargo proteini uskladišteni u IFT kompleksu B i usmereni ka vrhu aksoneme [23], a produkti koji ciliji nisu potrebni se putem IFT kompleksa A usmeravaju do ćelijskog tela gde će biti degradovani ili ponovo upotrebljeni [23, 25].

Kretanje duž mikrotubula osim prisustva IFT kompleksa A i B, je zasnovano i na aktivnosti članova dve velike familije motornih proteina, dineina i kinezina, koji koriste energiju nastalu hidrolizom ATP-a, za stvaranje pokreta duž mikrotubula.

1.1.2.1. Mikrotubularni motorni proteini

Prvi identifikovani mikrotubularni motorni protein je dinein, izolovan od strane Iana Gibbons-a, 1965. godine. Dinein je veliki molekul od približno 2000 kDa, koji se sastoji od dva ili tri teška polipeptidna lanca koji su u kompleksu sa različitim brojem lakih i intermedijarnih polipeptida. Teški lanci, formiraju globularni, ATP-vezujući, motorni domen, koji je odgovoran za kretanje duž mikrotubula. Bazalno telo dineina, koje se sastoji od lakih i intermedijarnih lanaca, služi za vezivanje vezikula i organela [2].

Dvadeset godina nakon otkrića dineina, 1985. godine, Ronald Vale i Michael Sheetz su identifikovali kinezine, mikrotubularne motorne proteine. Kinezin je molekul koji se sastoji dva teška i dva laka lanca, ukupne molekulske mase od 380 kDa. Teški lanci sadrže dugačke spiralne α -helikse koji se obmotavaju jedan oko drugog i formiraju strukturu zavojnice. Amino-terminalni globularni domeni (glave kinezina) teških lanaca su motorni domeni molekula koji se vezuju za dublete mikrotubula i za ATP čija energija omogućava kretanje. Karboksi-terminalni domeni teških lanaca kinezina interaguju sa lakim lancima kinezina. Ovaj domen kinezina je odgovoran i za vezivanje drugih ćelijskih komponenti kao što su vezikule i organele koje će biti transportovane duž mikrotubula [2].

Kinezini i dineini pripadaju velikim familijama proteina. Članovi dineinske familije su mnogobrojni i razlikujemo različite aksonemalne dineine, kao i brojne citoplazmatične dineine. Zajednička osobina svih dineinskih proteina je da sve svi kreću ka ćelijskom telu (retrogradno kretanje), a različiti citoplazmatski dineini prenose različite molekule. Pretpostavlja se da ima preko sto različitih kinezinskih proteina. Neki članovi iz familije kinezina se kreću ka vrhu cilija (anterogradno kretanje), kao i kinezin koji se nalazi u cilijama, dok se drugi članovi kreću u suprotnom smeru. Varijacije u sekvenci karboksi-terminalnog domena određuju tip molekula koji će biti transportovan.

Kretanje cilija i flagela je rezultat međusobnog klizanja perifernih MT koji dobijaju snagu zahvaljujući aksonemalnim dineinima. Bazalni domeni dineina se vezuju za tubuline A, dok su globularni delovi vezani za tubuline B susednih dubleta (Slika 2). Kako su mikrotubularni dubleti međusobno povezani neksinskim proteinima, oni se savijaju formirajući osnovu pokreta cilija i flagela. Takođe, aktivnost dineinskih molekula u različitim delovima aksoneme mora biti dobro iskoordinisana kako bi se održao pravilan obrazac kretanja ovih organela [2].

1.2. CILIOPATIJE KAO POSLEDICA CILIJARNIH ALTERACIJA

Cilija je jedinstveni kompartment ćelije koji sadrži mnogobrojne specifične proteine i lipide. Upotrebom genomskog, transkriptomskog i proteomskog pristupa, molekularne komponente cilija su izučavane [26-33] i oko 2.500 proteina je do sada identifikovano, što govori o kompleksnosti ovih organela na strukturnom nivou [34, 35]. Dodatno, molekularni mehanizmi koji obezbeđuju kretanje solubilnih i membranskih proteina u ciliju i duž cilije su takođe veoma složeni i nedovoljno izučeni. Poznavanje procesa biogeneze i funkcionisanja cilija je esencijalno za razumevanje ciliopatija i za stvaranje novih terapijskih pristupa u cilju njihovog lečenja.

Ciliopatije obuhvataju mnogobrojna patološka stanja nastala usled strukturnih ili funkcionalnih promena na motornim i primarnim cilijama. Kako su cilije sastavni deo skoro svake ćelije vertebrata, cilijarna disfunkcija se može manifestovati kao konstelacija karakteristika koje prvenstveno obuhvataju degeneraciju retine, bubrežne poremećaje, cerebralne anomalije, poremećaje traheobronhijalnog epitela. Dodatne manifestacije obuhvataju hronične respiratorne infekcije, otkazivanje rada disajnih puteva, kongenitalne fibrocistične bolesti jetre i pankreasa, bolesti srca, slepilo, gluvoću, dijabetes, gojaznost, sterilitet i skeletne poremećaje kao što su polidaktilija i patuljast rast. Različite fenotipske karakteristike ciliopatija mogu biti manifestacija patogene promene u jednom lokusu, i obrnuto, isti fenotip može biti posledica mnogobrojnih patogenih genetičkih varijanti [36].

U poslednjoj dekadi, abnormalnosti motornih i senzornih cilija bile su asocirane sa najmanje petnaest različitih poremećaja: Bardet-Biedl-ov sindrom, Meckel-Gruber-ov sindrom, Joubert-ov sindrom, Jeune-ov sindrom, Senior-Loken-ov sindrom, Alstrom-ov sindrom, primarna cilijarna diskinezija, policistična bolest bubrega, nefronoptise, holangiopatije, retinitis pigmentosa, Usher-ov sindrom, Hirschsprung-ova bolest, oralno-facialni-digitalni sindrom i kancer [37-40], a predviđa se da su odgovorne za preko 120 poremećaja nepoznate etiologije [41].

1.2.1. Primarne (senzorne) ciliopatije

Većina ćelija vertebrata ima pojedinačnu, nepokretnu, primarnu ciliju koja se sastoji od specijalizovanih proteina i ekstraćelijskih receptora koji joj omogućavaju primanje informacija iz okolne sredine. Senzorne primarne cilije su uključene u brojne ćelijske procese kao što je ćelijska deoba, gde imaju ulogu strukturne komponente koja služi za formiranje deobnog vretena, a regulišu i procese ćelijske proliferacije i apoptoze [4, 42]. Takođe je dokazana uloga primarnih senzornih cilija u brojnim signalnim putevima i procesima kao što su signalni putevi hedžhog (Hh), Wnt, Notch i Hippo, u signalnom putu faktora rasta fibroblasta i trombocita, i procesima uspostavljanja polarnosti planarnih ćelija [43].

Patogene varijante u genima koji kodiraju proteine primarnih cilija dovode do širokog spektra gore navedinih simptoma i sindroma, upravo zbog prisustva primarnih cilija na brojnim ćelijama i učestvovanja u velikom broju signalnih puteva. Iako pojedinačni sindromi koji se ubrajaju u senzorne ciliopatije predstavljaju retke genetičke bolesti, kada se posmatraju kao celina, njihova prevalenca je jako visoka, 1: 2.000 [44].

1.2.2. Motorne ciliopatije

Motorne ciliopatije obuhvataju alteracije u procesu embrionalnog formiranja levo-desne asimetrije tela, primarnu cilijarnu diskineziju, i disregulaciju ćelijske deobe i onkogeneze.

Embrionalna gastrulacija je simetričan proces do prvog prekida u Hensenovog čvoru. Na ventralnoj površini čvora nalazi se dva tipa cilija: pokretne, 9+0 cilije i nepokretne, 9+0 cilije. Pokretne cilije su lokalizovane u centralnom čvoru i kreću se rotaciono da bi omogućile kretanje perinodalne tečnosti ulevo. Ovakvo kretanje tečnosti je odgovorno za uspostavljanje signalne putanje protoka u smeru obrnutom od kazaljke na satu (ulevo). Kako se aksonema kreće u odgovoru na desno-levi perinodalni protok, u smeru kazaljke na satu (udesno), aktivira se signalni put intracelularnog kalcijuma koji se nalazi levo u nodalnom čvoru. Nepokretne cilije koje se nalaze na periferiji čvora, imaju ulogu mehanoreceptora i primaju ovaj signal. Kao posledica ovakvog kretanja brojni geni su eksprimirani asimetrično, dajući identitet svakoj embrionalnoj strani. Većina ovih gena kodira za signalne molekule koji interaguju da bi uspostavili signalne kaskade, i kao

rezultat asimetrične ekspresije gena nastaje normalna asimetrična morfologija organa i njihovog položaja [45, 46].

Normalan položaj srca i unutrašnjih organa naziva se *situs solitus*. Kada su unutrašnji organi postavljeni kao u ogledalu (inverzija unutrašnjih organa), onda je u pitanju *situs inversus*, a sve ostale promene položaja unutrašnjih organa se nazivaju *situs ambiguous*. Učestalost *situs inversus*-a je 1: 10.000, dok je učestalost *situs ambiguous*-a mnogo manja, i često je praćena kompleksnim kardiovaskularnim poremećajima [47].

1.3. PRIMARNA CILIJARNA DISKINEZIJA

Primarna cilijarna diskinezija (PCD (OMIM #244400)) je klinički i genetički veoma heterogen poremećaj koji se javlja odmah po rođenju, a karakteriše se promenama na motornim cilijama koje su posledica patogenih varijanti u genima koji kodiraju proteine neophodne za pravilnu strukturu i funkciju ovih organela. Ubraja se u retke bolesti, a nasleđuje na autozomno recesivan način ili je nasleđivanje vezano za hromozom X [48], i predominantno utiče na funkcionisanje pluća, reproduktivnih organa, i na lateralnost unutrašnjih organa. Uloga motornih cilija u respiratornom traktu je održavanje prohodnosti disajnih puteva, odnosno omogućavanje kretanje mukusa, bakterija i virusa čime se sprečava infekcija gornjih i donjih disajnih puteva. Plodnost kod muškaraca je smanjena usled poremećenog kretanja spermatozoida, obzirom da je ultrastruktura repa spermatozoida veoma slična ultrastrukturi motornih cilija. Takođe je zabeležen i veći stepen vanmaterične trudnoće kod žena, jer su motorne cilije odgovorne za kretanje jajne ćelije kroz Falopijevu tubu do materice [9].

Incidencija PCD-a je procenjena na 1: 15.000-30.000 živorođenih beba, ali se smatra da je ovaj broj mnogo veći u određenim etničkim grupama i ostrvskim populacijama gde češće dolazi do ukrštanja u srodstvu [49, 50]. Ne postoje reprezentativni evropski podaci o prevalenci, tačnim godinama pacijenata u kojima se uspostavlja dijagnoza i daljem toku bolesti, već podaci potiču iz pojedinih zemalja Evrope i varijaju od 1: 4.000 do 1: 40.000 osoba [49, 50], sa procenjenom srednjom prevalencom od 1: 10.000 osoba [51, 52] Evropska istraživanja su pokazala da je prosečna starost pacijenata pri uspostavljanju dijagnoze 5.3 godine, dok je nešto niža kod pacijenata sa invertovanim organima (3.5 godina) [51].

1.3.1. Istorijat

Alfons Karlovich Siewert je 1903. godine, objavio pojedinačan slučaj dvadeset jednogodišnjeg pacijenta muškog pola sa *situs inversus*-om, bronhiektazijama i naznakama sino-nazalne bolesti [53]. Trideset godina kasnije, 1933., poljski lekar, Manes Kartegener je opisao pacijente sa trijadom simptoma koji obuhvataju *situs inversus*, bronhiektazije i hroničnu mukoznu nazalnu bolest sa nazalnim polipima [54], i ovaj entitet je nazvan Kartagenerovim sindromom [55].

Nemački biolog, Bjorn Afzelius je 1976. godine potvrdio elektronskom mikroskopijom da se kod pacijenata sa Kartagenerovim sindromom cilije ne kreću i bolest je tada preimenovana u sindrom nepokretnih cilija. Naime, Afzelius je ustanovio da su glavne karakteristike PCD-a ultrastrukturni poremećaji motornih cilija koji dovode do njihove nepokretljivosti, izučavajući četiri pacijenta sa nepokretnim spermatozoidima. Istraživanje je obuhvatilo merenje stepena mukocilijarnog transporta u donjim disajnim putevima i proučavanje ultrastrukture repa spermatozoida i/ili respiratornih cilija. Tri od četiri pacijenta su imala učestali bronhitis i sinuzitis, jer mukocilijarni transport nije funkcionisao. Elektronskom mikroskopijom je utvrđeno da cilije ovih pacijenata nisu imale dineinske ručice. Ovi rezultati su podržali hipotezu da će kongenitalne alteracije cilija dovesti do hroničnih infekcija respiratornog trakta i do sindroma nepokretnih cilija [56, 57].

Dodatna istraživanja koja su usledila, dovela su do zamene ovog termina terminom primarna cilijarna diskinezija, da bi se ukazalo na to da ne samo cilijarna nepokretljivost, već i cilijarna diskinezija (poremećen obrazac kretanja), i cilijarna aplazija (odsustvo cilija) dovode do PCD [57, 58]. Dodatno, termin „primarna“ je usvojen da bi se napravila razlika između nasledne genetičke bolesti (PCD) i sekundarne cilijarne diskinezije koja nastaje usled procesa infekcije i inflamacije. Sekundarna cilijarna diskinezija je reverzibilan poremećaj, gde se nakon izlečenja vraća prvobitan broj cilija i njihova funkcionalnost [58].

1.3.2. Klinička prezentacija bolesti kod PCD pacijenata

Klinički simptomi PCD-a koji su posledica alteracija motornih cilija se ispoljavaju u disajnim putevima, paranazalnim sinusima, srednjem uhu (eustahijeva tuba), reproduktivnim organima, a utiču i na lateralnost organa (specijalizovane embrionalne motorne cilije prisutne u ventralnom čvoru tokom embriogeneze) [58]. Klinički simptomi se manifestuju odmah nakon rođenja ili u prvih nekoliko meseci života [59].

Kod novorođenčadi su najčešće prisutni neonatalni respiratorni distres i rinitis. Respiratorni simptomi su prisutni u 65-87 novorođenčadi, koji variraju od blage prolazne tahipneje do ozbiljnih respiratornih insuficijencija [60]. Ukoliko se javi neobjašnjivi respiratorni distres kod bebe, posebno ako je udružen sa atelektazijama, treba se posumnjati na dijagnozu PCD-a.

Novorođenčadi sa PCD imaju neprestani vlažni kašalj i učestale respiratorne infekcije koje se nastavljaju kroz detinjstvo i adolescenciju. Kako su respiratorne infekcije kod male dece veoma česte i u drugim bolestima, dijagnoza PCD-a je često zbog toga odložena.

Bronhiektazije mogu biti prisutne u detinjstvu, i skoro su neizbežne u adolescenciji, predominantno zahvatajući srednje i donje lobuse [60]. Bronhiektazije predstavljaju abnormalno proširenje bronhija i bronhiola čija su posledica hronični kašalj, produkcija sputuma i učestale infekcije. Bronhiektazije mogu dovesti do progresivnog gubitka funkcije pluća koja zahteva transplataciju pluća ili mogu dovesti do prevremene smrti ukoliko se ne leče na adekvatan način [61].

Celokupna klinička prezentacija bolesti u respiratornim organima obuhvata: neonatalni respiratorni distres kod 80% pacijenata, akutni rinosinuzitis, rinitis, sinuzitis, konduktivni gubitak sluha usled upale srednjeg uha, učestale ili hronične upale pluća sa bronhiektazijama i progresivni gubitak funkcije pluća [62, 63]. S obzirom da su motorne cilije prisutne celom dužinom respiratornog trakta, svaki strukturni ili funkcionalni gubitak integriteta cilija dovodi do narušavanja urođenog imunskog sistema, jer je poremećen mukocilijarni klirens [64]. Oko 50% pacijenata ima *situs inversus* ili druge nepravilnosti položaja unutrašnjih organa. Plodnost je smanjena kod žena i muškaraca usled nepravilnog funkcionisanja repa spermatozoida kod muškaraca, odnosno jajne ćelije ne mogu da stignu do materice, ili se jajna ćelija pozicionira van materice usled nepravilnog kretanja motornih cilija u Falopijevim tubama kod žena.

1.3.2.1. Slična klinička manifestacija senzornih i motornih ciliopatija

Iako motorne i senzorne cilije imaju sličnu strukturu i dele brojne komponente, disfunkcija motornih cilija je relativno retka u primarnim ciliopatijama. Ipak, postoje neke primarne ciliopatije gde su zahvaćeni i respiratorni organi, što ukazuje na potencijalnu ulogu primarnih cilija u bolestima pluća.

Postoji nekoliko patoloških stanja koja su posledica disfunkcije kako motornih tako i senzornih cilija uzrokovanih patogenim genetičkim varijantama u genima koji kodiraju proteine koju su prisutni u obe vrste cilija.

Retinitis pigmentosa je nasledno slepilo koje nastaje usled patogene promene u genu koji reguliše GTP-azu, a aktivan je i u motornim cilijama. Ovi pacijenti ispoljavaju simptome motorne ciliopatije, primarne cilijarne diskinezije [65, 66]. Autozomalno dominantna policistična bolest bubrega je primarna ciliopatija koja sekundarno nastaje usled poremećaja mehanoreceptora koji su prisutni i na motornim cilijama. Pacijenti sa ovim poremećajem imaju povećan rizik od razvoja bolesti pluća i imaju povišenu prevalencu radiografskih bronhiektazija koje su karakteristične za PCD [67]. U *Usher*-ovom sindromu je takođe dokazan uticaj motornih cilija i neki pacijenti sa ovom sindromom imaju simptome karakteristične za PCD [68].

Kranioektodermalna displazija, Sensenbrenner-ov sindrom i polidaktilija sa kratkim rebrima su još jedna grupa primarnih ciliopatija povezanih sa skeletnom displazijom koje dovode do respiratornih komplikacija [69]. Respiratorne bolesti koje su asocirane sa ovim poremećajima nastaju zbog malog grudnog koša, ali je nedavno pokazano da disfunkcija motornih cilija dodatno dovodi do respiratorne insuficijencije [70].

1.3.2.2. Slična klinička manifestacija ciliopatija i drugih pedijatrijskih plućnih bolesti

Iako je rano uspostavljanje dijagnoze neophodno da bi se smanjio stepen morbiditeta nastalog usled otkazivanja funkcije pluća, brojni su dokazi da se dijagnoza kod ovih pacijenata kasno uspostavlja usled velikog diverziteta kliničkih simptoma koji su zastupljeni i kod drugih plućnih pedijatrijskih pacijenata kao što su cistična fibroza, sindromi imunodeficijencije, neonatalni respiratorni distress, izolovane bronhiektazije,

gastroezofagealni refluks i *Wegener*-ova granulomatoza [51]. Iako je uspostavljanje dijagnoze bolesti olakšano prisustvom invertovanog položaja organa, *situs inversus* može da navede lekare na pogrešnu dijagnozu, jer se javlja i u primarnim senzornim ciliopatijama, može biti izolovan ili neobično stanje cistične fibroze [36, 71]. Takođe, bronhiektazije su nedavno pronađene kod 37% pacijenata sa primarnom senzornom ciliopatijom (autozomno-dominantna policistična bolest bubrega) [67]. Deca sa senzornim ciliopatijama u nekim slučajevima zaostaju sa rastom usled smanjenog unosa hrane, što je čest slučaj kod dece obolele od cistične fibroze, što dodatno otežava uspostavljanje precizne dijagnoze na vreme [72]. Respiratorne tegobe kod pacijenata sa kompleksnim srčanim oboljenjima su često pripisane upravo tim oboljenjima, a ne disfunkcionalnostima cilija. Kod ovih pacijenata je veoma bitno da se uspostavi i PCD dijagnoza, jer ona utiče na perioperativni proces i prognozu kod ovih pacijenata [73].

1.3.3. Dijagnostički testovi

Saharinski test je bio prvi dijagnostički test za PCD, jer odložena percepcija ukusa male čestice saharina ukazuje na problem sa cilijarnim klirensom. Kako su rezultati ovog testa ipak vrlo nepouzdati i subjektivni, on se više ne preporučuje kao dijagnostički test za PCD, ili mora biti primenjen u kombinaciji sa drugim testovima [74].

Upoređivanjem nivoa nazalnog azot oksida kod zdravih kontrola, pacijenata sa cističnom fibrozom, idiopatskim bronhiektazijama, Young-ovim sindromom, sinuzitisom i PCD-om, pokazano je da je nivo nazalnog azot oksida iz izdaha mnogo niži kod PCD pacijenata u poređenju sa drugim analiziranim grupama. Ova istraživanja su pokazala da je nivo nazalnog azot oksida pogodan dijagnostički test za pacijente suspektne na PCD, i smatra se da azot oksid ima veoma bitnu ulogu u regulaciji kretanja motornih cilijarnih ćelija [75]. Testovi za merenje nivoa nazalnog azot oksida (nNO) su postali univerzalni dijagnostički pristup kod PCD pacijenata [76], koji se primenjuje širom Evrope [74] i Severne Amerike [77], i sada predstavlja „zlatni standard“ u dijagnostikovanju PCD-a. U jednoj nozdrvi se postavlja sonda sa centralnim lumenom, a u drugoj se nalazi cev hemiluminiscentnog analizatora za uzorkovanje. Pacijent treba da zadrži dah dok traje procedura. Ovo zadržavanje daha sa manevrom zatvaranja veluma može biti veoma teško kod male dece, pa zbog toga postoje jednostavnija merenja kao što su zadržavanje daha

bez zatvaranja veluma ili uzorkovanje tokom udaha i izdaha (volumen gasa, V_t), koji takođe mogu da naprave razliku između PCD pacijenata i zdravih kontrola [78, 79]. Standardizacija analize nNO je neophodna, kao i postavljanje granice koja se smatra relevantnom (oko 77 nl/min) [64] pogotovo zbog primene različitih metoda analize. Takođe, preporučljivo je da se nNO test primenjuje u kombinaciji sa drugim testovima, jer postoje slučajevi da pacijenti sa CF, nazalnim polipima i akutnim infekcijama disajnih puteva imaju snižen nivo azot oksida (10-20% niže od normalne vrednosti), a da ponekad PCD pacijenti imaju povišen nivo nNO (pacijenti sa patogenim promenama u genu *RSPH1* imaju nivo nNO 98,3nl/min) [76].

Analiza cilijarne ultrastrukture upotrebom transmisiona elektronske mikroskopije (TEM), se ranije smatrala „zlatnim standardom“ za uspostavljanje dijagnoze PCD-a. I dalje je veoma važna u uspostavljanju dijagnoze, ali se takođe ne može više izolovano koristiti, jer postoje brojni dokazi da cilije mogu biti strukturno intaktne kod PCD pacijenata [80]. Za TEM analizu je potrebno najmanje sto cilija, uzorkovano nazalnom ili bronhijalnom biopsijom (biopsija nazalnim i bronhijalnim četkama) iz zdravih delova epitelijuma, a potom se njihov poprečni presek analizira [81]. Nazalne cilijarne ćelije mogu biti prikupljene i jačim trljanjem donjeg dela nosne školjke, i mada je ova procedura malo neprijatna, traje svega nekoliko sekundi.

Analiza frekvencije kretanja cilija (eng. *ciliary beat frequency*, CBF) i obrazca kretanja cilija (eng. *ciliary beat pattern*, CBP) prikupljenih nazalnom biopsijom, može odbaciti dijagnozu PCD-a, ako su rezultati ovih analiza u okviru normalnih vrednosti. Cilije se posmatraju video mikroskopijom velike brzine i rezolucije sa opcijom reprodukovanja usporenog snimka kako bi se izmerila frekvencija i obrazac kretanja cilija [82]. Abnormalnosti CBF obuhvataju nepokretne, slabo pokretne, prebrzo pokretne i rotirajuće cilije. Abnormalnosti CBP obuhvataju promenjeni smer kretanja cilija. Ovi tipovi abnormalnosti cilija su uglavnom vezani za specifične strukturne defekte koji se mogu uočiti TEM-om [83].

Abnormalnosti CBP-a, CBF-a i TEM-a se takođe mogu uočiti nakon infekcije i inflamacije epitelijuma, stoga je neophodno analizirati pacijente ovim metodama bar dva puta, i dodatno uzgajati epitelne ćelije pluća u vazdušno-tečnoj sredini (eng. *air-liquid interface*, ALI) gde će se cilije rediferencirati [84].

Kombinacija svih ovih testova doprinosi uspostavljanju precizne dijagnoze PCD-a, ali su rezultati nekada nedovoljno jasni i precizni i potrebna su brojna ponavljanja kako bi se dobili jednoznačni rezultati.

Napredak u identifikaciji gena koji su asocirani sa PCD-om je omogućio dizajniranje još jednog dijagnostičkog pristupa. Genetičke i molekularno-biološke analize su omogućile potvrdu i uspostavljanje precizne dijagnoze kod 65% pacijenata sa PCD-om [58]. Ove analize su omogućile uspostavljanje dijagnoze i kod pacijenata čije su analize TEM-a ili CBF bile normalne, ili pacijenata koji nisu imali klasičnu prezentaciju bolesti, čime ovaj dijagnostički pristup postaje nezaobilazan pri uspostavljanju dijagnoze PCD-a.

1.4. GENI UZROČNICI PCD

Poslednjih godina, razumevanje genetičke osnove PCD-a je uznapredovalo, i pokazano je da je velika klinička heterogenost ove bolesti zapravo rezultat velike genetičke heterogenosti. Do sada je utvrđeno prisustvo bialelskih patogenih varijanti u 38 gena [85] koje su odgovorne nastanak PCD-a, a smatra se da je taj broj mnogo veći obzirom da 2500 gena kodira za strukturne/funkcionalne proteine cilija (www.ciliaproteome.org). Poznati geni uzročnici PCD-a su: *ARMC4*, *C21orf59*, *CCDC103*, *CCDC114*, *CCDC151*, *CCDC39*, *CCDC40*, *CCDC65*, *CCNO*, *CFAP300*, *CILD4*, *CILD8*, *DNAAF1*, *DNAAF3*, *DNAAF4*, *DNAAF5*, *DNAH1*, *DNAH11*, *DNAH5*, *DNAI1*, *DNAI2*, *DNAJB13*, *DNAL1*, *DRC1*, *GAS8*, *HYDIN*, *KTU*, *LRRC6*, *NME8*, *PIH1D3*, *RSPH1*, *RSPH3*, *RSPH4A*, *RSPH9*, *SPAG1*, *SPZ1*, *TTC25* i *ZMYND10*.

Ono što dodatno otežava molekularno-genetičke analize je način nasleđivanja ove bolesti, jer osim homozigotnih patogenih varijanti, detektovano je prisustvo i udruženih heterozigotnih varijanti u istom genu ili u različitim genima uzročnicima bolesti, a takođe je utvrđeno i nasleđivanje vezano za hromozom X [48].

Sve gene uzročnike ove bolesti možemo podeliti u dve grupe:

- a) gene koji kodiraju za strukturne proteine motornih cilija, i
- b) gene koji kodiraju proteine odgovorne za pravilno funkcionisanje motornih cilija.

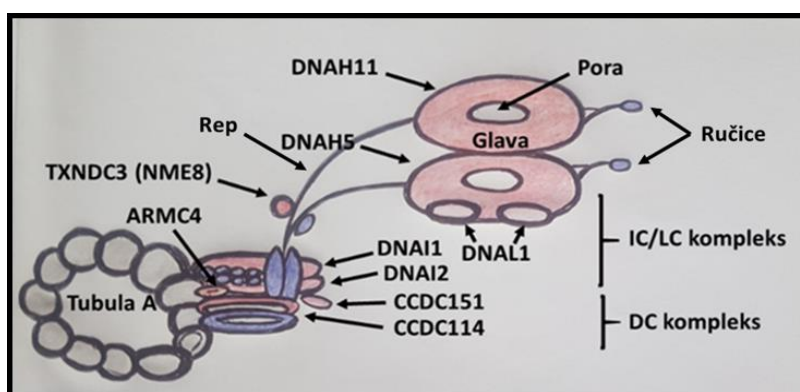
Kao što je već napomenuto, aktivnost respiratornih cilija je generisana aktivnošću dineina, odnosno dineinskih ručica koje su prikačene za aksonemalne mikrotubule A.

Razlikuju se dva tipa biohemijski različitih dineinskih ručica: spoljašnje dineinske ručice (eng. *outer dynein arms*, ODA) i unutrašnje dineinske ručice (eng. *inner dynein arms*, IDA). Oba tipa dineinskih ručica su prikačene za aksonemalne mikrotubule A iz dubleta, i tranzijentno interaguju sa mikrotubulama B opozitnih mikrotubula čime se omogućava kretanje, odnosno flagelarno savijanje (Slika 3). Spoljašnje dineinske ručice se ponavljaju na 24 nm duž dubleta mikrotubula, dajući snagu za 4/5 kretanja cilija [86].

1.4.1. Geni koji kodiraju proteine spoljašnjih i unutrašnjih dineinskih ručica (ODA i IDA)

Za formiranje spoljašnjih dineinskih ručica potrebna je aktivnost sledećih gena: *ARMC4*, *CCDC114*, *CCDC151*, *DNAI1*, *DNAI2*, *DNAL1*, *DNAH5*, *DNAH11* i *NME8* (Slika 3). Za asembliranje komponenta kako spoljašnjih tako i unutrašnjih dineinskih ručica potrebna je aktivnost gena *CCDC103*, *C21orf59*, *DNAAF2*, *DNAAF3*, *DYX1C1*, *HEATR2*, *LRRC6*, *LRRC50*, *SPAG1* i *ZMYND10* [87]. Patogene promene u većini ovih gena dovode do defekata aksonemalne ultrastrukture koji se karakterišu odsustvom ili velikim skraćivanjem ODA i IDA struktura. Dodatno, patogene promene u genima *CCDC39* i *CCDC40* dovode do poremećaja IDA struktura i mikrotubularne disorganizacije [88, 89].

Posledica promena ODA i IDA struktura su delimična ili potpuna nepokretljivost cilija koja dovodi do PCD-a [87]. Lokalizacija proteina u ODA, čije promene dovode do fenotipa primarne cilijarne diskinezije shematski su prikazani na Slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz ODA. Spoljašnje dineinske ručice (ODA) se sastoje od teških dineinskih lanaca β i γ koji formiraju rep, globularni domen (glavu) i ručice ODA; intermedijarnih lanaca (eng. *intermediate chain*, IC), lakih lanaca (eng. *light chain*, LC) i proteina za asembliranje

ODA (eng. *docking complex*, DC). Globularni domen predstavlja motornu jedinicu ODA, a ručice poseduju vezivni domen za mikrotubule (eng. *microtubule binding domain*, MTBD).

Prvi gen za čije je patogene varijante dokazano da uzrokuju PCD je *DNAI1* (OMIM #604366). Ovaj gen je identifikovan je 1999. godine, pristupom koji obuhvata analizu gena kandidata, i humani je ortolog gena *IC78 Chlamydomonas-a*. *DNAI1* kodira za aksonemalni dineinski intermedijarni lanac (eng. *axonemal dynein intermediate-chain 1*, DNAI1) i do sada je detektovano 102 patogene varijante u kodirajućim regionima ovog gena koje izazivaju PCD (ClinVar.). Patogene promene u ovom genu predstavljaju genetičku osnovu za 14% PCD pacijenata [90]. Analiza respiratornih cilija PCD pacijenata pokazala je da patogene promene u genu *DNAI1* onemogućavaju asembliranje proksimalnih ODA kompleksa koji sadrže DNAH5 i DNAH9 proteine [91] (Slika 3).

Drugi identifikovani gen je *DNAH5*, koji je otkriven korišćenjem homozigotnih mapa i analizom porodica u kojima se javljalo ukrštanje u srodstvu, i humani je ortolog γ -aksonemalnog teškog dineinskog lanca kod *Chlamydomonas-a*. *DNAH5* kodira za teški aksonemalni dineinski lanac 5, (eng. *dynein axonemal heavy chain 5*, DNAH5), najveći motorni protein ODA (Slika 3). Patogene promene u ovom genu predstavljaju genetičku osnovu za 25% PCD pacijenata [92].

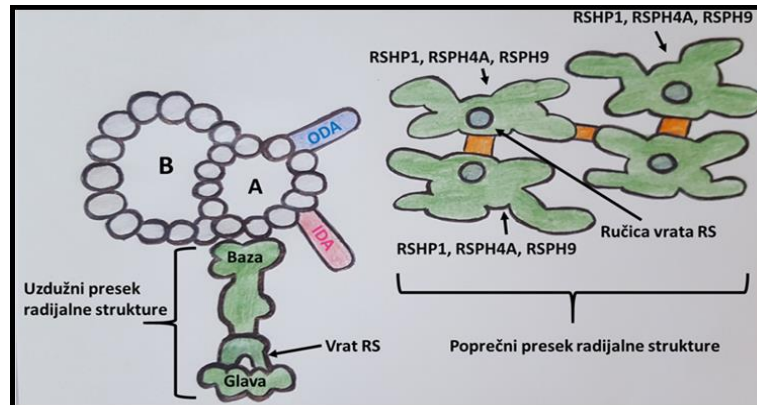
Patogene promene u genima koji kodiraju druge strukturne komponente ODA: *DNAI2*, *DNALI1* i *TXNDC3 (NME8)* (Slika 3), nisu toliko česte kod PCD pacijenata. Istraživanja su pokazala da patogene promene u *DNAI2* i *DNAH5* onemogućavaju asembliranje kako distalnog tako i proksimalnog ODA kompleksa [91].

Mnogobrojni kompleksi dineinskih ručica sa više subjedinica, produkovani i preasemblirani u citoplazmi, se transportuju u cilije i kače za aksonemalne MT putem ODA kompleksa za usidravanje. Patogene promene u genima koji kodiraju za proteine odgovorne za asembliranje, targetovanje i usidravanje, su pronađene kod pacijenata sa ODA i kombinovanim ODA/IDA defektima. Pokazano je da ODA defekti potiču od patogenih promena u genu *CCDC114*, koji kodira za komponentu koja je neophodna za kačenje ODA za MT tipa A [93], i genu *CCDC151*, koji je neophodan za aksonemalno asembliranje ODA kompleksa za usidravanje [94]. Patogene promene u ovim genima se retko nalaze kod PCD pacijenata, a češće su u genu *ARMC4*, koji kodira protein koji je važan za targetovanje i usidravanje ODA za MT tipa A [95] (Slika 3). Citoplazmatski protein, KTU (DNAAF2), čija je pretpostavljena uloga preasembliranje ili transport ODA

i IDA komponenti, je lokalizovan na apikalnoj strani ćelijske citoplazme [96]. Nedostatak dineinskih ručica, i posledična nepokretljivost cilija, uočena je kod nekoliko PCD pacijenata [96]. Drugi geni koji kodiraju za proteine odgovorne za citoplazmatično preasembliranje su *LRRC50 (DNAAF1)*, *DNAAF3*, *HEATR2* i *C21orf59* [97], *DYX1C1* (protein interaguje sa NME8), *LRRC6*, *ZMYND10* (protein interaguje sa LRRC6) i *SPAG1* [98]. Patogene promene u ovim genima dovode do kombinovanih ODA i IDA defekata. Analize pacijenata sa patogenim promenama u genu *CCDC103*, pokazale su da respiratornim cilijama delimično nedostaju ODA kompleksi. Pretpostavlja se da *CCDC103* ima ulogu u procesu asembliranja u citoplazmi, ali i u proksimalnom delu cilija [99].

1.4.2. Geni koji kodiraju komponente radijalnih struktura (RS)

Abnormalnosti u mikrotubularnoj organizaciji koji podrazumevaju odsustvo CP, sa 9+0 ili 8+1 tipom aksonema su jako često uočene anomalije kod PCD pacijenata i dovode do promenjenog obrasca kretanja cilija [83, 87, 100]. *RSPH4A* i *RSPH9* su glavni proteini radijalnih struktura i smatra se da imaju ulogu u signalnoj transdukciji između CP i dineinskih ručica. Patogene promene u ova dva gena su detektovane analiziranjem nekoliko beduinskih porodica kod kojih je prisutno ukrštanje u srodstvu [100], ali su promene u genu *RSPH4A* detektovane i u drugim populacijama [101, 102]. U istočnoevropskoj populacionoj studiji nisu detektovane promene u genu *RSPH9*, što ukazuje na to da je ovaj gen karakterističan za beduinske porodice [101]. Odnedavno su detektovane i patogene varijante u genu *RSPH1*, kod brojnih PCD pacijenata sa defektima u CP ili RS [102] (Slika 4). Patogene promene u genu *HYDIN* izazivaju blaže promene na cilijama [103], nema MT dezorganizacije, koja je karakteristična za patogene promene u ostalim genima radijalnih struktura. Kod pacijenata se javlja samo blaga promena kretanja cilija i zbog toga je kod ovih pacijenata sa promenama *HYDIN*-u dijagnoza često odložena.



Slika 4. Shematski prikaz radijalne strukture. Poprečni (desno) i uzdužni (levo) presek RS sa lokalizacijama gena *RSPH1*, *RSPH4A* i *RSPH9*, glavnih komponenti ovih struktura. Radijalna struktura je povezana sa tubulom A iz MT dubleta, i sastoji se iz baze, vrata i glave.

1.4.3. Geni koji kodiraju za proteine regulatornog kompleksa neksin-dinein (N-DRC)

Istraživanja na mutantima *Chlamydomonas-a* su omogućila identifikaciju proteinskih komponenti koji su sastavni deo veoma kompleksne N-DRC strukture. Geni ovih kompleksa u kojima su detektovane patogene promene koje dovode do PCD-a su *CCDC39*, *CCDC40*, *CCDC65* i *CCDC164* [89, 104].

Detaljna analiza aksonemalne strukture i funkcije kod osoba sa patogenim promenama u genima *CCDC39* i *CCDC40* je pokazala da cilijama nedostaju N-DRC, IDA i RS strukture, što dovodi do dezorganizacije MT i hiperkinetičkog i krutog cilijarnog kretanja [89, 104]. Promene u ovim genima su detektivane kod brojnih PCD pacijenata.

Druga dva gena koja su asocirana sa promenama na N-DRC strukturama su *CCDC164* i *CCDC65*. Kod PCD pacijenata sa promenama u genu *CCDC164*, uočeno je odsustvo kompleksa N-DRC, ali su DA i MT bile neizmenjene [105]. Pokazano je i da promene u ovom genu ne utiču na lokalizaciju *CCDC39*. Blage promene u obrascu i frekvenciji cilijarnog kretanja se takođe uočavaju kod ovih pacijenata [105]. Pacijenti sa promenama u genu *CCDC65*, dovode do promena u IDA i N-DRC i rigidnog cilijarnog kretanja [97].

1.4.4. Geni odgovorni za promene u cilijarnom kretanju sa nepromenjenom ultrastrukturom

Neki PCD pacijenti ispoljavaju karakterističnu kliničku prezentaciju ove bolesti, ali strukturne abnormalnosti nisu uočene. U ovim slučajevima se uočavaju promene u obrascu kretanja cilija. Cilije su nefleksibilne, brzopokretne ili nepokretne što rezultuje otežanim mukocilijarnim klirensom i kliničkim fenotipom PCD-a. Do sada je jedino gen *DNAH11*, koji kodira za teški lanac 11 spoljašnjih dineinskih ručica (eng. *dynein axonemal heavy chain 11*, DNAH11), povezan sa takvim fenotipom [106]. Promene u ovom genu su relativno česte kod PCD pacijenata sa normalnom aksonemalnom ultrastrukturom i objašnjavaju 20% ovog specifičnog PCD fenotipa [107].

1.5. GENI ODGOVORNI ZA PROCES CILIOGENEZE I FORMIRANJE MULTICILIJARNIH ĆELIJA

Broj gena uzročnika iz godine u godinu raste i trenutni broj različitih patogenih varijanti detektovanih u 38 do sada opisanih gena, prelazi 10.000. Osim što su detektovane u genima uzročnicima PCD-a, funkcionalna karakterizacija ovih varijanti je neophodna kako bi se potvrdio njihov uticaj na fenotip. Dodatno, kao što je već napomenuto, kada rezultati različitih dijagnostičkih testova ne pokazuju jednoznačne rezultate, dijagnoza PCD-a se može uspostaviti uzgajanjem primarne kulture cilijarnih ćelija pacijenata.

Bilo da se radi o primarnoj ćelijskoj kulturi epitelijalnih ćelija pacijenata ili o imortalizovanoj ćelijskoj liniji koja služi kao model sistem za izučavanje bolesti, da bi se ćelije diferencirale u MCC neophodno je njihovo gajenje u specijalnim uslovima koji će omogućiti polarizovanim ćelijama formiranje bazalne i apikalne membrane.

Ciliogeneza podrazumeva diferencijaciju epitelne plućne ćelijske linije u multicilijarnu ćelijsku liniju i predstavlja višestepeni proces koji traje različiti vremenski period kod različitih ćelijskih tipova. Multicilijarne ćelije koja nastaju procesom ciliogeneze su potpuno diferencirane, post-mitotičke ćelije koje formiraju stotine cilija na apikalnoj površini. Iako je uloga MCC brojna, molekularni mehanizmi koji regulišu

multiciliogenezu su slabo izučeni, i odnedavno, brojni geni i transkripcioni faktori koji potencijalno regulišu proces ciliogeneze su ušli u focus istraživanja.

1.5.1. Gen *RFX* i njegova uloga u multiciliogenezi

Nekoliko studija čija je tema bila izučavanje procesa ciliogeneze je svoje istraživanje fokusiralo na regulatorne faktore X, familiju transkripcionih faktora čiji članovi poseduju „krilati“ domen koji prepoznaje sekvencu na molekulu DNK i interaguje sa malim žljebom molekula DNK [108]. Faktori RFX u vidu homodimera ili heterodimera interaguju sa ciljnom sekvencom (X-kutija) koja se nalazi u promotorskim regionima brojnih gena i na taj način regulišu njihovu aktivnost [109].

Prva istraživanja su urađena na *C. elegans*-u, a zatim ponovljena na drugim model sistemima, i pokazano je da transkripcioni faktori RFX koordiniraju procesom ciliogeneze. Istraživanje na familiji gena RFX je pokazalo da su ovi geni eksprimirani u brojnim cilijarnim ćelijama i tkivima, da imaju ulogu u formiranju kako senzornih tako i motornih cilija, i da su proteini RFX familije esencijalni za strukturu cilija [110].

Istraživanja koja su sprovedi Loubna i saradnici na primarnoj kulturi ćelija poreklom iz mozga miša, su pokazala da je gen *Rfx3* ključan za formiranje pokretnih multicilija. Pokazano je da ovaj transkripcioni faktor ima brojne uloge u procesu ciliogeneze i da deficijencija gena *Rfx3* utiče kako na rast cilija, tako i na frekvenciju njihovog kretanja.

Transkripcioni faktor RFX3 reguliše i ekspresiju gena *FOXJ1* koji je esencijalan za diferencijaciju pokretnih cilija, vezivanjem za njegov promotor; reguliše gene koji su odgovorni za asembliranje cilija, kao i gene odgovorne za cilijarnu pokretljivost. Interakcijom sa dva aksonemalna dineina koja su odgovorna za pokretljivost cilija, RFX3 reguliše i gene uzročnike PCD-a kod ljudi [110].

1.5.2. Gen *FOXJ1* i regulacija ciliogeneze pokretnih cilija

Transkripcioni faktori FOX (eng. *Forkhead box*, FOX), predstavljaju familiju regulatornih proteina koji imaju važnu ulogu u regulaciji ekspresije gena koji učestvuju u ćelijskom rastu, proliferaciji i diferencijaciji [111].

Poslednjih godina je intenzivno ispitivana uloga proteina FOXJ1 (eng. *forkhead box protein J1*, FOXJ1) u procesu ciliogeneze. Analiza metodom *in situ* hibridizacije je pokazala da je ekspresija gena *FOXJ1* prostorno ograničena na nekoliko tkiva kod sisara koja sadrže multicilijarne ćelije, a to su horoidni pleksus, epitel pluća, jajovod i testis [112, 113]. Ovakav obrazac ekspresije je ukazao na potencijalnu ulogu ovog gena u procesu ciliogeneze [113].

Foxj1, jedarni protein miša, detektovan je u istim tkivima kao i iRNK gena *Foxj1* i akumulira se neposredno pre procesa ciliogeneze u ćelijama poreklom iz pluća i traheja, jajovoda i ependimalnih ćelija koje oblažu kičmeni stub i moždane ventrikule [114]. Foxj1 se takođe akumulira neposredno pre pojave flagela na spermatidama [114], što dodatno potvrđuje ulogu ovog transkripcionog regulatora u procesu ciliogeneze motornih cilija.

Istraživanja na *D. melanogaster*, *X. laevis*, *D. rerio* i *M. musculus* su dovela do identifikacije brojnih cilijarnih gena koji su regulisani transkripcionim faktorom Foxj1. U ove gene se ubrajaju geni koji kodiraju proteine IFT, tubuline, tubulin-modifikujuće enzime, kao i geni koji su neophodni za određene strukturne i funkcionalne aspekte motornih cilija (asembliiranje i transport ODA, IDA, CP, RS) [115, 116]. Identifikacijom gena koji su regulisani transkripcionim faktorom FOXJ1, potvrđena je njegova esencijalna uloga u diferencijaciji motornih cilija kod brojnih organizama, uključujući i čoveka.

1.5.3. Gen *CCNO* i smanjenje broja cilija

Gen *CCNO* (eng. *Cyclin O*, CCNO) je član proteinske familije ciklina, i kodira protein koji učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa. Ciklini uglavnom ostvaruju svoje dejstvo regulacijom kinaza CDK koje su zavisne od ciklina (eng. *cyclin-dependent kinases*, CDKs).

Molekularni targeti i kinaze koje reguliše gen *CCNO* nisu još uvek poznate i smatra se da će njihovom identifikacijom biti jasnija uloga ovog gena u ciliogenezi. Postoje hipoteze da je specifično eksprimiran gen *CCNO* na MCC podlegao funkcionalnim promenama, pa je ulogu duplikacije centriola u S fazi ćelijskog ciklusa, zamenio novom ulogom u procesu amplifikacije centriola zavisne od deuterosoma. Ova

dva procesa koriste delimično sličnu regulatornu mašineriju, pa se pretpostavlja da je CCNO preusmeren na funkcije u MCC [117].

Funk i saradnici [118] su eksperimentima na miševima pokazali da se gen *Ccno* vrlo specifično i dinamično eksprimira na MCC, a najveći stepen aktivnosti gena se uočava u ranim fazama formiranja deuterosoma i generisanja procentriole. Delecija ovog gena u miševima smanjuje produkciju cilija na cilijarnim ćelijama što se uočava u ranim fazama ciliogeneze tokom embrionalnog razvića. Njihovi rezultati sugerišu na specifičnu ulogu *Ccno* na pravilno formiranje deuterosoma, generisanje procentriola i sazrevanje i kačenje novoformiranih centriola. Deficijencija *Ccno* je dovela i do ultrastrukturnih promena u centriolama, bazalnim telima i aksonemama, ali se još uvek ne zna koji je od ovih poremećaja direktno izazvan nedostatkom gena *Ccno*. Dodatno, nedostatak *Ccno* dovodi do permanentne aktivacije transkripcionog programa koji reguliše amplifikaciju centriola, uključujući i ključni regulatorni protein MULTICILIN [119].

1.5.4. Proteinski produkt gena *MCIDAS* kao ključni uzvodni regulator ciliogeneze

Gen *MCIDAS* (eng. *Multiciliate Differentiation And DNA Synthesis Associated Cell Cycle Protein*, *MCIDAS*) kodira protein, MULTICILIN, koji je član geminin familije proteina. Ovaj mali jedarni protein je neophodan za formiranje multicilijarnih ćelija u respiratornom epitelu [120] kao i za promovisanje izlaska mitotičke ćelije iz ćelijskog ciklusa. Gen *MCIDAS* je lokalizovan u konzerviranom regionu hromozoma, za koji se smatra da je posvećen diferencijaciji MCC (sa jedne strane se nalazi gen *CCNO*, koji učestvuje u ciliogenezi, sa druge strane gen *CDC20B* koji sadrži tri miRNK neophodne za proces diferencijacije MCC) [121].

Istraživanja su pokazala da je MULTICILIN ključni uzvodni transkripcioni koregulator ciliogeneze, jer je neohodan i sam dovoljan da indukuje ekspresiju specifičnih gena potrebnih za diferencijaciju MCC [120]. Kako ovaj protein nema domen za interakciju sa molekulom DNK, mehanizmi njegovog delovanja su bili nejasni dok Ma i saradnici nisu pokazali da formira kompleks sa E2f4 ili E2f5 zajedno sa Dp1. Ovaj kompleks aktivira ekspresiju ciljnih gena koji su neophodni za asembliranje bazalnog tela tokom procesa diferencijacije MCC (18). Kako je prisutan samo u određenim podgrupama kičmenjaka, smatra se da se skoro evoluirao da bi predvodio program ciliogeneze MCC [122].

1.5.5. Gen *GEMC1* i diferencijacija multicelijarnih ćelija

Gen *GEMC1* (eng. *Geminin Coiled-Coil Domain Containing Protein 1*, *GEMC1*) je regulator procesa replikacije DNK, a takođe je pokazano da može da aktivira gene *MCIDAS* i *FOXJ1*, kao i druge gene koji su uključeni u diferencijaciju MCC [123]. Istraživanja su pokazala da *GEMC1* ostvaruje svoje funkcije preko C-terminalnog domena koji olakšava formiranje kompleksa EDG (E2F4/5-DP1-*GEMC1*), i da je njegova aktivnost dodatno stimulisana prisustvom proteina *MULTICILIN* [123]. Stubbs i saradnici su pokazali da *GEMC1* i *MULTICILIN* iniciraju slične transkripcione programe neophodne za diferencijaciju MCC, i da, iako oba proteina mogu aktivirati gen *FOXJ1*, *GEMC1* je neophodan za i ekspresiju iRNK gena *MCIDAS* i formiranje MCC u *in vivo* uslovima [120].

1.5.6. Gen *NOTCH1* i diferencijacija bazalnih plućnih ćelija

Signalni put Notch je evoluciono konzerviran i uključen je u brojne ćelijske procese [124]. Sisari ekspimiraju pet liganada NOTCH i četiri NOTCH receptora lokalizovana na plazma membrani [124, 125]. Receptori NOTCH su tip I transmembranskih receptora sa intracelularnim i ekstracelularnim domenima. Aktivacija signalnog puta Notch putem različitih interakcija receptor-ligand dovode do različitih nizvodnih odgovora i na taj način ovaj signalni put reguliše veliki broj ćelijskih procesa [126]. Istraživanja na mišu kao model sistemu su pokazala da tokom razvika kao i u adultnim plućima miša, signalni put Notch reguliše diferencijaciju plućnog epitela u sekretorne, cilijarne, neuroendokrine i Klara ćelije [127, 128].

Nasuprot tome, malo se zna o ulozi signalnog puta Notch u regulaciji diferencijacije humanog epitela koji je kompleksno tkivo koje se sastoji iz bazalnih ćelija (BC), cilijarnih, sekretornih i kolumnarnih/nediferenciranih ćelija [129]. Gomi i saradnici su pokazali da signalna transdukcija putem NOTCH1 i NOTCH3 ima veoma važnu ulogu u regulaciji diferencijacije BC u sekretorne i cilijarne ćelije [130]. Inhibicija signalne transdukcije sa Notch receptora upotrebom sekretaznih inhibitora rezultovala je totalnom blokadom diferencijacije BC u sekretorne ćelije, i delimičnom blokadom diferencijacije

u cilijarne ćelije. Ovi eksperimenti su sugerisali da je signalna transdukcija preko receptora NOTCH neophodna za luminalnu ćelijsku diferencijaciju humanih plućnih BĆ. Konstantno visoki nivoi aktivnosti receptora NOTCH1 i NOTCH4 stimulisali su BĆ za diferencijaciju u sekretorne ćelije rezultujući smanjenjem nivoa cilijarnih ćelija, čime je pokazano da su optimalni nivoi aktivnosti ovih receptora esencijalni za put diferencijacije BĆ [131].

1.6. CIKLIČNI ADENOZIN MONOFOSFAT I CILIJARNA AKTIVNOST

Mukocilijarni klirens spada u urođeni mehanizam odbrane domaćina, a uspostavlja se aktivnošću motornih cilija u disajnim putevima omogućavajući kretanje tečnosti koja u sebi sadrži inhalirane čestice, bakterije i viruse, kao i lokalno produkovan biološki debris, ka orofarinksu [132]. Promene u cilijarnoj aktivnosti mogu dovesti do promena u transportu mukusa [133] što ukazuje na to da su mehanizmi koji regulišu frekvenciju kretanja cilija odgovorni za regulaciju mukocilijarnog transporta. Neurohormoni i neurotransmiteri koji su asocirani sa autonomnim nervnim sistemom značajno utiču na mukocilijarnu aktivnost i istraživanja *in vitro* su pokazala da adrenergički lekovi mogu da ubrzaju CBF i u životinjskim i u humanim tkivima [134, 135]. Betaadrenergički agensi svoje dejstvo ostvaruju interakcijom sa membranskim receptorima povećavajući koncentraciju intracelularnog 3', 5 '-cikličnog adenzin monofosfata [136].

Kanonska signalizacija cikličnog adenzin monofostata (eng. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) je inicirana interakcijom ekstracelularnog agoniste sa G_s-protein kuplovanim intracelularnim receptorima. Ova interakcija inicira konformacionu promenu proteinskog kompleksa G_s, i dolazi do disocijacije kompleksa na G_a i G_{βγ} subjedinice [137]. G_a subjedinica aktivira adenil ciklaze (AC) koje vrše katalizu konverzije intracelularnog ATP-a u cAMP i pirofosfat. Najznačajniji target cAMP-a je protein kinaza zavisna od cAMP-a, (eng. *cAMP-dependent protein kinase*, PKA).

PKA je holoenzim koji se sastoji iz dve katalitičke i dve regulatorne subjedinice u svom neaktivnom stanju. Povećanje koncentracije intracelularnog cAMP-a (bilo aktivacijom receptora ili egzogenim dodavanjem), dovodi do vezivanja po jednog molekula cAMP-a za obe regulatorne subjedinice PKA, koje su označene kao A i B, čime se oslobađaju katalitičke subjedinice. Oslobođene katalitičke subjedinice PKA su aktivne,

i njihova uloga je fosforilacija serina i treonina mnogobrojnih ciljnih proteina sa odgovarajućom aminokiselinskom sekvencom [138, 139].

Mnogobrojne studije su pokazale da cilijarne aksoneme sadrže kinaze koje fosforilišu dineinske subjedinice i druge cilijarne strukture [140]. Ekspresija gena *PKA* je regulisana od strane promotora *FOXJ1* na cilijarnim ćelijama, i pokazano je da se sve četiri subjedinice (regulatorne i katalitičke) ovog enzima nalaze na cilijama [141]. Nekoliko studija u nesisarskim sistemima kao što su *Paramecium*, *Tetrahymena* i *Mytilus gill* je pokazalo snažnu korelaciju između povećanog nivoa molekula cAMP, posledične aktivacije PKA, fosforilacije nishodnih proteina i ubrzanog kretanja aksonema [142-144]. Na sisarskom tkivu pluća, ubrzanje frekvencije kretanja cilija uočeno je nakon veštačkog povećanja cAMP u cilijarnim ćelijama [138, 145, 146], ali je preveliko povećanje blokirano kinaznim inhibitorima, čime je potvrđena uloga cAMP kao i PKA u modulaciji CBF. U respiratornom tkivu čoveka, Morse i saradnici su pokazali da je povećanje CBF zavisno od količine molekula cAMP, čime je potvrđeno da PKA fosforiliše proteine na cilijama i da je rezultat te fosforilacije povećanje frekvencije kretanja cilija [147].

2. CILJEVI

Primarna cilijarna diskinezija je vrlo složen poremećaj, koji se odlikuje heterogenom kliničkom prezentacijom bolesti i čija je genetička osnova veoma kompleksna, sa do sada 38 opisanih gena uzročnika bolesti i više stotina gena kandidata. Velika raznolikost kliničke slike PCD pacijenata često dovodi do odloženog uspostavljanja precizne dijagnoze ove bolesti, a nije retkost i da pacijenti sa drugim bolestima pluća budu okarakterisani kao PCD pacijenti. Genetički profil ove bolesti kod pacijenata sa teritorije Srbije do sada nije utvrđen, pa je identifikacija gena uzročnika neophodna. Dodatno, molekularno genetička karakterizacija novootkrivenih varijanti bi doprinela uspostavljanju jasne korelacije između genotipa i fenotipa svakog pacijenta.

S tim u vezi, prvi deo ove studije obuhvata genomsko profilisanje pacijenata sa primarnom cilijarnom diskinezijom i funkcionalnu karakterizaciju novootkrivenih varijanti:

1. Razvoj genetičkog algoritma, koji bi osim opisanih patogenih genetičkih varijanti i gena uzročnika obuhvatao i novootkrivene varijante u kodirajućim regionima gena uzročnika PCD-a i gena kandidata za PCD. Razvoj ovakvog algoritma će omogućiti precizno i na vreme uspostavljenje dijagnoze PCD-a i predikciju težine bolesti kod pojedinačnih pacijenata.
2. Razvoj strategije, za diferencijalnu dijagnozu PCD-a i drugih bolesti pluća suspektnih na ciliopatije koji se klinički manifestuju kao PCD, koja će omogućiti veću stopu detektovanih mutacija i uspostavljenih dijagnoza.
3. Funkcionalna karakterizacija novootkrivenih patogenih varijanti u već poznatim genima koji su odgovorni za razvoj PCD-a i/ili u genima koji do sada nisu asocirani sa PCD-om, a koji bi mogli da dovedu do uočenog fenotipa kod pacijenta.

Glavna odlika PCD pacijenata je strukturna i/ili funkcionalna promena na cilijama, pa su one nepokretne, slabo pokretne, promenjen im je obrazac kretanja ili odsustvuju. Kod pacijenata kod kojih je promenjena brzina kretanja cilija tretman različitim malim molekulima bi mogao da dovede do prolaznog ili trajnog ubrzavanja kretanja cilija, pa drugi deo ove studije obuhvata uspostavljanje model sistema za testiranje malih molekula kao potencijalnih terapeutika za PCD:

1. Optimizacija protokola za kultivaciju humane plućne epitelne ćelijske linije A549 u cilju diferencijacije u cilijarnu ćelijsku liniju koja će poslužiti kao model sistem za funkcionalnu karakterizaciju novih varijanti i dejstva potencijalnih terapeutika.
2. Analiza profila ekspresije markera za ciliogenezu (*RFX3*, *FOXJ1*, *CCNO*, *MCIDAS*, *GEMC1* i *NOTCH1*) u različitim vremenskim tačkama (od 0. dana do 15. dana) u cilju praćenja ciliogeneze u ćelijskoj liniji A549.
3. Optimizacija doze i načina aplikacije cAMP-a za tretman bazalne ćelijske linije A549, kao i diferenciranih cilijarnih ćelija u različitim vremenskim intervalima; analiza uticaja primenjenog molekula na aktivaciju protein kinaze zavisne od cAMP-a- PKA i nishodnu fosforilaciju serina; analiza uticaja na frekvenciju kretanja cilija u cilju ispitivanja njegovog potencijalnog terapijskog dejstva.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. ISPITANICI

Ovo istraživanje odobreno je od strane Etičkog odbora Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“. Studija je sprovedena u skladu sa etičkim standardima izloženim u Helsinškoj deklaraciji i njenim kasnijim amandmanima. Informisana saglasnost je dobijena od svih učesnika uključenih u studiju.

PCD je kod pacijenata dijagnostikovano prilikom neonatalnog skrininga ili u dečijem uzrastu, na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta "Dr Vukan Čupić". Kriterijumi za uspostavljanje dijagnoze PCD-a su obuhvatili sledeće simptome bolesti: neonatalni respiratorni distres po rođenju, hronični sinuzitis, hroničnu upalu srednjeg uha, učestale upale pluća, brohnoektazije i *situs inversus*. Za identifikaciju pokretljivosti cilija uzorkovane su epitelne ćelije disajnih puteva i njihova pokretljivost je detektovana upotrebom optičkog mikroskopa. Kriterijum isključenja drugih bolesti je obuhvatio odsustvo cistične fibroze (CF) koje je ustanovljeno testiranjem pacijenata na prisustvo *P. aeruginosa* i znojnim testom.

U okviru ove studije korišćeni su uzorci 21. pacijenta suspektnog na PCD (iz 18 nesrodnih porodica) i dve kontrolne grupe od 69 i 11 ispitanika iz Srbije čije je prikupljanje počelo 2014. godine. Ova studija je obuhvatila i 8 zdravih članova porodice, u cilju identifikacije obrasca nasleđivanja detektovanih varijanti.

U istraživanju koje je obuhvatalo genomsko profilisanje pacijenata suspektnih na PCD, bio je uključen 21 pacijent. Kontrolna grupa ispitanika se sastojala iz 69 osoba sa teritorije Srbije, čiji su genomski profili, dobijeni istom metodologijom, korišćeni radi utvrđivanja frekvencije detektovanih varijanti i za eliminaciju populaciono specifičnih varijanti koje nisu potencijalni uzročnici bolesti.

U istraživanju koje je obuhvatalo molekularnu karakterizaciju novootkrivene varijante u genu uzročniku ove bolesti, bila su uključena dva pacijenta u srodstvu (rođene sestre) kod kojih je genetička varijanta detektovana, njihovi roditelji i 11 zdravih kontrola. Roditelji ovih pacijenata su analizirani radi potvrde statusa nosioca genetičke varijante.

U istraživanju koje je obuhvatilo dizajniranje genetičkog algoritma za lakše i brže uspostavljanje precizne dijagnoze PCD-a, kao i za uspostavljanje dijagnoze kod

pacijenata čiji je genomski profil ukazao na neku drugu pedijatrijsku bolest pluća sa sličnom prezentacijom bolesti, analizirana je kompletna kohorta sakupljenih pacijenata (21 pacijent) i kontrolna grupa (69 ispitanika).

Krv pacijenata, roditelja i braće i sestara obolelih uzimana je sa 3,8% natrijum-citratom kao antikoagulansom, u odnosu 9:1 i transportovana do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, gde je vršena izolacija DNK.

3.2. ĆELIJSKE LINIJE

U istraživanju koje je obuhvatilo optimizaciju protokola za kultivisanje humane plućne bazalne ćelijske linije u cilju diferencijacije u cilijarnu ćelijsku liniju, analizu profila ekspresije markera za ciliogenezu i optimizaciju doze, načina aplikacije cAMP-a i imunodetekciju fosforilisanih aminokiselina, korišćena je ćelijska linija A549.

U istraživanju koje je obuhvatilo molekularnu karakterizaciju novootkrivene varijante u genu uzročniku PCD, kao negativna kontrola za imunodetekciju proteina DNAI1 korišćen je proteinski izolat iz ćelijske linije Hek293.

3.3. METODE ZA GENOMSKO PROFILISANJE PACIJENATA

Genomsko profilisanje pacijenata urađeno je NGS metodom sekvenciranja nove generacije (eng. *Next Generation Sequencing*, NGS). Obrada dobijenih rezultata je obuhvatila programe za predikciju efekata detektovanih varijanti na nivou DNK, RNK i proteina, kao i programe za identifikaciju evolucione konzerviranosti analiziranih regiona. Validacija dobijenih rezultata je obuhvatila dizajniranje prajmera specifičnih za svaku pojedinačnu detektovanu varijantu, reakciju lančanog umnožavanja željenog fragmenta DNK, proveru umnoženih produkata na agaroznom gelu i sekvenciranje regiona DNK od interesa metodom po Sangeru.

Ovim eksperimentima prethodila je izolacija molekula DNK i kvantifikaciona analiza.

3.3.1. Izolacija molekula DNK iz periferne krvi i njegova kvantifikacija

Iz uzoraka pacijenata i njihovih srodnika izolovan je molekul DNK komercijanim kitom za izolaciju, prema uputstvu za korišćenje datog od strane proizvođača (*QIAamp DNA Blood Mini Kit*, *QIAGEN*). Kvalitet i kvantitet izolovanog molekula DNK utvrđena je upotrebom *Qubit 3.0* fluorimetra (*Invitrogen*, Sjedinjene Američke Države), po

uputstvu za rad na aparatu. *Qubit dsDNA HS* pufer (*Invitrogen*, Sjedinjene Američke Države), sa opsegom detekcije molekula DNK od 0.2-100 ng je korišćen za pripremu uzoraka za merenje na aparatu. Svako merenje je urađeno u duplikatu, i srednja vrednost ovih merenja je uzeta kao relevantna koncentracija molekula DNK za dati uzorak.

3.3.2. SEKVENCIRANJE NOVE GENERACIJE

Pacijenti suspekti na PCD analizirani su tehnologijom sekvenciranja nove generacije. NGS tehnologija omogućava precizno masivno paralelno sekvenciranje velikog broja DNK sekvenci istovremeno, u kratkom vremenskom periodu od nekoliko dana.

Vrsta sekvenciranja koja je korišćena u ovoj studiji je targetovano sekvenciranje obogaćivanjem (eng. *Target-enrichment sequencing*, TES). TES platforma je bazirana na probama koje se poravnavaju sa specifičnim regionima desetina gena do nekoliko hiljada gena. Ova platforma je pogodna kada se ne analizira samo mali ciljani region, nego šira sekvenca u kojoj se region od interesa nalazi. Veličina sekvenciranog regiona je do 200Mb.

NGS sekvenciranje obuhvata 3 osnovna koraka:

1. Priprema DNK uzoraka i biblioteke,
2. Reakcija sekvenciranja,
3. Analiza podataka.

3.3.2.1. *TruSight One* protokol za pripremu biblioteke

U ovoj studiji korišćen je „*TruSight One*“ panel (*Illumina*, Sjedinjene Američke Države) za pripremu biblioteke za sekvenciranje uzoraka genomske DNK pacijenata. *TruSight One* panel omogućava paralelno sekvenciranje ~62.000 egzona (~12Mb), 4813 gena koji su do sada povezani sa najrazličitijim kliničkim slikama pacijenata (klinički fenotip) (<https://www.illumina.com/>). Ovaj panel detektuje pojedinačne nukleotidne varijante (eng. *Single nucleotide variants*, SNVs), kao i male insercije i delecije. Rezultat sekvenciranja je detekcija genetičkih varijanti u okviru kodirajućih regiona 4813 gena, koje su uzročnici uočene kliničke slike analiziranih pacijenata.

Priprema uzoraka i pravljenje biblioteke za sekvenciranje urađena je po protokolu proizvođača (<https://support.illumina.com/>). Uzorci molekula DNK su normalizovani na 10 ng/μl, nakon čega je usledila dilucija uzoraka na 5 ng/μl u finalnoj zapremini od 10 μl u Tris-HCl (10mM, pH 8.5) puferu. Za merenje koncentracije uzoraka i validaciju biblioteke korišćen je *Qubit 3.0* fluorimetar i *Qubit dsDNA HS* pufer (*Invitrogen*, Sjedinjene Američke Države).

Priprema biblioteke se sastoji iz 11 sukcesivnih koraka:

1. Tagmentacija gDNK
2. Prečišćavanje gDNK
3. Prva amplifikacija fragmenata PCR reakcijom
4. Prvo prečišćavanje PCR produkta
 - Merenje koncentracije uzoraka nakon prve reakcije PCR-a
5. Prva hibridizacija oligonukleotida sa targetovanim regionima
6. Prvo izdvajanje kodirajućih regiona 4813 gena
7. Druga hibridizacija biblioteke
8. Drugo izdvajanje kodirajućih regiona 4813 gena
9. Prečišćavanje izdvojenih kodirajućih regiona
10. Druga PCR amplifikacija
11. Drugo prečišćavanje PCR produkta
 - Validacija biblioteke: merenje koncentracije biblioteke nakon druge amplifikacije targetovanih regiona

Nakon validacije biblioteke, koncentracija se preračunava na 12-13 pM u finalnom volumenu od 600 μl i nanosi se na kertridž (*Reagent Kit V3*, Kutija 1, *Illumina*, Sjedinjene Američke Države).

3.3.2.2. Targetovano NGS sekvenciranje

Tehnologija sekvenciranja sintezom (eng. *Sequencing by Synthesis*, SBS) se zasniva na upotrebi četiri fluorescentno obeležena nukleotida za paralelno sekvenciranje desetina miliona klastera na površini flow cell-a (*Reagent Kit V3*, Kutija 2, *Illumina*, Sjedinjene Američke Države). U svakom ciklusu sekvenciranja pojedinačni obeleženi dezoksinukleotid trifosfat (dNTP) se dodaje na rastući nukleotidni lanac i služi kao terminator za polimerizaciju - mesto za ugradnju sledećeg nukleotida. Svi nukleotidi koji se ne ugrade u rastući lanac se ispiraju. Nakon ugradnje fluorescentnog nukleotida emituje se fluorescentni signal i na osnovu boje signala detektuje se ugrađeni nukleotid. Fluorescentni obeleživač koji je kovalentno vezan za nukleotid se enzimski iseca sa nukleotida kako bi se omogućila dalja sinteza lanca. Detekcija i identifikacija ugrađenih nukleotida se vrši merenjem inteziteta signala tokom svakog ciklusa, što značajno umanjuje veličinu greške u poređenju sa drugim tehnologijama.

Za reakciju sekvenciranja korišćena je MiSeq platforma za sekvenciranje (*Illumina*, Sjedinjene Američke Države). U reakciji sekvenciranja je korišćen 151 ciklus sekvenciranja jednog DNK lanca sa oba kraja (eng. *pair end read*), dok su obeležavajuće (indeks) sekvence sekvencirane u po 8 ciklusa. Kvalitet sekvenciranja, odnosno ugradnje ispravnog nukleotida je prikazan u vidu Q vrednosti. Q30 vrednost optimalnog sekvenciranja iznosi > 90%, što znači da je 1 nukleotida u 1000 nukleotida pogrešno ugrađen u rastući lanac.

3.3.2.3. Analiza podataka

Za analizu podataka dobijenih upotrebom MiSeq platforme upotrebljen je softver *IlluminaVariant Studio* verzija 2.0 i 3.0 (*Illumina*, San Diego, Sjedinjene Američke Države). Ovaj softver analizira VCF (eng. *Variant Call Format*, VCF) podatke, koji sadrže između 8-10.000 varijanti po uzorku.

Filtriranje detektovanih varijanti

Nakon anotacije varijanti od strane softvera, pristupljeno je manuelnom filtriranju dobijenih varijanti, upotrebom dostupnih filtera u okviru ovog softvera. U filter sekciji podešeni su sledeći parametri: 1. Opšta sekcija (eng. *General section*): Svi genotipovi, svi tipovi varijanti, svi hromozomi; 2. Sekcija varijanti (eng. *Variant section*): Da su sve

varijante prošle filter (sekvencirane su više od 20 puta); 3. Sekcija o posledicama varijanti (eng. *Consequence section*): Da je program ClinVar potvrdio da su patogene; da su izlistane sve varijante koje: menjaju aminokiseline, menjaju okvir čitanja, uvode prevremeni stop kodon, dovode do gubitka stop kodona, insercije, delecije, insercije koje ne menjaju okvir čitanja sekvence, delecije koje ne menjaju okvir čitanja sekvence, varijante koje menjaju mesto iskrajanja; 4. Sekcija o frekvenciji varijante u populaciji (eng. *Population frequency section*): 1000 Genoma i ExaC: podešeno da prikazuje samo varijante koje imaju učestalost manju od 5%; 5. Sekcija klasifikacije (eng. *Classification section*): da su detektovane varijante patogene, potencijalno patogene ili nepoznatog uticaja.

Selekcija gena od interesa za PCD

Sledeći korak u analizi podataka je obuhvatio prioritizaciju 29 gena od interesa za izučavanu bolest: *CCDC8*, *CCDC39*, *CCDC40*, *CCDC50*, *CCDC88*, *CCDC103*, *DNAAF1 (LRRC50)*, *DNAAF2 (KTU)*, *DNAAF3*, *DNAI1*, *DNAI2*, *DNAL1*, *DNAH1*, *DNAH5*, *DNAH9*, *DNAH11*, *DYNC1H1*, *HEATR2*, *HYDIN*, *LRRC6*, *NME1*, *NME8 (TXNDC3)*, *OFD1*, *RPGR*, *RSPH4A*, *RSPH9*, *SPAG16*, *SPAG17* i *TCTE1*. Ova lista gena je obuhvatila gene uzročnike PCD-a, potencijalne gene kandidate za PCD i gene koji pripadaju istoj familiji gena kao i geni uzročnici ove bolesti (Tabela 1). Lista gena uzročnika bolesti je formirana pretraživanjem literature i baze podataka OMIM (eng. *Online Mendelian Inheritance in Men*, OMIM). Geni kandidati su odabrani upotrebom baze podataka *String Interaction Network* (<https://string-db.org/>), i to su geni čiji proteinski produkti direktno stupaju u interakcije protein-protein sa proteinima koju su poznati uzročnici ove bolesti. Nakon prioritizacije ovih gena, broj varijanti je sveden na 3-5 varijanti po uzorku.

Selekcija gena od interesa kod pacijenata kod kojih nisu detektovane varijante u genima relevantnim za PCD

Za identifikaciju mutacionog profila pacijenata kod kojih nisu detektovane varijante u genima relevantnim za PCD, analizirani su geni odgovorni za pojedinačne simptome bolesti. Detaljnim pretraživanjem literature selektovano je 45 gena (*ABCA3*, *ABCA1*, *ABCB1*, *ABCC3*, *ABCA10*, *ABCB11*, *ABCC4*, *ABCA12*, *ABCB4*, *ABCC6*,

ABCA13, ABCB6, ABCC8, ABCA2, ABCB7, ABCC9, ABCC1, ABCD1, ABCA4, ABCC11, ABCD4, ABCA7, ABCC2, ABCG1, ABCG2, ABCG5, ABCG8, CFTR, MUC1, MUC13, MUC2, MUC3A, MUC4, MUC5B, MUC6, MUC7, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SFTPC, SFTPD, SCNN1A, SCNN1B, SCNN1G i SLC26A9), za sledeće simptome bolesti: bronhiektazije, bronhiektazije sa odsustvom CF, hroničan kašalj, prekomerna produkcija mukusa, respiratorni distres kod novorođenčadi, metabolizam surfaktanta kod plućnih bolesti.

Poslednja grupa analiziranih gena obuhvatila je 19 gena asociranih sa senzornim ciliopatijama: *BBS1, BBS2, BBS3, BBS4, BBS5, BBS6, BBS7, BBS8, BBS9, BBIP10, KIF3A, KIF3B, KAP, IFTA, IFTB, IFT43, IFT80, IFT122 i TTC21B*.

Takođe, pacijenti su analizirani i na prisustvo homozigotnih varijanti u genu *CFTR* (uzročnik cistične fibroze), da bi se isključila mogućnost cistične fibroze kao finalne dijagnoze.

Varijante čija je učestalost bila manja od 5% (prema podacima iz baza podataka 1000 Genoma i Exac), za koje je predikcija pokazala da su patogene (prema podacima iz SIFT i PolyPhen2 baza podataka) i koje nisu detektovane ni u jednom od 69 analiziranih uzoraka iz kontrolne grupe koji su sekvencirani na isti način, su dalje analizirane kao potencijalne varijante koje mogu dovesti do uočenog fenotipa kod pacijenta.

Validacija detektovanih varijanti

Sledeće baze podataka su upotrebljene za dodatnu determinaciju patogenosti detektovanih varijanti: VarSome (<https://varsome.com/>), InterVar (<http://wintervar.wglab.org/>), dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>), HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>).

Baza podataka VarSome se sastoji iz informacija dobijenih iz sledećih pojedinačnih baza: gnomAD genomi, gnomAD egzomi, ClinVar, Projekat 1000 Genoma, ExaC, UniProt, Kaviar, ICGC Somatic i drugih.

Američki koledž za medicinsku genetiku i genomiku (eng. *American College of Medical Genetics and Genomics*, ACMG) i udruženje za molekularnu patologiju (eng. *Association for Molecular Pathology*, AMP) publikovali su vodič za kliničku interpretaciju varijanti u odnosu na humane bolesti, koji je baziran na 28 kriterijuma. Prema ACMG/AMP klasifikaciji, kriterijumi su podeljeni u dve grupe: patogeni ili

potencijalno patogeni (P/LP), i benigni ili potencijalno benigni (B/LB), dok je kriterijum “nepoznati značaj”, dodeljen varijantama gde su rezultati bili kontradiktorni. Dvadeset osam kriterijuma je podeljeno na sledeći način: 16 kriterijuma je dodeljeno za dodatno objašnjenje grupe P/LP (veoma jaka potvrda- PVS1, jaka potvrda- PS1-PS4, srednje jaka potvrda- PM1–PM6, podržava patogenost- PP1–PP5), 12 kriterijuma je dodeljeno grupi B/LB (samo jedan rezultat- BA1, jaka potvrda- BS1–BS4, podržava benignost- BP1–BP7) [148].

In silico programi upotrebljeni za predikciju patogenosti varijante na osnovu evolucione konzerviranosti iRNK, procesa iskrajanja, proteina i regulatornih funkcija su: DANN, MutationTaster, FATHMM, GERP i MetaLR. Predikciju efekata varijanti na strukturu i funkciju proteina upotrebljeni su sledeći programi: SIFT, Provean i PolyPhen2.

3.4. VERIFIKACIJA DETEKTOVANIH VARIJANTI

Patogene genetičke varijante za koje je nakon detaljne bioinformatičke analize uvrđeno da su uzročnici uočenog fenotipa kod pacijenata, verifikovane su sekvenciranjem željenog regiona molekula DNK metodom po Sangeru. Reakcija lančanog umnožavanja željenog fragmenta DNK i provera amplifikacije na agaroznom gelu prethodila je procesu sekvenciranja fragmenta DNK.

3.4.1. PRAJMER SEKVENCE

Oligonukleotidni prajmeri su neophodni za započinjanje procesa *in vitro* replikacije. Za svaku amplifikaciju željenog regiona molekula DNK dizajnirani su specifični prajmeri komplementarni regionu od interesa. Karakteristike prajmera (<https://www.addgene.org/protocols/primer-design/>) od kojih zavisi njihova specifičnost i produktivnost uzete su u obzir prilikom dizajna specifičnih prajmera upotrebom sledećih baza podataka i programa: NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Ensembl (<https://www.ensembl.org/>), Oligo Analyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com>), USCS *In silico* PCR (<http://rohsdb.cmb.usc.edu/>) i SNPCheck (<https://secure.ngsl.org.uk>).

U različitim PCR reakcijama i reakcijama sekvenciranja korišćeni su odgovarajući specifični prajmeri, čiji su nazivi, orijentacija, sekvence i dužina u baznim parovima (bp) navedeni u Tabeli 1.

Tabela 1. Prajmeri dizajnirani za verifikaciju patogenih genetičkih varijanti detektovanih u analiziranoj kohorti pacijenata suspektih na PCD.

Naziv prajmera	Orijentacija	Sekvenca prajmera	Dužina
DNAL1_116/117F	Ushodni	5'-CTCCCACACA ACTACTAGCTC-3'	21 bp
DNAL1_116/117R	Nishodni	5'-CTGTTTCTCTCTGAGCTTAGCC-3'	22 bp
DNAL1_162F	Ushodni	5'-ATCTCCTGATGTCGTGATCCGC-3'	22 bp
DNAL1_162R	Nishodni	5'-CACCTTGGCTCAAACCTAGACC-3'	22 bp
LRRC6_9F	Ushodni	5'-CAAAA ACTCCAGGAGGAGGTACC-3'	23 bp
LRRC6_9R	Nishodni	5'-CACAGCACTTTCCAAAGTTCTCTC-3'	24 bp
LRRC6_466F	Ushodni	5'-GGATGGGTGAGTTGAATCTG-3'	20 bp

LRRC6_466R	Nishodni	5'-GTAAAAACACTGGAGCAGCG-3'	20 bp
DNAH5_379F	Ushodni	5'-GAGCTTCAAAGCAGCCATGTAG-3'	22 bp
DNAH5_379R	Nishodni	5'-CTCCCTCACATCCTTCCATTTC-3'	22 bp
DNAH5_2542F	Ushodni	5'-GGGGAGAATTTGGAAGGTGAC-3'	21 bp
DNAH5_2542R	Nishodni	5'-GGATGCTTCATGTCTCCCC-3'	19 bp
DNAH5_INTF	Ushodni	5'-GGAGGAGAGGAGCTTTTTGG-3'	20 bp
DNAH5_INTR	Nishodni	5'-GGGGTGAAAAGAGAAGTTGGC-3'	21 bp
CCDC40_83F	Ushodni	5'-CAGGTGTCACCACCAGAG-3'	18 bp
CCDC40_83R	Nishodni	5'-CTCTTGCTGGAAGCCTTGG-3'	19 bp
SCNN1A_522F	Ushodni	5'-GCTGTTTCACCAAGTGCC-3'	18 bp
SCNN1A_522R	Nishodni	5'-CCTAGGAAAGAATGGGGGTG-3'	20 bp
DNAH11_2600F	Ushodni	5'-CCACAGGGTGGATGAAATCG-3'	20 bp
DNAH11_2600R	Nishodni	5'-CCAACTTTCAAAGATACAAAGGG-3'	24 bp
DNAH11_2852F	Ushodni	5'-CCTGGGCAACAGAGCAAGTC-3'	20 bp
DNAH11_2852R	Nishodni	5'-GCCTTGCCAAATCTGGGAG-3'	20 bp
DNAI1_947_948F	Ushodni	5'-CCTGGGTTTGCCATAAAGCG-3'	20 bp
DNAI1_947_948R	Nishodni	5'-GTACTGGGGGTTTGGGATGTAGAG-3'	24 bp
CCDC40_2440F	Ushodni	5'-CGGTCTAGGGGAAGAAGTG-3'	20 bp
CCDC40_2440R	Nishodni	5'-GCAGGCAGTGGTTCACATTAC-3'	22 bp
DNAH5e13_F	Ushodni	5'-CAGTACCCGTGGAACCTGAC-3'	20 bp
DNAH5e13_R	Nishodni	5'-CTATGACCTTGTGACCCAAATTGCC-3'	25 bp
DNAH5e54_F	Ushodni	5'-CATACGTATACGATAGAACAAAATCAGC-3'	28 bp
DNAH5e54_R	Nishodni	5'-CCCAATAGCACTTATTCACACCAC-3'	24 bp
SPAG17e5_F	Ushodni	5'-CCTCATGCATAAATGTGCCTTGTCAC-3'	26 bp
SPAG17e5_R	Nishodni	5'-GCCACTGTGTTTCACTCGTGAAAG-3'	24 bp
SPAG16e4_F	Ushodni	5'-GATAGGAGGACAGAGATTTGTTTGC-3'	26 bp
SPAG16e4_R	Nishodni	5'-GGTTTCAGGGCTGGAGATG-3'	19 bp
CFTR22e_F	Ushodni	CCTGTTAGTTCATTGAAAAGCCCG	25 bp

CFTR22e_R	Nishodni	CTGCTTGCTTTGTAGACTGTGTTC	24 bp
SPAG16e10_F	Ushodni	5'-CAGAGTATCAACCTGTGCAGTG-3'	22 bp
SPAG16e10_R	Nishodni	5'-CTTAGTCTGTACTGCCACCAAG-3'	22 bp
DNAH5e10_F	Ushodni	5'-CCCAAGCTCAAGTTAGAAGATTGTG-3'	25 bp
DNAH5e10_R	Nishodni	5'-GACATAGTAGGCTCCCAAGGAG-3'	22 bp
DNAH5e49_F	Ushodni	5'-GGAAACACTCAAGGAGTTAGGCTC-3'	24 bp
DNAH5e49_R	Nishodni	5'-CAAGCAGGTGTTCTTCCTCACC-3'	22 bp
DNAI1eg14_F	Ushodni	5'-GACAGAGATGGATGGAAGGAGGGAG-3'	25 bp
DNAI1eg14_R	Nishodni	5'-CTTTGCCATTTAGCTCCCTGCCTC-3'	24 bp
DNAI1eg17_F	Ushodni	5'-CCAGGGAAGTGGTGGCTGC-3'	19 bp
DNAI1eg17_R	Nishodni	5'-CTGCAGAGGTGGAGGGTGGAAAG-3'	23 bp

3.4.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERIZACIJE

Lančana reakcija polimerizacije (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) je *in vitro* metod koji omogućava amplifikaciju malih pojedinačnih regiona molekula DNK korišćenjem polimeraze. Osim molekula DNK koji će služiti kao matrica za proces sinteze komplementarnog lanca i termostabilne *Taq* polimeraze poreklom iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*, u PCR reakciju je neophodno dodati dNTP-ove (adenin, citozin, timin i guanin) u podjednakoj količini, MgCl₂ i jednolančane oligonukleotidne sekvence (prajmere).

Kada se ovi reagensi kombinuju u odgovarajućem puferu, niz postupaka zagrevanja (denaturacije) i hlađenja (anilinga) omogućavaju *Taq* polimerazi da umnoži region molekula DNK između prajmera (<https://www.addgene.org/protocols/pcr/>).

Amplifikacija regiona molekula DNK koji nose patogene genetičke varijante

PCR reakcije smeše finalne zapremine 25 µl sadržale su sledeće komponente: 50-100 ng DNK, 10x PCR pufer (*QIAGEN*), 5x Q rastvor (*QIAGEN*), 25 mM MgCl₂ (*QIAGEN*), 10 mM molekule dNTP-ova (*QIAGEN*), 10 µM prajmere (Tabela 1.) i 5 U/µl

Taq polimeraze (*HotStarTaq DNA Polymerase, QIAGEN*). Temperaturni profil PCR reakcija prikazan je u Tabeli 2. Opseg anilinga bio je između 56-61 °C u zavisnosti od T_m dizajniranih prajmera.

Tabela 2. Temperaturni profil PCR reakcija korišćen za amplifikaciju fragmenata molekula DNK u okviru kojih se nalaze detektovane patogene genetičke varijante

Korak	Temperatura	Dužina trajanja	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95 °C	5'	1x
Denaturacija	95 °C	30"	35x
Aniling	56-61 °C	45"	
Elongacija	72 °C	30"	
Finalna elongacija	72 °C	7'	1x

3.4.3. ANALIZA PRODUKATA PCR REAKCIJE NA AGAROSNOM GELU

PCR produkti su provereni horizontalnom elektroforezom u 2% agarosnom gelu. Za pripremu gelova i za elektroforezu, korišćen je 1xTAE pufer. Jačina primenjene struje bila je 110 mA i napona od 110 V (5V/cm gela). Vizuelizacija molekula DNK omogućena je dodavanjem etidijum bromida, fluorescentne boje, u gelove pre polimerizacije (Maniatis et al., 1982). Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćeni su odgovarajući komercijalni DNK markeri (Fermentas, Sjedinjene Američke Države). Upotrebom CCD kamere (*BioDocAnalyze System*) i osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 312 nm, fragment molekula DNK je vizualizovan.

3.4.4. SEKVENCIRANJE FRAGMENTA MOLEKULA DNK

Produkti PCR reakcije su prečišćeni na koloni korišćenjem kita za prečišćavanje (*QIAquick PCR Purification kit, QIAGEN, Holandija*), prema uputstvu za korišćenje datog od strane proizvođača.

Sangerovo sekvenciranje je metoda sekvenciranja koja se zasniva na sposobnosti DNK polimeraze da sintetiše komplementarni lanac DNK, nastavljajući oligonukleotidni lanac vezan za jednolančanu DNK, pri čemu koristi smešu dezoksiribonukleotida i didezoksiribonukleotida [149]. Ugradnja didezoksiribonukleotida koji ne poseduje 3'-OH

grupu na molekulu dezoksiriboze, u polinukleotidni lanac, sprečava dalju elongaciju molekula DNK. Reakcije se izvode sa jednim prajmerom (asimetrični PCR) i na taj način se dobija serija jednolančanih fragmenata čija se dužina razlikuje za po jedan bazni par. Svaki od četiri didezoksinukleotida je obeležen različitom fluorescentnom bojom, čime je omogućeno da se reakcija sekvenciranja i detekcija produkata vrše u jednoj reakciji umesto u četiri odvojene.

Za pripremu uzoraka za sekvenciranje korišćen je *BigDye™ Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)*. Smeša za sekvenciranje finalnog volumena 5 µl sadržala je sledeće komponente: 3-10 ng prečišćenog PCR produkta, prajmer za sekvenciranje (1 pmol/µl) i *Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)*. U reakciji sekvenciranja korišćeni su isti prajmeri kao i u PCR reakciji. Temperaturni profil reakcije PCR za sekvenciranje prikazan je u Tabeli 3.

Tabela 3. Temperaturni profil PCR reakcije za sekvenciranje fragmenata od interesa

Korak	Temperatura	Dužina trajanja	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	96 °C	1'	1x
Denaturacija	96 °C	10''	25x
Aniling	50 °C	5''	
Elongacija	60 °C	4'	
Finalna elongacija	4 °C	∞	1x

Nakon završene reakcije sekvenciranja uzorci su prečišćeni precipitacijom, upotrebom Na-acetata. Osušeni talog je rastvoran u 25 µl formamida (*HiDi Formamide, Applied Biosystems*) i celokupna zapremina je korišćena za kapilarnu elektroforezu na automatskom sekvenceru (*3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*). Za analizu dobijenih sekvenci korišćen je *Sequencing Analysis Software v5.3.2 with KB Basecaller v1.4 (Applied Biosystems)*.

3.5. METODE ZA FUNKCIONALNU KARAKTERIZACIJU NOVOOTKRIVENIH VARIJANTI

Za funkcionalnu karakterizaciju novootkrivene varijante analizirani su ekspresioni profili pacijenata (P9 i P10), njihovih roditelja (P9/10m i P9/10f) i 11 zdravih kontrola. Western blot analiza je korišćena za imunodetekciju proteina kod pacijenata (P9 i P10), roditelja (P9/10m i P9/10f) i zdrave kontrole, a ćelijska linija Hek293 koja ne sintetizuje protein od interesa je korišćena kao negativna kontrola.

Analiza interakcija protein-protein urađena je *in silico* modelovanjem neizmenjenog i mutiranog proteina. Analiza konzerviranosti sekvence koja je pogođena genetičkom varijantom urađena je poravnavanjem aminokiselinskih sekvenci kod različitih vrsta. Analiza prisustva prevremenog STOP kodona urađena je *in silico* translacijom sekvenci neizmenjene i mutirane iRNK. Prisustvo *SECIS* elemenata u 3'UTR regionu utvrđeno je analizom sekundarnih struktura molekula RNK.

3.5.1. METODE KORIŠĆENE ZA ANALIZU EKSPRESIONIH PROFILA CILJNIH GENA

3.5.1.1. Izolacija molekula RNK iz mononuklearnih ćelija

Za izolaciju mononuklearnih ćelija iz svežeg uzorka pune periferne krvi korišćen je *Ficoll-Paque™ Plus* (GE Healthcare, Sjedinjene Američke Države), priznati standard u laboratorijama širom sveta za održavanje vijabilnosti i reprezentativnu distribuciju limfocita B i T (<https://www.gelifesciences.com/>). Detaljan opis protokola za izolaciju opisan je u doktorskoj disertaciji V. Spasovski [150]

Za izolaciju totalne RNK iz mononuklearnih ćelija korišćen je *TRI Reagent Solution* (Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države), po protokolu datom od strane proizvođača. *TRI Reagent* kombinuje fenol i guanidin tiocijanat u monofaznom rastvoru radi olakšavanja neposredne inhibicije aktivnosti RNaze. Biološki uzorci su homogenizovani ili lizirani u ovom rastvoru, a naknadno dodavanje hloroforma dovodi do razdvajanja homogenata u vodenu (RNK), interfazu (DNK) i organsku fazu (proteini). RNK se precipitira iz vodene faze dodavanjem izopropanola (<https://www.thermofisher.com/>).

3.5.1.2. Kvantifikacija molekula RNK

Kvalitet i kvantitet izolovanog molekula RNK utvrđena je upotrebom *Qubit RNA BR* eseja i *Qubit 3.0* fluorimetra (*Invitrogen*, Sjedinjene Američke Države), po uputstvu za rad na aparatu. *Qubit RNA BR* omogućava detekciju molekula RNK koncentracije između 1 ng/μl i 1 μg/μl čime je opseg detekcije ovog eseja između 20 ng i 1 μg.

3.5.1.3. Reverzna transkripcija

Komplementarna DNK (cDNK) se koristi kao matrica u analizama genske ekspresije i sintetiše se iz 1 μg RNK izolovanog iz željenog biološkog uzorka, upotrebom *RevertAid M-MuLV* reverzne transkriptaze (*Thermo Scientific*, Sjedinjene Američke Države) i *random hexamer* prajmera.

Prema uputstvu proizvođača, reakciona smeša volumena 11 μl koja se sastoji iz 1 μg molekula RNK i 10 pmol/μl *random hexamer* prajmera inkubira se 5 min na 65 °C, nakon čega se u reakcionu smešu dodaju: 5x reakcioni pufer (*Thermo Scientific*), *RiboLock* Inhibitor RNaze (*Thermo Scientific*), 10mM dNTP-ovi i *RevertAid M-MuLV* reverzna transkriptaza (*Thermo Scientific*). Finalni volumen reakcione smeše je 20 μl. Temperaturni profil sinteze cDNK molekula prikazan je u Tabeli 4.

Tabela 4. Temperaturni profil reakcije sinteze komplementarne DNK koja će biti upotrebljena za analizu ekspresije gena od interesa

Korak u sintezi cDNK	Temperatura	Dužina trajanja
Denaturacija sekundarnih struktura RNK	65 °C	5'
Aniling prajmera	25 °C	10'
Proces reverzne transkripcije	43 °C	1h
Inhibicija reverzne transkriptaze	70 °C	10'

Nakon završene reakcije, sinteza i integritet cDNK matrice je proverena amplifikacijom fragmenta gena *ABL1* (eng. *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*, ABL), koji se konstitutivno ekspimirira (*housekeeping*), a zatim su PCR

produkti dužine 289bp provereni horizontalnom elektroforezom u 2% agaroznom gelu.

Naziv	Orijentacija	Sekvenca prajmera	Dužina
Ia	Ushodni	5'-ATCTGCCTGAAGCTGGTGGGCT-3'	22bp
D	Nishodni	5'-TGTGATTATAGCCTAAGACCCGGAG-3'	25bp

Sekvence prajmera prikazane su u Tabeli 5.

Tabela 5. Sekvence prajmera gena *ABLI* korišćene za analizu sinteze i integriteta cDNK.

3.5.1.4. PCR u realnom vremenu (qRT-PCR)

Kvantitativni PCR u realnom vremenu (eng. *quantitative real-time PCR*, qRT-PCR) je pouzdana metoda koja se koristi za detekciju i merenje produkata nastalih tokom svakog ciklusa PCR reakcije, čija je količina direktno proporcionalna početnoj količini matrice. Merenje količine produkta vrši se u toku ekspanzionalne faze reakcije, kada prilikom svakog PCR ciklusa, dolazi do duplikacije količine PCR produkta, za razliku od klasične metode PCR, gde se kvantifikacija vrši po završetku procesa. Detekcija amplifikacije u realnom vremenu omogućena je upotrebom fluorescentnih boja koje interaguju sa umnoženim produktom, pa je intezitet fluorescencije proporcionalan količini produkta. Fluorescentni signal koji je ispod praga detekcije (eng. *threshold*) se naziva osnovnim signalom (eng. *baseline*), odnosno količina amplifikata je još uvek mala da bi se signal detektovao. Kada fluorescentni signal pređe prag detektabilnosti, PCR ciklus u kome se to dogodi označava se kao „*threshold cycle*“ – Ct. Ct vrednost predstavlja broj ciklusa koji su neophodni za dati uzorak da bi se detektovao fluorescentni signal.

Kvantifikacija metodom qRT-PCR može biti apsolutna i relativna. Apsolutna kvantifikacija podrazumeva određivanje apsolutnog broja kopija target sekvence poređenjem sa standardnom krivom koja je dobijena kvantifikacijom uzoraka poznate koncentracije. Relativna kvantifikacija podrazumeva da se promene u ekspresiji gena od interesa porede sa drugim referentnim uzorkom (kalibratorom). Pored umnožavanja sekvence od interesa, uporedo se umnožava i endogena kontrola, konstitutivno eksprimiran (*housekeeping*) gen u svim uzorcima koji se kvantifikuju.

3.5.1.5. Provera efikasnosti prajmera i relativna kvantifikacija gena *DNAI1*

Specifični prajmeri za transkript gena *DNAI1* dizajnirani su prema detaljnom uputstvu datom od strane Thornton B i saradnika [151]. Naziv prajmera, njihova orijentacija, sekvence i dužine, prikazane su u Tabeli 6.

Tabela 6. Sekvence prajmera dizajniranih za analizu ekspresionog profila gena *DNAI1*

Naziv prajmera	Orijentacija	Sekvenca prajmera	Dužina
DNAI1_F_Exp	Uzhodni	5'-GTCCCAAGCTGCTAAGATCATGGAGCG-3'	27
DNAI1_R_Exp	Nishodni	5'-CAGGGTACCCACCTGGTCCC-3'	20

Efikasnost dizajniranih prajmera proverena je metodom apsolutne kvantifikacije, serijom od 5 razblaženja (100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng i 0,01 ng). Razblaženje sa najmanjom Ct vrednošću je korišćeno u metodi relativne kvantifikacije.

Određivanje relativne ekspresije gena *DNAI1*

Ekspresioni profil iRNK gena *DNAI1* utvrđen je korišćenjem *KAPA SYBR Green Universal qPCR* kita (*KAPA Biosystems*, Sjedinjene Američke Države) na aparatu *ABI 7500 Real-Time PCR System* (*KAPA Biosystems*, Sjedinjene Američke Države). Gen za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (eng. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, *GAPDH*) korišćen je kao endogena kontrola. Prajmeri za iRNK gena *GAPDH* preuzeti su iz publikacije Baluchamy i saradnika [152], i prikazane su u Tabeli 7. Svi eksperimenti urađeni su u duplikatu.

Tabela 7. Sekvence prajmera za iRNK gena *GAPDH* koji je korišćen kao endogena kontrola

Naziv prajmera	Orijentacija	Sekvenca prajmera	Dužina
GAPDH_SYBR_F	Ushodni	5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3'	19 bp
GAPDH_SYBR_R	Nishodni	5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'	19 bp

Reakciona smeša ukupnog volumena 10 µl sastojala se od sledećih komponenti u finalnim koncentracijama: 10 ng cDNK, 1x *Kapa Syber Fast Universal qPCR Master Mix*, 1x *ROX Low* referentna boja i 10 µM prajmera. Temperaturni profil reakcije korišćene za amplifikaciju iRNK gena *DNAI1* i *GAPDH* prikazan je u Tabeli 8. Nakon reakcije PCR u realnom vremenu, urađena je reakcija disocijacije radi utvrđivanja specifičnosti reakcije.

Tabela 8. Temperaturni profil reakcije qRT-PCR

Korak	Temperatura	Dužina trajanja	Broj ciklusa
1. ciklus	50°C	2'	1x
2. ciklus	95°C	3'	1x
3. ciklus	95°C	15''	40x
	60°C	1'	

Za obradu rezultata upotrebljen je komparativni ddCt metod, pri čemu je medijana dCt vrednosti 11 zdravih kontrolnih uzoraka korišćena kao kalibrator:

$$Q = 2^{-ddCt}, \text{ gde je}$$

$ddCt = dCt_{uzorak} (Ct_{ciljni\ gen} - Ct_{endogena\ kontrola}) - dCt_{kalibrator} (Ct_{ciljni\ gen, kalibrator} - Ct_{endogena kontrola})$.

3.6. METODE KORIŠĆENE ZA ANALIZU PROTEINA

3.6.1. IZOLACIJA I MERENJE KONCENTRACIJE PROTEINA

Izolacija celokupnih proteina iz periferne krvi je urađena po protokolu opisanom u Spasovski, 2012. Ukratko, periferna krv pacijenata, roditelja i zdrave kontrole tretirana je puferom za liziranje ćelija, zatim TEN-om (Tris-EDTA-NaCl) u koji je dodat proteazni inhibitor (*Roche*, Švajcarska) i 0.25M TrisHCl-om. Izolacija se zasniva na inkubaciji uzoraka na 37°C, i njihovom zamrzavanju korišćenjem tečnog azota čija je temperatura -196°C, u ciklusima u trajanju od po 5 min. Ukupno ima tri ciklusa inkubacije i tri ciklusa zamrzavanja, a sve u cilju liziranja ćelijske membrane i oslobađanja proteina.

Za izolaciju proteina iz ćelijske linije tretman puferom za liziranje ćelija je izostavljen, i direktno je na ćelijski talog koncentracije 8×10^6 dodat TEN, a potom je postupak izolacije bio identičan.

Koncentracija izolovanih proteina meri se metodom po Bradfordu [153]. Uzorci su za merenje pripremljeni korišćenjem *Bradford* reagensa (*Protein Assay Due Reagent, Bio Rad*), prema uputstvu proizvođača. Apsorbanca se određuje spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 595 nm (*Ultrospec 3300 Pro, Amersham Biosciences*) i veoma je važno da se apsorbanca proteina detektuje između 0.3-0.7, jer su tada izmerene koncentracije proteina najpreciznije. Radi određivanja koncentracije proteina u uzorku, potrebno je napraviti standardnu krivu tako što se poznata razblaženja proteina BSA (eng. *Bovin serum albumin, BSA*) (1 mg/ml), uključujući i blank, pripremaju i mere na identičan način kao i uzorci.

3.6.2. SDS-PAGE

SDS poliakriamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) je metoda koja se koristi za razdvajanje proteina prema molekularnoj masi. Denaturišući SDS poliakrilamidni gel sastoji se iz gela za koncentrovanje (eng. *stacking gel*) i gela za razdvajanje (eng. *running gel*). Za oba gela je kao denaturišući agens korišćen 10% SDS (eng. *sodium dodecyl sulfate*), dok su kao inicijatori polimerizacije gela korišćeni 10% APS (amonijumpersulfat) i 0,01% TEMED (tetrametiletildiamin). Nakon završene elektroforeze, gel se boji *Comasie Blue* bojom u trajanju od 5min, a zatim obezbojava destilovanom vodom preko noći.

3.6.3. WESTERN BLOT METODA

Western blot (Wb) metoda pripada tehnikama imunodetekcije, koje se zasnivaju na specifičnosti interakcije između molekula od interesa i probe kako bi se omogućila detekcija target molekula u smeši drugih sličnih molekula. U Wb analizi, molekul od interesa je protein, a proba je antitelo specifično za ciljani protein. Ova metoda podrazumeva razdvajanje solubilnih ćelijskih proteina prema molekularnoj masi (denaturišući SDS-poliakrilamidni gel), transfer pojedinačnih razdvojenih proteina na nitroceluloznu membranu koja se potom inkubira sa antitelom specifičnim za protein od interesa, a zatim sledi vizuelizacija kompleksa protein-antitelo hemiluminescentnim

detekcionim sistemom (*ECL*). Ova metoda omogućava detekciju prisustva, količine i molekulske mase analiziranog proteina [154].

Detekcija proteina DNAIL1 u analiziranim uzorcima

Wb metodi je prethodila izolacija celokupnih proteina iz periferne krvi kod pacijenata (P9 i P10), roditelja (P9/10m i P9/10f) i zdrave kontrole, kao i ćelijske linije Hek293 (negativna kontrola), merenje koncentracije celokupnih proteina, SDS-PAGE i bojenje gela radi potvrđivanja prisustva celokupnih proteina u analiziranim uzorcima.

Priprema uzoraka za SDS-PAGE je podrazumevala mešanje uzoraka sa puferom za denaturaciju (50 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol i 0.1% boje BPB (eng. *bromfenolblue*, BPB) i njihovu inkubaciju na 95 ° C u trajanju od 5 min u termobloku. Uzorci su preračunati na 50 µg, 100 µg i 400 µg, kako bi se utvrdila najadekvatnija koncentracija proteina za dalju analizu. Radi određivanja veličine proteina, uporedo sa uzorcima na gel je nanet i komercijalni proteinski marker *PageRuler Prestained ladder* (*Thermo Fisher Scientific*). Proteini su razdvajani vertikalnom elektroforezom u SDS-poliakrilamidnom gelu, gde je gel za razdvajanje bio 10%, a gel za koncentrovanje 12%. Za elektroforezu korišćen je 1 x TGB pufer. Napon kroz gel za koncentrovanje je 100 V, a za kretanje kroz gel na razdvajanje 180 V. Nakon završene elektroforeze, gel je obojen bojom *Comasie Blue* u trajanju od 5min, a zatim je usledilo obezbojavanje destilovanom vodom preko noći. Nakon detekcije proteinskih traka na gelu, pristupljeno je Wb metodi.

Postupak pripreme uzoraka i uslovi za SDS-PAGE se ponavljaju u prvom koraku Wb metode. Za dalju analizu koristili smo uzorke koncentracije od 50 µg. Nakon završene elektroforeze, izvršen je transfer proteina sa gela na PDVF membranu, pravljjenjem tzv. sendviča [154]. Jačina struje je preračunata na sledeći način: po 1cm² membrane primenjuje se struja jačine 5 mA. Analizirani gel bio je dimenzija 3.7 cm x 7.2 cm, pa je jačina primenjene struje bila 133 mA. Nakon transfera, membrana je tretirana puferom za sprečavanje nespecifičnog vezivanja antitela za membranu gde nema proteina i isprana puferom za ispiranje [154]. Proces blokiranja nespecifičnog vezivanja trajao je 2h, nakon čega je membrana tretirana primarnim antitelom.

Za detekciju proteina DNAIL1 metodom Wb, korišćeno je primarno *Anti-Dynein intermediate chain 1* monoklonsko antitelo (*Abcam*, Ujedinjeno Kraljevstvo) proizvedeno u zecu. Antitelo je razblaženo u odnosu 1 na 1000, i membrana je tretirana

24h primarnim antitelom, nakon čega je usledio tretman sekundarnim antitelom. Sekundarno antitelo koje je upotrebljeno je anti-zečje IgG antitelo konjugovano sa peroksidazom rena (eng. *horseradish peroxidase*) (*GE Healthcare*, Sjedinjene Američke Države). Dilucija sekundarnog antitela bila je 1 u 16000, a inkubacija membrane je trajala 2h.

Obzirom da je sekundarno antitelo konjugovano sa peroksidazom rena, vizuelizacija formiranih kompleksa ostvarena je dodavanjem hemiluminescentnog agensa (*ECL, Amersham Pharmacia Biotech*). Membrana je inkubirana sa agensom 5 min, nakon čega se film inkubira preko membrane u kaseti. Radi dobijanja optimalnog signala, film je inkubiran sa membranom u trajanju od 5 min, 15min, 45 min, 1h, 1h i 30min.

3.6.4. PROGRAMI ZA *IN SILICO* KARAKTERIZACIJU NOVOOTKRIVENE VARIJANTE

3.6.4.1. Modelovanje tercijarne strukture proteina DNAI1

Za dobijanje tercijarne strukture neizmenjenog proteina DNAI1 kao i mutiranog proteina DNAI1, upotrebljen je program *Protein Model Portal* (<https://www.proteinmodelportal.org/>). U okviru programa postoji opcija interaktivnog modelovanja, gde se remodeluje sekvencu, odnosno unosi se proteinska sekvencu koja se prosledi različitim serverima za modelovanje (*M4T, I-TASSER, Phyre 2, Raptor X*). Dodatno, upotrebljen je i program *SWISS-MODEL* (<https://swissmodel.expasy.org/>). Upotreba većeg broja programa za modelovanje proteina omogućava upoređivanje 3D struktura iz različitih programa i odabir one strukture koja je najzastupljenija, kao najpribližnije prediktivne strukture proteina. Korišćena je originalna proteinska sekvencu DNAI1 (NP_036276.1), i sekvencu sa unetom promenom koja je detektovana kod pacijenata. Proces dizajniranja tercijarne strukture i formiranja PDB (eng. *Protein Data Base, PDB*) datoteka, od strane softvera, traje u proseku između nekoliko sati i nekoliko dana. Nakon završenog procesa *in silico* modelovanja, informacije koje dobijete o proteinu su sledeće: hidrofobni i hidrofilni regioni proteina, tačne aminokiselinske

pozicije za interakcije protein-protein, ligandi sa kojima interaguje protein od interesa, aktivni centar enzima, nekoliko alternativnih 3D struktura u PDB format, i mnoge druge.

Pored *online* softvera za modelovanje, gde su rezultati dostupni samo kratki vremenski period, postoje i *desktop* programi koji čitaju PDB datoteke. Za analizu PDB datoteka mutiranog i neizmenjenog proteina DNAI1 korišćen je softver *UCSF Chimera 2.0* (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>). U okviru ovog softvera, postoje brojni parametri koji omogućavaju bolju karakterizaciju regiona proteina od interesa ili celog proteina. Finalna 3D struktura mutiranog i neizmenjenog proteina sa svim unetim karakteristikama, sačuvana je u .jpeg formatu.

3.6.4.2. *In silico* translacija proteina DNAI1

Softver *Translate Tool* (<http://web.expasy.org/translate/>), upotrebljen je za utvrđivanje otvorenog okvira čitanja sekvence iRNK neizmenjenog i mutiranog gena *DNAI1* (NM_012144.2). Ovaj program omogućava *in silico* translaciju DNK/RNK sekvenci ciljnih gena u proteinske sekvence. Nakon translacije, sekvenca obeležena crvenom bojom predstavlja otvoreni okvir čitanja, i počinje START kodonom, a kraj sekvence je označen STOP kodonom. Alternativni okviri čitanja se takođe detektuju (promenjeni START kodon ili prevremeni STOP kodon/kodoni).

3.6.4.3. Analiza evolucione konzerviranosti regiona proteina DNAI1 sa novootkrivenom varijantom

U cilju identifikacije konzerviranosti regiona od interesa proteina DNAI1 kod različitih vrsta, korišćen je program za višestruko poravnavanje aminokiselinskih sekvenci *ClustalW2* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Kompletna sekvenca čovekovog proteina DNAI1 kao i sekvence proteina DNAI1 kod ribe (*M. albus*), miša (*M. musculus*), majmuna (*G. gorilla*) i žabe (*X. laevis*) korišćene su za višestruko poravnavanje aminokiselinskih sekvenci. Gen Bank pristupni brojevi sekvenci su sledeći: čovek (NP_036276.1), riba (XP_020448239.1), žaba (NP_001085877.1), miš (NP_780347.2), majmun (XP_004047998.2).

3.6.4.4. Analiza sekundarnih RNK struktura

Za utvrđivanje prisustva specifičnih sekundarnih struktura RNK u 3'UTR regionu gena od interesa, analizirana je sekvenca dužine 60 nt, koja se nalazi nishodno od originalnog STOP kodona u transkriptu. Za ovu analizu korišćen je program MFOLD (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>), koji predviđa formiranje sekundarne strukture RNK molekula na osnovu nukleotidne sekvence transkripta pri konstantnoj temperaturi od 37° C. Nakon procesa savijanja molekula, dobija se informacija o slobodnoj energiji (dG) koju ta struktura poseduje i 2D struktura regiona RNK od interesa u *PostScript*, *pdf*, *png*, *jpg*, *.ct file*, *Vienna*, *RNAML*, *RnaViz ct*, *Mac ct*, *RNAdraw*, i *XRNA ss* formatu. Slobodne energije sekundarne strukture RNK transkripta *DNAII* gena i dG sekundarne strukture RNK poznatih selenocisteinskih proteina su potom upoređene.

3.7. USPOSTAVLJANJE MODEL SISTEMA ZA TESTIRANJE MALIH MOLEKULA

Uspostavljanje model sistema za testiranje malih molekula kao potencijalnih terapeutika za PCD obuhvatio je uspostavljanje uslova za gajenje ćelijske linije A549 na *transwell* filter umecima i njenu diferencijaciju u cilijarne ćelije, uz paralelno praćenje ekspresionih profila markera za ciliogenezu metodom qRT-PCR. Potom je optimizovana doza i način aplikacije cAMP na ćelijsku liniju A549 i izvršena je detekcija fosforilisanih proteina metodom Western Blot.

3.7.1. METODE KORIŠĆENE ZA DIFERENCIJACIJU BAZALNE ĆELIJSKE LINIJE A549 U CILIJARNU ĆELIJSKU LINIJU

Ćelijska linija A549 je dobijena ljubaznošću Laboratorije za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo.

Ćelijska linija A549 je adenokarcinomska humana alveolarna bazalna epitelna ćelija koja je prvi put razvijena 1972. godine od strane D. J. Giarda i saradnika kroz uklanjanje i kultivaciju kancerogenog plućnog tkiva u eksplantiranom tumoru 58-godišnjeg muškarca [155].

Kultivisanje adherentne ćelijske linije A549 urađeno je po protokolu Cordule Hirsch i saradnika [156]. Ćelije su nakon dve nedelje testirane na različite sojeve *Mycoplasma* bakterija, reakcijom PCR, korišćenjem specifičnih prajmera koji su navedeni u Tabeli 9. Temperaturni profil reakcije dat je u Tabeli 10. Pored uzorka A549 ćelija, paralelno su umnožene pozitivna i negativna kontrola.

Tabela 9. Sekvence prajmera korišćenih za testiranje ćelijske linije A549 na prisustvo *Mycoplasma* sojeva

Naziv prajmera	Orijentacija	Sekvenca prajmera	Dužina
Myc Up	Ushodni	5'- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA-3'	22 bp
Myc Down	Nishodni	5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC -3'	27 bp

Tabela 10. Temperaturni profil reakcije PCR korišćen za utvrđivanje prisustva/odsustva *Mycoplasma* sojeva u ispitivanom uzorku

Korak	Temperatura	Dužina trajanja	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95 °C	5'	1x
Denaturacija	94 °C	30''	30x
Aniling	56 °C	30''	
Elongacija	72 °C	45''	
Finalna elongacija	72 °C	10'	1x

3.7.1.1. Kultivacija ćelijske linije A549 na *transwell* filterima

Stimulacija diferencijacije A549 ćelija u cilijarne ćelije podrazumevala je gajenje ćelija na *Transwell* poliestarskim filter membranama za ćelijsku kulturu (www.corning.com/lifesciences), koje omogućavaju ćelijsku polarizaciju i stimulišu ciliogenezu kada su ćelije kultivisane u dvofaznom, vazdušno-tečnom, ALI sistemu (eng. *Air-Liquid interface*, ALI)

Odabir *Transwell* mikrotitar ploča određenih karakteristika, kao što je tip membrane, veličina pore, veličina filtera, i dr., izvršen je prema uputstvu proizvođača [157]. *Transwell* mikrotitar ploča korišćena u našoj studiji je sledećih karakteristika:

- Membrana mikroskopski transparentna, poliestraska (polietilen tereftalat-PET), površine 12mm, površina za rast ćelija 1.12cm², debljina 10 μm, veličina pore 0.4 μm, tretirana da obezbeđuje adheziju i rast ćelija.
- Providna polistirenska mikrotitar ploča sa 12 bunarića zapremine 1.5 ml, zapremina inserta 0.5 ml.
- Ravno, providno dno bunarića.
- Inserti koji obezbeđuju jasnu vidljivost ćelija pod fazno kontrastnim mikroskopom i omogućavaju procenu vijabilnosti ćelija i formiranje jednog sloja ćelija.

Protokol za gajenje ćelija A549 na transwell filter membranama:

1. Koncentracija ćelija je preračunata na 1×10^5 u finalnom volumenu od 100 μ l, upotrebom *Countess Automated Cell Counter* (Invitrogen, Sjedinjene Američke Države), prema uputstvu datom od strane proizvođača.
2. *Transwell* filter umetak je izvađen iz bunarića, invertovan i stavljen u Petri sud.
3. 100 μ l medijuma sa ćelijama je naliveno na invertovani umetak, a potom je poklopljen dnom drugog Petri suda i ubačen u inkubator (standardni uslovi: 37° C, 5% CO₂) na 2-5h u cilju lepljenja ćelija za membranu umetka.
4. Nakon 2-5h, umetak je vraćen u bunarić mikrotitar ploče (ćelije su zalepljene sa donje strane), i u umetak je dodato 180 μ l medijuma.
5. Medijum je menjan na svaka 24h.
6. Prisustvo/odsustvo cilija je detektovano fazno kontrastnim mikroskopom (*Olympus*).

3.7.1.2. Analiza profila ekspresije markera za ciliogenezu

Za analizu markera ciliogeneze, ćelijska linija A549 kultivisana je 15 dana na *transwell* filter membranama. Ćelije iz dva bunarića na mikrotitar ploči ($\sim 2 \times 10^5$ ćelija) sakupljane su nakon 3, 5, 10 i 15 dana i pripremane za analizu ekspresionih profila gena *GEMC1*, *MCIDAS*, *FOXJ1*, *RFX3*, *CCNO* i *NOTCH1*. Ćelije u nultom danu korišćene su kao kontrolni uzorci.

Analizi ekspresije gena markera ciliogeneze prethodila je izolacija molekula RNK iz ćelijske linije A549, kvantifikaciona analiza koncentracije molekula, reverzna transkripcija i dizajn prajmera za iRNK gena *GEMC1*, *MCIDAS*, *FOXJ1*, *RFX3*, *CCNO* i *NOTCH1* (Tabela 11). Ovi koraci su prethodno detaljno opisani u poglavlju 3.5.1. Metode korišćene za analizu ekspersionih profila ciljnih gena.

Tabela 11. Sekvence prajmera dizajniranih za analizu ekspresionog profila markera ciliogeneze u ćelijskoj liniji A549

Naziv prajmera	Orijentacija	Sekvenca prajmera	Dužina
GEMC1_Exp_F	Ushodni	5'-GCAAGATACCCTGGTGCAGAAGG-3'	23 bp
GEMC1_Exp_R	Nishodni	5'-GGGATGGGGAATCTCAGCAGG-3'	21 bp
MCIDAS_Exp_F	Ushodni	5'-GCCTTCGACAGCATCTGCCCC-3'	21 bp
MCIDAS_Exp_R	Nishodni	5'-GCCTGTGCATCCGGGGAAGAAC-3'	22 bp

FOXj1_Exp_F	Ushodni	5'-GCCACGCAGATCCCACCTGG-3'	20 bp
FOXj1_Exp_R	Nishodni	5'-GCCAGAAGCCCCCTTGC-3'	18 bp
RFX3_Exp_F	Ushodni	5'-GGATTCGTGTCAAGCCAGATTCCC-3'	24 bp
RFX3_Exp_R	Nishodni	5'-GCCTGTCTGTTGACCACTTCCTG-3'	23 bp
CCNO_Exp_F	Ushodni	5'-CTGCTTGGGGTCCACCTCCTTGC-3'	22 bp
CCNO_Exp_R	Nishodni	5'-GCAGCTTGTGCAGCACGATGC-3'	21 bp
Notch1_Exp_F	Ushodni	5'-GCAAGTCCGCCCTGCACTGG-3'	20 bp
Notch1_Exp_R	Nishodni	5'-GCGGTCTCGTAGCTGCCCTCC-3'	21 bp

Ekspresioni profili gena *GEMC1*, *MCIDAS*, *FOXJ1*, *RFX3*, *CCNO* i *NOTCH1*, utvrđeni su korišćenjem *KAPA SYBR Green Universal* qPCR kita (*KAPA Biosystems*, Sjedinjene Američke Države) na aparatu *ABI 7900 Real-Time PCR System* (*KAPA Biosystems*, Sjedinjene Američke Države) i analizirani su u 5 različitih vremenskih tačaka (0. dan, 3. dan, 5. dan, 10. dan i 15. dan). Za normalizaciju dobijenih rezultata, uporedo sa uzorcima analizirana je ekspresija gena *GAPDH* (endogena kontrola).

Reakciona smeša ukupnog volumena 10 μ l sastojala se od sledećih komponenti u finalnim koncentracijama: 10 ng cDNK, 1x *Kapa Syber Fast Universal qPCR Master Mix*, 1x *ROX High* referentna boja i 10 μ M prajmera. Temperaturni profil reakcije korišćene za amplifikaciju gena *GEMC1*, *MCIDAS*, *FOXJ1*, *RFX3*, *CCNO*, *NOTCH1* i *GAPDH* dat je u Tabeli 8.

3.8. OPTIMIZACIJA APLIKACIJE MOLEKULA cAMP I IMUNODETEKCIJA FOSFORILISANIH PROTEINA

Ciklični 3'-5'-adenozin monofosfat, molekulske težine 329.21 g/mol (*Sigma*, Sjedinjene Američke Države) je korišćen za analizu potencijalne aktivacije PKA i nishodne fosforilacije ciljnih proteina.

Ćelijska linija A549 tretirana je molekulom cAMP finalnih koncentracija 300 μ M i 600 μ M u trajanju od 5min, 15min, 30min i 60min. Pre tretmana ćelija malim molekulom, optimizovani su uslovi permeabilizacije ćelijske membrane koja će omogućiti ulazak cAMP molekula.

3.8.1 METODE ZA PERMEABILIZACIJU ĆELIJSKE MEMBRANE

Transfekcija ćelijske linije A549

Transfekcija je izvršena upotrebom reagensa *Lipofectamine*® 2000 (*ThermoFisher Scientific*, Sjedinjene Američke Države) prema uputstvu proizvođača. Konfluentnost ćelija u trenutku transfekcije bila je 70% (<http://www.nanopartikel.info/>). Kao marker kvantifikacije stepena transfekcije ćelija korišćen je GFP-tagovan plazmid pX458 (Addgene #48138). Ćelije su transfektovane sa 10 µl i 20 µl reagensa *Lipofectamine*® 2000 u trajanju od 24h i 48h, u cilju određivanja koncentracije reagensa koji će dati bolje rezultate. Nakon 24h odnosno 48h, procenat fluorescentnih ćelija detektovan je upotrebom fluorescentnog mikroskopa (*Olympus BX51 fluorescence microscope*, Tokio, Japan).

Permeabilizacija ćelijske membrane upotrebom 10% glicerola

Ćelije u finalnoj koncentraciji od 0.7×10^6 tretirane su sa 10% glicerola rastvorenim u PBS-u (eng. *Phosphate Buffered Saline*, PBS), u trajanju od 3 min, nakon čega je glicerol otklonjen i ćelije su tretirane malim molekulom rastvorenim u medijumu za gajenje ćelijske linije A549.

3.8.2. TRETMAN ĆELIJSKE LINIJE A549 MOLEKULOM cAMP

Protokol za tretman ćelija molekulom cAMP:

Ćelijska linija A549 kultivisana je u petri šoljama promera 34.8 mm u standardnom medijumu. Nakon dostizanja konfluentnosti od 100%, pristupljeno je tretmanu cAMP-om.

1. Nakon usisavanja medijuma vakuumom, ćelijski sloj je ispran sa 10% glicerola u PBS-u u trajanju od 3 min, a zatim je otklonjen usisavanjem.
2. Ćelije su tretirane sa 300 µM i 600 µM koncentracijom molekula cAMP rastvorenog u medijumu.

3. Nakon 5 min, 15 min, 30 min i 60 min usisan je medijum iz ćelija, a potom su ćelije tretirane tripsinom rastvorenim u PBS-u u cilju odlepljivanja od podloge. Nakon delovanja enzima (5 min) na 37°C, reakcija je zaustavljena dodavanjem standardnog medijuma u odnosu 1:1 prema dodatoj količini tripsina.
4. Ćelijski talozi su centrifugirani 4 min na 300g, isprani PBS-om, rastvoreni u puferu NP-40 (korišćen je za prezervaciju fosfatnih grupa), stavljeni na led 30 min, a potom centrifugirani 15 min na 13000 rpm (+ 4°C).
5. Supernatanti su prebačeni u nove prethodno ohlađene tube.

3.8.3. DETEKCIJA FOSFORILISANIH PROTEINA

Detekciji fosforilisanih proteina prethodilo je merenje koncentracije celokupnih proteina izolovanih iz ćelijske linije A549, upotrebom *Bradford* reagensa, nakon čega su svi uzorci normalizovani na 150 µg. Radi utvrđivanja veličine proteina, uporedo sa uzorcima je na gel nanošen i komercijalni proteinski marker (*Dual Color ladder, Bio Rad*).

Za detekciju fosforilisanih serina iz 9 uzoraka različito tretiranih ćelija metodom Wb, korišćeno je primarno, monoklonsko, anti-fosfoserinsko antitelo proizvedeno u mišu (*Sigma, Sjedinjene Američke Države*). Antitelo je razblaženo u odnosu 1 na 1000, i membrana je tretirana 24h, nakon čega je usledio tretman sekundarnim antitelom. Sekundarno antitelo koje je upotrebljeno je anti-mišje IgG antitelo konjugovano sa peroksidazom rena (*GE Healthcare, Sjedinjene Američke Države*). Dilucija sekundarnog antitela bila je 1 u 10.000, a inkubacija membrane sa sekundarnim antitelom trajala je 1 h.

Vizuelizacija formiranih kompleksa ostvarena je dodavanjem hemiluminescentnog agensa (*ECL, Amersham Pharmacia Biotech*). Radi dobijanja optimalnog signala, film je inkubiran sa membranom u trajanju od 15 min, 45 min, 1 h, 1 h i 30 min, 2 h i 30 min.

Bojenje membrane Ponceau S metodom

PDVF membrana sa različito tretiranim uzorcima ćelijske linije A549 tretirana je rastvorom *Ponceau S* u trajanju od 5 min. *Ponceau S* je negativno naelektrisana boja koja interaguje sa pozitivno naelektiranim aminokiselinama iz proteina.

4. REZULTATI

4.1. GENOMSKO PROFILISANJE PACIJENATA SUSPEKTIH NA PCD U SRBIJI

4.1.1. DEMOGRAFSKI I KLINIČKI OPIS ISPITANIKA UKLJUČENIH U STUDIJU

Studija je obuhvatila 21. pacijenta, 8 članova porodice (roditelji, sestre i braća) i kontrolnu grupu uzoraka od 69 ispitanika iz opšte populacije Srbije. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata prikazane su u Tabeli 12. Dodatni simptomi koji su detektovani sporadično kod pacijenata su hronična sekretorna upala srednjeg uha, hemoptizije i smanjena plodnost kod određenih pacijenata muškog pola koji su u reproduktivnom periodu života. Roditelji analiziranih pacijenata su se izjasnili da u njihovim porodicama nije došlo do ukrštanja u srodstvu.

Svi pacijenti su bili negativni na prisustvo *P. aeruginosa*, koncentracija hlorida u testu znojenja nije bila povišena i nisu detektovane homozigotne genetičke varijante u genu *CFTR* čime je odbačena mogućnost da je finalna dijagnoza kod pacijenata cistična fibroza.

Tabela 12. Demografski i klinički parametri pacijenata suspektih na PCD

Karakteristike	Pacijenti
Pacijenti muškog pola	11 (52.40%)
Pacijenti ženskog pola	10 (47.60%)
Dijagnostičke procedure	
Simptomi	
Bronhoektazije	17 (80.95%)
Hronični sinuzitis	19 (90.47%)
Neonatalni respiratorni distres	17 (80.95%)
Učestala upala pluća	9 (42.86%)
Laterálnost organa	
<i>Situs inversus</i>	10 (47.60%)
<i>Situs solitus</i>	11 (52.40%)
<i>Situs ambiguous</i>	0
Pokretljivost cilija	
Pokretne:	4 (19.05%)
Normalan obrazac kretanja cilija	1/4 (25.00%)
Izmenjen obrazac kretanja cilija	3/4 (75.00%)
Nepokretne cilije	17 (80.95%)

4.1.2. DETERMINACIJA GENETIČKE OSNOVE PCD PACIJENATA U SRBIJI

Analiza genetičke osnove bolesti kod 21. pacijenta suspektnog na PCD, urađena je metodom sekvenciranja nove generacije na platformi sa 4813 gena uzročnika različitih kliničkih fenotipova, i detektovano je između 7.000 i 9.000 varijanti po pacijentu.

Prvi korak u analizi podataka podrazumevao je upotrebu softvera *Variant Studio 2.0 i 3.0* i podešavanje mnogobrojnih parametara u okviru softvera koji omogućavaju selekciju varijanti od interesa. Ovi parametri omogućavaju prikazivanje samo selektovanih varijanti koje su: određenog genotipa, sa određenog hromozoma; varijante koje su po tipu patogene, potencijalno patogene ili nepoznatog uticaja; varijante koje menjaju aminokiseline, menjaju okvir čitanja sekvence, uvode prevremeni stop kodon, dovode do gubitka stop kodona, insercije, delecije, insercije i delecije koje ne menjaju okvir čitanja sekvence, varijante koje menjaju mesto iskrajanja; varijante koje imaju učestalost manju od 5%. Nakon upotrebe ovih parametara, broj varijanti se smanjio na oko 100 varijanti po pacijentu.

Pretraživanjem literature i korišćenjem baza OMIM i *String Interaction Network*, izvršena je prioritizacija gena uzročnika i gena kandidata za PCD, i gena koji pripadaju istoj familiji gena kao i PCD geni. Na ovaj način odabrano je 29 gena, čiji su nazivi, ćelijske lokalizacije i funkcije proteinskih produkata, kao i učestalost patogenih varijanti u njima, prikazani u Tabeli 13.

Kako je PCD bolest koja se nasleđuje recesivno, za analizu je upotrebljen recesivni model nasleđivanja koji je obuhvatio homozigotne varijante, heterozigotne varijante u istom genu (*compound* heterozigoti), kao i heterozigotne varijante u dva gena (trans-alelski heterozigoti).

Analizom 29 gena ukupno je detektovano 2210 genetičkih varijanti, koje su potom potražene u genetičkim profilima 69 ispitanika opšte populacije sa teritorije Srbije. Analizom ispitanika iz opšte populacije odbačene su populaciono specifične varijante koje nisu uzročnici bolesti, kao i sve preklapajuće varijante između pacijenata i ispitanika.

Tabela 13. Lista PCD gena uzročnika i gena kandidata analiziranih u ovoj studiji

Geni uzročnici PCD	Proteinska lokalizacija/funkcija	Varijante detektovane u našoj studiji	Učestalost detektovanih varijanti
<i>CCDC39</i>	N-DRC	-	0%
<i>CCDC40</i>	N-DRC	+	11.11%
<i>CCDC103</i>	Citoplazma, asembliranje ODA	-	0%
<i>DNAAF1 (LRRC50)</i>	Citoplazma, asembliranje DA	-	0%
<i>DNAAF2 (KTU)</i>	Citoplazma, asembliranje DA	-	0%
<i>DNAAF3</i>	Citoplazma, asembliranje DA	-	0%
<i>DNAI1</i>	ODA	+	16.66%
<i>DNAI2</i>	ODA	-	0%
<i>DNAL1</i>	ODA	+	16.66%
<i>DNAH1</i>	ODA	-	0%
<i>DNAH5</i>	ODA	+	27.77%
<i>DNAH9</i>	ODA	-	0%
<i>DNAH11</i>	ODA	+	5.55%
<i>HEATR2</i>	Citoplazma, asembliranje DA	-	0%
<i>HYDIN</i>	CP	-	0%
<i>LRRC6</i>	Citoplazma, asembliranje DA	+	5.55%
<i>NME8 (TXNDC3)</i>	ODA	+	0%
<i>OFD1</i>	Citoplazma	-	0%
<i>RPGR</i>	Citoplazma	-	0%
<i>RSPH4A</i>	RS	-	0%
<i>RSPH9</i>	RS	-	0%
Geni kandidati za PCD			

<i>CCDC8</i>	Regulacija mikrotubularne dinamike	-	0%
<i>CCDC50</i>	Asociran sa mikrotubularnim strukturama	-	0%
<i>CCDC88</i>	Uloga u ciliogenezi i morfologiji cilija	-	0%
<i>DYNC1H1</i>	Motorna aktivnost mikrotubula	-	0%
<i>NME1</i>	Centrozom	-	0%
<i>SPAG16</i>	Uloga u ciliogenezi	+	11.11%
<i>SPAG17</i>	Uloga u pravilnom funkcionisanju aksonema	+	5.55%
<i>TCTE1</i>	Komponenta aksonemalnog i citoplazmatičnog dineina	-	0%

Za determinaciju patogenosti detektovanih varijanti upotrebljene su sledeće baze podataka: VarSome, InterVar, HGMD i ClinVar. Analiza varijante upotrebom baze podataka VarSome dobijaju se informacije brojne informacije kao što su učestalost varijante u homozigotnom i heterozigotnom stanju, patogenost, biološki značaj. Baza podataka InterVar klasifikuje varijante u skladu sa 28 kriterijuma: na patogene ili potencijalno patogene (P/LP), benigne ili potencijalno benigne (B/LB) i varijante nepoznatog značaja (kontradiktorni rezultati). Baza podataka HGMD (eng. *Human Gene Mutation Database*, HGMD), predstavlja kolekciju svih poznatih (objavljenih) genetičkih varijanti koje su odgovorne za humane nasledne bolesti. ClinVar je javna arhiva izveštaja o asocijaciji između genetičkih varijanti i fenotipova. Upotrebom ovih baza, dobijaju se info o tome da li su varijante od interesa već prijavljene, da li su detektovane u humanoj populaciji, da li su asocirane sa PCD-om i da li su patogene.

Dodatno, *in silico* programi DANN, MutationTaster, FATHMM, GERP i MetalR su upotrebljeni za predikciju patogenosti varijante na osnovu evolucione konzerviranosti sekvence iRNK, procesa iskrajanja, proteina i regulatornih funkcija. Za predikciju efekata varijanti na strukturu i funkciju proteina upotrebljeni su programi SIFT, Provean i PolyPhen2.

4.1.2.1. Varijante detektovane u genima uzročnicima i genima kandidatima za PCD

Upotrebom gore navedenih baza podataka i *in silico* programa za determinaciju patogenosti varijanti, detektovano je ukupno 18 patogenih genetičkih varijanti (Tabela 14). Ove varijante su

detektovane u genima uzročnicima i genima kandidatima za PCD i mogu se smatrati potencijalnim genetičkim uzročnicima ove bolesti.

Od 18 detektovanih varijanti kod 14 pacijenata (12 nesrodnih pacijenata), 15 varijanti kod 11 pacijenata (9 nesrodnih pacijenata) je ispunilo kriterijum recesivnog nasleđivanja. Homozigotne genetičke varijante detektovane su kod 3 pacijenta, udružene heterozigotne varijante detektovane su kod 4 pacijenta, trans-alelske heterozigotne varijante su detektovane kod 2 pacijenta i 3 monoalelske genetičke varijante su detektovane kod preostala 3 pacijenta.

Patogene genetičke varijante detektovane su u genima *CCDC40*, *DNAI1*, *DNALI1*, *DNAH5*, *DNAH11*, *LRRC6*, *SPAG16* i *SPAG17* (Tabela 14). Geni koji su najčešće bili pogođeni patogenim varijantama u našoj kohorti pacijenata bili su *DNAH5* (27.77%), *DNAI1* (16.66%) i *DNALI1* (16.66%) (Tabela 13). Pozicija svih detektovanih varijanti determinisana je u odnosu na referentne cDNK sekvence i po preporuci Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen>). RefSeq pristupni brojevi za sekvence koje su upotrebljene u analizi su sledeći: NM_017950.3 (*CCDC40*), NM_012144.2 (*DNAI1*), NM_001369.2 (*DNAH5*), NM_031427.3 (*DNALI1*), NM_001277115.1 (*DNAH11*), NM_012472.3 (*LRRC6*), NM_024532.4 (*SPAG16*) i NM_206996.2 (*SPAG17*).

Klasifikacija detektovanih varijanti upotrebom baza podataka i in silico programa za predikciju efekta varijante

ACMG klasifikacija

Višestruki kriterijumi koji su dodeljeni svakoj pojedinačnoj genetičkoj varijanti nakon analize upotrebom softvera InterVar, prikazani su u Tabeli 14, a detaljan opis svakog kriterijama dat je u daljem tekstu.

U okviru ove studije, varijante c.248delC i c.2440C>T u genu *CCDC40* i varijanta c.4356-2A>G u genu *DNAH5*, klasifikovane su kao PVS1. Ovaj kriterijum obuhvata varijante koje uvode stop kodon, male insercije i delecije koje menjaju okvir čitanja i varijante koje menjaju kanonsko mesto iskrajanja, i koje najčešće dovode do gubitka funkcije proteina (eng. *Loss of function*, LOF).

Varijanta c.248delC u genu *CCDC40*, takođe je klasifikovana i kao PS3. Ovaj kriterijum se dodeljuje varijantama koje su *in vivo* i *in vitro* funkcionalno ispitane i dokazan je njihov štetni efekat.

PM1 oznaka dodeljena je varijantama c.350T>G u genu *DNALI*, c.8533C>G u genu *DNAH11* i c.1067G>A u genu *SPAG16*. Ovaj kriterijum obuhvata *missence* varijante koje se nalaze u regionima gena koji kodiraju domene proteina koji su esencijalni za njihovu funkciju, pa se smatra da je svaka promena u ovom regionu štetna za protein.

Varijante c. 2440C>T u genu *CCDC40*, c.1684G>A u genu *DNAI1*, c.4356-2A>G u genu *DNAH5*, c.347A>T, c.350T>G i c.485G>A u genu *DNALI*, c.27T>G u genu *LRRC6* i c.8533C>G u genu *DNAH11*, klasifikovane su kao PM2. Ovaj kriterijum obuhvata varijante koje imaju ekstremno nisku frekvenciju u velikim kohortama kontrola, kao i varijante koje uzrokuju recesivne bolesti.

Varijante c. 2440C>T u genu *CCDC40* i c.485G>A u genu *DNALI*, klasifikovane su kao PM4. Ovaj kriterijum se primenjuje kada su u pitanju male insercije i delecije koje ne menjaju okvir čitanja ili varijante koje dovode do gubitka stop kodona, i detektovane su u regionu gena koji nema repetitivne sekvence.

Varijanta c.27T>G u genu *LRRC6* prvobitno je klasifikovana kao BS4 (nedostatak informacije o segregaciji ili nedostatak segregacije u porodici). Nakon segregacione analize roditelja i brata obolelog pacijenta, varijanta je još jednom prošla klasifikacionu analizu, i uz dodatne informacije o segregaciji, označena je kao PP1. Ova klasifikacija obuhvata varijante koje se nalaze u poznatim genima uzročnicima bolesti i za koje je potvrđen obrazac nasleđivanja, jer je to važan parametar koji će povezati varijantu sa oboljenjem.

Varijanta c. 473A>T u genu *SPAG17* i varijanta c. 2440C>T u genu *CCDC40*, su klasifikovane kao PP2. Ovaj kriterijum podrazumeva da u ispitivanom genu *missence* varijante najčešće dovode do bolesti i da postoji jako mali broj prijavljenih benignih *missence* varijanti, pa se očekuje da se analizirana *missence* promena biti patogena.

Kada mnogobrojne *in silico* analize potvrde oštećujući efekat ispitivane varijante na gen ili genski produkt (konzerviranost, mesto iskrajanja, itd), varijante će biti klasifikovane kao PP3. U našoj studiji, na ovaj način su klasifikovane sledeće varijante: c.1684G>A u genu *DNAI1*, c.4356-2A>G, c.7624T>C, c.8999G>A, c.1206T>A u genu *DNAH5*, c.347A>T, c.350T>G i c.485G>A u genu *DNALI* i c. 331G>A u genu *SPAG16*.

Nukleotidna promena c. 473A>T u genu *SPAG17* klasifikovana je kao BA1. Ova klasifikacija obuhvata varijante čija je učestalost u *NHLBI Exome Sequencing Project* (ESP6500), 1000 Genomes Project i ExAC bazama podataka veća od 5%.

Varijanta c.8533C>G u genu *DNAH11*, označena je kao BP1, BP4 i BP6. BP1 oznaka obuhvata *missence* varijante za koje se po statistici smatra da nemaju uticaj na protein, jer su najčešće varijante koje su uzrokovale oštećenje proteina uvodile stop kodon. Kada mnogobrojne *in silico* analize ne daju identične rezultate za ispitivanu varijantu, varijante su klasifikovane kao BP4. BP6 oznaka se varijantama dodeljuje kada postoji informacija u literaturi da je varijanta benigna, ali bez eksperimentalnih dokaza.

Promene c.1067G>A SPAG16 i c. 473A>T u genu *SPAG17*, označene su kao BS1, koji je kriterijum za sve varijante koje su prisutne >1-5% u homozigotnom stanju u kontrolnoj grupi ispitanika u bazi podataka 1000 *Genomes Project*, a smatra se da su uzročnici recesivne bolesti.

Baze podataka HGMD i ClinVar

Upotrebom ovih baza podataka, kao i detaljnim pretraživanjem literature, ustanovljeno je da je 12 od 18 patogenih genetičkih varijanti novootkriveno u našoj studiji. ClinVar pristupni brojevi varijanti koje su poznate, kao i reference iz baze HGMD za varijante koje su prijavljene, prikazani su u Tabeli 14.

In silico predikcija patogenosti varijante

Softver DANN (eng. *Deleterious annotation of genetic variants using neural networks*, DANN) korišćen je za predikciju patogenosti 18 detektovanih varijanti. Informacija o patogenosti dobija se u vidu broja, sa opsegom vrednosti od 0 do 1, gde vrednost 1 označava patogenost.

Analizom genetičkih varijanti u ovoj studiji, detektovan je opseg vrednosti između 0.9813-0.993 za sve varijante osim za: c. 248delC (*CCDC40*), c. 947_948insG (*DNAI1*), c.1345_1349delCTTAA (*DNAI1*), c.8012A>G (*DNAH5*), c.350T>G (*DNALI*), za koje informacije nisu bile dostupne.

Softver SIFT (eng. *Sorts Intolerant From Tolerant*, SIFT) je *in silico* prediktivni alat koji se bazira na homologiji između analizirane sekvence i sličnih sekvenci iz baze PSI-BLAST. Opseg vrednosti SIFT rezultata se kreće od 0 (oštećujuća)-1 (tolerišuća).

Softver Provean (*Protein Variation Effect Analyzer*) je *in silico* alat koji vrši predikcije kako nesinonimne varijante ili male insercije i delecije koje ne menjaju okvir čitanja sekvence, mogu da utiču na funkcionalnost proteina. Za razdvajanje štetnih i neutralnih varijanti prag vrednosti je postavljen na -2.5 za binarnu klasifikaciju (tj. štetno protiv neutralnog). Ako je rezultat

Provean analize jednak ili ispod predefinisiranog praga od -2.5, predviđa se da je varijanta proteina "oštećujuća".

Analiza detektovanih varijanti u našoj kohorti pacijenata, upotrebom prediktivnih programa SIFT i Provean, pokazala je da je za 14 varijanti finalni status bio "oštećujuća". Za 4 genetičke varijante: c.248delC (*CCDC40*), c.947_948insG (*DNAI1*), c.1345_1349delCTTAA (*DNAI1*) i c.4356-2A>G (*DNAH5*), rezultati nisu bili dostupni, jer ovi programi nisu predviđeni za analizu malih insercija i delecija koje menjaju okvir čitanja, kao ni za varijante koje menjaju kanonsko mesto iskrajanja (Tabela 14).

Tabela 14. Spektar detektovanih genetičkih varijanti kod PCD pacijenata sa teritorije Srbije koje se smatraju uzročnicima ove bolesti

GEN	dbSNP ID	Genomske koordinate	Genetičke varijante		Frekvencija alela (%) ^a	ACMG klasifikacij ^a ^b	DANN ^c	SIFT/Provean ^d	ID pacijenta	Reference iz HGMD/ClinVar
			Nucleotidna zamena	Aminokiselinska zamena						
CCDC40	rs397515393	chr17-78013765	c. 248delC	p.Ala83ValfsTer84	0	Patogena (PVS1, PS3)	Nije dostupno	Nije primenljivo	P5	[158]
	rs747233125	chr17-78060006	c. 2440C>T	p.Arg814Ter	0	Patogena (PVS1, PM2, PM4, PP2)	0.9899	Oštećujuća	P13, P14	[88]
DNAI1	-	chr9-34500765	c. 947_948insG	p.Thr318TyrfTer11	nepoznata	Nije dostupno ^e	Nije dostupno	Nije primenljivo	P9, P10	novootkrivena
	rs867262419	chr9-34512140	c.1345_1349delCTTAA	p.Asn450LeufsTer6	0	Nije dostupno ^e	Nije dostupno	Nije primenljivo	P21	novootkrivena
	-	chr9-34514506	c.1684G>A	p.Asp562Asn	0	Nepoznatog značaja (PM2, PP3)	0.9993	Oštećujuća	P21	novootkrivena
DNAH5	-	chr5-13864748	c. 4356-2A>G	-	0	Patogena (PVS1, PM2, PP3)	0.9949	Nije primenljivo	P4	novootkrivena
	-	chr5-13809281	c.7624T>C	p.Trp2542Arg	0	Nepoznatog značaja (PM2, PP3)	0.9919	Oštećujuća	P4	novootkrivena
	rs137949961	chr5-13777417	c.8999G>A	p.Arg3000Gln	0.26	Nepoznatog značaja (PP3)	0.9989	Oštećujuća	P6	ClinVar 219734
	rs140782270	chr5-13914743	c.1206T>A	p.Asn402Lys	0.13	Nepoznatog značaja (PM2, PP3)	0.9979	Oštećujuća	P20	ClinVar 188080
	-	chr 5-13718980	c.8012A>G	p.Gln2701Arg	0	Nije dostupno ^e	Nije dostupno	Oštećujuća	P20	novootkrivena
DNAL1	rs751754576	chr14-74154044	c.347A>T	p.Lys116Ile	0	Nepoznatog značaja	0.9926	Oštećujuća	P1	novootkrivena

						(PM2, PP3)				
	rs535885451	chr14-74154047	c.350T>G	p.Leu117Trp	0	Nepoznatog značaja (PM1, PM2, PP3)	Nije dostupno	Oštećujuća	P1	novootkrivena
	-	chr14-74156171	c.485G>A	p.Trp162Ter	0	Nepoznatog značaja (PM2, PM4, PP3)	0.9946	Oštećujuća	P1	novootkrivena
LRRC6	rs200906172	chr8-133673857	c.27T>G	p.Ile9Met	0	Nepoznatog značaja (PM2, PP1)	0.9907	Oštećujuća	P2	ClinVar 473106
DNAH11	-	chr7- 21788220	c.8533C>G	p. Arg2845Gly	0.13	Potencijalno benigna (PM1, PM2, PP5, BP1, BP4, BP6)	0.9813	Oštećujuća	P3	ClinVar 359658
SPAG16	rs61752199	chr2-214354811	c.1067G>A	p.Ser356Asn	2	Nepoznatog značaja (PM1, BS1)	0.9964	Oštećujuća	P8	novootkrivena
	-	chr2-214174834	c. 331G>A	p.Asp111Asn	0	Nepoznatog značaja (PP3)	0.9993	Oštećujuća	P11	novootkrivena
SPAG17	rs17185492	chr1-118644524	c. 473A>T	p.Glu158Val	17	Benigna (PP2, BS1, BA1)	0.9927	Oštećujuća	P8, P11	novootkrivena

^a Prema podacima iz baze podataka VarSome (1000 Genome Project, ExaC);

^b ACMG: *American College of Medical Genetics and Genomics*. Klasifikacije su objašnjene u poglavlju 4.1.2.1

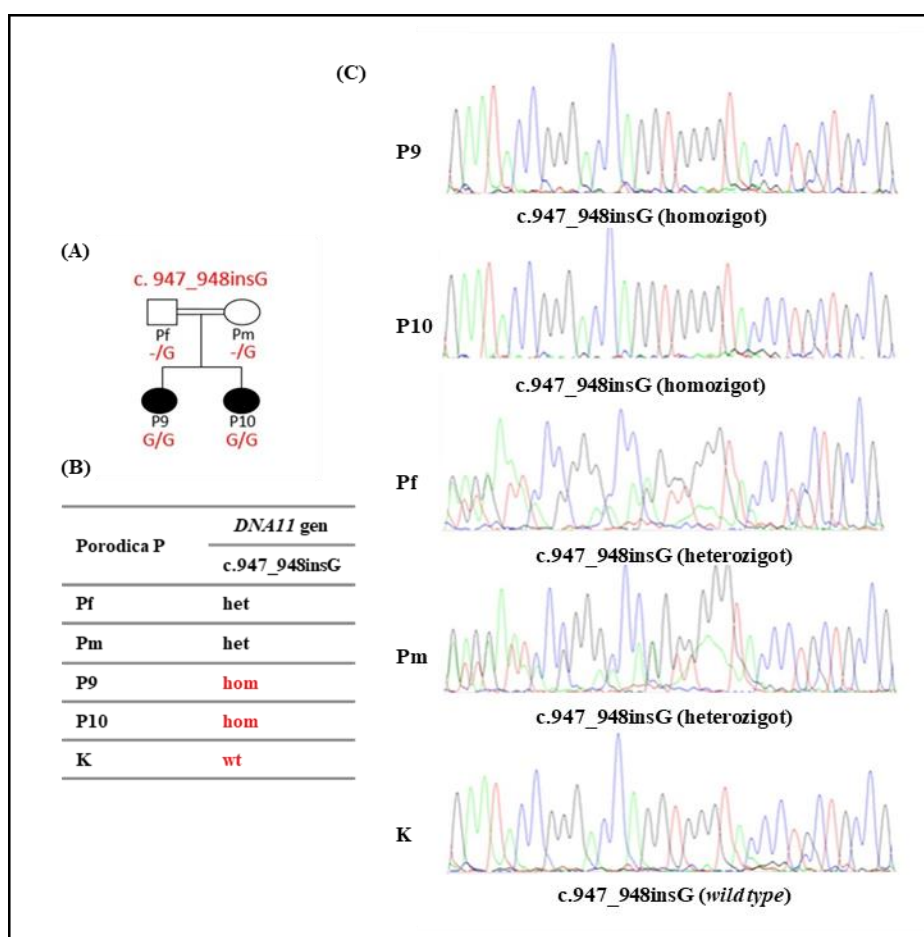
^c DANN: *Deleterious annotation of genetic variants using neural networks*.

^d SIFT: *Sorts intolerant from tolerant*. Provean: *Protein Variation Effect Analyzer*.

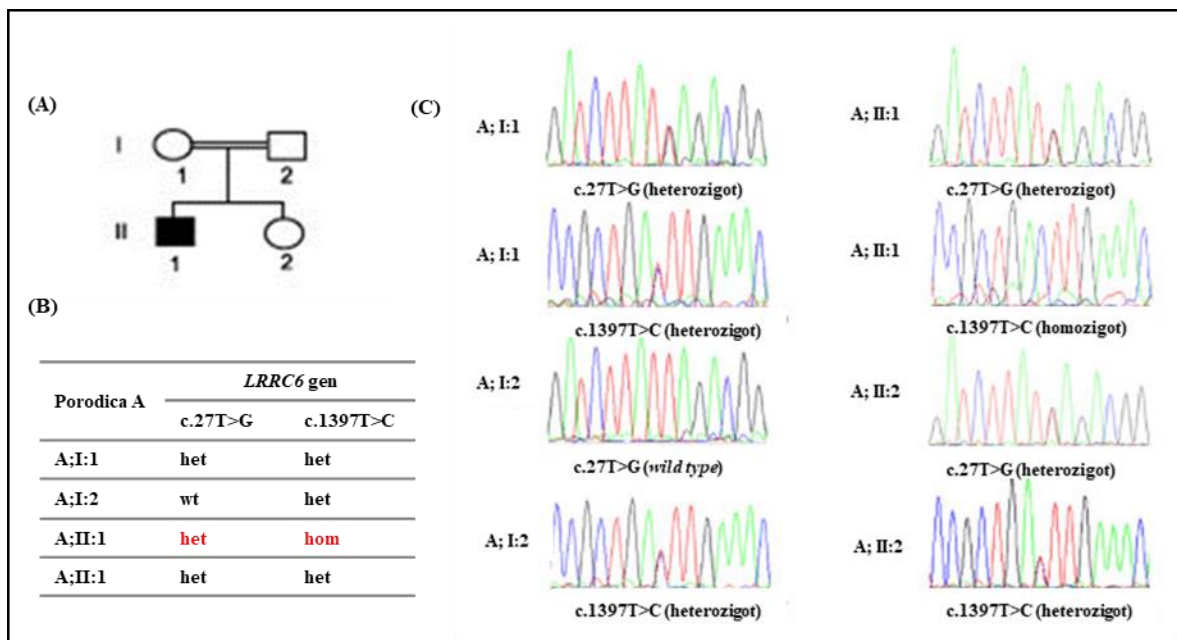
^e Označena varijanta nema automatsku ACMG/AMP interpretaciju.

4.1.3. VERIFIKACIJA PATOGENIH GENETIČKIH VARIJANTI I SEGREGACIONA ANALIZA

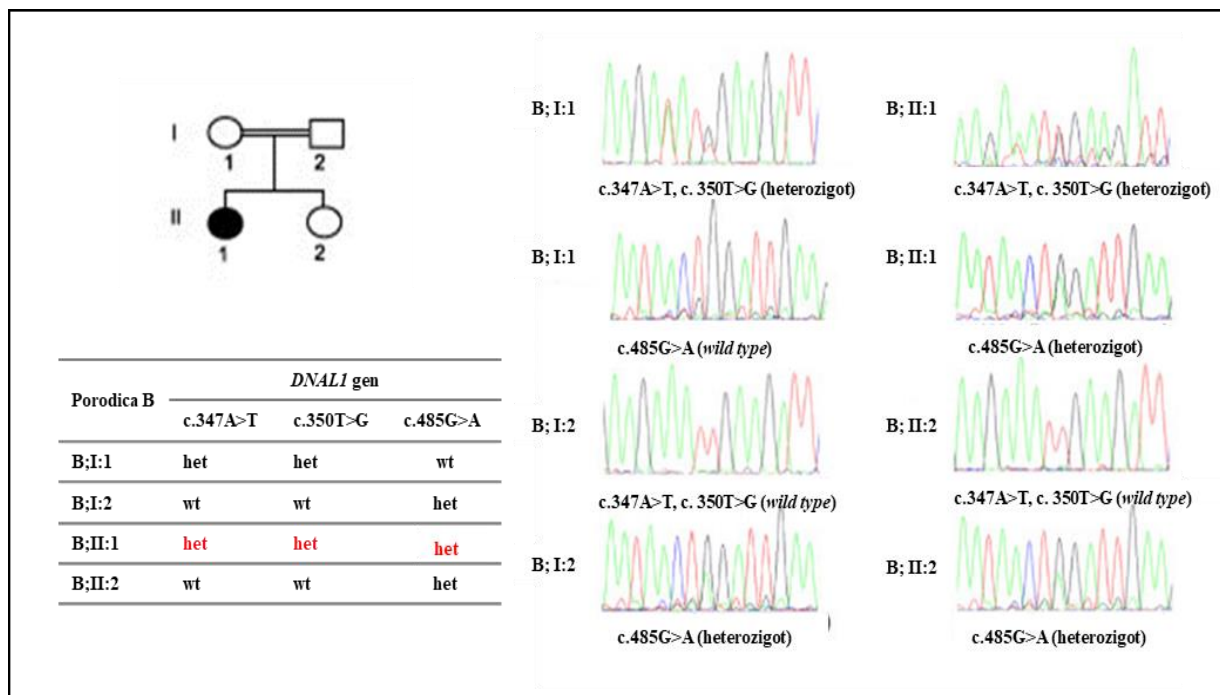
Za verifikaciju genetičkih varijanti detektovanih u genima uzročnicima i genima kandidatima za PCD kod pacijenata analiziranih u studiji, upotrebljeno je direktno sekvenciranje regiona od interesa Sangerovom metodom. Kod svih pacijenata potvrđene su genetičke varijante dobijene sekvenciranjem nove generacije, a segregaciona analiza urađena je za tri porodice čiji su uzorci bili dostupni (Slika 5, Slika 6 i Slika 7).



Slika 5. Verifikacija genetičke promene c.947_948insG, u egzonu 9 gena *DNAIL1* kod pacijenata i segregaciona analiza roditelja. (A) Rodoslovsko stablo porodice sa detektovanom varijantom c.947_948insG, u genu *DNAIL1*. (B) Tabelarni prikaz detektovane varijante kod roditelja (Pm i Pf), pacijenata (P9 i P10) i zdrave kontrole (K). (C) Region sekvence devetog egzona gena *DNAIL1* roditelja koji su heterozigotni nosioci varijante c.947_948insG, pacijenata koji su homozigotni nosioci varijante c.947_948insG i zdravog ispitanika koji nema analiziranu promenu. Za direktno sekvenciranje korišćen je nishodni prajmer (R), pa se sekvence poravnjavaju sa zadnje strane.



Slika 6. Verifikacija genetičkih varijanti c.27T>G i c.1397T>C u genu *LRRC6* kod pacijenta i segregaciona analiza roditelja i zdrave sestre. (A) Rodoslovsko stablo porodice sa detektovanim varijantama c.27T>G i c.1397T>C, u genu *LRRC6*. (B) Tabela prikaz detektovanih varijanti kod roditelja (A;I:1 i A;I:2), pacijenta (A;II:1) i zdrave sestre (A;II:2). (C) Analizirani region sekvence gena *LRRC6* majke koja je heterozigotni nosioc obe varijante, oca koji je heterozigotni nosioc varijante c. 1397T>C, pacijenta koji je heterozigotni nosioc varijante c.27T>G i homozigotni nosioc varijante c.1397T>C, i zdrave sestre koja ima isti genotip kao majka.



Slika 7. Verifikacija genetičkih varijanti c.347A>T, c.350T>G i c.485G>A u genu DNALI kod pacijenta i segregaciona analiza roditelja i zdrave sestre. (A) Rodoslovsko stablo porodice sa detektovanim varijantama c.347A>T, c.350T>G i c.485G>A u genu DNALI. (B) Tabela prikaz detektovanih varijanti kod roditelja (B;I:1 i B;I:2), pacijenta (B;II:1) i zdrave sestre (B;II:2). (C) Analizirani region sekvence gena LRRC6 majke koja je heterozigotni nosioc varijanti c.347A>T i c.350T>G, oca koji je heterozigotni nosioc varijante c.485G>A, pacijenta koji je heterozigotni nosioc sve tri analizirane varijante i zdrave sestre koja ima isti genotip kao otac.

4.2. IDENTIFIKACIJA MUTACIONOG PROFILA PACIJENATA KOD KOJIH NISU DETEKTOVANE VARIJANTE U GENIMA RELEVANTNIM ZA PCD

Dizajn strategije za diferencijalnu dijagnozu pacijenata

Analizom 29 gena kandidata i gena uzročnika za PCD, utvrđena je genetička osnova PCD-a kod 52.38% analiziranih pacijenata (11/21), dok kod 47.61% analiziranih pacijenata (10/21) nisu detektovane patogene varijante u navedenim genima. Kod 14.28% (3/10) pacijenata koja su ostala bez genetičke potvrde dijagnoze, pronađene su patogene monoalelske varijante u PCD genima uzročnicima (Tabela 14).

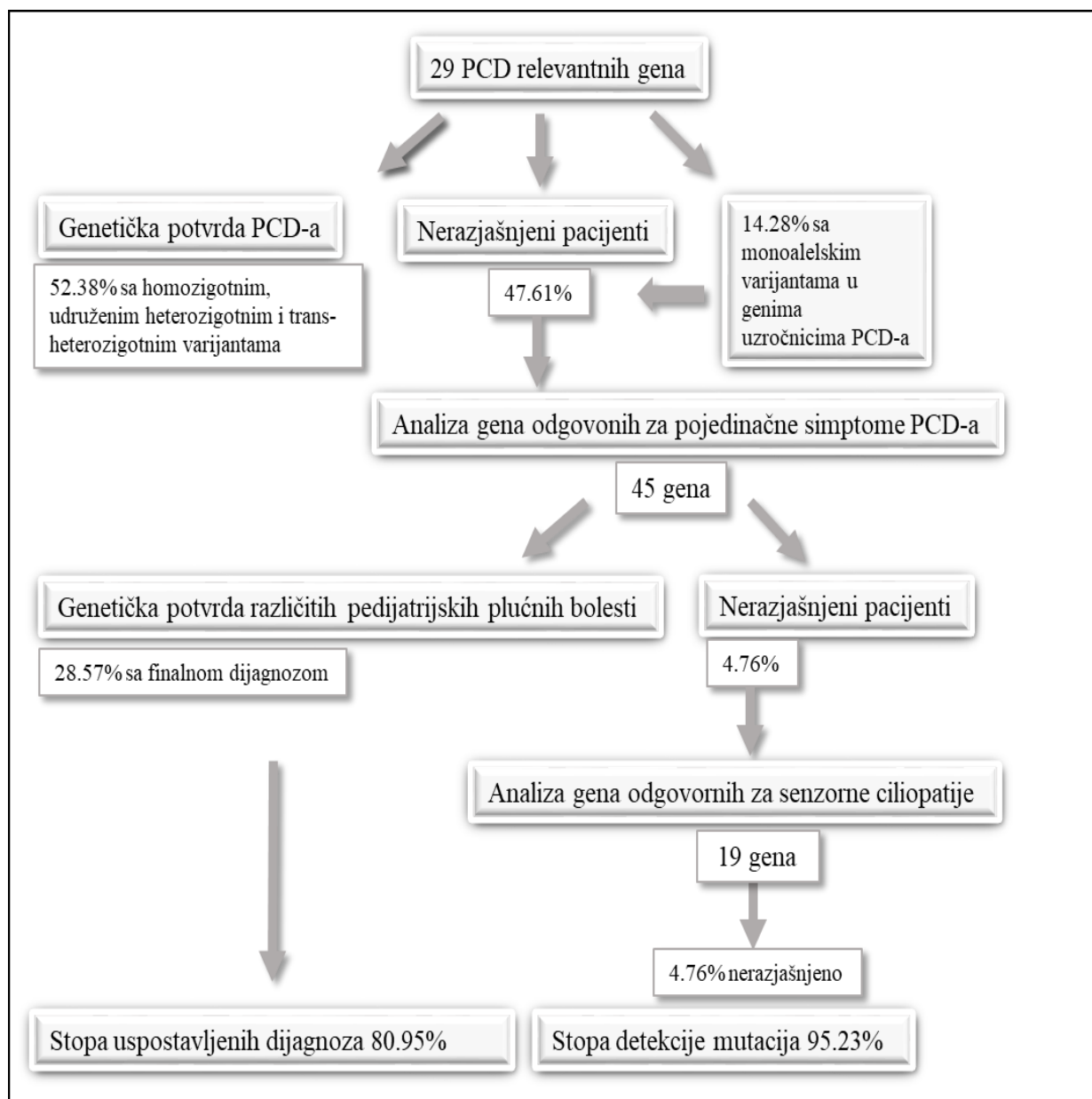
Kako bi se objasnila genetička osnova bolesti kod 47.61% nerazjašnjenih pacijenata, dizajnirana je strategija za diferencijalnu dijagnozu PCD pacijenata i pacijenata sa drugim pedijatrijskim plućnim bolestima koji imaju istu kliničku sliku kao PCD pacijenti (Slika 8). Strategija je pored 29 gena relevantnih za PCD obuhvatila još 45 gena (Tabela 15) koji su asocirani sa individualnim simptomima PCD-a, kao što su bronhiektazije, ektopična astma, sinuzitis i neonatalni respiratorni distres, kao i 19 gena (Tabela 15) odgovornih za senzorne ciliopatije.

Analizom 45 gena odgovornih za pojedinačne simptome PCD, uspostavljena je dijagnoza kod još 6/21 pacijenata (28.57%). Analizom 19 gena za ciliopatije nisu detektovane homozigotne, udružene heterozigotne ili trans-heterozigotne varijante koje bi rasvetlile genetičku osnovu bolesti kod preostalog pacijenta (4.76%).

Finalno, korišćenjem osmišljene strategije, stopa detektovanih mutacija dostigla je 95.23% (20/21 pacijenata), dok stopa uspostavljenih dijagnoza iznosi 80.95% (17/21 pacijenata).

Tabela 15. Lista od 64 izabrana gena koji su asocirani sa pojedinačnim simptomima pedijatrijskih plućnih bolesti

Geni odgovorni za pojedinačne simptome PCD-a					Geni odgovorni za senzorne ciliopatije		
<i>ABCA3</i>	<i>ABCC6</i>	<i>ABCA4</i>	<i>CFTR</i>	<i>SFTPA1</i>	<i>BBS1</i>	<i>BBIP10</i>	<i>TTC21B</i>
<i>ABCA1</i>	<i>ABCA13</i>	<i>ABCC11</i>	<i>MUC1</i>	<i>SFTPA2</i>	<i>BBS2</i>	<i>KIF3A</i>	
<i>ABCB1</i>	<i>ABCB6</i>	<i>ABCD4</i>	<i>MUC13</i>	<i>SFTPB</i>	<i>BBS3</i>	<i>KIF3B</i>	
<i>ABCC3</i>	<i>ABCC8</i>	<i>ABCA7</i>	<i>MUC2</i>	<i>SFTPC</i>	<i>BBS4</i>	<i>KAP</i>	
<i>ABCA10</i>	<i>ABCA2</i>	<i>ABCC2</i>	<i>MUC3A</i>	<i>SFTPD</i>	<i>BBS5</i>	<i>IFTA</i>	
<i>ABCB11</i>	<i>ABCB7</i>	<i>ABCG1</i>	<i>MUC4</i>	<i>SCNN1A</i>	<i>BBS6</i>	<i>IFTB</i>	
<i>ABCC4</i>	<i>ABCC9</i>	<i>ABCG2</i>	<i>MUC5B</i>	<i>SCNN1B</i>	<i>BBS7</i>	<i>IFT43</i>	
<i>ABCA12</i>	<i>ABCC1</i>	<i>ABCG5</i>	<i>MUC6</i>	<i>SCNN1G</i>	<i>BBS8</i>	<i>IFT80</i>	
<i>ABCB4</i>	<i>ABCD1</i>	<i>ABCG8</i>	<i>MUC7</i>	<i>SLC26A9</i>	<i>BBS9</i>	<i>IFT122</i>	



Slika 8. Predložena strategija za diferencijalnu dijagnozu između PCD pacijenta i drugih plućnih bolesti suspektnih na ciliopatije. Kandidati za genetičko testiranje su bili pacijenti sa *situs inversus totalis*, ili drugim abnormalnim položajem organa, sa bolestima gornjih i donjih disajnih puteva, istorijom neobjašnjivog neonatalnog respiratornog distresa, sterilitetom u reproduktivnom periodu i aberentnim cilijarnim pokretima. Dvadeset i jedan pacijent je imao više od dva gore navedena simptoma i analiziran je upotrebom *TruSightOne* platforme. Prvobitno su analizirani PCD geni uzročnici i geni kandidati (29 gena), i postavljena je dijagnoza PCD kod 11/21 pacijenata (52.38%). Analiza je potom proširena na gene odgovorne za pojedinačne simptome bolesti (45 gena) i gene odgovorne za senzorne ciliopatije (19 gena). Stopa detektovanih mutacija dostigla je 95%, dok je stopa uspostavljenih dijagnoza bila 81%.

4.2.1. VARIJANTE DETEKTOVANE U GENIMA ODGOVORNIM ZA POJEDINAČNE SIMPTOME PCD

Patogene genetičke varijante detektovane su u genima odgovornim za razvoj bronhiektazija (geni *SCNN1A* i *CFTR*), neonatalnog respiratornog distresa (gen *ABCA3*) i ektopične astme (gen *MUC2*). Pozicija svih detektovanih varijanti determinisana je u odnosu na referentne cDNK sekvence i po preporuci Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen>). RefSeq pristupni brojevi za sekvence koje su upotrebljene u analizi su sledeći: NM_001089.2 (*ABCA3*), NM_002457.2 (*MUC2*), NM_001159576.1 (*SCNN1A*), NM_000492.3 (*CFTR*) i NM_134325.2 (*SLC26A9*).

Od 6 pacijenata u kojima su detektovane patogene varijante u genima koji su odgovorni za pojedinačne simptome bolesti, 3 pacijenta je imalo istu genetičku varijantu c. 1654T>C, u genu *SCNN1A*. U uzorku jednog pacijenta varijanta je detektovana u homozigotnom stanju, dok je kod druga dva pacijenta bila udružena sa varijantom c. 3485G>A, u genu *CFTR*. U preostala 3 pacijenta, detektovane su sledeće varijante: varijanta c.2125C>T u heterozigotnom stanju, u genu *ABCA3*, homozigotna varijanta c.514G>A, u genu *SLC26A9* i udružene heterozigotne varijante u genu *MUC2* (c.5735G>T i c.8084T>G) (Tabela 16).

Detaljnim pretraživanjem literature i upotrebom baza podataka HGMD i ClinVar, utvrđeno je da je 5 od 6 genetičkih varijanti koje su detektovane kod 6/21 pacijenata, do sada neprijavljeno (Tabela 16).

Klasifikacija detektovanih varijanti upotrebom baza podataka i in silico programa za predikciju efekta varijante

ACMG klasifikacija i in silico predikcija patogenosti

Genetičke varijante: c.2125C>T, u genu *ABCA3*, c.514G>A, u genu *SLC26A9*, c.1654T>C, u genu *SCNN1A* i c. 3485G>A, u genu *CFTR* klasifikovane su kao PP3. Kada mnogobrojne in silico analize potvrde oštećujući efekat ispitivane varijante na gen ili genski produkt (konzerviranost, mesto iskrajanja, itd), dodeljuje im se ovaj rezultat.

Genetičke varijante c.1654T>C, u genu *SCNN1A* i c.3485G>A, u genu *CFTR* su dodatno klasifikovane kao BP6 varijante. BP6 oznaka se varijantama dodeljuje kada postoji informacija u literaturi da je varijanta potencijalno benigna, ali bez eksperimentalnih dokaza.

Varijante u genu MUC2 (c.5735G>T i c.8084T>G), nemaju automatsku interpretaciju u softveru InterVar, i zbog toga nisu stratifikovane prema ACMG/AMP klasifikaciji.

Sve detektovane varijante su okarakterisane kao patogene prema rezultatima *in silico* programa SIFT, Provean i PolyPhen2, i njihova učestalost je manja od 5% u Evropskoj populaciji.

Tabela 16. Lista genetičkih varijanti koje su detektovane u genima odgovornim za bronhiektazije, neonatalni respiratorni distres i ektopičnu astmu, i koje objašnjavaju genetičku osnovu kod 28.57% pacijenata.

GEN	dbSNP	Genetičke varijante		Frekvencija alela (%) ^a	ACMG klasifikacija	DANN	SIFT/Provean ^b	PolyPhen2 ^b	ID pacijenta	HGMD
		Nukleotidna zamena	Aminokiselinska zamena							
<i>ABCA3</i>	rs148671332	c.2125C>T	p.Arg709Trp	0	PP3	0.9989	Oštećujuća	<i>Deleterious</i>	P19	novootkrivena
<i>MUC2</i>	rs41359254	c.5735G>T	p.Gly1918Val	0.01	Nepoznatog značaja	Nije dostupno	Oštećujuća	<i>Deleterious</i>	P23	novootkrivena
	rs41386948	c.8084T>G	p.Ile2683Ser	0.02	Nepoznatog značaja	Nije dostupno	Oštećujuća	<i>Deleterious</i>		novootkrivena
<i>SLC26A9</i>	rs146704092	c.514G>A	p.Val172Met	0	PP3	Nije dostupno	Oštećujuća	<i>Deleterious</i>	P16	novootkrivena
<i>SCNN1A</i>	rs5742912	c.1654T>C	p. Trp552Arg	2.29	PP3, BP6	0.9961	Oštećujuća	<i>Deleterious</i>	P7, P17, P18	novootkrivena
<i>CFTR</i>	rs1800120	c.3485G>A	p.Arg1162Leu	0	PP3, BP6	0.9985	Oštećujuća	<i>Deleterious</i>	P17, P18	ClinVar RCV000671007.1

^a Prema podacima iz baze podataka VarSome (1000 Genome Project, ExaC);

^b SIFT, Provean i PolyPhen2: *In silico* programi za predikciju patogenosti detektovanih varijanti.

4.3. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVE VARIJANTE c.947_948insG, p.Thr318TyrfsTer11 U KODIRAJUĆEM REGIONU GENA *DNAII*

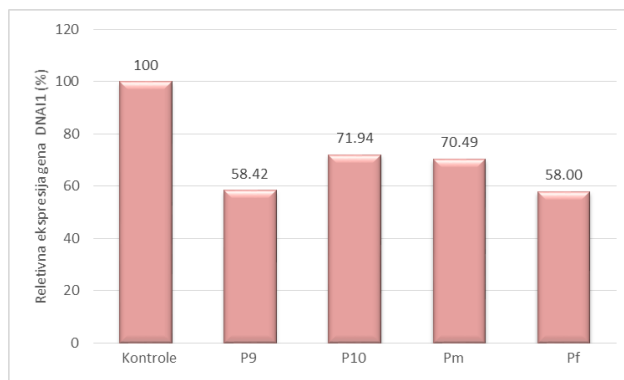
Genomskim profilisanjem pacijenata detektovano je 18 (12 novootkrivenih) genetičkih varijanti u PCD genima uzročnicima i genima kandidatima. Jedna genetička varijanta od 12 neopisanih, detektovana je u homozigotnom stanju, i pristupljeno je funkcionalnoj analizi njenog uticaja na strukturu i funkciju proteina.

U devetom egzonu gena *DNAII* detektovana je homozigotna varijanta c.947_948insG, p.Thr318TyrfsTer11, kod dve rođene sestre (obeleženi sa P9 i P10). Segracionom analizom je utvrđeno da su roditelji (obeleženi sa Pm i Pf) heterozigotni nosioci ove genetičke varijante.

4.3.1. ANALIZA EKSPRESIONOG PROFILA I IMUNODETEKCIJA PROTEINA *DNAII*

4.3.1.1 qRT-PCR

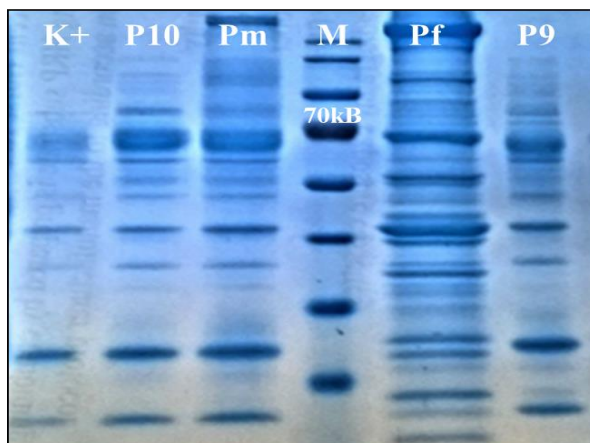
Analizirana je iRNK iz mononuklearnih ćelija periferne krvi pacijenata, roditelja i jedanaest zdravih kontrola metodom qRT-PCR, kako bi se ispitaio uticaj nukleotidne insercije i uvođenja prevremenog stop kodona na stabilnost transkripta gena *DNAII*. Kvantifikaciona analiza ekspresionih profila pokazala je da je transkript gena *DNAII* $30 \pm 45\%$ manje eksprimiran kod pacijenata (RQ_{P9} : 0.605 i RQ_{P10} : 0.745) i njihovih roditelja (RQ_{Pm} : 0.73 i RQ_{Pf} : 0.56) u odnosu na srednju vrednost ekspresionih profila kontrolne grupe uzoraka (RQ_{Sv} : 1.04). Razlike u nivou ekspresije gena *DNAII* između homozigotnih pacijenata i heterozigotnih roditelja nisu detektovane. Nivoi ekspresije analiziranih uzoraka predstavljeni su u vidu procenata (Slika 9).



Slika 9. Ekspresioni nivoi iRNK gena *DNAI1* analiziranih ispitanika. Poređenje nivoa ekspresionih profila kontrolne grupe (srednja vrednost ekspresionih profila kontrolnih uzoraka predstavlja 100% ekspresiju), pacijenata (P9: 58.42% i P10: 71.94%) i njihovih roditelja (Pm: 70.49% i Pf: 58.00).

4.3.1.2. SDS-PAGE

Za detekciju prisustva celokupnih proteina u analiziranim uzorcima pacijenata, roditelja i pozitivne kontrole, obojen je SDS poliakrilamidni gel nakon elektroforetskog razdvajanja proteina prema molekularnoj masi (SDS-PAGE). Utvrđeno je prisustvo celokupnih proteina izolovanih iz periferne krvi u svim analiziranim uzorcima (Slika 10).



Slika 10. Prikaz SDS poliakrilamidnog gela obojenog *Comasie Blue* bojom. Celokupni proteini periferne krvi pozitivne kontrole (K+), pacijenata (P9 i P10) i roditelja (Pm i Pf) pušteni su na SDS-PAGE, a potom obojeni radi vizuelne detekcije prisustva proteina u analiziranim uzorcima. Paralelno sa uzorcima, na gel je nanet i marker sa rasponom traka od 10 kDa do 180 kDa.

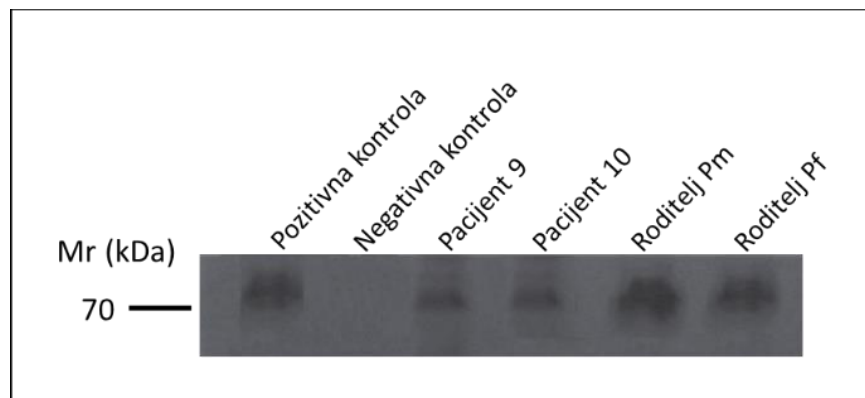
4.3.1.3. Western blot

Protein DNAI1 analiziran je metodom Western Blot, u cilju utvrđivanja uticaja varijante c. 947_948insG, p.Thr318TyrfsTer11, koja menja okvir čitanja sekvence i uvodi prevremeni stop kodon, na dužinu i količinu proteina.

U analiziranim uzorcima pacijenata, detektovana je traka na 70kDa, koja odgovara dužini kompletnog proteina (*wild type*) od 699 aminokiselina, što nije očekivano, jer ispitivana homozigotna varijanta uvodi prevremeni stop kodon nakon aminokiselinske pozicije 327.

U uzorcima roditelja i pozitivne kontrole takođe je detektovan kompletan protein. Detekcija proteina je izostala u uzorku proteinskog izolata iz ćelijske linije Hek293, koji je služio kao negativna kontrola.

Količina mutiranog p.Thr318TyrfsTer11 DNAI1 proteina kod pacijenata (bunarići 3 i 4), bila je manja u odnosu na količinu neizmenjenog proteina detektovanu u uzorcima roditelja (bunarići 5 i 6) i uzorku pozitivne kontrole (bunarić 1) (Slika 11).



Slika 11. Imunodetekcija proteina DNAI1 u uzorcima pacijenata sa novom genetičkom varijantom, roditelja i pozitivne kontrole. Za Western blot analizu korišćeno je zečje *Anti-Dynein intermediate chain 1* antitelo, koje interaguje sa humanim proteinom DNAI1. Upotrebom baze podataka *Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) utvrđeno je da se protein DNAI1 ne sintetiše u ovoj ćelijskoj liniji. Proteinski marker sa rasponom detekcije od 10 kDa do 180 kDa puštan je paralelno sa uzorcima. Tri nezavisna eksperimenta su urađena i najreprezentativnija imunodetekcija je prikazana.

4.3.2. IN SILICO ANALIZA VARIJANTE c.947_948insG, p.Thr318TyrfsTer11 DNAI1

Varijanta c.947_948insG, dovodi do menjanja okvira čitanja sekvence i posledično uvodi UGA stop kodon 33 nukleotida nishodno od insercije G nukleotida, što bi trebalo da dovede do skraćenja proteina od 699 aminokiselina na 327 aminokiselina. Kako je Western Blot analiza pokazala prisustvo proteina DNAI1 od 699 aminokiselina kod pacijenata sa p.Thr318TyrfsTer11 promenom, pristupljeno je *in silico* analizi sekvence proteina u cilju objašnjavanja dobijenog rezultata.

4.3.2.1. Modelovanje tercijarne strukture proteina DNAI1

Za brojne proteine kristalna struktura nije dostupna, pa su programi za *in silico* modelovanje veoma korisni za kreiranje prediktivnih modela tercijarne strukture, jer funkcionalnost proteina zavisi od njegovog savijanja u prostoru. Ovi programi poravnjavaju datu sekvencu proteina sa postojećim sekvencama različitih proteina iz baza podataka i na taj način vrše predikciju strukture i funkcije pojedinačnih regiona proteina.

Za dobijanje tercijarne strukture neizmenjenog proteina DNAI1 kao i mutiranog p.Thr318TyrfsTer11 proteina DNAI1, upotrebljeni su programi Protein Model Portal, I-TASSER i SWISS MODEL. Korišćena je originalna proteinska sekvenc DNAI1 (NP_036276.1), kao i sekvenc proteina DNAI1 sa p.Thr318TyrfsTer11 promenom. Nakon završenog procesa *in silico* modelovanja, dobijeno je nekoliko alternativnih 3D struktura u PDB formatu, od kojih je izabrana struktura koja je dobijena od strane sva tri programa, kao najpribližnija prediktivna struktura proteina DNAI1. Za analizu PDB datoteka mutiranog i neizmenjenog proteina DNAI1 korišćen je softver UCSF Chimera 2.0, i napravljeni su trodimenzionalni modeli neizmenjenog proteina i proteina DNAI1 sa p.Thr318TyrfsTer11 promenom (Slika 12a).

In silico analiza je pokazala da se *wild type* protein se sastoji iz 699 aminokiselina, dok je mutirani protein kraći, i sastoji se iz 327 aminokiselina. Analizirane proteinske sekvence počinju da se razlikuju nakon pozicije 318 u polipeptidnom lancu i 11 aminokiselina nishodno, uvodi se prevremeni UGA stop kodon, čime nastaje kraća forma proteina od 327 aminokiselina (Slika 12a).

4.3.2.2. Interakcije protein-protein i evolucionna konzerviranost regiona od interesa proteina DNAI1

Upotrebom softvera I-TASSER, dobijena je informacija o aminokiselinama i njihovim tačnim pozicijama u polipeptidnom lancu, koje učestvuju u interakcijama protein-protein (Tabela 17).

Tabela 17. Aminokiseline u proteinu DNAI1 i njihove pozicije u polipeptidno lancu koje učestvuju u interakcijama protein-protein.

Pozicija u polipeptidnom lancu	337	352	385	387	404	436	456	458	498
Aminokiselina	A	Y	G	M	V	W	S	G	C
Pozicija u polipeptidnom lancu	500	517	541	542	562	586	603	631	633
Aminokiselina	T	E	M	S	D	G	T	R	T

Obeležavanjem ovih aminokiselina u 3D modelu proteina (Slika 12a), uočeno je da mutiranom proteinu nedostaje region za interakcije protein-protein.

U cilju identifikacije konzerviranosti regiona proteina DNAI1 u kome je detektovana promena p.Thr318TyrfsTer11, kod različitih vrsta, korišćen je program za višestruko poravnavanje aminokiselinskih sekvenci ClustalW2. Kompletna sekvenca čovekovog proteina DNAI1 kao i sekvence proteina DNAI1 kod ribe (*M. albus*), miša (*M. musculus*), majmuna (*G. gorilla*) i žabe (*X. laevis*) korišćene su za višestruko poravnavanje aminokiselinskih sekvenci (Slika 12b). Gen Bank pristupni brojevi sekvenci korišćeni u ovoj studiji su sledeći: čovek (NP_036276.1), riba (XP_020448239.1), žaba (NP_001085877.1), miš (NP_780347.2), majmun (XP_004047998.2). Višestruko poravnavanje sekvenci je pokazalo da je aminokiselina Thr na poziciji 318, evoluciono konzervirana kod svih ispitavinih ortolognih organizama.

organizama ukazalo je na visoku evolucionu konzerviranost regiona od interesa u kome je detektovana p.Thr318TyrfsTer11 promena. Aminokiselina koja je označena pravougaonikom pokazuje apsolutnu evolutivnu konzerviranost kod analiziranih vrsta (miš, čovek, majmun, žaba i riba).

4.3.2.3. *In silico* translacija proteina DNAI1

Za utvrđivanje regiona otvorenog okvira čitanja sekvence iRNK neizmenjenog i mutiranog gena *DNAIL* (NM_012144.2) upotrebljen je softver Translate Tool.

Na transkripcionom nivou je pokazano da se translirana kodirajuća sekvenca iRNK neizmenjenog gena *DNAIL* i mutiranog gena *DNAIL* razlikuju (Slika 13a i b) nakon 318. aminokiseline u polipeptidnom lancu. Čitanjem mutirane sekvence nakon prvog prevemenog UGA stop kodona uvedenog 11 aminokiselina hishodno od insercije G, uočeno je prisustvo još 16 UGA stop kodona.

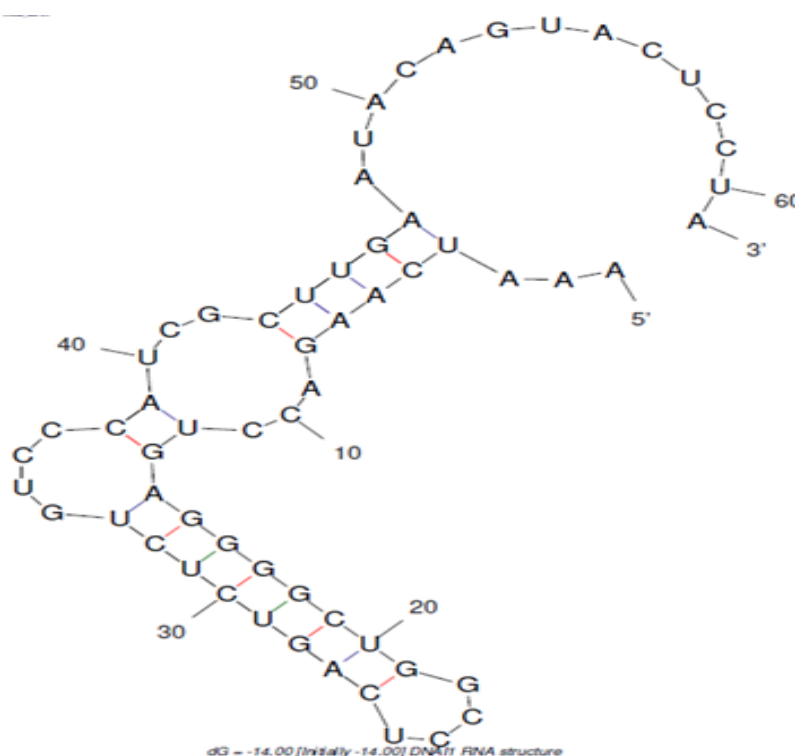


Slika 13. Translatirane sekvence neizmenjenog proteina DNAIL i proteina DNAIL sa p.Thr318TyrfsTer11 promenom. (A) Prikaz translirane sekvence kodirajućeg regiona *wild type* gena *DNAIL*. Crvenim pravougaonikom na slici je označena aminokiselina na poziciji 318. (B) Prikaz translirane sekvence kodirajućeg regiona mutiranog gena *DNAIL*. Zeleni pravougaonici označavaju izmenjeni okvir čitanja sekvence usled prisustva varijante c.947_948insG u genu *DNAIL*. Crveni pravougaonici označavaju 17 UGA stop kodona.

4.3.2.4. Analiza sekundarne RNK strukture regiona od interesa gena *DNAI1*

Kako je funkcionalna karakterizacija proteina DNAI1 pokazala njegovo prisustvo u uzorcima iz pacijenata uprkos prisustvu 17 UGA stop kodona pristupljeno je analizi dela sekvence 3'UTR regiona gena *DNAI1* sa ciljem detekcije prisustva *SECIS* (eng. *selenocysteine insertion sequence*, SECIS) elemenata.

Za utvrđivanje prisustva specifičnih sekundarnih struktura RNK u 3'UTR regionu gena od interesa, analizirana je sekvenca dužine 60 nt, koja se nalazi nishodno od originalnog STOP kodona u transkriptu. Za ovu analizu korišćen je program MFOLD. Detektovana slobodna energija sekundarne strukture RNK transkripta *DNAI1* gena iznosila je $dG = -14$. Zatim je pretraživanjem literature pronađen podatak o dG sekundarne strukture RNK poznatih selenocisteinskih proteina i ove vrednosti su upoređene. Slobodna energija sekundarne strukture RNK transkripta gena *DNAI1* bila je najpribližnija slobodnoj energiji sekundarne strukture RNK selenoproteina P ($dG = -16$), koji je jedini poznati selenoprotein u kome *SECIS* elementi čitaju višestruke UGA stop kodone i uvode aminokiselinu selenocistein (Slika 14).



Slika 14. Sekundarna struktura RNK gena *DNAI1*. Analiziran je region veličine 60 nt, koji je nalazi nishodno od originalnog stop kodona. Dobijena slobodna energija nastale sekundarne strukture iznosi $dG = -14$.

4.4. DIFERENCIJACIJA BAZALNE ĆELIJSKE LINIJE A549 U CILIJARNU ĆELIJSKU LINIJU I EKSPRESIONI PROFILI MARKERA CILIOGENEZE

4.4.1. KULTIVACIJA ĆELIJSKE LINIJE A549 NA *TRANSWELL* FILTER MEMBRANAMA

Jedna od karakteristika bazalnih ćelija pluća jeste da su to progenitorske ćelije koje imaju potencijal diferencijacije u sve tipove ćelija pluća. Diferencijacija bazalne plućne ćelijske linije A549 u multicelijarnu ćelijsku liniju zahteva kultivaciju ćelija u dvofaznom ALI sistemu (eng. *Air-Liquid Interface*, ALI). Dvofazni ALI sistem uspostavlja se kultivacijom ćelija na *transwell* filter membranama.

Proces kultivacije ćelijske linije A549 na *transwell* filter membrani podrazumeva je prethodnu optimizaciju:

- a) zapremine medijuma koji se naliva na filter membranu sa invertovane strane;
- b) gustine ćelija koja će obezbediti ~ 100% konfluentnost nakon dva dana adherencije za filter;
- c) vremena adherencije ćelija za donju stranu filtera, nakon čega će membrana biti invertovana u prvobitan položaj;
- d) količine medijuma koja će se dodati sa gornje strane membrane, a neće sprati ćelije sa donje strane membrane;
- e) dužine trajanja procesa diferencijacije od zasejavanja ćelija (0. dan/ALI) do cilija vidljivih pod mikroskopom.

Utvrđeno je da optimalna gustina ćelija za kultivaciju na invertovanoj strani filter membrane 2×10^5 ćelija u 100 μ l medijuma, a vreme trajanja adherencije ćelija za invertovani filter je 3h. Nakon 3h, filter je okrenut i sa gornje strane filtera naliveno je 120 μ l medijuma (optimizovanu količina medijuma koja nije sprala ćelije sa donje strane filtera). Ćelije su nakon dva dana dostigle konfluentnost od ~ 100% čime je pokazano da su pogodne za kultivaciju na invertovanim membranama.

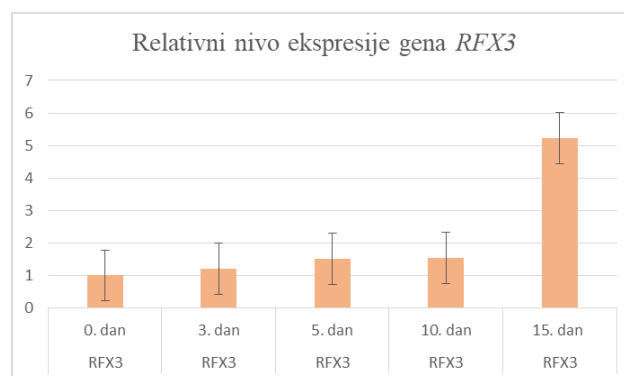
Nakon 15 dana kultivacije ćelija na *transwell* filter membranama pod optimalnim uslovima, cilije pod mikroskopom nisu uočene.

4.4.2. ANALIZA PROFILA EKSPRESIJE MARKERA CILIOGENEZE U RAZLIČITIM VREMENSKIM FAZAMA

Analizirane su iRNK iz ćelijske linije A549 prikupljene nakon 0, 3, 5, 10 i 15 dana kultivacije na *transwell* membrana u cilju utvrđivanja obrasca profila ekspresije markera ciliogeneze u ćelijskoj liniji A549. Kvantifikaciona analiza nivoa ekspresije gena *RFX3*, *FOXJ1*, *CCNO*, *MCIDAS*, *GEMC1* i *NOTCH1* urađena je metodom qRT-PCR. Ekspresioni profili ovih gena upoređeni su sa literaturnim podacima ekspresionih profila istih markera ciliogeneze dobijenih u *in vivo* i *in vitro* eksperimentima. Na osnovu markera ciliogeneze u određenim vremenskim tačkama praćen je proces ciliogeneze i utvrđeni su vremenski okviri odvijanja različitih faza ovog procesa u ćelijskoj liniji A549.

4.4.2.1. Relativna ekspresija gena *RFX3*

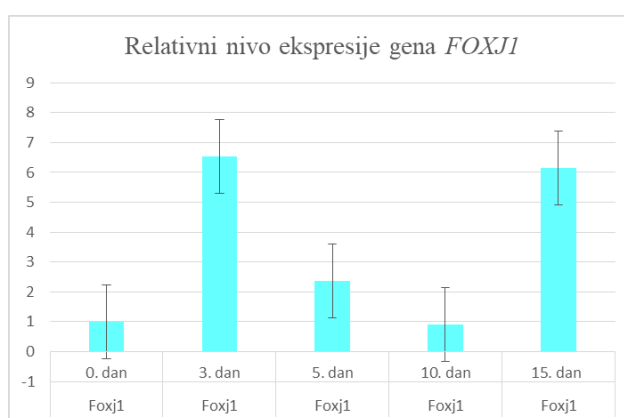
Analizom ekspresije gena *RFX3* u pet vremenskih tačaka, utvrđeno je da je količina transkripta gena *RFX3* veća 15 dana nakon kultivacije ćelija A549 u ALI sistemu u odnosu na količinu transkripta u ostalim vremenskim tačkama (Slika 16). Ekspresija gena *RFX3* u ćelijskoj liniji A549 nakon 15 dana ($A549_{15}=5.222$) je petostruko veća u odnosu na ekspresiju istog gena nultog dana ($A549_0=1$). Dobijeni rezultati profila ekspresije gena *RFX3* ukazuju da je ćelijska linija A549 petnaestog dana kultivisanja u ALI sistemu u završnoj fazi duplikacije centriola.



Slika 16. Ekspresioni profili iRNK gena *RFX3* poreklom iz ćelijske linije A549. Ekspresija gena *RFX3* analizirana je u pet vremenskih tačaka (nakon 0, 3, 5, 10 i 15 dana). Nulti dan korišćen je kao kalibrator za analizu.

4.4.2.2. Relativna ekspresija gena *FOXJ1*

Analizom relativne ekspresije gena *FOXJ1* poreklom iz ćelijske linije A549, u različitim vremenskim intervalima, pokazano je da se ekspresija najviše razlikuje u trećem ($A549_3= 6.543$) i petnaestom danu ($A549_{15}= 6.152$) kultivisanja ćelija A549 u ALI sistemu, od ekspresije u nultom danu ($A549_0=1$), (Slika 17). Dobijeni ekspresioni profili gena *FOXJ1* ukazuju da je ćelijska linija A549 3. dana kultivacije ćelija u dvofaznoj sredini u ranoj fazi formiranja deuterosoma, dok 15. dan odgovora završnoj fazi duplikacije centriola.

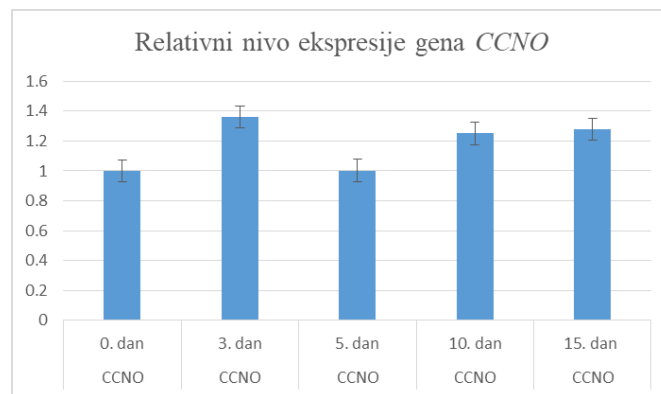


Slika 17. Ekspresioni profili iRNK gena *FOXJ1* poreklom iz ćelijske linije A549. Ekspresija gena *FOXJ1* analizirana je u pet različitim vremenskih tačaka (nakon 0, 3, 5, 10 i 15 dana). Nulti dan korišćen je kao kalibrator za analizu.

4.4.2.3. Relativna ekspresija gena *CCNO*

Ekspresioni profil gena *CCNO* analiziran je nakon 0, 3, 5, 10 i 15 dana kultivacije ćelijske linije u dvofaznom sistemu (Slika 18). Kvantifikaciona analiza je pokazala da se ekspresija ovog gena najviše razlikuje u trećem ($A549_3= 1.361$), desetom ($A549_{10}= 1.250$) i petnaestom danu ($A549_{15}= 1.278$), od ekspresije u nultom danu ($A549_0=1$). Trend

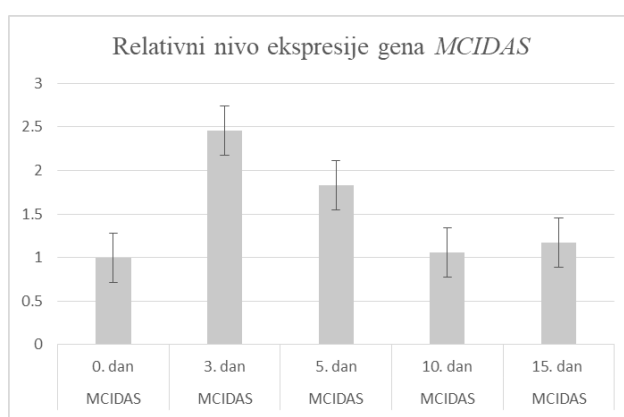
ekspresije gena *CCNO* ukazuje da ćelijska linija A549 prolazi kroz faze formiranja deuterosoma i asembliranja centriola.



Slika 18. Ekspresioni profili gena *CCNO* poreklom iz ćelijske linije A549. Ekspresija gena *CCNO* analizirana je u pet različitih vremenskih tačaka (nakon 0, 3, 5, 10 i 15 dana). Nulti dan korišćen je kao kalibrator za analizu.

4.4.2.4. Relativna ekspresija gena *MCIDAS*

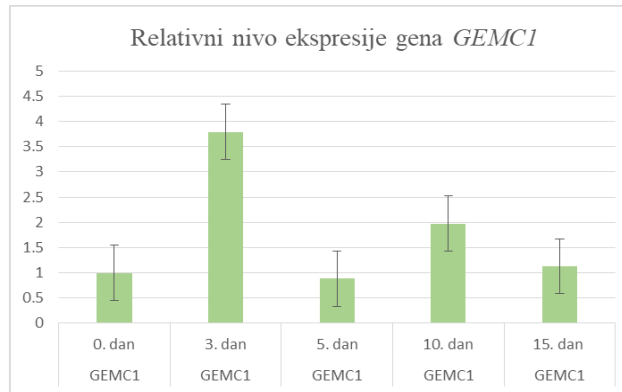
Analizom relativne ekspresije gena *MCIDAS* poreklom iz ćelijske linije A549, u različitim vremenskim intervalima, pokazano je da je ekspresija ovog gena najveća trećeg dana ($A549_{3d} = 2.460$) kultivisanja ćelija A549 u ALI sistemu (Slika 19). Tokom procesa ciliogeneze, rana faza formiranja deuterosoma započinje 3. dana kultivacije ćelija u dvofaznoj sredini. Dobijeni ekspresioni profil gena *MCIDAS* poreklom iz ćelijske linije A549, ukazuju da se ova ćelijska linija 3. dana kultivisanja u ALI sistemu nalazi u ranoj fazi formiranja deuterosoma.



Slika 19. Relativna ekspresija gena *MCIDAS* poreklom iz ćelijske linije A549. Ekspresija gena *MCIDAS* analizirana je u pet različitim vremenskih tačaka (nakon 0, 3, 5, 10 i 15 dana). Nulti dan korišćen je kao kalibrator za analizu.

4.4.2.5. Relativna ekspresija gena *GEMCI*

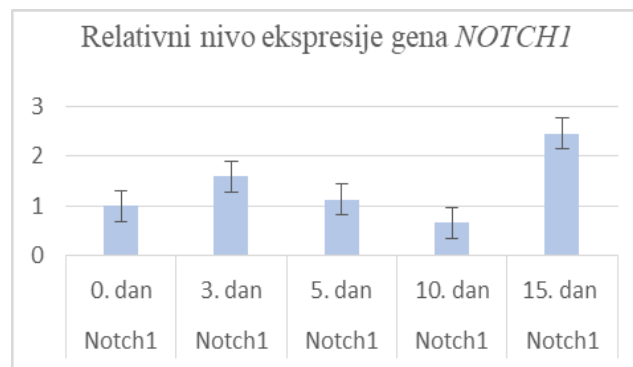
Ekspresioni profil gena *GEMCI* analiziran je nakon 0, 3, 5, 10, i 15 dana kultivacije ćelijske linije A549 u dvofaznom sistemu (Slika 20). Kvantifikaciona analiza je pokazala da se ekspresija ovog gena najviše razlikuje u trećem danu ($A549_{3d} = 3.379$) gajenja ćelija u ALI sistemu, od ekspresije u nultom danu ($A549_0 = 1$). Povećanje ekspresije gena *GEMCI* u ovoj vremenskoj tački ukazuje na početak procesa ciliogeneze u ćelijskoj liniji A549.



Slika 20. Relativna ekspresija molekula iRNK gena *GEMC1* izolovanog iz ćelijske linije A549. Ekspresija gena *GEMC1* analizirana je u pet različitim vremenskih tačaka (nakon 0, 3, 5, 10 i 15 dana). Nulti dan korišćen je kao kalibrator za analizu.

4.4.2.6. Relativna ekspresija gena *NOTCH1*

Kvantifikaciona analiza ekspresije gena *NOTCH1* urađena je nakon 0, 3, 5, 10, i 15 dana kultivacije ćelijske linije A549 u ALI sistemu (Slika 21). Analiza je pokazala da se ekspresija ovog gena najviše razlikuje u trećem ($A549_3 = 1.593$) i petnaestom danu ($A549_{15} = 2.441$) gajenja ćelija u ALI sistemu, od ekspresije u nultom danu ($A549_0 = 1$). Dobijen je specifičan profil ekspresije gena *NOTCH1* koji do sada nije zabeležen u drugim analiziranim ćelijskim linijama.



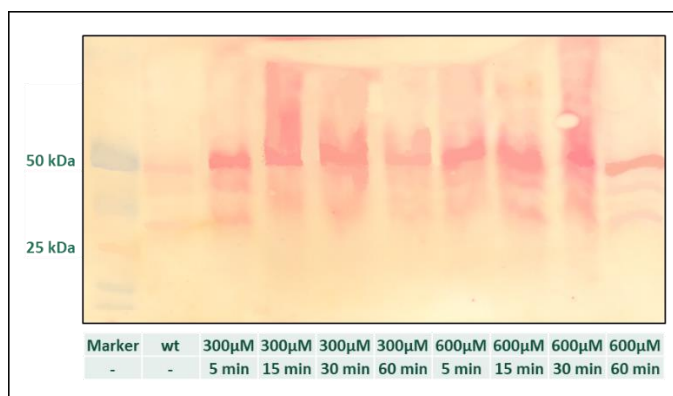
Slika 21. Relativna ekspresija molekula iRNK gena *NOTCH1* izolovanog iz ćelijske linije A549. Nulti dan korišćen je kao kalibrator za analizu.

4.5. OPTIMIZACIJA TRETMANA ĆELIJSKE LINIJE A549 CIKLIČNIM ADENOZIN MONOFOSFATOM I IMUNODETEKCIJA FOSFORILISANIH SERINA

Tretman ćelijske linije A549 molekulom cAMP podrazumevao je optimizaciju načina unosa malog molekula, doze primenjenog molekula i dužine trajanja tretmana. Nakon optimizacije tretmana, analizan je uticaj primenjenog cAMP na aktivaciju PKA i nishodnu fosforilaciju serina celokupnih proteina izolovanih iz ćelijske linije A549.

Upotreba reagensa *Lipofectame 2000* (10 μ l/24h, 10 μ l/48h, 20 μ l/24h, 20 μ l/48h) je pokazala jako nisku efikasnost transfekcije (10%). Stoga je strazegija za unos molekula cAMP izmenjena, pa je za permeabilizaciju ćelijske membrane korišćen 10% glicerol.

Detekcija fosforilisanih serina celokupnih proteina iz uzoraka: *wt* (netretirani uzorak), 300 μ M/5min, 300 μ M/15min, 300 μ M/30min, 300 μ M/60min, 600 μ M/5min, 600 μ M/15min, 600 μ M/30min i 600 μ M/60min, urađena je metodom Western Blot (Slika 22). Analiza je pokazala da je stepen fosforilacije u svim tretiranim uzorcima (bunarići 3-10) bio veći u odnosu na netretirani uzorak (bunarić 2). Stepen fosforilacije serina u celokupnim proteinima se povećavao sa dužinom tretmana uzoraka od 5-30 min (bunarići 3, 4, 5 i 7, 8, 9), nakon čega je stepen fosforilacije je opao (60 min), (bunarići 6 i 10). Tretman uzoraka sa 300 μ M i 600 μ M cAMP je pokazao podjednaku efikasnost fosforilacije (Slika 22).



Slika 22. Imunodetekcija fosforilisanih serina celokupnih proteina iz netretirane i tretiranih ćelija A549. Za Western blot analizu korišćeno je monoklonsko anti-fosfoserinsko antitelo poreklom iz miša, koje interaguje sa humanim fosforilisanim serinima svih proteina u izolatu. Uporedo sa uzorcima pušten je i proteinski marker (bunarić 1). Kako je signal dobijen upotrebom reagensa *ECL* bio jako slab, vizuelizacija uzoraka urađena je bojenjem membrane Ponceu S metodom.

5. DISKUSIJA

5.1. PRIMARNA CILIJARNA DISKINEZIJA – OPŠTE KARAKTERISTIKE

Primarna cilijarna diskinezija nastaje kao posledica promena u broju i/ili strukturi motornih cilija i predominantno se posledice ovih promena ispoljavaju u respiratornom i reproduktivnom sistemu. Heterogenost i nedovoljna specifičnost kliničke prezentacije ove bolesti oslikava genetičku heterogenost koja leži u osnovi ovog kompleksnog poremećaja.

Ukoliko pacijent ispoljava simptome koji ukazuju na PCD:

1. *Situs inversus* udružen sa promenama gornjih i donjih disajnih puteva;
2. Neonatalni respiratorni distres nepoznatog porekla;
3. Porodična istorija bolesti, pogotovo ako su članovi porodice asimptomatski;
4. Svakodnevni vlažni kašalj;
5. Negativni testovi na cističnu fibrozu, a prisutni rinitis, sinuzitis i ušna mast se luči u većim količinama;
6. Neobjašnjive bronhiektazije - bronhijalne tube hronično proširene, oštećene, mlitave, sa delimičnim ili potpunim gubitkom funkcije;
7. Ozbiljna upala srednjeg uha koja se javlja zajedno sa drugim respiratornim tegobama;
8. Problemi srca koji nastaju kao posledica aberantno pozicioniranih unutrašnjih organa, a javljaju se kod pacijenta sa plućnim, nazalnim i problemima sa ušima,

trebalo bi da bude upućen u specijalizovani dijagnostički centar ili respiratorni centar radi utvrđivanja precizne kliničke dijagnoze bolesti [159].

Istraživanje o zbrinjavanju pacijenata sa PCD-om koje je obuhvatilo 196 centara iz 26 država Evrope je pokazalo da lečenje PCD pacijenata nije centralizovano u tim državama. Prosečan broj pacijenata po centru je četiri, u različitim dijagnostičkim centrima korišćeni su različiti testovi za uspostavljanje dijagnoze i pacijenti su dobijali različitu terapiju [160], čime je zapravo dodatno naglašeno da protokol lečenja PCD pacijenata mora da se standardizuje [74].

Nakon uspostavljanja kliničke dijagnoze bolesti, sledeći obavezni korak ka uspostavljanju finalne dijagnoze je determinacija genetičke osnove kliničkog fenotipa, jer je u velikom broju slučajeva dijagnoza PCD-a klinički odbačena zbog nepostojanja strukturne i/ili funkcionalne abnormalnosti na cilijama [64] ili je postavljena dijagnoza PCD-a na osnovu simptoma, a genetička potvrda je izostala [58]. Dodatno, genetička osnova bolesti predstavlja veliki izazov obzirom da se radi o bolesti koja nije determinisana promenama u jednom ili nekoliko gena već je broj gena uzročnika dostigao 38 u poslednjih par godina upotrebom sekvenciranja nove generacije [85].

U ovoj studiji, u Srbiji, je po prvi put sprovedeno genomsko profilisanje pacijenata suspektnih na PCD koji ispoljavaju klinički fenotip ove bolesti. Genomsko profilisanje pacijenata omogućilo je uspostavljanje genetičke osnove bolesti kod pacijenata sa teritorije Srbije i formiranje genetičkog algoritma koji je obuhvatio kako već poznate gene uzročnike i varijante unutar njih, tako i novootkrivene varijante i potencijalne gene kandidate za PCD. Takođe, formirana je strategija za diferencijalno dijagnostiku PCD pacijenata i drugih pacijenata sa sličnom kliničkom prezentacijom bolesti, ali bez patogenih promena u genima odgovornim za PCD.

5.1.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE ANALIZIRANE GRUPE PACIJENATA

Analizirana kohorta ispitanika sastojala se iz 21. pacijenta sa kliničkom manifestacijom PCD-a. Kod svih pacijenata je prethodno odbačena cistična fibroza kao finalna klinička dijagnoza, a potom su svi pacijenti analizirani na prisustvo homozigotnih varijanti u genu *CFTR* čime je dijagnoza cistične fibroze odbačena i sa genetičkog aspekta.

Najčešće detektovani klinički simptomi u analiziranoj grupi pacijenata bili su hronični sinuzitis (90.47%), a zatim bronhiektazije, neonatalni respiratorni distres i cilijarna nepokretljivost sa podjednakom učestalošću (80.95%) (Tabela 12). Visok procenat zastupljenosti neonatalnog respiratornog distresa sugerise da pokretne cilije imaju značajnu ulogu u protoku tečnosti za vreme tranzicije sa fetalnih na neonatalna pluća [161].

Situs inversus, kao jedna od glavnih karakteristika ovog oboljenja detektovan je kod 10 pacijenata (47.60%), što je u skladu sa literaturnim podacima [161].

5.2. GENOMSKO PROFILISANJE PACIJENATA SUSPEKTIH NA PCD U SRBIJI I FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA NOVOOTKRIVENE VARIJANTE

Prvi deo ovog istraživanja je za cilj imao genomsko profilisanje pacijenata sa kliničkom prezentacijom primarne cilijarne diskinezije i kompletiranje spektra patogenih varijanti u genima uzročnicima i genima kandidatima za PCD, kao i dizajniranje strategije za detekciju patogenih promena kod pacijenata sa kliničkom slikom ove bolesti, ali bez detektovanih varijanti u PCD genima. Takođe, ovaj deo istraživanja je obuhvatio i funkcionalnu karakterizaciju novootkrivene varijante u kodirajućem regionu gena *DNAI1*.

U okviru ove studije prikazan je genomski profil 21. pacijenta suspektog na PCD, pri čemu je detektovano 18 patogenih genetičkih varijanti u genima uzročnicima i genima kandidatima za PCD i 6 patogenih genetičkih varijanti u genima odgovornim za pojedinačne simptome ove bolesti. U okviru ove studije ukupno je identifikovano 12 novih, do sada neopisanih varijanti u genima uzročnicima i genima kandidatima za PCD i 5 novih varijanti u genima odgovornim za pojedinačne simptome ove bolesti. Urađena je molekularna karakterizacija jedne novootkrivene homozigotne varijante c.947_948insG, p.Thr318TyrfsTer11, detektovane u genu *DNAI1*.

5.2.1. SPEKTAR GENA UZROČNIKA I GENA KANDIDATA ZA PCD U KOJIMA SU DETEKTOVANE PATOGENE GENETIČKE VARIJANTE U POPULACIJI SRBIJE

Genomskim profilisanjem pacijenata iz naše kohorte detektovane su patogene genetičke varijante u šest gena uzročnika bolesti (*CCDC40*, *DNAI1*, *DNALI1*, *DNAH5*, *DNAH11* i *LRRC6*) i dva gena kandidata za PCD (*SPAG16* i *SPAG17*) (Tabela 13) i uspostavljena je dijagnoza kod 52.38% pacijenata. Prema podacima iz literature, 5 gena koja su najčešće mutirana kod PCD pacijenata su upravo *DNAH5*, *DNAH11*, *DNALI1*, *CCDC40* i *CCDC39* i približno 26% detektovanih varijanti u ovim genima je poznato [162], čime se i naša populacija sa 27.78% detektovanih patogenih genetičkih varijanti koje su već opisane, u potpunosti uklapa.

Rezultati naše studije su pokazali da su promene u spoljašnjim dineinskim ručicama (ODA) odgovorne za 55.55% uočenog fenotipa kod PCD pacijenata iz analizirane kohorte. Aksonemalni

dineini spoljašnjih dineinskih ručica su motorni proteini koji generišu energiju kroz aktivnost adenozin trifosfat-a, koja se koristi za kontrolisano klizno kretanje dve susedne tubule [163]. Ovim strukturama pripadaju proteini koje kodiraju geni *DNAI1*, *DNAH5*, *DNAH11* i *DNALI* (157). PCD pacijenti koji su pogođeni patogenim promenama u ovim genima ispoljavaju ultrastrukturne defekte koji obuhvataju odsustvo ili skraćenje ovih struktura.

Pokazano je da je gen *DNAH5* (27.77%) bio najčešće pogođen patogenim genetičkim varijantama u našoj kohorti, što je u skladu sa prethodnim rezultatima dobijenim za Evropsku populaciju [92, 164]. U analiziranoj kohorti pacijenata, kod 3 PCD pacijenta detektovane su patogene varijante u ovom genu. Genetičke varijante c. 4356-2A>G, c.7624T>C, c.1206T>A i c.8012A>G, detektovane su u udruženom heterozigotnom stanju, dok je varijanta c.8999G>A detektovana samo na jednom alelu. Genetičke varijante c.1206T>A i c.8999G>A gena *DNAH5*, su prijavljene u bazi podataka ClinVar (pristupni brojevi: 188080 i 219734), dok su preostale tri promene detektovane prvi put u našoj kohorti ispitanika (Tabela 14). *Situs inversus* je prisutan kod dva od tri pacijenta što potvrđuje da je randomizacija unutrašnjih organa delimično uzrokovana nefunkcionalnim proteinom *DNAH5* [165].

Gen *DNAI1* odgovoran je za 16.66% uočenog fenotipa kod PCD pacijenata iz analizirane kohorte. Ovaj procenat je malo veći u odnosu na prosek od 10% detekcije patogenih promena u ovom genu [90]. U genu *DNAI1* detektovane su sledeće neokarakterisane patogene promene: c.947_948insG, c.1345_1349delCTTAA i c.1684G>A, kod tri pacijenta iz naše populacije (Tabela 14).

Patogene promene u genu *DNAH11*, koji kodira za protein koji je takođe deo ODA, ne dovode do ultrastrukturnih promena, ali svakako dovode do PCD-a [107, 162]. Genomskim profilisanjem pacijenata uključenih u ovu studiju detektovana je promena c.8533C>G, kod jednog PCD pacijenta, koja je prijavljena u bazi podataka ClinVar (pristupni broj: 359658).

Promene u genu *CCDC40* detektovane su kod 11.11% analiziranih pacijenata, što je u skladu sa literaturnim podacima, gde je uočeno da je ovaj tip poremećaja detektovan između 5-20% [162]. Ovaj gen kodira za protein *CCDC40* koji zajedno sa proteinom *CCDC39* ima ulogu molekularnog klizača i usmerava precizno rastojanje i raspored IDA i RS [166]. Bialelske promene u genu *CCDC40* odgovorne su za odsustvo IDA i kombinovane poremećaje IDA i centralnog aparata što dovodi do mikrotubularne dezorganizacije i transpozicije spoljašnjih dubleta u centar cilije [88]. Takođe, bialelske promene u ovom genu dovode do mnogo ozbiljnije bolesti pluća nego

promene u genima koji kodiraju proteine dineinskih ručica [167]. Genomskim profilisanjem pacijenata uključenih u ovu studiju detektovane su dve homozigotne patogene promene: c. 248delC i c. 2440C>T, kod 3 pacijenta (iz dve porodice). Obe genetičke promene su prethodno opisane u literaturi [88, 158].

Patogene promene u genu *LRRC6* detektovane su kod 5.55% analiziranih pacijenata. Gen *LRRC6* kodira protein LRCC6 koji učestvuje u asembliranju ODA i IDA. Promene u ovom genu dovode do kombinovanog poremećaja ODA i IDA što se najčešće ispoljava potpunom nepokretljivošću cilija [87, 162]. U našoj populaciji, monoalelska patogena promena c.27T>G (ClinVar 473106) u genu *LRRC6* detektovana je u jednom pacijentu (Tabela 14).

5.2.1.1. Geni kandidati za PCD

Patogene genetičke promene u genima *SPAG16* i *SPAG17* detektovane su kod 16.66% analiziranih PCD pacijenata. Genetičke varijante u ovim genima prvi put su otkrivene u našoj kohorti PCD pacijenata, a prethodno su ovi geni u literaturi dovedeni u vezu sa nekim od simptoma ove bolesti [168, 169].

Gen *SPAG17* kodira za protein koji je deo centralnog aparata u 9 + 2 tipu aksoneme, i odgovoran je za njeno pravilno funkcionisanje. Patogene promene u ortolognom genu *Spag17* kod miša, dovode do PCD-a koji se karakteriše nepokretnim nazalnim i trahealnim cilijama, redukovanim mukoznim klirensom, respiratornim distresom i čestim letalnim ishodom u neonatalnom periodu zbog neprohodnosti disajnih puteva [169].

Gen *SPAG16* kodira za dva proteina SPAG16L i SPAG16S. Protein SPAG16L je strukturni deo aksoneme repa spermatozoida, dok je protein SPAG16S asociran sa jedrom postmejotičkih ćelija [168].

Prethodne studije su ukazale da *SPAG17*, *SPAG6* i *SPAG16L* formiraju interaktom u sisarskom centralnom aparatu cilija. Značaj ove mreže proteina ogleda se u činjenici da patogena promena u bilo kom od ova tri gena dovodi do poremećaja u procesu spermatogeneze, pokretljivosti spermatozoida i cilijarne disfunkcije [170].

5.2.1.2. Spektar genetičkih varijanti detektovanih u genima uzročnicima i genima kandidatima za PCD

Kada je reč o 18 patogenih genetičkih varijanti detektovanih kod pacijenata sa teritorije Srbije, može se uočiti da daleko najveći procenat svih detektovanih varijanti obuhvataju *missense* varijante (77.78%), zatim slede male insercije i delecije (16.67%), i detektovana je jedna genetička varijanta koja menja kanonsko mesto iskrajanja sekvence (5.55%) (Tabela 14). Ovaj rezultat nije u saglasnosti sa rezultatima drugih populacija, gde je zabeležena najveća učestalost *nonsense* promena [91, 171].

Od 18 genetičkih varijanti, 12 varijanti je novootkriveno u našoj populaciji (66.67%) (Tabela 14). Ovaj podatak je u saglasnosti sa rezultatima dobijenih analiziranjem drugih populacija [162], gde je uočeno da je približno 75% detektovanih varijanti novootkriveno, odnosno da se nove genetičke varijante javljaju izolovano, samo u određenim porodicama. Petnaest genetičkih varijanti (83.33 %) detektovano je u homozigotnom (20%), udruženom heterozigotnom (60%) i transalelskom heterozigotnom (20%) stanju, dok su tri genetičke varijante (16.67%) detektovane u monoalelskom stanju. Od četrnaest pacijenata sa 18 genetičkih varijanti, 9 PCD pacijenata (64%) pogođeno je sa dve patogene varijante u genima uzročnicima PCD-a, što je u skladu sa literaturnim podacima gde je utvrđeno da ~65-70% PCD pacijenata ima bialeleske varijante u PCD genima [172].

5.2.3. STRATEGIJA ZA USPOSTAVLJANJE DIJAGNOZE KOD PACIJENATA KOD KOJIH NISU DETEKTOVANE GENETIČKE VARIJANTE U PCD GENIMA

U cilju uspostavljanja precizne dijagnoze kod pacijenata sa kliničkom prezentacijom PCD-a, koja je veoma slična kliničkoj slici drugih retkih pedijatrijskih bolesti pluća koje su asocirane sa senzornim ciliopatijama, dizajnirana je strategija za diferencijalnu dijagnozu koja se bazira na genomskom profilisanju pacijenata. Prvobitno su analizirani PCD geni uzročnici i geni kandidati (29 gena), a potom je analiza proširena na gene odgovorne za pojedinačne simptome bolesti (45 gena) i gene odgovorne za senzorne ciliopatije (19 gena) (Slika 8).

Kod 6 pacijenata kod kojih nisu detektovane patogene genetičke varijante u PCD genima, a koji imaju kliničku manifestaciju ove bolesti, proširena genomaska analiza i sagledavanje svakog

pojedinačnog simptoma bolesti je pokazala da ovi pacijenti imaju genetičku osnovu drugih plućnih bolesti kao što je astma, neonatalni respiratorni distress i izolovane bronhiektazije (bez CF). Šest patogenih varijanti u homozigotnom, udruženom heterozigotnom i transalelskom stanju, detektovane su u genima *ABCA3*, *CFTR*, *MUC2*, *SCNNIA* i *SLC26A9* (Tabela 16).

Gen *SCNNIA* kodira za α subjedinicu epitelnog kanala za natrijum osetljivog na amilorid (eng. *Amiloride-sensitive epithelial sodium channel*, ENaC). ENaC je konstitutivno aktiviran i omogućava protok natrijumovih jona iz lumena u epitelne ćelije kroz apikalnu ćelijsku membranu [173]. Prethodne studije su pokazale da patogene promene u genima iz familije *SCNNI* mogu biti oštećujuće po kanal što posledično dovodi do bronhiektazija, posebno kod pacijenata koji su transalelski heterozigoti za ENaC/*CFTR* mutacije [174]. Gen *SCNNIA* se može uvrstiti u potencijalne gene kandidatke za PCD obzirom da su bronhiektazije najučestalije obeležje PCD-a. Kod tri analizirana pacijenta detektovana je ista patogena genetička varijanta u genu *SCNNIA* (NM_001159576.1, c.1654T>C, p.Trp552Arg). Kod 2 od 3 pacijenta, ova varijanta je bila udružena sa varijantom u genu *CFTR* (NM_000492.3, c. 3485G>A, p.Arg1162Leu), dok je kod jednog pacijenta detektovana u homozigotnom stanju.

Gen *ABCA3* (eng. *ATP Binding Cassette Subfamily A Member 3*, *ABCA3*) kodira protein *ABCA3* koji je član superfamilije ABC (eng. *ATP-binding cassette*, ABC) transportera. ABC proteini transportuju različite molekule kroz intraćelijske i ekstraćelijske membrane i podeljeni su u sedam podfamilija. Gen *ABCA3* je visoko eksprimiran u plućima i protein koji sintetiše je lokalizovan na membranama lamelarnih tela alveolarnih ćelija tipa II [175]. Protein *ABCA3* ima veoma važnu ulogu u formiranju surfaktanta pluća, najverovatnije, jer transportuje lipide [176].

Pacijenti sa heterozigotnim varijantama u genu *ABCA3* ispoljavaju učestali bronhiolitis sa neophodnom hospitalizacijom i *situs inversus*. Bronhiolitis pogađa male disajne kanale, koji bivaju upaljeni i ispunjeni mukusom što otežava disanje. Istraživanja na ćelijskim model sistemima su pokazala da patogene promene u genu *ABCA3* utiču na metabolizam surfaktanta tako što remete normalan transport molekula, remete trodimenzionalnu strukturu proteina *ABCA3* ili je poremećena hidroliza ATP-a [177]. Deca sa homozigotnim ili udruženim heterozigotnim varijantama u genu *ABCA3* razvijaju progresivni, letalni, neonatalni respiratorni distress zbog smanjenja sadržaja fosfatidilholina i funkcije smanjenja površinske napetosti plućnog surfaktanta

[178, 179]. Deca sa monoalelskim varijantama u genu *ABCA3* imaju smanjen nivo ekspresije ovog gena što dovodi do nastanka NRDS [180].

U analiziranoj kohorti pacijenata, detektovana je heterozigotna varijanta u genu *ABCA3* (NM_001089.2, c.2125C>T, p.Arg709Trp), kod jednog pacijenta.

Gen *MUC2* (eng. *Mucin 2, Oligomeric Mucus/Gel-Forming*, *MUC2*) je član porodice mucin proteina. Mucini su glikoproteini velike molekulske mase koje proizvode mnoga epitelna tkiva. Protein kodiran od strane gena *MUC2* se luči i formira nerastvorljivu barijeru od sluzi. Protein se polimerizuje u gel koji je 80% sastavljen od bočnih lanaca oligosaharida. *MUC2* varijante gena mogu dovesti do različitog savijanja glikoproteina ili promenljivih nivoa glikozilacije. Pacijenti sa homozigotnim varijantama u ovom genu ispoljavaju simptome astme, bronhitisa i sinusitisa, jer genetičke promene menjaju funkciju mucina [181-183], sluz se prekomerno proizvodi u gornjim i/ili donjim respiratornim putevima, i dolazi do njihove opstrukcije [184].

U analiziranoj kohorti pacijenata, kod jednog pacijenta detektovana je udružena heterozigotna varijanta u ovom genu (NM_002457.2, c.5735G>T, p.Gly1918Val; c.8084T>G, p.Ile2683Ser).

Gen *SLC26A9* (eng. *Solute Carrier Family 26 Member 9*, *SLC26A9*) je član familije gena sulfat/anjonskih transportera. Članovi porodice su visoko konzervirani kada je u pitanju broj i veličina egzona i struktura proteina (dužina se ne razlikuje među vrstama), ali imaju različite profile ekspresija u različitim tkivima [185].

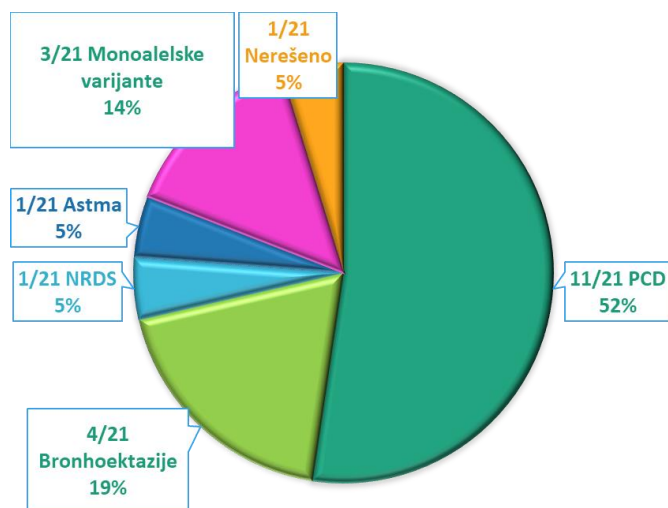
SLC26A9 ima funkciju Cl^- - HCO_3^- transportera, kanala za Cl^- i Na^+ kuplovanog transportera [186, 187]. Protein *SLC26A9* lokalizovan je u epitelnom tkivu stomaka i pluća [186]. Proteini *SLC26A9* i *CFTR* se zajedno eksprimiraju u crevnom i plućnom epitelu čime se uvećava značaj interakcije protein-protein ovih proteina. Dodatno, GWA studija koja je obuhvatila pacijente sa cističnom fibrozom ukazala je da je ekspresija humanog gena *SLC26A9* asocirana sa određenim fenotipovima cistične fibroze [188]. Brojne studije su dovele do hipoteze da patogene promene u genu *SLC26A9* mogu imati velike (monogenske) ili male (poligeneske) fenotipske efekte na cističnu fibrozu i/ili druge bolesti kod ljudi, te je funkcionalna analiza varijanti detektovanih u ovom genu klinički veoma značajna [189].

Kod jednog pacijenta detektovana je varijanta u genu *SLC26A9* (NM_134325.2, c.514G>A, p.Val172Met).

Uprkos sličnoj kliničkoj prezentaciji bolesti kod PCD pacijenata i pacijenata sa drugim plućnim bolestima, kada je dijagnoza PCD-a genetički odbačena i precizna dijagnoza bronhiektazija, NRDS i astme uspostavljena, adekvatnija terapija je primenjena za lečenje ovih bolesti i kvalitet života ovih pedijatrijskih pacijenata je poboljšan.

Iako je finalno analizirano 93 gena, kod jednog pacijenta nisu detektovane genetičke varijante koje bi odgovarale kliničkoj slici pacijenta. Ovaj rezultat sugerše da su nova saznanja koja će omogućiti proširavanje spektra analiziranih gena neophodna u cilju uspostavljanja precizne dijagnoze kod svih pacijenata. Takođe, treba napomenuti da je naša analiza obuhvatila samo kodirajuće regione 93 gena i male genetičke promene i da veliki hromozomski rearanžmani nisu obuhvaćeni ovim načinom analize.

Dijagnostička strategija dizajnirana da obuhvata ne samo gene uzročnike i gene kandidate za PCD, već i gene koji su odgovorni ili doprinose nastanku uočenih simptoma kod pacijenta, omogućava bržu, lakšu i pristupačniju detekciju patogenih varijanti kod pacijenata suspektnih na PCD čime se obezbeđuje primena odgovarajuće terapije. Primena ovakve strategije omogućila je da stopa detekcije mutacija dostigne 95% i da se stopa uspostavljenih dijagnoza poveća za približno 30% (sa 52.38% na 80.95%) (Slika 23).



Slika 23. Distribucija pedijatrijskih plućnih oboljenja detektovanih u analiziranoj kohorti pacijenata. Nakon detaljne analize koja je obuhvatila 93 gena uzročnika i gena kandidata za PCD i druge pedijatrijske plućne bolesti, stopa detekcije mutacija dostigla je 95%, dok je stopa uspostavljenih dijagnoza dostigla 80.95%. Primarna cilijarna diskinezija sa 52% je najzastupljeniji poremećaj među analiziranim pacijentima, a zatim slede bronhiektazije bez cistične fibroze sa 19%, i NRDS i astma sa po 5%. Procenat

pacijenata sa patogenim monoalelskim varijantama u PCD genima uzročnicima iznosi 14%, dok jedan pacijent ostao bez genetičke potvrde kliničkog fenotipa.

5.2.4. FUNKCIONALNA ANALIZA NOVE VARIJANTE c.947_948insG, p.Thr318TyrfsTer11 U KODIRAJUĆEM REGIONU GENA *DNAI1*

Među pacijentima sa detektovanim patogenim promenama u PCD genima, nova, neokarakterisana homozigotna varijanta c.947_948insG, detektovana je u egzonu 9 gena *DNAI1* kod dve rođene sestre. Obzirom da je reč o potencijalnoj patogenoj varijanti koja dovodi do razvoja primarne cilijarne diskinezije, ova promena je podvrgnuta funkcionalnoj i *in silico* analizi, u cilju potvrde patološkog efekta.

Gen *DNAI1* (eng. *Axonemal dynein intermediate-chain gene*, *DNAI1*) (OMIM #604366)) je prvi prijavljeni gen u kome su detektovane genetičke promene povezane sa kliničkim fenotipom PCD-a. U okviru gena *DNAI1*, do sada je detektovano 73 različitih genetičkih promena koje uzrokuju PCD, prema podacima iz baze podataka ClinVar.

Segregaciona analiza je potvrdila da su pacijenti, koji su homozigotni nosioci varijante c.947_948insG, nasledili ovu genetičku promenu od svojih roditelja koji su heterozigoti (Slika 5), čime je potvrđeno recesivno nasleđivanje ove varijante.

5.2.4.1. Molekularna karakterizacija genetičke varijante c.947_948insG *DNAI1*

Genetička promena c.947_948insG dovodi do menjanja okvira čitanja sekvence gena *DNAI1* i uvodi prevremeni UGA stop kodon 33 nukleotida nishodno od mesta insercije guanina. Na transkripcionom nivou je pokazano da je iRNK gena *DNAI1* koji sadrži prevremeni stop kodon manje eksprimiran od neizmenjenog transkripta gena. Pretpostavka je da je mutirani transkript obeležen za degradaciju posredovanu prevremenim stop kodonom, NMD (eng. *Nonsense-mediated mRNA decay*, NMD), ali kako ovaj mehanizam nije podjednako efikasan u svim ćelijskim tipovima, određena količina transkripta je i dalje prisutna u analiziranim uzorcima.

Analiza proteina *DNAI1* koji sadrži promenu p.Thr318TyrfsTer11 pokazala je prisustvo proteina kompletne dužine od 699 aminokiselina kod pacijenata uprkos prisustvu prevremenog UGA stop kodona i uočenom kliničkom fenotipu kod nosioca ove varijante.

5.2.4.2. *In silico* analiza genetičke varijante c.947_948insG DNAI1

Kako bi se prisustvo proteina DNAI1 kompletne dužine uprkos prevremenom stop kodonu objasnio, modelovana je trodimenzionalna struktura *wild type* i mutiranog proteina DNAI1 i oučeno je da se region koji je odgovoran za interakcije protein-protein nalazi nishodno od insercije nukleotida koji menja okvir čitanja sekvence (Slika 12). Naime, na pozicijama 337, 352, 385, 387, 404, 436, 456, 458, 498, 500, 517, 541, 542, 562, 586, 603, 631 i 633 u polipeptidnom lancu proteina DNAI1, koje učestvuju u interakcijama protein-protein, nalaze se druge aminokiseline (Tabela 17).

Ovaj rezultat ukazuje na to da je, iako je dužina mutiranog proteina ista kao i dužina neizmenjenog proteina, ovaj protein nefunkcionalan zbog odsustva interakcija sa drugim proteinima [190].

Potom je translirana sekvenca *wild type* i mutiranog proteina DNAI1 i detektovano je 17 UGA stop kodona nishodno od insercije guanina (Slika 13).

Terminacija sinteze proteina podrazumeva dekodiranje stop signala i interakciju između iRNK i proteina za oslobađanje (eng. *release factors*, RFs) kao odgovor na translokaciju sekvence koja nosi signal za terminaciju (UAA, UAG ili UGA) u A mesto ribozoma [191]. Iako tri stop kodona, dovode do terminacije translacije, proces terminacije translacije nije 100% efikasan [192]. Nekoliko prirodnih mehanizama suprimira proces terminacije translacije: ribozomsko menjanje okvira čitanja sekvence [193], supresorske tRNK, [194] i čitanje UGA stop kodona, za koji smatramo da je odgovoran za prisustvo kompletnog proteina u uzorcima pacijenata sa p.Thr318TyrfsTer11 promenom. Selenocisteinska tRNK ima sposobnost da UGA stop kodon zameni selenocisteinom ukoliko postoji SECIS element u netranslatirajućem regionu sekvence [195, 196]. Analizom prisustva SECIS elementa u 3'UTR regionu iRNK DNAI1 pokazano je da ovaj element zaista postoji (Slika 14, 15) i da se najverovatnije umesto 17 UGA stop kodona ugrađuje selenocistein, aminokiselina koja je kandidat za 21. aminokiselinu univerzalnog genetičkog koda.

Oslanjajući se na podatke iz literature, rezultate *in silico* analiza i visoku evolucionu konzerviranost regiona proteina DNAI1 koji je pogođen p.Thr318TyrfsTer11 promenom, kod analiziranih ortolognih organizama (Slika 12), postavljena je hipoteza da varijanta c.947_948insG u genu DNAI1 preferira sintezu proteina iza stop kodona i ugrađivanje selenocisteina umesto UGA

kodona, pre nego degradaciju nakon prevremenog stop kodona, ali biološki značaj rekodiranja UGA kodona u proteinu DNAI1 nije još uvek poznat.

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju, može se zaključiti da je nukleotidna insercija c.947_948insG koja dovodi do uvođenja 17 preveremenih stop kodona i sinteze proteina DNAI1 sa izmenjenom aminokiselinsom sekvencom, zapravo patološka promena koja dovodi do razvoja primarne cilijarne diskinezije, i kao takva se može uvrstiti u baze podataka.

5.3. DIFERENCIJACIJA BAZALNE ĆELIJSKE LINIJE A549 U CILIJARNU ĆELIJSKU LINIJU, EKSPRESIONI PROFILI MARKERA CILIOGENEZE I TRETMAN ĆELIJSKE LINIJE A549 MOLEKULOM cAMP

Drugi deo ove studije obuhvatio je optimizaciju protokola za kultivaciju humane plućne epitelne ćelijske linije A549 u cilju diferencijacije u cilijarnu ćelijsku liniju; analizu profila ekspresije markera za ciliogenezu (*RFX3*, *FOXJ1*, *CCNO*, *MCIDAS*, *GEMC1* i *NOTCH1*) u različitim vremenskim tačkama (od 0. dana do 15. dana) u cilju utvrđivanja obrasca profila ekspresije markera ciliogenezе u ćelijskoj liniji A549; i optimizaciju doze i načina aplikacije cAMP-a za tretman bazalne ćelijske linije A549, u različitim vremenskim intervalima u cilju ispitivanja uticaja primenjenog molekula na aktivaciju PKA i nishodnu fosforilaciju serina.

5.3.1. OPTIMIZACIJA KULTIVACIJE ĆELIJSKE LINIJE A549 U CILJU DIFERENCIJACIJE U CILIJARNU ĆELIJSKU LINIJU

Ovo je prva studija koja izučava proces ciliogenezе na adenokarcinomskoj humanoј alveolarnoj bazalnoj epitelnoj ćelijskoj liniji A549 i iz literature nije poznato koji su optimalni uslovi za njenu kultivaciju i koliko je vremena potrebno za diferencijaciju u cilijarnu ćelijsku liniju.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je optimalna gustina ćelija A549 za kultivaciju na *transwell* filter membrani 2×10^5 ćelija u 100 μ l medijuma, a vreme trajanja adherencije ćelija za invertovani filter je 3h. Uspešnost kultivacije ove ćelijske linije na invertovanim membrana pokazana je njihovim dostizanjem konfluentnosti od ~100% nakon dva dana. Ćelijska linija A549 je u optimizovanim uslovima kultivisana 15 dana u cilju aktivacije procesa ciliogenezе i diferencijacije u multicilijarne ćelije, ali cilije pod mikroskopom nisu uočene.

Prema podacima iz literature dobijenih kultivacijom na *transwell* membranama drugih ćelijskih linija, vreme koje je potrebno da se cilije uoče je između 3 i 14 dana [197-199]. Istraživanje koje su sproveli Wakabayashi i saradnici obuhvatilo je kultivaciju ćelijske linije MDCK II (eng. *Madin-Darby Canine Kidney*, MDCK) na invertovanim *transwell* filter membranama i cilije su detektovane na apikalnoj strani polarizovanih ćelija nakon 5 dana [199]. Istraživanje sprovedeno na mišjim trahealnim bazalnim ćelijama je pokazalo da bazalne ćelije pluća reaguju na povredu izazvanu inhalacijom nekog oštećujućeg agensa tako što se predominantno diferenciraju u cilijarne ćelije, a taj proces traje dve nedelje [197]. Studija koju su

sproveli Ott i saradnica, imala je za cilj dizajn protokola za kultivaciju ćelijske linije MDCK i NIH3T3 u cilju formiranja primarne cilije na živim ćelijama. Ova studija je pokazala da ćelijska linija MDCK formira cilije nakon 3 do 5 dana kultivisanja u odgovarajućim uslovima, dok proces ciliogeneze nešto kraće traje kod ćelijske linije NIH3T3 (embrionalni fibroblasti poreklom iz miša), svega dan ili dva nakon starvacije [198].

Vodeći se rezultatima ovih studija, naša pretpostavka je bila da će se proces ciliogeneze završiti nakon 15 dana i da ćemo uočiti cilije pod mikroskopom. Kako cilije ipak nisu detektovane, sledeći korak u istraživanju obuhvatio je analizu ekspresionih profila markera ciliogeneze u ćelijskoj liniji A549 i njihovo upoređivanje sa rezultatima iz literature dobijenih na drugim ćelijskim linijama, kako bi se odredila faza ciliogeneze u kojoj se ćelije nalaze nakon 15 dana i dala pretpostavka koliko je potrebno produžiti kultivaciju u ALI sistemu kako bi doslo do njihove diferencijacije u cilijarne ćelije.

5.3.2. EKSPRESIONI PROFILI MARKERA CILIOGENEZE

U cilju utvrđivanja ekspresionih profila markera ciliogeneze u ćelijskoj liniji A549, analizirane su iRNK prikupljene nakon 0, 3, 5, 10 i 15 dana kultivacije na *transwell* membrana. Ekspresioni profili gena *RFX3*, *FOXJ1*, *CCNO*, *MCIDAS*, *GEMC1* i *NOTCH1* upoređeni su sa literaturnim podacima ekspresionih profila istih markera ciliogeneze dobijenih u *in vivo* i *in vitro* eksperimentima na drugim ćelijskim linijama. Ovi rezultati su iskorišćeni za procenu stadijuma ciliogeneze u ćelijskoj liniji A549 i faze u kojoj se ove ćelije nalaze nakon 15 dana gajenja u ALI sistemu.

Analiza ekspresije markera ciliogeneze RFX3

Istraživanja sprovedena na *C. elegans* i *D. melanogaster* pokazala su da transkripcioni faktori RFX upravljaju procesom ciliogeneze [27, 28], a na mišu kao model sistemu, pokazano je da Rfx3 reguliše rast primarne cilije u embrionalnom čvoru i u pankreasu [200, 201].

Kako do sada nije utvrđena uloga ovog gena na diferencijaciju ćelijske linije A549 u multicilijarne ćelije, analiziran je profil ekspresije gena *RFX3* poreklom iz ove ćelijske linije, u pet vremenskih tačaka, i upoređen sa literaturnim podacima.

Analiza ekspresije je pokazala da je količina transkripta gena *RFX3* petostruko veća nakon 15 dana u odnosu na ekspresiju istog gena nultog dana kultivacije ćelijske linije A549 u ALI sistemu.

Istraživanje koju su sprovedi Zein i saradnici na mišjim embrionima E18.5, je pokazalo da je tokom procesa ebrionogeneze kao i nakon rođenja miša gen *Rfx3* eksprimiran u određenim ventrikularnim ćelijama mozga [202]. Rezultati njihovog istraživanja na disektovanom mozgu miša su pokazali da je nivo ekspresije gena *Rfx3* bio u postepenom porastu od nultog dana gajenja u ALI sistemu i starvacije, do 20. dana, kada dostiže svoj maksimum, a cilije su uočene nakon tri nedelje (21 dan) [110].

Kada ove rezultate uporedimo sa dobijenim rezultatima, uočava se da profil ekspresije gena *RFX3* u ćelijskoj liniji A549 (Slika 16) prati isti obrazac ekspresije mišjeg gena *Rfx3*, odnosno da postoji korelacija između dužine kultivacije ćelija u ALI sistemu i porasta ekspresije i u ćelijskoj liniji A549. Kako je ćelijska linija A549 kultivisana svega 15 dana u ovom sistemu, i kako ekspresija gena *RFX3* nije počela da opada, može se zaključiti da je potrebno produžiti trajanje kultivacije ćelijske linije A549 u ovom sistemu kako bi se završio proces ciliogeneze i uočile multicilijarne ćelije.

Prema istraživanju procesa ciliogeneze od strane Terré i saradnika, gen *RFX3* svoju ulogu u procesu ciliogeneze vrši u okviru faze duplikacije centriola [123]. Kako je svaka cilija MCC formirana od bazalnog tela, nastanak MCC zahteva masovnu ekspanziju centriola kako bi se formirale stotine cilija po ćeliji [203]. Duplikacija centriola se regularno odvija za vreme ćelijskog ciklusa kroz kanonski majka-centriola zavisani put, ali kako su MCC postmitotičke, duplikacija centriola se zasniva na *de novo* formiranju bazalnih tela. Ovaj sistem ekspanzije bazalnih tela zavisi od deuteriosoma, slabo objašnjenih, elektronskih prstenastih struktura, koje omogućavaju brzo formiranje velikog broja bazalnih tela [204].

Petnaesti dan ciliogeneze ćelijske linije A549, kada je uočena petostruko veća ekspresija gena *RFX3* u odnosu na nulti dan, odgovora završnoj fazi duplikacije centriola i početku faze formiranja multicilijarnih ćelija, pa dobijeni rezultati ukazuju da je gen *RFX3* izolovan iz ćelijske linije A549, uključen u ove procese.

Analiza ekspresije markera ciliogeneze FOXJ1

Istraživanja na *D. melanogaster*, *X. laevis*, *D. rerio* i *M. musculus* su dovela do identifikacije brojnih cilijarnih gena (geni za neophodni asembliranje i transport ODA, IDA, CP, RS, geni koji kodiraju proteine IFT, tubuline i tubulin-modifikujuće enzyme) (115, 116) koji su regulisani transkripcionim faktorom FOXJ1, čime je potvrđena njegova uloga u diferencijaciji MCC kod brojnih organizama, uključujući i čoveka.

Analizom relativne ekspresije gena *FOXJ1* poreklom iz ćelijske linije A549, u različitim vremenskim intervalima, pokazano je da je ekspresija u trećem i petnaestom danu kultivisanja ćelija A549 u ALI sistemu petostruko veća od ekspresije u nultom danu (Slika 17).

Istraživanje koje su sprovedi Thomas i saradnici je pokazalo da je transkripcioni faktor FOXJ1 esencijalan za asembliranje cilija kod kičmenjaka kroz regulaciju gena koji su neophodni za formiranje svih komponenti motornih cilija kao i regulaciju gena neophodnih za transport bazalnih tela do apikalne membrane [205]. Slično istraživanje na *in vitro* kultivisanim ćelijama izolovanih iz embriona miša kome nedostaje gen *Foxj1* je pokazalo da formiranje mnogobrojnih bazalnih tela ne zavisi od ovog transkripcionog faktora, ali da je njihovo asembliranje za apikalnu membranu MCC nemoguće u odsustvu Foxj1 [206, 207].

Kada ove rezultate uporedimo sa dobijenim rezultatima na ćelijskoj liniji A549, pretpostavljamo da je povišena ekspresija gena *FOXJ1* nakon tri dana gajenja u ALI sistemu asocirana sa regulisanjem mnogobrojnih strukturnih gena MCC i da odgovara ranoj fazi duplikacije centriola. Petostruko povišena ekspresija ovog gena nakon 15 dana kultivisanja ćelijske linije A549 verovatno odgovara fazi asembliranja bazalnih tela na apikalnu membranu ćelijske linije A549 koja će se diferencirati u MCC. Dodatno, poređenjem dobijenih rezultata sa istraživanjem Horani i saradnika je pokazalo da je ekspresioni profil gena *FOXJ1* izolovanog iz humanih disajnih puteva sličan ekspresionom profilu gena *FOXJ1* poreklom iz ćelijske linije A549 [208]. Naime, detektovana je povećana ekspresija ovog gena nakon 3.5, 14 i 21. dana kultivacije humanih plućnih ćelija, čime se još jednom potvrđuje da gen *FOXJ1* ima značajnu ulogu i u ciliogenezi ćelijske linije A549.

Analiza ekspresije markera ciliogeneze CCNO

Istraživanje Fank i saradnika na mišjim traheobronhijalnim epitelnim ćelijama mTEC (eng. *Mouse tracheal epithelial cell*, mTEC) pokazalo je specifičnu ekspresiju gena *Ccno* od ranih faza

duplikacije centriola i ciliogeneze za vreme embrionalnog razvića, do diferencijacije u MCC. Istraživanje Ccno deficijentog miša koji ispoljava fenotip PCD, je pokazalo da je uočeni fenotip posledica redukovano broja cilija na MCC. Poremećena ciliogeneza i redukvan broj cilija je rezultat poremećaja u mehanizmu duplikacije deuterosoma (amplifikacije centriola) koji sprečava pravilno formiranje cilijarnih bazalnih tela i asembliranje centriola [118]. Ovo istraživanje ide u prilog hipotezi da je gen CCNO ulogu duplikacije centriola u S fazi ćelijskog ciklusa, zamenio novom ulogom u procesu amplifikacije centriola zavisne od deuterosoma [117].

Ekspresioni profil gena CCNO analiziran je nakon 0., 3., 5., 10., i 15. dana kultivacije ćelijske linije u ALI sistemu (Slika 18). Kvantifikaciona analiza je pokazala da ekspresija ovog gena svoj maksimum dostiže trećeg dana kultivacije ćelijske linije A549, i da se i ekspresije u desetom i petnaestom danu razlikuju od ekspresije u nultom danu. Poređenjem dobijenih rezultata sa rezultatima istraživanja koje su sprovedeli Funk i saradnici [118], koji su takođe detektovali da je iRNK *CCNO* najjače indukovana trećeg dana kultivacije u ALI sistemu, može se zaključiti da gen *CCNO* u ćelijskoj liniji A549 ima ulogu u procesu duplikacije centriola (formiranje deuterosoma) i njihovom asembliranju na apikalnu membranu ćelije. Poremećena ekspresija ovog gena u kasnim fazama ciliogeneze (15 dan) dovodi do razvoja primarne cilijarne diskinezije usled formiranja MCC sa redukovanim brojem cilija [118].

Analiza ekspresije markera ciliogeneze NOTCH1, MCIDAS i GEMC1

Događaji u ćeliji koji predstavljaju okidač za diferencijaciju MCC nisu u potpunosti jasni i smatra se da variraju u odnosu na organizam i tip tkiva [203, 209]. U brojnim tkivima, inhibicija Notch/Delta signalnog puta promovise diferencijaciju progenitorskih ćelija u MCC [32, 210, 211]. Inhibicija Notch signalnog puta delom je prouzrokovana familijama miRNK (Mir34 i Mir449) koje direktno kontrolišu Notch [121, 212] što dovodi do aktivacije proteina MULTICILIN i GEMC1.

Istraživanje sprovedeno od strane Marcet i saradnika je pokazalo da je nivo ekspresije proteina NOTCH1 i Delta-Like 1 u humanim multicilijarnim ćelijama manji nego u okolnim ćelijama i da je smanjenje ekspresije gena, a potom i proteina, posledica povišene ekspresije miR-449. Ovakav mehanizam regulacije ekspresije gena *NOTCH1* neophodan je za otpočinjanje procesa deferencijacije progenitorskih cilijarnih ćelija [121].

Dve nedavne studije su ukazale je transkripcioni faktor MULTICILIN kodiran od strane gena *MCIDAS*, glavni regulator transkripcionog programa multicilogeneze zavisne od formiranja deuterosoma [119, 120] i smatra se da je prvi u nizu transkripcionih aktivatora MCC diferencijacije.

Istraživanje Terré i saradnika na miševima kojima je urađena deplecija gena *Gemc1*, rezultovalo je formiranjem modela i hipoteze potencijalne uloge *Gemc1* u diferencijaciji MCC [123]. *Gemc1* svoju aktivnost ostvaruje u ranim fazama procesa ciliogeneze, interagujući sa kompleksom E2F4/5-DP1 u cilju aktivacije gena *Mcidas* i *Foxj1*. Aktivacija gena *Mcidas* je direktna, dok aktivacija gena *Foxj1* može biti ili direktna (inhibicija Notch signalnog puta dovodi do aktivacije *Foxj1*), ili rezultat aktivacije gena *Mcidas* transkripcionih faktorom *Gemc1* koja poslednično dovodi do aktivacije *Foxj1* [123].

Pretpostavka je da GEMC1 i MULTICILIN formiraju heterokomplekse [213] što dovodi do optimalne aktivacije gena *FOXJ1*, *MYB* i *RFX3* kao i transkripcionih faktora koji će aktivirati gene neophodne za pojedinačne komponentne cilija, *CCDC78*, *DEUP1* i *CCNO* [117-119]. Kako je njihova uloga u aktivaciji gena koji su neophodni za amplifikaciju centriola (formiranje deuterosoma), asembilarnje bazalnih tela za apikalnu membranu ćelija i formiranje MCC, smatra se da u procesu ciliogeneze oni svoju ulogu ostvaruju u početnim, progenitorskim fazama analizirane ćelijske linije.

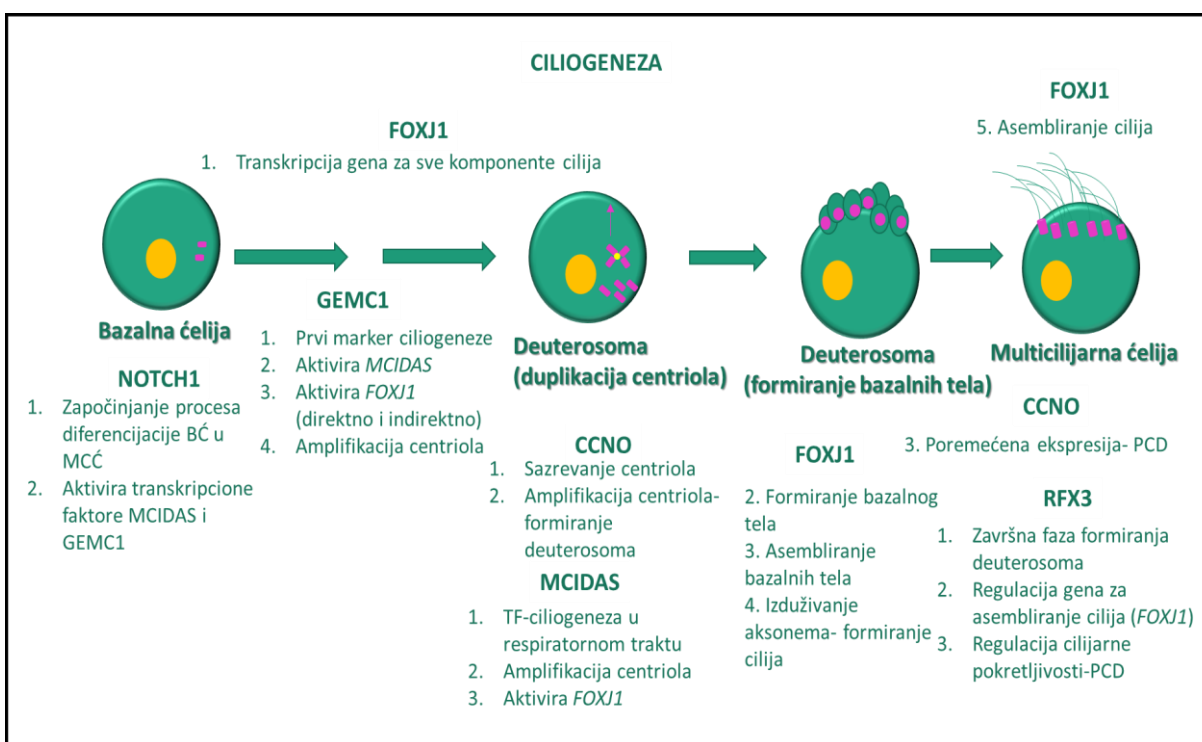
Kvantifikaciona analiza ekspresije gena *NOTCH1* je pokazala da je ekspresija ovog gena povišena u trećem i petnaestom danu kultivacije ćelijske linije A549 u ALI sistemu. Treći dan kultivacije ćelija u ALI sistemu odgovara početnim fazama procesa ciliogeneze kada u progenitorskoj ćeliji dolazi do *de novo* amplifikacije centriola (rana faza formiranja deuterosoma).

Povišena ekspresija gena *NOTCH1* na početku procesa ciliogeneze na prvi pogled ne ukazuje na ulogu gena *NOTCH1* u aktivaciji i regulaciji diferencijacije humane ćelijske linije A549 u MCC, jer brojni literaturni podaci potvrđuju da mehanizam aktivacije procesa ciliogeneze otpočinje inhibicijom gena *NOTCH1*. Detektovana ekspresija gena *NOTCH1* u ćelijskoj liniji A549 trećeg dana kultivacije u ALI sistemu bila je povišena svega 50% i nishodno je aktivirana ekspresija markera ciliogeneze *MCIDAS* i *GEMC1*. Povišeni nishodni markeri ciliogeneze ukazuju na inhibiciju gena *NOTCH1* u početnim fazama ovog procesa, jer je to jedini način aktivacije nishodnih markera, pa smo zaključili da nam vremenski okvir detekcije ekspresije ovog markera nije bio adekvatan i da je zapravo detektovana ekspresija trećeg dana već faza inhibicije ekspresije

ovog gena koja je najverovatnije bila mnogo veća prvog i drugog dana kultivacije analizirane ćelijske linije u ALI sistemu. Nagli porast ekspresije ovog gena 15 dana kultivacije u ALI sistemu, detektovan je samo u našoj studiji i biološki značaj ovog događaja nije u potpunosti jasan.

Analizom relativne ekspresije gena *MCIDAS* i *GEMC1* poreklom iz ćelijske linije A549, u različitim vremenskim intervalima, pokazano je da ekspresije ovih gena svoj maksimum dostižu trećeg dana kultivisanja ćelija A549 u ALI sistemu (Slika 19 i 20). Dobijeni ekspresioni profili ukazuju da geni *MCIDAS* i *GEMC1* poreklom iz ćelijske linije A549, svoju ulogu ostvaruju u početnim fazama u procesu diferencijacije ćelijske linije A549 u cilijarnu ćelijsku liniju. Detektovani ekspresioni pik trećeg dana ciliogeneze odgovara samom početku procesa *de novo* duplikacije centriola, čime se potvrđuje da geni *MCIDAS* i *GEMC1* i u ćelijskoj liniji A549 imaju ulogu transkripcionih aktivatora nishodnih gena neophodnih za proces ciliogeneze.

Finalno, upotrebom dobijenih rezultata, osmišljen je potencijalni model procesa ciliogeneze u humanoj bazalnoj plućnoj ćelijskoj liniji A549, koji obuhvata sve analizirane markere u ovoj studiji i njihove potencijalne uloge u ovom procesu (Slika 24).



Slika 24. Shematski prikaz predloženog modela diferencijacije humane plućne bazalne ćelijske linije A549 u multicilijarne ćelije. Analizom ekspresionih profila markera ciliogeneze *NOTCH1*, *GEMC1*, *MCIDAS*, *CCNO*, *RFX3* i *FOXJ1* u različitim vremenskim intervalima, predložena je njihova potencijalna

uloga u različitim fazama ciliogeneze ćelijske linije A549. Prema dobijenim rezultatima, za otpočinjanje procesa ciliogeneze neophodno je smanjenje ekspresije gena *NOTCH1* u prvim satima/danima koje dovodi do aktivacije i povećanja ekspresije prvih markera ciliogeneze *GEMC1* i *MCIDAS*. *GEMC1*, kao transkripcioni regulator, takođe stimuliše aktivaciju gena *MCIDAS*, čime indirektno aktivira i povećava ekspresiju gena *FOXJ1*, ali takođe je moguća i direktna aktivacija gena *FOXJ1* (bez posredstva transkripcionog regulatora *MCIDAS*). Geni *MCIDAS* i *CCNO* svoju najveću aktivnost ispoljavaju u ranim fazama ciliogeneze i smatraju se odgovornim za sazrevanje i *de novo* replifikaciju centriola (formiranje deuterosoma). Poremećena ekspresija gena *CCNO* u kasnim fazama dovodi do razvoja primarne cilijarne diskinezije usled formiranja MCC sa redukovanim brojem cilija. Transkripcioni regulator *RFX3* svoju aktivnost ispoljava u završnim fazama formiranja deuterosoma koje podrazumevaju formiranje i asembliranje bazalnih tela na apikalnu membranu ćelija i regulaciju gena za asembliranje cilija (*FOXJ1*). Transkripcioni faktor *FOXJ1* u završnoj fazi formiranja deuterosoma omogućava formiranje i asembliranje bazalnih tela, izdužavanje aksonema i formiranje cilija. Dodatno, ovaj transkripcioni faktor omogućava aktivaciju transkripcije gena za sve komponentne cilija.

5.3.3. OPTIMIZACIJA TRETMANA ĆELIJSKE LINIJE A549 CIKLIČNIM ADENOZIN MONOFOSFATOM I IMUNODETEKCIJA FOSFORILISANIH SERINA

Ovo je prva studija koja je izučavala tretman ćelijske linije A549 molekulom cAMP i praćenje posledične aktivacije PKA i nishodne fosforilacije serina celokupnih proteina izolovanih iz ove ćelijske linije, u cilju analize potencijalnog uticaja na frekvenciju kretanja cilija i ispitivanja potencijalnog terapijskog dejstva molekula cAMP.

Detaljnim pretraživanjem literature pronađeni su malobrojni eksperimentalni podaci vezani za koncentraciju i dužinu tretmana molekulom cAMP drugih model sistema ili ćelijskih linija. Kako literaturni podaci o tretmanu ćelijske linije A549 molekulom cAMP ne postoje, ova studija je obuhvatila proces optimizacije načina unosa malog molekula, doze primenjenog molekula i dužine trajanja tretmana.

cAMP predstavlja klasični, dobro poznati molekul koji ima ulogu sekundarnog glasnika [214]. Do danas, istraživanja na ovom molekulu dovela su do pet Nobelovih nagrada, što govori o njegovim mnogobrojnim i značajnim ulogama u ćeliji, a u poslednjih dvadeset godina, upotreba fluorescentno obeleženih proba dovela je do kvantifikacije i vizuelizacije ovog molekula, što je upotrebljeno za razumevanje njegovog prostornog i vremenskog ispoljavanja u ćeliji i razumevanje cele signalne kaskade [215, 216].

U plućima, cAMP je ključni regulator tonusa mišića obzirom da je glavni regulator relaksacije glatkih mišića pluća. Zbog svoje uloge u prevođenju signala nastalih kliničkom upotrebom agonista beta-adrenoreceptora u plućima koji dovode do bronhorelaksacije, postao je glavni terapijski target. Dodatno, molekul cAMP moduliše niz različitih ćelijskih procesa koji se odnose na funkciju disajnih puteva uključujući proizvodnju i lučenje zapaljenskih medijatora i komponenata ekstracelularnog matriksa, proliferacije i migracije epitelnih ćelija, kao i njihovu sekreciju mukusa, zarastanje rana, transport anjona i cilijarnu pokretljivost [217, 218].

Brojna istraživanja na animalnim modelima su pokazala da egzogeno aplikovan molekul cAMP aktivira signalnu kaskadu događaja u cilijarnoj ćeliji koji podrazumevaju aktivaciju protein kinaze A (ali i drugih kinaza) i nishodnu fosforilaciju cilijarnih proteina što rezultuje ubrzanim kretanjem cilija [145, 146].

Kako je jedna od glavnih karakteristika PCD-a nepokretljivost ili slaba pokretljivost cilija, i kako molekul cAMP ima mnogobrojne uloge u disajnim putevima, ispitana je potencijalna terapijska primena ovog molekula, odnosno potencijal egzogeno aplikovanog molekula na CBF.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je 10% glicerol najadekvatniji za permeabilizaciju ćelijske membrane i unos molekula cAMP u neizmenjenom obliku. Analiza je pokazala da je stepen fosforilacije serina u svim tretiranim uzorcima bio veći u odnosu na netretirani uzorak, čime je potvrđen ulazak molekula u ćeliju i aktivacija PKA.

Stepen fosforilacije serina u celokupnim proteinima se eksponencijalno povećavao sa dužinom trajanja tretmana uzoraka od petog do tridesetog minuta, nakon čega je stepen fosforilacije polako opadao. Ovaj obrazac stepena fosforilacije i dužine trajanja tretmana se ponovio i kada su upotrebljene dve različite koncentracije molekula cAMP, sugerišući da signalna kaskada ovog molekula u ćelijskoj liniji A549 traje približno 30 minuta, nakon čega se verovatno aktiviraju endogeni kinazni inhibitori PKI (eng. *Protein kinase inhibitor peptide*, PKI) koji učestvuju u regulaciji aktivnosti PKA i sprečavaju njenu prekomernu aktivaciju i nishodnu fosforilaciju [219]. Studija sprovedena od strane Goto i saradnika, takođe je pokazala da se u prvih 30 min tretmana ćelijske linije PC12D molekulom cAMP, aktivira PKA i dolazi do nishodne aktivacije ciljnih molekula koji dostižu svoju maksimalnu aktivnost u okviru 30 minuta [220], pa se može zaključiti da signalni proces od unosa molekula cAMP, preko aktivacije PKA do finalne fosforilacije ciljnih proteina traje približno 30 min.

Tretman uzoraka sa 300 μM i 600 μM cAMP je pokazao podjednaku efikasnost fosforilacije serina nishodnih proteina (Slika 22). Ovaj rezultat se može objasniti hipotezom da je koncentracija aplikovanog molekula od 300 μM bila dovoljna da zasiti sve receptore za cAMP u ćelijskoj liniji i da je rezultovala maksimalnim stepenom fosforilacije, pa se primena veće koncentracije nije odrazila na stepen fosforilacije. U prilog ovoj hipotezi idu istraživanja u čijim su eksperimentima korišćene mnogo manje koncentracije (10 μM -300 μM) molekula dibutiril cAMP, u kojima se jasno uočavala razlika u stepenu fosforilacije između različitih koncentracija ovog molekula [140, 221]. Sa druge strane, u literaturi takođe postoje podaci da koncentracija dibutiril cAMP čak i do 2 mM nije aktivirala PKA u ćelijskoj liniji NIH3T3 u dovoljnoj meri da bi se izvršila njena translokacija u nukleus i aktivacija CREB (eng. *cAMP-responsive promotor*, CREB) [222]. Kako literaturni ukazuju na to da je različita koncentracija ovog molekula potrebna da aktivira nishodni signalni put u različitim ćelijskim linijama, može se zaključiti da je optimizacija koncentracije molekula cAMP koja će aktivirati PKA neophodna za svaku ćelijsku liniju i da optimalna koncentracija egzogeno aplikovanog molekula cAMP koja dovodi do aktivacije PKA u ćelijskoj liniji A549 iznosi 300 μM .

6. ZAKLJUČCI

Kako je prvi deo ove studije imao za cilj genomsko profilisanje pacijenata sa primarnom cilijarnom diskinezijom (PCD) i funkcionalnu karakterizaciju novootkrivenih varijanti, na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Analizom rezultata genomskog profilisanja 21. pacijenta sa kliničkom prezentacijom primarne cilijarne diskinezije uspostavljena je genetička osnova PCD kod 52.38% analiziranih pacijenata sa teritorije Srbije. Patogene genetičke varijante su detektovane u genima uzročnicima (*CCDC40*, *DNAI1*, *DNALI1*, *DNAH5*, *DNAH11* i *LRRC6*) kao i u genima kandidatima (*SPAG16* i *SPAG17*) za PCD. Ukupno je detektovano 18 patogenih genetičkih varijanti, od kojih je 12 (66.67%) novootkriveno u našoj kohorti pacijenata.
2. Formirana je strategija za diferencijalnu dijagnostiku PCD pacijenata i drugih pacijenata sa sličnom kliničkom prezentacijom bolesti, ali bez patogenih promena u genima odgovornim za PCD. Strategija je obuhvatila analizu 93 gena, a patogene genetičke varijante su detektovane u sledećim genima: *ABCA3*, *CFTR*, *MUC2*, *SCNN1A* i *SLC26A9*. Ukupno je detektovano 6 patogenih genetičkih varijanti, od kojih je 5 (83.33%) novootkriveno u našoj studiji. Ovi geni odgovorni su za razvoj izolovanih bronhiektazija, neonatalnog respiratornog distres sindroma i atopične astme. Primena ovakve strategije omogućila je da stopa detekcije mutacija dostigne 95% i da se stopa uspostavljenih dijagnoza poveća na 80.95%.
3. Primarna cilijarna diskinezija sa 52.38% zastupljenosti je najzastupljeniji poremećaj među analiziranim pacijentima, a zatim slede bronhiektazije bez cistične fibroze sa 19% i neonatalni respiratorni distres sindrom i astma sa po 5% zastupljenosti. Procenat pacijenata sa patogenim monoalelskim varijantama u PCD genima uzročnicima iznosi 14%, dok je jedan pacijent ostao bez genetičke potvrde kliničkog fenotipa.
4. Strukturne i/ili funkcionalne promene u spoljašnjim dineinskim ručicama (ODA) uzrokovane patogenim genetičkim varijantama u genima koji kodiraju komponente ODA, odgovorne su za 55.55% uočenog fenotipa kod PCD pacijenata iz analizirane kohorte, a gen *DNAH5* je najčešće bio pogođen patogenim genetičkim varijantama (27.77%) u našoj populaciji.

5. Funkcionalno je okarakterisana novootkrivena homozigotna varijanta c.947_948insG, detektovana u egzonu 9 gena *DNAI1*, koja dovodi do menjanja okvira čitanja sekvence gena i uvodi prevremeni UGA stop kodon 33 nukleotida nishodno od mesta insercije guanina. Na osnovu rezultata funkcionalnih i *in silico* analiza pokazano je da insercija nukleotida G dovodi do uvođenja 17 prevremenih UGA stop kodona za koje postoji pretpostavka da su zamenjeni aminokiselinom selenocisteinom. Ugradnjom selenocisteina objašnjava se imunodetekcija kompletnog proteina *DNAI1*, ali sa izmenjenom aminokiselinskom sekvencom koja onemogućava funkcionalnost proteina usled narušenih pozicija u polipeptidnom lancu za interakcije protein-protein. Imajući sve ovo u vidu, kao i kliničku sliku pacijenata kod kojih je patogena genetička varijanta detektovana, može se zaključiti da je p.Thr318TyrfsTer11 promena u proteinu *DNAI1* zapravo patološka promena koja dovodi do razvoja primarne cilijarne diskinezije.

Kako je drugi deo ove studije obuhvatio optimizaciju protokola za diferencijaciju bazalne plućne ćelijske linije u cilijarnu ćelijsku liniju i testiranje malih molekula kao potencijalnih terapeutika za PCD, dobijeni rezultati doveli su do sledećih zaključaka:

1. Optimizovani su uslovi (optimalna gustina ćelija, vreme adherencije i konfluentnost) za propagaciju ćelijske linije A549 na *transwell* membranama. Ćelijska linija A549 je u optimizovanim uslovima kultivisana 15 dana u cilju aktivacije procesa ciliogeneze i diferencijacije u multicilijarne ćelije, ali cilije pod mikroskopom nisu uočene.
2. Analizom ekspresionih profila markera ciliogeneze *NOTCH1*, *GEMC1*, *MCIDAS*, *CCNO*, *RFX3* i *FOXJ1* u različitim vremenskim intervalima i upoređivanjem sa literaturnim podacima, utvrđeni su vremenski okviri odvijanja različitih faza procesa ciliogeneze u ćelijskoj liniji A549.
 - a) Ekspresioni nivoi analiziranih markera ciliogeneze poreklom iz ćelijske linije A549 ukazuju da se ova ćelijska linija 3. dana kultivacije u ALI sistemu nalazi u fazi *de novo* duplikacije centriola (nivoi ekspresije gena *FOXJ1*, *MCIDAS*, *GEMC1* i *CCNO*) procesa ciliogeneze. Povišen nivo ekspresije gena *CCNO* poreklom iz ćelijske linije A549 izmeren nakon 10. dana kultivacije u ALI sistemu

ukazuje da se ova ćelijska linija nalazi u fazi asembliranja centriola na apikalnu membranu ćelija, procesa ciliogeneze. Povišeni nivoi ekspresije gena *RFX3* i *FOXJ* nakon 15 dana kultivacije ćelijske linije A549 u dvofaznoj sredini ukazuju da se analizirana ćelijska linija nalazi u kasnoj fazi formiranja deuterosoma i asembliranja bazalnih tela na apikalnu membranu ćelija A549, procesa ciliogeneze.

- b) Rezultat kvantifikacione analize gena *NOTCH1* nije pratio očekivani profil ekspresije koji bi ukazivao na njegovu inhibiciju i posledičnu aktivaciju nishodnih gena. Kako su nishodni markeri ciliogeneze *MCIDAS* i *GEMC1* aktivirani, pretpostavka je da se inhibicija gena *NOTCH1* dogodila u prvim satima ovog procesa, koji nisu obuhvaćeni ovim ispitivanjima. Na osnovu ovog rezultata može se zaključiti da vremenski okvir detekcije ekspresije *NOTCH1* nije bio adekvatan i da je potrebno analizirati nivo ekspresije ovog gena u prvim satima kultivacije ćelijske linije A549 u ALI sistemu. Nagli porast ekspresije ovog gena nakon 15 dana kultivacije u ALI sistemu detektovan je samo u našoj studiji, što sugeriše da gen *NOTCH1* reguliše još neke faze ciliogeneze u ćelijskoj liniji A549.
 - c) Na osnovu objedinjenih rezultata ekspresionih profila analiziranih markera ciliogeneze, može se zaključiti da je ćelijska linija A549 započela proces ciliogeneze, da je rana faza formiranja deuterosoma (amplifikacija centriola) završena i da je ćelijska linija A549 ušla u kasnu fazu formiranja deuterosoma u kojoj dolazi do izdužavanja aksonema i formiranja cilija, ali taj proces nije završen nakon 15 dana kultivisanja ćelijske linije A549 u dvofaznoj sredini.
3. Optimizovani su adekvatni uslovi (unos, dužina trajanja tretmana, koncentracija aplikovanog molekula) za tretman ćelijske linije A549 molekulom cAMP. Rezultati su ukazali da egzogeno aplikovani molekul cAMP ima potencijal aktivacije PKA i posledične nishodne fosforilacije serinskih ostataka celokupnih proteina ove ćelijske linije. Uočena fosforilacija sugeriše na potencijalnu ulogu ovog molekula u stimulanju bržeg kretanja cilija. Ipak, detektovana fosforilacija je tranzijentna i neophodni su dodatni eksperimenti kako bi se utvrdio tačan uticaj ovog molekula na brzinu kretanja cilija u multicilijarnoj ćelijskoj liniji.

7. LITERATURA

1. Goodenough, U.W., *Cilia, flagella and the basal apparatus*. Curr Opin Cell Biol, 1989. 1(1): p. 58-62.
2. GM., C., *A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Microtubule Motors and Movements*. The Cell, 2000
3. Satir, P. and S.T. Christensen, *Overview of structure and function of mammalian cilia*. Annu Rev Physiol, 2007. 69: p. 377-400.
4. Singla, V. and J.F. Reiter, *The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle*. Science, 2006. 313(5787): p. 629-33.
5. Wloga, D., et al., *TLL3 Is a tubulin glycine ligase that regulates the assembly of cilia*. Dev Cell, 2009. 16(6): p. 867-76.
6. Westermann, S. and K. Weber, *Post-translational modifications regulate microtubule function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. 4(12): p. 938-47.
7. Eley, L., L.M. Yates, and J.A. Goodship, *Cilia and disease*. Curr Opin Genet Dev, 2005. 15(3): p. 308-14.
8. Tissir, F., et al., *Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus*. Nat Neurosci, 2010. 13(6): p. 700-7.
9. Bylander, A., et al., *The classical progesterone receptor mediates the rapid reduction of fallopian tube ciliary beat frequency by progesterone*. Reprod Biol Endocrinol, 2013. 11: p. 33.
10. Zariwala, M.A., et al., *ZMYND10 is mutated in primary ciliary dyskinesia and interacts with LRRC6*. Am J Hum Genet, 2013. 93(2): p. 336-45.
11. Ben Khelifa, M., et al., *Mutations in DNAH1, which encodes an inner arm heavy chain dynein, lead to male infertility from multiple morphological abnormalities of the sperm flagella*. Am J Hum Genet, 2014. 94(1): p. 95-104.
12. Kindt, K.S., G. Finch, and T. Nicolson, *Kinocilia mediate mechanosensitivity in developing zebrafish hair cells*. Dev Cell, 2012. 23(2): p. 329-41.
13. Yoshihara, S., et al., *Cilia at the node of mouse embryos sense fluid flow for left-right determination via Pkd2*. Science, 2012. 338(6104): p. 226-31.
14. Wang, G., H.J. Yost, and J.D. Amack, *Analysis of gene function and visualization of cilia-generated fluid flow in Kupffer's vesicle*. J Vis Exp, 2013(73).

15. Bergmann, C., *ARPKD and early manifestations of ADPKD: the original polycystic kidney disease and phenocopies*. *Pediatr Nephrol*, 2015. 30(1): p. 15-30.
16. Larusso, N.F. and T.V. Masyuk, *The role of cilia in the regulation of bile flow*. *Dig Dis*, 2011. 29(1): p. 6-12.
17. Bloodgood, R.A., *Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia*. *J Cell Sci*, 2010. 123(Pt 4): p. 505-9.
18. Nonaka, S., et al., *Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein*. *Cell*, 1998. 95(6): p. 829-37.
19. Gallagher, A.R., et al., *Biliary and pancreatic dysgenesis in mice harboring a mutation in Pkhd1*. *Am J Pathol*, 2008. 172(2): p. 417-29.
20. Muhammad, H., et al., *The primary cilium as a dual sensor of mechanochemical signals in chondrocytes*. *Cell Mol Life Sci*, 2012. 69(13): p. 2101-7.
21. Ho, L., et al., *Primary cilia attenuate hedgehog signalling in neoplastic chondrocytes*. *Oncogene*, 2013. 32(47): p. 5388-96.
22. Di Gioia, S.A., et al., *FAM161A, associated with retinitis pigmentosa, is a component of the cilia-basal body complex and interacts with proteins involved in ciliopathies*. *Hum Mol Genet*, 2012. 21(23): p. 5174-84.
23. Rosenbaum, J.L. and G.B. Witman, *Intraflagellar transport*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(11): p. 813-25.
24. Kozminski, K.G., et al., *A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(12): p. 5519-23.
25. Scholey, J.M., *Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna*. *J Cell Biol*, 2008. 180(1): p. 23-9.
26. Andersen, J.S., et al., *Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling*. *Nature*, 2003. 426(6966): p. 570-4.
27. Avidor-Reiss, T., et al., *Decoding cilia function: defining specialized genes required for compartmentalized cilia biogenesis*. *Cell*, 2004. 117(4): p. 527-39.
28. Blacque, O.E., et al., *Functional genomics of the cilium, a sensory organelle*. *Curr Biol*, 2005. 15(10): p. 935-41.

29. Efimenko, E., et al., *Caenorhabditis elegans* DYF-2, an orthologue of human WDR19, is a component of the intraflagellar transport machinery in sensory cilia. *Mol Biol Cell*, 2006. 17(11): p. 4801-11.
30. Keller, L.C., et al., *Proteomic analysis of isolated chlamydomonas centrioles reveals orthologs of ciliary-disease genes*. *Curr Biol*, 2005. 15(12): p. 1090-8.
31. Li, J.B., et al., *Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene*. *Cell*, 2004. 117(4): p. 541-52.
32. Liu, Y., et al., *Notch signaling controls the differentiation of transporting epithelia and multiciliated cells in the zebrafish pronephros*. *Development*, 2007. 134(6): p. 1111-22.
33. Ostrowski, L.E., et al., *A proteomic analysis of human cilia: identification of novel components*. *Mol Cell Proteomics*, 2002. 1(6): p. 451-65.
34. Gherman, A., E.E. Davis, and N. Katsanis, *The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia*. *Nat Genet*, 2006. 38(9): p. 961-2.
35. www.ciliaproteome.org.
36. Waters, A.M. and P.L. Beales, *Ciliopathies: an expanding disease spectrum*. *Pediatr Nephrol*, 2011. 26(7): p. 1039-56.
37. Badano, J.L., et al., *The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders*. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2006. 7: p. 125-48.
38. Brugmann, S.A., D.R. Cordero, and J.A. Helms, *Craniofacial ciliopathies: A new classification for craniofacial disorders*. *Am J Med Genet A*, 2010. 152a(12): p. 2995-3006.
39. Han, Y.G. and A. Alvarez-Buylla, *Role of primary cilia in brain development and cancer*. *Curr Opin Neurobiol*, 2010. 20(1): p. 58-67.
40. Masyuk, T., A. Masyuk, and N. LaRusso, *Cholangiociliopathies: genetics, molecular mechanisms and potential therapies*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2009. 25(3): p. 265-71.
41. Baker, K. and P.L. Beales, *Making sense of cilia in disease: the human ciliopathies*. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2009. 151c(4): p. 281-95.
42. Marshall, W.F. and S. Nonaka, *Cilia: tuning in to the cell's antenna*. *Curr Biol*, 2006. 16(15): p. R604-14.
43. Ashe, A., et al., *Mutations in mouse *Ift144* model the craniofacial, limb and rib defects in skeletal ciliopathies*. *Hum Mol Genet*, 2012. 21(8): p. 1808-23.

44. Quinlan, R.J., J.L. Tobin, and P.L. Beales, *Modeling ciliopathies: Primary cilia in development and disease*. *Curr Top Dev Biol*, 2008. 84: p. 249-310.
45. Afzelius, B.A., *Situs inversus and ciliary abnormalities. What is the connection?* *Int J Dev Biol*, 1995. 39(5): p. 839-44.
46. Icardo, J.M., J.M. Garcia Rincon, and M.A. Ros, [*Congenital heart disease, heterotaxia and laterality*]. *Rev Esp Cardiol*, 2002. 55(9): p. 962-74.
47. Casey, B. and B.P. Hackett, *Left-right axis malformations in man and mouse*. *Curr Opin Genet Dev*, 2000. 10(3): p. 257-61.
48. Iannaccone, A., et al., *Clinical and immunohistochemical evidence for an X linked retinitis pigmentosa syndrome with recurrent infections and hearing loss in association with an RPGR mutation*. *J Med Genet*, 2003. 40(11): p. e118.
49. O'Callaghan, C., P. Chetcuti, and E. Moya, *High prevalence of primary ciliary dyskinesia in a British Asian population*. *Arch Dis Child*, 2010. 95(1): p. 51-2.
50. Sommer, J.U., et al., *ENT manifestations in patients with primary ciliary dyskinesia: prevalence and significance of otorhinolaryngologic co-morbidities*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2011. 268(3): p. 383-8.
51. Kuehni, C.E., et al., *Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children*. *Eur Respir J*, 2010. 36(6): p. 1248-58.
52. Lucas, J.S., A. Barbato, and S.A. Collins, *European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia*. 2017. 49(1).
53. AK, S., *Übereinen fall von bronchiectasie bei einem patienten mit situs inversusviscerum*. *Berliner KlinischeWochenschrift* 1904(41:139-141).
54. M., K., *Zur Pathogenese der Bronchiectasien. Bronchiectasien bei Situs viscerum inversus*. *Beiträgezur Klinik der Tuberkulose*, 1933(83(4):489-501).
55. Milla, C.E., *The evolving spectrum of ciliopathies and respiratory disease*. *Curr Opin Pediatr*, 2016. 28(3): p. 339-47.
56. Eliasson, R., et al., *The immotile-cilia syndrome. A congenital ciliary abnormality as an etiologic factor in chronic airway infections and male sterility*. *N Engl J Med*, 1977. 297(1): p. 1-6.
57. Afzelius, B.A., *A human syndrome caused by immotile cilia*. *Science*, 1976. 193(4250): p. 317-9.

58. Knowles, M.R., et al., *Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease.* Am J Respir Crit Care Med, 2013. 188(8): p. 913-22.
59. Sagel, S.D., et al., *Update of respiratory tract disease in children with primary ciliary dyskinesia.* Proc Am Thorac Soc, 2011. 8(5): p. 438-43.
60. Noone, P.G., et al., *Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features.* Am J Respir Crit Care Med, 2004. 169(4): p. 459-67.
61. Birch, J., et al., *Outcomes of lung transplantation in adults with bronchiectasis.* 2018. 18(1): p. 82.
62. Boon, M., et al., *Primary ciliary dyskinesia: critical evaluation of clinical symptoms and diagnosis in patients with normal and abnormal ultrastructure.* Orphanet J Rare Dis, 2014. 9: p. 11.
63. Frija-Masson, J., et al., *Clinical characteristics, functional respiratory decline and follow-up in adult patients with primary ciliary dyskinesia.* Thorax, 2017. 72(2): p. 154-160.
64. Daniels, M.L. and P.G. Noone, *Genetics, diagnosis, and future treatment strategies for primary ciliary dyskinesia.* Expert Opin Orphan Drugs, 2015. 3(1): p. 31-44.
65. Moore, A., et al., *RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa.* J Med Genet, 2006. 43(4): p. 326-33.
66. Bukowy-Bieryllo, Z., et al., *RPGR mutations might cause reduced orientation of respiratory cilia.* Pediatr Pulmonol, 2013. 48(4): p. 352-63.
67. Driscoll, J.A., et al., *Autosomal dominant polycystic kidney disease is associated with an increased prevalence of radiographic bronchiectasis.* Chest, 2008. 133(5): p. 1181-8.
68. Piatti, G., et al., *Emerging ciliopathies: are respiratory cilia compromised in Usher syndrome?* Am J Otolaryngol, 2014. 35(3): p. 340-6.
69. Schmidts, M., *Clinical genetics and pathobiology of ciliary chondrodysplasias.* J Pediatr Genet, 2014. 3(2): p. 46-94.
70. Li, Y., et al., *Respiratory motile cilia dysfunction in a patient with cranioectodermal dysplasia.* Am J Med Genet A, 2015. 167a(9): p. 2188-96.
71. Noone, P.G., et al., *Discordant organ laterality in monozygotic twins with primary ciliary dyskinesia.* Am J Med Genet, 1999. 82(2): p. 155-60.

72. Morini, F., et al., *An infant with respiratory distress and failure to thrive*. Eur Respir J, 2002. 20(2): p. 500-3.
73. Harden, B., et al., *Increased postoperative respiratory complications in heterotaxy congenital heart disease patients with respiratory ciliary dysfunction*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014. 147(4): p. 1291-1298.e2.
74. Barbato, A., et al., *Primary ciliary dyskinesia: a consensus statement on diagnostic and treatment approaches in children*. Eur Respir J, 2009. 34(6): p. 1264-76.
75. Wodehouse, T., et al., *Nasal nitric oxide measurements for the screening of primary ciliary dyskinesia*. Eur Respir J, 2003. 21(1): p. 43-7.
76. Walker, W.T., et al., *Nitric oxide in primary ciliary dyskinesia*. Eur Respir J, 2012. 40(4): p. 1024-32.
77. Leigh, M.W., et al., *Standardizing nasal nitric oxide measurement as a test for primary ciliary dyskinesia*. Ann Am Thorac Soc, 2013. 10(6): p. 574-81.
78. Marthin, J.K. and K.G. Nielsen, *Hand-held tidal breathing nasal nitric oxide measurement--a promising targeted case-finding tool for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia*. PLoS One, 2013. 8(2): p. e57262.
79. Harris, A., et al., *Validation of a portable nitric oxide analyzer for screening in primary ciliary dyskinesias*. BMC Pulm Med, 2014. 14: p. 18.
80. Shoemark, A., et al., *Primary ciliary dyskinesia with normal ultrastructure: three-dimensional tomography detects absence of DNAH11*. Eur Respir J, 2018. 51(2).
81. Stannard, W.A., et al., *Diagnostic testing of patients suspected of primary ciliary dyskinesia*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. 181(4): p. 307-14.
82. Chilvers, M.A. and C. O'Callaghan, *Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods*. Thorax, 2000. 55(4): p. 314-7.
83. Chilvers, M.A., A. Rutman, and C. O'Callaghan, *Ciliary beat pattern is associated with specific ultrastructural defects in primary ciliary dyskinesia*. J Allergy Clin Immunol, 2003. 112(3): p. 518-24.
84. Hirst, R.A., et al., *Ciliated air-liquid cultures as an aid to diagnostic testing of primary ciliary dyskinesia*. Chest, 2010. 138(6): p. 1441-7.
85. <https://www.omim.org/entry/244400>.

86. Koutoulis, A., et al., *The Chlamydomonas reinhardtii ODA3 gene encodes a protein of the outer dynein arm docking complex*. J Cell Biol, 1997. 137(5): p. 1069-80.
87. Raidt, J., et al., *Ciliary beat pattern and frequency in genetic variants of primary ciliary dyskinesia*. Eur Respir J, 2014. 44(6): p. 1579-88.
88. Becker-Heck, A., et al., *The coiled-coil domain containing protein CCDC40 is essential for motile cilia function and left-right axis formation*. Nat Genet, 2011. 43(1): p. 79-84.
89. Merveille, A.C., et al., *CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs*. Nat Genet, 2011. 43(1): p. 72-8.
90. Zariwala, M.A., et al., *Mutations of DNAI1 in primary ciliary dyskinesia: evidence of founder effect in a common mutation*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 174(8): p. 858-66.
91. Loges, N.T., et al., *DNAI2 mutations cause primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm*. Am J Hum Genet, 2008. 83(5): p. 547-58.
92. Olbrich, H., et al., *Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry*. Nat Genet, 2002. 30(2): p. 143-4.
93. Knowles, M.R., et al., *Exome sequencing identifies mutations in CCDC114 as a cause of primary ciliary dyskinesia*. Am J Hum Genet, 2013. 92(1): p. 99-106.
94. Onoufriadis, A., et al., *Splice-site mutations in the axonemal outer dynein arm docking complex gene CCDC114 cause primary ciliary dyskinesia*. Am J Hum Genet, 2013. 92(1): p. 88-98.
95. Onoufriadis, A., et al., *Combined exome and whole-genome sequencing identifies mutations in ARMC4 as a cause of primary ciliary dyskinesia with defects in the outer dynein arm*. J Med Genet, 2014. 51(1): p. 61-7.
96. Omran, H., et al., *Ktu/PF13 is required for cytoplasmic pre-assembly of axonemal dyneins*. Nature, 2008. 456(7222): p. 611-6.
97. Austin-Tse, C., et al., *Zebrafish Ciliopathy Screen Plus Human Mutational Analysis Identifies C21orf59 and CCDC65 Defects as Causing Primary Ciliary Dyskinesia*. Am J Hum Genet, 2013. 93(4): p. 672-86.
98. Kurkowiak, M., E. Zietkiewicz, and M. Witt, *Recent advances in primary ciliary dyskinesia genetics*. J Med Genet, 2015. 52(1): p. 1-9.
99. Panizzi, J.R., et al., *CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms*. Nat Genet, 2012. 44(6): p. 714-9.

100. Castleman, V.H., et al., *Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities*. Am J Hum Genet, 2009. 84(2): p. 197-209.
101. Zietkiewicz, E., et al., *Mutations in radial spoke head genes and ultrastructural cilia defects in East-European cohort of primary ciliary dyskinesia patients*. PLoS One, 2012. 7(3): p. e33667.
102. Kott, E., et al., *Loss-of-function mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with central-complex and radial-spoke defects*. Am J Hum Genet, 2013. 93(3): p. 561-70.
103. Olbrich, H., et al., *Recessive HYDIN mutations cause primary ciliary dyskinesia without randomization of left-right body asymmetry*. Am J Hum Genet, 2012. 91(4): p. 672-84.
104. Blanchon, S., et al., *Delineation of CCDC39/CCDC40 mutation spectrum and associated phenotypes in primary ciliary dyskinesia*. J Med Genet, 2012. 49(6): p. 410-6.
105. Wirschell, M., et al., *The nexin-dynein regulatory complex subunit DRC1 is essential for motile cilia function in algae and humans*. Nat Genet, 2013. 45(3): p. 262-8.
106. Pifferi, M., et al., *New DNAH11 mutations in primary ciliary dyskinesia with normal axonemal ultrastructure*. Eur Respir J, 2010. 35(6): p. 1413-6.
107. Knowles, M.R., et al., *Mutations of DNAH11 in patients with primary ciliary dyskinesia with normal ciliary ultrastructure*. Thorax, 2012. 67(5): p. 433-41.
108. Gajiwala, K.S., et al., *Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding*. Nature, 2000. 403(6772): p. 916-21.
109. Emery, P., et al., *A consensus motif in the RFX DNA binding domain and binding domain mutants with altered specificity*. Mol Cell Biol, 1996. 16(8): p. 4486-94.
110. El Zein, L., et al., *RFX3 governs growth and beating efficiency of motile cilia in mouse and controls the expression of genes involved in human ciliopathies*. J Cell Sci, 2009. 122(Pt 17): p. 3180-9.
111. Hannenhalli, S. and K.H. Kaestner, *The evolution of Fox genes and their role in development and disease*. Nat Rev Genet, 2009. 10(4): p. 233-40.
112. Clevidence, D.E., et al., *Members of the HNF-3/forkhead family of transcription factors exhibit distinct cellular expression patterns in lung and regulate the surfactant protein B promoter*. Dev Biol, 1994. 166(1): p. 195-209.
113. Murphy, D.B., et al., *The human hepatocyte nuclear factor 3/fork head gene FKHL13: genomic structure and pattern of expression*. Genomics, 1997. 40(3): p. 462-9.

114. Blatt, E.N., et al., *Forkhead transcription factor HFH-4 expression is temporally related to ciliogenesis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. 21(2): p. 168-76.
115. Didon, L., et al., *RFX3 modulation of FOXJ1 regulation of cilia genes in the human airway epithelium*. Respir Res, 2013. 14: p. 70.
116. Stubbs, J.L., et al., *The forkhead protein Foxj1 specifies node-like cilia in Xenopus and zebrafish embryos*. Nat Genet, 2008. 40(12): p. 1454-60.
117. Klos Dehring, D.A., et al., *Deuterosome-mediated centriole biogenesis*. Dev Cell, 2013. 27(1): p. 103-12.
118. Funk, M.C., et al., *Cyclin O (Ccno) functions during deuterosome-mediated centriole amplification of multiciliated cells*. Embo j, 2015. 34(8): p. 1078-89.
119. Ma, L., et al., *Multicilin drives centriole biogenesis via E2f proteins*. Genes Dev, 2014. 28(13): p. 1461-71.
120. Stubbs, J.L., et al., *Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation*. Nat Cell Biol, 2012. 14(2): p. 140-7.
121. Marcet, B., et al., *Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway*. Nat Cell Biol, 2011. 13(6): p. 693-9.
122. Zhao, H., et al., *The Cep63 paralogue Deup1 enables massive de novo centriole biogenesis for vertebrate multiciliogenesis*. Nat Cell Biol, 2013. 15(12): p. 1434-44.
123. Terre, B., et al., *GEMC1 is a critical regulator of multiciliated cell differentiation*. Embo j, 2016. 35(9): p. 942-60.
124. Kopan, R. and M.X. Ilagan, *The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism*. Cell, 2009. 137(2): p. 216-33.
125. Hori, K., A. Sen, and S. Artavanis-Tsakonas, *Notch signaling at a glance*. J Cell Sci, 2013. 126(Pt 10): p. 2135-40.
126. Iso, T., L. Kedes, and Y. Hamamori, *HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway*. J Cell Physiol, 2003. 194(3): p. 237-55.
127. Ito, T., et al., *Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium*. Development, 2000. 127(18): p. 3913-21.
128. Zhang, S., et al., *Jagged1 is the major regulator of Notch-dependent cell fate in proximal airways*. Dev Dyn, 2013. 242(6): p. 678-86.

129. Tam, A., et al., *The airway epithelium: more than just a structural barrier*. *Ther Adv Respir Dis*, 2011. 5(4): p. 255-73.
130. Gomi, K., et al., *Activation of NOTCH1 or NOTCH3 signaling skews human airway basal cell differentiation toward a secretory pathway*. *PLoS One*, 2015. 10(2): p. e0116507.
131. Guseh, J.S., et al., *Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development*. *Development*, 2009. 136(10): p. 1751-9.
132. Wanner, A., *Clinical aspects of mucociliary transport*. *Am Rev Respir Dis*, 1977. 116(1): p. 73-125.
133. Ross, S.M. and S. Corrsin, *Results of an analytical model of mucociliary pumping*. *J Appl Physiol*, 1974. 37(3): p. 333-40.
134. van As, A., *The role of selective beta2-adrenoceptor stimulants in the control of ciliary activity*. *Respiration*, 1974. 31(2): p. 146-51.
135. Yanaura, S., N. Imamura, and M. Misawa, *Effects of beta-adrenoceptor stimulants on the canine tracheal ciliated cells*. *Jpn J Pharmacol*, 1981. 31(6): p. 951-6.
136. Tomlinson, S., S. Mac Neil, and B.L. Brown, *Calcium, cyclic AMP and hormone action*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1985. 23(5): p. 595-610.
137. Billington, C.K. and R.B. Penn, *Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle*. *Respir Res*, 2003. 4: p. 2.
138. Di Benedetto, G., F.S. Manara-Shediach, and A. Mehta, *Effect of cyclic AMP on ciliary activity of human respiratory epithelium*. *Eur Respir J*, 1991. 4(7): p. 789-95.
139. Billington, C.K. and I.P. Hall, *Novel cAMP signalling paradigms: therapeutic implications for airway disease*. *Br J Pharmacol*, 2012. 166(2): p. 401-10.
140. Kultgen, P.L., et al., *Characterization of an A-kinase anchoring protein in human ciliary axonemes*. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(12): p. 4156-66.
141. Barzi, M., et al., *Sonic-hedgehog-mediated proliferation requires the localization of PKA to the cilium base*. *J Cell Sci*, 2010. 123(Pt 1): p. 62-9.
142. Stommel, E.W. and R.E. Stephens, *Cyclic AMP and calcium in the differential control of *Mytilus* gill cilia*. *J Comp Physiol A*, 1985. 157(4): p. 451-9.
143. Hamasaki, T., et al., *In vitro phosphorylation of *Paramecium* axonemes and permeabilized cells*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1989. 12(1): p. 1-11.

144. Christensen, S.T., et al., *A regulatory light chain of ciliary outer arm dynein in Tetrahymena thermophila*. J Biol Chem, 2001. 276(23): p. 20048-54.
145. Tamaoki, J., M. Kondo, and T. Takizawa, *Effect of cAMP on ciliary function in rabbit tracheal epithelial cells*. J Appl Physiol (1985), 1989. 66(3): p. 1035-9.
146. Wyatt, T.A., et al., *Regulation of ciliary beat frequency by both PKA and PKG in bovine airway epithelial cells*. Am J Physiol, 1998. 275(4 Pt 1): p. L827-35.
147. Morse, D.M., J.L. Smullen, and C.W. Davis, *Differential effects of UTP, ATP, and adenosine on ciliary activity of human nasal epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. 280(6): p. C1485-97.
148. Li, Q. and K. Wang, *InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines*. Am J Hum Genet, 2017. 100(2): p. 267-280.
149. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. 74(12): p. 5463-7.
150. Vesna, S., *Molecular mechanisms of pathogenesis of myeloproliferative neoplasms: deregulation of genes involved in cell proliferation and apoptosis*. . PhD thesis, Faculty of Biology, Belgrade. Available at 10.2298/BG20121227SPASOVSKI., 2012.
151. Thornton, B. and C. Basu, *Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software*. Biochem Mol Biol Educ, 2011. 39(2): p. 145-54.
152. Baluchamy, S., et al., *Relationship between E1A binding to cellular proteins, c-myc activation and S-phase induction*. Oncogene, 2007. 26(5): p. 781-7.
153. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
154. Liu, Z.Q., T. Mahmood, and P.C. Yang, *Western blot: technique, theory and trouble shooting*. N Am J Med Sci, 2014. 6(3): p. 160.
155. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. J Natl Cancer Inst, 1973. 51(5): p. 1417-23.
156. http://www.nanopartikel.info/files/methodik/VIGO/cell_culture_A549.pdf.
157. http://www.corning.com/catalog/cls/documents/selection-guides/Selection_Guide_CLS-CC-027_Permeable_Supports.pdf.

158. Antony, D., et al., *Mutations in CCDC39 and CCDC40 are the major cause of primary ciliary dyskinesia with axonemal disorganization and absent inner dynein arms*. Hum Mutat, 2013. 34(3): p. 462-72.
159. Lucas, J.S., et al., *Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia*. Arch Dis Child, 2014. 99(9): p. 850-6.
160. Strippoli, M.P., et al., *Management of primary ciliary dyskinesia in European children: recommendations and clinical practice*. Eur Respir J, 2012. 39(6): p. 1482-91.
161. Leigh, M.W., et al., *Clinical and genetic aspects of primary ciliary dyskinesia/Kartagener syndrome*. Genet Med, 2009. 11(7): p. 473-87.
162. Knowles, M.R., M. Zariwala, and M. Leigh, *Primary Ciliary Dyskinesia*. Clin Chest Med, 2016. 37(3): p. 449-61.
163. Heuser, T., et al., *The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella*. J Cell Biol, 2009. 187(6): p. 921-33.
164. Djakow, J., et al., *An effective combination of sanger and next generation sequencing in diagnostics of primary ciliary dyskinesia*. Pediatr Pulmonol, 2016. 51(5): p. 498-509.
165. Olbrich H, H.K., Kispert A, Völkel A, Volz A, Sasmaz G, Reinhardt R, Hennig S, Lehrach H, Konietzko N, Zariwala M, Noone PG, Knowles M, Mitchison HM, Meeks M, Chung EM, Hildebrandt F, Sudbrak R, Omran H., *Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry*. Nature Genetics, 2002.
166. Oda, T., et al., *A molecular ruler determines the repeat length in eukaryotic cilia and flagella*. Science, 2014. 346(6211): p. 857-60.
167. Davis, S.D., et al., *Clinical features of childhood primary ciliary dyskinesia by genotype and ultrastructural phenotype*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. 191(3): p. 316-24.
168. Zhang, Z., et al., *A heterozygous mutation disrupting the SPAG16 gene results in biochemical instability of central apparatus components of the human sperm axoneme*. Biol Reprod, 2007. 77(5): p. 864-71.
169. Teves, M.E., et al., *Sperm-associated antigen-17 gene is essential for motile cilia function and neonatal survival*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013. 48(6): p. 765-72.
170. Zhang, Z., et al., *Dissecting the axoneme interactome: the mammalian orthologue of Chlamydomonas PF6 interacts with sperm-associated antigen 6, the mammalian orthologue of Chlamydomonas PF16*. Mol Cell Proteomics, 2005. 4(7): p. 914-23.
171. Hornef, N., et al., *DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 174(2): p. 120-6.

172. Zariwala, M.K., MR.; Leigh, MW. Primary Ciliary Dyskinesia. In: Pagon, RA.; Adam, MP.; Ardinger, HH.; Wallace, SE.; Amemiya, A.; Bean, LJH.; Bird, TD.; Fong, CT.; Mefford, HC.; Smith, RJH.; Stephens, K., editors. GeneReviews(R); Seattle (WA): 1993. (updated Sept 2015).
173. Hanukoglu, I. and A. Hanukoglu, *Epithelial sodium channel (ENaC) family: Phylogeny, structure-function, tissue distribution, and associated inherited diseases*. Gene, 2016. 579(2): p. 95-132.
174. Fajac, I., et al., *Could a defective epithelial sodium channel lead to bronchiectasis*. Respir Res, 2008. 9: p. 46.
175. Yamano, G., et al., *ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells*. FEBS Lett, 2001. 508(2): p. 221-5.
176. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ABCA3>.
177. Matsumura, Y., et al., *Characterization and classification of ATP-binding cassette transporter ABCA3 mutants in fatal surfactant deficiency*. J Biol Chem, 2006. 281(45): p. 34503-14.
178. Shulenin, S., et al., *ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency*. N Engl J Med, 2004. 350(13): p. 1296-303.
179. Garmany, T.H., et al., *Surfactant composition and function in patients with ABCA3 mutations*. Pediatr Res, 2006. 59(6): p. 801-5.
180. Stahlman, M.T., et al., *Expression of ABCA3 in developing lung and other tissues*. J Histochem Cytochem, 2007. 55(1): p. 71-83.
181. Wanner, A., *Tracheobronchial mucus: abnormalities related to asthma and its treatment*. J Asthma, 1981. 18(1): p. 27-9.
182. Robertson, B., *Basic morphology of the pulmonary defence system*. Eur J Respir Dis Suppl, 1980. 107: p. 21-40.
183. Ubell, M.L., P. Khampang, and J.E. Kerschner, *Mucin gene polymorphisms in otitis media patients*. Laryngoscope, 2010. 120(1): p. 132-8.
184. Kaliner, M., et al., *Human respiratory mucus*. Am Rev Respir Dis, 1986. 134(3): p. 612-21.
185. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC26A9&keywords=SLC26A9>.
186. Chang, M.H., et al., *Slc26a9--anion exchanger, channel and Na⁺ transporter*. J Membr Biol, 2009. 228(3): p. 125-40.

187. Dorwart, M.R., et al., *SLC26A9 is a Cl(-) channel regulated by the WNK kinases*. J Physiol, 2007. 584(Pt 1): p. 333-45.
188. Li, X.C., H.; Li, W.; Chiang, T.; Lin, F.; Boelle, P-Y.; Drumm, M.; Cutting, G.; Knowles, M.; and P. Durie, et al., *Replication evidence that constituents of the apical plasma membrane contribute to Meconium ileus in Cystic Fibrosis*. 25th N Am CF Conference;, 2011.
189. Chen, A.P., M.H. Chang, and M.F. Romero, *Functional analysis of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human SLC26A9*. Hum Mutat, 2012. 33(8): p. 1275-84.
190. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UI46>.
191. Poole, E.S., et al., *Accommodating the bacterial decoding release factor as an alien protein among the RNAs at the active site of the ribosome*. Cell Res, 2007. 17(7): p. 591-607.
192. Gingold, H. and Y. Pilpel, *Determinants of translation efficiency and accuracy*. Mol Syst Biol, 2011. 7: p. 481.
193. Weiss, R.B., et al., *Ribosomal frameshifting from -2 to +50 nucleotides*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1990. 39: p. 159-83.
194. Beier, H. and M. Grimm, *Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(23): p. 4767-82.
195. Low, S.C. and M.J. Berry, *Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes*. Trends Biochem Sci, 1996. 21(6): p. 203-8.
196. Copeland, P.R., V.A. Stepanik, and D.M. Driscoll, *Insight into mammalian selenocysteine insertion: domain structure and ribosome binding properties of Sec insertion sequence binding protein 2*. Mol Cell Biol, 2001. 21(5): p. 1491-8.
197. Rock, J.R., et al., *Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(31): p. 12771-5.
198. Ott, C. and J. Lippincott-Schwartz, *Visualization of live primary cilia dynamics using fluorescence microscopy*. Curr Protoc Cell Biol, 2012. Chapter 4: p. Unit 4.26.
199. Wakabayashi, Y., et al., *Four-dimensional imaging of filter-grown polarized epithelial cells*. Histochem Cell Biol, 2007. 127(5): p. 463-72.
200. Ait-Lounis, A., et al., *Novel function of the ciliogenic transcription factor RFX3 in development of the endocrine pancreas*. Diabetes, 2007. 56(4): p. 950-9.
201. Bonnafe, E., et al., *The transcription factor RFX3 directs nodal cilium development and left-right asymmetry specification*. Mol Cell Biol, 2004. 24(10): p. 4417-27.

202. Spassky, N., et al., *Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis*. J Neurosci, 2005. 25(1): p. 10-8.
203. Caillat, C., et al., *The Geminin and Idas coiled coils preferentially form a heterodimer that inhibits Geminin function in DNA replication licensing*. J Biol Chem, 2013. 288(44): p. 31624-34.
204. Sorokin, S.P., *Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs*. J Cell Sci, 1968. 3(2): p. 207-30.
205. Thomas, J., et al., *Transcriptional control of genes involved in ciliogenesis: a first step in making cilia*. Biol Cell, 2010. 102(9): p. 499-513.
206. Gomperts, B.N., X. Gong-Cooper, and B.P. Hackett, *Foxj1 regulates basal body anchoring to the cytoskeleton of ciliated pulmonary epithelial cells*. J Cell Sci, 2004. 117(Pt 8): p. 1329-37.
207. You, Y., et al., *Role of f-box factor foxj1 in differentiation of ciliated airway epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. 286(4): p. L650-7.
208. Horani, A., et al., *CCDC65 mutation causes primary ciliary dyskinesia with normal ultrastructure and hyperkinetic cilia*. PLoS One, 2013. 8(8): p. e72299.
209. Choksi, S.P., et al., *Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis*. Development, 2014. 141(7): p. 1427-41.
210. Deblandre, G.A., et al., *A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of Xenopus embryos*. Development, 1999. 126(21): p. 4715-28.
211. Lafkas, D., et al., *Therapeutic antibodies reveal Notch control of transdifferentiation in the adult lung*. Nature, 2015. 528(7580): p. 127-31.
212. Song, R., et al., *miR-34/449 miRNAs are required for motile ciliogenesis by repressing cp110*. Nature, 2014. 510(7503): p. 115-20.
213. Caillat, C., et al., *The structure of the GemC1 coiled coil and its interaction with the Geminin family of coiled-coil proteins*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2015. 71(Pt 11): p. 2278-86.
214. Sutherland, E.W. and T.W. Rall, *Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles*. J Biol Chem, 1958. 232(2): p. 1077-91.
215. Lohse, M.J., et al., *Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2008. 29(3): p. 159-65.

216. Hill, S.J., C. Williams, and L.T. May, *Insights into GPCR pharmacology from the measurement of changes in intracellular cyclic AMP; advantages and pitfalls of differing methodologies*. Br J Pharmacol, 2010. 161(6): p. 1266-75.
217. Salathe, M., *Effects of beta-agonists on airway epithelial cells*. J Allergy Clin Immunol, 2002. 110(6 Suppl): p. S275-81.
218. Giembycz, M.A. and R. Newton, *Beyond the dogma: novel beta2-adrenoceptor signalling in the airways*. Eur Respir J, 2006. 27(6): p. 1286-306.
219. Murray, A.J., *Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems*. Sci Signal, 2008. 1(22): p. re4.
220. Goto, A., et al., *Phosphorylation of STEF/Tiam2 by protein kinase A is critical for Rac1 activation and neurite outgrowth in dibutyryl cAMP-treated PC12D cells*. Mol Biol Cell, 2011. 22(10): p. 1780-90.
221. Jang, M.J., et al., *Phosphorylation of phospholipase D1 and the modulation of its interaction with RhoA by cAMP-dependent protein kinase*. Exp Mol Med, 2004. 36(2): p. 172-8.
222. Seternes, O.M., et al., *Activation of protein kinase A by dibutyryl cAMP treatment of NIH 3T3 cells inhibits proliferation but fails to induce Ser-133 phosphorylation and transcriptional activation of CREB*. Cell Signal, 1999. 11(3): p. 211-9.

BIOGRAFIJA:

Marina Anđelković je rođena 26.03.1990. godine u Pančevu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, upisala je školske 2009/2010. godine i diplomirala u oktobru 2013. godine kada je upisala master studije, studijski program Molekularna biologija i fiziologija, modul Humana molekularna biologija. Master studije je završila juna 2014. godine odbranivši master rad pod nazivom: “Uticaj varijanti gena *NRAMP1* i *VDR* na izmenjenu funkciju makrofaga kod pacijenata sa tuberkulozom”. Doktorske studije upisala je školske 2014/2015. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota. U periodu od decembra 2014. do juna 2015. godine zaposlena je u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, kao učesnik međunarodnog projekta: “Strengthening the Research Potential of IMGGE through Reinforcement of Biomedical Science of Rare Diseases in Serbia – en route for innovation” (EU-FP7-REGPOT-316088, 2013-2016. godine). Od juna 2015. godine učesnik je na nacionalnom projektu “Retke bolesti: molekularna patofiziologija, dijagnostički i terapijski modaliteti i socijalni, etički i pravni aspekti“ (Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, ev. br. III41004, 2011-2018. godine). Marina Anđelković je do sada objavila 10 radova u časopisima međunarodnog značaja i imala 14 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima i 3 saopštenja na skupu nacionalnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Марина Анђелковић _____

Број индекса _____ M3002/2014 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Геномски профил пацијената дечијег узраста са примарном цилијарном

дискинезијом: корелација генотипа и фенотипа и функционална карактеризација

нових генетичких варијанти

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____ 23.01.2019. _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Геномски профил пацијената дечијег узраста са примарном цилијарном дискинезијом:
корелација генотипа и фенотипа и функционална карактеризација нових генетичких
варијанти

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 23.01.2019.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.