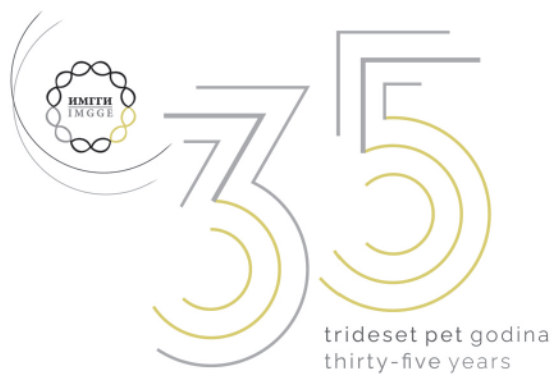


Broj 1 • septembar 2021. N° 1 • September 2021.



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



Beograd • Belgrade • 2021.
IMGGI • IMGGE

Sadržaj • Content

Personalizovana medicina i COVID-19: značaj genomskog profilisanja pacijenata i bioinformatike Branka Zukić, Biljana Stanković, Nikola Kotur	6	Personalized medicine and COVID-19: the importance of genomic host profiling and bioinformatics
Izotermalna amplifikacija posredovana petljom (LAMP) kao metoda za terensku detekciju SARS-CoV-2 virusa Mila Djisalov, Teodora Knežić, Ljiljana Janjušević, Željko D. Popović, Petar Kosijer, Ivana Gadjanski	21	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a point-of-care SARS-CoV-2 detection method
CRISPR-Cas9 tehnologija: od osnovnih istraživanja do kliničke prakse Marko Panić	33	CRISPR-Cas9 technology: from basic research to clinical application
Primena CRISPR/Cas9 tehnologije u otkrivanju novih molekularnih terapeutika Anita Skakić, Maja Stojilković	42	Application of CRISPR/Cas9 technology in the discovery of new molecular therapeutics
Nova paradigma u dijagnostici retkih bolesti Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dušan Keckarević	54	Diagnostics of rare diseases: New paradigm
Genetička i epigenetička karakterizacija varijantnih <i>DMPK</i> ekspanzija kao modifikatora fenotipa miotonične distrofije tipa 1 Jovan Pešović, Stojan Perić, Lana Radenković, Vidosava Rakočević-Stojanović, Dušanka Savić-Pavićević	60	Genetic and epigenetic characterization of variant <i>DMPK</i> expansions as a modifier of phenotype in myotonic dystrophy type 1
Molekularna osnova primarne cilijarne diskinezije Marina Anđelković	71	Molecular basis of primary ciliary dyskinesia
Molekularna osnova monogenetskog dijabetesa Jovana Komazec, Milena Ugrin	84	The Molecular Basis of Monogenic Diabetes
Diferencijalna dijagnoza eozinofilnog infiltrata u sluznici jednjaka primenom molekularno-bioloških metoda Nina Ristić, Tijana Išić Denčić, Radmila Janković	96	Differential diagnosis of eosinophilic infiltrate in esophageal mucosa by applying molecular biology methods
Molekularni markeri u sistemskoj sklerozi: geni kandidati i terapijski modaliteti Vesna Spasovski, Miša Vreća	107	Molecular markers in systemic sclerosis: candidate genes and therapeutic modalities
Duga nekodirajuća RNK GAS5 kao novi biomarker u onkologiji Vladimir Gašić, Nataša Tošić	113	Long noncoding RNA GAS5 as a new biomarker in oncology
Prediktivna i prognostička uloga gena p16INK4a, p14ARF i KRAS u karcinomu rektuma čoveka Bojana Kožik, Milena Krajnović, Nikola Kokanov	123	Predictive and prognostic role of p16INK4a, p14ARF and KRAS genes in human rectal carcinoma
Savremena molekularno-biološka ispitivanja prognostičkih faktora papilarnog tiroidnog karcinoma i mogućnost njihove primene u kliničkoj praksi Ilona Đorić, Jelena Janković Miljuš, Sonja Šelemetjev	133	Contemporary molecular-biological investigations of papillary thyroid carcinoma prognostic factors and their potential for application in clinical practice
Nekodirajuće RNK kao perspektiva u dijagnostici i lečenju kardiovaskularnih bolesti Ljiljana Rakićević	146	Non-coding RNAs as a prospect in diagnostics and treatment of cardiovascular diseases
Biološko delovanje polifenola nara na komponente metaboličkog sindroma: implikacije na oksidativni stres Milica Kojadinović i Aleksandra Arsić	152	Biological effect of pomegranate polyphenols on the components of metabolic syndrome: implications on oxidative stress
Biogeni utišavači virulencije vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Milka Malešević, Branko Jovčić	166	Biogenic silencers of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> virulence
Silicijum kao antistres element za biljke izložene toksičnim koncentracijama bakra Dragana Bosnić, Dragana Nikolić, Jelena Samardžić	180	Silicon as an anti-stress element for plants exposed to toxic copper

PREDGOVOR

Molekularna biologija doživljava svoj procvat u XXI veku. Od naučne discipline koja je početkom 1930-ih bila u povojima, i koja je nastojala da objedini genetiku, biohemiju i biofiziku kako bi rasvetlila tajne života, izrasla je u nauku čija su postignuća doprinela velikom napretku u medicini, veterini, poljoprivredi i farmaciji. Uz informaciono komunikacione tehnologije, molekularna biologija je najperspektivnija oblast istraživanja, od koje se očekuje da značajno doprinese boljitku života ljudi u budućnosti.

U Srbiji je molekularna biologija prepoznata relativno rano, pre nego na mnogim drugim meridijanima. Već u školskoj 1972/73. se na Biološkom fakultetu u Beogradu (tada Prirodno-matematički fakultet) osniva smer- molekularna biologija i fiziologija. U našoj zemlji se tako edukuju generacije molekularnih biologa već pola veka. I veliki naučni instituti u Srbiji osnivaju laboratorije u kojima istraživanja prate, a ponekad i predvode, svetske trendove u molekularnoj biologiji. Jedna od tih naučnih institucija je Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), osnovan 1986. godine u Beogradu. Već 35 godina naučnici iz IMGGI stavljaju najmodernije teme iz molekularne biologije u fokus svojih istraživanja.

Ovaj Tematski zbornik ima za cilj da prikaže aktuelne teme i postignuća iz oblasti molekularne biologije u prethodnoj, 2020. godini i da svedoči o tome kako su naučnici u Srbiji učestvovali u tim svetskim trendovima. Poglavlja su rezultat doktorskih teza mladih molekularnih biologa ali i prikaz aktuelnih istraživanja u kojima je istaknut doprinos naših naučnika. Od godine 2020. se očekivao veliki napredak u mnogim disciplinama zahvaljujući novim saznanjima iz molekularne biologije. Početak godine je doneo pandemiju KOVID-19 bolesti, koja je imala sve karakteristike epidemija iz ranijih vekova. Bili smo na pragu velikog razočaranja. A onda je molekularna biologija upotrebila sve svoje kapacitete, tako što je omogućila karakterizaciju virusa, uzročnika bolesti, za izuzetno kratko vreme. Iz tog razloga metode za detekciju virusa su bile razvijene u rekordnom roku, te je brza i efikasna dijagnostika postala dostupna lekarima. A potom su se pojavile vakcine, rezultat modernih metoda genetičkog inženjerstva. I tako je 2020. godina ipak bila jedinstvena u istoriji, jer je odgovor na epidemiju bio brz i efikasan, zahvaljujući, u velikoj meri, molekularnoj biologiji. Iste godine, Nobelova nagrada za hemiju je dodeljena metodi koja efikasno i tačno edituje humani genom. Vrata medicine budućnosti su se širom otvorila.

Ova sveska bi trebalo da bude prva u nizu godišnjih tematskih zbornika posvećenih aktuelnim temama iz molekularne biologije. Svesni smo kako će ovi rezultati izgledati za deceniju ili dve. Ali, ovo su „znakovi pored puta“ koje je naše vreme ostavilo, osvetljavajući put kojim se ide napred. Mi smo zadivljeni napretkom naše nauke, kad pogledamo u prošlost, ali smo i svesni koji su njeni dometi u odnosu na ono čemu nauka stremi. Radujemo se budućim sveskama i verujemo da će one otvarati nove perspektive i trasirati put napretka.

Nadamo se da će ovaj Tematski zbornik naći put do mladih ljudi, da će ih inspirisati da se opredele za naučni rad, posebno za molekularnu biologiju. Verujemo da će buduće generacije uvideti da naučni rad i u ovoj zemlji može dati doprinos svetskoj nauci a pri tome i dovesti do poboljšanja života ljudi u našoj zemlji. Od svih koji su učestvovali u stvaranju ovog svedočenja o našem vremenu, poruka za vas koji dolazite je:

„Hoćemo li na molekularnu?!“

Sonja Pavlović

IZ RECENZIJ TEMATSKOG ZBORNIKA

Trendovi u molekularnoj biologiji

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* oslikava trenutno stanje i fokus istraživanja u molekularnoj biologiji u Srbiji. Izabrane tematske oblasti i reprezentativni radovi jasno govore o mogućnostima i dometima ove naučne oblasti i spremnosti istraživača u Srbiji da prate trendove i savremene naučne pristupe.

Osim trenutno aktuelnog COVID-19, molekularna biologija je unapredila i obogatila istraživanja u medicini kroz oblast biomedicine. Težište ovog Tematskog zbornika je na rezultatima istraživanja molekularne osnove kompleksnih i retkih bolesti. Proučavanje prokariota dovelo je do mnogih fundamentalnih i revolucionarnih otkrića u molekularnoj biologiji, koja su otvorila put ka biotehnološkoj primeni. Jedno od takvih otkrića je i CRISPR/Cas9 tehnologija za editovanje genoma. Veoma važna oblast istraživanja je i potraga za inovativnim načinima kontrole infekcija izazvanih bakterijama koje su rezistentne na konvencionalne antibiotike. O ovim temama se takođe govori u Tematskom zborniku. Istraživanja u molekularnoj biologiji biljaka ne samo da su proširila znanja o ovim organizmima, već su otvorila put ka primeni savremenih metoda za poboljšanje osobina biljaka i povećanje prinosa. U tom smislu je veoma zanimljiv i ilustrativan rad koji je prikazan u ovom Zborniku.

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* jasno je ukazao na naučni i širi društveni značaj istraživanja u molekularnoj biologiji. Ovim prvim brojem nagoveštava se da će Zbornik ne samo pratiti i dokumentovati najznačajnija dostignuća u molekularnoj biologiji, već da će biti podstrek i inspiracija istraživačima u Srbiji.

Prof. Svetlana Radović, redovni profesor Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji“ je sačinjen od 17 poglavlja u kojima su predstavljeni naučni rezultati iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije. Veliki broj poglavlja iz Zbornika je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. Doprinos koji je molekularna biologija dala modernoj medicini je izuzetno veliki. Danas su u kliničkoj praksi mnogobrojni dijagnostički, prognostički i terapijskih molekularni markeri. Posebno je značajno što je medicina u Srbiji pratila svetske trendove, i to zahvaljujući i velikim naporima molekularnih biologa u našoj zemlji.

Najbolji primer postignuća molekularne biomedicine je odgovor ove nauke na pandemiju KOVID-19. Dijagnostika je omogućena uzuzetno brzo jer je molekularna biologija bila spremna za ovaj zadatak. Ipak je razvoj vakcina u fascinantnom roku najveće postignuće ove nauke. Molekularna biologija je pokazala svoju snagu u pravom trenutku i postala najznačajnija nauka u kriznim momentima za čovečanstvo, kako u svetu, tako i u našoj zemlji.

Sigurno je da će ovako koncipiran Tematski zbornik imati budućnost, jer je napredak medicine nemoguće zamisliti bez novih dostignuća molekularne biologije.

Prof. dr Vesna Škodrić-Trifunović, redovni profesor Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Ovaj Tematski zbornik kroz četiri celine daje pregled najznačajnijih ostvarenja u molekularnoj biologiji u svetu, a kojima se bave i istraživači u Srbiji. U okviru 17 preglednih radova prikazani su različiti rezultati - od onih koji su obeležili prethodnu godinu (posvećeni COVID-19 i CRISPR/Cas9 tehnologiji), preko novih dostignuća u biomedicini (retkih i kompleksnih bolesti), do molekularno bioloških istraživanja prokariota i biljaka.

Značaj ovog Zbornika je višestruk, ogleda se ne samo u činjenici da su najrelevantnija saznanja iz navedenih oblasti objedinjena i postala dostupna široj javnosti na maternjem jeziku, već i zbog toga što su radove napisali istraživači iz različitih naučnih instituta (6), fakulteta (3) i klinika (2) iz Srbije, u kojima se ta istraživanja aktivno sprovode. Naime, saznanja o SARS-CoV-2 koronavirusu, uzročniku nove bolesti COVID-19, se kontinuirano uvećavaju i veoma je važno što i naučnici iz naše zemlje daju doprinos u razumevanju ove pandemije. Isto se odnosi i na najnovije tehnologije za manipulaciju molekula DNK, koje su dovele do revolucionarnih pomaka u biomedicinskim naukama. Stoga, prikazana istraživanja molekularne osnove različitih bolesti najsavremenijim metodološkim pristupima, primena dobijenih rezultata u dijagnozi, preciznom predviđanju progresije bolesti i lečenju, kao i razvoju novih molekularnih terapeutika, daju realnu osnovu očekivanjima da će personalizovana medicina uskoro postati široko dostupna.

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

Nova paradigma u dijagnostici retkih bolesti

Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dušan Keckarević
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet, Katedra za biohemiju i molekularnu biologiju, Centar za forenzičku i primenjenu molekularnu genetiku, Beograd, Srbija
Kontakt: milica@bio.bg.ac.rs

Apstrakt

Po definiciji, retke bolesti obuhvataju oboljenja čija je učestalost manja od 1 u 2000 u Evropi. Do sada je identifikovano skoro 7000 retkih bolesti uzrokovanih mutacijama u preko 4000 gena, a na svakih 50 osoba u Evropi jedna ima retku bolest za koju je pokazano ili se smatra da je genetički uzrokovana.

Objavljivanje preliminarne sekvence humanog genoma 2001. godine, kao i automatizacija reakcija PCR-a i sekvenciranja, omogućilo je otkrivanje velikog broja gena uzročnika retkih bolesti, kao i uspostavljanje i široku primenu molekularno - genetičke dijagnostike. Na ovaj način je omogućena dijagnostika bolesti koje su se odlikovale relativno čestim pojavljivanjem, a koje nisu imale posebno izraženu alelsku ili lokusnu heterogenost.

Razvoj metoda masivnog paralelnog sekvenciranja omogućio je širu dijagnostiku poznatih bolesti, ali se otvorila i mogućnost da se potraži uzrok za svaku retku bolest, međutim, nakon više od 10 godina masovne primene, preko 70% bolesti verovatno uzrokovanih naslednim faktorima i dalje ima nepoznatu etiologiju.

Ključne reči: retke bolesti, dijagnostika, humani genom, sekvenciranje

Diagnostics of rare diseases: New paradigm

Milica Keckarevic Markovic, Miljana Kecmanovic, Dusan Keckarevic
University of Belgrade – Faculty of Biology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center for Forensic and Applied Molecular Genetics, Belgrade, Serbia
Correspondence: milica@bio.bg.ac.rs

Abstract

Rare diseases comprise diseases with a frequency less than 1 in 2000 in Europe. So far, almost 7,000 rare diseases caused by mutations in over 4,000 genes have been identified, and for every 50 people in Europe, one has a probably genetically caused rare disease.

The draft sequence of the human genome published in year 2001, as well as the automation of PCR and sequencing techniques enabled the identification of a large number of genes that cause rare diseases, as well as the establishment and wide application of molecular-genetic diagnostics. Thus, it was possible to establish the genetic background of relatively frequent and diseases without significant allelic or locus heterogeneity.

The development of massive parallel sequencing methods has enabled a broader diagnosis of known diseases, but also enabled scientific community to look for the cause of each rare disease. However, after more than 10 years, over 70% of probably genetically caused diseases still have an unknown etiology.

Key words: rare diseases, diagnostics, human genome, sequencing

Veličina humanog genoma iznosi oko 3,2 milijarde baznih parova (bp). Razvoj metoda masivnog paralelnog sekvenciranja (MPS, eng. *Massive Parallel Sequencing*) omogućio je sekvenciranje velikog broja humanih genoma, a poređenjem genoma različitih individua i analizom sličnosti i razlika između njih utvrđene su razmere prisutne varijabilnosti. Danas se tako zna da u genomu svake osobe postoji, u proseku, preko 3,2 miliona nukleotidnih varijanti (SNV, eng. *Single Nucleotide Variant*) i preko 700 000 inserciono-delecionijskih polimorfizama (INDEL, eng. *Insertion Deletion Polymorphism*) od kojih je oko 5000 SNV i 300 INDEL prisutno u pojedinačnim genomima (privatne varijante) (1), a oko 75 SNV i 3 INDEL nastaju *de novo* (2). Humani genomi se međusobno razlikuju i po strukturnim varijantama koje zahvataju regione preko 1000 bp (translokacije, inverzije, velike delecije, varijacije u broju kopija - CNV, eng. *Copy Number Variation*) (2), kao i po varijaciji u broju uzastopnih kraćih ponovljenih sekvenci (mikro- i minisateliti). Svaka osoba u proseku nosi preko 200 velikih delecija, među kojima i jednu privatnu (1). Takođe, svaka osoba, u proseku, nosi po nekoliko stotina varijanti u protein kodirajućim genima za koje se predviđa ili se zna da su štetne, a od toga oko 85 mutacija za koje se očekuje da dovode do gubitka funkcije (LoF, eng. *Loss of Function*) (1, 2).

Analizom velikog broja humanih genoma moguće je utvrditi učestalosti različitih varijanti sekvence DNK (alela) u odgovarajućoj populaciji, pri čemu je učestalost manje ili najmanje zastupljenog alela (MAF, eng. *Minor Allele Frequency*) od interesa za dalje analize. Varijante čija je učestalost manja od 1% smatraju se retkim (eng. *Rare*), između 1 i 5% kao varijante niske učestalosti (eng. *Low-frequency*), dok se varijante zastupljene sa preko 5% smatraju uobičajenim (eng. *Common*). Učestale varijante su prisutne u populacijama različitog porekla, dok su retke i varijante sa niskom učestalošću često populaciono - specifične. Najveća varijabilnost u sekvenci DNK je prisutna u populacijama afričkog porekla, a razlike u varijabilnosti i prisustvu pojedinih varijanti u različitim populacijama su oblikovane evolucionim mehanizmima, pre svega genetičkim driftom, ali i prirodnom selekcijom. Za retke i varijante niske učestalosti, koje su potencijalni uzročnici retkih genetičkih bolesti (RGD, eng. *Rare Genetic Diseases*), imajući u vidu njihovu populacionu specifičnost, posebno je značajna zastupljenost populacija različitog porekla u analizama humanih genoma.

Retke bolesti su definisane kao oboljenja od kojih boluje manje od 200 000 ljudi u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) (3), odnosno čija je učestalost u Evropi manja od 1 u 2000 (4). Među retkim bolestima najzastupljenije su bolesti koje imaju genetičku osnovu, a među njima bolesti uzrokovane mutacijama u pojedinačnim genima, odnosno monogenske bolesti koje se zbog jasnih obrazaca nasleđivanja, nazivaju i Mendelovskim (eng. *Mendelian disorders*). Do danas je otkriveno oko 7000 retkih bolesti, koje su uzrokovane mutacijama u preko 4000 gena (5, 6), a njihova kumulativna zastupljenost u Evropi iznosi 1 u 50 osoba (7). Zbog dugogodišnjeg nedostatka interesovanja za izuzetno retke bolesti, često prisutne u pojedinačnim pedigreima, nazivaju se i bolestima "siročićima" (eng. *Orphan diseases*).

Monogenske bolesti su uglavnom uzrokovane mutacijama u protein - kodirajućim (strukturnim) genima, a nasleđuju se na jedan od sledećih načina: autozomno - dominantno, autozomno - recesivno, X- ili Y-vezano, u zavisnosti od pozicije pogođenog gena u genomu, od uticaja uzročne mutacije na strukturu i sintezu, kao i funkciju kodiranog proteina. Recesivno nasleđivanje je povezano sa gubitkom funkcije proteina, koja može biti uzrokovana mutacijama koje dovode do promena u okviru čitanja (eng. *Frameshift*), mutacijama u mestima za splajsovanje (eng. *Splice Site*), kao i mutacijama koje dovode do pojava stop kodona (eng. *Nonsense*). Autozomno - recesivne bolesti se ispoljavaju u slučaju homozigotnog prisustva mutacije ili ređe, u slučaju prisustva kombinovanih heterozigota, gde su različite mutacije prisutne u različitim kopijama gena, a za posledicu imaju gubitak funkcije proteina kodiranih sa obe kopije gena prisutne u genomu. Autozomno - dominantno nasleđivanje bolesti podrazumeva da mutacija na jednoj kopiji gena dovodi do ispoljavanja bolesti, pri čemu se uglavnom radi o mutacijama koje dovode do promene smisla (eng. *Missense*). Dominantan efekat mutacije može biti uzrokovan dobijanjem nove, toksične funkcije izmenjenog proteina (eng. *Gain of Function*), kao i dominantno negativnim efektom, kada izmenjeni onemogućava funkcionisanje neizmenjenog (*wt*, eng. *Wild Type*) proteina. U nekim slučajevima smanjena količina proteina, kao posledica heterozigotnog prisustva mutacije koja dovodi do gubitka funkcije, može da dovede do ispoljavanja bolesti i tada je reč o haploinsuficijenciji.

Iako su većinom monogenske, u retke genetički uzrokovane bolesti se mogu svrstati i numeričke i strukturne hromozomske aberacije, bolesti izazvane varijacijama u broju kopija (CNV, mikroduplikacije, mikrodelecije), poremećaji u utiskivanju gena (ID, eng. *Imprinting disorders*), bolesti uzrokovane mutacijama u mitohondrijskom genomu (mitohondrijske bolesti), bolesti sa multigenomskom osnovom, kao i bolesti uzrokovane dinamičkim mutacijama, a čije nasleđivanje se ne može jasno predvideti. Takođe, nasleđivanje monogenskih bolesti sa smanjenom penetrabilnošću i različitom ekspresivnošću se ne može predvideti iz Mendelovih pravila, a obrazac nasleđivanja bolesti koje smanjuju reproduktivni fitness najčešće nije moguće utvrditi, već se mutacije uglavnom javljaju *de novo*.

Razvoj metoda koje omogućavaju analize velikih delova ili čitavih genoma, bazirane na masivnom paralelnom sekvenciranju, i njihova široka dostupnost od 2009. godine, nametnula je novu paradigmu u analizi retkih bolesti, dijagnoza za svakog pacijenta, koja ima za cilj da se pronađe uzrok za svaku retku bolest (8). U prethodnih nekoliko decenija, od otkrića prvog asociiranog lokusa i prvog gena uzročnika, pa do perioda masivnog paralelnog sekvenciranja, otkriće gena odgovornih za retke bolesti bilo je sporo, vremenski i finansijski zahtevno, i uglavnom ograničeno na visoko pe-

netrabilne i široko zastupljene bolesti (autozomno recesivne, autozomno dominantne bolesti koje ne smanjuju re-produktivni fitness ili bolesti uzrokovane rekurentnim mutacijama). Do sekvenciranja humanog genoma i objavljivanja preliminarne sekvence 2001. godine, pristupi u identifikaciji novih gena podrazumevali su kombinaciju analiza veza-nosti (eng. *Linkage Analysis*), pozicionog kloniranja i sekvenciranje gena kandidata identifikovanih u regionu asoci-raznom sa bolešću, a odabranih za sekvenciranje prvenstveno na osnovu pretpostavljene ili poznate funkcije, te mogućeg učestvovanja u patogenezi bolesti (8). Huntingtonova bolest je prva povezana sa genetičkim lokusom na 4. hromo-zomu, a vezanost je utvrđena 1983. godine (9). Uzročni gen, gen za protein huntingtin, identifikovan je 10 godina kas-nije, a u otkriću je učestvovalo 58 istraživača iz šest istraživačkih grupa, i analizirane su osobe iz 75 velikih pedigrea iz Venecuele (10). Do 1995. godine otkrivena su 42 gena (11), dok je do 2001. godine otkriveno oko 1300 gena uzročnika retkih bolesti (12).

Otkriće i automatizacija metode lančane reakcije polimeraze (PCR, eng. *Polymerase Chain Reaction*) i automati-zacija metode sekvenciranja omogućilo je sekvenciranje humanog genoma (1990-2004.). Poznavanje sekvence huma-nog genoma olakšalo je i ubrzalo otkrivanje novih gena uzročnika retkih bolesti, a dostupnost, jednostavnost i brzina metode PCR omogućila je široku rasprostranjenost dijagnostike retkih bolesti za koje je bio poznat uzročni gen ili geni, odnosno uzročna mutacija. Korišćenim metodama baziranim na PCR-u praćenom restrikcionom digestijom i/ili elek-troforezom ili sekvenciranjem PCR produkata bilo je moguće pretraživati region na prisustvo bilo kakve promene u ana-liziranoj sekvenci (SSCP, eng. *Single Strand Conformation Polymorphism*, sekvenciranje), ili detekcija tačno odgovarajuće, ciljane, mutacije (RFLP, eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*, AFLP, eng. *Amplified Fragment Length Polymor-phism*, AS-PCR, eng. *Allele Specific PCR*). Bolesti koje su bile podobne za dijagnostiku su se odlikovale relativno visokom zastupljenošću, ali i ne previše izraženom alelskom i lokusnom heterogenošću. Na osnovu prisustva i učestalosti po-jedinih mutacija, kao i nivoa uključenosti različitih gena u slučaju lokusne heterogenosti formirani su populaciono – specifični algoritmi za dijagnostiku pojedinih bolesti ili grupa bolesti (13,14). Na ovaj način bilo je omogućeno postavljanje dijagnoze retkih bolesti na genetičkom nivou, ali je značajan broj pacijenata čija se bolest nije mogla objasniti nekom od učestalijih mutacija ili mutacijama u genima koji su često pogođeni ostajao bez konačne dijagnoze, te genetičkog saveta, čak i u slučajevima kada je klinička dijagnoza bila jasna. Ovo je posebno dolazilo do izražaja u gen-ima uzročnicima sa velikim brojem egzona (gen za distrofin, uzročnik Dišenove/Bekerove mišićne distrofije, *CFTR* gen, uzročnik cistične fibroze), kao i kod bolesti sa izraženom lokusnom heterogenošću (hereditarne motorne i senzorne neuropatije, HMSN). Takođe, bez mogućnosti dijagnostike bile su izuzetno retke bolesti uzrokovane privatnim mu-tacijama.

Masivno paralelno sekvenciranje omogućilo je veliki pomak u dijagnostici retkih bolesti. Od 2009. godine identi-fikuje se u proseku 250 novih asocijacija bolesti i gena uzročnika (15). U periodu od 2012. do 2015. godine oko 60% novih asocijacija činila je identifikacija novih gena, a preostalih 40% identifikacija novih fenotipova uzrokovanih mu-tacijama u genima već od ranije povezanim sa bolestima (8). Poslednjih godina, sa otkrićem sve više gena, taj odnos se neminovno pomera u korist otkrivanja povezanosti novih bolesti ili novih manifestacija poznatih bolesti i od ranije poznatih gena uzročnika RGD. Analize velike propusne moći generišu i veliku količinu podataka, te je razvoj metoda masivnog paralelnog sekvenciranja praćen razvojem hardvera za čuvanje i analizu podataka, informacionih tehnolo-gija, formiranjem baza za skladištenje podataka, razvojem bioinformatičkih programa, kao i edukacijom kadrova za ana-lizu velikih količina podataka (eng. *Big Data Analysis*). Formiraju se međunarodni konzorcijumi za istraživanje RGD (iRDiRC, eng. *International Rare Disease Research Consortium*) sa ciljem da svaka obolela osoba u razumnom vremen-skom periodu dobije dijagnozu, i, ukoliko je moguće, terapiju, a koji podrazumevaju saradnju između lekara kliničara i istraživača iz velikog broja zemalja, ujednačavanje dijagnostičkih kriterijuma, kao i široku dostupnost dobijenih re-zultata kroz objavljivanje naučnih radova i ažuriranje internet baza podataka (5).

Prelazak sa standardne dijagnostike RGD na metode MPS doveo je do promene u načinu postavljanja hipoteze o potencijalnom genu uzročniku na osnovu prethodnih ispitivanja, kliničke slike pacijenta i porodične anamneze. Tako je, za razliku od standardne dijagnostike, svaka obolela osoba za koju postoji dovoljno podataka u prilog tome da bo-luje od genetički uzrokovane retke bolesti dobar kandidat za analize, bez obzira da li se radi o od ranije poznatoj ili bo-lesti koja se po prvi put sreće, i bez obzira da li postoji prethodna pretpotavka o potencijalnom genu uzročniku. Argumenti koji govore u prilog pretpostavci da se radi o genetički uzrokovanoj bolesti su ostali isti: postojanje poro-dičnog stabla sa većim brojem obolelih, visoka penetrabilnost bolesti sa jasnim obrascem nasleđivanja, kao i preklapanje simptoma kod nesrodnih pacijenata. Za osobe obolele od teških bolesti sa ranim početkom, obično prisutne u pojedinačnim porodicama, tek je uvođenje masivnog paralelnog sekvenciranja omogućilo određivanje genetičke os-nove, a samim tim i značajno povećanje senzitivnosti analiza.

U dijagnostici retkih bolesti masivnim paralelnim sekvenciranjem postoje različiti pristupi koji podrazumevaju sekvenciranje manjeg ili većeg dela, a potencijalno i celog genoma. Odabir pristupa zavisi, pre svega, od simptoma bo-lesti, od činjenice da li su oni već od ranije poznati i asociрани sa genima uzročnicima ili se prvi put javlja(ju), i da li se

sumnja na jasno definisanu bolest za koju je poznato da se odlikuje alelskom i/ili lokusnom heterogenošću. Analiza genskih panela je najjednostavniji prisutup i podrazumeva simultanu analizu gena, pre svega egzona i egzon – intron granica, povezanih sa nekom bolešću ili grupom bolesti, a koje se odlikuju alelskom i/ili lokusnom heterogenošću. Na ovaj način se sekvenciraju samo određeni delovi genoma, analize najmanje koštaju, a obrada dobijenih podataka je najjednostavnija (5). Ovakav pristup daje najveću pouzdanost dobijene informacije, jer se svaka analizirana sekvenca pročita veliki broj puta. Međutim, ove analize su ograničene na retke bolesti koje se relativno često javljaju i za koje postoji dovoljan broj informacija kako bi se konstruisali genski paneli. Sa otkrićem mutacija u novim genima i/ili regulatornim elementima i potvrdom povezanosti sa odgovarajućom bolešću, genski paneli se dodatno proširuju. Uobičajeni sledeći pristup je analiza kliničkog egzoma, kojim se sekvenciraju geni od ranije asocirani sa različitim bolestima. Ovakav pristup se bira kada su u pitanju bolesti nepoznate etiologije. Broj analiziranih gena je trenutno oko 5000 i stalno se usklađuje sa novim otkrićima. Kao i kod genskih panela, sekvenciraju se regioni gena koji se jasno mogu dovesti u uzročno - posledičnu vezu sa simptomima (egzoni i egzon – intron granice), a proširuju se i sekvencama regulatornih regiona, ukoliko je utvrđena njihova povezanost sa bolešću. Kao alternativa kliničkom egzomu koristi se analiza sekvenciranjem čitavog egzoma (WES, eng. *Whole Exome Sequencing*) i često odabir jedne od ove dve metode zavisi od laboratorije koja izvodi analize, njenih potencijala i ciljeva istraživačkih projekata. Svakako, ukoliko analize kliničkog egzoma ne daju rezultate, sledeći korak je WES. Sveobuhvatni pristup je analiza čitavog genoma (WGS, eng. *Whole Genome Sequencing*) i njemu se pristupa tek kada su prethodne mogućnosti iscrpljene. Iako se pomoću WGS analizira preko 90%, a danas i čitav genom, a WES-om se analizira oko 2% genoma (16, 17, 18), rezultati WGS-a nisu doneli značajno više informacije od WES-a, osim u domenu insercija i delecija, strukturnih varijanti i varijanti u broju kopija (18, 19). Jedan od razloga je i manja konzerviranost, odnosno veća raznovrsnost varijanti u nekodirajućim delovima genoma koja ukazuje na manji selektivni pritisak i generalno velika količina varijanti dobijenih analizom sekvence genoma, a za koje nije moguće ili je veoma teško uspostaviti uzročno – posledičnu vezu sa bolešću na osnovu same sekvence.

Radi ujednačavanja opisa simptoma, kao i za integraciju informacija o povezanosti genotipa i fenotipa, razvijen je sistem ontologija humanih fenotipova (HPO, eng. *Human Phenotype Ontology*) (20). Na ovaj način su pojednostavljene razmena i deponovanje informacija u internet baze podataka, što je od posebnog značaja za dijagnostiku izuzetno retkih bolesti, gde prisustvo iste varijante povezane sa istim simptomima u bar dva posebno zabeležena slučaja daje potvrdu da se radi o patogenoj varijanti. HPO obuhvata standardizovani rečnik fenotipskih abnormalnosti koje se sreću kod humanih bolesti i trenutno sadrži preko 13 000 izraza i preko 156 000 povezanosti varijanti sa fenotipovima (21).

Kako su rezultati masivnog paralelnog sekvenciranja često opterećeni velikim brojem uočenih varijanti, u cilju pojednostavlivanja samog procesa, HPO klasifikacija je integrisana u algoritme programa za njihovu analizu, pa se tako prvenstveno analiziraju oni geni za koje je utvrđena povezanost sa odgovarajućim simptomima. Rezultati mogu da ukažu na postojanje varijanti za koje je već ustanovljena uzročno – posledična veza sa bolešću, što pojednostavljuje donošenje zaključka o genetičkoj osnovi bolesti u konkretnom slučaju. Ukoliko se uoči nova varijanta, ali u genu koji je prepoznat kao potencijalni gen - uzročnik, donošenje zaključka zahteva i dodatne analize, koje se pre svega odnose na efekat mutacije na fenotip. Generalno, da bi analizirana varijanta bila potencijalni uzročnik retke bolesti treba da zadovolji jedan ili više kriterijuma, i oni se često automatski uzimaju u obzir prilikom analize rezultata. Pa tako, kao potencijalno uzročne, uzimaju se u obzir varijante koje nisu prisutne u referentnoj populaciji ili čija je zastupljenost izuzetno niska. Koja će se MAF koristiti kao prag za analize zavisi od karakteristika same bolesti (težine kliničke slike, vremena pojave prvih simptoma), njene učestalosti, kao i od pretpostavljenog i/ili evidentiranog načina nasleđivanja. Korišćenje podataka iz analiza genoma ili egzoma referentne populacije je od velikog značaja, imajući u vidu uticaj demografskih faktora, te potencijalno veliki efekat genetičkog drifta, na populacionu zastupljenost retkih varijanti. Takođe, mutacije koje dovode do jasne promene na nivou kodiranog proteina (*nonsense*, *frameshift*, mutacije u mestima za splajsovanje, *missense* mutacije) i koje se nalaze na evoluciono konzerviranim pozicijama, a čiji se efekat može pretpostaviti korišćenjem različitih bioinformatičkih alatki (programi *SIFT* (22), *Polyphen* (23), *MutationTaster* (24)), segregacija mutacije sa bolešću (25), prisustvo iste mutacije u različitim porodicama (26), govore u prilog uzročno - posledičnoj vezi sa analiziranom bolešću.

Metode masivnog paralelnog sekvenciranja su najveći pomak donele dijagnostici retkih bolesti koje se odlikuju visokom penetrabilnošću i/ili jasnim nasleđivanjem koje se može pratiti u velikim porodičnim pedigreima ili kroz analizu većeg broja porodica, a za koje prethodnim pristupima nije bila dijagnostikovana uzročna mutacija, uglavnom kao posledica retke zastupljenosti (privatne mutacije) i visoke alelske i/ili lokusne heterogenosti. Veliki broj novih gena je povezan sa različitim bolestima, utvrđene su nove veze varijanti i bolesti (alelska heterogenost), kao i nove veze gena i bolesti (lokusna heterogenost). U zavisnosti od primenjenog pristupa, kao i od selekcije pacijenata, otkrivanje uzročne varijante sekvenciranjem kliničkog ili celog egzoma generalno se kreće od 25% do oko 50% (8, 16, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34), dok je sekvenciranje genoma, i pored velikog napretka u samoj metodologiji koja danas omogućava

čitanje kompletne sekvence, i dalje ograničeno na mali broj centara koji zadovoljava tehničke mogućnosti za ovakve analize, a rezultati dobijeni WGS-om komplikovani za interpretaciju, zbog nemogućnosti uspostavljanja uzročno – posledične veze između velikog broja identifikovanih varijanti i razvoja bolesti.

Autozomno – recesivne bolesti koje su obično prisutne u velikim pedigreima se lakše mogu povezati sa bolešću, zbog prisustva mutacije u, najčešće, homozigotnom obliku kod obolelih članova porodice i heterozigotnom kod nosilaca (35, 36, 37), dok se za autozomno – dominantne bolesti koje se nasleđuju u porodicama teže može otkriti uzročna varijanta, s obzirom da se veliki broj varijanti nasleđuje zajedno. Kod ovakvih slučajeva, za identifikaciju uzročne mutacije značajno je postojanje većeg broja nesrodnih porodica ili velikih, razgranatih pedigreea u kojima su obolele osobe u što daljem srodstvu (38, 39). Za otkrivanje *de novo* mutacija sa dominantnim efektom, a koje su asocirane sa teškom kliničkom slikom sa ranim početkom, analize obično uključuju oba roditelja i dete (trio) (40). Svakako, dete u odnosu na roditelje ima oko 75 *de novo* SNV (2), te je za konačnu dijagnozu značajno i postojanje drugih pacijenata sa preklapajućim simptomima (41, 42).

Nova paradigma u dijagnostici retkih bolesti omogućila je velikom broju pacijenata da dođe do sigurne ili, bar, potencijalne genetičke dijagnoze, pri čemu za preko 70% pacijenata nakon prvih analiza etiologija bolesti ostaje i dalje nepoznata. Ponovna analiza rezultata WES-a nakon nekoliko godina, a zahvaljujući novim gen - varijanta - fenotip povezanostima i većem broju sekvenciranih egzoma i genoma dostupnih u internet bazama podataka, te unapređenim algoritmima za analizu, omogućava utvrđivanje genetičke osnove za dodatnih 10% pacijenata sa RGD (15, 43). U pojedinim slučajevima uzročna mutacija može biti nedijagnostikovana usled prisustva mozaicizma, odnosno embrionalne *de novo* mutacije i njenog odsustva u analiziranom (obično krv), a prisustva u pogođenom tkivu. Takođe, očekuje se da će se sa napredovanjem tehnologije WGS, razvojem tehnologija analiza transkriptoma i metiloma u cilju identifikacije novih genotip – fenotip povezanosti, dobiti odgovor za još preko 10% RGD pacijenata (44).

LITERATURA

1. The UK10K Consortium. The UK10K project identifies rare variants in health and disease. *Nature* 2015; 526(7571): 82–90.
2. Jackson M, Marks L, May GHW, Wilson JB. The genetic basis of disease. *Essays Biochem* 2018; 62(5): 643–723.
3. United States Congress. Rare Diseases Act of 2002. 2002. <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/PLAW-107publ280/html/PLAW-107publ280.htm>.
4. The European Parliament and the Council of the European Union. Regulation (EC) No 1411/2000 of the European parliament and of the council of 16 December 1999 on orphan medicinal products. 1999. http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/reg_....
5. McInerney-Leo AM, Duncan EL. Massively Parallel Sequencing for Rare Genetic Disorders: Potential and Pitfalls. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; 11: 628946.
6. OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man (<https://omim.org/>).
7. Prevalence and incidence of rare diseases: Bibliographic data. In Orphanet Report Series: Rare Diseases collection. Ana Rath, editor. 2014. http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/GB/Prevalence_of_rare_disease...
8. Boycott KM, Rath A, Chong JX, Hartley T, Alkuraya FS, Baynam G, et al. International Cooperation to Enable the Diagnosis of All Rare Genetic Diseases. *Am J Hum Genet* 2017; 100(5):695-705.
9. Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, et al. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 1983; 306(5940):234-8.
10. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*. 1993; 72(6):971-83.
11. Collins FS. Positional cloning moves from perditional to traditional. *Nat Genet* 1995; 9(4):347-50.
12. Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ. Finding genes that underlie complex traits. *Science* 2002; 298(5602):2345-9.
13. Keckarevic-Markovic M, Milic-Rasic V, Mladenovic J, Dackovic J, Kecmanovic M, Keckarevic D, et al. Mutational analysis of GJB1, MPZ, PMP22, EGR2, and LITAF/SIMPLE in Serbian Charcot-Marie-Tooth patients. *J Peripher Nerv Syst* 2009; 14(2):125-36.
14. Keckarevic Markovic M, Dackovic J, Mladenovic J, Milic-Rasic V, Kecmanovic M, Keckarevic D, et al. An algorithm for genetic testing of Serbian patients with demyelinating Charcot-Marie-Tooth. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013; 17(1):85-7.
15. Wenger AM, Guturu H, Bernstein JA, Bejerano G. Systematic reanalysis of clinical exome data yields additional diagnoses: implications for providers. *Genet Med* 2017; 19(2):209-214.
16. Shamseldin HE, Maddirevula S, Faqeih E, Ibrahim N, Hashem M, Shaheen R, et al. Increasing the sensitivity of clinical exome sequencing through improved filtration strategy. *Genet Med* 2017; 19(5):593-598.
17. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, Tan TY, White SM, Dimmock D, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genom Med* 2018; 3:16.
18. Logsdon GA, Vollger MR, Hsieh P, Mao Y, Liskovych MA, Koren S, et al. The structure, function and evolution of a complete human chromosome 8. *Nature* 2021; 593(7857):101-107.
19. Fang H, Wu Y, Narzisi G, O'Rawe JA, Barrón LT, Rosenbaum J, et al. Reducing INDEL calling errors in whole genome and exome sequencing data. *Genome Med* 2014; 6(10):89.
20. Robinson PN, Köhler S, Bauer S, Seelow D, Horn D, Mundlos S. The Human Phenotype Ontology: a tool for annotating and analyzing human hereditary disease. *Am J Hum Genet*. 2008; 83(5):610-5.
21. The Human Phenotype Ontology. <https://hpo.jax.org/app/>

22. Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, Sikic M, Ng PC. SIFT missense predictions for genomes. *Nat Protoc* 2016; 11(1):1-9.
23. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010; 7(4):248-9.
24. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014; 11(4):361-2.
25. McInerney-Leo AM, Le Goff C, Leo PJ, Kenna TJ, Keith P, Harris JE, et al. Mutations in LTBP3 cause acromicric dysplasia and geleophysic dysplasia. *J Med Genet* 2016; 53(7):457-64.
26. Zankl A, Duncan EL, Leo PJ, Clark GR, Glazov EA, Addor MC, et al. Multicentric carpotarsal osteolysis is caused by mutations clustering in the amino-terminal transcriptional activation domain of MAFB. *Am J Hum Genet* 2012; 90(3):494-501.
27. Anazi S, Maddirevula S, Faqeih E, Alsedairy H, Alzahrani F, Shamseldin HE, et al. Clinical genomics expands the morbid genome of intellectual disability and offers a high diagnostic yield. *Mol Psychiatry* 2017; 22(4):615-624.
28. Retterer K, Juusola J, Cho MT, Vitazka P, Millan F, Gibellini F, et al. Clinical application of whole-exome sequencing across clinical indications. *Genet Med* 2016; 18(7):696-704.
29. Farwell KD, Shahmirzadi L, El-Khechen D, Powis Z, Chao EC, Tippin Davis B, et al. Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. *Genet Med* 2015;17(7):578-86.
30. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA* 2014;312(18):1870-9.
31. Lee H, Deignan JL, Dorrani N, Strom SP, Kantarci S, Quintero-Rivera F, et al. Clinical exome sequencing for genetic identification of rare Mendelian disorders. *JAMA* 2014; 312(18):1880-7.
32. Posey JE, Rosenfeld JA, James RA, Bainbridge M, Niu Z, Wang X, et al. Molecular diagnostic experience of whole-exome sequencing in adult patients. *Genet Med* 2016; 18(7):678-85.
33. Yavarna T, Al-Dewik N, Al-Mureikhi M, Ali R, Al-Mesaifri F, Mahmoud L, et al. High diagnostic yield of clinical exome sequencing in Middle Eastern patients with Mendelian disorders. *Hum Genet* 2015; 134(9):967-80.
34. Stark Z, Tan TY, Chong B, Brett GR, Yap P, Walsh M, et al. A prospective evaluation of whole-exome sequencing as a first-tier molecular test in infants with suspected monogenic disorders. *Genet Med* 2016; 18(11):1090-1096.
35. Bredrup C, Saunier S, Oud MM, Fiskerstrand T, Hoischen A, Brackman D, et al. Ciliopathies with skeletal anomalies and renal insufficiency due to mutations in the IFT-A gene WDR19. *Am J Hum Genet* 2011; 89(5):634-43.
36. Becker J, Semler O, Gilissen C, Li Y, Bolz HJ, Giunta C, et al. Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet* 2011; 88(3):362-71.
37. McInerney-Leo AM, Schmidts M, Cortés CR, Leo PJ, Gener B, Courtney AD, et al. Short-rib polydactyly and Jeune syndromes are caused by mutations in WDR60. *Am J Hum Genet* 2013; 93(3):515-23.
38. Sparrow DB, McInerney-Leo A, Gucev ZS, Gardiner B, Marshall M, Leo PJ, et al. Autosomal dominant spondylocostal dysostosis is caused by mutation in TBX6. *Hum Mol Genet* 2013; 22(8):1625-31.
39. Sirmaci A, Spiliopoulos M, Brancati F, Powell E, Duman D, Abrams A, et al. Mutations in ANKRD11 cause KBG syndrome, characterized by intellectual disability, skeletal malformations, and macrodontia. *Am J Hum Genet* 2011; 89(2):289-94.
40. Semler O, Garbes L, Keupp K, Swan D, Zimmermann K, Becker J, et al. A mutation in the 5'-UTR of IFITM5 creates an in-frame start codon and causes autosomal-dominant osteogenesis imperfecta type V with hyperplastic callus. *Am J Hum Genet* 2012; 91(2):349-57.
41. Rauch F, Moffatt P, Cheung M, Roughley P, Lalic L, Lund AM, et al. Osteogenesis imperfecta type V: marked phenotypic variability despite the presence of the IFITM5 c.-14C>T mutation in all patients. *J Med Genet* 2013; 50(1):21-4.
42. Wade EM, Daniel PB, Jenkins ZA, McInerney-Leo A, Leo P, Morgan T, et al. Mutations in MAP3K7 that Alter the Activity of the TAK1 Signaling Complex Cause Frontometaphyseal Dysplasia. *Am J Hum Genet*. 2016; 99(2):392-406.
43. Basel-Salmon L, Orenstein N, Markus-Bustani K, Ruhrman-Shahar N, Kilim Y, Magal N, et al. Improved diagnostics by exome sequencing following raw data reevaluation by clinical geneticists involved in the medical care of the individuals tested. *Genet Med* 2019; 21(6):1443-1451.
44. Boycott KM, Hartley T, Biesecker LG, Gibbs RA, Innes AM, Riess O, et al. A Diagnosis for All Rare Genetic Diseases: The Horizon and the Next Frontiers. *Cell*. 2019; 177(1):32-37.

IMPRESUM

Trendovi u molekularnoj biologiji, 2021.

Izdavač

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

Uređivački odbor

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

Dr **Jelena Begović**, naučni savetnik,
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

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

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

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

Recenzenti

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

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

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

Dizajn i izrada korica

Ivan Strahinić

Štampa

Curent Print, Beograd

Periodičnost izlaza publikacije

Godišnje

Tiraž

200 primeraka

Autori

Anđelković Marina	71
Arsić Aleksandra.....	152
Bosnić Dragana	180
Djusalov Mila	21
Đorić Ilona	133
Gadjanski Ivana	21
Gašić Vladimir	113
Išić Denčić Tijana	96
Janjušević Ljiljana	21
Janković Miljuš Jelena	133
Janković Radmila	96
Jovčić Branko	166
Keckarević Dušan	54
Keckarević Marković Milica	54
Kecmanović Miljana	54
Knežić Teodora	21
Kojadinović Milica	152
Kokanov Nikola	123
Komazec Jovana	84
Kosijer Petar	21
Kotur Nikola	6
Kožik Bojana	123
Krajnović Milena	123
Malešević Milka	166
Nikolić Dragana	180
Panić Marko	33
Perić Stojan	60
Pešović Jovan	60
Popović D. Željko	21
Radenković Lana	60
Rakićević Ljiljana	146
Rakočević-Stojanović Vidosava	60
Ristić Nina	96
Samardžić Jelena	180
Savić-Pavićević Dužanka	60
Šelemetjev Sonja	133
Skakić Anita	42
Spasovski Vesna	107
Stanković Biljana	6
Stojiljković Maja	42
Tošić Nataša	113
Ugrin Milena	84
Vreća Miša	107
Zukić Branka	6

CIP - Каталогизacija y publikaciji
Народна библиотека Србије, Београд

577.2

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

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