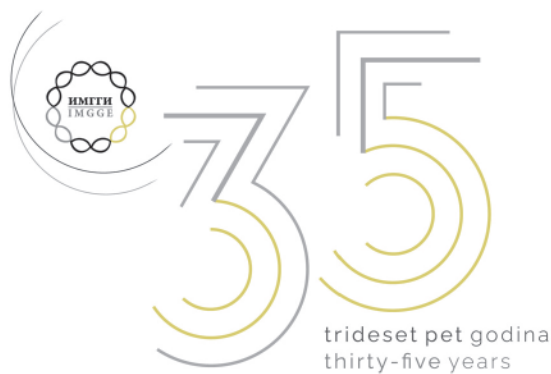


Broj 1 • septembar 2021. N° 1 • September 2021.



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 sklerozii: 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 RECENZIJA 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

Molekularna osnova primarne cilijarne diskinezije

Marina Anđelković

Laboratorija za molekularnu biomedicinu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

Kontakt: marina.andjelkovic@imgge.bg.ac.rs

Apstrakt

Primarna cilijarna diskinezija (PCD) predstavlja redak genetički poremećaj motornih cilija koji se najčešće nasleđuje na autozomno recesivan način, a uočeno je i nasleđivanje vezano za hromozom X i autozomno dominantno nasleđivanje ovog oboljenja. Osnovne karakteristike PCD-a su abnormalnosti pokretnih cilija, koje su posledica patogenih varijanti u genima koji kodiraju za proteine koji su neophodni za pravilnu strukturu i funkciju ovih organela. PCD predominantno obuhvata respiratorni trakt i reproduktivne organe, a utiče i na lateralnost unutrašnjih organa. Klinička prezentacija nije specifična, već obuhvata simptome različitih respiratornih oboljenja, što često dovodi do odloženog uspostavljanja precizne dijagnoze, zbog čega je upotreba dijagnostičkih analiza i genetičkog profilisanja neophodna za utvrđivanje PCD-a. Metode sekvenciranja nove generacije omogućile su poslednjih godina detekciju velikog broja novih gena uzročnika i gena kandidata za PCD, pa je do sada opisano 45 gena uzročnika koje su odgovorni za nastanak PCD-a i 200 gena kandidata, a smatra se da je taj broj mnogo veći, s obzirom da 2500 proteina učestvuje u izgradnji i pravilnom funkcionisanju cilija. Nakon detekcije genetičkih varijanti u uzorcima pacijenata suspektih na PCD, molekularna karakterizacija varijanti, upotrebom *in silico* i/ili eksperimentalnih metoda, omogućava determinaciju njihove patogenosti i uspostavljanje korelacije između genotipa i fenotipa pacijenata. Terapijski protokoli kojima se leče PCD pacijenti nisu specifični za ovo oboljenje već se ekstrapoliraju iz terapijskih protokola drugih plućnih oboljenja sa sličnom kliničkom prezentacijom bolesti. Stoga su istraživanja terapijika na animalnim model sistemima od ključnog značaja za razvoj adekvatne terapije za PCD pacijente.

Gljučne reči: Primarna cilijarna diskinezija (PCD), dijagnostički testovi, genomsko profilisanje PCD pacijenata, funkcionalna karakterizacija varijanti, model sistemi za PCD, terapija za PCD.

Molecular basis of primary ciliary dyskinesia

Marina Andjelkovic

Laboratory for Molecular Biomedicine, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

Correspondence: marina.andjelkovic@imgge.bg.ac.rs

Abstract

Primary ciliary dyskinesia (PCD) is a rare genetic disorder that is most often inherited in an autosomal recessive manner, nevertheless X-linked and autosomal dominant inheritance of this disease have been reported. The main characteristics of PCD are abnormalities of motile cilia, which are a consequence of pathogenic variants in genes encoding proteins necessary for the proper structure and function of these organelles. PCD predominantly involves the respiratory tract and reproductive organs, and also affects the laterality of internal organs. The clinical presentation is not specific, and most often includes the symptoms of various respiratory diseases, which leads to the delayed establishment of an accurate diagnosis. Consequently, the use of diagnostic and genetic analyses is necessary for the determination of PCD. Next-generation sequencing methods have enabled the detection of a large number of novel PCD disease-causing and candidate genes in recent years, and so far, 45 PCD disease-causing and 200 candidate genes have been described, and this number is thought to be much higher since 2500 proteins participate in cilia formation. After detection of genetic variants in samples of patients suspected of PCD, molecular characterization of variants, using *in silico* and/or experimental methods, allows determination of their pathogenicity and establishment of genotype-phenotype correlation in patients. Therapeutic protocols for treating PCD patients are not specific for this disease rather, the therapy is extrapolated from other similar lung diseases. Therefore, research on therapeutics on animal model systems is crucial for the development of adequate therapy for PCD patients.

Keywords: Primary ciliary dyskinesia (PCD), diagnostic tests, genomic profiling of PCD patients, functional characterization of variants, model systems for PCD, therapy for PCD.

UVOD

Sindrom koji je obuhvatio trijadu hroničnog sinuzitisa, bronhiektazije i *situs viscerum inversus* (SI), prvi je opisao Kartagener (1). Četrdeset godina kasnije, Afzelius je opisao četiri osobe sa rekurentnim bronhitisom i pneumonijom povezanim sa ponovljenim infekcijama gornjih disajnih puteva koji su takođe imali SI u 50% slučajeva, tada poznatom kao Kartagenerov sindrom (2). Kod ovih pacijenata su elektronskom mikroskopijom detektovane nepokretne cilije kao posledica nedostatka dineinskih ručica u respiratornim cilijama i repovima spermatozoida. Ova studija pokazala je da urođeni poremećaj motornih cilija u respiratornom traktu i flagelama spermatozoida može prouzrokovati hroničnu infekciju disajnih puteva i sterilitet kod muškaraca i tada je usvojen termin „sindrom nepokretne cilije“ (Afzelius).

Istraživanja koja su usledila pokazala su da pored cilijarne nepokretljivosti i cilijarna diskinezija (poremećen obrazac kretanja) kao i cilijarna aplazija (odsustvo cilija) dovode do ovog oboljenja, pa je ovaj termin zamenjen terminom „primarna cilijarna diskinezija“ (2, 3). Termin „primarna“ korišćen je za razlikovanje ovog stanja od sekundarnih abnormalnosti cilija izazvanih upalom i infekcijom.

Primarna cilijarna diskinezija (PCD) je vrlo redak poremećaj motornih cilija (OMIM 244400) (3) koji se manifestuje odmah po rođenju. Najčešći tip nasleđivanja ovog oboljenja je autozomno recesivno nasleđivanje (homozigotne varijante, udružene heterozigotne varijante i trans-alelske heterozigotne varijante). Poslednjih godina nasleđivanje vezano za hromozom X se sve češće detektuje kod pacijenata sa PCD-om (4-6), a nedavno su identifikovane i autozomno dominantne genetičke varijante u genu *FOXJ1* koje uzrokuju PCD asociran sa hidrocefalusom (7). Prevalenca bolesti je veoma promenljiva u celoj Evropi, jer je ovaj poremećaj često nedovoljno dijagnostikovao zbog nepristupačnosti dijagnostičkih i genetičkih testova (8). Procenjena prevalenca je između 1: 4000 i 1:40 000, s pravom prevalencom verovatno oko 1:10 000 (8, 9) i većim stopama u određenim etničkim grupama zbog konsagviniteta (10, 11).

Osnovna ultrastrukturalna karakteristika ovog oboljenja je poremećaj motornih (pokretnih) cilija koji je posledica patogenih genetičkih varijanti u genima koji kodiraju za proteine koji su neophodni za pravilnu strukturu i funkciju ovih organela. Uloga motornih cilija u respiratornom traktu je održavanje prohodnosti disajnih puteva omogućavanjem kretanja mukusa sa inhaliranim bakterijama, virusima i stranim česticama čime se sprečava infekcija gornjih i donjih disajnih puteva. Klinička prezentacija nije specifična, već obuhvata simptome različitih respiratornih oboljenja, što često dovodi do odloženog uspostavljanja precizne dijagnoze, zbog čega je upotreba dijagnostičkih (biopsija respiratornog epitela i elektronska mikroskopija, merenje nivoa nazalnog azot oksida (nNO), analiza frekvencije i obrasca kretanja cilija i analiza cilijarnih proteina) i genetičkog profilisanja neophodna za utvrđivanje PCD-a. Primena metoda sekvenciranja nove generacije (eng. *Next-Generation Sequencing*, NGS), kao što su targetovano egzomsko sekvenciranje (eng. *Targeted Exome Sequencing*, TES) i sekvenciranje kompletnog egzoma (eng. *Whole Exome Sequencing*, WES) omogućile su poslednjih godina detekciju velikog broja novih gena uzročnika i gena kandidata za PCD. Do danas je opisano 45 gena uzročnika koje su odgovorni za nastanak PCD-a i 200 gena kandidata, a smatra se da je taj broj mnogo veći obzirom da 2500 proteina učestvuje u izgradnji i pravilnom funkcionisanju cilija (10, 12-17). Međutim, identifikacija genetičkih varijanti koje su odgovorne za uočeni fenotip PCD pacijenata je veoma dug i složen proces zbog velike količine genetičkih varijanti dobijenih primenom ovih metoda. Ukoliko su detektovane varijante novootkrivene i o njima ne postoje informacije u bazama podataka, neophodna su dodatna istraživanja koja obuhvataju *in silico* strukturalnu i funkcionalnu analizu kao i eksperimentalnu funkcionalnu karakterizaciju genetičkih varijanti (4).

Iz terapijske perspektive ne postoje prospektivna, nasumična klinička ispitivanja praćenja ili lečenja PCD-a. Lekari koji leče PCD prilagođavaju terapijske pristupe koji se koriste za druge hronične respiratorne bolesti, poput cistične fibroze (CF) i bronhiektazija bez CF. Razlike u različitim fenotipskim parametrima između ovih oboljenja sugerišu da ekstrapolirajuće terapije u nekim okolnostima nisu prikladne za lečenje PCD-a (18-20). Stoga su istraživanja terapeutika na model sistemima od ključnog značaja za razvoj adekvatne terapije za PCD pacijente.

2. BIOLOGIJA MOTORNIH CILIJ: STRUKTURA I FUNKCIJA

Naše razumevanje pokretnih cilija i njihove uloge u bolestima izuzetno se povećalo tokom poslednje dve decenije, a ključne informacije i uvidi su proizašli iz analize na model sistemu miša. Pokretne cilije se formiraju na određenim tipovima epitelnih ćelija i obično se kreću na koordinisani način poput biča da bi olakšali protok i čišćenje tečnosti duž ćelijske površine. U novije vreme, primena inovativnih ćelijskih bioloških tehnika na mišjim modelima omogućila je značajan napredak u rasvetljavanju molekularnih i ćelijskih mehanizama u osnovi biogeneze i funkcije pokretnih cilija sisara (21).

Visokokonzervirana cilijarna struktura (aksonema), sastoji se od devet dubleta mikrotubula (tubula A i tubula B) koji okružuju centralni par mikrotubula. Ovakva cilijarna struktura označena je kao 9+2 tip aksoneme (22-24) i poseduju ga motorne cilije kao i kinocilije. Unutrašnje dineinske ručice (eng. *Inner Dynein Arms*, IDAs) i spoljašnje dineinske ručice (eng. *Outer Dynein Arms*, ODAs) sastoje se od dineinskih motornih proteina koji omogućavaju kretanje cilija i re-

gulisani su regulatornim kompleksom neksin-dinein (eng. *Nexin-Dynein Regulatory Complex*, N-DRC) i radijalnim strukturalom (eng. *Radial Spokes*, RS). Aksonema, čiji poporečni presek iznosi približno 250nm, podeljena je u niz ponavljajućih jedinica od 96 nm, dužinom cilijuma, što je posledica periodične organizacije glavnih aksonemalnih komponenata (21).

Trenutno razumevanje motornih cilija potiče iz studije izvedene na različitim model sistemima, uključujući miševе i druge organizme (25). Najznačajniji među nižim eukariotima je alga *Chlamidomonas reinhardtii*, posebno primenljiv model sistem koji je omogućio detaljnu genetičku, biohemijsku i strukturnu analizu flagela (24, 26). Za razliku od modela nižih kičmenjaka, miš je model sistem sisara čija su anatomija i fiziologija bliži čoveku. Jedini izuzetak je povezanost hidrocefalusa, koja je češća na mišjim modelima nego kod ljudi, zbog anatomske razlike u moždanim komorama i dodatnih genetičkih modifikatora koji se izdvajaju u određenim sojevima miševa koji su ukršteni u srodstvu (27). Motorne cilije sisara formiraju se na terminalno diferenciranim tipovima ćelija kao što su epitelne ćelije disajnih puteva, ependimske ćelije diferencirane od radijalne glijе i nodalne embrionalne ćelije (28). Pokretne cilije su prostorno orijentisane, a njihova pokretljivost je visoko koordinisana unutar i između ćelija, kako bi se efikasno omogućio mukocilijarni klirens i prohodnost (23).

Kao posledica poremećaja u biogenezi i pokretljivosti cilija dolazi do disfunkcije organa ili razvojnih nedostataka, uključujući gubitak prve linije odbrane domaćina, urođenog imuniteta, gubitak funkcije pluća, oštećenje moždanog tkiva i hidrocefalus, kao i poremećaje levo-desne asimetrije tokom embrionalnog razvoja (23, 29).

Razumevanje mehanizama u osnovi formiranja, regulacije i funkcije pokretnih cilija sisara, kao i patogeni proces izazvan aberantnim cilijama, omogućiće razvoj specifičnih terapija za PCD.

3. KLINIČKA PREZENTACIJA PCD-a

Kod većine PCD pacijenata, klinički simptomi predominantno zahvataju čitav respiratorni trakt, reproduktivne organe kao i položaj unutrašnjih organa. Većina simptoma se javlja ubrzo posle rođenja, nakon čega postaju hronični. Najmanje 80% novorođenčadi obolelih od PCD-a razvija neonatalni respiratorni distres (NRD), iako nisu prevremeno rođeni (30). Neonatalni respiratorni distres manifestuje se ubrzanim disanjem (tahipneom), modrilom (cijanozom), uvlačenjem interkostalnih predela, uvlačenjem sternuma, lepršanjem nozdrva i apneom (31). Pored NRDS-a, prisutni su rinitis, sinuzitis, upala srednjeg uha, kao i česte respiratorne infekcije gornjih i donjih disajnih puteva, koji se nastavljaju kroz detinjstvo i adolescenciju. Bronhiektazije se mogu javiti u detinjstvu, ali je ovaj entitet skoro neizbežan u adolescenciji kao rezultat progresije bolesti. Bronhiektazije predominantno zahvataju donje i srednje lobuse, i predstavljaju abnormalno proširenje bronhija i bronhiola. Kao posledica prisustva bronhiektazija javlja se hroničan kašalj, produkcija sputuma i česta pojava infekcija, što može dovesti do progresivnog gubitka plućne funkcije, koja zahteva transplantaciju pluća ili može imati fatalan ishod.

Kod 50% PCD pacijenata pored *situs solitus* (anatomski normalan položaj unutrašnjih organa) primećena je i inverzija unutrašnjih organa, *situs inversus*, a uočavaju se i druge abnormalnosti položaja visceralnih organa kao što je *situs ambiguous*. Kod većine muškaraca sa PCD-om javlja se sterilitet koji nastaje kao posledica smanjene pokretljivosti spermatozoida usled narušene flagelarne strukture, zabeležen je i veći stepen vanmateričnih trudnoća jer su motorne cilije odgovorne za kretanje jajne ćelije kroz Falopijevu tubu do materice (32).

Klinička prezentacija bolesti nije specifična, već obuhvata simptome različitih respiratornih oboljenja, kao što su CF, bronhiektazije bez CF, neonatalni respiratorni distres sindrom, sindromi imunodeficijencije i *Wegener*-ova granulomatoza (8), što često dovodi do odloženog uspostavljanja precizne dijagnoze. Uspostavljanje precizne dijagnoze PCD-a je u većini slučajeva znatno olakšano ukoliko postoji inverzija visceralnih organa, *situs inversus*. Međutim, samo 25% pacijenata sa SI ima i Kartagenerov sindrom, a SI može biti asociran i sa drugim oboljenjima organskih sistema (respiratorni, gastrointestinalni i genitourinarni), kao i sa različitim malformacijama bubrega (displazija, hipoplazija, ektopija i policistični bubrezi) (33). Stoga je primena dijagnostičkih testova i utvrđivanje genetičkog profila pacijenata suspektnih na PCD ključna za potvrđivanje kliničke dijagnoze ovog oboljenja.

4. PRISTUPI ZA DIJAGNOSTIKOVANJE PCD-a

4.1. Dijagnostički testovi

Biopsija respiratornog epitela i elektronska mikroskopija

Biopsija respiratornog epitela i upotreba elektronske mikroskopije (EM) za ultrastrukturni pregled cilijarnih aksonema je dokazana tehnika za uspostavljanje PCD dijagnoze (16) i preporučuje se kao deo panela dijagnostičkih testova za PCD. Kada se korišćenjem EM detektuju promene na spoljašnjim dineinskim ručicama (ODA) (34), spoljašnjim i unutrašnjim diineinskim ručicama (ODA i IDA) (35), unutrašnjim dineinskim ručicama sa neorganizovanim mikro-

tubulama (36), radijalnih struktura (37) ili centralnog aparata (38) potvrđuje se dijagnoza PCD-a. Međutim, EM studije sa normalnom cilijarnom ultrastrukturom ne isključuju PCD, jer određene patogene genetičke varijante PCD gena mogu rezultovati normalnom ultrastrukturom (39, 40), ili suptilnim abnormalnostima (posebno onima koje uključuju centralni aparat i radijalne strukture) koje ne mogu lako da se prepoznaju pomoću EM (41). Pored toga, ponovljene biopsije kojima se ne detektuju respiratorne cilije mogu predstavljati oligocilijarni defekt koji uzrokuje PCD (42).

Za dijagnostičku studiju koja podrazumeva upotrebu EM potrebno je najmanje 20-50 jasnih poprečnih preseka cilija, a dijagnostičke abnormalnosti se moraju konzistentno uočavati na poprečnim presecima više različitih cilija kako bi se ove promene smatrale uzročnicima bolesti. Dalje, od suštinske je važnosti da se biopsije sakupljaju kada su pacijenti zdravi, jer se sekundarne promene u ultrastrukтури cilija mogu desiti tokom pogoršanja stanja njihovih respiratornih organa, zbog čega biopsiju treba ponoviti najmanje 2 nedelje nakon potpunog oporavka od bolesti (43).

Ukoliko se detektuje nedostatak unutrašnjih dineinskih ručica (izolovan, bez drugih promena na aksonemi), uvek su potrebne ponovljene biopsije i EM studije kako bi se potvrdilo da li ova patološka promena traje i stoga je verovatnije genetička (primarna), i nije nastala iz sekundarnih uzroka (17), čime se potvrđuje dijagnoza analiziranog pacijenta. Takođe se mogu razmotriti ponovljene biopsije da bi se potvrdila univerzalnost i trajnost nalaza koji ukazuju na promene centralnog aparata, radijalnih struktura ili unutrašnjih dineinskih ručica sa dezorganizacijom mikrotubula.

Kada se ispune svi neophodni uslovi za upotrebu EM, procenjeno je da se na ovaj način može razjasniti oko 70 % svih PCD pacijenata (3).

Merenje nazalnog azot oksida

Vrednosti azotnog oksida (eng. *Nasal Nitric Oxide*, nNO) u nosu su izuzetno niske kod PCD pacijenata (44). Korišćenjem granične vrednosti nNO < 77 nl/min, detektor će otkriti PCD, koji je rezultat cilijarnih aksonemalnih defekata ili patogenih genetičkih varijanti u genu *DNAH11*, sa osetljivošću i specifičnošću od 98% i > 99%, pod uslovom da je CF isključena kao finalna dijagnoza (45). Vrednosti znatno iznad ovog graničnog nivoa smanjuju verovatnoću PCD-a. Međutim, kliničari i dalje moraju razmotriti PCD kao finalnu dijagnozu kada se suoče sa odgovarajućim kliničkim fenotipom za PCD i vrednostima nNO iznad 77 nl/min, iako su retko prijavljeni oblici PCD sa vrednostima nNO iznad ove granične vrednosti (46). Veoma niski nivoi nNO (ispod 77 nl/min) mogu se javiti tokom akutnih virusnih respiratornih infekcija i kod približno 30% pacijenata sa CF. Stoga se ispitivanje nNO mora izvršiti kada se pacijent potpuno oporavi od virusne infekcije i nakon dijagnostičkog ispitivanja radi isključivanja CF (47). Stanja kao što su HIV (48), panbronhiolitis (49) i ne-atopični sinusitis (50) takođe mogu dovesti do nivoa nNO ispod graničnih vrednosti, pa je neopodno primeniti druge dijagnostičke testove kako bi se utvrdila precizna dijagnoza ovih pacijenata.

Merenje nNO se preporučuje kao deo panela dijagnostičkih testova za PCD kod odraslih i dece starije od 5 godina (45). Vrednosti NO u nosu pouzdanije su kod dece školskog uzrasta i odraslih, jer ovi pacijenti mogu da ispune zahtev lekara (pravilno duvanje u otpornik). Trenutno se istražuju tehnike za merenje nNO kod dece mlađe od 5 godina (51), ali granične vrednosti koje bi imale dijagnostički značaj za PCD nisu utvrđene (52).

Analiza frekvencije i obrasca kretanja cilija

Analiza frekvencije obrasca kretanja cilija upotrebom brze video mikroskopije (eng. *High Speed Videomicroscopy analysis*, HSVA) na cilijarnim biopsijama može potvrditi dijagnozu PCD-a, a ovaj test se preporučuje i kao deo panela PCD dijagnostičkih testova (53). Funkcionalna cilijarna analiza se mora izvesti veoma precizno, kako bi se izbegli lažno pozitivni i lažno negativni rezultati. Biopsije treba izvoditi samo kada su pacijenti zdravi. Ponovljene biopsije su potrebne da bi se osiguralo da abnormalni obrasci kretanja nisu posledica sekundarnih procesa, poput virusnih infekcija (54), izloženosti duvanu ili okolini, lošeg uzorkovanja biopsije ili nepravilne obrade biopsije (55). U studiji Roberta Hirst-a i saradnika, potvrđeno je i da kultivacija bioptiranih epitelnih ćelija u ALI sistemu (eng. *Air-Liquide interface*, ALI) dobijenih *nasal-brushing* tehnikom uklanjanja sekundarne promene na cilijama koje nisu posledica oboljenja i omogućava veću preciznost dobijenih rezultata (43).

Analiza cilijarnih proteina

Imunofluorescentna (IF) analiza cilijarnih proteina upotrebom fluorescentno obeleženih antitela omogućava detekciju proteina dineinskih ručica koji nedostaju duž cilijarne aksoneme. IF analiza je od velikog značaja u potvrđivanju PCD-a i deo je panela dijagnostičkih testova za utvrđivanje PCD-a (56). Bojenjem specifičnih cilijarnih proteina (DNAH5, DNAI2, DNALI1 i RSPH4 / RSPH1 / RSPH9), koji su od suštinske važnosti za celokupnu strukturu dineinskih ručica i radijalnih struktura, IF može otkriti mnogobrojne alteracije spoljašnjih i unutrašnjih dineinskih ručica i radijalnih struktura čak i kada su u pitanju deficijencije drugih cilijarnih proteina primarni uzrok PCD-a. Heike Olbrich i saradnici su potvrdili da na rezultate IF ne utiče sekundarna cilijarna diskinezija što je prednost u odnosu na HSVA, zbog čega ova metoda ima veliki potencijal kao dijagnostički test za PCD (57).

Genetički testovi i strategije za selekciju genetičkih varijanti

Genomskim profilisanjem PCD pacijenata utvrđeno je da se približno 65-70 % genetičkih varijanti nasleđuje na autozomno recesivan način (varijante u homozigotnom stanju, udružene heterozigotne varijante, trans alelske genetičke varijante), i da je najveći broj (75%) detektovanih varijanti u PCD genima izolovano, tj prisutno u jednoj porodici (58, 59). Genetičke varijante koje prouzrokuju PCD najčešće (80%) dovode do gubitka funkcije proteina (menjaju okvir čitanja, uvode preveremeni stop kodon, ukidaju stop kodon, menjaju mesto splajsovanja) (58), dok je manji broj varijanti koje dovode do aminokiselinske zamene u polipeptidnom lancu proteina. Prema podacima iz literature, geni u kojima se najčešće detektuju patogene genetičke varijante su *DNAH5*, *DNAH11*, *DNAI1*, *CCDC39* i *CCDC40* (58) i oni su uzročnici bolesti kod 26% analiziranih PCD pacijenata. U populaciji Srbije, patogene genetičke varijante u ovim genima odgovorne su za nastanak PCD-a kod približno 30% pacijenata (59). Grupisanje genetičkih varijanti u specifičnim genskim regionima, kao što je to u slučaju sa drugim genetičkim oboljenjima, je veoma retko. Iz tog razloga, jako je teško odrediti koje genetičke varijante su stvarno uzročnici bolesti, a koje predstavljaju retke polimorfizme (52).

Pored autozomno recesivnog nasleđivanja, genetičke varijante u genima *OFD1* i *RPGR*, koji se nalaze na hromozomu X, prouzrokuju PCD udruženu sa drugim poremećajima. *Retinitis Pigmentosus* (slepilo zbog retinalne cilijarne disfunkcije) kao i orofacioidigitalni sindrom (mentalna retardacija, kraniofacijalne abnormalnosti, abnormalnosti prstiju, makrocefalija i cistični bubrezi) su oboljenja povezana sa hromozomom X koja obuhvataju cilijarne gene, *RPGR* i *OFD1*, redom (5, 60). Kod pacijenata sa patogenim genetičkim varijantama u ovim genima neophodna je detaljna analiza kliničke prezentacije bolesti jer se radi o udruženim oboljenjima nastalim kao posledica defekata u cilijarnim genima, kako bi se primenila što adekvatnija terapija.

Najnovija istraživanja Adama Shapiro-a i saradnika, pokazala su da autozomno dominante varijante u genu *FOXJ1* prouzrokuju PCD koji je udružen sa drugim genetičkim oboljenjima. Pojedinačne patogene genetičke varijante u genu *FOXJ1* nastaju *de novo* i asocirane su sa hidrocefalusom i hroničnim oto-sino-pulmonarnim oboljenjima, pa je detaljna klinička i genetička analiza ovih pacijenata neophodna zbog moguće asociranosti ovih oboljenja sa PCD-om (7).

Genetičko testiranje pacijenata suspektnih na PCD preporučuje se kao deo panela dijagnostičkih PCD testova. Trenutno je poznato 45 gena uzročnika PCD-a (OMIM #244400) (Tabela 1.), a broj gena uzročnika i gena kandidata za nastanak ovog poremećaja rapidno raste sa upotrebom tehnika sekvenciranja nove generacije (TES, WES) obzirom na kompleksnost cilijarne aksoneme (4, 59).

Nakon genomskog profilisanja suspektnih PCD pacijenata količina detektovanih varijanti nekada prelazi 10.000 po jednom pacijentu pa je neophodno izvršiti prioritizaciju gena od interesa za PCD. U ove gene ubrajaju se svi poznati geni kandidati i geni uzročnici za PCD, geni koji pripadaju istoj familiji gena kojoj pripadaju geni uzročnici i geni čiji proteinski produkti interaguju sa proteinima neophodnim za pravilnu strukturu i funkciju cilija (59). Nakon formiranja jedinstvene liste gena za PCD, broj detektovanih varijanti unutar ovih gena iznosi i preko 100. Stoga se vrši selekcija genetičkih varijanti na sledeći način:

Prema posledicama varijanti na protein: vrše aminokiselinsku zamenu u polipeptidnom lancu, menjaju okvir čitanja aminokiselinske sekvence, uvode prevremeni stop kodon, dovode do ukidanja stop kodona, insercije i delecije koje menjaju okvir čitanja, insercije i delecije koje ne menjaju okvir čitanja, varijante koje utiču na mesto iskrajanja;

Prema učestalosti varijanti: varijante koje imaju učestalost < 5% (prema podacima iz baza podataka: 1000 Genoma i ExaC;

Prema patogenosti: patogene, potencijalno patogene i varijante nepoznatog značaja (eng. *Variant of Uncertain Significance*, VUS).

Ukoliko se detektuju potencijalno patogene genetičke varijante u uzorcima pacijenata suspektnih na PCD, pristupa se njihovoj validaciji, odnosno utvrđivanju njihove patogenosti upotrebom *in silico* i/ili eksperimentalnih metoda.

Za identifikaciju mutacionog profila pacijenata kod kojih nisu detektovane varijante u genima relevantnim za PCD, a klinička prezentacija bolesti ukazuje na ovo oboljenje, pristupa se detaljnoj pretrazi literature i listi gena (Tabela 1.) dodaju se geni odgovorni za pojedinačne simptome bolesti. Ova proširena lista gena omogućava diferencijalnu dijagnozu pacijenata koji boluju od drugih plućnih pedijatrijskih bolesti, a sa PCD-om dele zajedničku kliničku sliku (61). Za sledeće simptome bolesti: bronhiektazije bez CF, hroničan kašalj, prekomerna produkcija mukusa, respiratorni distres kod novorođenčadi i metabolizam surfaktanta kod plućnih oboljenja, analiziraju se sledeći geni: *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*, *SLC26A9*.

Zatim se analiziraju geni asocirani sa senzornim ciliopatijama: *BBS1*, *BBS2*, *BBS3*, *BBS4*, *BBS5*, *BBS6*, *BBS7*, *BBS8*, *BBS9*, *BBIP10*, *KIF3A*, *KIF3B*, *KAP*, *IFTA*, *IFTB*, *IFT43*, *IFT80*, *IFT122* i *TTC21B*.

U populaciji Srbije, proširena lista gena omogućila je uspostavljanje dijagnoze kod još 30% analiziranih pacijenata (61).

Gen	Lokus	Način nasleđivanja	Lokalizacija/funkcija proteina	Ultrastrukturalne promene
<i>DNAH5</i>	Hromozom 5	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
<i>DNAI1</i>	Hromozom 9	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
<i>DNAI2</i>	Hromozom 17	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
<i>DNAL1</i>	Hromozom 14	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
<i>NME8</i>	Hromozom 7	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
<i>DNAH8</i>	Hromozom 6	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
<i>DNAH11</i>	Hromozom 7	AR	ODA	Normalna struktura
<i>TTC25</i>	Hromozom 17	AR	Kompleks za spajanje ODA	ODA je skraćena ili je nema
<i>CCDC114</i>	Hromozom 19	AR	Kompleks za spajanje ODA	ODA je skraćena ili je nema
<i>ARMC4</i>	Hromozom 10	AR	Kompleks za spajanje ODA	ODA je skraćena ili je nema
<i>CCDC151</i>	Hromozom 19	AR	Kompleks za spajanje ODA	ODA je skraćena ili je nema
<i>CCDC103</i>	Hromozom 17	AR	Protein za asemliranje dineinskih ručica	ODA nedostaje
<i>DNAH1</i>	Hromozom 3	AR	IDA	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
<i>LRR6</i>	Hromozom 8	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
<i>DNAAF1</i>	Hromozom 16	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
<i>DNAAF2</i>	Hromozom 14	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
<i>DNAAF3</i>	Hromozom 19	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
<i>DNAAF4</i>	Hromozom 15	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
<i>DNAAF5</i>	Hromozom 7	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
<i>SPAG1</i>	Hromozom 8	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
<i>ZMYND10</i>	Hromozom 3	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
<i>CFAP298</i>	Hromozom 21	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
<i>CFAP300</i>	Hromozom 11	AR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
<i>PIH1D3/DNAAF6</i>	Hromozom X	XLR	Citoplazma	ODA+IDA su skraćene ili ih nema

HYDIN	Hromozom 16	AR	Centralni par	Normalna struktura
STK36	Hromozom 2	AR	Centralni par	Normalna/Narušena struktura centralnog para
RSPH4A	Hromozom 6	AR	Radijalne strukture	Normalna/Narušena struktura centralnog para
RSPH9	Hromozom 6	AR	Radijalne strukture	Normalna/Narušena struktura centralnog para
RSPH1	Hromozom 21	AR	Radijalne strukture	Normalna/Narušena struktura centralnog para
RSPH3	Hromozom 6	AR	Radijalne strukture	Normalna/Narušena struktura centralnog para
DNAJB13	Hromozom 11	AR	Radijalne strukture	Normalna/Narušena struktura centralnog para
CCDC65	Hromozom 12	AR	Proteini neksina	Normalna struktura
DRC1	Hromozom 2	AR	Proteini neksina	Normalna struktura
GAS8	Hromozom 16	AR	Proteini neksina	Normalna struktura
CCDC39	Hromozom 3	AR	Neksin-dinein regulatorni kompleks	IDA nedostaje i narušena mikrotubularna organizacija
CCDC40	Hromozom 17	AR	Neksin-dinein regulatorni kompleks	IDA nedostaje i narušena mikrotubularna organizacija
CCNO	Hromozom 5	AR	Amplifikacija i sazrevanje cilija	Smanjenje cilija
MCIDAS	Hromozom 5	AR	Jedarni transkripcijski regulator	Smanjen broj cilija
RPGR	Hromozom X	XLR	Tranzitna zona	Normalna struktura
OFD1	Hromozom X	XLR	Centriola	Normalna struktura
DNAH9	Hromozom 17	AR	ODA	ODA je skraćena ili je nema
GAS2L2	Hromozom 17	AR	Citoplazma	Normalna struktura
LRRC56	Hromozom 11	AR	Interflagelarni transport	Normalna struktura
SPAG16	Hromozom 2	AR	Uloga u ciliogenezi	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
SPAG17	Hromozom 1	AR	Pravilna funkcija aksoneme	ODA+IDA su skraćene ili ih nema
TTC12	Hromozom 11	AR	Protein za asepliranje dineinskih ručica	ODA nedostaje
FOXJ1	Hromozom 17	AD	Aksonemalna biogeneza	
NEK10	Hromozom 3	AR	Mukocilijarni transport	
CFAP221	Hromozom 2	AR	Regulacija cilijarne i flagelarne pokretljivosti	

Tabela 1. Spisak gena uzročnika i gena kandidata asociiranih sa nastankom PCD-a

AR – autozomno recesivno, AD – autozomno dominantno, ODA – spoljašnje dineinske ručice, IDA – unutrašnje dineinske ručice

5. MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA GENETIČKIH VARIJANTI

5.1. *In silico* strukturalna i/ili funkcionalna analiza

Ukoliko se DNK i iRNK sekvenca gena od interesa modifikuje zbog prisustva genetičke varijante, biološka funkcija transliranog proteina se menja, jer biološka funkcija proteina zavisi od njegove native trodimenzionalne strukture (3D). Tehnike određivanja 3D strukture, kao što su XRD (eng. *X-ray diffraction*, XRD) ili NMR (eng. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) (62), su veoma skupe i stoga ograničene. Takođe, postoje tehničke prepreke, jer se svaki protein ponaša drugačije ili ne može da zadrži svoje native stanje nakon procesa kristalizacije (63). Stoga je dostupnost različitih *online* i *offline* alata za 3D modelovanje proteina presudna za predviđanje strukture proteina. Korišćenje alata kao što su Raptor X (64), Phyre2 (65) i Chimera (66) omogućavaju prediktivne trodimenzionalne modele odabranih proteina i pružaju informacije o tome kako genetička varijanta utiče na savijanje proteina u prostoru.

In silico predikcija patogenosti uključuje predviđanje uticaja otkrivenih varijanti na transkripcionom, translacionom i posttranslacionom nivou. Ukoliko detektovana varijanta promeni otvoreni okvir čitanja (eng. *Open Reading Frame*, ORF) sekvence, za otkrivanje svih mogućih ORF-ova softver Translate Tool je jedan od načina detekcije (67). Dalje, interakcije protein-protein (PPI), kao i posttranslacione modifikacije (PTM), igraju centralnu ulogu u regulaciji velikog broja ćelijskih procesa signalizacije, a promena interakcija i PTM mogu dovesti do različitih oboljenja kod ljudi (68). Alati za predviđanje PPI, kao što su STRING (69) i COACH (70), pružaju neophodne informacije o kvaternarnoj strukturi proteina od interesa. Da bi se utvrdilo da li genetička varijanta menja posttranslacione modifikacije (PTM) proteina, program PhosphoSitePlus je *in silico* metoda od izbora (71). Ako je region proteina na koji utiče detektovana genetička varijanta visoko evoluciono očuvan, postoji indikacija da je region važan za održavanje strukture i/ili funkcije proteina. Korišćenje softvera Aminode (72) i poravnanje sekvence proteina među različitim vrstama pružaju dragocene informacije.

5.2. Eksperimentalna funkcionalna analiza detektovanih genetičkih varijanti

Da bi se utvrdio potencijalni efekat varijante koja je označena kao patogena ili varijanta sa nepoznatim značajem i kako bi se gen kandidat uvrstio u listu gena uzročnika za PCD, pored *in silico* analize, eksperimentalna, empirijska analiza, omogućava definitivnu potvrdu uloge detektovane genetičke varijante i gena kandidata na uočen fenotip kod PCD pacijenata.

Genetička varijanta svoje efekte ispoljava na transkripcionom i translacionom nivou što kao rezultat ima gubitak sinteze proteina od interesa, apsolutni i/ili delimični gubitak biološke funkcije koju ostvaruje u interakciji sa drugim proteinima (kvaternarna struktura proteina) ili sintezu okrnjenog proteina.

Mnogobrojne metode su opisane u literaturi za determinaciju patogenosti genetičkih varijanti gena uzročnika za PCD (59, 73). Za analizu uticaja detektovane genetičke varijante na transkripcionom nivou koristi se RT-qPCR metoda (59). Za analizu uticaja efekta varijante na proteinskom nivou koriste se: Western Blot metoda (59) i sekvenciranje aminokiselinske sekvence proteina od interesa (74). Dve najčešće korišćene metode za sekvenciranje proteina su masena spektrometrija i Edmanova degradacija korišćenjem proteinskog sekvencera. Metode masene spektrometrije su sada najčešće korišćene za sekvenciranje i identifikaciju proteina, ali Edmanova degradacija ostaje zlatni standard za karakterizaciju N-terminusa proteina (74).

Tehnologija CRISPR/Cas9 i editovanje gena od interesa na ćelijskom nivou (*in vitro*) i u živom model sistemu (*in vivo/ex vivo*) (21, 75) se koristi kako bi se uspostavila korelacija između genetičkih varijanti i uočenih fenotipova kod PCD pacijenata (76).

6. MODEL SISTEMI I NAČINI LEČENJA PCD-a

6.1. Miš kao model sistem za izučavanje PCD-a i multicelijarnih ćelija

Brojni model sistemi, u rasponu od jednoćelijskih eukariota do sisara, pružili su informacije o genetici, biohemiji i strukturi motornih cilija koje se nalaze u osnovi patogeneze PCD-a. Međutim, zbog izvanrednih resursa koji su na raspolaganju za genetičke manipulacije i razvojnu, patološku i fiziološku analizu fenotipa, miš je izbio u prvi plan razumevanja pokretnih cilija sisara i postao najadekvatniji model sistem za analizu PCD-a (21), o čemu svedoči i veliki broj relevantnih linija miševa.

Tokom poslednje dve decenije, modeli miša pružili su ogromnu količinu informacija o genima, genetičkim mehanizmima i obrascima nasleđivanja koji se nalaze u osnovi PCD-a kao i funkcije motornih cilija. Kao i kod ljudskih PCD pacijenata, modeli miša pokazuju genetičku i fenotipsku heterogenost, a većina pokazuje kombinaciju različitih fenotipova povezanih sa PCD-om, uključujući nakupljanje sluzi u sinusnoj šupljini, otitis media, neplodnost mužjaka i ženki, hidrocefalus i heterotaksiju ili urođenu srčanu manu. Različite genetičke modifikacije miševa omogućile su unapređenje ovog polja istraživanja, što je omogućilo detaljnu histopatološku analizu fenotipa i sveobuhvatnu procenu strukture i funkcije cilija u više tipova ćelija. Ovi modeli su takođe verifikovali gene uzročnike PCD-a identifikovane kod

ljudskih pacijenata, identifikovali nove gene potrebne za funkciju pokretnih cilija i otkrili efekte velikog broja alela na patogenezu bolesti, multiciliranu diferencijaciju ćelija i strukturu i funkciju cilija.

Pored spektra mišjih modela sa genetičkim varijantama koje rezultuju disfunkcijom cilija i PCD-om, stvoreno je nekoliko linija miša koji služe kao moćni alati za obeležavanje, identifikovanje ili manipulaciju cilijarnim ćelijama. Rekombinacija uslovnog alela u motornim cilijarnim ćelijama omogućena je Fokj1-Cre linijom miša i linijom Fokj1-CreERT2 indukovanom tamoksifenom (77, 78). Ovakve linije miševa omogućavaju GFP (eng. *Green Fluorescent Protein*, GFP) obeležavanje svih pokretnih cilijarnih ćelija (79). Pored omogućavanja proučavanja genetičkih *knockout*-a, ove linije miševa su vrlo efikasne prilikom analiziranja ćelijske loze koji prate diferencijaciju cilijarnih ćelija u disajnim putevima i razvoj nervnog sistema (80, 81). Pored toga, transgena linija CiliaGFP omogućava obeležavanje motornih i primarnih cilijarnih ćelija (82). Ovi novi genetički alati se mogu primeniti na modelima PCD-a za procenu patogeneze bolesti ili koristiti za biološku i biohemijsku analizu cilijarnih ćelija.

Primarna kultura poreklom iz miša kao model sistem

Primarna kultura cilijarnog epitela, posebno mTEC (eng. *Mouse Tracheal Epithelial Cells*, mTEC), u ALI sistemu, postala je osnovni sistem za analizu motornih cilija sisara (83).

Primarna kultura može biti poreklom od *wild-type* ili mutiranog miša, a genetičke manipulacije na ovim ćelijskim linijama vrše se lentivirusnom transdukcijom čime se omogućava generisanje *knockdown* primarne kulture sa prekomernom egzogenom ekspresijom, pomoću RNK sa strukturom ukosnice, shRNK (eng. *Short Hairpin RNA*, shRNA) ili kratkih interferirajućih siRNK (eng. *Small Interfering RNA*, siRNA) (84-86). Ovako generisane ćelijske linije poreklom iz miševa koriste se za analizu ćelijskih i biohemijski procesa, a ekspresija egzogenih proteina omogućava i studije interakcije protein-protein u mTEC ćelijskoj liniji (87). Utišavanje gena transkripcionog faktora *Gemc1* ili *Mcidas* u kultiviranim radijalnim glijalnim ćelijama sprečilo je diferencijaciju u kolumnarni cilijarni epitel i ekspresiju *Foxj1* (88), potvrđujući njihovu ulogu u pokretanju multicilirane diferencijacije ćelija.

Mišji modeli PCD-a kao i ćelijske linije generisane metodama genetičkog inženjerstva mogu poslužiti kao adekvatan model sistem za testiranje terapeutika za lečenje PCD-a i poboljšanje cilijarne funkcije.

7. TERAPIJA PCD-a

Terapijski protokoli kojima se leče PCD pacijenti nisu specifični za ovo oboljenje, već se terapijski pristupi ekstrapoliraju iz drugih plućnih oboljenja sa sličnom kliničkom prezentacijom bolesti. Najčešće se koristi terapija za CF, uprkos očiglednim razlikama u patofiziologiji ova dva poremećaja (89).

Osnovni postupci lečenja PCD-a uključuju čišćenje disajnih puteva, kontrolu i prevenciju infekcije i, ukoliko je moguće, sprečavanje izlaganju inflamatornim agensima, uključujući i pasivno udisanje duvanskog dima.

Različite tehnike kao što su ručna fizioterapija grudnog koša, posturalna drenaža, autogena drenaža, aktivno ciklično disanje i fizička aktivnost, omogućavaju klirens disajnih puteva (90).

Korišćenje inhalatora je uobičajena procedura za tretiranje PCD pacijenata koja pomaže vlaženju i razređivanju viskoznog sekreta disajnih puteva, čime se olakšava proces mukocilijarnog klirensa (91). Inhalacioni fiziološki rastvor koristi se u lečenju bronhiektazija za poboljšanje mukocilijarnog klirensa (92), međutim nedavna studija je pokazala da inhalacija fiziološkog rastvora PCD pacijentima nije poboljšala kvalitet života niti značajno uticala na spirometriju ili smanjenje upale disajnih puteva (93).

Tokom infekcija, DNK i aktin koji se oslobađaju akumulacijom neutrofila povećavaju viskoznost sputuma u disajnim putevima. Udisanjem rekombinantne humane DNaza I (rhDNase) poboljšavaju se rezultati spirometrije, pa se rhDNase vrlo često preporučuju u tretmanu CF (94). Neutrofilno zapaljenje disajnih puteva zabeleženo je i kod PCD pacijenata. Do sada je nekoliko PCD studija pokazalo značajno poboljšanje kliničkih parametara nakon tretmana inhalacionom DNazom (95, 96). Trenutno se rhDNase ne preporučuju rutinski u lečenju PCD-a, stoga su neophodne dodatne studije kako bi se potvrdila njegova efikasnost u smanjenju neutrofilnog zapaljenja kod PCD pacijenata.

Studije na pacijentima sa CF-om i bronhiektazijama bez CF, uključujući i neke pacijente sa PCD-om, pokazale su da su sistemski antibiotici efikasni u lečenju „pogoršanja“ stanja plućnih bolesti (97, 98). Simptomi respiratornog trakta koji uključuju promene u kašlju, stvaranje sputuma, promene u brzini disanja, ili su spiromerijski testovi loši (opada ekspiratorni volumen u 1s, eng. *expiratory volume in 1s*, FEV1), mogu se smatrati pouzdanim markerima pogoršanja stanja respiratornog trakta kod PCD pacijenata. Iako se blaga pogoršanja mogu lečiti oralnim antibiotikom i povećanim agresivnim klirensom disajnih puteva, teška pogoršanja mogu zahtevati intravenske antibiotike i hospitalizaciju. Izbor antibiotika treba izvršiti na osnovu najnovijih rezultata kulture sputuma i uzimati u obzir istoriju kolonizacije disajnih puteva svakog pojedinačnog pacijenta.

Hirurška intervencija (segmentektomija ili lobektomija) može se sa oprezom razmatrati u slučaju difuzne plućne bolesti i može se uzeti u obzir samo kada neproporcionalno opterećeni region pluća nije uspeo da se oporavi nakon

lečenja i postoji značajno pogoršanje pacijentovog zdravlja zbog teške hemoptize. Ako se razvije bolest pluća u završnoj fazi, transplantacija pluća može biti opcija kod PCD pacijenata (99, 100).

Otkrivanje i primena terapije za PCD koja je specifična za ovo oboljenje, odnosno specifična za uočenu genotip-fenotip korelaciju pojedinačnih pacijenata biće omogućena sa sve većim znanjem i razumevanjem ove korelacije kod PCD pacijenata. Veliko očekivanje potiče iz nedavne studije Michele Lai i saradnika koji je prvi primenio tehnologiju „editovanje gena“ za ovu bolest. U ovoj studiji, obnovljena je funkcija gena *DNAH11 ex vivo*, zamjenjujući patogenu genetičku varijantu nativnom, neizmenjenom sekvencom u oboleloj ćeliji. Na epitelnoj ćelijskoj liniji dizajniranoj da sadrži ciljno mesto za *DNAH11*, restrikcioni enzim je isekao preko 80% mutirane sekvence *DNAH11* i zamenio mutiranu sekvencu originalnom sekvencom u oko 50% ćelija. U cilijarnim ćelijama disajnih puteva pacijenata sa PCD-om, rekombinacija i normalizacija cilijarnog kretanja i obrazca dogodili su se u 33%, odnosno u 29% ćelija. Rezultat editovanja gena je povratak normalne funkcije cilija (101).

Ova studija pokazuje da editovanje gena može omogućiti ponovnu cilijarnu funkciju *ex vivo*, otvarajući nove perspektive za lečenje PCD-a.

8. ZAKLJUČAK

Iako je PCD genetički i klinički vrlo heterogeno oboljenje, pored kliničke prezenacije bolesti koja ukazuje na PCD, upotrebom dijagnostičkih testova i genomskog profilisanja suspektih pacijenata, može se dostići visoka stopa uspostavljanja precizne dijagnoze bolesti na vreme (~70%). Da bi stopa uspostavljanja dijagnoze dostigla svoj maksimum, neophodne su dodatne funkcionalne analize na ćelijskim linijama i model sistemima za PCD.

Napredak u genetičkoj manipulaciji i fenotipskoj analizi PCD-a na modelu miša, zajedno sa primenom inovativnih molekularno bioloških tehnika, doveli su do značajnog napretka u razumevanju pokretnih cilija sisara i patogeneze PCD-a. Širok spektar genetičkih mišjih modela potvrdio je značajnost mnogih cilijarnih gena i otkrio nove uloge za brojne gene, čime je klinički fenotip PCD pacijenata razjašnjen. Miš, kao model sistem takođe služi za identifikovanje, razvoj i ispitivanje efikasnosti potencijalnih terapeutika za PCD.

ZAHVALNICA.

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-9/2021-14/200042.

LITERATURA

1. Sader E, Dahan E, Al A. [Triad of Kartagener (situs inversus, bronchiectasis and sinusitis); lobectomy]. *Le Journal medical libanais The Lebanese medical journal*. 1951;4(3):170-7.
2. Afzelius BA. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science (New York, NY)*. 1976;193(4250):317-9.
3. Knowles MR, Daniels LA, Davis SD, Zariwala MA, Leigh MW. Primary ciliary dyskinesia. Recent advances in diagnostics, genetics, and characterization of clinical disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;188(8):913-22.
4. Boaretto F, Snijders D, Salvoro C, Spalletta A, Mostacciolo ML, Collura M, et al. Diagnosis of Primary Ciliary Dyskinesia by a Targeted Next-Generation Sequencing Panel: Molecular and Clinical Findings in Italian Patients. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2016;18(6):912-22.
5. Moore A, Escudier E, Roger G, Tamalet A, Pelosse B, Marlin S, et al. RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. *Journal of medical genetics*. 2006;43(4):326-33.
6. Paff T, Loges NT, Aprea I, Wu K, Bakey Z, Haarman EG, et al. Mutations in PIH1D3 Cause X-Linked Primary Ciliary Dyskinesia with Outer and Inner Dynein Arm Defects. *American journal of human genetics*. 2017;100(1):160-8.
7. Shapiro AJ, Kaspary K, Daniels MLA, Stonebraker JR, Nguyen VH, Joyal L, et al. Autosomal dominant variants in FOXJ1 causing primary ciliary dyskinesia in two patients with obstructive hydrocephalus. *Molecular genetics & genomic medicine*. 2021:e1726.
8. Kuehni CE, Frischer T, Strippoli MP, Maurer E, Bush A, Nielsen KG, et al. Factors influencing age at diagnosis of primary ciliary dyskinesia in European children. *The European respiratory journal*. 2010;36(6):1248-58.
9. Lucas JS, et al., . Orphan Lung Diseases, in Primary ciliary dyskinesia. 2011:201-17.
10. O'Callaghan C, Chetcuti P, Moya E. High prevalence of primary ciliary dyskinesia in a British Asian population. *Archives of disease in childhood*. 2010;95(1):51-2.
11. Sommer JU, Schäfer K, Omran H, Olbrich H, Wallmeier J, Blum A, et al. ENT manifestations in patients with primary ciliary dyskinesia: prevalence and significance of otorhinolaryngologic co-morbidities. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*. 2011;268(3):383-8.
12. Noone PG, Leigh MW, Sannuti A, Minnix SL, Carson JL, Hazucha M, et al. Primary ciliary dyskinesia: diagnostic and phenotypic features. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004;169(4):459-67.
13. Halbert SA, Patton DL, Zarutskie PW, Soules MR. Function and structure of cilia in the fallopian tube of an infertile woman with Kartagener's syndrome. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1997;12(1):55-8.

14. Knowles MR, Leigh MW, Carson JL, Davis SD, Dell SD, Ferkol TW, et al. Mutations of DNAH11 in patients with primary ciliary dyskinesia with normal ciliary ultrastructure. *Thorax*. 2012;67(5):433-41.
15. Morillas HN, Zariwala M, Knowles MR. Genetic causes of bronchiectasis: primary ciliary dyskinesia. *Respiration; international review of thoracic diseases*. 2007;74(3):252-63.
16. Olin JT, Burns K, Carson JL, Metjian H, Atkinson JJ, Davis SD, et al. Diagnostic yield of nasal scrape biopsies in primary ciliary dyskinesia: a multicenter experience. *Pediatric pulmonology*. 2011;46(5):483-8.
17. O'Callaghan C, Rutman A, Williams CM, Hirst RA. Inner dynein arm defects causing primary ciliary dyskinesia: repeat testing required. *The European respiratory journal*. 2011;38(3):603-7.
18. Lucas JS, Carroll M. Primary ciliary dyskinesia and cystic fibrosis: different diseases require different treatment. *Chest*. 2014;145(4):674-6.
19. Cohen-Cymberek M, Simanovsky N, Hiller N, Hillel AG, Shoseyov D, Kerem E. Differences in disease expression between primary ciliary dyskinesia and cystic fibrosis with and without pancreatic insufficiency. *Chest*. 2014;145(4):738-44.
20. Paff T, van der Schee MP, Daniels JM, Pals G, Postmus PE, Sterk PJ, et al. Exhaled molecular profiles in the assessment of cystic fibrosis and primary ciliary dyskinesia. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2013;12(5):454-60.
21. Lee L, Ostrowski LE. Motile cilia genetics and cell biology: big results from little mice. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2021;78(3):769-97.
22. Satir P, Christensen ST. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual review of physiology*. 2007;69:377-400.
23. Bustamante-Marin XM, Ostrowski LE. Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2017;9(4).
24. Ishikawa T. Axoneme Structure from Motile Cilia. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2017;9(1).
25. Poprzeczko M, Bicka M, Farahat H, Bazan R, Osinka A, Fabczak H, et al. Rare Human Diseases: Model Organisms in Deciphering the Molecular Basis of Primary Ciliary Dyskinesia. *Cells*. 2019;8(12).
26. Loreng TD, Smith EF. The Central Apparatus of Cilia and Eukaryotic Flagella. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2017;9(2).
27. Lee L. Riding the wave of ependymal cilia: genetic susceptibility to hydrocephalus in primary ciliary dyskinesia. *Journal of neuroscience research*. 2013;91(9):1117-32.
28. Boutin C, Kodjabachian L. Biology of multiciliated cells. *Current opinion in genetics & development*. 2019;56:1-7.
29. Brown JM, Witman GB. Cilia and Diseases. *Bioscience*. 2014;64(12):1126-37.
30. Mullowney T, Manson D, Kim R, Stephens D, Shah V, Dell S. Primary ciliary dyskinesia and neonatal respiratory distress. *Pediatrics*. 2014;134(6):1160-6.
31. Hermansen CL, Lorah KN. Respiratory distress in the newborn. *American family physician*. 2007;76(7):987-94.
32. Bylander A, Lind K, Goksör M, Billig H, Larsson DG. The classical progesterone receptor mediates the rapid reduction of fallopian tube ciliary beat frequency by progesterone. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2013;11:33.
33. Nardella G CM, Verrotti di Pianella V, Lanzano A, Soldano L, Gorgogliano S, Calabrese C, Di Gianni AM, Lozupone S, Maffei G, Popolo G, Villani G, Pettoello-Mantovani M, Magaldi R. Situs inversus viscerum and renal agenesis in a newborn. 2017.
34. de longh RU, Rutland J. Ciliary defects in healthy subjects, bronchiectasis, and primary ciliary dyskinesia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;151(5):1559-67.
35. Escudier E, Couprie M, Duriez B, Roudot-Thoraval F, Millepied MC, Prulière-Escabasse V, et al. Computer-assisted analysis helps detect inner dynein arm abnormalities. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;166(9):1257-62.
36. Antony D, Becker-Heck A, Zariwala MA, Schmidts M, Onoufriadi A, Forouhan M, et al. Mutations in CCDC39 and CCDC40 are the major cause of primary ciliary dyskinesia with axonemal disorganization and absent inner dynein arms. *Human mutation*. 2013;34(3):462-72.
37. Castleman VH, Romio L, Chodhari R, Hirst RA, de Castro SC, Parker KA, et al. Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities. *American journal of human genetics*. 2009;84(2):197-209.
38. Jeanson L, Copin B, Papon JF, Dastot-Le Moal F, Duquesnoy P, Montantin G, et al. RSPH3 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Central-Complex Defects and a Near Absence of Radial Spokes. *American journal of human genetics*. 2015;97(1):153-62.
39. Horani A, Brody SL, Ferkol TW, Shoseyov D, Wasserman MG, Ta-shma A, et al. CCDC65 mutation causes primary ciliary dyskinesia with normal ultrastructure and hyperkinetic cilia. *PLoS one*. 2013;8(8):e72299.
40. Knowles MR, Ostrowski LE, Leigh MW, Sears PR, Davis SD, Wolf WE, et al. Mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with a unique clinical and ciliary phenotype. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;189(6):707-17.
41. Wirschell M, Olbrich H, Werner C, Tritschler D, Bower R, Sale WS, et al. The nexin-dynein regulatory complex subunit DRC1 is essential for motile cilia function in algae and humans. *Nature genetics*. 2013;45(3):262-8.
42. Wallmeier J, Al-Mutairi DA, Chen CT, Loges NT, Pennekamp P, Menchen T, et al. Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nature genetics*. 2014;46(6):646-51.
43. Hirst RA, Rutman A, Williams G, O'Callaghan C. Ciliated air-liquid cultures as an aid to diagnostic testing of primary ciliary dyskinesia. *Chest*. 2010;138(6):1441-7.
44. Collins SA, Gove K, Walker W, Lucas JS. Nasal nitric oxide screening for primary ciliary dyskinesia: systematic review and meta-analysis. *The European respiratory journal*. 2014;44(6):1589-99.
45. Leigh MW, Hazucha MJ, Chawla KK, Baker BR, Shapiro AJ, Brown DE, et al. Standardizing nasal nitric oxide measurement as a test for primary ciliary dyskinesia. *Annals of the American Thoracic Society*. 2013;10(6):574-81.
46. Pifferi M, Caramella D, Cangiotti AM, Ragazzo V, Macchia P, Boner AL. Nasal nitric oxide in atypical primary ciliary dyskinesia. *Chest*. 2007;131(3):870-3.
47. Balfour-Lynn IM, Laverty A, Dinwiddie R. Reduced upper airway nitric oxide in cystic fibrosis. *Archives of disease in childhood*. 1996;75(4):319-22.
48. Palm J, Lidman C, Graf P, Alving K, Lundberg J. Nasal nitric oxide is reduced in patients with HIV. *Acta oto-laryngologica*. 2000;120(3):420-3.
49. Nakano H, Ide H, Imada M, Osanai S, Takahashi T, Kikuchi K, et al. Reduced nasal nitric oxide in diffuse panbronchiolitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000;162(6):2218-20.
50. Arnal JF, Flores P, Rami J, Murris-Espin M, Bremont F, Pasto IAM, et al. Nasal nitric oxide concentration in paranasal sinus inflammatory diseases. *The European respiratory journal*. 1999;13(2):307-12.
51. Mateos-Corral D, Coombs R, Grasemann H, Ratjen F, Dell SD. Diagnostic value of nasal nitric oxide measured with non-velum closure techniques for primary ciliary dyskinesia. *The Journal of pediatrics*. 2011;159(3):420-4.
52. Shapiro AJ, Zariwala MA, Ferkol T, Davis SD, Sagel SD, Dell SD, et al. Diagnosis, monitoring, and treatment of primary ciliary dyskinesia: PCD foundation consensus recommendations based on state of the art review. *Pediatric pulmonology*. 2016;51(2):115-32.

53. Stannard WA, Chilvers MA, Rutman AR, Williams CD, O'Callaghan C. Diagnostic testing of patients suspected of primary ciliary dyskinesia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2010;181(4):307-14.
54. Chilvers MA, McKean M, Rutman A, Myint BS, Silverman M, O'Callaghan C. The effects of coronavirus on human nasal ciliated respiratory epithelium. *The European respiratory journal*. 2001;18(6):965-70.
55. Jackson CL, Goggin PM, Lucas JS. Ciliary beat pattern analysis below 37°C may increase risk of primary ciliary dyskinesia misdiagnosis. *Chest*. 2012;142(2):543-4.
56. Omran H, Loges NT. Immunofluorescence staining of ciliated respiratory epithelial cells. *Methods in cell biology*. 2009;91:123-33.
57. Olbrich H, Horváth J, Fekete A, Loges NT, Storm van's Gravesande K, Blum A, et al. Axonemal localization of the dynein component DNAH5 is not altered in secondary ciliary dyskinesia. *Pediatric research*. 2006;59(3):418-22.
58. Knowles MR, Zariwala M, Leigh M. Primary Ciliary Dyskinesia. *Clinics in chest medicine*. 2016;37(3):449-61.
59. Andjelkovic M, Minic P, Vreca M, Stojiljkovic M, Skacic A, Sovtic A, et al. Genomic profiling supports the diagnosis of primary ciliary dyskinesia and reveals novel candidate genes and genetic variants. *PloS one*. 2018;13(10):e0205422.
60. Budny B, Chen W, Omran H, Fliegau M, Tzschach A, Wisniewska M, et al. A novel X-linked recessive mental retardation syndrome comprising macrocephaly and ciliary dysfunction is allelic to oral-facial-digital type I syndrome. *Human genetics*. 2006;120(2):171-8.
61. Andelković M, Spasovski V, Vreca M, Sovtić A, Rodić M, Komazec J, et al. The importance of genomic profiling for differential diagnosis of pediatric lung disease patients with suspected ciliopathies. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*. 2019;147(3-4):160-6.
62. Schmidt A, Lamzin VS. Veni, vidi, vici - atomic resolution unravelling the mysteries of protein function. *Current opinion in structural biology*. 2002;12(6):698-703.
63. Aloy P, Russell RB. Structural systems biology: modelling protein interactions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(3):188-97.
64. Ma J, Wang S, Zhao F, Xu J. Protein threading using context-specific alignment potential. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2013;29(13):i257-65.
65. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*. 2015;10(6):845-58.
66. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*. 2004;25(13):1605-12.
67. Duvaud S, Gabella C, Lisacek F, Stockinger H, Ioannidis V, Durinx C. Expaty, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. *Nucleic acids research*. 2021;49(W1):W216-w27.
68. Rao VS, Srinivas K, Sujini GN, Kumar GN. Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *International journal of proteomics*. 2014;2014:147648.
69. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*. 2019;47(D1):D607-d13.
70. Yang J, Roy A, Zhang Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2013;29(20):2588-95.
71. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic acids research*. 2015;43(Database issue):D512-20.
72. Chang KT, Guo J, di Ronza A, Sardiello M. Aminode: Identification of Evolutionary Constraints in the Human Proteome. *Scientific reports*. 2018;8(1):1357.
73. Loges NT, Olbrich H, Becker-Heck A, Häffner K, Heer A, Reinhard C, et al. Deletions and point mutations of LRRC50 cause primary ciliary dyskinesia due to dynein arm defects. *The American Journal of Human Genetics*. 2009;85(6):883-9.
74. Behal RH, Miller MS, Qin H, Lucker BF, Jones A, Cole DG. Subunit interactions and organization of the *Chlamydomonas reinhardtii* intraflagellar transport complex A proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(15):11689-703.
75. Šedová L, Buková I, Bažantová P, Petrežskýová S, Prochazka J, Školníková E, et al. Semi-Lethal Primary Ciliary Dyskinesia in Rats Lacking the Nme7 Gene. *International journal of molecular sciences*. 2021;22(8):3810.
76. Yoke H, Ueno H, Narita A, Sakai T, Horiuchi K, Shingyoji C, et al. Rsp4a is essential for the triplet radial spoke head assembly of the mouse motile cilia. *PLoS genetics*. 2020;16(3):e1008664.
77. Zhang Y, Huang G, Shornick LP, Roswit WT, Shipley JM, Brody SL, et al. A transgenic FOXJ1-Cre system for gene inactivation in ciliated epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2007;36(5):515-9.
78. Rawlins EL, Ostrowski LE, Randell SH, Hogan BL. Lung development and repair: contribution of the ciliated lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(2):410-7.
79. Ostrowski LE, Hutchins JR, Zakei K, O'Neal WK. Targeting expression of a transgene to the airway surface epithelium using a ciliated cell-specific promoter. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2003;8(4):637-45.
80. Li X, Floriddia EM, Toskas K, Chalfouh C, Honore A, Aumont A, et al. FoxJ1 regulates spinal cord development and is required for the maintenance of spinal cord stem cell potential. *Experimental cell research*. 2018;368(1):84-100.
81. Rawlins EL, Hogan BL. Ciliated epithelial cell lifespan in the mouse trachea and lung. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295(1):L231-4.
82. Schmitz F, Burtscher I, Stauber M, Gossler A, Lickert H. A novel Cre-inducible knock-in ARL13B-tRFP fusion cilium reporter. *Genesis (New York, NY : 2000)*. 2017;55(11).
83. You Y, Richer EJ, Huang T, Brody SL. Growth and differentiation of mouse tracheal epithelial cells: selection of a proliferative population. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2002;283(6):L1315-21.
84. Arbi M, Pefani DE, Kyrousi C, Lalioti ME, Kalogeropoulou A, Papanastasiou AD, et al. GemC1 controls multiciliogenesis in the airway epithelium. *EMBO reports*. 2016;17(3):400-13.
85. Marshall CB, Mays DJ, Beeler JS, Rosenbluth JM, Boyd KL, Santos Guasch GL, et al. p73 Is Required for Multiciliogenesis and Regulates the Foxj1-Associated Gene Network. *Cell reports*. 2016;14(10):2289-300.
86. Stubbs JL, Vladar EK, Axelrod JD, Kintner C. Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nature cell biology*. 2012;14(2):140-7.
87. Cho KJ, Noh SH, Han SM, Choi WI, Kim HY, Yu S, et al. ZMYND10 stabilizes intermediate chain proteins in the cytoplasmic pre-assembly of dynein arms. *PLoS genetics*. 2018;14(3):e1007316.
88. Kyrousi C, Arbi M, Pilz GA, Pefani DE, Lalioti ME, Ninkovic J, et al. Mcidas and GemC1 are key regulators for the generation of multiciliated ependymal cells in the adult neurogenic niche. *Development (Cambridge, England)*. 2015;142(21):3661-74.

89. Mirra V, Werner C, Santamaria F. Primary Ciliary Dyskinesia: An Update on Clinical Aspects, Genetics, Diagnosis, and Future Treatment Strategies. *Frontiers in pediatrics*. 2017;5:135.
90. Bradley J, Moran F, Greenstone M. Physical training for bronchiectasis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2002;2002(3):Cd002166.
91. Boe J, Dennis JH, O'Driscoll BR, Bauer TT, Carone M, Dautzenberg B, et al. European Respiratory Society Guidelines on the use of nebulizers. *The European respiratory journal*. 2001;18(1):228-42.
92. Hart A, Sugumar K, Milan SJ, Fowler SJ, Crossingham I. Inhaled hyperosmolar agents for bronchiectasis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014(5):Cd002996.
93. Paff T, Daniels JM, Weersink EJ, Lutter R, Vonk Noordegraaf A, Haarman EG. A randomised controlled trial on the effect of inhaled hypertonic saline on quality of life in primary ciliary dyskinesia. *The European respiratory journal*. 2017;49(2).
94. Konstan MW, Ratjen F. Effect of dornase alfa on inflammation and lung function: potential role in the early treatment of cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2012;11(2):78-83.
95. El-Abiad NM, Clifton S, Nasr SZ. Long-term use of nebulized human recombinant DNase1 in two siblings with primary ciliary dyskinesia. *Respiratory medicine*. 2007;101(10):2224-6.
96. Desai M, Weller PH, Spencer DA. Clinical benefit from nebulized human recombinant DNase in Kartagener's syndrome. *Pediatric pulmonology*. 1995;20(5):307-8.
97. Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ, Jr., Willey-Courand DB, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2007;176(10):957-69.
98. King PT, Holmes PW. Use of antibiotics in bronchiectasis. *Reviews on recent clinical trials*. 2012;7(1):24-30.
99. Deuse T, Reitz BA. Heart-lung transplantation in situs inversus totalis. *The Annals of thoracic surgery*. 2009;88(3):1002-3.
100. Macchiarini P, Chapelier A, Vouhé P, Cerrina J, Ladurie FL, Parquin F, et al. Double lung transplantation in situs inversus with Kartagener's syndrome. Paris-Sud University Lung Transplant Group. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1994;108(1):86-91.
101. Lai M, Pifferi M, Bush A, Piras M, Michelucci A, Di Cicco M, et al. Gene editing of DNAH11 restores normal cilia motility in primary ciliary dyskinesia. *Journal of medical genetics*. 2016;53(4):242-9.
102. Fulcher AS, Turner MA. Abdominal manifestations of situs anomalies in adults. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc.* 2002;22(6):1439-56.

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