

HRVATSKA AKADEMIJA ZNANOSTI I UMJETNOSTI
Razred za prirodne znanosti
Odbor za primjenjenu genomiku

ZNANSTVENI SASTANAK

**PRIMIJEJENA GENOMIKA –
PRECIZNA MEDICINA**
23.listopada 2018.

SAŽECI

Steroidni receptori u raku dojke

Stjepan Gamulin

Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb

Otkrićem estrogenskih receptora (ER) u raku dojke sedamdesetih godina prošlog stoljeća objašnjen je mehanizam davno ranije poznate hormonske ovisnosti tog tumora, a ujedno je dobiven i molekularni biljeg koji pretkazuje uspješnost hormonske terapije (HT). Općenito uspjeh HT postiže se u oko 30% bolesnica s rakom dojke, odnosno 60% onih s ER+ tumorima te oko 6% u onih s ER-tumorima. Određivanje progesteronskih receptora (PgR), kao pokazatelja funkcionalnosti ER sustava, povećalo je prediktivno značenje ER; uspjeh HT u ER+PgR+ je oko 75% .

Imunohistokemijske metode određivanja steroidnih receptora devedesetih godina prošlog stoljeća zamijenile su metode s vezivanjem radioaktivno označenih liganda. Tim se metodama specifično određuje ER α koji je dominantan u hormonskoj ovisnosti raka dojke. Imunohistokemijsko određivanje izražaja ER, PgR i HER2 nezaobilazan je postupak u histopatološkoj karakterizaciji raka dojke, koja je surogat molekularne karakterizacije raka dojke na temelju transkripcijskog profiliranja. ER+PgR+HER2-skupina tumora (luminalna A skupina) ima najbolju prognozu i velike izgleda za uspjeh HT. Transkripcijskim profiliranjem u toj skupini moguće je razlučiti dvije podskupine s dobrom i lošom prognozom, pa u potonjoj uz adjuvantnu HT preporuča se i kemoterapija.

Mehanizam nastanka ER- raka dojke te mehanizmi hormonske rezistencije ER+ tumora, ključni su problemi u HT raka dojke. Rezistencija na HT može biti primarna (*de novo*) ili sekundarna nakon uspješne primjene HT. ER- tumori su primarno rezistentni. Gubitak ER može biti posljedica mutacije ER gena ili epigenetskih promjena, primjerice hipermetilacije promotora ER gena. Oko 40% ER+ tumora primarno su rezistentni na HR zbog različitih poremećaja u funkciji ER sustava: mutacije ER gena, epigenetskih poremećaja, interakcije s drugim signalnim sustavima, posebice HER2, funkcije membranski ER s negenomskim učincima, interakcije s ER β , RNA interferencija, međugenske interakcije. Sekundarna rezistencija na HT može biti posljedica svih spomenutih mehanizama koji se odvijaju tijekom daljnjeg razvoja tumora ali i heterogenosti tumora u kojem su zastupljene stanice osjetljive i rezistentne na HT. Tijekom HT selekcioniraju se rezistentne stanice te tumor postaje hormonski rezistentna.

Nadamo se da će u kontekstu precizne medicine otkriće molekularnih biomarkera za preciznu dijagnozu hormonske rezistencije raka dojke i prognozu bolesti i razvoj odgovarajućih lijekova usmjerenih tako identificiranom molekularnom cilju omogućiti personaliziranu terapiju raka dojke.

Otkriće nove supersimetrije u ljudskom kromosomu 1 koja uzrokuje tripletnu kodonsku strukturu za proteine DUF1220 koji djeluju na razvoj i patologiju (neuroblastom, šizofrenija, autizam) ljudskog mozga

Vladimir Paar^{1,2}, Ines Vlahović², Matko Glunčić², Marija Rosandić²

¹Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb

²Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

U genomskoj sekvenci ljudskog kromosoma 1 otkrili smo 3mer HOR supersimetrije linearno poredane u NBPF20, NBPF10, NBPF12, NBPF14 i NBPF19 članovima NBPF gena temeljenim na ~1,6 kb primarnoj monomernoj repeticijskoj jedinici, kao humanoj akceleriranoj repeticiji višeg reda (HAHOR) i kako ta supersimetrija generira tripletnu kodonsku strukturu proteina DUF1220 od važnosti za jedinstveni razvoj i funkciju ljudskog mozga. Na taj način smo dokazali da je poznata pojava proteinskoga tripleta HLS1-HLS2-HLS3 posljedica genomske supersimetrije (genomska repeticija višega reda). U kontigu NT_004487.20 identificirali smo pet 3mer HOR niza koji se sastoje od: 22, 14, 2, 11 i 14 HOR kopija i našli njihove pozicije u humanom kromosomu 1.

Otkriće aproksimativnog homologa Neuroblastoma BreakPoint Family (NBPF) gena u genomu neandertalca i moguća posljedica divergencije između neandertalca i čovjeka na razvoj mozga i izumiranje neandertalca

Ines Vlahović², Matko Glunčić², Marija Rosandić², Vladimir Paar^{1,2}

¹Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb

²Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

U kromosomu 1 neandertalca otkrili smo prvu repeticiju višeg reda (HOR) u genomu neandertalca: šest HOR nizova u kromosomu 1 neandertalca temeljenom na primarnom monomeru od ~1,6 kb, organiziranom u 3mer HOR, kao distordirani homolog humanoga NBPF-a, s dodatnim šupljinama i raspršenjima. Otkrili smo sistematsku divergenciju strukture 3mer HOR-a kod neandertalca u odnosu na ljudski genom. Pri translaciji u amino kiseline divergencije HLS sekvenci unutar HOR kopija su veće kod

neandertalca, naročito za HLS3: za čovjeka ~3.84% i za neandertalca ~7.22%. Divergencija je najmanja za HLS2 sekvence kod čovjeka, i za HLS1 kod neandertalca. Identificirali smo kompoziciju šest 3mer HOR nizova s: 16, 13, 4, 12, 4 i 14 HOR kopija i odredili njihove pozicije u kromozomu 1 neandertalca. Na osnovi tih rezultata pokazali smo da su HLS domene kod neandertalca manje homogene (više raspršene) nego kod čovjeka. Ukazano je na mogući utjecaj te razlike na evoluciju i izumiranje neandertalca.

Otkriće u humanom kromosomu 21 (relevantnog za Dawn sindrom i aneuploiditet općenito) alfa-satelitske repeticije višeg reda (HOR) s najvećom HOR repeticijskom jedinicom među svih 22 humanih somatskih kromosoma

Matko Glunčić², Ines Vlahović², Vladimir Paar^{1,2}

¹Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb

²Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

S nedavnim impresivnim napretkom metoda sekvencioniranja genoma (NGS, TGS/LRS, WGS) vrlo aktualni su jedinstveni izazovi za istraživanje humanih satelita u DNA i RNA sekvencama, kao značajnim regulatornim elementima i za napredak našega razumijevanja još uvijek pretežito neistraženog cetromernoga dijela genoma. Kromosom 21 je najmanji ljudski kromosom, ali od značajnog interesa za otkrivanje molekularne osnove Down sindroma, uzrokovanog ekstra kopijom kromosoma 21, i općenito aneuploiditeta.

Stvorili smo moćni kompjutorski program za identifikaciju i analizu HOR-a, GRM algoritam s visokim stupnjem robusnosti za identifikaciju HOR-a. Uz pridruživanje našega drugog kompjutorskog programa APHASub za ekstrakciju HOR nizova iz dane DNA sekvence istražili smo dosad nepoznate HOR-ove u hg38 NCBI bazi za sekvencu humanog kromosoma 21. Otkrili smo novi alfa-satelitski HOR – 33mer. To je najveća HOR repeticijska jedinica dosad otkrivena među svih 22 somatskih humanih kromosoma. Štoviše, otkrili smo homologe toga 33mera u još tri druga akrocentrična humana kromosoma, kromosomima 13, 14 i 22.

Narušavanje Chargaffovog drugoga paritetnog pravila (CSPR) i kvadrupletne simetrije u humanoj kodirajućoj DNA

Marija Rosandić¹, Ines Vlahović², Vladimir Paar^{1,2}

¹Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb

²Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Istraživanjem po segmentima >100 kb u humanim kromosomima dobije se da je frekvencija svakog trinukleotida D aproksimativno jednaka frekvenciji njezinoga reverznog komplementa RC(D) unutar istog DNA lanca, na razini devijacije od ispod 2%. Ovdje istražujemo je li to odstupanje statistička pogreška ili postoji neko drugo strukturno objašnjenje. Analizirali smo relativne frekvencije trinukleotida posebno u A+T bogatim i C+G bogatim kvadrupletnim matricama u humanim kromosomima. Kao kontrolnu grupu selektirali smo iz svakog kromosoma nasumično segmente od po 100 bp, i konstruirali kombiniranu nasumičnu sekvencu od 200 kb. Pokazali smo da frekventna analiza svake nasumične nadovezane sekvence zadovoljava Drugo Chargaffovo paritetno pravilo (CSPR), poput cijelog kromozoma, i da su njihove frekventne matrice međusobno vrlo slične. Nasuprot tome, CSPR je ozbiljno narušeno za egzom (sekvence međusobno nadovezanih izdvojenih egzona). To baca novo svjetlo na DNA. Treba spomenuti da sekvencija nadovezanih egzona za svaki kromosom sadrži više od oko milijun nukleotida, što omogućuje pouzdanu analizu. Na taj način, nadovezani kodirajući DNA za svaki humani kromosom ne zadovoljava CSPR: postoje značajne razlike između relativnih frekvencija A i T, te između C i G nukleotida. To se može interpretirati u suglasju s hipotezom o nastanku DNA molekula iz primordijalnih RNA ("RNA svijet") na osnovi Watson-Crickovog sparivanja i Prirodnog zakona o DNA stvaranju i očuvanju.

Cystic fibrosis

Milan Macek

Department of Biology and Medical Genetics, Charles University and 2nd School of Medicine, Prague

The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2.org) project represents a novel approach to clinical and functional annotation of mutations identified in disease-causing genes in cystic fibrosis (CF). Phenotype and genotype information on approximately 40,000 CF patients have been collected from registries and large clinics. The disease-liability of the 200+ most frequently reported mutations was evaluated by means of a multistage process which involved clinical (sweat chloride average), functional (expression in cell-based systems) and epidemiological (mutation analysis in obligate heterozygotes) steps. The results of this „penetrance analysis” can be consulted within a dedicated freely accessible website. Data originated by CFTR2 may be valuable in several facets of CF care, including diagnosis, newborn screening, carrier testing, genotype/phenotype correlation and mutation-specific therapeutics. In this regards, cystic fibrosis serves as model for other locus specific efforts aimed as assessing disease liability of variants detected by next generation sequencing. Application of economic analyses into the application of drugs and devices into health care is termed pharmacoeconomics (PE). This subject is of increasing significance due to the gradually increasing health care costs, aging population and introduction of more efficient, albeit more expensive, therapeutic modalities. An orphan medicinal product (“orphan drug”; OMP) is aimed at specifically treating a rare medical (“Mendelian”) condition, itself being often termed as an “orphan disease”. There is specific legislation and incentives for the pharmaceutical industry to commence development, OMP marketing approval or assuring extended marketed exclusivity, all intended to encourage the development of drugs which might otherwise lack a sufficient economic incentive based on the estimated profit in a small patient population. OMPs often represent medical breakthroughs, that may not have otherwise been achieved due to the otherwise “unfavourable” economics of drug research and development in rare diseases. We will present a model PE study, using CF as a model disease.

Biopsija sjemenika u neplodnih pacijenata s mikrodelecijom kromosoma Y

Davor Ježek^{1,2,3}

¹Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zavod za histologiju i embriologiju;

²Klinički bolnički centar Zagreb, Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju

³Znanstveni centar izvrsnosti za reprodukciju i regenerativnu medicinu, Istraživačka jedinica

“Biomedicinsko istraživanje reprodukcije i razvoja”

Azoospermija je jedan od najtežih oblika neplodnosti muškarca, a manifestira se potpunim nedostatkom muških spolnih stanica, spermija, u sjemenu muškarca. Ove stanice nisu prisutne ni nakon centrifugiranja uzorka ejakulata, a također nema ni ostalih oblika sjemenskih stanica (zrelih i nezrelih spermatida te spermatocita) koje se katkada tamo mogu zateći. Udio pacijenata s azoospermijom u populaciji neplodnih muškaraca se povećava pa sada, po nekim procjenama, on iznosi oko 15%. Uzroci azoospermije su mnogobrojni: preboljeli zaušnjaci u djetinstvu, kriptorhizam, ksenoestrogeni i drugi čimbenici okoliša, lijekovi, profesionalna izloženost visokim temperaturama ali i mikrodelecije Y kromosoma. Naime, ljudski Y kromosom nosi gene koji su odgovorni za razvoj testisa, kao i za pobuđivanje i održavanje spermatogeneze u odrasloj dobi. Dugačka ruka Y kromosoma (Yq) podložna je samo-rekombinaciji tijekom spermatogeneze i time osjetljiva na intra-kromosomske delecije. Takve delecije dovode do varijacije broja kopija u genima Y kromosoma što rezultira muškom neplodnosti. Na Y kromosomu osobito je važno područje tzv. čimbenika azoospermije (AZF, Azoospermia Factor) koje se sastoji od podregija AZFa, AZFb i AZFc. Globalna prevalencija Yq mikrodelecija u neplodnih muškaraca je 7,5% pri čemu prednjače stanovnici Sjeverne Amerike i Istočne Azije. U bijelaca i populaciji mongolskih muškarca također je nađena povezanost gr/gr delecija s azoospermijom, dok je b2 / b3 delecija pretežito povezana s muškom neplodnošću u afričke populacije. Godine 2013. pri KBC „Zagreb“ počela je s radom Banka sjemenika sa svrhom dijagnostike i liječenja pacijenata s azoospermijom. Tijekom dijagnostičko-terapijskog postupka, primjenjuje se tzv. otvorena biopsija sjemenika. Biopsijski komadići se programirano zamrzavaju u tekućem dušiku i pohranjuju u banci tkiva, a jedan dio se histološki analizira. Do sada je operirano preko 180 pacijenata, od toga 5 sa mikrodelecijom AZFc, 1 sa djelomičnom mikrodelecijom AZFb te 1 pacijent sa delecijom gr/gr. Histološka analiza pokazala je odsutnost spermija samo u pacijenta sa delecijom gr/gr. Analiza mikrodelecija Y kromosoma u pacijenata sa oligoastenoteratospermijom i azoospermijom u skladu s preporukama Europske androloške akademije (EAA) važan je korak u obradi neplodnog muškarca.

Genetska dijagnostika i pametni lijekovi u neuromuskularnim bolestima u djece

Nina Barišić^{1,2}

¹Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

²Klinički bolnički centar Zagreb, Klinika za pedijatriju, Referentni centar za pedijatrijske neuromuskularne bolesti

Recentni razvoj etiološke posebno tzv. molekularno -genetske terapije omogućuje individualni pristup i primjenu personalizirane/precizne terapije (pametnih lijekova) u liječenju genetskih neuromuskularnih bolesti (NMB). Terapija obuhvaća gensku i genetsku terapiju protusmjernim oligonukleotidima (AON) i malim molekulama te farmakološku usmjerenu na komplikacije bolesti. Posebno je značajan napredak u liječenju proksimalne /infantilne spinalne mišićne atrofije uzrokovane mutacijom gena SMN1 (survival motor neuron) na kromosomu 5q. Nusinersen/Spinraza i male molekule usmjereni su na uključivanje egzona 7 u SMN2 mRNA, te produkciju funkcionalnog proteina. Rana primjena modificirajuće terapije SMA ponajprije u tipu I povezana je s promjenom prirodnog tijeka i ishoda bolesti u smislu zaustavljanja progresije, smanjenjem ranog mortaliteta i napretkom u razvoju ali ne i izlječenjem. Za sada nema strogih međunarodno prihvaćenih kriterija za uključivanje bolesnika u terapiju nusinersenom prema tipovima, dobi, trajanju bolesti i ovisnosti o trajnoj mehaničkoj ventilaciji. U Hrvatskoj je na terapiji nusinersenom uključeno 15 djece (5 sa tipom I i 10 sa tipom II i III). Potrebna su dodatna ispitivanja radi procjene duljine trajanja liječenja, doze te nuspojava vezanih uz dugotrajnu primjenu.

Duchennova mišićna distrofija najčešća je progresivna mišićna distrofija u dječjoj dobi uzrokovana mutacijama X-vezanog gena za protein distrofin. U Hrvatskoj je dostupna terapija malom policikličkom molekulom ataurenom/Translarna za bolesnike s besmislenom mutacijom koji omogućuje pročitavanje kroz prematurni stop kodon.

Etiološka terapija ostalih genetskih NMB je u ranim fazama kliničkih studija ili u tijeku ispitivanja na eksperimentalnim modelima. Za izdvojiti je i napredak razvoja genetske terapije miotoničke distrofije tip 1 s AON kojim se sprječava akumulacija trinukleotida (CUG) direktnim učinkom na RNA.

Zaključak. Rano prepoznavanje i rana genetska dijagnoza NMB uz poznavanje patogeneze i prirodnog tijeka bolesti i rana primjena ciljane genetske precizne /personalizirane terapije uz standarde zbrinjavanja i multidisciplinarni timski pristup omogućuju uspješnost ishoda liječenja i poboljšanje kvalitete života bolesnika s NMB.

Ključne riječi: spinalna mišićna atrofija, Duchennova mišićna distrofija, dijagnoza, genetska terapija

Klinička važnost genetskog testiranja u sindromima multiple endokrine neoplazije

Darko Kaštelan ^{1,2}, Tina Dušek ^{1,2}

¹Medicinski fakultet Sveučilište u Zagrebu

²Klinički bolnički centar Zagreb, Zavod za endokrinologiju

Sindromi multiple endokrine neoplazije (MEN) su nasljedni poremećaji u kojima dolazi do razvoja dobroćudnih i zloćudnih tumora endokrinih žlijezda. Genetsko testiranje ima presudnu ulogu u dijagnostici ovih sindroma jer određuje i usmjerava klinički pristup bolesnicima. U sindromu multiple endokrine neoplazije tip 1 (MEN 1) do stvaranja tumora dolazi uslijed mutacije tumor supresijskog gena menina, dok multipla endokrina neoplazija tip 2 (MEN 2) nastaje kao rezultat mutacije RET-protoonkogena. Dijagnoza MEN sindroma postavlja se na temelju kliničke slike i rezultata genetskog testiranja, a bolesnici kod kojih je utvrđena mutacija moraju biti pod redovitom kliničkom kontrolom u cilju što ranijeg otkrivanja 'očekivanih' tumora endokrinih žlijezda i, sukladno tome, što ranijeg liječenja. Štoviše, kod bolesnika s dijagnozom MEN 2 potrebno je učiniti profilaktičku tireoidektomiju u cilju sprječavanja razvoja medularnog karcinoma štitnjače, a dob do koje je navedeni zahvat potrebno učiniti varira od prve godine života do mlađe odrasle dobi i ovisi prvenstveno o mjestu genetske mutacije na molekuli DNA. Mutacije kod oba sindroma se nasljeđuju autosomno dominantno, a nakon što je dijagnoza potvrđena genetskim testiranjem potrebno je učiniti genetski probir obitelji.

Genski i biokemijski biljezi monogenetskog dijabetesa

Jadranka Sertić^{1,2}, Darko Kaštelan^{1,3}, Lea Smirčić Duvnjak^{1,4}, Tina Dušek^{1,3}, Tomislav Bulum^{1,4}, Maja Baretić^{1,3}, Ana Merkler², Domagoj Caban², Anita Špehar Uroić⁵, Hana Ljubić², Srđana Telarević^{1,6}

¹Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Katedra za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju

²Klinički bolnički centar Zagreb, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku

³Klinički bolnički centar Zagreb, Klinika za endokrinologiju

⁴Sveučilišna klinika Vuk Vrhovac

⁵Klinički bolnički centar Zagreb, Klinika za pedijatriju

⁶Klinički bolnički centar Zagreb, Klinika za pedijatriju

Novi dijagnostički i terapijski pristup monogenском dijabetesu (MODY) uključuje analizu genskih i biokemijskih biljega posebice mutacija u genima nuklearnih faktora HNF1A, HNF4A, HNF1B i glukokinaze GCK. Identifikacijom mutacija HNF1A-MODY, HNF4A-MODY, GCKY-MODY i HNF1B-MODY stratificiraju se ispitanici u dobro definirane podtipove dijabetesa MODY. Najčešće genske patogene varijante (HNF1A-MODY, HNF4A-MODY, HNF1B-MODY) vezane su uz disfunkciju beta stanica pankreasa i mikrovaskularne komplikacije (retinopatija, nefropatija, neuropatija), te kardio-cerebrovaskularne bolesti. Dob postavljanja dijagnoze je određena lokacijom patoloških mutacija u genu. Rijede mutacije otkrivene su u genima INS, INSR, PPARG, ABCC8, KCNJ11, LMNA, TRMT10A, WFS1, NEUROD1 i m.3243A>G. U osoba s MODY u zemljama s razvijenom preciznom medicinom provode se DNA analize sa svrhom individualizacije terapije niskom dozom sulfoniluree gdje je bitan genotip HNF1A i HNF4A, te terapije inzulinom gdje važnu ulogu ima HNF1B. Kod bolesnika s GCK-MODY stabilna je funkcija beta stanica s blagom hiperglikemijom i terapija nije potrebna. Sekvenciranje gena omogućava dijagnozu sve većem broju pacijenata u Hrvatskoj u KBC-u Zagreb gdje se provodi molekularna dijagnostika prema međunarodnim smjernicama od 2017. godine, te se postavlja dijagnoza koristeći biokemijske pretrage (profil GUK-a, OGTT, C-peptid, inzulin, HbA1c, protutijela ICA, GAD, IA2) i genske biljege. Progresija ove autosomno dominantne bolesti je spora, dugo asptomatska, a često se dijagnosticira u mlađih osoba s hiperglikemijom tijekom bolesti. Precizna klasifikacija dijabetesa i liječenja na temelju genotipa dio su precizne medicine u razvijenom svijetu. Translacijska istraživanja mutacija u pojedinim populacijama polučuju korisne spoznaje o pojavnosti bolesti, etiologiji, ranom otkrivanju i liječenju pojedinih podtipova dijabetesa, onemogućuje da slučajevi ostaju neprepoznati, te koriste za registar bolesnika. Precizna medicina podiže kvalitetu života pacijenata s monogenским dijabetesom i smanjuje troškove liječenja.

Novije spoznaje o mitohondriju i mitohondrijskim bolestima

Nives Pećina Šlaus^{1,2}

¹Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Katedra za biologiju

²Laboratorij za neuroonkologiju, Hrvatski institut za istraživanje mozga

Spoznaje o osnovnim funkcijama mitohondrija u normalnoj staničnoj fiziologiji produbile su se do nevjerojatnih detalja. Novi znanstveni radovi o ulogama mitohondrija u stanici i ljudskom zdravlju dali su detaljnija saznanja o ultrastrukтури i makromolekularnim komponentama vanjske i unutrašnje membrane ove organele, a spoznaje o uzrocima brojnih mitohondrijskih bolesti pokazuju da je klasično poimanje uloge mitohondrija kao generatora energije samo vrh ledenog brijega. Promjene mitohondrijske DNA (mtDNA) su danas funkcionalno i genetički vezane uz čitav niz bolesti čovjeka. Jedan od razloga velike kompleksnosti i heterogenosti mitohondrijskih bolesti svakako je uključenost obaju genoma, i mitohondrijskog i jezgrinog, u njihov nastanak. Mitohondrijske bolesti su grupa klinički heterogenih bolesti zajednički definiranih gubitkom stanične energije radi neispravne oksidativne fosforilacije. Od vremena prve mutacija mtDNA čovjeka sa patološkim posljedicama otkrivene 1988. godine do danas, lista gena, mutacija i bolesti uzrokovanih promjenama mitohondrija svakim danom sve je duža. Neke od značajnijih mitohondrijskih bolesti su Leighov sindrom, Kearns-Sayreov sindrom, Pearsonov sindrom, Leberova nasljedna optička neuropatija, Mioklona epilepsija s ragged-red fibers (MERRF). To su rijetki sindromi uzrokovani oštećenjima brojnih tkiva. Tkivna oštećenja slijede redosljed osjetljivosti tkiva na energetske manjak. Najčešća su oštećenja očnog živca i središnjeg živčanog sustava, zatim skeletnih mišića i srca, stanica gušteračinih Langerhasovih otočića, bubrega i jetre. Stoga se mitohondrijske bolesti općenito očituju sljepoćom, poremećajima središnjeg živčanog sustava, smanjenjem mišićne snage, slabošću srca i poremećajima drugih organa. Iako su moderne molekularno genetičke tehnike omogućile veliki napredak u dijagnozi i karakterizaciji specifičnih molekularnih oštećenja, za liječenje većine mitohondrijskih bolesti još uvijek nema definitivne biokemijske terapije. Stoga se razmatra mogućnost genske terapije. Kako bi spriječili prijenos štetnih mutacija mtDNA majke na potomstvo predloženi pristup genske terapije je transplantacija jezgrine DNA iz majčine jajne stanice u jajnu stanicu donora čija citoplazma sadrži zdrave mitohondrije, a kojoj je prethodno uklonjena jezgra. Rezultirajući embrio tzv. embrio tri osobe sadrži mitohondrijske gene zdrave donorice i jezgrinu DNA majke i oca. Iako se u većini zemalja za ovu potencijalnu gensku terapiju mitohondrijskih bolesti, koja se još naziva i donacija mitohondrija, još uvijek čeka odobrenje, krajem 2016. godine u Velikoj Britaniji rođena je prva beba uporabom ove tehnike.

Dometi farmakogenomike u preciznoj medicini

Nada Božina^{1,3}, Lana Ganoci³, Livija Šimičević³, Tamara Božina², Iva Klarica Domjanović⁴, Nikica Mirošević Skvrce⁴

¹Medicinski fakultet Sveučilište u Zagrebu, Katedra za farmakologiju

²Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Katedra za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju

³Klinički bolnički centar Zagreb, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku

⁴Agencija za lijekove i medicinske proizvode

Farmakogenomika ispituje genetički determiniranu varijabilnost u metabolizmu, transportu i interakciji lijeka s ciljnom molekulom. Genetički čimbenici mogu imati dominantnu ulogu u ukupnoj neočekivanoj reakciji na lijek. Mogu značajno modulirati učinkovitost lijeka te povećati rizik razvoja neželjenih reakcija. Stoga se provode brojne dobro osmišljene asocijacijske studije, stvaraju baze podataka klinički relevantnih nuspojava te biobanke s uzorcima tkiva i DNA za provođenje studija na razini cijelog genoma. Ubrzan razvoj sofisticiranih tehnologija koje se primjenjuju u području molekularne biologije poput sekvenciranja sljedeće generacije (eng. *Next Generation Sequencing*, NGS) omogućuje dizajniranje panela za testiranje bolesnika sa specifičnim simptomima/bolestima, u kojih se primjenjuje određena skupina lijekova (psihotropni, kardiovaskularni, protuupalni, imunosupresijski, neurološki, onkološki i drugi). Validacijom identificiranih genetičkih biljega izdaju se preporuke i smjernice od strane međunarodno prepoznatih društava i konzorcija poput *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC)*, *Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG)* i *European Pharmacogenetics Implementation Consortium (Eu-PIC)* koje će zasigurno unaprijediti primjenu farmakogenomike u svakodnevnom radu kliničara. Uočljiv je konstantan rast farmakogenetičkih testiranja u kliničkoj praksi s ciljem optimizacije terapije, smanjenja broja ozbiljnih nuspojava i nepotrebnih medicinskih troškova zbog njihova zbrinjavanja. Takav pristup omogućava primjenu lijekova i razvoj precizne medicine za genotipski/fenotipski različite skupine bolesnika. Implementaciju farmakogenomike u informaciju o lijeku kao i identifikaciju farmakogenomskih biomarkera tijekom razvoja lijeka podupire i Radna skupina za farmakogenomiku Europske agencije za lijekove (*Pharmacogenomics Working Party, European Medicines Agency-EMA*).

Genomska medicina u svakodnevnom radu u kliničkom laboratoriju

- iskustva KBC Split

Irena Drmić Hofman ^{1,2}

¹Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, Katedra za medicinsku kemiju i biokemiju

²Klinički bolnički centar Split, Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju

Genomska medicina je interdisciplinarno područje medicine koje se bavi analizom gena i njihovom utjecajem na zdravlje čovjeka. Genomika istražuje kompleksne biološke osobitosti svake osobe i stečena znanja koristi za razvoj efikasnije dijagnostike i liječenja prilagođenog svakom pojedinom pacijentu.

Dekodiranjem ljudskog genoma i zbog sve većih potreba suvremene kliničke medicine za liječenjem niza bolesti, posebice malignih bolesti, došlo je do ekspanzije u razvoju novih dijagnostičkih postupaka u molekularnoj patologiji te posljedično do promjene paradigme i primjene različitih molekularnih biljega u liječenju niza bolesti.

U ovom radu analizirat ćemo kako i koliko je napredak genomske medicine utjecao na razvoj jednog kliničkog genetičkog laboratorija, Laboratorija za molekularnu genetiku Zavoda za patologiju, sudsku medicine i citologiju KBC Split, u razdoblju od 1993.-2018. godine.

Također ćemo sagledati perspektivu i izazove koje stoje pred Laboratorijem, posebice u kontekstu iskustva implementacije novih dijagnostičkih metoda, poput sekvenciranja nove generacije, razvoja ciljanih genskih panela i integriranja bioinformatičkih podataka u dijagnostici malignih bolesti.

Genetsko profiliranje tumora i molekularno usmjerena terapija

Blaženka Grahovac, Bojana Mohar

Medicinski fakultet, Sveučilište Rijeka

Rak je genetska bolest - uzrokovan je promjenama u DNA koja kontrolira način kako stanice funkcioniraju, posebno stanični rast i diobu stanica. Ove promjene (mutacije) mogu biti nasljedne, ali većinom se javljaju slučajno, tijekom diobi stanica ili usljed izloženosti karcinogenima koji oštećuju DNA (somske mutacije). Rak svakog oboljelog ima jedinstvenu kombinaciju genetskih promjena, a metoda sekvenciranja tumorske DNA, nazvana i genetsko profiliranje je test kojim se identificiraju ove promjene. Znanje o genetskim promjenama u pojedinačnom slučaju raka može pomoći u određivanju plana liječenja. Ciljane terapije djelotvorne su samo za bolesnike čije stanice raka imaju specifične genetske promjene – mutacije, koje uzrokuju da stanice rastu izvan kontrole (onkogene „driver“ mutacije). Sekvenciranje DNA tumora je osnova precizne medicine- liječenja usmjerenog prema molekularnim značajkama tumora svakog bolesnika. Ciljana terapija raka podrazumijeva lijekove koji blokiraju rast i širenje raka ometajući signalne puteve u stanici.

Mnogo je različitih ciljnih terapija odobreno za uporabu u liječenju raka. Te terapije uključuju hormonske terapije, inhibitore prijenosa signala, modulatore genske ekspresije, induktore apoptoze, inhibitore angiogeneze, imunoterapije i molekule za isporuku toksina. Rani uspjesi u ciljanoj terapiji u liječenju raka dojke s trastuzumabom u HER-2 pozitivnim tumorima, imatinibom u Philadelphia-pozitivnoj kroničnoj mijeloičnoj leukemiji, erlotinibom u EGFR mutiranom tumoru ne-malih stanica raka pluća, cetuximabom u KRAS tumoru debelog crijeva i vemurafenibom u BRAF-mutiranom melanomu, ohrabрили su intenzivno istraživanje proteklih godina. Projekt Cancer Genome Atlas je baza podataka o genomici tumora pokrenuta 2006.god., koja je postavila temelje istraživanjima molekularnog profiliranja tumora. Kao rezultat novih otkrića u području genomike tumora danas je stotine spojeva u kliničkom ispitivanju koji imaju za ciljne molekule više od 100 mutacija u genima koji uključuju višestruke stanične signalne puteve.

Molekularno profiliranje u lezijama tumora od temeljne je važnosti za razumijevanje molekularne etiologije razvoja tumora i pruža podatke o novim biomarkerima koji mogu poslužiti u ranom otkrivanju raka.

Dolazak novih tehnologija kao što je sekvenciranje nove generacije (NGS) omogućuje brzo, relativno jeftino profiliranje jednog gena, skupine gena ili cijelog genoma raka. Ovaj tehnološki napredak omogućuje da ciljana terapija usmjerena na onkogenu mutaciju gena jednog signalnog puta ili više gena povezanih s više signalnih puteva, dovede do značajnog "individualiziranja" terapije raka.

Klinička primjena naprednih lijekova i Banka tkiva u Klinici za traumatologiju, KBC Sestre milosrdnice

Mirna Tominac Trcin

Klinički bolnički centar *Sestre Milosrdnice*, Klinika za traumatologiju, Banka tkiva

Lijekovi za naprednu terapiju (eng. Advanced Therapy Medicinal Products, ATMP) čine novu generaciju inovativnih lijekova definiranih u EU Regulativom EC 1394/2007. Prema navedenoj Regulativi, ATMP-lijekovi uključuju: medicinske proizvode temeljene na somatskim stanicama, genskoj terapiji i tkivnom inženjerstvu te kombinirane proizvode. Regulativa EC 1394/2007 je još prije 10-ak godina postavila legalni okvir za daljnji razvoj ATMP-proizvoda, njihovo uvođenje u kliničku primjenu i autorizaciju. No, međutim neki dijelovi ove Regulative još su uvijek nerazjašnjeni i podložni različitom tumačenju između samih zemalja članica EU. To se osobito odnosi na one dijelove Regulative koji se tiču definiranja kriterija za kategorizaciju ATMP-a kao „bolničko izuzeće“ (eng. Hospital Exemption). Kategorija „bolničko izuzeće“ omogućava zemljama članicama da na svom teritoriju koriste ATMP-lijekove bez centralne marketinške dozvole. U ovu kategoriju spadaju lijekovi koji se proizvode u maloj količini, na nerutinskoj osnovi, pod osobnom odgovornošću liječnika, za poznatog pacijenta unutar bolnice ili zemlje članice. No, bez obzira na ograničenja u distribuciji korištenju takvog lijeka, ATMP-lijek mora biti licenciran od strane odgovornog nacionalnog tijela i mora zadovoljiti sve nacionalne zahtjeve u pogledu kvalitete, sljedivosti i farmakovigilancije koja se odnose na ostale autorizirane lijekove te bankirana tkiva i stanice za kliničku primjenu. Nadalje, proizvodnja ATMP-lijekova zahtijeva implementaciju odgovarajućeg sustava kvalitete i dobre proizvođačke prakse (eng. Good Manufacturing Practice, GMP) uz poštivanje GMP- smjernica specifičnih za ATMP kao i smjernica za donirana i bankirana tkiva i stanice namijenjene presađivanju. U ovoj prezentaciji donosimo iskustva Banke tkiva, KZT, KBC Sestre milosrdnice u razvoju, kliničkoj primjeni i pripremama za licenciranje naprednih lijekova kao „bolničko izuzeće“. Banka tkiva KZT licencirana je za proizvodnju jedne vrste ATMP-a – uzgoj ljudske kože, tj. autolognih epitelnih stanica na određenim nosačima za potrebe liječenja teških opekлина i kroničnih rana. Ljudsku kožu uzgajamo već više od 10 godina. Intenzivno se pripremamo za licenciranje i druge ATMP-djelatnosti - uzgoj matičnih stanica oka, tj. limbalnih matičnih stanica rožnice za liječenje određenih vrsta sljepoće.

Inovativni pristupi u primjeni bakterija mliječne kiseline: proizvodnja visokovrijednih biokemikalija - glukozilglicerola i estera mliječne kiseline

Anita Slavica^{1,2}

¹Prehrambeno biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za biokemijsko inženjerstvo,

²Hrvatsko društvo za biotehnologiju

Tradicionalni bioprocesi u kojima se primjenjuju bakterije mliječne kiseline su solidna biotehnološka osnovica za daljni razvoj cijelog niza postupaka i procesa u kojima bi se mogli primijeniti ovi biokatalizatori. GRAS (engl. Generally Recognized As Safe) status ove skupine bakterija je opće prihvaćen u njihovoj širokoj primjeni i biotehnološkim istraživanjima, ali doprinosi i uvriježenim načinima razmišljanja mladih istraživača po kojima ove bakterije predstavljaju relativno zahtjevne i osjetljive biokatalizatore. U našim istraživanjima pošli smo od pretpostavke da su bakterije mliječne kiseline vrlo prilagodljivi i robusni mikroorganizmi koji zadržavaju određene metaboličke i druge ciljane aktivnosti u tzv. nepovoljnim uvjetima. Odabrane su dvije vrste ovih bakterija - *Leuconostoc mesenteroides* i *Lactobacillus amylovorus* i to za proizvodnju visokovrijednih biokemikalija, redom, glukozilglicerola i estera mliječne kiseline, koji se mogu proizvesti iz obnovljivih izvora.

Genom mezofilne heterofermentativne bakterije *Leuconostoc mesenteroides* sadrži funkcionalni gen za saharoza fosforilazu (EC 2.4.1.7), dobro okarakterizirani enzim koji se koristi u reakcijama glukozilacije u industrijskom mjerilu. U našim istraživanjima uspješno smo primijenili permeabilizirane stanice ove vrste u reakciji glikozilacije saharoze u cilju proizvodnje glukozilglicerola (2-O- α -D-glukopiranozil-sn-glicerol).

Direktna razgradnja škroba do mliječne kiseline dobro je okarakteriziran biotehnološki proces kojeg katalizira homofermentativna bakterija *Lactobacillus amylovorus*. Ovaj tip simultane saharifikacije polučvrstog susprata (škroba) i fermentacije jednostavnih ugljikohidrata do mliječne kiseline znatno je poboljšana i integrirana sa esterifikacijom proizvedene kiseline. Prema našim saznanjima, ovo je prvi takav sustav kojim je moguće proizvesti estere mliječne kiseline.

Tekuća biopsija – važan dijagnostički alat u preciznoj medicini

Jasenska Wagner

Medicinski fakultet Sveučilište J.J.Strossmayera Osijek, Katedra za medicinsku biologiju i genetiku

Brojne cjelogenomske studije provedene posljednje desetljeće pružile su nam uvid u molekularnu biologiju mnogih tumora. Bolje poznavanje i razumijevanje genetičkih promjena i njihovih funkcionalnih posljedica dovele su do otkrića novih terapijskih opcija te poboljšale kliničku skrb pacijenata s tumorom. Iako je molekularna stratifikacija pacijenata temeljena na analizi tumorskog tkiva zlatni standard u preciznoj medicini, ona ima i neka ograničenja. Tkivna biopsija je rizičan invazivni postupak te je ponekad nedovoljno reprezentativna za tumorsko tkivo zbog njegove genetičke heterogenosti.

Komplementarna karakterizacija genetičke informacije iz krvi pacijenata može poslužiti kao minimalno invazivna tekuća biopsija. Tekuća biopsija revolucionarna je tehnika koja se temelji na detekciji i izolaciji cirkulirajućih tumorskih stanica (CTC), cirkulirajućih tumorskih nukleinskih kiselina i/ili exosoma koji su izvor genomske i proteomske informacije o tumoru.

Fragmenti cirkulirajuće slobodne DNA (ctDNA) koja je porijeklom iz različitih tkiva, a nalazimo je kod i oboljelih i zdravih osoba, potencijalan su dijagnostički, prognostički i prediktivni biljeg. Slobodno cirkulirajuća DNA otpušta se i iz primarnog tumora i iz metastaza i reprezentativna je za genetičke aberacije kod stanica tumora. Klinička primjena analize slobodno cirkulirajuće tumorske DNA moguća je za longitudinalno praćenje tumora pod terapijom te minimalne ostatne bolesti, rezistentnih mutacija te terapijskih ciljeva. Da bi analiza cirkulirajuće tumorske DNA zaživjela u svakodnevnoj kliničkoj praksi, potrebno je validirati i standardizirati svaki predanalitički i analitički postupak koji primjenjujemo. Budući da se u svrhu izolacije i kvantifikacije cirkulirajuće tumorske DNA primjenjuju različiti postupci, a isti slučaj je s analitičkim procesima koji se primjenjuju u svrhu analize ctDNA, jasno je da svaka od ovih metodologija ima svoju osjetljivost i specifičnost kao i ograničenja i prednosti u odnosu na druge. Iako tekuća biopsija još uvijek nije u svakodnevnoj rutinskoj praksi, rezultati nedavnih istraživanja pružaju nadu za skorom kliničkom primjenom te u konačnici za napuštanje tkivne biopsije.