

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Anita G. Skakić

**GENOMSKI PROFIL PACIJENATA DEČIJEG
UZRASTA SA HEPATIČNIM GLIKOGENOZAMA:
KORELACIJA GENOTIPA I FENOTIPA I
FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA
NOVIH VARIJANTI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Anita G. Skakic

**GENOMIC PROFILING OF PEDIATRIC
PATIENTS WITH LIVER GLYCOGENOSIS:
GENOTYPE- PHENOTYPE CORRELATION
AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION
OF NOVEL VARIANTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

MENTORI:

dr Maja Stojilković, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

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

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Maja Stojilković, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

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

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

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

doc. dr Maja Đorđević Milošević, docent, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____2019. godine

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je osmišljena i realizovana u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu.

Najveću zahvalnost dugujem svojim mentorima, dr Sonji Pavlović i dr Maji Stojiljković.

Zahvaljujem se dr Sonji Pavlović na ukazanoj prilici da se bavim naukom, na poverenju, savetima i podršci. Draga Sonja, hvala na svim razgovorima, motivaciji i Vašoj upornosti koja me je naučila da nikad ne odustajem, čak iako se u prvi mah činilo nemogućim.

Veliko hvala dr Maji Stojiljković koja me je vodila od prvog dana u laboratoriji pa kroz ceo put koji je definisao ovu doktorsku disertaciju. Hvala ti što si pre svega bila moj prijatelj, pa tek onda mentor. Hvala na beskrajnom strpljenju, na prihvatanju svih naših razlika u razmišljanju, svim razgovorima uz kafe i koktele, savetima i na ukazanom poverenju za slobodu u radu.

Zahvaljujem se dr Goranu Brajuškoviću na iskrenim savetima tokom osnovnih i doktorskih studija, na ukazanom poverenju i pruženoj podršci.

Hvala dr Svetlani Radović na svim savetima i pažljivom čitanju ove doktorske disertacije.

Hvala timu Odeljenja za ispitivanje i lečenje metaboličkih bolesti, kliničku genetiku i ishranu zdravog i obolelog deteta sa Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta „Dr Vukan Čupić“, Univerziteta u Beogradu, a naročito dr Maji Đorđević Milošević, dr Adrijanu Sarajlija i dr Božici Kecman na saradnji u ostvarivanju ovog projekta.

Zelega bih takođe da se zahvalim dr Aleksandri Trifunović koja me je srdačno primila u svoju laboratoriju AG Trifunovic, na CECAD Univerzitetu u Kelnu. Zahvalna sam svim članovima laboratorije što su mi omogućili da steknem nova znanja i izvanredna iskustva tokom svog boravka u Kelnu.

Veliko hvala svim mojim kolegama iz Lab01: Goci, Branki, Tanji, Jeleni, Vladi, Nikoli, Biljani Jovani, Ireni, Vesni, Miši, Kris i Sanji na korisnim savetima, timskom radu, druženju i razgovorima pruženim od mog prvog dana u labu. Posebno bih se zahvalila Nataši koja je uvek bila tu da podeli sa mnom svoje životno i naučno iskustvo kad god mi je zatrebalo. Takođe, hvala Bojanu koji je uvek bio spreman i raspoložen da pomogne za sve što je bilo potrebno, kao i Mileni i Dori na posebno veseloj, optimističnoj atmosferi.

Posebnu zahvalnost dugujem najmanjoj ženi na svetu, mojoj Marini koja je bila tu kad god mi je bila potrebna. Marina hvala ti na svim preslišavanjima, svom utrošenom vremenu za osmišljavanje i realizaciju naših eksperimenata, na nesebičnoj pomoći i beskrajno pozitivnoj energiji. Hvala za sve dane, vikende provedene sa mnom u labu, za to što si me bodrila kad god je bilo teško i za svo kvalitetno vreme provedeno van instituta.

Hvala svim kolegama iz drugih laboratorija sa IMGGI koji su uvek bili tu da podele svoje znanje i iskustvo kada je trebalo. Posebno hvala Jeleni, Danijeli i Gruji na svim pruženim savetima.

Zahvalila bih se svim svojim prijateljima koji su bili uz mene, a naročito Bojani, Maji i Džo. Bobi hvala ti za sve šetnje po keju, neizmernoj podršci i za sve razgovore koji su učinili da se osećam bolje. Majo hvala za svo strpljenje koje imaš za mene i za svu nesebičnu podršku. Mali Džo hvala ti što si uvek uz mene, na toleranciji, beskrajnom razumevanju i pruženoj podršci i ljubavi. Takođe, hvala mojoj jedinoj kumici na svetu koja je uvek bila tu da me sasluša kad god je bilo teško.

Posebnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima i sestri, kojima posvećujem ovu tezu. Hvala vam na pruženoj podršci, strpljenju i безусловnoj ljubavi. Hvala vam što ste moj najveći oslonac, što verujete u mene i što me podržavate u svemu što radim. Takođe, hvala i ostalim članovima moje porodice na svemu što su mi pružili.

Genomski profil pacijenata dečijeg uzrasta sa hepatičnim glikogenozama: korelacija genotipa i fenotipa i funkcionalna karakterizacija novih varijanti

Rezime

Bolesti koje nastaju usled naslednog enzimskog poremećaja u sintezi ili razgradnji glikogena i koje primarno pogađaju jetru i bubrege, nazivaju se hepatične glikogenoze. Glikogenoza tip I (GSD tip I) je jedan od najčešćih oblika i zauzima posebno mesto u grupi ovih bolesti zbog prepoznatljivog kliničkog fenotipa koji jasno odražava složenu patofiziologiju poremećaja u metabolizmu glikogena. GSD tip Ia razvija se usled deficitarne aktivnosti enzima glukoza-6-fosfataze α (G6Paza- α ili G6PC), a GSD tip Ib nastaje kao posledica deficijencije transportera glukoza-6-fosfat translokaze (G6PT ili SLC37A4) koja se nalazi na membrani endoplazmatičnog retikuluma (ER). U jetri, bubrežima i mukozi creva, G6Paza- α i G6PT formiraju funkcionalni kompleks koji učestvuje u održavanju homeostaze glukoze u krvi između obroka. Ukoliko je ovaj proces narušen, dolazi do nakupljanja glikogena u jetri, bubrežima i intestinalnoj mukozi i razvoja hipoglikemije, hiperlaktatemije, hiperlipidemije, hiperurikemije, i hepatomegalije. Ove metaboličke abnormalnosti rezultiraju dugoročnim komplikacijama bubrežnih bolesti i hepatocelularnih adenoma/karcinoma, čiji su molekularni mehanizmi slabo istraženi. Kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib dodatno se javljaju neutropenija i disfunkcija neutrofila i makrofaga, pa zbog toga ovi pacijenti razvijaju rekurentne bakterijske infekcije, neretko praćene simptomima inflamatorne bolesti creva slične Kronovoj bolesti. Uzimajući u obzir patofiziološke posledice metaboličkog stresa kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib, od velikog interesa su adaptivni odgovori i molekularni mehanizmi koje ćelije aktiviraju pod takvim uslovima. Poznato je da poremećaj homeostaze ER-a, nastalog kao posledica gubitka intraćelijske produkcije glukoze, dovodi do hronične aktivacije „odgovora nesavijenih proteina” (UPR) čime doprinosi patogenezi mnogih bolesti. Stres ER-a je impliciran u mnogim hroničnim bolestima, ali se vrlo malo zna o hroničnom stresu ER-a uzrokovanom nedostatkom G6PT. Osim GSD tip I, postoji još šest hepatičnih GSD (tipovi 0, III, IV, VI, IX i XI), kao i desetine tipova GSD koje pogađaju skeletne mišiće, srce i druge organe. Pošto su posledice bolesti ozbiljne i ireverzibilne, molekularno-genetičko testiranje je od presudne važnosti za precizno postavljanje dijagnoze i što raniju primenu adekvatne terapije.

U okviru ove teze je po prvi put urađeno genomsko profilisanje 41 pacijenata iz 39 nesrodnih porodica iz Srbije. U studiju su uključene samo osobe sa kliničkim

simptomima karakterističnim za različite tipove hepatičnih glikogenoza, kao i 75 ispitanika kontrolne grupe iz Srbije. S obzirom da se radi o grupi bolesti sa heterogenom genetičkom osnovom i da je neophodno analizirati više gena kako bi se postavila precizna dijagnoza, pored Sangerovog sekvenciranja korišćeno je i sekvenciranje nove generacije (NGS). Takođe, izvršena je i funkcionalna karakterizacija novootkrivenih varijanti u genu *SLC37A4* koji je odgovoran za razvoj GSD tip Ib. Analiziran je ekspresioni profil kod pacijenata i kontrolnih ispitanika koji su po polu i uzrastu odgovarali analiziranim uzorcima. Takođe, u ovoj studiji je po prvi put upotrebljena metoda CRISPR/Cas9 za precizno editovanje gena *SLC37A4* bubrežne ćelijske linije HEK293FlpIn u cilju formiranja novog *in vitro* model sistema za GSD tip Ib. Dodatno, ispitano je da li narušavanje funkcije transportera G6PT dovodi do razvoja hroničnog stresa ER-a i povišene apoptoze u precizno editovanoj ćelijskoj liniji HEK293FlpIn sa homozigotnom, humanom, patogenom varijantom c.248G>A u genu *SLC37A4* u cilju utvrđivanja povezanosti ovih procesa sa renalnim komplikacijama kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib. Upotrebom metode RT-qPCR izmerena je ekspresija molekularnih markera odgovora UPR (*ATF4*, *DDIT3*, *HSPA5* i *XBP1s*) i apoptoze (*BCL2*, *BAX*) u klonalnim ćelijskim linijama HEK293FlpIn. Proliferacija i vijabilnost klonova detektovana je upotrebom MTT testa.

Prikazan je genomski profil kod svih analiziranih pacijenata, od kojih je 5 obolelo od GSD tip Ia, 31 od tip Ib, po jedan pacijent od tip III, tip VI i tip IXa. Kod dva pacijenta koji su bili suspekti na GSD, upotrebom NGS tehnologije identifikovane su patogene varijante u genima uzročnicima za bolest nakupljanja holesterol estara i *Shwachman-Bodian-Diamond* sindrom. Na osnovu spektra i učestalosti varijanti u genima uzročnicima GSD, konstruisan je genetički algoritam koji omogućava brzu, laku i preciznu detekciju patogenih varijanti. Kod pacijenata obolelih od GSD tip Ia u genu *G6PC* detektovane su dve poznate patogene varijante, p.Arg83Cys i p.Leu173Pro, dok je kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib u genu *SLC37A4* detektovano sedam različitih varijanti, među kojima su 3 poznate varijante p.Asn27Lys, p.Ser54Arg, p.Leu348Valfs*53, i 4 nove varijante p.Gly83Glu, p.Gly135Asp, p.Pro191Ser i p.Ser263Glyfs*33. Pokazano je odsustvo jasne korelacije genotipa i fenotipa kod pacijenata obolelih od GSD tip Ia iz Srbije, međutim prisustvo varijante p.Ser263Glyfs*33 u genu *SLC37A4* nagoveštava da ova promena predstavlja faktor rizika za ranu pojavu neutropenije kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib.

Svi upotrebljeni bioinformatički alati za predviđanje potencijalnog patogenog efekta, ekspresione studije kao i klinička prezentacija bolesti kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib, nedvosmisleno su ukazali da najčešće novootkrivene varijante u genu *SLC37A4* (p.Gly83Glu i p.Ser263Glyfs*33) narušavaju funkciju translokaze G6PT.

Optimizovan je protokol za precizno editovanje genoma upotrebom tehnologije CRISPR/Cas9 i formirana je bubrežna ćelijska linija HEK293FlpIn_SLC37A4_c.248G>A koja se karakteriše odsustvom ekspresije gena *SLC37A4* i predstavlja novi *in vitro* model sistem za GSD tip Ib. Pokazano je da u stanju hroničnog stresa, ćelije pokreću odgovor UPR izazvan stresom ER-a, što dovodi do supresije svih UPR molekularnih markera, i promoviše preživljavanje ćelija (sniženi nivoi ekspresije gena *ATF4*, *DDIT3*, *HSPA5*). Međutim, perzistentni metabolički stres uzrokovan izostankom ekspresije gena *SLC37A4* prevazilazi mehanizme adaptacije ćelije na hronični stres i indukuje apoptozu kroz povišenu ekspresiju pro-apoptotičkih markera (snižen *BCL2/BAX* odnos).

Sveobuhvatnom molekularno-genetičkom analizom pacijenata suspektih na hepatične GSD iz Srbije, postignuta je 100% uspešnost detekcije patogenih varijanti, čime je omogućena rana primena odgovarajuće terapije specifične za genotip pacijenta. Rezultati ove studije ukazali su na postojanje najviše incidence GSD tip Ib do sada zabeležene u svetskim okvirima. Takođe, grupa pacijenata iz Srbije sa GSD tip Ib predstavlja najveću nacionalnu kohortu obolelih od ove retke bolesti. Rezultati ove teze istakli su značajnost upotrebe NGS tehnologije za postavljanje precizne dijagnoze GSD i diferencijalne dijagnoze kod pacijenata sa preklapajućim fenotipovima. Ovo je prva studija koja se bavi ispitivanjem uloge molekularnih markera stresa ER-a i apoptoze u patogenezi GSD tip Ib. Takođe, rezultati ove studije dodatno rasvetljavaju molekularne mehanizme stresa ER-a, UPR i apoptoze i njihove povezanosti sa bubrežnim komplikacijama kod pacijenata sa GSD tip Ib. Štaviše, novi *in vitro* model sistem bi mogao biti koristan za proučavanje patogeneze GSD tip Ib i potencijalnih targeta za molekularnu terapiju dizajniranu da koriguje metaboličke abnormalnosti povezane sa disfunkcijom bubrega kod pacijenata obolelih GSD tip Ib.

Ključne reči: Hepatične glikogenoze, gen *SLC37A4*, sekvenciranje nove generacije, genotip-fenotip korelacija, tehnologija CRISPR/Cas9, stres endoplazmatičnog retikuluma, apoptoza.

Naučna oblast: Molekularna biologija eukariota

Uža naučna oblast: Molekularna genetika

UDK broj: 616-053.2:575.113.1:[616.36-008.6:612.122]:[575.21:575.22](043.3)

Genomic profiling of pediatric patients with hepatic glycogenesis: genotype-phenotype correlation and functional characterization of novel variants

Abstract

Hepatic glycogen storage diseases (GSD) are inherited disorders of glycogen synthesis or degradation, which primarily affect the liver and kidneys. GSD type I is one of the most common types and takes a special place in the group of these diseases due to a recognizable clinical phenotype that clearly reflects the complex pathophysiology of disorders in glycogen metabolism. GSD type Ia and type Ib are due to a deficiency of an enzyme glucose-6-phosphatase α (G6Pase- α or G6PC) and endoplasmic reticulum (ER) glucose-6-phosphate translocase (G6PT or SLC37A4), respectively. G6Pase- α and G6PT form a functional complex on the ER membrane, that maintenance the blood glucose homeostasis between the meals, and its deficiency results in excessive accumulation of glycogen in the liver, kidney, and intestinal mucosa, leading to the hypoglycemia, hyperlactatemia, hyperlipidemia, hyperuricemia, and hepatomegaly. These metabolic abnormalities result in long-term complications of kidney diseases and hepatocellular adenomas/carcinoma, whose molecular mechanisms are poorly understood. Patients with GSD type Ib, also develop neutropenia and dysfunction of neutrophils and macrophages followed by recurrent bacterial infections, and symptoms of inflammatory bowel disease like Crohn's disease. Considering the pathophysiological consequences of this metabolic stress, the adaptive responses and molecular markers which cells activate under such conditions are of great interest. It is known that disturbance of ER homeostasis, resulting from a loss of intracellular glucose production, leads to the chronic activation of the unfolded protein response (UPR), which contributes to the pathogenesis of many diseases. ER stress is implicated in many chronic diseases, but little is known how the UPR corresponds to the chronic ER stress caused by a deficiency of G6PT. Besides GSD type I, there are six additional hepatic GSD types (0, III, IV, VI, IX and XI), as well as dozens of GSD forms that affect skeletal muscles, heart and other organs. Since the consequences of the disease are serious and irreversible, molecular-genetic testing is crucial for precise diagnosis and applying the appropriate therapy as early as possible.

In this study, for the first time, genomic profiling of 41 patients from 39 unrelated families from Serbia was done. Only patients with clinical symptoms specific to different types of hepatic GSD, as well as 75 control subjects from Serbia, were

included in the study. Since GSD is a group of diseases with a heterogeneous genetic basis and it is necessary to analyze several genes in order to establish a precise diagnosis, in addition to Sanger's sequencing, the Next Generation Sequencing (NGS) was performed. Furthermore, the functional characterization of the novel variants detected in the *SLC37A4* gene responsible for the development of GSD type Ib was accomplished. The expression profile of the *SLC37A4* gene was analyzed in patients and control subjects, which according to sex and age corresponded to the analyzed samples.

In this study, we used the CRISPR/Cas9 precise gene editing method to establish a novel human kidney cell model system for the GSD type Ib. Therefore, we aimed to test if a deficiency of *SLC37A4* gene triggers the activation of the UPR response in the ER of precise edited kidney HEK293FlpIn cells, thus contributing to the pathogenesis of GSD Ib. Furthermore, it was tested whether the disturbance of the G6PT in the precisely edited HEK293FlpIn cell line with the homozygous, human, pathogenic variant c.248G>A in the *SLC37A4* gene leads to the development of chronic ER stress and elevated apoptosis in order to determine the association of these processes with renal complications in GSD type Ib. Using the RT-qPCR method, the expression of molecular markers of the UPR response (*ATF4*, *DDIT3*, *HSPA5*, and *XBP1s*) and apoptosis (*BCL2*, *BAX*) in HDR clones of HEK293FlpIn was measured. The proliferation and viability of the single cell clones were detected using the MTT test.

The genomic profile of analyzed patients identified 5 patients with GSD type Ia, 31 patients with type Ib, and one patient of each types III, VI and IXa. Additionally, in two patients with clinical suspicion of hepatic GSD, the next-generation sequencing revealed known pathogenic variants in non-GSD-associated genes responsible for cholesteryl ester storage disease and Shwachman-Bodian-Diamond syndrome, respectively. Based on the spectrum and frequency of the GSD genetic variants, a genetic algorithm was constructed which enables fast, easy and precise detection of pathogenic variants. Only two known variants were identified in the *G6PC* gene of GSD type Ia patients, p.Arg83Cys and p.Leu173Pro, while seven different variants were detected in the *SLC37A4* gene of GSD type Ib patients, three previously reported in the literature, p.Asn27Lys, p.Ser54Arg, p.Leu348Valfs*53, and 4 novel variants p.Gly83Glu, p.Gly135Asp, p.Pro191Ser and p.Ser263Glyfs*33. Results clearly demonstrated the absence of a genotype-phenotype correlation of GSD type Ia patients from Serbia, but the presence of the variant p.Ser263Glyfs*33 in the *SLC37A4* gene suggests that this variant represents a risk factor for the early development of neutropenia in GSD type Ib patients.

Computational, expression analysis and clinical presentation in patients undoubtedly confirmed the pathogenic effect of the most common novel variants (p.Gly83Glu and p.Ser263Glyfs*33) in *SLC37A4* gene.

Protocol for precise genome editing was optimized using CRISPR/Cas9 technology and the renal cell line HEK293FlpIn_*SLC37A4*_c.248G>A, characterized by the absence of *SLC37A4* gene expression, represents the new *in vitro* model system for the GSD type Ib. It has been shown that chronic stress triggers an ER-induced UPR response, leading to a suppression of all UPR molecular markers, and promoting cell survival (expression levels of *ATF4*, *DDIT3*, *HSPA5* were decreased). However, the persistent metabolic stress caused by the absence of *SLC37A4* gene expression exceeds the mechanisms of cell adaptation to chronic stress and induces apoptosis through increased expression of pro-apoptotic markers (*BCL2/BAX* ratio was decreased).

Comprehensive molecular-genetic analysis of patients with clinical suspicion of hepatic GSD from Serbia achieved 100% mutation detection rate, allowing early application of appropriate therapy specific to the patient's genotype. Results of this study revealed the highest worldwide incidence of GSD type Ib. Also, a group of patients from Serbia with GSD type Ib is the largest national cohort of patients with this rare metabolic disease. The results of this thesis supported the usefulness of NGS for correct diagnostics of hepatic GSD and differential diagnosis in patients with overlapping phenotypes. This is the first study of the role of ER stress molecular markers and apoptosis in the pathogenesis of the GSD type Ib. Also, the results of this study further illuminate the molecular mechanisms of the ER stress, UPR, and apoptosis associated with renal complications in patients with GSD Ib. Moreover, the new *in vitro* model system could be significant for understanding the pathogenesis of the GSD type Ib and exploring the potential molecular therapeutic targets designed to correct metabolic abnormalities associated with renal complications in patients with GSD type Ib.

Keywords: Hepatic glycogenosis, *SLC37A4* gene, Next Generation Sequencing, genotype-phenotype correlations, CRISPR/Cas9 technology, endoplasmic reticulum stress, apoptosis.

Research area: Molecular biology of eukaryotes

Area of special interest: Molecular genetics

UDK number: 616-053.2:575.113.1:[616.36-008.6:612.122]:[575.21:575.22](043.3)

LISTA SKRAĆENICA

- ABL1 – eng. *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*
ACMG – eng. *American College of Medical Genetics and Genomics*
ak – aminokiselina
ATF4 – aktivirajući transkripcioni faktor 4 (eng. *Activating Transcription Factor 4*)
ATF6 – aktivirajući transkripcioni faktor 6 (eng. *Activating Transcription Factor 6*)
ATP – adenozin-3-fosfat
BAM – eng. *Binary Alignment/Map*
Bax – Bcl2 asocirani protein X (eng. *Bcl2 Associated X protein*)
Bcl-2 – faktor B ćelijski limfom 2 (eng. *B cell lymphoma-2 factor*)
BDGP – eng. *Berkeley Drosophila Genome Project*
BiP – imunoglobinski vezujući protein (eng. *Immunoglobulin Binding Protein*), isto što i Grp78
bp – bazni par
CHOP – C/EBP α -homologi protein (eng. *C/EBP α -homologous protein*)
CRISPR/Cas9 – eng. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated protein 9*
DANN – eng. *Deleterious Annotation of genetic variants using Neural Networks*
DDIT3 – eng. *DNA Damage Inducible Transcript 3*, isto što i CHOP
ddNTP – didezoksiribonukleotid
DMSO - dimetilsulfoksid
dNTP – dezoksiribonukleotid
DSB – dvolančani prekid (eng. *Double-Stranded Breaks*)
DTT - ditiotreitol
eIF2 α – eukariotski faktor inicijacije translacije 2 α (eng. *eukaryotic Initiation Factor 2 α*)
ER – endoplazmatični retikulum
ERSS – ER senzori stresa (eng. *Endoplasmatic Reticulum Stress Sensors*)
ESS – prigušivač mesta splajsovanja egzona (eng. *Exonic Splicing Silencer*)
FATHMM-MLK – eng. *Functional Analysis through Hidden Markov Models*
FCNHG – fatalna urođena nelizozomska srčana glikogenoza (eng. *Fatal Congenital Non-lysosomal Heart Glycogenesis*)
FDA – Administracija za hranu i lekove (eng. *Food and Drug Administration*)
FHC – familijarna hipertrofična kardiomiopatija (eng. *Familial hypertrophic cardiomyopathy*)
G6P – glukozo-6-fosfat
-

G6Paza- α ili G6PC – glukoza-6-fosfataza α
G6Paza- β ili G6PC3 – glukoza-6-fosfataza β
G6PT ili SLC37A4 – glukoza-6-fosfat translokaza
GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
G-CSF – faktor stimulacije granulocitnih kolonija (eng. *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*)
Grp78 – glukozom regulisani protein 78 kDa (eng. *Glucose-regulated protein 78*), isto što i BiP
GSD – Glikogenoze ili bolest skladištenja glikogena
GSD tip I – von Gierkeova bolest
GSD-Irs – sindrom sličan glikogenozu tip I (eng. eng. *GSD I related syndrome*)
HDR – reparacija homologom rekombinacijom (eng. *Homology Directed Repair*)
HEK293FlpIn - humana embrionalna bubrežna ćelijska linija 293FlpIn T-REx (eng. *Human Embryonic Kidney cell line 293FlpIn T-Rex*)
HSF – eng. *Human Splicing Finder*
HSPA5 – eng. *Heat Shock Protein Family A Member 5*, isto što i Bip i Grp78
IRE1 – enzim 1 koji zahteva inozitol (eng. *Inositol-Requiring Enzyme 1*)
JNK1 – c-Jun N-terminalna kinaza 1 (JNK, eng. *C-Jun N-Terminal Kinase 1*)
LIPA – bolest skladištenja holesterola estara (eng. *Cholesteryl ester storage disease*)
MTT - 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-tetrazolijum bromid
MutPred2 – eng. *Mutation Predictor version 2*
NGS – sekvenciranje nove generacije (eng. *Next Generation Sequencing*)
NHEJ – nehomologo sparivanje krajeva (eng. *Non-Homologous End Joining*)
NMD - eng. *Nonsense-Mediated mRNA Decay*
nt – nukleotid
PAM – protospeser susjedni motiv ili PAM region (eng. *Protospacer Adjacent Motif*)
PCR – lančana reakcija polimeraze (eng. *Polimerase Chain Reaction*)
PERK – pankreasna ER kinaza (eng. *Pancreatic ER Kinase*)
P_i – neorganski fosfat
PolyPhen-2 – eng. *Polymorphism Phenotyping version 2*
PROVEAN – eng. *Protein Variation Effect Analyzer*
rAAV – rekombinantni adeno-asocirani virusni vektor (eng. *recombinant Adeno-Associated Virus vector*)
RFLP (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*)
RT-PCR – reverzna transkripcija (eng. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)
RT-qPCR – kvantitativni PCR u realnom vremenu (eng. *Real-Time quantitative PCR*)

SBDS – egzokrina insuficijencija pankreasa (eng. *Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome*)

SBS – sekvenciranje sintezom (eng. *Sequencing by Synthesis*)

SCN4 – težak kongenitalni neutropenijski sindrom tip 4, isto što i GSD-Irs

sgRNA – mali vodič RNK molekul (eng. *Single-Guide RNA*)

SIFT – eng. *Sorts Intolerant From Tolerant*

SNVs – pojedinačne nukleotidne varijante (eng. *Single Nucleotide Variants*)

ssODN – jednolančani DNK oligonukleotid (eng. *Single-Stranded Donor Oligonucleotide*)

tracrRNK – transaktivirajuća crRNK (eng. *trans-activating crRNA*)

VCF – eng. *Variant Call Format*

WPWS – *Wolff Parkinson White* sindrom

WT – eng. *wild type*

XBP1 – X boks-vezujući protein 1 (XBP1, eng. *X box-binding protein 1*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Metabolizam glikogena	2
1.2. Bolesti taloženja glikogena	5
1.2.1. Hepatične glikogenoze	8
1.3. Glikogenoza tip I	10
1.3.1. Istorijski osvrt i opšte karakteristike	10
1.3.2. Metabolički poremećaji GSD tip I	12
1.3.3. Kliničke manifestacije GSD tip I	14
1.3.4. Gen <i>G6PC</i> i deficijencija enzima G6Paze- α	17
1.3.5. Gen <i>SLC37A4</i> i deficijencija enzima G6PT	20
1.3.6. Neutropenija kod GSD tip Ib pacijenata	24
1.3.7. Terapijski pristupi kod GSD tip I	27
2. CILJEVI	29
3. MATERIJAL I METODE	32
3.1. Ispitanici	33
3.2. Metode za detekciju genetičkih varijanti u genima uzročnicima GSD	34
3.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi	34
3.2.2. Amplifikacija regiona DNK od interesa metodom PCR	34
3.2.3. Analiza PCR produkata elektroforezom na agaroznom gelu	36
3.2.4. Sekvenciranje po Sangeru	36
3.2.5. Sekvenciranje nove generacije (NGS)	38
3.2.5.1. <i>Formiranje biblioteke DNK</i>	38
3.2.5.2. <i>Reakcija sekvenciranja</i>	38
3.2.5.3. <i>Analiza podataka</i>	40
3.2.6. <i>In silico</i> analiza detektovanih varijanti	41
3.3. Metode za funkcionalnu karakterizaciju novootkrivenih varijanti	43
3.3.1. Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi	43
3.3.2. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija	43
3.3.3. Reverzna transkripcija	44
3.3.3.1. <i>Identifikacija transkripata SLC37A4 kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib: nested-PCR i RT-PCR</i>	45

3.3.4. Analiza ekspresije gena metodom kvantitativnog PCR u realnom vremenu (RT-qPCR)	46
3.3.4.1. Apsolutna kvantifikacija	48
3.3.4.2. Relativna kvantifikacija	48
3.3.5. Formiranje <i>in vitro</i> model sistema za GSD tip Ib – tehnologija CRISPR/Cas9 i <i>knockin</i> pristup	49
3.3.5.1. Čelijska linija i uslovi gajenja	53
3.3.5.2. Ekspresioni sistemi	54
3.3.5.3. Bakterijski soj	55
3.3.5.4. Dizajniranje komponenti za editovanje genoma	55
3.3.5.5. Priprema ekspresionog konstrukta <i>PX459_sgRNK</i>	57
3.3.5.6. Transfekcija čelijske linije <i>HEK293FlpIn</i>	60
3.3.5.7. Genotipizacija klonalnih čelijskih linija	61
3.3.5.8. Analiza <i>off-targeta</i>	62
3.3.5.9. Analiza ekspresije gena <i>SLC37A4</i> u HDR klonovima čelijske linije <i>HEK293FlpIn</i>	62
3.4. Metode za detekciju stresa edoplazmatičnog retikuluma i apoptoze u novom <i>in vitro</i> model sistemu za GSD tip Ib	64
3.4.1. Analiza ekspresije markera stresa ER-a i apoptoze u HDR klonovima čelijske linije <i>HEK293FlpIn_SLC37A4_c.248G>A</i>	64
3.4.2. MTT test	64
3.4.3. Statistička obrada podataka	65
4. REZULTATI	66
4.1. Genomsko profilisanje pacijenata suspektnih na GSD u Srbiji	67
4.1.1. Demografski i osnovni klinički parametri ispitanika	67
4.1.2. Detekcija varijanti u genima <i>G6PC</i> i <i>SLC37A4</i>	68
4.1.2.1. Kliničke manifestacije pacijenata sa GSD tip Ib koji su nosioci novootkrivenih varijanti u genu <i>SLC37A4</i>	70
4.1.3. Uspostavljanje diferencijalne dijagnoze GSD	72
4.2. Karakterizacija novootkrivenih varijanti u genu <i>SLC37A4</i>	74
4.2.1. Bioinformatička analiza novootkrivenih varijanti u genu <i>SLC37A4</i>	74
4.2.2. Ispitivanje uticaja varijante c.785G>A u genu <i>SLC37A4</i> na alternativno splajsovanje	81
4.2.3. Ispitivanje uticaja varijante c.785G>A na nivo ekspresije gena <i>SLC37A4</i>	82
4.2.4. Karakterizacija c.248G>A varijante u novom <i>in vitro</i> model sistemu za GSD tip Ib	83
4.2.5. Ispitivanje uticaja varijante c.248G>A na nivo ekspresije gena <i>SLC37A4</i> u HDR klonovima čelijske linije <i>HEK293FlpIn</i>	85
4.3. Analiza molekularnih markera stresa ER-a i apoptoze u <i>in vitro</i> model sistemu za GSD tip Ib	87

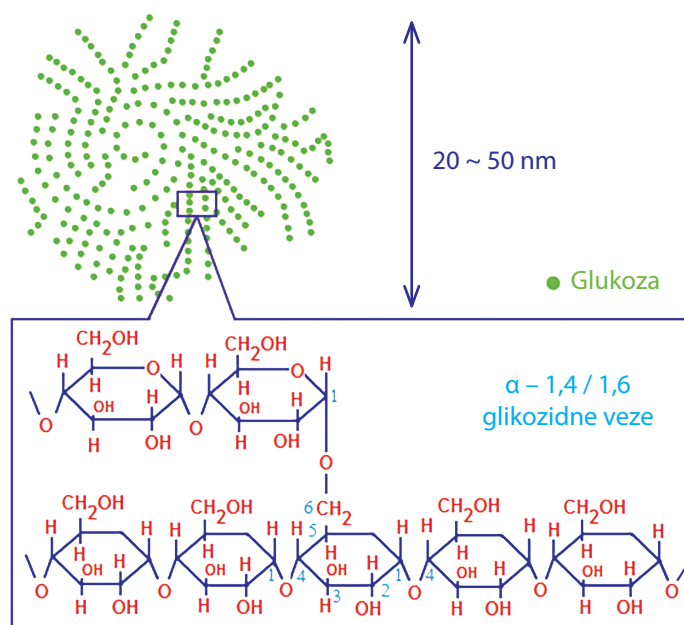
5. DISKUSIJA	90
5.1. Genomski profil pacijenata dečijeg uzrasta sa hepatičnim GSD u Srbiji	91
5.1.1. Epidemiološki podaci i kliničke manifestacije pacijenata obolelih od GSD tip I ...	91
5.1.2. Spektar i učestalost detektovanih varijanti u genu <i>G6PC</i> kod pacijenata obolelih od GSD tip Ia iz Srbije	92
5.1.3. Korelacija genotipa i fenotipa kod pacijenata obolelih od GSD tip Ia iz Srbije ...	93
5.1.4. Spektar i učestalost detektovanih varijanti u genu <i>SLC37A4</i> kod GSD tip Ib pacijenata iz Srbije	94
5.1.5. Nove varijante u genu <i>SLC37A4</i>	95
5.1.6. Korelacija genotipa i fenotipa kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib iz Srbije ...	98
5.1.7. Određivanje strategije za uspostavljanje rutinske molekularno-genetičke dijagnostike hepatičnih glikogenoza u Srbiji.	99
5.2. Funkcionalna karakterizacija novootkrivenih varijanti u genu <i>SLC37A4</i> kod GSD tip Ib pacijenata iz Srbije	102
5.2.1. Funkcionalna analiza varijante c.785G>A (p.Gly262Asp ili p.Ser263Glyfs*33) u genu <i>SLC37A4</i>	102
5.2.2. Funkcionalna analiza nove varijante c.248G>A (p.Gly83Glu) u genu <i>SLC37A4</i> ..	104
5.3. Stres ER-a i apoptoza u GSD tip Ib <i>in vitro</i> model sistemu.	106
6. ZAKLJUČCI	110
7. LITERATURA	114

1. UVOD

1.1. Metabolizam glikogena

Glukoza je primarni izvor energije za većinu ćelija sisara, stoga je održavanje njene homeostaze neophodno za normalno funkcionisanje organizma. Koncentracija glukoze u krvi održava se na tri različita načina: ishranom, razgradnjom glikogena i glukoneogenezom. S obzirom da je unos glukoze i njenih prekursora kroz ishranu sporadičan, a glukoneogeneza proces koji zahteva određeno vreme i ne može se javiti u brzom odgovoru na pad nivoa šećera u krvi, glikogen predstavlja primarni rezervoar glukoze u organizmu [Chen i sar., 2006; 2016].

Glikogen ili „životinjski skrob” je rezervni homopolisaharid razgranatog lanca, prisutan u svim ćelijama organizma, ali su glavni rezervoari jetra i skeletni mišići. Glikogen formira granule u citoplazmi ćelija vidljive pod elektronskim mikroskopom. Izgrađen je od α -D-glukoza jedinica koje su međusobno povezane α -1,4-glikozidnim vezama, dok se na mestima grananja uspostavljaju α -1,6-glikozidne veze (Slika 1). Mesta grananja glikogena nalaze se na svakih 4 do 10 glukoza jedinica [Rybicka, 1996]. Postoje različiti oblici glikogena u zavisnosti od tkiva u kome se skladišti. U skeletnim mišićima, glikogen formira β čestice sfernog oblika, veličine od 10-44 nm u prečniku koje se sastoje do 60.000 glukoza ostataka. Jetra sadrži rozete glikogena, α čestice, koje izgledaju kao agregirane β čestice i mogu biti veličine oko 110-290 nm u prečniku. Ove čestice predstavljaju dinamične ćelijske organele nazvane glikozomi i sastoje se od proteinske komponente glikogenina, koji obezbeđuje enzimsku aktivnost organele i glikogena koji je proizvod njegove aktivnosti [Rybicka, 1996; Roach, 2002; Chen i sar., 2006].

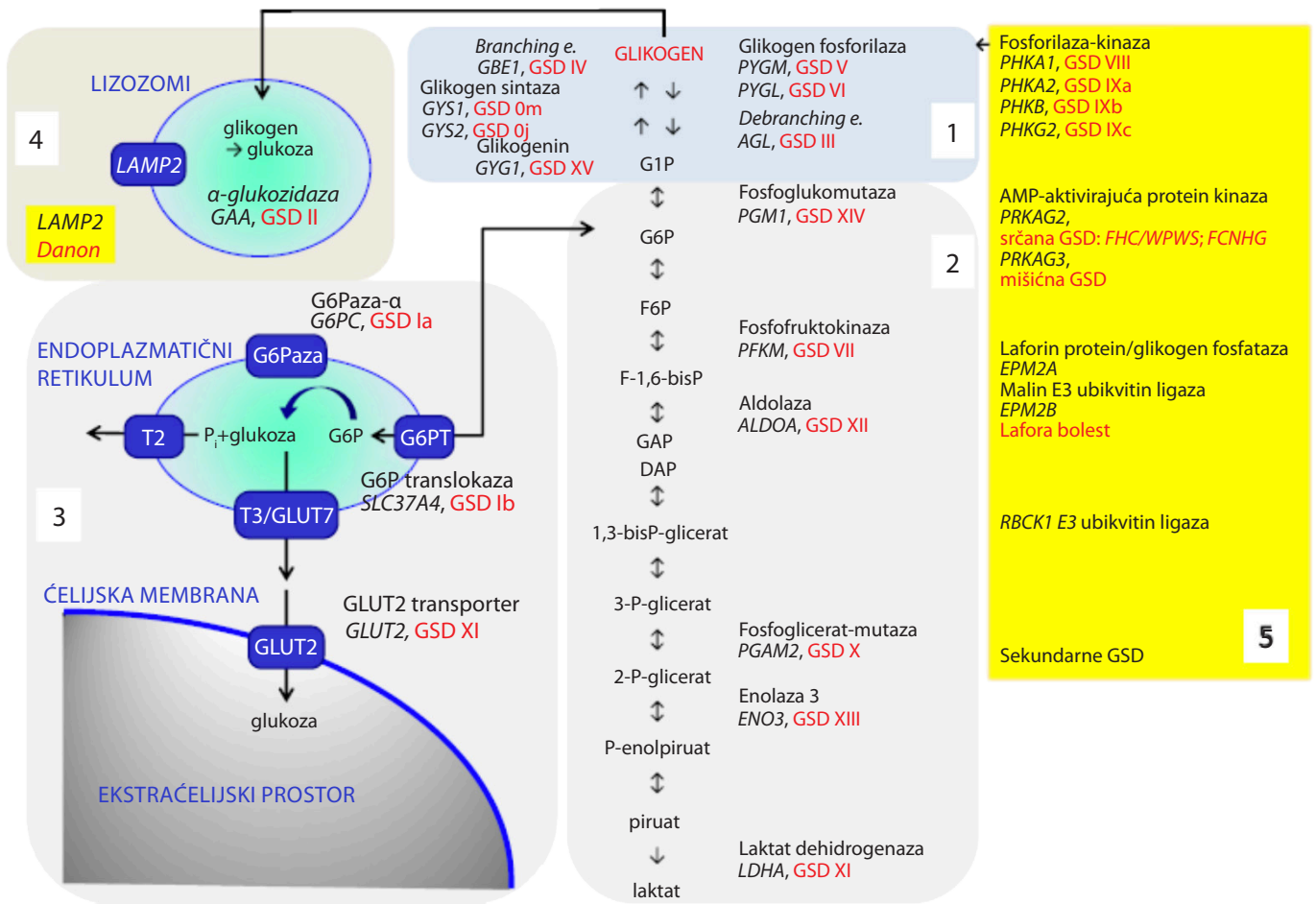


Slika 1. Šematski prikaz strukture glikogena. Preuzeto i modifikovano sa [\[https://chemistry.tutorvista.com/organic-chemistry/glycogen.html\]](https://chemistry.tutorvista.com/organic-chemistry/glycogen.html).

Glikogen se sintetiše u citosolu ćelija jetre i bubrega u procesu zavisnom od adenozin-3-fosfata (ATP), dok se njegova razgradnja odvija u citoplazmi i unutar lizozoma. Glukoneogeneza i razgradnja glikogena recipročno su regulisani kako ne bi došlo do beskorisne proizvodnje energije u organizmu, a istovremeno da se zadovolje potrebe živog sistema. Pri visokoj koncentraciji glukoze u krvi, u jetri se procesi usmeravaju ka konzervaciji energije i stimuliše se biosinteza glikogena. U odsustvu glukoze, u fazi gladovanja, glikogen iz jetre brzo se razgrađuje na glukozu i otpušta u krv za potrebe tkiva koja ne mogu da proizvedu značajne količine glukoze za kratko vreme (npr. mozak, mišići i eritrociti). Glikogen skladišten u skeletnim mišićima degraduje se i koristi za stvaranje ATP-a neophodnog za kontrakciju mišića. U mozgu, glikogen obezbeđuje hitno snabdevanje energijom za upotrebu tokom kratkih perioda hipoglikemije ili hipoksije. Kada su rezerve glikogena iscrpljene, može doći do glukoneogeneze u specifičnim tkivima, omogućavajući *de novo* sintezu glukoze koristeći glukogene amino kiseline iz proteina zajedno sa laktatom iz bubrega i mišića, kako bi se održao potreban nivo glukoze u krvi [Chen i Weinstein, 2016].

Deficijencija proteina uključenih u metabolizam glikogena i njegovu regulaciju rezultiraju u širokom spektru kliničkih poremećaja među kojima su urođene bolesti metabolizma označene kao bolesti nakupljanja glikogena ili glikogenoze. Pregled metaboličkih puteva glikogena i različitih tipova glikogenoza prikazan je na Slici 2. Tokom proteklih 50 godina, mnogobrojne studije ovih genetskih nedostataka dovele su do znatno boljeg razumevanja mehanizama delovanja proteina uključenih u metabolizam glikogena i njegovu regulaciju. Napredak u razumevanju molekularne osnove različitih genetskih nedostataka koji su uzročnici ove grupe oboljenja, omogućava precizno uspostavljanje dijagnoze i predviđanje kliničkog toka i ishoda bolesti karakterističnog za određeni tip glikogenoza. Gledajući duži vremenski period, molekularne studije ove grupe oboljenja mogle bi da dovedu do kreiranja uspešne genske terapije za teže oblike ovih bolesti.

Geni i proteini uključeni u razvoj glikogenoza



Slika 2. Pregled metaboličkih puteva glikogena. Glikogenoze (GSD) mogu biti uzrokovane defektima proteina koji učestvuju u sintezi ili razgradnji glikogena (1), u glikolitičkoj degradaciji glukoznih fosfata u mišićima i eritrocitima (2), u oslobađanju glukoze iz jetre i bubrega u krvotok (3), u lizozomskom klirensu glikogena (4) ili u regulaciji ovih puteva (5). FHC/WPWS - familijarna hipertrofična kardiomiopatija (eng. Familial hypertrophic cardiomyopathy)/Wolff Parkinson White sindrom; FCNHG, fatalna urođena nelizozomska srčana glikogenoza (eng. Fatal Congenital Non-lysosomal Heart Glycogenosis). Preuzeto i modificirano iz [Kilimann i Oldfors, 2015].

1.2. Bolesti taloženja glikogena

Bolesti taloženja glikogena ili glikogenoze (GSD, eng. *Glycogen Storage Disease*) predstavljaju grupu urođenih poremećaja metabolizma ugljenih hidrata koji nastaju usled deficitarne aktivnosti enzima ili transportnih proteina uključenih u sintezu ili razgradnju glikogena. Histološki se manifestuju abnormalnom količinom glikogena u ćelijama koji je takođe abnormalne strukture [Kilimann i Oldfors, 2015]. Biohemijska klasifikacija GSD omogućena je tek kada su se razjasnili detaljni mehanizmi puteva metabolizma glikogena. Tokom proteklih 50 godina, otkriveni su gotovo svi proteini koji su uključeni u sintezu ili razgradnju glikogena i regulaciju metabolizma glikogena. Postoji više tipova ove bolesti, svaki se karakteriše zasebnim genetičkim i biohemijskim defektom, vremenom ispoljavanja prvih simptoma, različitom težinom kliničke slike i ishodom bolesti [Chen i sar., 2006; Hicks i sar., 2011; Adeva-Andany i sar., 2016; Chen i Weinstein, 2016]. Klinička slika GSD je heterogena i kreće se u rasponu poremećaja koji ne zahtevaju lečenje do vrlo teških oblika za koje ne postoji specifična terapija. Postoje tipovi GSD koji se ispoljavaju u neonatalnom periodu i karakteriše ih teška insuficijencija jetre ili respiratorna insuficijencija koja dovodi do smrtnog ishoda već u prvoj godini života. Na drugom kraju spektra nalaze se blagi poremećaji koji su gotovo asimptomatski (karakteriše ih neprogresivna hepatomegalija ili umanjena tolerancija fizičkog napora) i prepoznaju se u adolescenciji ili odraslom dobu [Hicks i sar., 2011].

Iako je teško precizno odrediti učestalost, na osnovu podataka iz različitih evropskih studija procenjena je ukupna učestalost GSD na 1:20.000 – 25.000 živorođenih [Chen i Kishnani, 1998; Chen i sar., 2006; Kishnani i sar., 2014], među kojima je najčešći oblik GSD tip IX [Rodriguez-Jimenez i sar., 2017]. Takođe, tipovi I, II, III, VI i IX čine preko 90% svih slučajeva. Klasifikacija GSD bazira se na hronološkom redosledu otkrivanja deficitarnih enzima [Chen i sar., 2006]. S obzirom da su glavna mesta skladištenja glikogena u organizmu jetra i skeletni mišići, u literaturi postoji opšta podela na tzv. hepatične, mišićne i generalizovane GSD [Smit i sar., 2000; Rake i sar., 2006]. Pojedini tipovi ispoljavaju se kao monosistemske bolesti (npr. GSD tip V), dok većina zahvata više organa i organskih sistema [Chen i Weinstein, 2016], tako da je da opšta podela GSD neadekvatna. Ipak, u kliničkim okvirima, može se govoriti o GSD koje primarno oštećuju jetru i GSD kod kojih su glavna mesta nakupljanja glikogena skeletni mišići. Do sada je otkriveno najmanje 15 tipova GSD, a kratak pregled njihovih karakteristika prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1. Pregled karakteristika različitih tipova glikogenoza (GSD)

Naziv bolesti	#MIM	Enzimski nedostatak	Gen i način nasleđivanja	Lokacija na hromozomu	Opšta podela (jetra ili mišići)
Glikogenoza tip I (von Girkeova bolest)	232200	Ia: Glukoza-6-fosfataza α	<i>G6PC</i> , AR	17q21.31	Jetra
	232220	Ib: Glukoza-6-fosfat translokaza	<i>SLC37A4</i> , AR	11q23.3	
Glikogenoza tip II (Pompeova bolest)	232300	α -1,4-glukozidaza	<i>GAA</i> , AR	17q25.3	Mišići
Glikogenoza tip IIb (Danonova bolest)	300257	Membranski protein 2 asociran sa lizozomom	<i>LAMP2</i> , XD	Xq24	Mišići
Glikogenoza tip III (Cori-Forbsova bolest)	232400	Amilo- α -1,6-glukozidaza	<i>AGL</i> , AR	1p21.2	Jetra i mišići
Glikogenoza tip IV (Andersenova bolest)	232500	Amilo-(1,4 \rightarrow 1,6)-transglikozilaza	<i>GBE1</i> , AR	3p12.3	Jetra i mišići
Glikogenoza tip V (McArdleova bolest)	232600	Miofosforilaza	<i>PYGM</i> , AR	11q13.1	Mišići
Glikogenoza tip VI (Hersova bolest)	232700	Glikogen fosforilaza	<i>PYGL</i> , AR	14q22.1	Jetra
Glikogenoza tip VII (Taruijeva bolest)	232800	Fosfofruktokinaza	<i>PFKM</i> , AR	12q13.11	Mišići
Glikogenoza tip VIII (ili tip IXd)	300559	Fosforilaza-kinaza α 1	<i>PHKA1</i> , XR	Xq13.1	Jetra
	306000	IXa: Fosforilaza-kinaza α 2	<i>PHKA2</i> , XR	Xp22.13	
Glikogenoza tip IX	261750	IXb: Fosforilaza-kinaza β	<i>PHKB</i> , AR	16q21.1	Jetra
	613027	IXc: Fosforilaza-kinaza γ	<i>PHKG2</i> , AR	16p11.2	
Glikogenoza tip X	261670	Fosfoglicerat-mutaza	<i>PGAM2</i> , AR	4p14	Mišići
Glikogenoza tip XI (Fanconi-Bickel sindrom)	227810	GLUT2 transporter	<i>SLC2A2</i> , AR	3q26.2	Jetra i mišići
Glikogenoza tip XII	611881	Aldolaza A	<i>ALDOA</i> , AR	16p11.2	Mišići
Glikogenoza tip XIII	612932	Enolaza 3	<i>ENO3</i> , AR	17p13.2	Mišići
Glikogenoza tip XIV	614921	Fosfoglukomutaza 1	<i>PGM1</i> , AR	1p31.3	Mišići
Glikogenoza tip XV	613507	Glikogenin 1	<i>GYG1</i> , AR	3q24	Mišići
	611556	Glikogen sintaza	<i>GYS1</i> , AR	19q13.33	
Glikogenoza tip 0	240600	Glikogen sintaza	<i>GYS2</i> , AR	12p12.1	Jetra

Legenda: AR - autozomno recesivno, XR - X vezano recesivno, XD - X vezano dominantno

Najvažnija laboratorijska abnormalnost koja se detektuje kod obolelih od hepatičnih oblika GSD je hipoglikemija. Pacijenti oboleli od mišićnih GSD ispoljavaju mišićnu slabost (hipotoniju), zamaranje, smanjenu toleranciju fizičkog napora, grčeve u mišićima, a laboratorijski se detektuju povišene vrednosti mišićnih enzima [Rake i sar., 2006; Ozen, 2007]. Mnogi organi i organski sistemi, pored jetre i mišića, mogu biti pogođeni u GSD, kao što su poremećaji u funkciji bubrega (uvećanje bubrega, hronična bubrežna insuficijencija), srca (kardiomiopatija), perifernog i centralnog nervnog sistema, kostne srži (mijeloidna disfunkcija, neutropenija) [Ozen, 2007; Hicks i sar., 2011; Chen i Weinstein, 2016].

Uspostavljanje dijagnoze zasniva se na detekciji specifične kombinacije kliničkih i biohemijskih parametara, histopatoloških nalaza, a konačna potvrda bolesti zahteva molekularno-genetičke metode. U zavisnosti od specifičnog tipa GSD, nedostatak enzima može se otkriti u jetri, mišićima, fibroblastima kože i krvnim ćelijama. U poslednjoj deceniji, analiza DNK postala je primarna metoda za dijagnostikovanje GSD [Kishnani i sar., 2014; Chen i Weinstein, 2016]. Upotrebom revolucionarne tehnologije sekvenciranja nove generacije (eng. *Next Generation Sequencing*, NGS) za precizno, masivno, paralelno sekvenciranje hiljade gena, omogućeno je određivanje genomskog profila pacijenata sa hepatičnim glikogenozama za vrlo kratko vreme. Takođe, metoda NGS našla je svoju primenu u uspostavljanju diferencijalne dijagnoze kod pacijenata sa preklapajućim patološkim fenotipovima [Di Resta i sar., 2018].

Molekularno-genetičko testiranje danas predstavlja zlatni standard za precizno uspostavljanje dijagnoze. Prednosti ovih analiza su brojne:

- ⇒ ne zahtevaju invazivnu biopsiju tkiva,
- ⇒ za razliku od enzimološke dijagnostike za koju su neophodne značajne količine sveže zamrznutog tkiva, tehnike koje se zasnivaju na analizi DNK ne zahtevaju tako precizno rukovanje senzitivnim uzorcima i velike količine uzorka,
- ⇒ koriste se za određivanje statusa nosioca genetičkih varijanti odgovornih za razvoj određenog tipa GSD, čime je omogućena i prenatalna dijagnostika [Kishnani i sar., 2014; Chen i Weinstein, 2016].

Preduslov za umanjeње morbiditeta i mortaliteta kod obolelih od GSD je rano prepoznavanje prvih simptoma bolesti, uspostavljanje precizne dijagnoze i poštovanje preporuka lekara od strane pacijenata i njihovih porodica [Kishnani i sar., 2014; Bali i sar., 2016].

Lečenje se zasniva na dijetetskom režimu čiji je cilj prevencija hipoglikemije. Loša metabolička kontrola dovodi do čestih akutnih metaboličkih komplikacija i bržeg razvoja hronične bubrežne insuficijencije, osteoporoze i urolitijaze. Nastanak adenoma ili karcinoma jetre su dugoročne posledice taloženja glikogena, pa je od

presudne važnosti precizno uspostavljanje dijagnoze i što ranija primena terapije [Kecman i sar., 2012].

Terapija većine pacijenata sa GSD zasnovana je na specifičnom dijetetskom režimu koji podrazumeva izbegavanje perioda dužeg gladovanja. Farmakološka terapija koristi se za lečenje biohemijskih abnormalnosti (hiperurikemija, hiperlipidemija) i disfunkcije pojedinih organa (srčana i bubrežna insuficijencija, neutropenija) [Bali i sar., 2016]. Fizikalna terapija je u upotrebi kod pacijenata obolelih od mišićnih oblika GSD. Transplantacija jetre ili kombinovana transplantacija jetre i bubrega predstavlja deo lečenja osoba obolelih od GSD u ekspertskim centrima [Labrune, 2002; Marega i sar., 2011]. Takođe, unazad nekoliko godina omogućeno je lečenje Pompeove bolesti (GSD tip II) enzimskom supstitucionom terapijom, što je otvorilo perspektivu genskoj terapiji kod drugih tipova ovog metaboličkog poremećaja [Van den Hout i sar., 2000; Koeberl i sar., 2009].

1.2.1. Hepatične glikogenoze

Poremećaji metabolizma glikogena koji pogađaju uglavnom jetru uključuju GSD tip I, tip III, tip IV, tip VI, tip IX, *Fanconi-Bickel* sindrom (tip XI) i tip 0. Zajednički simptomi za sve hepatične oblike GSD su hipoglikemija, izražena hepatomegalija i usporen telesni rast i razvoj. Mentalni razvoj ovih pacijenata je normalan ukoliko se dijetetskim režimom ishrane održava normoglikemija i time spreči oštećenje mozga koje može nastati hronične hipoglikemije. Većina pacijenata sa GSD tip III razvija hepatično-mišićni oblik bolesti sa generalizovanom miopatijom koja može uključivati i kardiomiopatiju. GSD tip IV se kod većine pacijenata u ranom djetinjstvu manifestuje kao hepatična insuficijencija sa cirozom, što može da dovede do krajnjeg stadijuma bolesti koji zahteva transplantaciju jetre. Kod ostalih pacijenata sa GSD tip IV javljaju se sve vrste kombinacija hepatičnih i mišićnih simptoma bolesti. GSD tip VI i tip IX su najblaži oblici poremećaja metabolizma glikogena. Kod ovih pacijenata uočava se blaga hipoglikemija u periodu između obroka, veličina jetre se normalizuje u odrasloj dobi, a pacijenti dostižu normalnu visinu. Pacijenti oboleli od *Fanconi-Bickel* oblika GSD razvijaju hepatomegaliju, hipoglikemiju, rahitis i tubulopatiju. Prvi simptomi GSD tip 0 uočavaju se u ranom detinjstvu sa pojavom postprandijalne hipoglikemijom, ketoze i hiperlaktacidemije [Fernandes i Smit, 2000; Smit i sar., 2000; Rake i sar., 2006].

GSD tip I je jedan od najčešćih oblika hepatičnih glikogenoza, a i bolesti taloženja glikogena uopšte, bar kada se radi o evropskoj i severnoameričkoj populaciji [Bali D i sar., 2016]. Pored učestalosti, GSD tip I zauzima posebno mesto u grupi GSD

zbog prepoznatljivog kliničkog fenotipa koji jasno odražava složenu patofiziologiju poremećaja u razgradnji glikogena i regulaciji njegovog metabolizma. U narednim poglavljima detaljno će biti opisane kliničke, biohemijske manifestacije ove bolesti, genomski profil pacijenata kao i korelacija genotipa i fenotipa kod obolelih od GSD tip I iz Srbije. Važno je naglasiti da su simptomi koji definišu hepatične glikogenoze (hipoglikemija, hepatomegalija, usporen telesni rast i razvoj) najjasnije prisutni upravo kod ove bolesti koja se iz ovih razloga često označava i kao „klasični” oblik GSD [Ozen, 2007; Bali i sar., 2016; Chen i Weinstein, 2016].

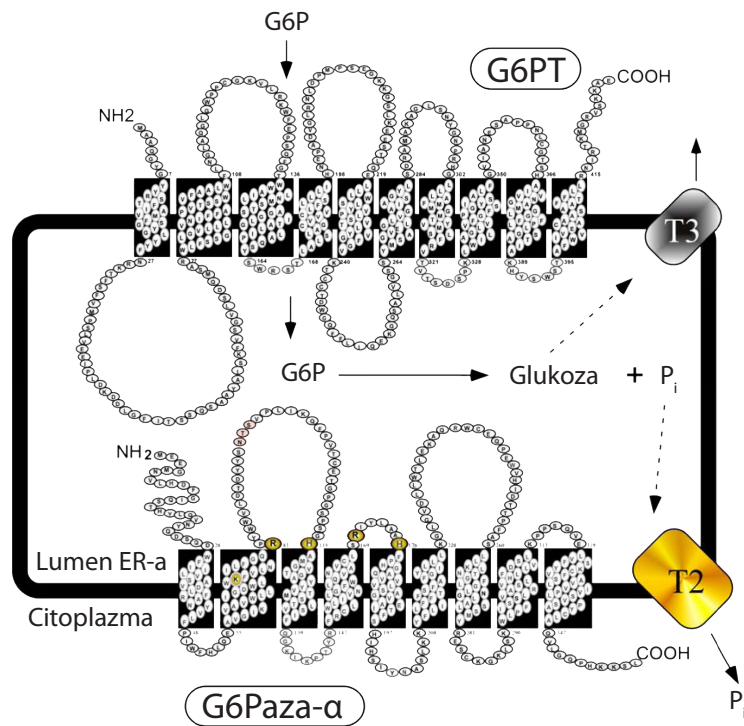
1.3. Glikogenoza tip I

1.3.1. Istorijski osvrt i opšte karakteristike

Prvi klinički opis pacijenta sa defektom u mobilizaciji glikogena zabeležen je 1928. godine od strane holandskih pedijatara Snappesa i Van Crevelda [Snappes i Van Creveld, 1928]. Godinu dana kasnije nemački patolog Edgar von Gierke analizirajući autopsijske uzorke jetre dva pacijenta sa hepatomegalijom i nefromegalijom otkrio je visok sadržaj glikogena u hepatocitama i takvo stanje opisao kao „*hepatonephromegalia glycogenica*” [von Gierke, 1929]. Takođe, pokazao je da se nagomilani glikogen iz jetre pacijenta može rastvoriti dodavanjem usitnjenog tkiva zdrave jetre. Tako je na indirektan način dokazao da je uzrok bolesti enzimski deficit [Schoenheimer, 1929]. Godine 1952. bračni par Cori pokazao je da je odsustvo aktivnosti glukozo-6-fosfataze (G6Paze) enzimski defekt odgovoran za razvoj kliničkih simptoma GSD tip I, i danas poznate kao von Gierkeova bolest. Ovim saznanjem, GSD tip I opisana je kao prvi metabolički poremećaj u kojem je defekt enzima identifikovan kao uzročnik bolesti [Cori i Cori, 1952]. Od 1959. godine opisan je sve veći broj pacijenata koji su imali isti klinički tok kao GSD tip I, ali nisu bili deficijentni u aktivnosti G6Paze u uzorcima jetre i bubrega. Kako bi opisali ovu biohemijsku heterogenost, izvršena je klasifikacija ove bolesti na dva podtipa, GSD tip Ia kod koje je pokazana deficitarna aktivnost G6Paze i na GSD tip Ib koja je predstavljala oblik bolesti sa neizmenjenom funkcijom G6Paze [Senior i Loridan, 1968].

Tada je već bilo poznato da se G6Paza nalazi na membrani endoplazmatičnog retikuluma (ER) i da učestvuje u hidrolizi glukozo-6-fosfata (G6P) na glukozu i neorganski fosfat (P_i). Podaci iz različitih studija 70-tih godina prošlog veka prikazali su da je enzimski aktivnost u intaktnim mikrozomima ćelija jetre i bubrega otporna na delimičnu proteolizu [Nilsson i sar., 1978; Nordlie i sar., 1983; Waddell i Burchell, 1991]. Ovi eksperimenti ukazali su da se aktivno mesto enzima ne nalazi u citoplazmi i da se G6P iz citoplazme mora transportovati kroz membranu u lumen ER kako bi došlo do njegove hidrolize. Takođe, pokazano je da se glukozu i fosfat transportuju nazad u citoplazmu kako bi mogli da se oslobode u krv. To je navelo Arion i sar. da postave hipotezu da je za hidrolizu G6P neophodna koordinisana aktivnost nekoliko integralnih membranskih proteina. Opisali su G6Pazu kao multimerni kompleks enzima koji je u čvrstoj vezi sa ER membranom i nazvali ga „sistem G6Paze” (Slika 3). U ovom modelu, *in vivo* hidroliza G6P vrši se uz pomoć nekoliko membranskih proteina koji uključuju specifičnu translokazu koja vrši transport G6P u lumen ER-a, katalitičku jedinicu G6Paze koja vrši hidrolizu G6P i transporteri za glukozu i fosfat koji produkte hidrolize vraćaju u citoplazmu [Arion i sar., 1972; 1976; 1980]. Na

osnovu ovih postavki, dokazano je da je za poremećaj u transportu G6P u lumen ER-a odgovoran za razvoj GSD tip Ib [Narisawa i sar., 1978; Lange i sar., 1980].



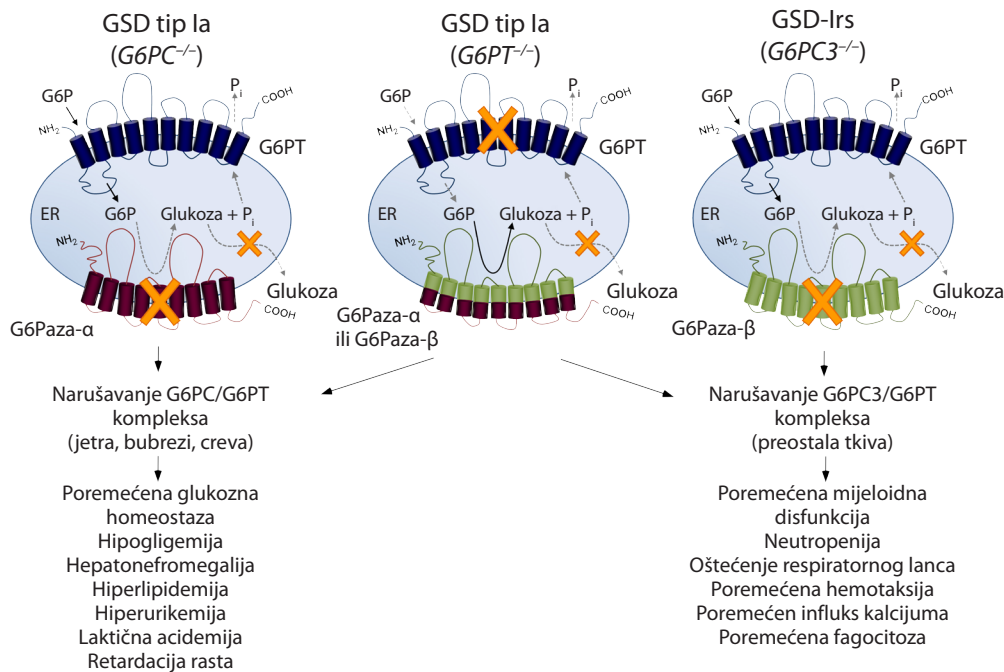
Slika 3. Sistem G6Paze. Enzimski kompleks G6Paze, esencijalan za održavanje homeostaze glukoze u krvi, sastoji se iz katalitičke jedinice G6Paze, G6P translokaze (G6PT), transportera za neorganski fosfat (T2), transportera za glukozu (T3). Ovi proteini nalaze se u membrani ER-a i u kontaktu su sa lumenom ER-a i citoplazmom. Preuzeto i modificirano iz [Chou i Mansfield, 2007].

Predloženi opis sistema G6Paze koji je usklađen sa kliničkim i biohemijskim heterogenostima zabeleženim kod pacijenata sa GSD tip I [Chou, 2001], služio je kao osnova za klasifikaciju ove bolesti na četiri podtipa koje karakterišu deficitarne aktivnosti enzima G6Paze (GSD tip Ia), transportera za G6P koga su označili kao glukozo-6-fosfat translokaza ili G6PT (GSD tip Ib), transportera za fosfat (GSD tip Ic) i transportera za glukozu (GSD tip Id).

Molekularno-genetičke studije sprovedene krajem prošlog veka, potvrdile su da su promene u genima *G6PC* (koji kodira G6Pazu- α) i *SLC37A4* (koji kodira G6PT) odgovorne za razvoj GSD tip Ia [Lei i sar., 1993; 1994] i GSD tip Ib [Gerin i sar., 1997; Hiraiwa i sar., 1999]. Genotipizacijom pacijenata sa GSD tip Ic i Id utvrđeno je da su svi zapravo imali promene u genu *SLC37A4* koje su odgovorne za razvoj GSD tip Ib [Veiga-da-Cunha i sar., 1998; Galli i sar., 1999; 1999; Janecke i sar., 2000]. Ovo saznanje je u skladu sa biohemijskim karakteristikama bolesti i otkrićem da G6PT funkcioniše kod eukariota kao antiporter koji transportuje G6P u lumen ER-a u zamenu za neorganski fosfat [Chen i sar., 2008b].

1.3.2. Metabolički poremećaji GSD tip I

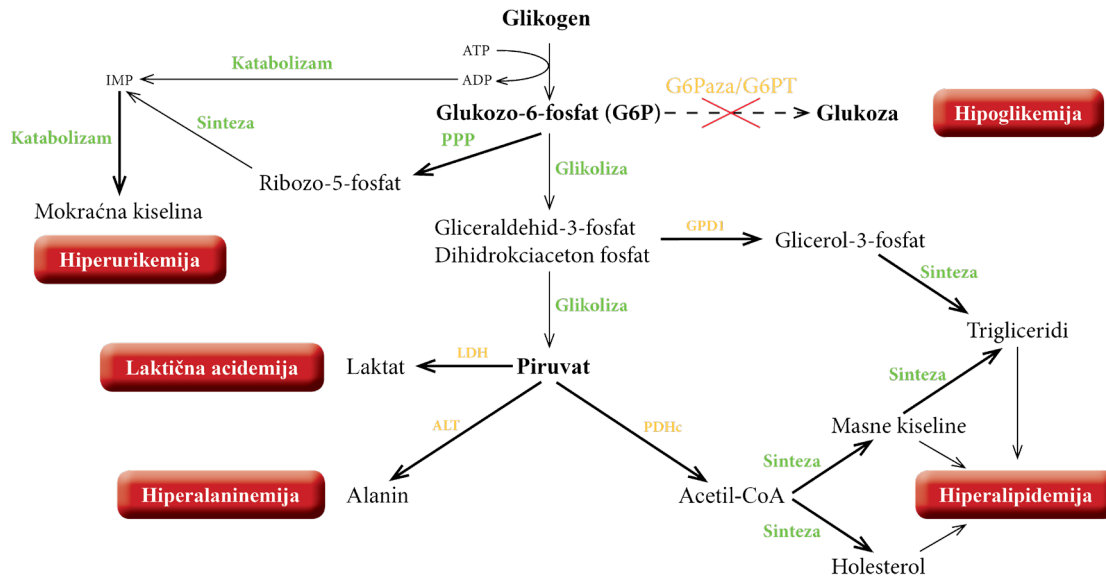
GSD tip I predstavlja grupu autozomno recesivnih oboljenja koja nastaju usled deficitarne aktivnosti funkcionalnog kompleksa koga čine G6Paza- α i G6PT na membrani ER-a [Chou i sar., 2002; 2010a; 2014]. Javlja se sa učestalošću od 1:100.000 živorođenih. Promene u G6Pazi- α (ili G6PC) koja se eksprimira u jetri, bubrezima i intestinalnoj mukozi, dovode do razvoja GSD tip Ia (#MIM232200), dok je GSD tip Ib (#MIM232220) uzrokovana disfunkcijom ubikvitarno eksprimirane G6PT (ili SLC37A4). U proteklih 15 godina, identifikovana je G6Paza za koju je pokazano da se eksprimira u svim tkivima i nazvana je G6Paza- β (ili G6PC3) [Martin i sar., 2002; Shieh i sar., 2003]. Obe izoforme, α i β , katalizuju hidrolizu G6P u lumenu ER-a i predstavljaju ključne enzime za intracelularnu proizvodnju glukoze. Promene u G6Pazi- β dovode do razvoja teškog kongenitalnog neutropenijskog sindroma tip 4 (SCN4, eng. *Severe Congenital Neutropenia 4*; #MIM612541), koji se naziva i sindrom sličan glikogenozii tip I (GSD-Irs, eng. *GSD I Related Syndrome*). Ovaj sindrom karakterišu neutropenija, disfunkcija neutrofila i makrofaga usled oštećenja respiratornog lanca, hemotaksije, mobilizacije kalcijuma i fagocitoze [Cheung i sar., 2007; Boztug i sar., 2009; Jun i sar., 2010; Jun i sar., 2012; Banka i Newman, 2013]. Topološke studije pokazale su da i G6Paza- α [Pan i sar., 1998; Ghosh i sar., 2002] i G6Paza- β [Shieh i sar., 2003; Ghosh i sar., 2004] obuhvataju unutrašnju membranu ER-a, a da se njihova aktivna mesta nalaze unutar lumena ER-a. Shodno tome, za katalizu hidrolize G6P, funkcija obe izoforme fosfataze zavisi od aktivnosti transmembranskog proteina G6PT vezanog za membranu ER-a, koji vrši transport G6P iz citoplazme u lumen ER-a. Pošto se G6PT ubikvitarno eksprimira, različiti fenotipovi koji su zabeleženi kod pacijenata obolelih od GSD tip I odražavaju tkivno-specifične profile ekspresije G6Paze- α ili G6Paze- β i rezultujućih kompleksa G6Paze/G6PT (Slika 4). Funkcionalni kompleks G6PC/G6PT održava homeostazu glukoze u krvi između obroka, dok funkcionalni kompleks G6PC3/G6PT održava energetske homeostazu i funkcionalnost neutrofila i makrofaga [Chou i sar., 2002; Chou i sar., 2010b; Jun i sar., 2010].



Slika 4. Metabolički poremećaji kod pacijenata obolelih od GSD tip I. Varijante u genu $G6PC$ dovode do razvoja GSD tip Ia koju karakteriše metabolički fenotip nastao kao posledica poremećene homeostaze glukoze u krvi. Osnovne patofiziološke manifestacije su hipopoglikemija, hepatomegalija, nefromegalija, hipertrigliceridemija, hiperholesterolemija, hiperurikemija, laktična acidemija i retardacija rasta. Promene u $G6Pazi-\beta$ dovode do razvoja teškog kongenitalnog neutropenijskog sindroma tipa 4 ($SCN4$ ili GSD-Irs), koga karakterišu neutropenija i disfunkcija neutrofila i makrofaga koje uključuje oštećenje respiratornog lanca, hemotaksiju, mobilizaciju kalcijuma i fagocitozu. Varijante u $G6PT$ dovode do razvoja GSD tip Ib, koja deli isti metabolički fenotip poremećene glukoze homeostaze sa GSD tip Ia, sa dodatnim komplikacijama neutropenije i mijeloidne disfunkcije tipične za deficijenciju $G6Paze-\beta$. Preuzeto i modifikovano iz rada [Chou i sar., 2015].

Metaboličke posledice hepatične deficijencije $G6Paze-\alpha$ dosežu daleko iznad očigledne hipoglikemije koja je posledica nemogućnosti jetre da isporuči slobodnu glukozu u cirkulaciju, što dovodi do pada glikemije između obroka [Fernandes i Smit, 2000]. Nemogućnost hidrolize G6P u lumenu ER-a najvećim delom dovodi do njegovog preusmeravanja u glikolizu, što rezultira proizvodnjom viška piruvata. Količina piruvata na nivou iznad kapaciteta ciklusa trikarbonskih kiselina (TCA ciklus) rezultuje redukcijom piruvata na laktat i formiranje laktične kiseline. Akumulacija laktata u krvi koja se dešava tokom gladovanja (između obroka), uzrokuje metaboličku acidozu koja može ozbiljno ugroziti život pacijenata [Chen i sar., 2006]. Pored toga, deo piruvata prevodi se u alanin transaminacijom, što dovodi do hiperalaninemije, a deo u procesu β -oksidacije u acetil-CoA. Velike količine acetil-CoA transportuju se u citoplazmu gde će služiti kao supstrat za sintezu triglicerida i holesterola što dovodi do hiperlipidemije i masne infiltracije u hepatocitama i hepatomegalije. Oksidacija

G6P preko puta pentozo fosfata dovodi do povećane produkcije ribozo-5-fosfata koji zatim aktivira *de novo* sintezu purinskih nukleotida koji se katabolizuju u mokraćnu kiselinu, što dovodi do hiperurikemije i posledičnih simptoma gihta [Fernandes i Smit, 2000; Rake i sar., 2002; Chen i sar., 2006]. Međusobni odnosi ovih metaboličkih puteva prikazani su na Slici 5.



Slika 5. Šematski prikaz metaboličkih puteva glukoze-6-fosfata (G6P) u GSD tip I.

Pacijenti oboleli od GSD tip Ib dele isti metabolički fenotip poremećene glukoze homeostaze sa GSD tip Ia, ali razvijaju dodatne komplikacije neutropenije i mijeloidne disfunkcije tipične za GSD Irs [Chou, 2001; Kim i sar., 2008; 2010b; Jun i sar., 2014]. Neutropenija stvara predispoziciju za nastanak teških i učestalih infekcija, ali i druge komplikacije kao što je inflamatorna bolest creva slična Kronovoj bolesti [Dieckgraefe i sar., 2002]. Osim smanjenog broja, neutrofili pacijenata sa GSD tip Ib imaju i poremećenu funkciju (oslabljen respiratorni prasak) i povišenu apoptozu [Kuijpers i sar., 2003], a mehanizmi ovog procesa biće objašnjeni u naredim poglavljima.

1.3.3. Kliničke manifestacije GSD tip I

Klinički simptomi GSD tip I obično se ne otkrivaju prvih nekoliko meseci života, iako neki pacijenti u neonatalnom periodu razvijaju hipoglikemiju i laktičnu acidozu. Prvi simptomi obično su hepatomegalija ili simptomatska hipoglikemija koja se razvija nakon kratkotrajnog gladovanja, odnosno 2-3 sata nakon obroka [Chou, 2001; 2002; Kishnani i sar., 2014]. Međutim, veliki broj organa i organskih sistema mogu biti pogođeni kod GSD tip I.

Deca sa GSD tip I često su niskog rasta, poseduju protuberantni abdomen zbog masivne hepatomegalije, karakteristični lutkasti oblik lica sa istaknutim obrazima zbog akumulacije masnog tkiva, koji se u literaturi opisuje kao „doll-like face” (Slika 6). Takođe, karakteriše ih usporen rast i telesni razvoj, hipertrofični mišići, kao i zakasneli ili odsutan pubertet [Chou i sar., 2002]. Kognitivni razvoj obično je normalan, osim ako pacijent nema oštećenje mozga nastalo kao posledica recidivnih hipoglikemičnih epizoda [Kishnani i sar., 2014]. Pored jetre, bubrezi su takođe simetrično uvećani, ali slezina i srce su normalne veličine [Chou, 2001].



Slika 6. Dete obolelo od GSD tip Ia. Preuzeto sa [\[https://slideplayer.com/slide/961037/\]](https://slideplayer.com/slide/961037/).

Biohemijski testovi pacijenata sa GSD tip I odražavaju patofiziologiju bolesti i otkrivaju hipoglikemiju, hiperurikemiju, hiperalaninemiju, hiperholesterolemiju i laktičnu acidozu [Chou i sar., 2002; 2010a]. Osim toga, pacijenti imaju hiperlipidemiju sa izraženom hipertrigliceridemijom. Ksantomi kože iznad gornjih i donjih ekstremiteta mogu biti prisutni u detinjstvu, a promene mrežnjače koje karakterišu višestruke, žučkaste paramakularne lezije takođe se javljaju sekundarno zbog izražene hiperlipidemije [Chen i sar., 2006]. Visok nivo triglicerida može dovesti do pojave akutnog pankreatitisa koji predstavlja po život opasnu komplikaciju bolesti [Kikuchi i sar., 1991].

Lako dobijanje modrica, epistaksa, a kod žena reproduktivnog uzrasta menoragija (obilne menstruacije) često se javljaju kao rezultat poremećene funkcije trombocita [Austin i sar., 2013; Kishnani i sar., 2014]. Anemija je uobičajena manifestacija koja se javlja kod pacijenata obolelih od GSD tip I, iako je patofiziologija različita između podtipova ove bolesti. Teška anemija obično se sreće kod osoba sa GSD tip Ia kod kojih je došlo do razvoja hepatocelularnih adenoma, dok se kod pacijenata sa tipom Ib anemija javlja kao posledica hronične inflamacije creva [Wang i sar., 2012].

Takođe, nedostatak vitamina D se sve više prepoznaje kod ovih pacijenata [Banugaria i sar., 2010]. Česti prelomi i radiografski dokazi osteopenije nisu neuobičajeni kod odraslih pacijenata, a gustina kostiju značajno je smanjena kod dece pre puberteta [Minarich i sar., 2012].

Hepatomegalija kod GSD tip I razvija se usled patološke akumulacije glikogena i lipida u ćelijama jetre. Uvećanje jetre naglašeno je kod male dece, jer imaju izraženo uvećan trbuh, što često predstavlja putokaz ka uspostavljanju dijagnoze [Kishnani i sar., 2014; Bali i sar., 2016]. Kod većine osoba sa GSD tip I hepatomegalija se smanjuje sa godinama. Međutim, kod velikog broja pacijenata, naročito sa GSD tip Ia, dolazi do pojave hepatocelularnih adenoma u pubertetu [Kelly i Poon, 2001; Kudo, 2001]. Iako su ove promene u većini slučajeva benigne prirode, kod 5-10% pacijenata može doći do maligne transformacije ovih tumora [Franco i sar., 2005].

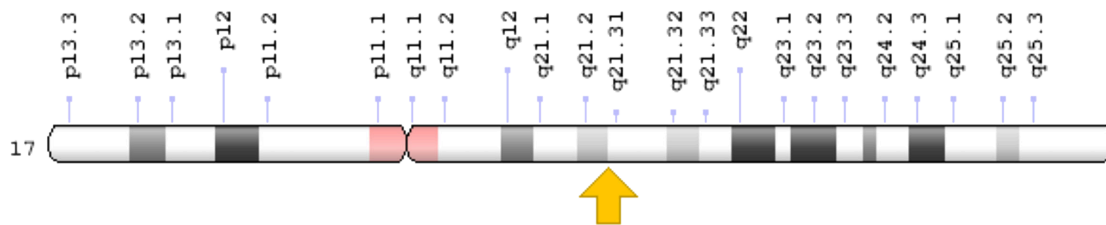
Oštećenje bubrega kod osoba sa GSD tip I razvija se od ranog detinjstva, ali prvi simptomi ispoljavaju se kasnije, često u odraslom dobu. Bubrež je takođe jedan od organa u kojima dolazi do akumulacije glikogena, pa se nefromegalija može uočiti prilikom ultrazvučnog pregleda abdomena. Glomerularna hiperfiltracija gotovo uvek se razvija u adolescentnom uzrastu i može biti praćena mikroalbuminurijom i proteinurijom. Druge renalne abnormalnosti uključuju disfunkciju proksimalnih i/ili distalnih tubula. Kod značajnog broja pacijenata, akumulacija navedenih oštećenja postepeno dovodi do terminalne insuficijencije bubrega [Reitsma-Bierens, 1993; Weinstein i sar., 2001]. Lečenje GSD tip I dijetom i drugim merama ima za cilj da spreči dugoročne komplikacije, među kojima je i bubrežna bolest [Kishnani i sar., 2014; Bali i sar., 2016].

Osobe obolele od GSD tip Ib imaju slične kliničke i metaboličke manifestacije kao pacijenti sa GSD tip Ia. Specifičnost tipa Ib predstavlja neutropenija udružena sa disfunkcijom neutrofila i monocita. Ove komplikacije povećavaju sklonost ka rekurentnim teškim bakterijskim infekcijama i inflamatornoj bolesti creva sličnoj Kronovoj bolesti [Dieckgraefe i sar., 2002; Chou i sar., 2010b]. Najčešće se javlja između 5.-12. godine života, ali prijavljeni su slučajevi kod kojih je sa samo 13 meseci došlo do razvoja prvih simptoma inflamatorne bolesti creva [Davis i sar., 2010]. Neutropenija takođe utiče na pojavu oralnih ulceracija, gingivitisa, karijesa i periodontalne bolesti, koji značajno narušavaju kvalitet života ovih pacijenata. Takođe, zapaženo je da osobe sa GSD tip Ib koji razvijaju neutropeniju imaju povećanu sklonost ka autoimunim poremećajima [Melis i sar., 2017].

Smrtni ishod osoba obolelih od GSD tip I obično je u vezi sa hroničnom insuficijencijom bubrega ili jetre i događa se u adultnom dobu. Postoji, međutim, značajan rizik za smrtni ishod kod dece ukoliko se akutne komplikacije kao što su sepsa ili akutni pankreatitis ne leče blagovremeno i agresivno [Kishnani i sar., 2014].

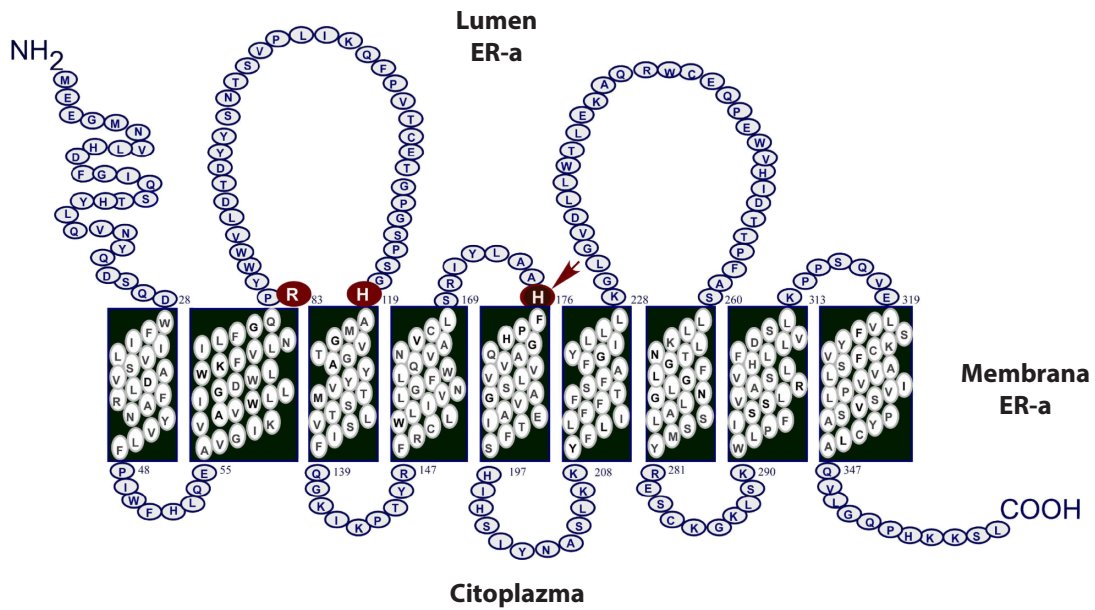
1.3.4. Gen *G6PC* i deficijencija enzima G6Paze- α

GSD tip Ia je prema podacima iz literature češći oblik bolesti i javlja se u ~ 80% slučajeva [Chou i sar., 2002; 2010a; Kishnani i sar., 2014; Bali i sar., 2016]. Gen *G6PC* (RefSeq: NG_011808.1) poseduje jednu kopiju u humanom genomu, sastoji se iz 5 egzona koji obuhvataju 12,5 kb sekvence DNK na dugom kraku hromozoma 17 (17q21.31) [Lei i sar., 1993; Chou i sar., 2002] (Slika 7). Ovaj gen kodira za G6Pazu- α , čija ekspresija je tkivno-specifična, a primarno izražena u jetri, bubrezima i intestinalnoj mukozi. Transkript gena *G6PC* (RefSeq: NM_000151.3), dužine 3096 nukleotida (nt), omogućava sintezu hidrofobnog glikoproteina dužine 357 aminokiselina (ak) koji vrši hidrolizu G6P na glukozu i P_i u lumen ER-a [Lei i sar., 1993; Pan i sar., 1998].



Slika 7. Lokacija gena *G6PC* na hromozomu 17. Žutom strelicom obeležena je pozicija (q21.31) gena *G6PC*. Preuzeto sa [<https://ghr.nlm.nih.gov>].

G6Paze- α sadrži 9 transmembranskih domena koji se vezuju za unutrašnju membranu ER-a [Pan i sar., 1998]. Amino-terminalni domen enzima nalazi se u lumen ER-a, dok je karboksi-terminalni domen okrenut ka citoplazmi. Analiza sekvence proteina ukazala je na postojanje konzerviranog domena označenog kao K-X₆-RP-(X₁₂₋₅₄)-PSGH-(X₃₁₋₅₄)-SR-X₅-H-X₃-D domen, koji se proteže od 76. - 180. aminokiseline i podudara se sa konzerviranim motivom u lipidnim fosfatazama, kiselim fosfatazama i vanadijum haloperoksidazama. Koristeći kristalnu strukturu vanadijum haloperoksidaze [Hemrika i sar., 1997], predloženo je da aktivni centar enzima čine aminokiselinske rezidue Lys-76, Arg-83, His-119, Arg-170 i His-176. Međutim, na osnovu eksperimentalnih rezultata iz studija koje su se bavile obeležavanjem i identifikacijom aktivnog mesta enzima G6Paze- α , pokazano je da His-176 inicira nukleofilni napad na fosfatnu grupu G6P-a, čime se formira intermedijer fosfohistidin-G6Paze- α . Ovo prelazno stanje stabilizovano je sa Arg-83 koji formira vodonične veze sa fosfatom i His-119 koji obezbeđuje proton koji oslobađa glukozu. Aktivna mesta enzima, Arg-83, His-119 i His-176, nalaze se u lumen ER-a, stoga je za interakciju sa supstratom neophodno da G6P bude transportovan iz citoplazme u lumen ER-a (Slika 8) [Ghosh i sar., 2002].



Slika 8. Humani enzim G6Paza- α . G6Paza- α ukotvljena je u membranu ER-a sa 9 transmembranskih heliksa koji su uokvireni crnim pravougaonicima. Amino-terminus nalazi se u lumenu ER-a, a karboksi-terminus u citoplazmi. Aminokiseline Arg-83, His-119 i His-176, koje čine aktivni centar enzima, uokvirene su crvenom bojom. Strelica ukazuje na akceptor fosfata. Preuzeto i modifikovano iz [Chou i sar., 2017].

Od otkrića prvog izmenjenog G6PC alela [Lei i sar., 1993] pa do danas, registrovan je relativno veliki broj varijanti u genu *G6PC* koje dovode do razvoja GSD tip Ia (Slika 9). Do marta 2019. godine je u bazi podataka HGMD *Professional* [<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>] prijavljeno 118 različitih genetičkih varijanti koje su otkrivene kod preko 600 pacijenata. Približno 72% svih promena čine nesinonimne varijante (eng. *missense variants*) koje nastaju usled promene samo jednog nukleotida i varijante koje dovode do pojave prevremenog stop kodona (eng. *nonsense variants*). Male delecije čine oko 11%, zatim slede promene koje menjaju mesto iskrajanja introna (eng. *splice site variants*) i male insercije (8%). Velike delecije, duplikacije i insercije vrlo retko se javljaju (~1%). Varijante u aktivnom mestu enzima p.Arg83Cys, p.Arg83His i p.His119Leu detektovane su kod GSD tip Ia pacijenata. Pokazano je da ove promene kompletno ukidaju aktivnost G6Paze- α , što ide u prilog njihovoj predloženoj ulozi [Lei i sar., 1993; Shieh i sar., 2002]. Interesantno je da do sada nisu identifikovane varijante na poziciji His-176 kod GSD tip Ia pacijenata [Chou i sar., 2017]. Međutim, eksperimentima sa mesto-dirigovanom mutagenezom pokazano je da varijante His-176 potpuno ukidaju hidrolitičku aktivnost G6Paze- α , što je u skladu sa njegovom ulogom akceptora fosfata [Pan i sar., 1998].

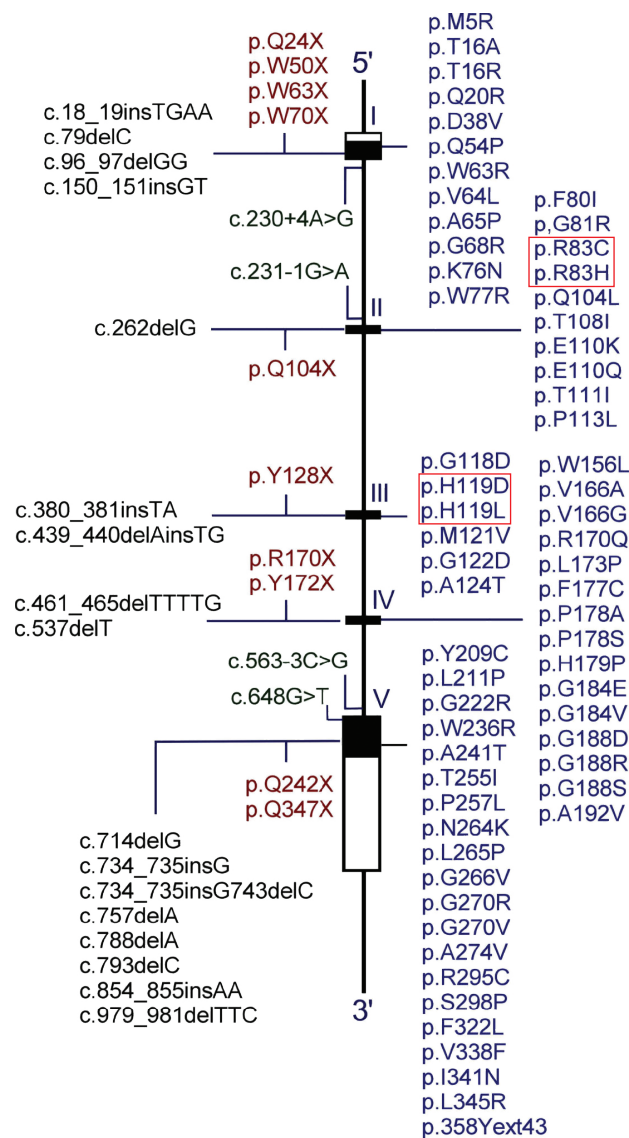
Iako GSD tip Ia nije pretežno ograničena na jednu rasnu ili etničku grupu, opisane su varijante u genu *G6PC* koje su jedinstvene za pacijente evropske, latinoameričke, kineske, korejske i jevrejske populacije, što ukazuje na efekat osnivača za neke varijante

[Chou i sar., 2002; 2008; 2010a]. Pokazano je da je u populaciji Jevreja izuzetno visoka učestalost varijante p.Arg83Cys (98%). Takva uniformnost genotipa kod pacijenata obolelih od GSD tip Ia nije prijavljena u populacijama širom sveta [Chou i Mansfield, 2008].

Tabela 2. Prevalentne varijante detektovane kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib.

Evropa	Latinska Amerika	Japan	Kina	Južna Koreja
p.Arg83Cys (33%) p.Gln347Ter (18%)	c.380_381insTA (54%)	c.648G>T (91%)	c.648G>T (54%) p.Arg83Cys (26%)	c.648G>T (75%)

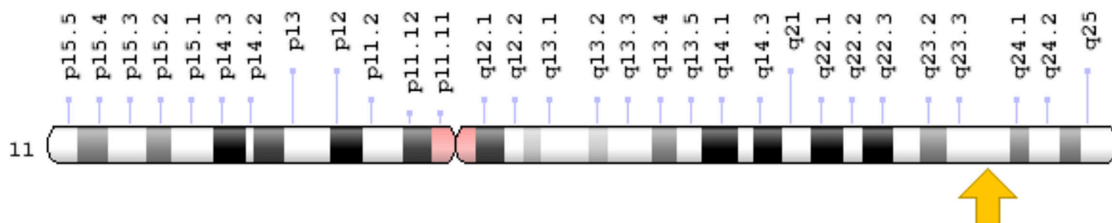
Do danas nije pokazana jasna korelacija genotipa i fenotipa kod pacijenata obolelih od GSD tip Ia [Matern i sar., 2002; Chou i sar., 2010a].



Slika 9. Varijante identifikovane kod GSD tip Ia pacijenata. Crni pravougaonici predstavljaju kodirajuće regione, dok su belim pravougaonicima obeleženi 5' i 3'-UTR regioni gena G6PC. Varijante detektovane u aktivnim mestima enzima uokvirene su crvenim pravougaonicima. Preuzeto i modifikovano iz [Chou i sar., 2017].

1.3.5. Gen *SLC37A4* i deficijencija enzima G6PT

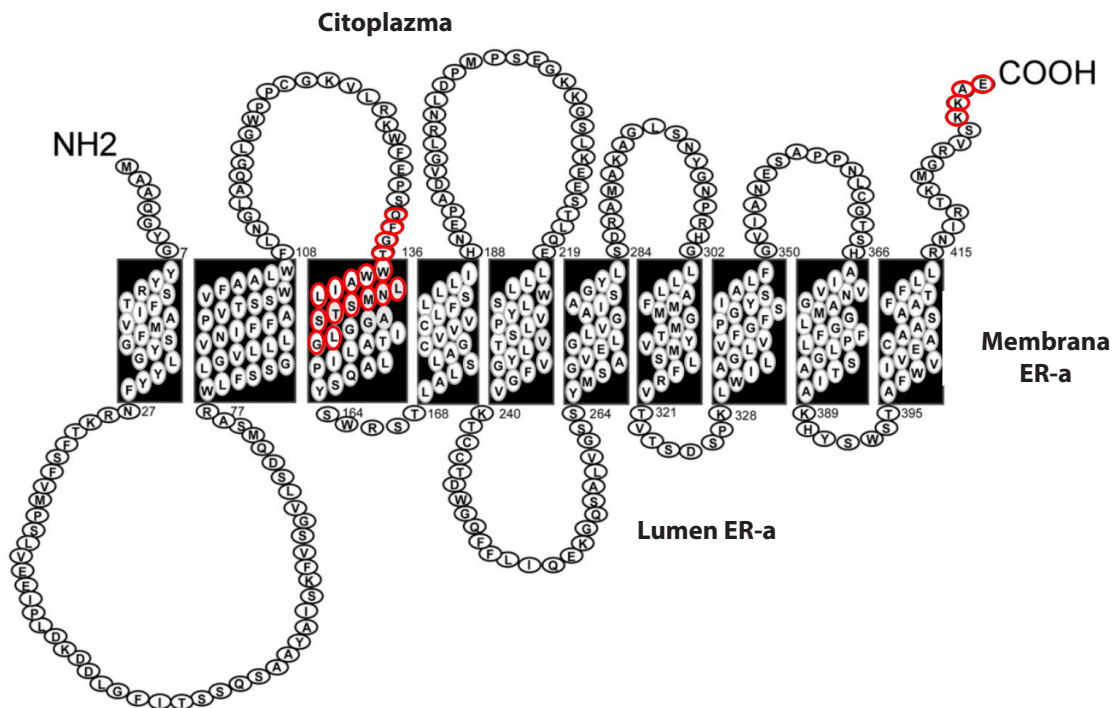
Krajem prošlog veka molekularno-genetičkim studijama dokazano je postojanje dva podtipa von Gierkeove bolesti. GSD tip Ib je oblik bolesti koji se detektuje kod ~ 20% pacijenata obolelih od GSD tip I [Gerin i sar., 1997; Hiraiwa i sar., 1999; Veiga-da-Cunha i sar., 1999; Janecke i sar., 2000]. Kao što je već opisano, GSD tip Ib nastaje kao posledica deficitarne aktivnosti proteina G6PT [Chou i sar., 2002; 2010a]. Humani protein G6PT, kodiran je jednom kopijom gena *SLC37A4* (RefSeq: NG_013331.1), koji obuhvata ~ 5,3 kb DNK sekvence. Gen *SLC37A4* nalazi se na dugom kraku hromozoma 11 (11q23.3) (Slika 10) [Annabi i sar., 1998; Hiraiwa i sar., 1999]. Transkripcija gena *SLC37A4* dovodi do produkcije dva alternativno splajsovana transkripta, G6PT (RefSeq: NM_001164277.1) i vG6PT (RefSeq: NM_001164278.2), koji kodiraju neglikozilovane proteine dužine 429 i 451 ak, respektivno [Gerin i sar., 1997; Hiraiwa i sar., 1999; Lin i sar., 2000]. Primarni transkript sadrži 8 egzona i odgovoran je za sintezu proteina G6PT koji se ubikvitarno eksprimira, a posebno visoka ekspresija zabeležena je u jetri, bubrezima, intestinumu i hematopoetskim progenitorskim ćelijama [Gerin i sar., 1997; Gerin i sar., 1999; Ihara i sar., 2000; Lin i sar., 2000]. U mozgu, srcu i skeletnim mišićima eksprimira se varijantni transkript sa 9 egzona odgovoran za sintezu proteina vG6PT [Lin i sar., 2000]. Značaj ovih ekspresionih obrazaca još uvek nije razjašnjen, s obzirom da su oba proteina podjednako katalitički aktivna [Pan i sar., 1999; Lin i sar., 2000].



Slika 10. Lokacija gena *SLC37A4* na hromozomu 11. Žutom strelicom obeležena je pozicija (q23.3) gena *SLC37A4*. Preuzeto sa [<https://ghr.nlm.nih.gov/>].

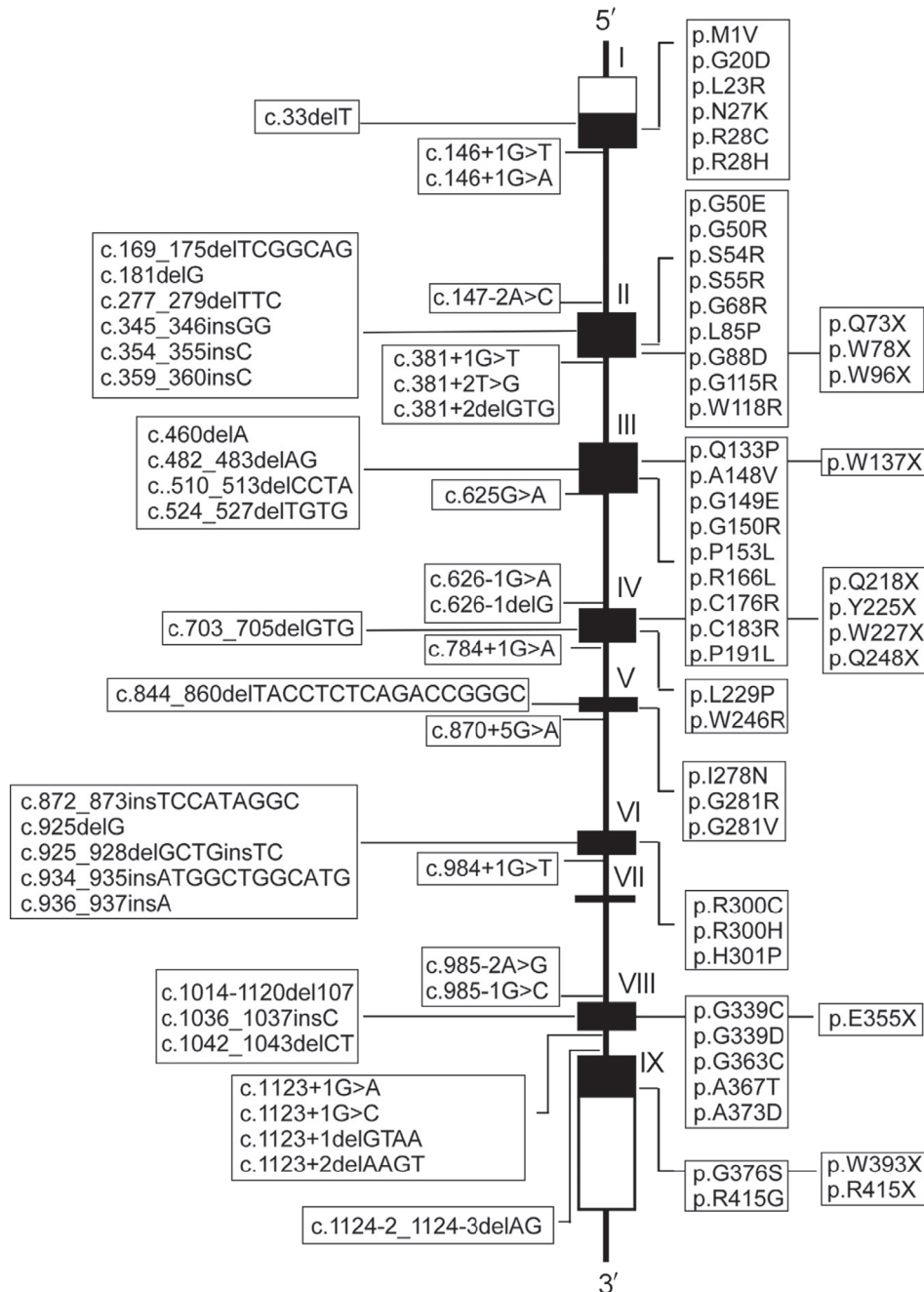
G6PT pripada superfamiliji integralnih membranskih proteina SLC37 (eng. *solute carrier family 37*) koji se nalaze na membrani ER-a i vrše transport šećernih fosfata iz citoplazme u lumen ER-a u zamenu za P_i [Chen i sar., 2008b; Chou i Mansfield, 2014]. G6PT prvi je otkriven, strukturno i funkcionalno okarakterisan i ujedno najbolje opisan član ove superfamilije proteina. Topološke studije ukazale su da G6PT poseduje 10 transmembranskih domena, pri čemu se i amino-terminalni i karboksiterminalni domeni nalaze u citoplazmi [Pan i sar., 1999] (Slika 11). Kao što je u prethodnim poglavljima već spomenuto, primarna uloga proteina G6PT je da vrši

prenos G6P-a iz citoplazme u lumen ER-a, gde dolazi do njegove hidrolize na glukozu i P_i pod dejstvom G6Paze- α (ili G6PC) u jetri, bubrezima i intestinalnoj mukozii, ili G6Paze- β (ili G6PC3) u ostalim tkivima [Chou i sar., 2002; 2010a]. Ova transportna aktivnost zavisi od sposobnosti G6PT da formira funkcionalni kompleks sa G6Pazom. U odsustvu G6Paze, transport G6P je minimalan [Lei i sar., 1996; Hiraiwa i sar., 1999; Chen i sar., 2008a]. Shodno tome, G6PT je od suštinskog značaja za održavanje homeostaze glukoze u krvi između obroka i energetske homeostaze mijeloidnih ćelija, čineći GSD tip Ib i metaboličkim i imunskim poremećajem.



Slika 11. Humani protein G6PT. G6PT ukotvljena je u membranu ER-a sa 10 transmembranskih heliksa koji su uokvireni crnim pravougaonicima. Oba kraja proteina nalaze se u citoplazmi. Prepoznajući motiv (eng. signature motif) koji obuhvata aminokiseline na pozicijama od 133-149, kao i retencioni motiv KKAEE (426-429 ak), uokvireni su crvenom bojom. Preuzeto i modifikovano iz [Chou i sar., 2018].

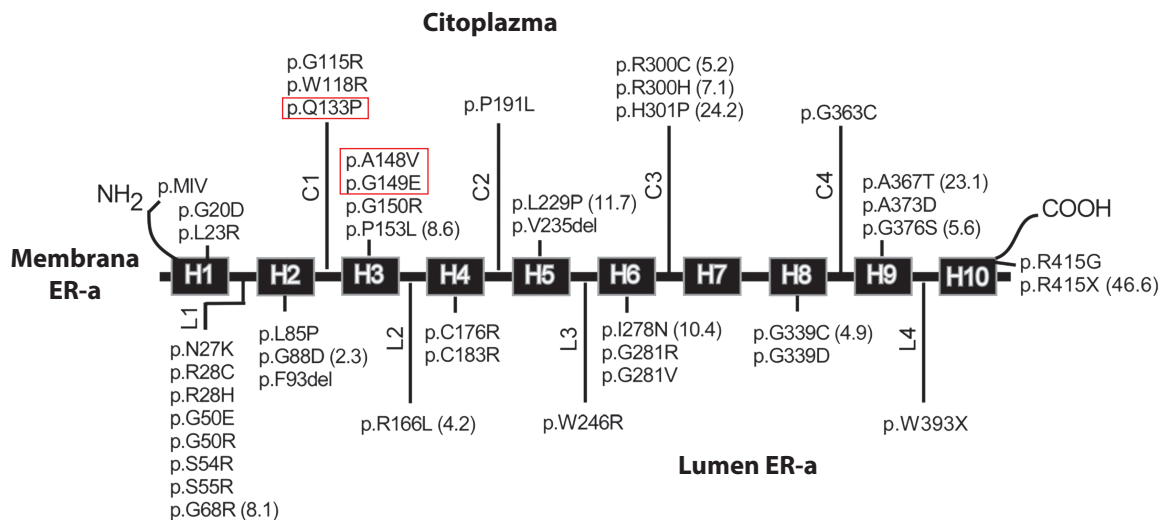
Do marta 2019. godine, u bazi podataka HGMD Professional [<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>] registrovano je ukupno 116 varijanti u genu *SLC37A4* detektovanih kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib (Slika 12). Oko 60% varijanti čine nesinonimne promene i varijante koje uvode prevremeni stop kodon. Registrovan je relativno veliki broj malih delecija i varijanti koje menjaju mesto iskrajanja introna, koje zajedno čine 35% svih identifikovanih varijanti. Takođe, prijavljene su dve velike delecije [Janecke i sar., 2000; Qiu i sar., 2011].



Slika 12. Varijante u genu *SLC37A4* koje su detektovane kod pacijenata obolelih od GSD Ib. Gen *SLC37A4* sadrži 9 egzona (I-IX) koji su obeleženi crnim pravougaonikima, dok su 5' i 3'-UTR regije obeleženi belim pravougaonikima. Preuzeto iz [Chou i Mansfield, 2014].

Na osnovu studija koje su se bavile funkcionalnom karakterizacijom varijanti u genu *SLC37A4*, detektovane promene grupisane su u tri kategorije: varijante koje se nalaze u domenima heliksa (H, eng. *helical*), varijante koje uključuju citoplazmatske (C, eng. *cytoplasmatic loops*) i luminalne petlje (L, eng. *luminal loops*) i terminalne varijante koje uključuju amino-terminalni (p.M1V) i karboksi-terminalni (p.Arg415Ter) domen [Hiraiwa i sar., 1999; Chen i sar., 2002; Chen i sar., 2008a] (Slika 13). Pokazano

je da nesinonimne varijante detektovane u prvoj luminalnoj petlji predstavljaju nulte varijante (eng. *null variants*) što ukazuje da je ova petlja vrlo važna za transport G6P-a. Slično tome, pokazano je da varijanta p.MIV dovodi do izostanka celog N-terminusa (aminokiseline na pozicijama od 1-7) i dela prvog heliksa (od 8.-16. ak), što za posledicu ima kompletno ukidanje transportne aktivnosti proteina G6PT [Chen i sar., 2002; 2008a]. Interesantno je istaći, da karboksi-terminalna varijanta p.Arg415Ter dovodi do iskrajanja C-terminalnog repa koji sadrži ER-retencioni motiv (KKAE), zadržava 47% G6PT aktivnosti [Chen i sar., 2002]. Protein G6PT deli prepoznavajući motiv (eng. *signature motif*, ProSite PDOC00726) sa proteinima koji pripadaju familiji organo-fosfatnih:Pi antiportera (GlpT, uhpT), sa receptorom za G6P (uhpC) i fosfoglicerat transporterom (PgtP). U humanom proteinu G6PT, ovaj motiv se nalazi na pozicijama od 133.-149. ak. Kod GSD tip Ib pacijenata detektovane su varijante u ovom motivu p.Gln133Pro, p.Ala148Val i p.Gly149Glu i pokazano je da one ne utiču na stabilnost proteina G6PT, već da kompletno ukidaju njegovu transportnu aktivnost [Hiraiwa i sar., 1999; Chen i sar., 2002; 2008a]. Ovi rezultati ukazuju na to da je *signature* motiv funkcionalni element neophodan za optimalan mikrozomalni transport G6P iz citoplazme u lumen ER-a.



Slika 13. Varijante detektovane u genu SLC37A4 koje utiču na aktivnost preuzimanja G6P. G6PT protein sadrži 10 transmembranskih domena označenih kao H1 - H10, 4 citoplazmatske petlje označene kao C1 - C4 i 4 luminalne petlje označene kao L1 - L4. Varijante za koje je pokazano da ukidaju aktivnost G6PT su neuokvirene. Varijante koje zadržavaju rezidualnu aktivnost navedene su sa procentom zadržane transportne aktivnosti u zagradama. Tri varijante prepoznavajućeg motiva (p.Gly133Pro, p.Ala148Val i p.Gly149Glu) koje su do sada identifikovane u GSD tip Ib pacijentima su uokvirene crvenim pravougaonicima. Preuzeto i modifikovano iz [Chou i sar., 2018].

Iako je GSD tip Ib bolest panetničkog karaktera, u literaturi su opisane varijante koje se često javljaju u određenim etničkim okvirima [Chou i sar., 2002; Matern i sar.,

2002; Qiu i sar., 2011; Kido i sar., 2013; Liang i sar., 2013; Chou i Mansfield, 2014; 2017]. U Tabeli 3 prikazane su varijante sa najvećim frekvencijama u Evropi, Japanu, Kini i Južnoj Koreji.

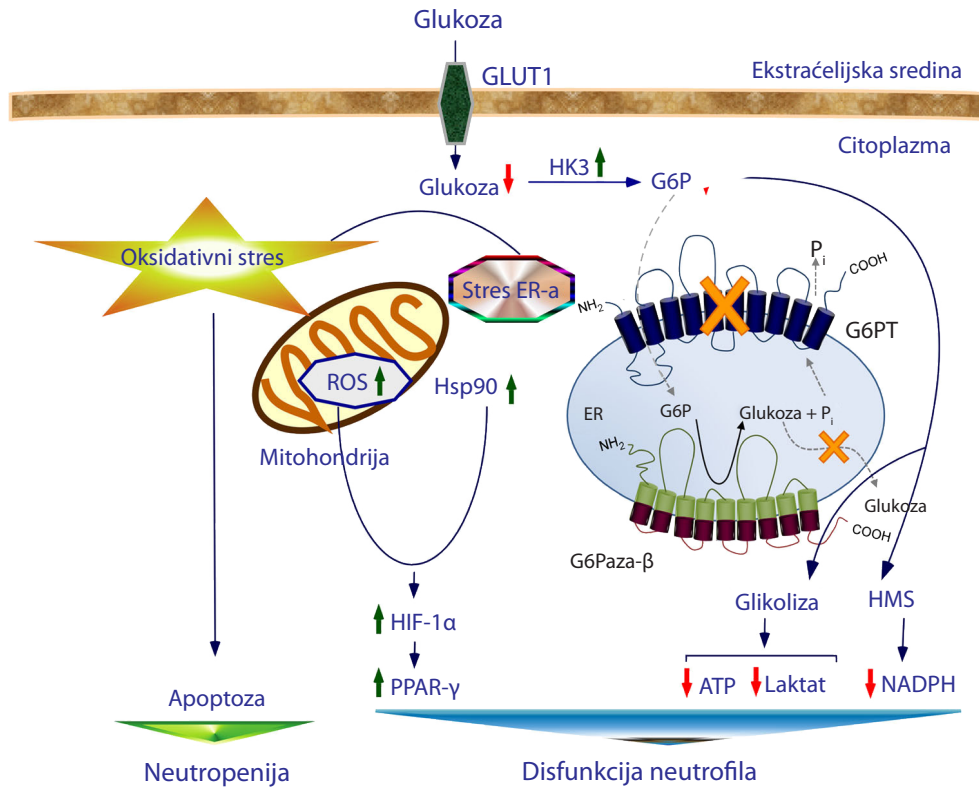
Tabela 3. Prevalentne varijante detektovane kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib.

Evropa	Japan	Kina	Južna Koreja
c.1042_1043delCT (31%) p.Gly339Cys (14%)	p.Trp118Arg (46%)	p.Gly149Glu (29%) p.Pro191Leu (29%)	p.Ala148Val (40%)

Kao što je to slučaj i sa GSD tip Ia, do danas nije pokazana jasna povezanost genotipa sa fenotipom pacijenata obolelih od GSD tip Ib [Matern i sar., 2002; Chou i sar., 2010a].

1.3.6. Neutropenija kod GSD tip Ib pacijenata

Imunološke manifestacije GSD tip Ib su u žiži interesovanja, jer u velikoj meri utiču na kvalitet života obolelih. Pacijenti sa GSD tip Ib manifestuju neutropeniju i mijeloidnu disfunkciju koju karakterišu oštećenja respiratornog lanca neutrofila, hemotaksije i mobilizacije kalcijuma [Annabi i sar., 1998; Visser i sar., 2000; Chou i sar., 2002; 2010a; 2010b]. Neutrofili imaju vrlo važnu ulogu u zaštiti organizma od bakterijskih i gljivičnih infekcija i predstavljaju prvu liniju odbrane organizma od izazivača upalnih procesa. Kao rezultat njihove disfunkcije, kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib obično se javljaju teške i rekurentne bakterijske infekcije, a do 77% pacijenata koji ispoljavaju neutropeniju takođe razvijaju i inflamatornu bolest creva sličnu Kronovoj bolesti [Visser i sar., 2000; Dieckgraefe i sar., 2002; 2002]. Molekularni mehanizmi koji leže u osnovi neutropenije tek sada bivaju shvaćeni (Slika 14). Nedavno je sugerisano da je osnovni uzrok disfunkcije neutrofila i makrofaga kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib i GSD-Irs poremećaj energetske homeostaze u ER-u, uzrokovane gubitkom intracelularne proizvodnje glukoze [Jun i sar., 2014; Chou i sar., 2015]. ER je važna organela sa ključnom ulogom u fiziološkoj regulaciji mnogih procesa u ćeliji. Poznato je da poremećaji homeostaze ER-a dovode do hronične aktivacije „odgovora nesavijenih proteina” (UPR, eng. *unfolded protein response*), koji doprinosi patogenezi mnogih metaboličkih bolesti [Ozcan i Tabas, 2012]. Osnovni cilj UPR-a je da se ponovo uspostavi homeostaza i ublaži stres ER-a kroz povišenu ekspresiju proteina šaperona koji učestvuju u procesima pravilnog savijanja proteina, inhibiciji generalne translacije i promovisanju degradacije pogrešno savijenih proteina. Međutim, ako je stres prolongiran ili težak, UPR inicira programiranu ćelijsku smrt [Tabas i Ron, 2011; Hetz, 2012].

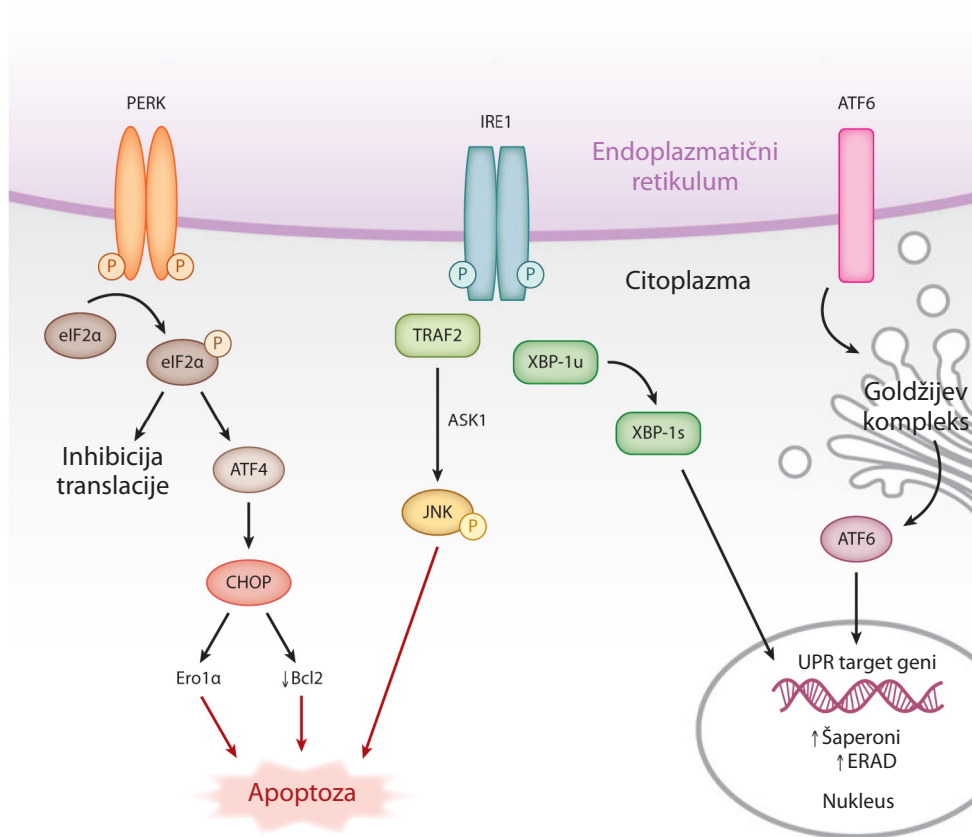


Slika 14. Predložen mehanizam disfunkcije neutrofila kod GSD tip Ib pacijenata. Glukoza transportovana u citoplazmu preko transportera glukoze 1 (GLUT1) metaboliše se heksokinazom (HK) u G6P, koji učestvuje u tri glavna puta: glikolizi, u putu pentozo fosfata (HMS), i hidrolizi posredovanom kompleksom G6PT/G6Paze- β na membrani ER-a. Poremećaj transporta G6P u lumen ER-a, u neutrofilima dovodi do smanjenog unosa glukoze, poremećaja energetske homeostaze i funkcionalnosti. Osnovni uzrok neutropenije u GSD tip Ib je pojačan stres ER-a neutrofila, oksidativni stres i apoptoza. Preuzeto i modifikovano iz [Chou i sar., 2018].

U ćelijama sisara postoje tri glavna UPR puta koja su inicirana aktivacijom senzora za stres (ERSS, eng. *Endoplasmatic Reticulum Stress Sensors*) koji se nalaze u membrani ER-a: enzim 1 koji zahteva inozitol (IRE1, eng. *Inositol-Requiring Enzyme 1*), pankreasna ER kinaza (PERK, eng. *Pancreatic ER Kinase*) i aktivirajući transkripcioni faktor 6 (ATF6, eng. *Activating Transcription Factor 6*) [Lai i sar., 2007] (Slika 15). Aktivacija receptora dešava se sekvencijalno, pri čemu se PERK prvi aktivira, potom sledi ATF6, dok se IRE1 poslednji aktivira [Szegezdi i sar., 2006]. U normalnim stanjima, ER šaperon, imunoglobinski vezujući protein (BiP, eng. *Immunoglobulin Binding Protein*, takođe poznat i kao Grp78 (eng. *Glucose-regulated protein 78*), koji se eksprimira sa gena *HSPA5*, vezuje se za luminalne domene glavnih UPR regulatora držeći ih neaktivnim. Nakon delovanja stresa ER-a, BiP disocira sa ovih senzora što rezultira njihovom aktivacijom [Osowski i Urano, 2011]. Aktivirani PERK indukuje globalnu translacionu atenuaciju fosforilacijom eukariotskog inicijacionog faktora 2 α (eIF2 α , eng. *eukaryotic initiation factor 2 α*) i smanjuje opterećenje ER-a promovisanjem

translacije aktivirajućeg transkripcionog faktora 4 (ATF4, eng. *Activating Transcription Factor 4*). ATF4, kao regulator transkripcije, promoviše preživljavanje ćelija tako što indukuje transkripciju gena potrebnih za obnavljanje homeostaze ER-a [Harding i sar., 2003]. Međutim, nisu svi geni koje ATF4 aktivira anti-apoptotski. Transkripcija UPR efektor C/EBP α -homologi protein (CHOP, eng. *C/EBP α -homologous protein*), koji se eksprimira sa gena *DDIT3*, zavisi isključivo od aktivacije ATF4. U patološkim stanjima, produžena ekspresija proteina CHOP aktivira apoptozu kroz brojne mehanizme, uključujući i regulaciju anti-apoptotskog faktora B ćelijski limfom 2 (Bcl-2, eng. *B cell lymphoma-2 factor*) [Szegezdi i sar., 2006].

Nakon disocijacije BiP, ATF6 se translocira iz ER-a u Golđi aparat gde se vrši njegova aktivacija ograničenom proteolizom. Aktivni ATF6 odlazi u nukleus gde povećava ekspresiju ER šaperona uključenih u savijanje proteina, obradu i degradaciju, kao što je BiP, koji se generalno smatra standardnim markerom stresa ER-a [Yoshida i sar., 2001; Oikawa i sar., 2007]. Takođe, reguliše ekspresiju i X boks-vezujućeg proteina 1 (XBP1, eng. *X box-binding protein 1*), važnog transkripcionog faktora koji promoviše preživljavanje ćelija. Da bi postigao svoj aktivni oblik, primarni transkript *XBP1* mora biti podvrgnut alternativnom splajsovanju, koje se izvodi pomoću IRE1. Protein IRE1 sa dualnom enzimskom aktivnošću, poseduje dva domena, serin-treonin kinazni domen i endoribonukleazni domen. Endonukleazna aktivnost IRE1 dovodi do isecanja introna dužine od 26 nt tokom obrade primarnog transkripta *XBP1*, formirajući varijantni transkript *XBP1s* koji kodira potentan regulator transkripcije šaperona, PERK-inhibitora, kao i gena uključenih u degradaciju proteina [Yoshida i sar., 2001; Osłowski i Urano, 2011]. Ova usklađena akcija ima za cilj da obnovi funkciju ER-a blokirajući dalje sintezu proteina, povećavajući kapacitet savijanja proteina i inicirajući degradaciju proteinskih agregata. Međutim, ukoliko stres dugo traje ili je dovoljno težak tako da ćelija ne može da nadoknadi oštećenja, IRE1 indukuje apoptozu kroz aktivaciju c-Jun N-terminalne kinaze 1 (JNK1, eng. *C-Jun N-Terminal Kinase 1*), koja reguliše Bcl-2 familiju proteina [Szegezdi i sar., 2006].



Slika 15. Odgovor ćelije na stres ER-a. Nakon akumulacije nesavijenih proteina u lumenu ER-a, aktiviraju se tri glavna senzora stresa PERK, ATF6 i IRE1 koji zatim prenose signale koji kontrolišu preživljavanje ili smrt ćelija. Preuzeto i modifikovano iz [Ozcan i Tabas, 2012].

Istraživanja sa G6PT-deficijentnim miševima i G6PC3-deficijentnim miševima, pokazala su da nedostatak bilo G6PT ili G6PC3 dovodi do stresa ER-a i povišene apoptoze koji nastaju kao posledica gubitka intracelularne produkcije glukoze [Cheung i sar., 2007; Kim i sar., 2008]. Takođe, detektovani su povišeni markeri stresa ER-a i apoptoze u bubrezima mišjeg modela GSD Ia [Farah i sar., 2017] i u neutrofilima pacijenata sa GSD tip Ib i GSD-Irs [Kuijpers i sar., 2003; Boztug i sar., 2009].

1.3.7. Terapijski pristupi kod GSD tip I

Metaboličke abnormalnosti kod pacijenata obolelih od GSD tip I trenutno se leče dijetetskim terapijama koje podrazumevaju upotrebu nekuvanog kukuruznog skroba, kao izvora glukoze, i čestih obroka, na svakih 2-6 sati zavisno od uzrasta. Uspostavljanje adekvatnog dijetetskog režima ovim pacijentima omogućava održavanje normalnog nivoa glukoze u krvi, obezbeđivanje optimalne ishrane za rast i razvoj, uklanjanje ranih simptoma i poboljšanje dugoročne prognoze bolesti [Kishnani i sar., 2014; Bali i sar., 2016]. Farmakološka terapija ima značaja za ublažavanje posledica hiperurikemije,

koja predstavlja faktor rizika za razvoj gihta i bubrežnih bolesti. Takođe, utiče na poboljšanje hiperlipidemije i održavanje nivoa lipida u normalnim granicama kako bi se sprečio razvoj ateroskleroze i pankreatitisa koji može ozbiljno ugroziti život pacijenata [Bali i sar., 2016]. Transplantacija jetre i kombinovana transplantacija jetre i bubrega predstavljaju terapijski metod kojim se mogu korigovati osnovni biohemijski defekti u ovim organima [Labrune, 2002; Marega i sar., 2011].

Kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib se u lečenju neutropenije upotrebljava faktor stimulacije granulocitnih kolonija (G-CSF, eng. *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) koji stimuliše produkciju neutrofila u koštanoj srži i utiče pozitivno na funkciju cirkulišućih neutrofila. Ova terapija poboljšava neutropeniju i simptome inflamatorne bolesti creva [Bali i sar., 2016]. Međutim, u malom procentu javljaju se komplikacije splenomegalije i mijelodisplazije koje mogu da dovedu do razvoja akutne mijeloidne leukemije [Visser i sar., 2002; Kishnani i sar., 2014].

Medikamentna i dijetetska terapija omogućavaju pacijentima sa GSD tip I da održe normoglikemiju, ali uzroci patofizioloških poremećaja i dalje ostaju nerešeni. Hepatocelularni adenomi/karcinomi kao i insuficijencija bubrega, često su uzroci mortaliteta kod ovih pacijenata [Chou i sar., 2002; 2010a; 2015]. Razvoj nove terapije za GSD tip I, poput genske terapije, može da spreči razvoj dugoročnih komplikacija i biohemijskih abnormalnosti karakterističnih za GSD tip I. Razvijeni su različiti vektori za transfer gena, uključujući adenovirusne [Zingone i sar., 2000], lentivirusne [Salani i sar., 2005] i rekombinantne adeno-asocirane virusne vektore (rAAV, eng. *recombinant Adeno-Associated Virus vector*) [Chou i Mansfield, 2011; Lee i sar., 2015; Kim i sar., 2017]. Genska terapija posredovana vektorom rAAV kod mišjih i psećih modela za GSD tip Ia dovela je do dugoročne korekcije metaboličkih abnormalnosti bez detektabilne toksičnosti [Kim i sar., 2017; Lee i sar., 2018]. Početkom 2018. godine, američka Administracija za hranu i lekove (FDA, eng. *Food and Drug Administration*) odobrila je prvu kliničku studiju za upotrebu genske terapije kod pacijenata obolelih od GSD tip Ia, što predstavlja prvi veliki korak ka uspešnom lečenju ovih pacijenata.

Genska terapija animalnih modela za GSD tip Ib posredovana rAAV vektorima pokazala je stabilnost i relativnu dugotrajnost efekta u ćelijama jetre [Yiu i sar., 2009; Kwon i sar., 2017]. Tretiranjem miševa *G6PT^{-/-}* vektorom rAAV-GPE-G6PT došlo je do korekcije metaboličkih abnormalnosti [Kwon i sar., 2017]. Međutim, upotrebom ovog vektora nisu korigovane renalne abnormalnosti kao ni mijeloidna disfunkcija. Efikasna upotreba genskih terapija za ispravljanje metaboličkih abnormalnosti u GSD tip Ib je obećavajuća, ali strategije koje se bave i metaboličkim i mijeloidnim komplikacijama mogu zahtevati upotrebu vektora sa širim opsegom specifičnosti transdukcije tkiva ili multivektorski pristup [Chou i sar., 2018].

2. CILJEVI

Glikogenoze predstavljaju skup urođenih poremećaja metabolizma glikogena koje karakteriše različita klinička slika koja primarno pogađa jetru i mišićni sistem, a neretko više organa i organskih sistema. Genetička osnova GSD je heterogena, sa do sada otkrivenih preko 20 gena uzročnika ovih bolesti. Posledice mogu biti fatalne i kreću se u rasponu od poremećaja koji ne zahtevaju lečenje do vrlo teških oblika za koje ne postoji specifična terapija. Nastanak adenoma ili karcinoma jetre i insuficijencije bubrega predstavljaju dugoročne posledice taloženja glikogena, pa je od presudne važnosti precizno uspostavljanje dijagnoze i što ranija primena terapije.

Do sada u Srbiji nije analizirana molekularno-genetička osnova glikogenoza, pa bi određivanje genomskog profila pacijenata iz ove grupe oboljenja omogućilo njihovu dijagnostiku u Srbiji i doprinelo boljem razumevanju njihovog kompleksnog fenotipa. S tim u vezi, postavljeni ciljevi prvog dela istraživanja su:

1. Određivanje genomskog profila pacijenata sa hepatičnim GSD i utvrđivanje spektra i frekvencije varijanti u genima uzročnicima GSD kod pacijenata iz Srbije. Genomsko profilisanje će se vršiti na uzorcima iz biobanke GSD koja će u tu svrhu po prvi put biti formirana u Srbiji i koja će postaviti osnovu za buduća istraživanja GSD u Srbiji.
2. Određivanje strategije za uspostavljanje rutinske molekularno-genetičke dijagnostike hepatičnih glikogenoza u Srbiji. Time će biti omogućeno pravovremeno uspostavljanje dijagnoze i rana primena odgovarajuće terapije specifične za genotip pacijenta, kao i davanje genetičkog saveta porodicama sa visokim rizikom za rođenje deteta sa GSD.

Budući da se u Srbiji po prvi put sprovodi molekularno-genetička studija vezana za GSD, očekivano je prisustvo novih, do sada u literaturi neprijavljenih varijanti u genima uzročnicima, s obzirom da je u pitanju retka bolest. Ciljevi drugog dela ovog istraživanja su:

1. Funkcionalna karakterizacija novootkrivenih varijanti u genima uzročnicima GSD, u cilju boljeg razumevanja fenotipa na osnovu genotipa kod ovih pacijenata.
2. Optimizacija preciznog editovanja genoma ćelijske linije HEK293FlpIn upotrebom tehnologije CRISPR/Cas9 i pristupa *knockin* kako bi nove varijante bile uvedene na tačno definisanom mestu genoma odabrane ćelijske linije.
3. Formiranje model sistema za funkcionalnu karakterizaciju novootkrivenih varijanti i ispitivanje njihove uloge u patogenezi hepatičnih GSD.

GSD tip Ib je autozomno recesivni poremećaj koji nastaje usled deficitarne aktivnosti proteina G6PT koja dovodi do nakupljanja glikogena u jetri i bubrezima. Kao rezultat toga javljaju se dugoročne komplikacije bubrežnih bolesti i hepatocelularnih

adenoma i/ili karcinoma. Uspostavljanjem adekvatnog *in vitro* modela sistema za GSD tip Ib biće omogućeno ispitivanje hipoteze da je translokacija G6P i njegova hidroliza u lumenu ER-a neophodna za normalnu funkciju bubrežnih ćelija i da je disfunkcija bubrega u GSD tip Ib, bar delimično, posledica stresa ER-a i povećane apoptoze. Potvrda postojanja ovih procesa značajno bi doprinela razumevanju patologije GSD tip Ib. U skladu sa tim, cilj trećeg dela ovog istraživanja je:

1. Formiranje stabilnog *in vitro* model sistema sa homozigotnom patogenom varijantom u genu *SLC37A4* koji bi imao primenu u ispitivanju patogeneze GSD tip Ib, kao i u budućim ispitivanjima novih terapeutika u svrhe personalizovane terapije.
2. Analiza ekspresije molekularnih markera stresa ER-a (*ATF4*, *DDIT3*, *HSPA5* i *XBP1s*) i apoptoze (*BCL2* i *BAX*) na modelu *SLC37A4* deficitarne ćelijske linije HEK293FlpIn radi boljeg razumevanja metaboličkog fenotipa GSD tip Ib povezanog sa bubrežnim komplikacijama.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. Ispitanici

Ova studija započeta je 2013. godine i u nju je bilo uključeno ukupno 41 ispitanika iz 39 nesrodnih porodica iz Srbije. Uključene su samo osobe sa kliničkim simptomima karakterističnim za različite tipove hepatičnih glikogenoza, kao i 75 ispitanika kontrolne grupe iz Srbije. U epidemiološkom delu studije uključili smo dodatnih 5 pacijenata sa dijagnozom GSD tip I, čiji su uzorci analizirani nezavisno od ove studije.

Demografski podaci, klinički i biohemijski parametri bolesti, kao i uzorci periferne krvi ovih pacijenata i njihovih roditelja, obezbeđeni su u saradnji sa Odeljenjem za ispitivanje i lečenje metaboličkih bolesti, kliničku genetiku i ishranu zdravog i obolelog deteta na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta „Dr Vukan Čupić“, Univerziteta u Beogradu, koji predstavlja referentnu ustanovu za urođene bolesti metabolizma u našoj zemlji. Takođe, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu, predstavlja jedinu instituciju u Srbiji koja omogućava uspostavljanje molekularno-genetičke dijagnoze GSD.

Uzorci periferne krvi pacijenata i roditelja uzeti su sa 3,8% natrijum citratom kao antikoagulansom u zapreminskom odnosu 9:1. Deo uzorka krvi iskorišćen je za izolaciju DNK, a iz preostalog uzorka krvi izolovane su mononuklearne ćelije koje su čuvane u *TRIzol*[®] reagensu (*ThermoFisher Scientific, MA, USA*) na -80°C . Iz mononuklearnih ćelija izolovana je RNK, koja je takođe čuvana na -80°C . Kontrolna grupa sastojala se od 75 ispitanika iz Srbije, koji su po polu i godinama odgovarali analiziranoj kohorti GSD pacijenata. Njihovi uzorci periferne krvi prikupljeni su i ispitivani na isti način kao i uzorci obolelih. Informisana saglasnost dobijena je od svih pojedinačnih učesnika uključenih u studiju. Roditelji pacijenata analizirani su radi potvrde statusa nosioca varijanti kada je to bilo moguće.

Ova studija odobrena je od strane Etičkog odbora Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ i izvođena je u skladu sa etičkim standardima utvrđenim Helsinškim deklaracijama iz 1964. godine i njenim kasnijim amandmanima.

3.2. Metode za detekciju genetičkih varijanti u genima uzročnicima GSD

Za detekciju genetičkih varijanti u genima odgovornih za razvoj GSD tip I (geni *G6PC* i *SLC37A4*) korišćena je metoda Sangerovog sekvenciranja, dok je detekcija varijanti odgovornih za razvoj preostalih tipova GSD omogućena upotrebom tehnologije sekvenciranja nove generacije (NGS, eng. *Next Generation Sequencing*). Ovim metodama prethodila je izolacija DNK iz uzorka periferne krvi pacijenata, njihovih roditelja i kontrolnih ispitanika. Nakon izolacije DNK usledilo je umnožavanje odabranih regiona DNK u lančanoj reakciji polimeraze (PCR, eng. *Polimerase Chain Reaction*).

3.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi

Genomska DNK izolovana je direktno iz periferne krvi ispitanika na koloni upotrebom *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (*QIAGEN, Venlo, Netherlands*) prema uputstvu proizvođača. Prinos izolovane DNK izmeren je na aparatu *Qubit® 3.0 Fluorimeter* (*ThermoFisher Scientific, MA, USA*) upotrebom *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit* dizajniranog specijalno za ovaj aparat. Ovaj esej je visoko selektivan za dvolančanu DNK i dizajniran tako da meri koncentraciju početnog uzorka od 10 pg/μl do 100 ng/μl.

3.2.2. Amplifikacija regiona DNK od interesa metodom PCR

Svih pet egzona gena *G6PC* (RefSeq: NG_011808.1) i osam egzona gena *SLC37A4* (RefSeq: NG_013331.1), kao i okolnih intronskih sekvenci pojedinačno je umnoženo upotrebom PCR aparata (*Mastercycler Nexus, Eppendorf, Hamburg, Germany*). Prajmeri koji su korišćeni za amplifikaciju željenih regiona DNK dizajnirani su upotrebom različitih programa: Primer3 [<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>], SNPCheck [<http://www.ngrl.org.uk>], OligoAnalyzer [<https://eu.idtdna.com/Primerquest/home/Index>] prema preporukama Hindmana i sar. [Hyndman i Mitsuhashi, 2003]. Spisak svih prajmera sa nazivima, sekvencama i dužinom umnoženih regiona DNK prikazan je u Tabeli 4.

Tabela 4. Spisak parova prajmera korišćenih za umnožavanje i sekvenciranje kodirajućih regiona i okolnih intronskih sekvenci gena *G6PC* i *SLC37A4*.

Gen	Kod sekvence	Naziv	Sekvenca prajmera (5'→3')	Dužina (bp)
<i>G6PC</i>	NG_011808.1	<i>G6PC_1F</i>	TCTGCTGACATCTTCCTGAGG	307
		<i>G6PC_1R</i>	GCCTCTTTTCTTGCTGATCTCC	
		<i>G6PC_2F</i>	AGCATTTCATTTCAGTAACCCCAG	194
		<i>G6PC_2R</i>	GTCCACTCAGCTTCTGTCTG	
		<i>G6PC_3F</i>	CACCTTTACTCCATTCTCTTTCC	232
		<i>G6PC_3R</i>	CGTGGTGTGTCAGCTAC	
		<i>G6PC_4F</i>	TGCCAGGCTCCAACATTTTC	260
		<i>G6PC_4R</i>	GGAGAGAAACGGAATGGGG	
		<i>G6PC_5F</i>	CTTCCTATCTCTCACAGTCATGC	651
		<i>G6PC_5R</i>	CATGTCACTTGCTCCAAATACC	
<i>SLC37A4</i>	NG_013331.1	<i>SLC37A4_1F</i>	CAGTTTGGCGCTCAGTAATCTC	470
		<i>SLC37A4_1R</i>	CACCACATGCCTGTACACAA	
		<i>SLC37A4_2F</i>	GTGTCAGATTGCAGCACAGG	474
		<i>SLC37A4_2R</i>	GTGGAGGTGGTGGGTAAGAA	
		<i>SLC37A4_3F</i>	AGGTGGCAGAGGAGGAAACT	491
		<i>SLC37A4_3R</i>	ACATCCACTGACCAGCACAG	
		<i>SLC37A4_4F</i>	TGAGGGAATACCCTTCATGC	367
		<i>SLC37A4_4R</i>	AAGGCTGAATTTGCATCC	
		<i>SLC37A4_5F</i>	GGGACAACCCCAATGTGTAA	242
		<i>SLC37A4_5R</i>	GACTCCCATCTCTCCAGTGC	
		<i>SLC37A4_6F</i>	CCTGCTGTGTCAGAGTCCAG	273
		<i>SLC37A4_6R</i>	AAGCCAGGAGAGGGAGACA	
		<i>SLC37A4_7F</i>	GTCAGTTGTGTTGGGGAGTGG	374
		<i>SLC37A4_7R</i>	GCTCCAGCTTCTCACTGGTC	
		<i>SLC37A4_8F</i>	CCACCTGTGCTTTGCATATAGA	500
		<i>SLC37A4_8R</i>	TGTTTGTCTGAAGGCAGGAA	

Legenda: F – ushodni prajmer, R – nishodni prajmer

PCR reakcione smeše bile su finalne zapremine 25 μ l i sadržale su 80-100 ng DNK i sledeće komponente u finalnim koncentracijama:

- ⇒ 1 x PCR pufer sa 1,5 mM MgCl₂,
- ⇒ 1,5 mM MgCl₂,
- ⇒ dNTP-ovi (svakog 0,25 mM),
- ⇒ prajmeri (svakog 10 pmol),
- ⇒ 1 U *Taq* polimeraza (*KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA*)
- ⇒ ddH₂O do 25 μ l.

Temperaturni profili PCR reakcija prikazani su u Tabeli 5. Opseg anilinga bio je između 55–58°C u zavisnosti od T_m dizajniranih prajmera.

Tabela 5. Temperaturni profil PCR reakcija

	Temperatura (°C)	Vreme trajanja	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	3 min	1
Denaturacija	95	30 sec	
Aniling	55-58	30 sec	30
Ekstenzija	72	1 min	
Finalna ekstenzija	72	5 min	1

Produkti PCR reakcije prečišćeni su na koloni korišćenjem *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Venlo, Netherlands) prema uputstvu proizvođača.

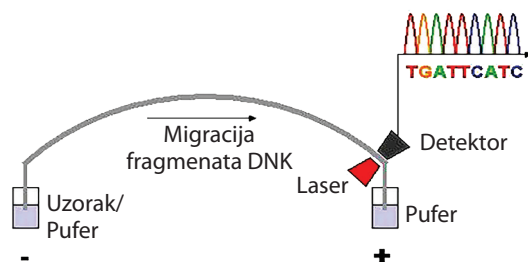
3.2.3. Analiza PCR produkata elektroforezom na agaroznom gelu

Nakon PCR reakcije, umnoženi fragmenti analizirani su horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu [Maniatis i sar., 1982] u koji je pre polimerizacije dodat etidijum bromid u finalnoj koncentraciji 0,5 µg/ml. Za pripremu gela i elektroforezu korišćen je pufer 1 x TAE. Elektroforeza izvedena je pri jačini struje od 110 mA i naponu od 110 V u trajanju od 40 min. Vizuelizacija umnoženih regiona DNK omogućena je upotrebom CCD kamere sa *BioDocAnalyze* sistemom (*Biometra GmbH, Göttingen, Germany*) i osvetljavanjem gela UV svetlom talasne dužine 312 nm. Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćen je odgovarajući komercijalni DNK marker (*ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA*).

3.2.4. Sekvenciranje po Sangeru

Za identifikaciju genetičkih varijanti odgovornih za razvoj GSD tip I korišćena je metoda sekvenciranja po Sangeru [Sanger i sar., 1977] kojom se određuje redosled nukleotida u lancu DNK. Metoda se zasniva na sposobnosti DNK polimeraze da izvrši *in vitro* replikaciju komplementarnog lanca DNK, korišćenjem oligonukleotidnog prajmera (koji se vezuje za jednolančanu DNK), dezoksiribonukleotida (dNTP) i didezoksiribonukleotida (ddNTP). Svaki od četiri ddNTP-a obeležen je različitom fluorescentnom bojom, čime je omogućeno da se sekvenciranje i detekcija produkata vrši u jednoj reakciji umesto u četiri odvojene. *In vitro* replikacija DNK zaustavlja se ugrađivanjem ddNTP-a koji ne poseduje 3'-OH grupu na molekulu dezoksiriboze neophodnu za elongaciju molekula DNK. U

PCR reakcionu smešu dodaje se samo jedan prajmer (asimetrični PCR), tako da se dobijaju fragmenti koji se međusobno razlikuju u dužini za po jedan bazni par i koji se završavaju ddNTP-om. Laser u automatizovanom aparatu detektuje fluorescentni signal nukleotida, koji se nakon kompjuterske obrade podataka prevodi u pik na elektroferogramu, što je ilustrovano na Slici 16.



Slika 16. Šematski prikaz generisanja rezultata sekvenciranja. Preuzeto i modificirano sa [https://en.wikipedia.org/wiki/Electropherogram#/media/File:CE_Basic.jpg].

Smeša PCR za sekvenciranje finalnog volumena od 5 μ l sadržala je \sim 10 ng prečišćenog PCR produkta, prajmer za sekvenciranje u finalnoj koncentraciji od 2 pmol (Tabela 4), 0,2 μ l *Ready Reaction Mix* iz *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA*) i ddH₂O do finalnog volumena. Temperaturni profil PCR reakcije sekvenciranja prikazan je u Tabeli 6.

Tabela 6. Temperaturni profil PCR reakcije sekvenciranja

	Temperatura (°C)	Vreme trajanja	Broj ciklusa
Početna denaturacija	96	1 min	1
Denaturacija	96	10 sec	
Aniling	50	5 sec	25
Ekstenzija	60	4 min	
Finalna ekstenzija	4	∞	1

Nakon završene reakcije, PCR produkti su prečišćeni precipitacijom sa Na-acetatom i apsolutnim etanolom. Osušeni talog rastvoren je u 25 μ l *HiDi Formamide* (*Applied Biosystems Life Technologies, California, USA*) i celokupna zapremina korišćena je za kapilarnu elektroforezu na automatskom sekvenceru 3130 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems Life Technologies, California, USA*). Analiza podataka izvršena je upotrebom *Sequencing Analysis Software v5.3.2 with KB Basecaller v1.4* (*Applied Biosystems Life Technologies, California, USA*).

3.2.5. Sekvenciranje nove generacije (NGS)

Kod pacijenata kod kojih nije uspostavljena dijagnoza sekvenciranjem po Sangeru, korišćena je metoda NGS koja omogućava precizno, masivno, paralelno sekvenciranje velikog broja DNK sekvenci u kratkom vremenskom periodu. Korišćen je *TruSight One Sequencing Panel* (Illumina, San Diego, USA) koji uključuje sve poznate gene povezane sa različitim bolestima koje su opisane u *online* dostupnim bazama podataka: DECIPHER [<https://decipher.sanger.ac.uk/>], ClinVar [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>], OMIM [www.omim.org], HGMD [www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php] i obuhvata kodirajuće regione 4.813 gena (~ 62.000 egzona) i njihovih okolnih intronskih sekvenci. Upotrebom ovog panela detektuju se pojedinačne nukleotidne varijante (SNVs, eng. *Single Nucleotide Variants*) u germinativnim ćelijama, kao i male insercije i delecije.

Metoda NGS obuhvata 3 glavna koraka:

- ⇒ pripremu uzoraka i formiranje biblioteke DNK,
- ⇒ reakciju sekvenciranja,
- ⇒ analizu dobijenih podataka.

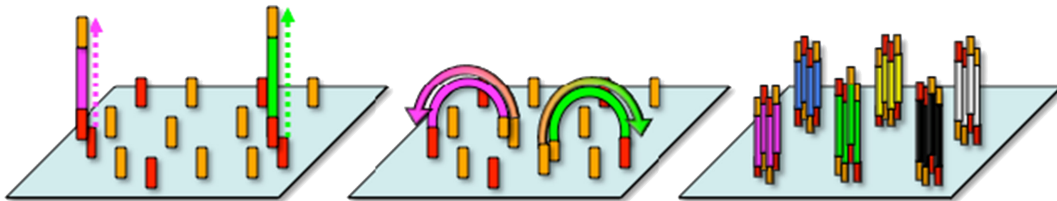
3.2.5.1. Formiranje biblioteke DNK

Priprema uzoraka pacijenata pre formiranja biblioteke DNK podrazumeva normalizaciju izolovanih uzoraka DNK na 10 ng/ μ l, a zatim diluciju na 5 ng/ μ l u finalnoj zapremini od 10 μ l Tris-HCl (10 mM, pH 8,5). Priprema uzoraka i formiranje biblioteke DNK urađeno je prema protokolu proizvođača [<https://support.illumina.com/>] upotrebom *Reagent Kit V3* (Illumina, San Diego, USA). Nakon formiranja biblioteke DNK, pre reakcije sekvenciranja sledi validacija. Za merenje koncentracije biblioteke DNK korišćen je *Qubit[®] 3.0 Fluorimeter* i *Qubit[™] dsDNA HS Assay Kit* (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Formirana biblioteka nanosi se na kertridž za sekvenciranje u koncentraciji od 12-13 pM u finalnom volumenu od 600 μ l *Resuspension Buffer* (*Reagent Kit V3*, Illumina, San Diego, USA).

3.2.5.2. Reakcija sekvenciranja

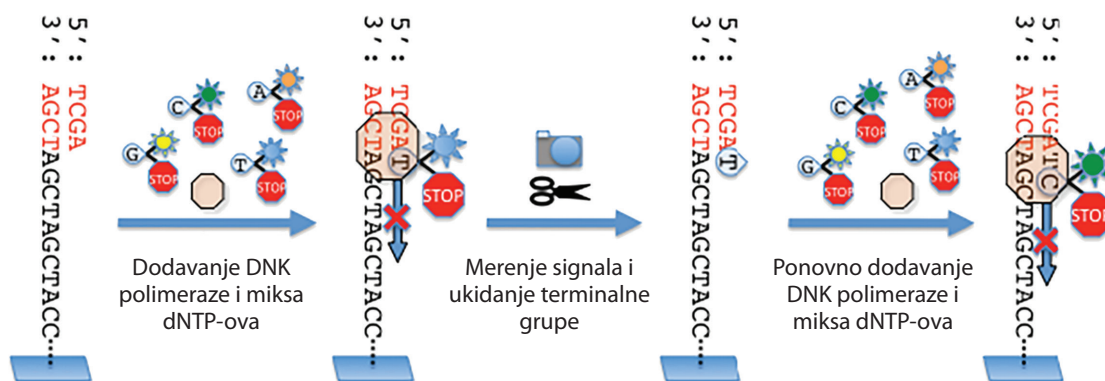
Sekvenciranje nove generacije odvija se sintezom (SBS, eng. *Sequencing by Synthesis*) na površini protočne ćelije (eng. *flow cell*) i zasniva se na upotrebi fluorescentno obeleženih dNTP-ova za paralelno sekvenciranje desetina miliona klastera. Tokom formiranja biblioteke, za fragmente DNK ligiraju se adapterski oligonukleotidi koji su komplementarni oligonukleotidima kovalentno vezanim za površinu protočne ćelije. Nakon komplementarnog sparivanja oligonukleotida, fragmenti molekula DNK klonalno se amplifikuju u modifikovanoj izotermalnoj PCR reakciji koja se zove

bridge-PCR [Adessi i sar., 2000; Fedurco i sar., 2006] tokom koje se molekuli DNK savijaju i formiraju most sa susednim oligonukleotidom na površini protočne ćelije (Slika 17). Ovaj proces omogućava formiranje više od 50 miliona pojedinačnih klastera koji sadrže više od hiljadu kopija klonalno amplifikovanih molekula DNK na površini protočne ćelije. Nakon toga dolazi do denaturacije klastera kako bi se obezbedila jednolančana DNK matrica za koju će se vezati prajmer za sekvenciranje.



Slika 17. Bridge-PCR. Matrice fragmenata DNK (obeležene zelenom i roze bojom) ligirane su sa adapterskim oligonukleotidima (obeleženi crvenom i narandžastom bojom) i denaturisane u jednolančane DNK molekule. U sledećem koraku komplementarno se spariju adapterski oligonukleotidi na površini protočne ćelije, pri čemu jednolančana DNK formira most. Adapteri služe kao prajmeri za umnožavanje fragmenata, nakon čega ponovo dolazi do denaturacije. Ovaj proces se ponavlja sve dok se ne formiraju klasteri sa multipnim klonalnim kopijama matrice na površini protočne ćelije. Preuzeto iz rada [Anderson i Schrijver, 2010].

Tokom svakog ciklusa sekvenciranja, klonalno amplifikovani klasteri izlažu se DNK polimerazi i miksu od četiri nukleotida od kojih je svaki obeležen jedinstvenom fluorescentnom bojom (Slika 18). Nukleotidi su modifikovani na 3'-kraju sa grupom koja omogućava terminaciju procesa sinteze kako bi se obezbedila ugradnja samo jednog nukleotida u svakom ciklusu sekvenciranja. Na kraju svakog ciklusa meri se fluorescentni signal za svaki klaster, a zatim dolazi do uklanjanja fluorescentnog markera i grupe za terminaciju. Na taj način rastući lanac se regeneriše za naredni ciklus dodavanja nukleotida.



Slika 18. Illumina hemija za sekvenciranje. Prajmer za sekvenciranje (obeležen crvenom bojom) anilingovan je sa matricom koja se nalazi na površini protočne ćelije. U sledećem koraku dodaje se DNK polimeraza i miks fluorescentno obeleženih dNTP-ova koji su modifikovani na 3'-kraju. U toku jednog ciklusa sinteze ugrađuje se samo jedan nukleotid. Nakon vezivanja nukleotida, meri se fluorescentni signal i terminalna grupa se uklanja sa sintetisanog lanca, nakon čega dolazi do ponovnog dodavanja DNK polimeraze i miksa dNTP-ova za započinjanje novog ciklusa sekvenciranja. Preuzeto i modifikovano iz rada [Anderson i Schrijver, 2010].

Za sekvenciranje i kreiranje VCF fajlova (eng. *Variant Call Format*) korišćena je *Illumina MiSeq* platforma (*Illumina, San Diego, CA*). Reakcija sekvenciranja svakog lanca DNK odigrala se u 151 ciklusu sa oba kraja (eng. *pair end read*). Kvalitet sekvenciranja prikazan je kao Q vrednost koja predstavlja procenat ugradnje ispravnog nukleotida. Optimalna vrednost kvaliteta sekvenciranja iznosi više od 90% (Q30), što znači da je 1 nt od 1000 nt pogrešno ugrađen u rastući lanac.

3.2.5.3. Analiza podataka

Nakon završene reakcije sekvenciranja, vrši se primarna i sekundarna analiza podataka na *Illumina MiSeq* aparatu (*Illumina, San Diego, CA*) koja podrazumeva formiranje FastQ, BAM (eng. *Binary Alignment/Map*) i VCF (eng. *Variant Calling Files*) fajlova. Analiza VCF fajlova omogućena je upotrebom softvera *VariantStudio 3.0.* (*Illumina, San Diego, CA*). Izvršeno je filtriranje podataka tako da su isključene varijante koje nisu prošle filter kvaliteta (Q20, dubina čitanja < 20), sinonimne varijante i varijante koje se javljaju u frekvenciji većoj od 1% u opštoj populaciji prema podacima iz baza podataka 1000 Genomes [<http://www.internationalgenome.org/>] i ExAC [<http://exac.broadinstitute.org/>]. Preostale promene koje uključuju nesinonimne varijante (eng. *missense variants*), varijante koje menjaju mesto iskrajanja introna (eng. *splice site variants*), koje uvode prevremeni stop kodon (eng. *nonsense variants*), male delecije, insercije (eng. *indels*) ili menjaju okvir čitanja (eng. *frameshift variants*), filtrirane su prema sledećim kriterijumima:

- ⇒ Prvo su ispitivani geni uzročnici različitih tipova GSD. Na osnovu literaturnih podataka, napravljen je panel gena za GSD koji se sastoji od 23 gena uzročnika: *AGL, ALDOA, ENO3, G6PC, GAA, GBE1, GYG1, GYS1, GYS2, LAMP2, LDHA, PFKM, PGAM2, PGM1, PHKA1, PHKA2, PHKB, PHKG1, PHKG2, PYGL, PYGM, SLC2A2* i *SLC37A4*.
- ⇒ Isključuju se sve varijante detektovane u genima uzročnicima GSD koje nisu ukazale na očekivani obrazac nasleđivanja (npr. ukoliko se detektuje samo jedna promena u genu koji je povezan sa autozomno recesivnim načinom nasleđivanja).
- ⇒ Proverava se da li su detektovane varijante opisane kao patogene u bazama podataka ClinVar [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>], VarSome [<https://varsome.com/>], HGMD [<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>]. Takođe, vrši se pretraživanje literature u bazi PubMed [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>] kako bi se utvrdilo da li za detektovane varijante postoje objavljene funkcionalne studije.
- ⇒ Ako ranije opisane varijante nisu detektovane, u tom slučaju vrši se *in silico* analiza novootkrivenih varijanti upotrebom različitih bioinformatičkih alata za utvrđivanje potencijalno patogenog efekta. Ako su nove varijante prijavljene u bazi ExAC [<http://exac.broadinstitute.org/>] ili detektovane u internoj *TruSight One* bazi, bile su isključene i nisu uzete u razmatranje.

⇒ Ukoliko nisu pronađene varijante u genima uzročnicima GSD, izvršena je analiza gena za GSD diferencijalnu dijagnostiku prema kliničkim parametrima pacijenata i kriterijumima predstavljenim u bazi podataka OMIM [www.omim.org].

Varijante odabrane ovim kriterijumima koje su na osnovu *in silico* predikcije okarakterisane kao potencijalno patogene i koje nisu detektovane ni u jednom od 75 uzoraka iz kontrolne grupe sekvencirane i analizirane na isti način, bile su potvrđene sekvenciranjem po Sangeru. U svim slučajevima izvršena je analiza segregacije kod roditelja radi potvrde da se otkrivene varijante nalaze na različitim hromozomima, kako bi se isključilo prisustvo velikih delecija, uniparentalne dizomije ili *allele drop-out*. Prajmeri koji su korišćeni u ovom delu studije dizajnirani su na način koji je prethodno objašnjen u poglavlju 3.2.2. i prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. Spisak parova prajmera korišćenih za verifikaciju varijanti detektovanih metodom NGS

Naziv bolesti	Gen	Kod sekvence	Naziv	Sekvenca prajmera (5'→3')	Region (egzon)	Dužina (bp)
GSD III	AGL	NG_012865.1	AGL_5F	CAGTAGCATGCTTGCCTTGC	5	432
			AGL_5R	GCCCCTTTCTCTTCTCTTTC		
			AGL_30F	CATCTCAATTCAGACTGGCCAC	30	424
			AGL_30R	GGAACTAAGCAAACCTAGCACATC		
GSD VI	PYGL	NG_012796.1	PYGL_16F	CATAGGTCTCACTGCCCTGAC	16	505
			PYGL_16R	GCCCTTATTCTGCACAAGAGTG		
GSD IXa	PHKA2	NG_016622.1	PHKA2_9F	CTCTTGACGCCCTGATACTCTG	9	432
			PHKA2_9R	CTCCAGGCTTGCTGACTCC		
SBDS	SBDS	NG_007277.1	SBDS_2F	GGGGTAAGAAAAAGAAAAGTGGCC	2	391
			SBDS_2R	GCTTGGTTAGTCTTTCCTCCAG		
LIPA	LIPA	NG_008194.1	LIPA_8F	CCGTGCTTACCATGTTGTTGC	8	430
			LIPA_8R	CCAGGACTCTGGGAAGAAAAC		

Legenda: SBDS – *Shwachman-Bodian-Diamond syndrome*; LIPA – *Lysosomal acid lipase deficiency*; F – ushodni prajmer, R – nishodni prajmer

3.2.6. *In silico* analiza detektovanih varijanti

Sve identifikovane varijante pretražene su u različitim bazama podataka kako bi se potvrdio njihov potencijalni patogeni efekat. Korišćene su sledeće baze podataka: HGMD [<http://www.hgmd.org>], VarSome [<https://varsome.com/>], ExAC [<http://exac>].

broad-institute.org/], dbSNP [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>], EVS [<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>], Ensembl [<https://www.ensembl.org/>], ClinVar [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>]. Ukoliko detektovana varijanta nije bila prisutna ni u jednoj od baza podataka, takva promena podvrgnuta je *in silico* analizi uz pomoć odgovarajućih bioinformatičkih softvera.

VarSome predstavlja veoma koristan alat za pretraživanje i analizu potencijalnog patogenog efekta humanih varijanti i sastoji se iz informacija dobijenih iz različitih baza podataka: gnomAD, genomi, ExAC, ClinVar, 1000 Genomes, UniProt, Kaviar i drugih [Kopanoss et al., 2018]. Takođe, u okviru ovog softvera, prikazana je ACMG klasifikacija (eng. *American College of Medical Genetics and Genomics*) efekta varijanti prema kriterijumima: patogene ili potencijalno patogene (P/LP, eng. *Pathogenic/Lightly Pathogenic*) varijante, i benigne ili potencijalno benigne (B/LB, eng. *Benign/Lightly Benign*) varijante. Za promene čiji su rezultati predikcije kontradiktorni dodeljen im se kriterijum nepoznatog značaja (eng. *Uncertain Significance*) [Richards et al., 2015].

U slučaju nesinonimnih varijanti (eng. *missense variants*) korišćeni su softveri:

- ⇒ PolyPhen-2 [<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>],
- ⇒ PROVEAN [<http://provean.jcvi.org/>],
- ⇒ MutPred2 [<http://mutpred.mutdb.org/>],
- ⇒ SIFT [<https://sift.bii.aster.edu.sg/>],
- ⇒ InterVar [<http://wintervar.wglab.org/>].

Varijante koje menjaju mesta iskrajanja introna (eng. *splice site variants*) analizirane su sledećim programima:

- ⇒ BDGP [http://www.fruit-fly.org/seq_tools/splice.html],
- ⇒ HSF [<http://www.umd.be/HSF3/>].

Ovim programima predviđa se da li detektovana promena može da dovede do razvoja bolesti ili predstavlja benignu varijantu koja nema patološki efekat.

Za utvrđivanje otvorenog okvira čitanja sekvence neizmenjenog i izmenjenog gena *SLC37A4* korišćen je softver *ExpASy Translate Tool* [<https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna2aa.cgi>]. Ovaj program omogućava *in silico* translaciju DNK ili RNK sekvenci ciljnih gena u proteinske sekvence i određivanje alternativnih okvira čitanja ili pojavu prevremenog STOP kodona.

Za proveru evolutivne konzerviranosti regiona proteina u kome je došlo do promene korišćen je program *Clustal Omega* [<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>]. Ovaj program vrši poravnanje većeg broja proteinskih sekvenci iz različitih organizama i omogućava proveru prisustva date aminokiseline na određenoj poziciji kod manje ili više evolutivno udaljenih vrsta.

Za analizu efekta genetskih varijanti na strukturu proteina korišćeni su programi *PyMOL* [Delano, 2002], *I-TASSER* [Roy et al., 2010; Yang et al., 2015].

3.3. Metode za funkcionalnu karakterizaciju novootkrivenih varijanti

Novootkrivene varijante detektovane kod više pacijenata, a koje nisu bile prisutne ni u jednoj od baza podataka i za koje je *in silico* analiza predvidela patološki efekat, bile su podvrgnute funkcionalnoj analizi. Ispitivan je ekspresioni profil kod pacijenata i kontrolnih ispitanika koji su po polu i uzrastu odgovarali analiziranim uzorcima. Tehnologijom CRISPR/Cas9 i *knockin* pristupom izmenjen je genom humane embrionalne bubrežne ćelijske linije 293FlpIn T-REx (HEK293FlpIn) kako bi se potvrdio patogeni efekat novootkrivene varijante. Ovim metodama predhodila je izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi pacijenata, njihovih roditelja i kontrolnih ispitanika, a zatim izolacija molekula RNK iz mononuklearnih ćelija.

3.3.1. Izolacija mononuklearnih ćelija iz periferne krvi

Za izolaciju mononuklearnih ćelija iz svežih uzoraka periferne krvi pacijenata, njihovih roditelja i kontrolnih ispitanika korišćen je *Ficoll-Paque™ Plus* (GE Healthcare Life sciences, Marlborough, USA) kao gustinski gradijent u cilju razdvajanja krvnih ćelija centrifugiranjem. Talog mononuklearnih ćelija resuspendovan je u 1 ml *TRI® Reagent Solution* (ThermoFisher Scientific, MA, USA) i čuvan na -80°C do dalje upotrebe. Detaljan protokol opisan je u doktorskoj disertaciji dr Biljane Stanković [Stankovic, 2015].

3.3.2. Izolacija RNK iz mononuklearnih ćelija

Celokupna RNK iz mononuklearnih ćelija izolovana je ekstrakcijom sa *TRI® Reagent Solution* (ThermoFisher Scientific, MA, USA) prema protokolu proizvođača. *TRI Reagent* predstavlja monofazni rastvor fenola i guanidin-izotiocijanata koji inhibira aktivnost RNaze, a sam proces predstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK [Chomczynski i Sacchi, 1987]. Uzorci se homogenizuju ili liziraju špricom u ovom rastvoru, a naknadno dodavanje hloroforma dovodi do razdvajanja homogenata u vodenu RNK fazu, interfazu u kojoj se nalazi DNK i organsku fazu koju čine proteini. RNK se iz vodene faze precipitira dodavanjem izopropanola (*Sigma-Aldrich, Missouri, USA*). U zavisnosti od količine taloga RNK je rastvarana u 20-100 μl DEPC vode. Uzorak se do dalje upotrebe čuvao na -80°C . Detaljan opis protokola predstavlja unapređen klasični metod izolacije RNK [Chomczynski i Sacchi, 1987] i detaljno je objašnjen u doktorskoj disertaciji dr Biljane Stanković [Stankovic, 2015]. Kvalitet i kvantitet izolovane RNK izmeren je na aparatu *Qubit® 3.0 Fluorimeter* (ThermoFisher Scientific,

MA, USA) upotrebom *Qubit™ RNA BR Assay Kit* dizajniranog specijalno za ovaj aparat. Ovaj esej je visoko selektivan za RNK i dizajniran tako da meri koncentraciju početnog uzorka od 1 ng/μl do 1 μg/μl.

3.3.3. Reverzna transkripcija

Metoda reverzne transkripcije (RT-PCR) kojom se iz izolovane RNK sintetiše komplementarna DNK (cDNK), izvršena je pomoću *RevertAid Reverse Transcriptase* (*ThermoFisher Scientific, MA, USA*) i *Random Hexamer Primer* (*ThermoFisher Scientific, MA, USA*) prema uputstvu proizvođača. Reakciona smeša volumena od 11 μl koja se sastoji iz 1 μg molekula RNK i *Random Hexamer* prajmera zagreva se 5 min na temperaturi od 70°C, pa se zatim u reakcionu smešu doda 9 μl unapred pripremljenog miksa koji sadrži: 5 x RT pufer, *RiboLock* (*ThermoFisher Scientific, MA, USA*), dNTP-ove i reverznu transkriptazu *RevertAid M-MuLV*, tako da finalni volumen reakcione smeše bude 20 μl. Uzorak cDNK koncentracije 50 ng/μl je do dalje upotrebe čuvan na -20°C. Temperaturni profil reakcije sinteze cDNK molekula prikazan je u Tabeli 8.

Tabela 8. Temperaturni profil sinteze cDNK molekula

	Temperatura (°C)	Vreme trajanja
Denaturacija sekundarnih struktura RNK	70	5 min
Aniling	25	15 min
Reverzna transkripcija	42	1 h
Inhibicija reverzne transkriptaze	70	10 min

Nakon završene reakcije, kvalitet sintetisane cDNK proveren je amplifikacijom fragmenta gena *ABL1* (eng. *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*), koji se konstitutivno eksprimira. Ovim je indirektno potvrđen integritet izolovane RNK koja je korišćena za sintezu cDNK, kao i efikasnost reverzne transkripcije. Produkti PCR reakcije analizirani su horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Za umnožavanje odabranog fragmenta gena *ABL1* korišćeni su prajmeri čije su sekvence prikazane u Tabeli 9. Reakciona smeša za PCR reakciju napravljena je prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2.

Tabela 9. Par prajmera korišćen za proveru kvaliteta sintetisane cDNK

Gen	Kod sekvence	Naziv	Sekvenca prajmera (5'→3')	Dužina (bp)
ABL1	NM_007313.2	Ia	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAA	289
		D	AGGTGATGTAGTTGCTTGGGACCCA	

Legenda: Ia – ushodni prajmer, D – nishodni prajmer

3.3.3.1. Identifikacija transkripata *SLC37A4* kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib: *nested-PCR* i *RT-PCR*

S obzirom da se u leukocitima i ćelijama jetre eksprimira isti transkript *SLC37A4* (bez egzona 7) [Ihara i sar., 2000], u ovom delu studije korišćene su neinvazivno dobijene mononuklearne ćelije izolovane iz periferne krvi pacijenata i kontrolnih ispitanika za RT-PCR analizu. Transkript *SLC37A4* (RefSeq: NM_001164277.1) amplifikovan je metodom *nested-PCR*, koja za cilj ima da smanji nespecifično vezivanje prajmera i selektivno amplifikuje željeni transkript. *Nested-PCR* uključuje dva seta prajmera i odvija se u dve uzastopne PCR reakcije. Amplikoni koji su rezultat prve PCR reakcije koriste se kao matrica za drugi set prajmera i drugi korak amplifikacije [Carr i sar., 2010]. Prajmeri upotrebljeni za specifično umnožavanje željenog transkripta dizajnirani su prema detaljnim *MIQE* uputstvima [Bustin i sar., 2009] uz pomoć različitih programa: *Primer-BLAST* [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>] i *qPCR Primer & Probe Design Tool* [<https://www.eurofinngenomics.eu/en/ecom/tools/qpcr-assay-design>]. Spisak parova prajmera koji su korišćeni za RT-PCR analizu prikazani su u Tabeli 10.

Tabela 10. Parovi prajmera korišćeni za RT-PCR analizu transkripta *SLC37A4* kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib

Naziv prajmera	Kod sekvence	Sekvenca prajmera (5'→3')	Dužina (bp)	<i>nested-PCR</i>
<i>SLC37A4</i> _F _{5'UTR}	NM_001164277.1	GAACTGTGAGAGCGGCAAG	1444	I
<i>SLC37A4</i> _R _{3'UTR}		CAGGCCCTCCTTTTCTC		
<i>SLC37A4</i> _F ₄		CTTACCTGTGGGTGCTCTCC	334	II
<i>SLC37A4</i> _R _{6/8}		CCCAATACCAGGATCCAGAGCTTGG		

Legenda: F – ushodni prajmer, R – nishodni prajmer

Za prvu PCR reakciju korišćen je *KAPA LongRange HotStart PCR Kit* (*KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA*), a temperaturni profil prikazan u Tabeli 11.

Reakciona smeša finalne zapremine 25 µl sadržala je sledeće komponente:

- ⇒ 100 ng cDNK,
- ⇒ 5 x *Long Range* PCR pufer (fin. konc. 1 x PCR pufer),
- ⇒ 25 mM MgCl₂ (fin. konc. 2 mM),
- ⇒ dNTP-ovi (fin. konc. svakog 0,375 mM),
- ⇒ prajmeri (fin. konc. svakog 10 pmol),
- ⇒ 1 U *KAPA Long Range HotStart* polimeraza,
- ⇒ ddH₂O do 25 µl.

Tabela 11. Temperaturni profil prve amplifikacije nested-PCR

	Temperatura (°C)	Vreme trajanja	Broj ciklusa
Početna denaturacija	94	5 min	1
Denaturacija	94	30 sec	
Aniling	56	30 sec	35
Ekstenzija	68	3 min	
Finalna ekstenzija	72	10 min	1

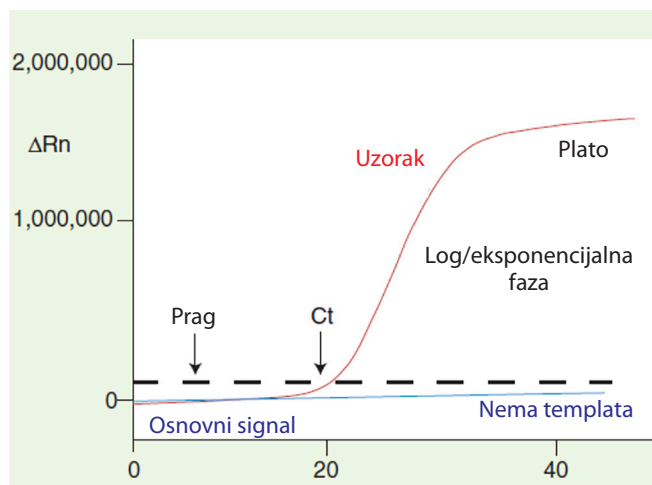
Reakciona smeša za drugu rundu *nested*-PCR reakcije pripremljena je prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2. Kao početna matrica korišćeno je 0,2 µl PCR produkta iz prve amplifikacije. Temperaturni profil razlikuje se od predstavljenog profila u Tabeli 5 u poglavlju 3.2.2. samo u temperaturi anilinga, koja je u ovom slučaju 63°C. Produkti PCR reakcije prečišćeni su na koloni korišćenjem *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Venlo, Netherlands) prema uputstvu proizvođača.

Nakon druge PCR reakcije, umnoženi fragmenti analizirani su horizontalnom elektroforezom na 3% *low-melting* agaroznom gelu (*NuSieve™ GTG™ Agarose*, Lonza, Rockland, ME, USA) u koji je pre polimerizacije dodat etidijum bromid (finalne koncentracije 0,5 µg/ml). Elektroforeza izvedena je preko noći pri jačini struje od 50 mA i naponu od 50 V. Nakon elektroforeze i vizuelizacije gela na CCD kameri, pojedinačni fragmenti isečeni su sa gela oštrim skalpelom, pa je zatim usledila ekstrakcija umnoženih fragmenata upotrebom *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen, Venlo, Netherlands) prema uputstvu proizvođača. Analiza pojedinačnih amplifikovanih fragmenata izolovanih sa gela izvršena je sekvenciranjem po Sangeru prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4. Za sekvenciranje korišćeni su prajmeri upotrebljeni za drugu amplifikaciju *nested*-PCR.

3.3.4. Analiza ekspresije gena metodom kvantitativnog PCR u realnom vremenu (RT-qPCR)

Kvantitativni PCR u realnom vremenu (RT-qPCR, eng. *Real-Time quantitative PCR*) predstavlja pouzdanu metodu za detekciju i merenje produkata tokom svakog ciklusa PCR reakcije tj. u realnom vremenu (eng. *real-time*). Detekcija amplifikacije omogućena je upotrebom fluorescentnih boja koje interaguju sa umnoženim produktom, pa je intenzitet fluorescencije proporcionalan količini produkta. Za razliku od metode „klasičnog” PCR-a gde se količina produkta meri na kraju PCR reakcije, ovde se kvantifikacija odvija u toku ekspanzionalne faze reakcije, gde dolazi do udvostručavanja produkta prilikom svakog PCR ciklusa [Arya i sar., 2005]. Fluorescentni signal koji je ispod praga detekcije (eng. *threshold*) predstavlja osnovni signal (eng. *baseline*) kada je količina amplifikata

još uvek mala da bi se signal detektovao (Slika 19). Kada fluorescentni signal pređe prag detekcije, PCR ciklus u kome se to dogodi označava se kao Ct vrednost (eng. *threshold cycle*) koja je direktno proporcionalna količini target sekvence u uzorku [Gibson i sar., 1996].



Slika 19. Faze RT-qPCR amplifikacije. R_n predstavlja vrednost fluorescencije reporterske boje, a ΔR_n predstavlja razliku R_n vrednosti između uzorka i kontrole. Preuzeto i modifikovano iz rada [Arya i sar., 2005].

Kvantifikacija RT-qPCR podataka može biti:

- ⇒ Apsolutna – rezultat predstavlja apsolutni broj kopija target sekvence. Tačna kvantifikacija target sekvence dobija se poređenjem sa standardnom krivom izrađenom od uzoraka poznate koncentracije.
- ⇒ Relativna – rezultat je predstavljen kao relativni odnos referentnog (kalibratora) i merenog uzorka.

U oba pristupa vrši se normalizacija dobijenih podataka. Pošto količina dobijenih PCR produkata zavisi od početne količine matrice, da bi se izbegle greške nastale prilikom postavke eksperimenta, paralelno sa umnožavanjem target sekvence vrši se i umnožavanje endogene kontrole. Kao endogena kontrola koristi se gen koji je konstitutivno eksprimiran (eng. *housekeeping*), čija ekspresija je stabilna u svim uzorcima koji se kvantifikuju, odnosno čija ekspresija se ne menja prilikom esperimentalnih tretmana [Arya i sar., 2005].

U ovoj studiji korišćena je metoda RT-qPCR zasnovana na primeni *SYBR Green I* boje koja se interkalira u molekul DNK. Sa povećanjem broja ciklusa PCR reakcije, dolazi do povećanja količine dvolančane DNK pa samim tim i do povećanja fluorescentnog signala koga emituje boja *SYBR Green I* (na 520 nm). Ova tehnika nije specifična i za posledicu može imati detekciju nespecifično amplifikovanih PCR produkata, kao i detekciju dimera prajmera. Za procenu specifičnosti primenjuje se analiza krive topljenja (eng. *melting curve analysis*) u kojoj temperatura polako raste od 40 do 95°C, pri čemu se konstantno prati nivo fluorescencije. Fluorescentni signal će biti visok

pri niskim temperaturama u slučaju postojanja dvolančane DNK, ali će fluorescencija drastično da se smanji pri temperaturama oko tačke topljenja PCR produkata. PCR produkti različite dužine i sastava imaće različite tačke topljenja pa će davati različite pikove fluorescencije. Specifični PCR produkt imaće samo jedan pik.

3.3.4.1. Apsolutna kvantifikacija

Prajmeri korišćeni za specifičnu amplifikaciju željenih transkripata dizajnirani su prema uputstvima navedenim u poglavlju 3.3.3.1. Efikasnost dizajniranih prajmera proverena je metodom apsolutne kvantifikacije, serijom od 5 razblaženja uzorka poznate koncentracije (100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng i 0,01 ng). Razblaženje koje je imalo najnižu Ct vrednost korišćeno je u metodi relativne kvantifikacije. Podaci o prajmerima koji su upotrebljeni u ovoj studiji za analizu ekspresije gena *SLC37A4* kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib prikazani su u Tabeli 12.

Tabela 12. Spisak prajmera korišćenih za apsolutnu i relativnu kvantifikaciju ekspresije gena *SLC37A4*

Gen	Kod sekvence	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5'→3')
<i>SLC37A4</i>	NM_001164277.1	<i>SLC37A4_F₄</i>	CTTACCTGTGGGTGCTCTCC
		<i>SLC37A4_F_{4/6}</i>	GCCCTTGTAGGCGGGACTG
		<i>SLC37A4_F₆</i>	GCCTGTTGCTGTTTCATGATGGCTG
		<i>SLC37A4_R_{6/8}</i>	CCCAATACCAGGATCCAGAGCTTGG
<i>GAPDH</i>	NM_001289745.2	<i>GAPDH_SYBR_F</i>	GTGAAGGTCGGAGTCAACG
		<i>GAPDH_SYBR_R</i>	TGAGGTCAATGAAGGGGTC

Legenda: F – ushodni prajmer, R – nishodni prajmer

Prajmeri za određivanje ekspresije gena *GAPDH* preuzeti su iz publikacije Baluchami i sar. [Baluchamy i sar., 2007].

3.3.4.2. Relativna kvantifikacija

Ekspresioni profili gena u uzorcima krvi određeni su na aparatu *ABI 7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) upotrebom *KAPA SYBR Green Universal qPCR Master Mix* (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA). Za normalizaciju sintetisane cDNK u uzorcima korišćena je endogena kontrola gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (*GAPDH*), a kao kalibrator odabrana je medijana normalizovanih vrednosti za ekspresiju gena u uzorcima kontrolne grupe. Svi eksperimenti rađeni su u duplikatu. Ukoliko su se Ct vrednosti za isti uzorak značajno razlikovale, eksperiment je ponovljen u duplikatu.

Reakciona smeša ukupnog volumena 10 μ l sastojala se od sledećih komponenti u finalnim koncentracijama:

- ⇒ 20 ng cDNK,
- ⇒ 1 x *Kapa Syber Fast Universal qPCR Master Mix*,
- ⇒ 1 x *ROX Low* referentna boja,
- ⇒ 3 pmol prajmera
- ⇒ *PCR grade water* do finalnog volumena.

Temperaturni profil reakcije korišćene za amplifikaciju iRNK *SLC37A4* i *GAPDH* prikazan je u Tabeli 13. Nakon završene reakcije RT-qPCR, radi utvrđivanja specifičnosti reakcije puštena je kriva disocijacije.

Za obradu rezultata upotrebljen je komparativni ddCt metod [Livak i Schmittgen, 2001]. Formula po kojoj je izračunata relativna vrednost količine ekspresije ciljnog gena je:

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

$$ddCt = dCt_{uzorka} - dCt_{kalibratora} = (Ct_{uzorka} - Ct_{endogena kont.}) - (Ct_{kalibratora} - Ct_{endogena kont.}).$$

Tabela 13. Temperaturni profil reakcije RT-qPCR

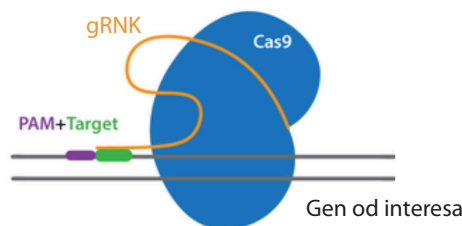
	Temperatura (°C)	Vreme trajanja	Broj ciklusa
1.	50	2 min	1
2.	95	10 min	1
3.	95	15 sec	40
	60	1 min	

3.3.5. Formiranje *in vitro* model sistema za GSD tip Ib – tehnologija CRISPR/Cas9 i *knockin* pristup

CRISPR/Cas9 (eng. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated protein 9*) tehnologija predstavlja revolucionarni metod za precizno editovanje željenih genskih lokusa različitih tipova ćelija i organizama. CRISPR/Cas9 sistem prvobitno je otkriven 1980. godine u *Escherichia coli* [Ishino i sar., 1987], ali funkcija ovog sistema nije potvrđena sve do 2007. godine kada su Barrangou i sar. pokazali da *Streptococcus thermophilus* može steći otpornost na bakteriofag integracijom infektivnog genetičkog fragmenta u svoj CRISPR lokus [Barrangou i sar., 2007].

CRISPR/Cas9 predstavlja bakterijski adaptivni imuni sistem koji koristi RNK molekulom vođenu nukleazu za odstranjivanje stranog genetičkog materijala uvođenjem dvolančanih prekida [Horvath i Barrangou, 2010; Bhaya i sar., 2011; Makarova i sar., 2011]. Do sada su identifikovana tri CRISPR sistema (I-III) u širokom spektru bakterijskih i arhejskih domaćina, pri čemu je tip II najbolje okarakterisan [Garneau i sar.,

2010; Gasiunas i sar., 2012; Jinek i sar., 2012]. CRISPR sistem tip II sastoji se od nukleaze Cas9, crRNK niza koji kodira mali vodič RNK molekul (sgRNA, eng. *Single-Guide RNA*) i neophodne pomoćne transaktivirajuće crRNK (tracrRNK, eng. *trans activated crRNA*) koja olakšava procesovanje crRNK lanca i omogućava povezivanje crRNK i Cas9 u ribonukleoproteinski kompleks [Garneau i sar., 2010; Gasiunas i sar., 2012]. Svaka crRNK jedinica sastoji se iz 20 nt dugačke *guide* sekvence i parcijalno direktnih ponovaka (koji se nazivaju protospeseri), koji navode Cas9 na 20 bp dugačku target DNK sekvencu i spajaju se sa njom po principu komplementarnosti (Slika 20). Vezivanje endonukleaze Cas9 sa ciljnim genomskim lokusom posredovano je i kratkom sekvencom od 3 bp u targetnoj DNK sekvenci. Taj niz naziva se protospesjer susjedni motiv ili PAM region (PAM, eng. *Protospacer Adjacent Motif*). Neophodno je da PAM motiv bude smešten odmah nishodno od mesta komplementarnosti. Ukoliko PAM region nedostaje na targetnoj sekvenci, Cas9 se neće vezati ni uvesti dvolančane prekide. U CRISPR/Cas9 sistemu koji potice od *S. pyogenes*, targetnom DNK lokusu mora da prethodi PAM motiv 5'-NGG ili 5'-NAG [Jinek i sar., 2012], dok drugi Cas9 ortolozi mogu zahtevati druge PAM motive kao kod *S. thermophilus* (5'-NNAGAA za CRISPR1 i 5'-NGGNG za CRISPR3) i *Neisseria meningitidis* (5'-NNNNGATT) [Garneau i sar., 2010; Gasiunas i sar., 2012].



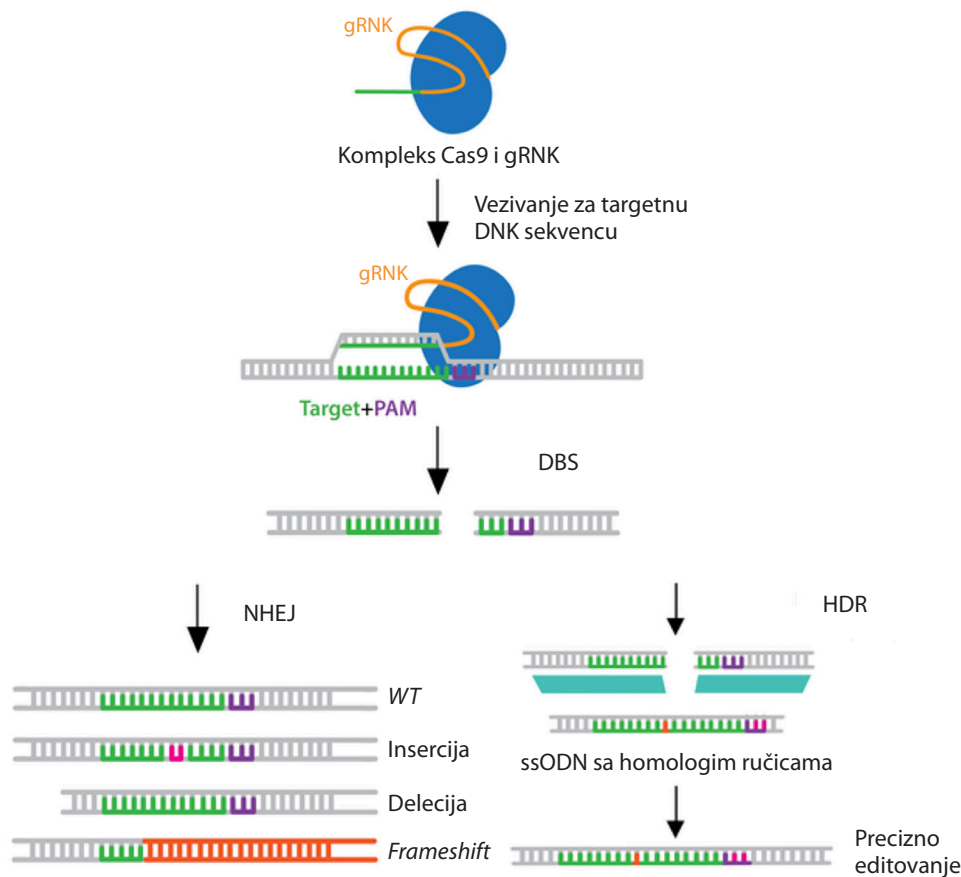
Slika 20. CRISPR/Cas9 tip II kompleks. Ovaj kompleks sastoji se iz dve komponente: sgRNK i CRISPR asocirane endonukleaze. sgRNK je mala sintetička RNK sastavljena iz sekvence neophodne za povezivanje za Cas9 i 20 nt dugačke sekvence komplementarne targetovanoj DNK sekvenci. Prema tome, genomski target proteina Cas9 može se definisati jednostavnim dizajniranjem sekvence prisutne u sgRNK. Preuzeto i modifikovano sa [<https://www.addgene.org/crispr/guide/#ko-generation>].

Metoda editovanja genoma zasniva se na upotrebi endonukleaza koje su vođene malim dizajniranim RNK molekulom koji se komplementarno vezuje za željeni DNK lokus i time omogućava endonukleazi da na specifičnom mestu u genomu uvede dvolančani prekid (DSB, eng. *Double-Stranded Breaks*) ~ 3-4 bp ushodno od PAM regiona [Hsu i Zhang, 2012; Jinek i sar., 2012]. Nakon uvedenog prekida, targetovani lokus biva podvrgnut reparaciji DNK uz pomoć dva glavna mehanizma (Slika 21):

- ⇒ nehomologim sparivanjem krajeva (NHEJ, eng. *Non-Homologous End Joining*),
- ⇒ reparacijom homologom rekombinacijom (HDR, eng. *Homology Directed Repair*),

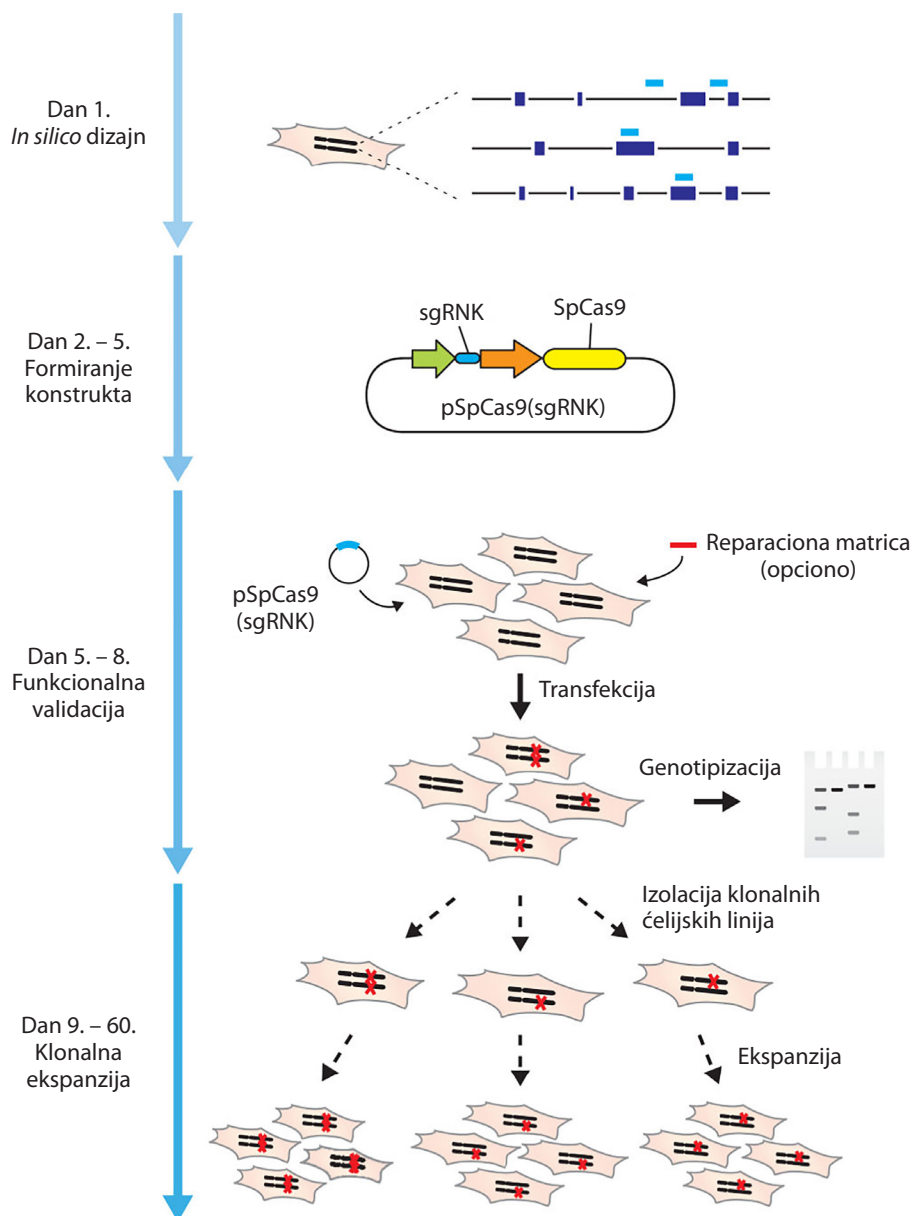
a oba puta mogu da se koriste kako bi se postigao željeni efekat editovanja [Cong i sar., 2013]. U odsustvu reparacione matrice, dvolančani prekid popravljaju se procesom NHEJ

koji ostavlja ožiljke u formi malih insercija/delecija (eng. *indels*). NHEJ se može iskoristiti za konstruisanje *knockout* gena, pošto male insercije/delecije u okviru kodirajućeg regiona gena dovode do promena koje menjaju okvir čitanja (eng. *frameshift variants*) i pojave prevremenog stop kodona (eng. *nonsense variants*) [Urnov i sar., 2010]. HDR je alternativni put reparacije DNK. Iako se dešava znatno ređe i varijabilnije frekvencije nego NHEJ, ovaj proces može biti korišćen za generisanje precizno definisanih modifikacija targetovanih lokusa uz prisustvo egzogeno uvedene matrice za reparaciju (konstruisanje *knockin* gena). Reparaciona matrica može biti u formi dvolančanog DNK konstrukta ili jednolančanog DNK oligonukleotida (ssODN, eng. *Single-Stranded Donor Oligonucleotide*) [Chen i sar., 2011]. Za razliku od NHEJ, HDR je aktivna samo u ćelijama koje se dele, a efikasnost zavisi od tipa i stanja ćelije, kao i od genomskog lokusa i reparacione matrice [Saleh-Gohari i Helleday, 2004][Saleh-Gohari i sar. 2004].



Slika 21. Reparacija dvolančanih prekida DNK lanca u targetovanom editovanju genoma. Dvolančani DNK prekidi indukovani Cas9 endonukleazom mogu biti popravljani jednim od dva moguća puta. U NHEJ putu krajevi dvolančanog prekida popravljaju se uz pomoć endogene DNK mašinerije za reparaciju i ponovno spajanje, koja može uzrokovati nastanak slučajnih indel promena na mestu prekida. Indel mutacije u okviru kodirajućeg regiona gena dovode do stvaranja varijanti koje menjaju okvir čitanja i kreiraju prevremeni stop kodon i stvaranje knockout gena. Alternativno, matrica za reparaciju u formi plazmida ili ssODN može biti isporučena kako bi se aktivirao HDR put za reparaciju, koji omogućava visoku preciznost editovanja. Preuzeto i modifikovano sa [<https://www.addgene.org/crispr/guide/#ko-generation>].

U ovoj studiji korišćen je pristup za *in vitro* precizno editovanje genoma (*knockin*) koji je detaljno opisan u protokolu Ran i sar. [Ran i sar., 2013]. Ovaj metod zasniva se na korišćenju nukleaze Cas9 i dirigovane homologe rekombinacije za precizno editovanje genoma odabrane ćelijske linije, a kratak pregled metode prikazan je na Slici 22. Za generisanje *knockin* ćelija, HDR je esencijalan za uvođenje varijante od interesa u genom ćelijske linije uz pomoć egzogeno uvedene reparacione matrice tokom dvolančanog prekida DNK lanca [Chen i sar., 2011]. Efikasnost HDR je generalno niska (<10% modifikovanih alela) i u ćelijama koje eksprimiraju Cas9, sgRNK i egzogenu reparacionu matricu. Da bi se poboljšala efikasnost HDR, vrši se sinhronizacija ćelija, jer se HDR odvija samo tokom S i G2 faza ćelijskog ciklusa [Mao i sar., 2008].



Slika 22. Pregled koraka i vremenski okvir preciznog editovanja genoma upotrebom knockin pristupa. Preuzeto i modifikovano iz rada [Ran i sar., 2013].

3.3.5.1. Čelijska linija i uslovi gajenja

Za formiranje *in vitro* model sistema za GSD tip Ib korišćena je humana embrionalna bubrežna čelijska linija Flp-In™ T-REx™-293 (HEK293FlpIn) dobijena na poklon od prof dr Aleksandre Trifunović (AG Trifunovic, CECAD, Cologne, Germany).

Ćelije su kultivisane prema uputstvu proizvođača (Life Technologies, California, USA). Za gajenje permanentne čelijske linije korišćen je *High glucose DMEM* sa *GlutaMAX™* (Gibco, MA, USA) suplementiran sa 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*, Gibco, MA, USA) i 1% *Antibiotic-Antimycotic* (Gibco, MA, USA) u standardnim uslovima za gajenje ćelija pri temperaturi od 37°C i 5% CO₂. Ćelije su pasažirane u odnosu 1:10 na svaka 2-3 dana kada su dostizale 80-90% konfluentnosti. Iako su HEK293FlpIn adherentne ćelije, lako se odlepljuju od podloge na kojoj se gaje, tako da prilikom pasažiranja nije korišćen tripsin. Brojanje ćelija vršeno je upotrebom aparata *Countess™ Automated Cell Counter* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), prema uputstvu proizvođača. Ćelije u koncentraciji od 3 x 10⁶ ćelija/ml zamrzavane su u medijumu za zamrzavanje koji se sastojao iz 80% kompletnog medijuma za kultivaciju ćelija, 10% dodatnog FBS i 10% dimetilsulfoksida (DMSO, *SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany*).

Pre nego što je započet proces editovanja genoma čelijske linije HEK293FlpIn, izvršeno je Sangerovo sekvenciranje gena *G6PC* i *SLC37A4*, kako bi se utvrdilo da ne postoje promene u ovim genima koje bi mogle da utiču na funkcionalnost kompleksa G6PC/G6PT i da ova linija predstavlja *wt* (eng. *wild-type*) čelijsku liniju. Sekvenciranje je izvršeno prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4. Takođe, ćelije su prvobitno gajene dve nedelje u medijumu i zatim testirane na prisustvo različitih sojeva *Mycoplasma* bakterija metodom PCR. Nakon dve nedelje kultivacije, iz konfluentne šolje sakupi se 1 ml medijuma koji se centrifugira 5 min na 1200 rpm i 4°C (*Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Germany*). Zatim se supernatant prebaci u novu tubu i centrifugira 15 min na 1500 rpm i 4°C. U sledećem koraku odstrani se supernatant, a pelet rastvori u 20 µl ddH₂O. Uzorak se potom inkubira 10 min na 95°C u PCR aparatu. Kao početni materijal za umnožavanje koristi se 4 µl uzorka. PCR reakcija urađena je prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.2. Par prajmera koji je korišćen u ove svrhe preuzet je iz publikacije van Kuppeveld i sar. i prikazan u Tabeli 14 [van Kuppeveld i sar., 1992], a temperaturni profil PCR reakcije u Tabeli 15. Pored uzorka HEK293FlpIn ćelija, paralelno su umnožene pozitivna i negativna kontrola.

Tabela 14. Par prajmera korišćen za testiranje ćelijske linije HEK293FlpIn na prisustvo Mycoplasma sojeva

Naziv	Sekvenca prajmera (5'→3')	Dužina (bp)
MYC_Up	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA	703-713
MYC_Down	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	

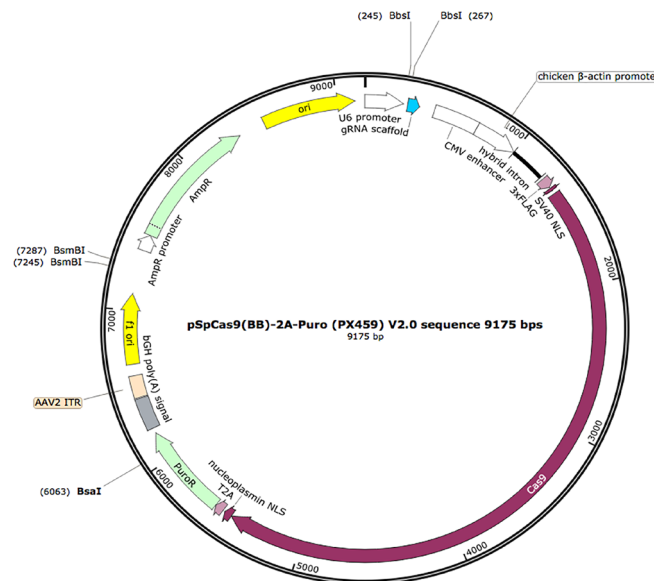
Legenda: Up – ushodni prajmer, Down – nishodni prajmer

Tabela 15. Temperaturni profil reakcije PCR za testiranje prisustva Mycoplasma sojeva u ćelijskoj liniji HEK293FlpIn

	Temperatura (°C)	Vreme trajanja	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	5 min	1
Denaturacija	94	30 sec	
Aniling	56	30 sec	30
Ekstenzija	72	45 sec	
Finalna ekstenzija	72	10 min	1

3.3.5.2. Ekspresioni sistemi

Za editovanje genoma ćelijske linije HEK293FlpIn korišćen je ekspresioni vektor pSpCas9(BB)-2A-Puro V2.0 ili PX459 (*Addgene, Cambridge, MA, USA*) (Slika 23). Ovaj vektor poseduje gen za rezistenciju na antibiotik puromicin koji se koristi pri pozitivnoj selekciji transfektovanih ćelija. Za proveru efikasnosti transfekcije ćelijske linije HEK293FlpIn korišćen je pSpCas9(BB)-2A-GFP ili PX458 (*Addgene, Cambridge, MA, USA*). Oba ekspresiona vektora dobijena su na poklon od prof dr Aleksandre Trifunović (*AG Trifunovic, CECAD, Cologne, Germany*).



Slika 23. Ekspresioni vektor pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0.

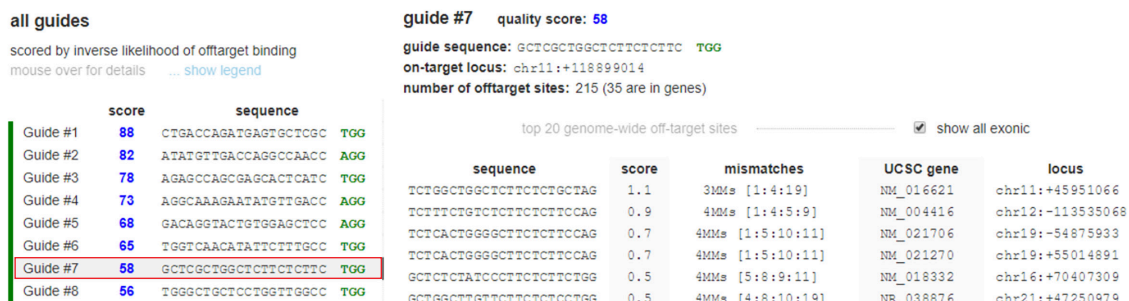
Preuzeto sa [<https://www.addgene.org/62988/>].

3.3.5.3. Bakterijski soj

Za umnožavanje ekspresionih vektora korišćen je *E. coli* DH5 α soj kultivisan u tečnom LB (eng. *Luria-Bertani*) medijumu (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca) ili na čvrstoj LB podlozi (1% tripton, 1% NaCl, 0,5% ekstrakt kvasca i 1,5% bacto-agar) prema protokolu opisanom u Maniatis i sar. [Maniatis i sar., 1982]. Svi medijumi za kultivisanje sterilisani su autoklaviranjem 20 min na 120°C. Kultivacija bakterija vršila se na temperaturi od 37°C. S obzirom da PX459 nosi rezistenciju na ampicilin, ovaj antibiotik je dodavan i u tečni i u čvrsti medijum u finalnoj koncentraciji od 100 μ g/ml.

3.3.5.4. Dizajniranje komponenti za editovanje genoma

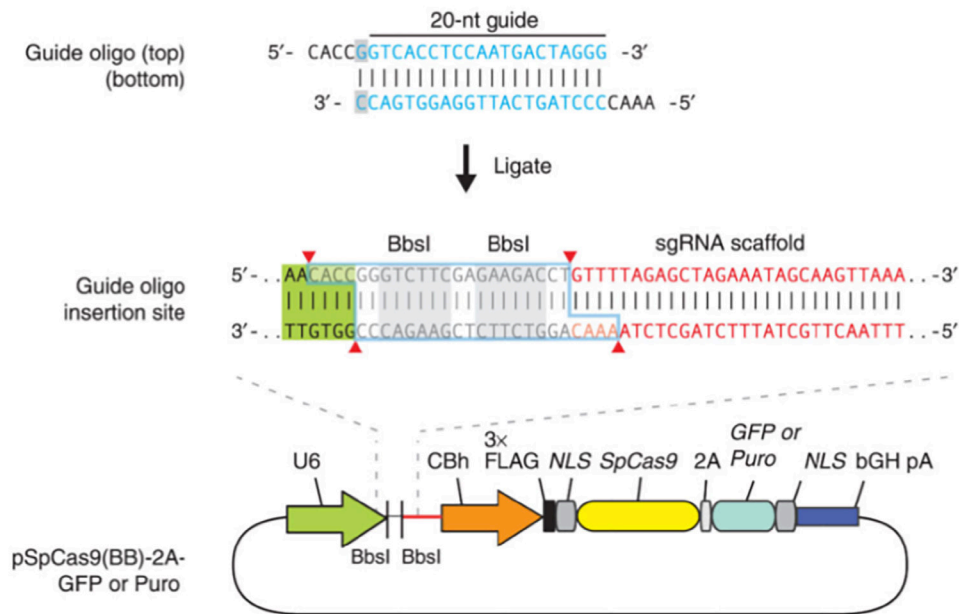
Za dizajniranje sgRNK upotrebljen je *online* dostupan program *CRISPR Design Tool* [<https://zlab.bio/guide-design-resources>] koji koristi genomsku sekvencu od interesa i vrši predikciju potencijalnih target mesta za enzim Cas9 (*on-target* mesta), ali i predikciju potencijalnih neželjenih mesta sečenja (*off-target*) (Slika 24). *CRISPR Design Tool* prikazuje listu svih mogućih *guide* sekvenci koje su poredane na osnovu skora kvaliteta (eng. *quality score*). Skor kvaliteta predstavlja verovatnoću da Cas9 seče *on-target* (što iznosi 100%) umanjenu za ukupni broj mogućih *off-target* za genom od interesa. Što je veći skor kvaliteta, manji je broj potencijalnih *off-target* mesta.



Slika 24. Prikaz potencijalnih target mesta dobijenih upotrebom programa CRISPR Design Tool [<https://zlab.bio/guide-design-resources>].

Prilikom dizajniranja neophodno je da sgRNK sadrži (Slika 25):

- ⇒ ručice za ligaciju u odabrani ekspresioni vektor, kako bi se ligacija dogodila na pravom mestu i u pravoj orijentaciji,
- ⇒ 20 nt dugačku sekvencu koja je komplementarna targetnoj DNK sekvenci,
- ⇒ G nt na 5'-kraju sekvence sgRNK. Ako 5'-kraj sgRNK ne počinje sa G nukleotidom, onda se on dodaje kao 21. nt zato što je pokazano da pospešuje transkripciju sa U6 promotora vektora, a samim tim i efikasnost transfekcije [Guschin i sar., 2010].



Slika 25. Šematski prikaz kloniranja sgRNK u ekspresioni vektor PX459.
Preuzeto i modificirano iz rada Ran i sar. 2016.

Za uvođenje nove varijante c.248G>A (p.Gly83Glu) u gen *SLC37A4* ćelijske linije HEK293FlpIn, odabrana je sgRNA čiji se PAM region poklapa sa kodonom za glicin koji je izmenjen kod 3 pacijenta sa GSD tip Ib (Slika 26). Mesto sečenja enzima Cas9 nalazilo se 6 nt ushodno od promene koju smo želeli da uvedemo u genom ćelijske linije HEK293FlpIn.

U ovoj studiji korišćen je jednolančani oligonukleotidni DNK lanac (ssODN) kao matrica za popravku dvolančanih prekida nastalih targetovanim sečenjem endonukleazom Cas9. Za dizajniranje ssODN upotrebljeni su sledeći programi:

- ⇒ NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>],
- ⇒ Ensembl [<https://www.ensembl.org/index.html>],
- ⇒ NEBcutter 2.0 [<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>],
- ⇒ Restriction Mapper [<http://www.restrictionmapper.org/>].

ssODN reparaciona matrica (*Integrated DNA Technologies, San Jose, CA, USA*) dugačka 121 nt, bila je orijentisana u 5'-3' smeru (eng. *sense*) u odnosu na targetnu DNK sekvencu i sadržala je 60 nt dugačke regione homologije, a u sredini željeni nukleotid A. Varijanta A ujedno je menjala PAM region tako da više nije bio prisutan u reparacionoj matrici i uvodila je novo restrikciono mesto za endonukleazu DdeI (*New England BioLabs®*, Ipswich, MA, USA). Na Slici 26 dat je šematski prikaz humanog lokusa *SLC37A4* sa matricom, a u Tabeli 16 predstavljene kompletne sekvence targetovanog regiona gena *SLC37A4*, sgRNK i ssODN.

SLC37A4 egzon 2



ssODN_p.Gly83Gly



Slika 26. Šematski prikaz humanog lokusa SLC37A4 sa odgovarajućom ssODN matricom.

A) Deo sekvence egzona 2 gena SLC37A4. Kodon za glicin uokviren je plavom bojom, dok su sgRNK i PAM region obeleženi crvenom bojom. Strelica predstavlja mesto uvođenja dvolančanog prekida u lancu DNK. B) ssODN sa željenom promenom koja je obeležena zelenom bojom, dok je mesto prepoznavanja restriktionog enzima DdeI podvučeno, a strelica predstavlja mesto sečenja.

Tabela 16. Sekvence sgRNK i ssODN korišćene za precizno editovanje genoma ćelijske linije HEK293FlpIn.

Naziv	Kod sekvence	Sekvenca
oligo_sgRNA		F: 5' - CACCGCTCGCTGGCTCTTCTCTTC - 3'
		C: 3' - CGAGCGACCGAGAAGAGAAGCAAA - 5'
ssODN	NG_013331.1	5' - GCAAGTTTGTCAAGTGGGGTGCTGTCTGACCAGATGAGTGCTCGCTGGCTCTTCTCTTCTGAGCTGCTCCTGGTTGGCCTGGTCAACATATTCTTTGCCTGGAGCTCCACAGTACCTGTCTT - 3'

Legenda: F – sense oligonukleotid, C - komplementarni oligonukleotid

3.3.5.5. Priprema ekspresionog konstrukta PX459_sgRNK

Aniling sgRNK oligonukleotida

Da bi željena sgRNK mogla da se eksprimira sa vektora, neophodno je da se prekloniranja formira dvolančani DNK fragment oligonukleotida sgRNK. Reakciona smeša za ligaciju oligonukleotida sastojala se iz sledećih komponenti u finalnim koncentracijama:

- ⇒ oligo_sgRNK po 10 pmol,
- ⇒ 1 x T4 ligacioni pufer,
- ⇒ 10 mM ATP (*New England BioLabs*®, Ipswich, MA, USA),
- ⇒ 1 U T4 polinukleotid kinaza (*New England BioLabs*®, Ipswich, MA, USA),
- ⇒ ddH₂O do 10 µl.

Temperaturni profil anilinga oligonukleotida sgRNK prikazan je u Tabeli 17. Nakon završene reakcije vrši se razblaživanje produkta u odnosu 1:150.

Tabela 17. Temperaturni profil anilinga sekvenci sgRNK

Temperatura (°C)	Vreme trajanja
37	30 min
65	20 min
95	5 min
10	∞

Kloniranje sgRNK u ekspresioni vektor PX459

Pre nego što se izvrši reakcija kloniranja neophodno je da se uradi analiza vektora metodom RFLP (eng. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Metoda se zasniva na upotrebi restrikcionih endonukleaza koje prepoznaju određenu sekvencu DNK u okviru koje se nalazi ispitivana promena. Kada enzim prepozna restrikciono mesto, vezuje se za DNK i uvodi dvolančane prekide usled čega se formiraju fragmenti različite dužine zbog prisustva ili odsustva željene promene u ispitivanoj sekvenci DNK. Produkti digestije se potom analiziraju na horizontalnoj elektroforezi [Maniatis i sar., 1982]. U ovom slučaju, digestija je korišćena za restrikciono kloniranje željene sgRNK u ekspresioni vektor PX459.

PX459 poseduje dva mesta za sečenje restrikcionim enzimom *BbsI* (*New England BioLabs*®, Ipswich, MA, USA). Reakcija digestije urađena je prema protokolu proizvođača. Nakon završene reakcije, vektor je prečišćen na koloni upotrebom *QIAquick PCR Purification Kit* (*QIAGEN*, Venlo, Netherlands) prema uputstvu proizvođača i analiziran horizontalnom elektroforezom na 1% agaroznom gelu sa etidijum bromidom (finalne koncentracije 0,5 µg/ml). Elektroforeza je izvedena pri jačini struje od 110 mA i naponu od 110 V u trajanju od 1 h. Koncentracija digeriranog vektora izmerena je na *Qubit*® 3.0 *Fluorimeter* (*ThermoFisher Scientific*, MA, USA) upotrebom *Qubit*™ *dsDNA HS Assay Kit*.

Ligaciona smeša finalne zapremine od 15 µl sadržala je sledeće komponente:

- ⇒ 100 ng digeriranog vektora PX459,
- ⇒ 2 µl diluirane sgRNK,
- ⇒ 10 mM ATP (*New England BioLabs*®, Ipswich, MA, USA),
- ⇒ 1 x T4 ligacioni pufer,
- ⇒ 1 U T4 ligaze (*ThermoFisher Scientific*, MA, USA),
- ⇒ ddH₂O do 15 µl,

a potom se preko noći (~16 h) inkubirala na 37°C. Kao negativna kontrola korišćena je ligaciona smeša bez ligaze i sgRNK.

Transformacija kompetentnih ćelija bakterijskog soja DH5 α

Kompetentne DH5 α ćelije (100 μ l) otopljene su na ledu, pa im je zatim dodato 5 μ l ekspresionog konstrukta PX459. Nakon veoma pažljivog mešanja, smeša je inkubirana 30 min na ledu. Sledeći korak je izlaganje smeše temperaturnom šoku: 1 min na 42°C bez mešanja u aparatu *Thermomixer* (Eppendorf, Hamburg, Germany), nakon čega se smeša momentalno prebaci na led 15 min. Ovim se postiže maksimalna propustljivost ćelijskih membrana bakterija i omogućava efikasna transformacija DH5 α plazmidnom DNK [Maniatis i sar., 1982]. U smešu je dodato 250 μ l tečnog LB medijuma (bez antibiotika) koja se zatim mešala 1 h na 37°C u aparatu *Thermomixer* (Eppendorf, Hamburg, Germany). Za svaku smešu pripremljeno je po dve petri šolje sa čvrstim LB podlogama sa ampicilinom u finalnoj koncentraciji 100 μ g/ml. S obzirom da PX459 poseduje gen za rezistenciju na ampicilin, samo bakterije koje su primile plazmidnu DNK mogu da izrastu na ovoj podlozi. Transformacione smeše od 50 μ l i 100 μ l utrljavane su na podloge i inkubirane 16 h na 37°C. Od preostale količine prekonoćnih kultura napravljeni su glicerolcki stokovi koji će se nakon validacije ekspresionog konstrukta koristiti za izolaciju plazmidne DNK na velikoj skali. Glicerolski stok sadržao je 800 μ l prekonoćne kulture u koju je dodato 200 μ l autoklaviranog 100% glicerola. Smeša se pažljivo promeša i cuva na temperaturi od -80°C do dalje upotrebe.

Sledećeg dana, na petri šoljama uočavaju se pojedinačne bakterijske kolonije. Na šoljama na kojima se nalaze negativne kontrole ne očekuje se da izrastu kolonije. Sa svake šolje pikiraju se po 3 kolonije koje se ubacuju u 10 ml tečnog LB medijuma sa ampicilinom (finalne koncentracije 100 μ g/ml). Pojedinačne kolonije mešaju se preko noći na 37°C u šejkeru. Sledećeg dana vrši se izolacija plazmidne DNK upotrebom *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, Venlo, Netherlands) prema uputstvu proizvođača. Koncentracija plazmidne DNK izmerena je na aparatu *Qubit[®] 3.0 Fluorimeter* (ThermoFisher Scientific, MA, USA) upotrebom *Qubit[™] dsDNA HS Assay Kit* dizajniranog specijalno za ovaj aparat.

Validacija ekspresionog konstrukta PX459_sgRNK

Da bi se proverilo da ekspresioni konstrukt sadrži željenu sgRNK, koristi se metoda duple digestije, prilikom koje se ekspresioni konstrukt izlaže restrikcijom endonukleazama *BbsI* i *AgeI* (New England BioLabs[®], Ipswich, MA, USA), prema uputstvu proizvođača. Ugradnjom sgRNK u plazmid PX459, ukida se restrikciono mesto za enzim *BbsI*, tako da ako se u okviru plazmidne DNK sekvence nalazi željena sgRNK, proizvod duple digestije biće samo jedan fragment. Ukoliko nije došlo do ugradnje sgRNK u PX459, duplom digestijom dobiće se dva fragmenta. Analiza produkata digestije vrši se horizontalnom elektroforezom na 1% agaroznom gelu sa etidijum bromidom

(finalne koncentracije 0,5 µg/ml). Elektroforeza je izvedena pri jačini struje od 110 mA i naponu od 110 V u trajanju od 1 h.

Nakon duple digestije vrši se selekcija konstrukata za sekvenciranje po Sangeru. Sekvenca prajmera koji je korišćen u reakciji sekvenciranja prikazana je u Tabeli 18. Reakciona smeša za sekvenciranje finalne zapremine 20 µl sadržala je 200 ng digeriranog konstrukta, 4 µl *Ready Reaction Mix* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA*), 3,2 pmol prajmera i ddH₂O do finalnog volumena. Temperaturni profil PCR reakcije za sekvenciranje prikazan je u Tabeli 6, a prečišćavanje produkata opisano je u poglavlju 3.2.4.

Tabela 18. Prajmer korišćen za sekvenciranje ekspresionog konstrukta PX459_sgRNK

Naziv	Sekvenca prajmera (5'→3')
U6_F	GCAATATACGATACAAGGCT

Legenda: F – ushodni prajmer

Kada se nakon sekvenciranja potvrdi da vektor sadrži sgRNK na pravom mestu, taj bakterijski klon se dalje umnožava i koristi za izolaciju plazmidne DNK na velikoj skali upotrebom *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (*QIAGEN, Venlo, Netherlands*) prema protokolu proizvođača. Nakon izolacije, koncentracija plazmidne DNK izmerena je na aparatu *Qubit® 3.0 Fluorimeter* (*ThermoFisher Scientific, MA, USA*) upotrebom *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit* dizajniranog specijalno za ovaj aparat. Ovaj esej je visoko selektivan za dvolančanu DNK i dizajniran tako da meri koncentraciju početnog uzorka od 100 pg/µl do 1000 ng/µl.

3.3.5.6. Transfekcija ćelijske linije HEK293FlpIn

Poznato je da je homologa rekombinacija skoro odsutna u G1 fazi, ali je najaktivnija u S fazi ćelijskog ciklusa [Mao i sar., 2008]. Iako serum obezbeđuje optimalne uslove za rast ćelija, eliminacija seruma iz medijuma smanjuje bazalnu aktivnost i čini populaciju proliferativnih ćelija homogenom [Pirkmajer i Chibalin, 2011]. Da bi se poboljšala HDR efikasnost, korišćeno je gladovanje serumom 24 h pre transfekcije, kako bi se indukovala sinhronizacija ćelijskog ciklusa i akumulacija ćelija u G1 fazi. Zasejano je 1 x 10⁶ ćelija po bunariću u mikrotitar ploče sa ravnim dnom i 6 bunarića (*Sarstedt, Nümbrecht, Germany*) u medijumu sa 0,5% serumom i bez antibiotika. Na dan transfekcije, ćelije su bile 60-70% konfluentne. Transfekcija je izvedena sa reagensom *Lipofectamine® 2000* (*ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA*) prema uputstvu proizvođača. Transfekcija je urađena u tehničkim triplikatima za pouzdanu kvantifikaciju, uključujući kontrolu transfekcije sa GFP obeleženim plazmidom (PX458) za praćenje efikasnosti transfekcije. Za formiranje *knockin* klonova,

u smešu za transfekciju dodaje se ekspresioni konstrukt u finalnoj koncentraciji od 4 µg zajedno sa 10 µM ssODN po bunariću. Nakon 24 h vrši se kontrola efikasnosti transfekcije. Procenat fluorescentnih ćelija u kontroli (sa GFP obeleženim plazmidom) procenjen je upotrebom fluorescentnog mikroskopa (*Olympus BX51, Tokyo, Japan*). Više od 70% ćelija bilo je transfektovano.

Nakon 24 h vrši se selekcija transfektovanih ćelija upotrebom puromicina (*Gibco, ThermoFisher Scientific, MA, USA*) u finalnoj koncentraciji 3 mg/ml po bunariću u toku 48 h. Netransfektovane ćelije korišćene su kao negativna kontrola za selekciju puromicinom. Izolacija klonalnih ćelijskih linija sa specifičnim modifikacijama postignuta je 72 h nakon selekcije puromicinom serijskim razblaženjima u finalnoj koncentraciji od 0,75 ćelija po bunariću, nakon čega je usledio period ekspanzije od 3 nedelje. Zasejano je četiri mikrotitar ploče sa 96 bunarića i ravnim dnom (*Sarstedt, Nümbrecht, Germany*). Nakon 7-10 dana plejtovi su pregledani pomoću mikroskopa (*Leica DM IL LED, Wetzlar, Germany*). Prazni i bunarići zasejani sa više od jedne kolonije su obeleženi. Na 7 dana kultivacije pojedinačnih klonova neophodno je zameniti medijum za gajenje ćelija.

3.3.5.7. Genotipizacija klonalnih ćelijskih linija

Nakon 3-5 nedelja kultivacije pojedinačnih klonova izvršena je detekcija HDR linija amplifikacijom željenog regiona, nakon čega je usledila analiza RFLP i Sangerovo sekvenciranje modifikovanog regiona. Genomska DNK pojedinačnih kolonija izolovana je direktno iz ćelijskog peleta upotrebom *QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands)* prema uputstvu proizvođača. Prinosa izolovane DNK izmeren je na aparatu *Qubit® 3.0 Fluorimeter (ThermoFisher Scientific, MA, USA)* upotrebom *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit*. Replike pojedinačnih klonova kultivisane su u standardnim uslovima sve do završene genotipizacije. Prajmeri korišćeni za detekciju HDR u pojedinačnim klonovima dizajnirani su tako da umnožavaju region izvan regiona homologije i prikazani su u Tabeli 19. Temperaturni profil reakcije prikazan je u Tabeli 5 u poglavlju 3.2.2.

Tabela 19. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju HDR regiona u pojedinačnim klonovima ćelijske linije HEK293FlpIn.

Gen	Kod sekvence	Naziv	Sekvenca prajmera (5'→3')	Dužina (bp)
SLC37A4	NG_013331.1	SLC37A4_HDR_2F	GTAGGGCCCATGAGTGTC	474
		SLC37A4_HDR_2R	GTGGAGGTGGTGGGTAAGAA	

Legenda: F – ushodni prajmer, R – nishodni prajmer

Produkti PCR reakcije analizirani su horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu prema već opisanom protokolu. Nakon vizuelizacije DNK fragmenata,

izvršena je RFLP analiza upotrebom restrikcionog enzima *DdeI* (*New England BioLabs*[®], *Ipswich, MA, USA*) prema uputstvu proizvođača. Enzim *DdeI* prepoznaje jedno mesto sečenja u *wt* klonovima i dva mesta sečenja u HDR-modifikovanim klonovima, što rezultira fragmentima digestije dužine od 342 bp i 132 bp u *wt* klonovima i 224 bp, 132 bp i 118 bp u homozigotnim *knockin* klonovima. Produkti digestije analizirani su elektroforezom na već opisan način. Svi PCR fragmenti za koje se sumnjalo da imaju željenu modifikaciju sekvencirani su prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.4.

Efikasnost HDR izračunata je prema formuli [Ran i sar., 2013]:

$$\frac{b + c}{a + b + c}$$

gde *a* predstavlja broj PCR produkata *wt* klonova (sa 2 fragmenta), *b* broj produkata homozigotnih *knockin* klonova (sa 3 fragmenta) i *c* broj produkata heterozigotnih klonova (sa 4 fragmenta).

3.3.5.8. Analiza off-targeta

Pažljiva validacija precizno editovanih ćelijskih linija je od suštinskog značaja za kontrolu neželjenih efekata i sprečavanje nenamernog editovanja genoma, što može biti uzrokovano nespecifičnim vezivanjem sgRNK i uvođenja dvolančanih prekida na neželjenim mestima u genomu [Cong i sar., 2013]. Potencijalni regioni sečenja predviđeni su pomoću *online* programa *CRISPR Design Tool* [<https://zlab.bio/guide-design-resources>] i alata BLAST [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] za lokalno poravnanje sekvenci. Prajmeri za analizu *off-targeta* dizajnirani su prema uputstvima opisanim u poglavlju 3.2.2. i prikazani u Tabeli 20.

Tabela 20. Prajmeri za analizu off-targeta HDR ćelijskih linija.

Gen	Kod sekvence	Naziv	Sekvenca prajmera (5'→3')	Region (egzon)	Dužina (bp)
DTX1	NM_004416.2	<i>DTX1_F</i>	GAGGGCCAAGCAGAGAGTAC	3'-UTR	287
		<i>DTX1_R</i>	GAGTTTCCCGAGTCCCTCTTTG		
PHF21A	NM_016621.3	<i>PHF21A_F</i>	CCTTTGGACCCTCACCTCTC	3'-UTR	242
		<i>PHF21A_R</i>	CCACCCCTCAAACAAAACC		

Legenda: F – ushodni prajmer, R – nishodni prajmer

3.3.5.9. Analiza ekspresije gena *SLC37A4* u HDR klonovima ćelijske linije HEK293FlpIn

Za analizu ekspresije gena *SLC37A4* u HDR klonovima korišćene su metode RT-PCR i RT-qPCR prethodno opisane u poglavljima 3.3.3. i 3.3.4., respektivno. Izolacija ukupne RNK iz *wt*, heterozigotnih i homozigotnih klonova ćelijske linije HEK293FlpIn

izvršena je direktno iz ćelijskog peleta uz pomoć *TRI[®] Reagent Solution* (*ThermoFisher Scientific, MA, USA*) prema protokolu opisanom u poglavlju 3.3.2. Priprema ćelijskog peleta podrazumevala je sledeće korake:

- ⇒ sakupljanje ćelija iz mikrotitar ploča sa 12 bunarića u *Falcon[®]* tube (*Sarstedt, Nümbrecht, Germany*) zapremine 15 ml,
- ⇒ centrifugiranje ćelija 5 min na 250 x g i sobnoj temperaturi,
- ⇒ odstranjivanje medijuma vakuum pumpom,
- ⇒ ispiranje ćelija sa 0,5 ml 1 x PBS,
- ⇒ ponovno centrifugiranje u istim uslovima i odstranjivanje 1 x PBS,
- ⇒ resuspendovanje ćelijskog peleta u 1 ml *TRI[®] Reagent Solution*.

Ekspresioni profili gena *SLC37A4* u *wt*, heterozigotnim i homozigotnim klonovima ćelijske linije HEK293FlpIn određeni su na aparatu *7900 HT Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Za normalizaciju sintetisane cDNK u uzorcima korišćen je GAPDH kao endogena kontrola, a kao kalibrator srednja vrednost relativne ekspresije *wt* klonova ćelijske linije HEK293FlpIn. Svi eksperimenti urađeni su u biološkom i tehničkom duplikatu. Svi kvantitativni podaci predstavljeni su kao srednja vrednost relativne ekspresije \pm SD [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_-042380.pdf].

Reakciona smeša ukupnog volumena 10 μ l sastojala se od sledećih komponenti u finalnim koncentracijama:

- ⇒ 40 ng cDNK,
- ⇒ 1 x *Fast SG/ROX qPCR Master Mix (2x)* (*EURx, Gdansk, Poland*),
- ⇒ 1 x *ROX High* referentna boja,
- ⇒ 3 pmol prajmera,
- ⇒ *PCR grade water* do finalnog volumena.

Temperaturni profil reakcije korišćene za amplifikaciju iRNK *SLC37A4* i *GAPDH* prikazan je u Tabeli 21. Nakon završene reakcije RT-qPCR, radi utvrđivanja specifičnosti reakcije puštena je kriva disocijacije. Za obradu rezultata upotrebljen je komparativni ddCt metod [Livak i Schmittgen, 2001].

Tabela 21. Temperaturni profil reakcije RT-qPCR

	Temperatura (°C)	Vreme trajanja	Broj ciklusa
1.	95	5 min	1
2.	95	15 sec	40
	60	1 min	

3.4. Metode za detekciju stresa edoplazmatičnog retikuluma i apoptoze u novom *in vitro* model sistemu za GSD tip Ib

3.4.1. Analiza ekspresije markera stresa ER-a i apoptoze u HDR klonovima ćelijske linije HEK293FlpIn_SLC37A4_c.248G>A

Analiza ekspresije markera stresa ER-a (*ATF4*, *DDIT3*, *HSPA5* i *XBP1s*) i apoptoze (*BCL2* i *BAX*) u *wt* i *knockin* klonovima ćelijske linije HEK293FlpIn_SLC37A4_c.248G>A urađena je pomoću metode RT-qPCR prethodno opisane u poglavlju 3.3.4. Celokupna RNK izolovana je direktno iz ćelijskog peleta ekstrakcijom sa *TRI[®] Reagent Solution* (*ThermoFisher Scientific, MA, USA*) prema protokolu opisanom u poglavlju 3.3.5.9. Prajmeri korišćeni za analizu markera stresa ER-a dati su u Tabeli 22, dok su prajmeri za određivanje ekspresije gena *BCL2* i *BAX* preuzeti iz publikacije Floros i sar. [Floros i sar., 2006].

Tabela 22. Parovi prajmera korišćeni za RT-qPCR analizu markera stresa ER-a i apoptoze u knockin ćelijskim klonovima.

Gen	Kod sekvence	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5'→3')
ATF4	NM_001675.4	<i>ATF4_F</i>	CAGCAAGGAGGATGCCTTCTCCGG
		<i>ATF4_R</i>	CCAACGTGGTCAGAAGGTCATCTGGC
DDIT3	NM_001195053.1	<i>DDIT3_F</i>	TCACCTCCTGGAAATGAAGAGGAA
		<i>DDIT3_R</i>	GAGGTGCTTGTGACCTCTGC
HSPA5	NM_005347.4	<i>HSPA5_F</i>	GGACCACCTACTCCTGCGTCCG
		<i>HSPA5_R</i>	GGCGGCATCGCCAATCAGACG
XBP1s	NM_001079539.1	<i>XBP1s_F</i>	GACAGCGCTTGGGGATGGATGC
		<i>XBP1s_R</i>	CTGCACCTGCTGCGGACTCAG
BCL2	NM_000633.2	<i>BCL2_F</i>	TCGCCCTGTGGATGACTGA
		<i>BCL2_R</i>	CAGAGACAGCCAGGAGAAATC
BAX	NM_004324.3	<i>BAX_F</i>	TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC
		<i>BAX_R</i>	TCACCCAACCACCCTGGTCTT

Legenda: F – ushodni prajmer, R – nishodni prajmer

3.4.2. MTT test

Da bi se izmerila proliferacija i vijabilnost *knockin* ćelijskih linija, izveden je MTT test upotrebom *TACS[™] MTT Assay Kit* (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*) prema protokolu proizvođača. Ćelije su zasejane u tehničkim triplikatima koncentracije od

2×10^4 ćelija po bunariću u 100 μ l medijuma sa 10% FBS i bez antibiotika u mikrotitar ploču sa 96 bunarića (*Sarstedt, Nümbrecht, Germany*). Svi uzorci izmereni su dva puta (biološki duplikat), uključujući 3 kontrolna bunarića koja su sadržala samo medijum za kultivaciju ćelija. MTT (3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-tetrazolijum bromid) je dodavan u ćelije i inkubiran 2 h na 37°C. Medijum je zatim uklonjen i u ćelije je dodat DMSO (*SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany*). Ćelije su potom inkubirane 30 min na 37°C, nakon čega je merena apsorbancija na talasnim dužinama od 570 nm i 630 nm (referentna talasna dužina) na aparatu *TECAN (Infinite M200 pro, Männedorf, Switzerland)*.

3.4.3. Statistička obrada podataka

Svi kvantitativni podaci predstavljeni su kao srednja vrednost relativne ekspresije \pm SD [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_042380.pdf], a za određivanje statističke značajnosti razlika u vrednosti ekspresije između grupa korišćen je jednosmerni ANOVA test (eng. *One-way ANOVA test*) i post-hoc t-test. Vrednost $P < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Nije bilo uklanjanja (eng. *omit*) ekstremnih vrednosti i nijedan podatak nije odbačen ukoliko nije postojala nedvosmislena indikacija da eksperiment nije uspeo iz tehničkih razloga.

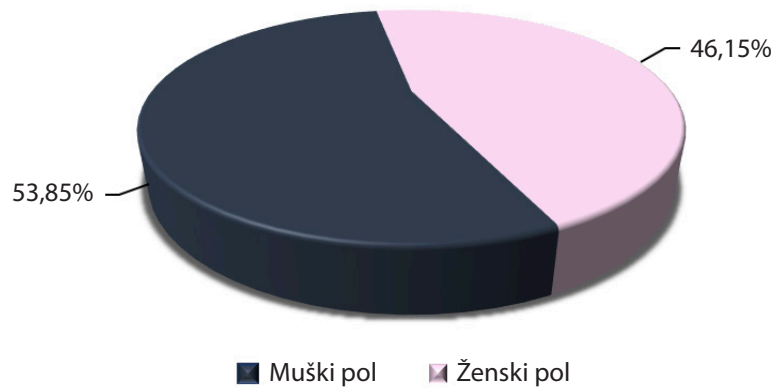
4. REZULTATI

4.1. Genomsko profilisanje pacijenata suspektih na GSD u Srbiji

4.1.1. Demografski i osnovni klinički parametri ispitanika

U studiju je bilo uključeno ukupno 41 pacijenata suspektih na GSD. Kontrolnu grupu ispitanika činilo je 75 osoba iz opše populacije iz Srbije koje su po polu i uzrastu odgovarali ispitivanoj grupi pacijenata. Tokom trajanja ove studije na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu, formirana je biobanka sa uzorcima pacijenata iz Srbije koji su oboleli od različitih tipova hepatičnih GSD.

U ispitivanoj grupi postojala je blaga prevaga pacijenata muškog pola, što je predstavljeno na Slici 27.



Slika 27. Distribucija polova u ispitivanoj grupi pacijenata obolelih od GSD

Prosečna starost u vreme postavljanja dijagnoze bila je 6 meseci za pacijente sa GSD tip Ia i 10 meseci za GSD tip Ib pacijente. Period između pojave prvih simptoma bolesti i uspostavljanja dijagnoze kretao se u rasponu od 0 do 42 meseca, sa prosekom od 5,8 meseci.

Hepatomegalija, hipoglikemija i slabo napredovanje deteta bili su najčešći pokazatelji GSD tip Ia, dok su hepatomegalija i rekurentne bakterijske infekcije glavni klinički simptomi koji su prethodili dijagnozi kod GSD tip Ib pacijenata. Kod 20% dece sa GSD tip Ib, neutropenija nije bila očigledna prilikom uspostavljanja dijagnoze. Međutim, svi ovi pacijenti razvili su neutropeniju u roku od tri godine nakon rođenja. Inflamatorna bolest creva detektovana je kod 20,6% GSD tip Ib pacijenata uzrasta od 2 do 10 godina.

4.1.2. Detekcija varijanti u genima *G6PC* i *SLC37A4*

Kod svih pacijenata analiza je započeta detekcijom tačkastih promena u genima *G6PC* i *SLC37A4* metodom sekvenciranja po Sangeru. U Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu je u periodu od 2013. do 2017. godine uspostavljena dijagnoza GSD tip I kod 36 pacijenata, od kojih je 5 pacijenata obolelo od GSD tip Ia, a 31 pacijenata iz 29 nesrodnih porodica od GSD tip Ib. Segregacionom analizom pokazano je da se detektovane varijante nalaze na oba hromozoma kod svih obolelih osoba. Svi roditelji bili su heterozigotni nosioci promena, što znači da nijedna od varijanti nije nastala *de novo*. Spektar i učestalost promena detektovanih u genima *G6PC* i *SLC37A4* prikazana je u Tabeli 23.

Samo dve različite varijante identifikovane su u genu *G6PC*: c.247C>T (p.Arg83Cys) i c.518T>C (p.Leu173Pro). Varijanta p.Arg83Cys pronađena je na 90% analiziranih hromozoma što implicira da su svi pacijenti, sem jednog, bili homozigotni nosioci ove varijante.

U genu *SLC37A4* detektovano je sedam različitih varijanti, od kojih su:

- ⇒ tri prethodno prijavljene u literaturi – c.81T>A (p.Asn27Lys), c.162C>A (p.Ser54Arg), c.1042_1043delCT (p.Leu348Valfs*53),
- ⇒ a četiri varijante prvi put detektovane u ovoj studiji – c.248G>A (p.Gly83Glu), c.404G>A (p.Gly135Asp), c.571C>T (p.Pro191Ser) i c.785G>A (p.Gly262Asp ili p.Ser263Glyfs*33).

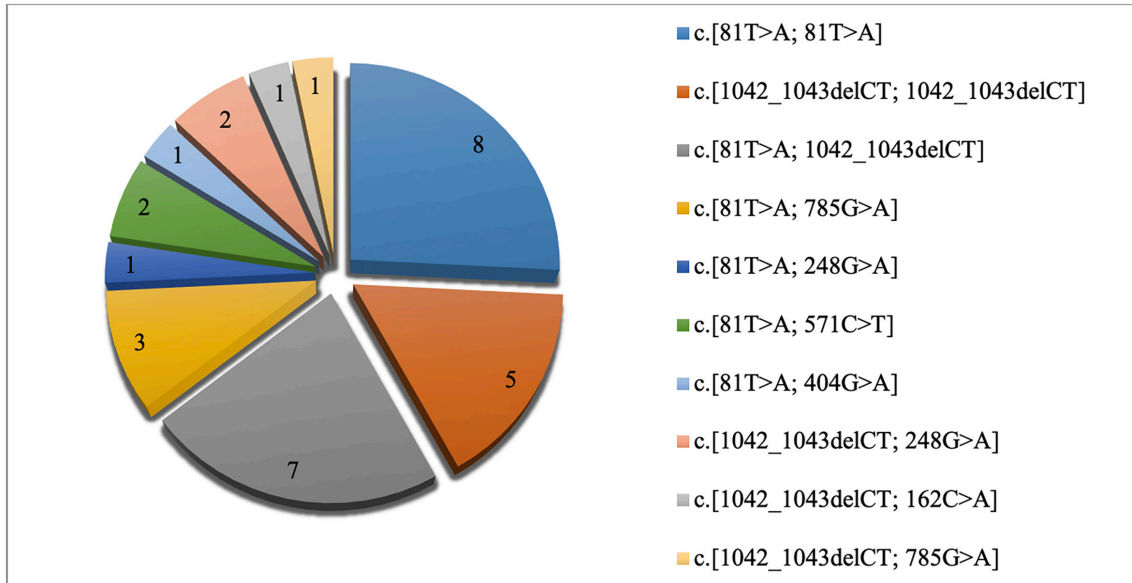
Varijante c.81T>A i c.1042_1043delCT činile su 82,26% svih analiziranih hromozoma. Varijanta c.404G>A pronađena je na samo jednom hromozomu, kao i varijante c.162C>A i c.571C>T, dok su c.248G>A i c.785G>A pronađene na 3 i 4 hromozoma, respektivno. Grafički prikaz distribucije pacijenata u odnosu na genotip prikazan je na Slici 28.

Sekvenciranjem po Sangeru uspešno je uspostavljena dijagnoza kod 87,8% pacijenata.

Tabela 23. Spektar i frekvencija varijanti u genima G6PC i SLC37A4

Gen	Egzon	Nukleotidna zamena	Aminokiselinska zamena	Tip promene	Broj hromozoma	Relativna učestalost (%)	dbSNP ID	Reference	
G6PC	2	c.247C>T	p.Arg83Cys	missense	9	90,00	rs1801175	[Lei i sar., 1995]	
	4	c.518T>C	p.Leu173Pro	missense	1	10,00	rs775826449	[Li i sar., 2007]	
Ukupno					10				
SLC37A4	1	c.81T>A	p.Asn27Lys	missense	30	48,39	rs193302889	[Santer i sar., 2000]	
	2	c.162C>A	p.Ser54Arg	missense	1	1,61	rs193302898	[Janecke i sar., 2000]	
	2	c.248G>A	p.Gly83Glu	missense	3	4,84	novootkrivena	[Skakic i sar., 2018]	
	3	c.404G>A	p.Gly135Asp	missense	1	1,61	novootkrivena	[Skakic i sar., 2018]	
	4	c.571C>T	p.Pro191Ser	missense	2	3,23	novootkrivena	-	
	5	c.785G>A	p.Gly262Asp/ p.Ser263Glyfs*33	missense/ splice site	4	6,45	novootkrivena	[Skakic i sar., 2018]	
	9	c.1042_1043delCT	p.Leu348Valfs*53	frameshift	21	33,87	rs80356491	[Marcolongo i sar., 1998]	
	Ukupno					62			

Sve detektovane varijante napisane su prema nomenklaturi i preporukama HGVS [<http://varnomen.hgvs.org/>]. Varijante označene kao novootkrivene nisu pronađene u bazama podataka HGMD Professional, ExAC, EVS i našoj *TruSight One* bazi podataka koja obuhvata 75 osoba iz opšte populacije Srbije. Nove varijante c.248G>A, c.404G>A i c.785G>A prvi put su detektovane u ovoj studiji i objavljene u radu [Skakic i sar., 2018].



Slika 28. Distribucija pacijenata iz Srbije obolelih od GSD tip Ib u odnosu na genotip. Najzastupljeniji genotip u analiziranoj kohorti pacijenata bili su homozigotni nosioci varijante c.81T>A (p.Asn27Lys). Varijante c.81T>A i c.1042_1043delCT činile su 82,26% svih analiziranih hromozoma.

4.1.2.1. Kliničke manifestacije pacijenata sa GSD tip Ib koji su nosioci novootkrivenih varijanti u genu SLC37A4

Pregled kliničkih karakteristika pacijenata obolelih od GSD tip Ib koji su nosioci novootkrivenih varijanti prikazan je u Tabeli 24. Kod svih pacijenata prvi simptomi bolesti registrovani su tokom prve godine života. Prisustvo varijante c.785G>A (p.Gly262Asp ili p.Ser263Glyfs*33) u heterozigotnom stanju udruženo je sa ranom pojavom neutropenije. Kod pacijenta koji je heterozigotni nosilac retke varijante c.162C>A (p.Ser54Arg) dijagnoza je uspostavljena u uzrastu od 4 meseci na osnovu hepatomegalije, nefromegalije, hipoglikemije i neutropenije.

Tabela 24. Pregled kliničkih karakteristika pacijenata koji su nosioci novootkrivenih varijanti u genu SLC37A4

ID pacijenta	Genotip		Kliničke manifestacije
P25	c.248G>A (p.Gly83Glu)	c.1042_1043delCT (p.Leu348Valfs*53)	Dijagnoza uspostavljena u uzrastu od 12 meseci na osnovu prisustva hepatomegalije, hiperlaktatemije i hiperlipidemije. Rast ispod donje granice normale (147 cm), a multipli hepatični adenomi opisani su u uzrastu od 27 godina. Neutropenija je prisutna od prvih meseci života sa relativno niskom frekvencijom bakterijskih infekcija. Pacijentkinja nije razvila inflamatornu bolest creva.
P9			Neutropenija prisutna od 9. meseca života kada je uspostavljena dijagnoza, a hronično od 10. godine. Lečenje neupogenom nije dalo poboljšanje nalaza u krvnoj slici, ali je smanjena učestalost infekcije kože i respiratornog trakta. Od 10. godine dečak boluje od eksudativne enteropatije.
P22	c.404G>A (p.Gly135Asp)	c.81T>A (p.Asn27Lys)	U uzrastu od 6 meseci uočen je uvećan abdomen, ali je dijagnoza postavljena sa 14 meseci na osnovu hepatomegalije udružene sa biohemijskim karakteristikama tipičnim za GSD tip I. Neutropenija se razvila tokom druge godine života.
P40			Kod sestara dijagnoza je postavljena istovremeno, mlađoj u 3. godini, a starijoj u 5. godini života, na osnovu hepatomegalije, tipičnog biohemijskog profila i neutropenije. Kod starije sestre prisutan je nizak rast.
P41	c.571C>T (p.Pro191Ser)	c.81T>A (p.Asn27Lys)	
P3		c.1042_1043delCT (p.Leu348Valfs*53)	Prisustvo novootkrivene c.785G>A udruženo je sa ranom pojavom simptoma bolesti (od 1-6 meseci), hepatomegalijom i teškim bakterijskim infekcijama. Svi pacijenti razvili su neutropeniju u prvim mesecima života.
P24	c.785G>A		Jedan pacijent muškog pola sa genotipom c.[81T>A;785G>A] razvio je težak oblik inflamatorne bolesti creva u 8. godini života.
P26	(p.Gly262Asp ili p.Ser263Glyfs*33)	c.81T>A (p.Asn27Lys)	
P5			

4.1.3. Uspostavljanje diferencijalne dijagnoze GSD

Kod pet pacijenata suspektih na GSD nisu bile detektovane promene u genima *G6PC* i *SLC37A4*, stoga je u okviru ove studije prvi put izvršeno uspostavljanje diferencijalne dijagnoze GSD primenom NGS tehnologije.

S obzirom da su GSD bolesti koje se nasleđuju recesivno, za analizu podataka korišćen je recesivni model nasleđivanja koji podrazumeva homozigotne varijante i heterozigotne varijante u istom genu (eng. *compound heterozygous*). Broj detektovanih varijanti kod analiziranih pacijenata bio je 9014 ± 127 . Analizom 75 kontrolnih ispitanika iz opšte populacije isključene su populaciono specifične varijante koje nisu uzročnici bolesti.

Ovom metodom kod 3 pacijenta identifikovane su poznate patogene varijante u genima *AGL*, *PIGL* i *PHKA2* koje su odgovorne za razvoj hepatičnih oblika bolesti, GSD tip III, GSD tip VI i GSD tip IXa. Kod preostala dva pacijenta detektovane su varijante u genima koji nisu povezani sa GSD, *LIPA* i *SBDS* i odgovorni su za razvoj bolesti skladištenja holesterol estara (eng. *Cholesteryl ester storage disease*) i egzokrine insuficijencije pankreasa poznate kao *Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome*, respektivno. Segregacionom analizom potvrđeno je da se sve detektovane varijante nalaze na oba hromozoma kod svih obolelih osoba. Svi roditelji bili su heterozigotni nosioci varijanti, što znači da nijedna od varijanti nije nastala *de novo*. U Tabeli 25 prikazane su karakteristike varijanti detektovanih metodom NGS.

Kombinovanim pristupom koji podrazumeva upotrebu sekvenciranja po Sangeru i tehnologije NGS, uspostavljena je 100% uspešnost detekcije patogenih varijanti kod pacijenata obolelih od različitih tipova hepatičnih GSD.

Tabela 25. Prikaz opštih karakteristika varijanti detektovanih metodom NGS

Naziv bolesti	Gen	Način nasleđivanja ^a	Egzon	Nukleotidna zamena	Aminokiselinska zamena	Tip promene	dbSNP ID	Reference
GSD tip III	AGL	AR	4	c.655A>G	p.Asn219Asp	missense	rs1332399736	[Sentner i sar., 2013]
			29	c.3980G>A	p.Trp1327Ter	nonsense	rs267606640	[Lucchiari i sar., 2002]
GSD tip VI	PYGL	AR	16	c.[1964_1969inv6; 1969+1_+4delGTAC]	p.[Glu655Gly; Glu655Glyfs*64]	inversion, frameshift	rs370033969, rs760051052	[Beauchamp i sar., 2007]
				c.[1964_1969inv6; 1969+1_+4delGTAC]	p.[Glu655Gly; Glu655Glyfs*64]			
GSD tip IXa	PHKA2	XLR	9	c.884G>A	p.Arg295His	missense	rs797045008	[Hendrickx i sar., 1999]
LIPA^b	LIPA	AR	8	c.894G>A	p.Ser275_Gln298del	splice site	rs116928232	[Klima i sar., 1993]
				c.894G>A	p.Ser275_Gln298del			
SBDS^c	SBDS	AR	2	c.184A>T	p.Lys62Ter	missense	rs120074160	[Austin i sar., 2005]
				c.258+2T>C	-	splice site	rs113993993	[Nelson i Myers, 1993]

^a AR – autozomno recesivno nasleđivanje, XLR – X-vezano recesivno nasleđivanje (eng. *X-linked recessive inheritance*)

^b Bolest skladištenja holesterol estara (eng. *Cholesteryl ester storage disease*)

^c Egzokrina insuficijencija pankreasa ili SBDS sindrom (eng. *Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome*)

4.2. Karakterizacija novootkrivenih varijanti u genu *SLC37A4*

Preliminarna analiza novootkrivenih varijanti izvršena je primenom *in silico* softvera, a zatim su najčešće varijante, c.785G>A i c.248G>A, okarakterisane funkcionalno.

4.2.1. Bioinformatička analiza novootkrivenih varijanti u genu *SLC37A4*

Prilikom sekvenciranja gena *SLC37A4* detektovane su 4 nove varijante koje prethodno nisu bile prijavljene u bazama podataka HGMD *Professional*, ExAC, EVS, Ensembl, dbSNP, kao ni u dostupnoj literaturi, pri čemu je usledila *in silico* predikcija njihovog potencijalnog patogenog efekta upotrebom različitih bioinformatičkih alata. Rezultati *in silico* analize novootkrivenih varijanti u genu *SLC37A4* predstavljeni su u Tabelama 26 i 27, Slikama 29 i 30, a detaljan opis kriterijuma koji su dodeljeni varijantama opisani su u daljem tekstu.

Program PROVEAN (eng. *Protein Variation Effect Analyzer*) vrši predikciju efekta nesinonimnih varijanti i malih insercija i delecija na biološku funkciju proteina. Za razlikovanje patogenih i benignih varijanti postavljen je prag vrednosti na -2,5. Svaki rezultat predikcije jednak pragu ili ispod definisanog praga karakteriše varijantu kao patogenu [Choi i Chan, 2015]. Upotrebom ovog softvera, detektovan je opseg vrednosti od -3,94 do -7,64 za novootkrivene nesinonimne varijante u genu *SLC37A4*.

Softver SIFT (eng. *Sorts Intolerant From Tolerant*) je algoritam koji predviđa potencijalni efekat aminokiselinskih zamena na funkciju proteina korišćenjem informacija iz baze UniProtKB [<https://www.uniprot.org/>]. Opseg vrednosti rezultata kreće se od 0 do 1, gde 0 predstavlja varijantu sa štetnim dejstvom [Sim i sar., 2012]. Upotrebom ovog softvera, detektovan je opseg vrednosti od 0,000 do 0,003 za novootkrivene nesinonimne varijante u genu *SLC37A4*.

Alat PolyPhen-2 (eng. *Polymorphism Phenotyping version 2*) predviđa mogući uticaj supstitucije aminokiselina na strukturu i funkciju humanog proteina koristeći informacije iz baze podataka UniProtKB [<https://www.uniprot.org/>]. Klasifikacija efekta varijanti određena je prema kriterijumima: benigne, potencijalno patogene, verovatno patogene i patogene varijante. Opseg vrednosti kreće se u rasponu od 0 do 1, gde 1 označava patogenu varijantu [Adzhubei i sar., 2010]. Korišćenjem ovog alata detektovan je opseg vrednosti od 0,946 do 1,000 za novootkrivene nesinonimne varijante u genu *SLC37A4*.

U okviru programa VarSome, prikazani su skorovi patogenosti DANN (eng. *Deleterious Annotation of genetic variants using Neural Networks*) i FATHMM-MLK

(eng. *Functional Analysis through Hidden Markov Models*), kao i ACMG (eng. *American College of Medical Genetics and Genomics*) klasifikacija. DANN predstavlja softver za označavanje patogenosti varijanti i koristi opseg vrednosti od 0 do 1, gde vrednost 1 označava varijantu sa ostećujućim dejstvom [Quang i sar., 2015]. Softver FATHMM-MLK predviđa efekte nesinonimnih varijanti integriranjem informacija iz baze podataka ENCODE [<https://www.encodeproject.org/>]. Opseg vrednosti je takođe od 0 do 1, gde 1 označava patogenu varijantu [Shihab i sar., 2015]. Analizom genetičkih varijanti u ovoj studiji, detektovan je opseg vrednosti između 0,860 – 0,980 za sve novootkrivene nesinonimne varijante u genu *SLC37A4*. Takođe, u okviru ove studije, sve novootkrivene varijante su prema ACMG kriterijumima definisane kao PM2, PP2, PP3. Kriterijum PM2 dodeljuje se varijantama koje izostaju ili imaju ekstremno nisku frekvenciju u velikim kohortama kontrolnih ispitanika u bazama podataka ExAC, *1000 Genomes* i *Exome Sequencing Project*. Kriterijum PP2 podrazumeva da u ispitivanom genu nesinonimne varijante najčešće dovode do razvoja bolesti i da postoji mali broj prijavljenih benignih nesinonimnih varijanti, pa se predviđa da je analizirana varijanta patogena. Kriterijum PP3 dodeljuje se varijanti kada mnogobrojne *in silico* predikcije potvrde patogeni efekat ispitivane varijante na protein i pokažu da ispitivana varijanta utiče na evolutivnu konzerviranost i/ili mesto iskrajanja introna [Richards i sar., 2015].

Softver MutPred2 (eng. *Mutation Predictor version 2*) predstavlja alat koji predviđa potencijalno štetni efekat aminokiselinskih supstitucija i generiše molekularne mehanizme koji mogu biti uzročnici bolesti koristeći različite baze podataka: HGMD, SwissVar, dbSNP [Pejaver i sar., 2017]. Rezultati MutPred2 analize nesinonimnih varijanti u genu *SLC37A4* prikazani su u Tabeli 27. Za svaku varijantu softver je naveo nekoliko mogućih hipoteza koje narušavaju funkciju proteina G6PT i prikazao P vrednosti za opisani događaj (događaj je verovatniji ukoliko je vrednost P niža). Skor vrednosti za MutPred2 predstavlja verovatnoću da je reč o štetnoj promeni i predstavljen je u opsegu od 0 do 1, pri čemu vrednosti bliže nuli označavaju najverovatnije benigne, dok vrednosti bliže jedinici označavaju varijante koje najverovatnije narušavaju funkciju proteina [Pejaver i sar., 2017].

Svi upotrebljeni algoritmi za predviđanje potencijalnog efekta nesinonimnih zamena, PROVEAN, SIFT, PolyPhen-2, Varsome i MutPred2, ocenili su varijante p.Gly83Glu, p.Gly135Asp, p.Pro191Ser i p.Gly262Asp kao potencijalno patogene varijante koje narušavaju funkciju proteina G6PT i dovode do razvoja GSD tip Ib.

Tabela 26. *In silico* analiza novootkrivenih nesinonimnih varijanti u genu SLC37A4

Gen	Varijanta	PROVEAN		SIFT		PolyPhen-2		VarSome			
		skor	predikcija (<i>cutoff</i> = -2,5)	skor	predikcija (<i>cutoff</i> = 0,05)	skor	predikcija (od 0 - 1)	DANN ^a skor	FATHMM-MLK ^b skor	predikcija (od 0 - 1)	ACMG ^c predikcija
SLC37A4	c.248G>A (p.Gly83Glu)	-7,64	patogena	0,000	patogena	1,000	patogena	0,860	0,949	patogena	PM2, PP2, PP3
	c.404G>A (p.Gly135Asp)	-6,92	patogena	0,000	patogena	0,993	verovatno patogena	0,904	0,956	patogena	PM2, PP2, PP3
	c.571C>T (p.Pro191Ser)	-7,50	patogena	0,003	patogena	0,946	verovatno patogena	0,883	0,980	patogena	PM2, PP2, PP3
	c.785G>A (p.Gly262Asp)	-3,94	patogena	0,002	patogena	0,996	verovatno patogena	0,917	0,980	patogena	PM2, PP2, PP3

^a DANN – Deleterious annotation of genetic variants using neural networks [Quang i sar., 2015]

^b FATHMM-MLK – Functional Analysis through Hidden Markov Models [Shihab i sar., 2015]

^c ACMG – American College of Medical Genetics and Genomics [Richards i sar., 2015]-

Tabela 27. MutPred2 analiza novootkrivenih nesinonimnih varijanti u genu *SLC37A4*

Gen	Varijanta	MutPred2		
		skor	molekularni mehanizam	P vrednost (p ≤ 0,05)
<i>SLC37A4</i>	c.248G>A (p.Gly83Glu)	0,898	Izmenjena funkcija transmembranskog proteina	0,0e+00
			Izmenjena protein-protein interakcija	0,04
	c.404G>A (p.Gly135Asp)	0,911	Izmenjena funkcija transmembranskog proteina	1,7e-04
			Izmenjena protein-protein interakcija	0,03
			Gubitak posttranslacione modifikacije na Q133	0,02
	c.571C>T (p.Pro191Ser)	0,518	Izmenjena funkcija transmembranskog proteina	0,02
			Gubitak petlje	0,04
	c.785G>A (p.Gly262Asp)	0,623	Izmenjena funkcija transmembranskog proteina	1,5e-05
Formiranje heliksa			5,2e-03	
Gubitak lanca			0,01	

S obzirom da se varijanta c.785G>A nalazi na mestu prvog nukleotida egzona 5 u genu *SLC37A4*, ispitan je potencijalni uticaj ove varijante na mesto iskrajanja introna upotrebom softvera HSF [<http://www.umd.be/HSE3/>] i BDGP [http://www.fruit-fly.org/seq_tools/splice.html]. Korišćenjem HSF softvera (eng. *Human Splicing Finder*), pokazano je da varijanta c.785G>A u genu *SLC37A4* najverovatnije kreira novi prigušivač mesta splajsovanja egzona (ESS, eng. *Exonic Splicing Silencer*) koji promovira preskakanje egzona 5 (eng. *exon skipping*) prilikom obrade primarnog transkripta (Slika 29). Predikcijom BDGP (eng. *Berkeley Drosophila Genome Project*) softvera, pokazano je da varijanta c.785G>A u genu *SLC37A4* najverovatnije ukida akceptorsko mesto egzona 5 i time dovodi do alternativnog splajsovanja (Slika 30).

Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
New ESS Site	1 - ESR Sequences from Goren et al.		Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.
	2 - Sironi et al. - Motif 1		

Slika 29. In silico analiza splice site varijante c.785G>A detektovane u genu *SLC37A4* upotrebom programa *Human Splicing Finder* [<http://www.umd.be/HSE3/>].

Score	Intron	Exon	Score	Intron	Exon
0.98	ccagccttttccacctcc	aggctccttgaaggaggagagc	0.98	ccagccttttccacctcc	aggctccttgaaggaggagagc
0.82	ggccagttcttccttatcc	ggagaaaggacagtcagccct	0.82	ggccagttcttccttatcc	ggagaaaggacagtcagccct
0.96	gggaacctgtacctctcc	aggtttaagccattgtgggaca	0.96	gggaacctgtacctctcc	aggtttaagccattgtgggaca
0.78	caccacaactccctactgc	aggttagctcctacatgagtgcc	0.60	caccacaactccctactgc	agatagctcctacatgagtgcc
0.93	tatttcttagcttagctgt	aggttgctccacagcccagga	0.93	tatttcttagcttagctgt	aggttgctccacagcccagga

Slika 30. In silico analiza splice site varijante c.785G>A detektovane u genu *SLC37A4* upotrebom programa BDGP [http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html]. Sa leve strane prikazana je wt sekvenca, a sa desne sekvenca gena *SLC37A4* sa varijantom c.785G>A. Crvenim pravougaonikom obeleženo je akceptorsko mesto egzona 5 u genu *SLC37A4*.

Pod pretpostavkom da varijanta c.785G>A dovodi do preskakanja egzona 5, upotrebljen je program *ExPASy Translate Tool* [<https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna2aa.cgi>] za *in silico* translaciju neizmenjene i izmenjene sekvence *SLC37A4* iRNK (NM_001164277.1). Ovom analizom pokazano je da se translirane sekvence iRNK neizmenjenog i izmenjenog gena *SLC37A4* razlikuju za 134 ak. Preskakanje egzona 5 dovodi do formiranja kraće *SLC37A4* iRNK i do uvođenja prevremenog stop kodona udaljenog 33 ak od mesta promene, čime se sintetiše protein G6PT dužine 295 ak (p.Ser263Glyfs*33). Na Slici 31 prikazan je rezultat *in silico* translacije neizmenjene i izmenjene *SLC37A4* iRNK.

- A** Met AAQGYGYYRTVIFSA Met FGGYSLYYFNRKTF SFV Met PSLVEEIPLDK
 DD LGFITSSQSAAYAISK FVSGVLS DQ Met SARWLFSSGLLLVGLVNIFFA
 WSSTVPVFAALWFLNGLAQQLGWPPCGKVL RKFEP SQFGTWWAILS
 TS Met NLAGGLGPILATILAQSYSWRSTLALSGALCVVVSFLCLLLIHNEP
 ADVGLRNLDP Met PSEGKKGSLKEESTLQELLSPYLWVLSTGYLVVFGV
 KTCCTDWGQFFLIQEKGQSALV G SSY Met SALEVGGLVGSI AAGYLS DR
 A Met AKAGLSNYGNPRHGLLLF Met Met AG Met TVS Met YLFRVTVTSDSPKL
 WILVLGAVFGFSSYGPIALFGVIANESAPPNLCGTSHAIVGL Met ANVGGF
 LAGLPFSTIAKHYSWSTAFWVAEVICA ASTAAFFLLRNIRTK MetGRVSKK
 AE Stop
- B** Met AAQGYGYYRTVIFSA Met FGGYSLYYFNRKTF SFV Met PSLVEEIPLDK
 DD LGFITSSQSAAYAISK FVSGVLS DQ Met SARWLFSSGLLLVGLVNIFFA
 WSSTVPVFAALWFLNGLAQQLGWPPCGKVL RKFEP SQFGTWWAILS
 TS Met NLAGGLGPILATILAQSYSWRSTLALSGALCVVVSFLCLLLIHNEP
 ADVGLRNLDP Met PSEGKKGSLKEESTLQELLSPYLWVLSTGYLVVFGV
 KTCCTDWGQFFLIQEKGQSALV GGT VQLREPS PWPVAVHDGWHDSVH
 VPLPGNSDQ Stop LPQALDPGIGSCIWFLLVWPHCPVWVSHS QRECPSQLV
 WHLPRHCGTHGQCGRLSGWAALQHHCQALQLEHSL LGG Stop SDLCGG
 HGCLLPPTKHPHQDGPSVQEG Stop V

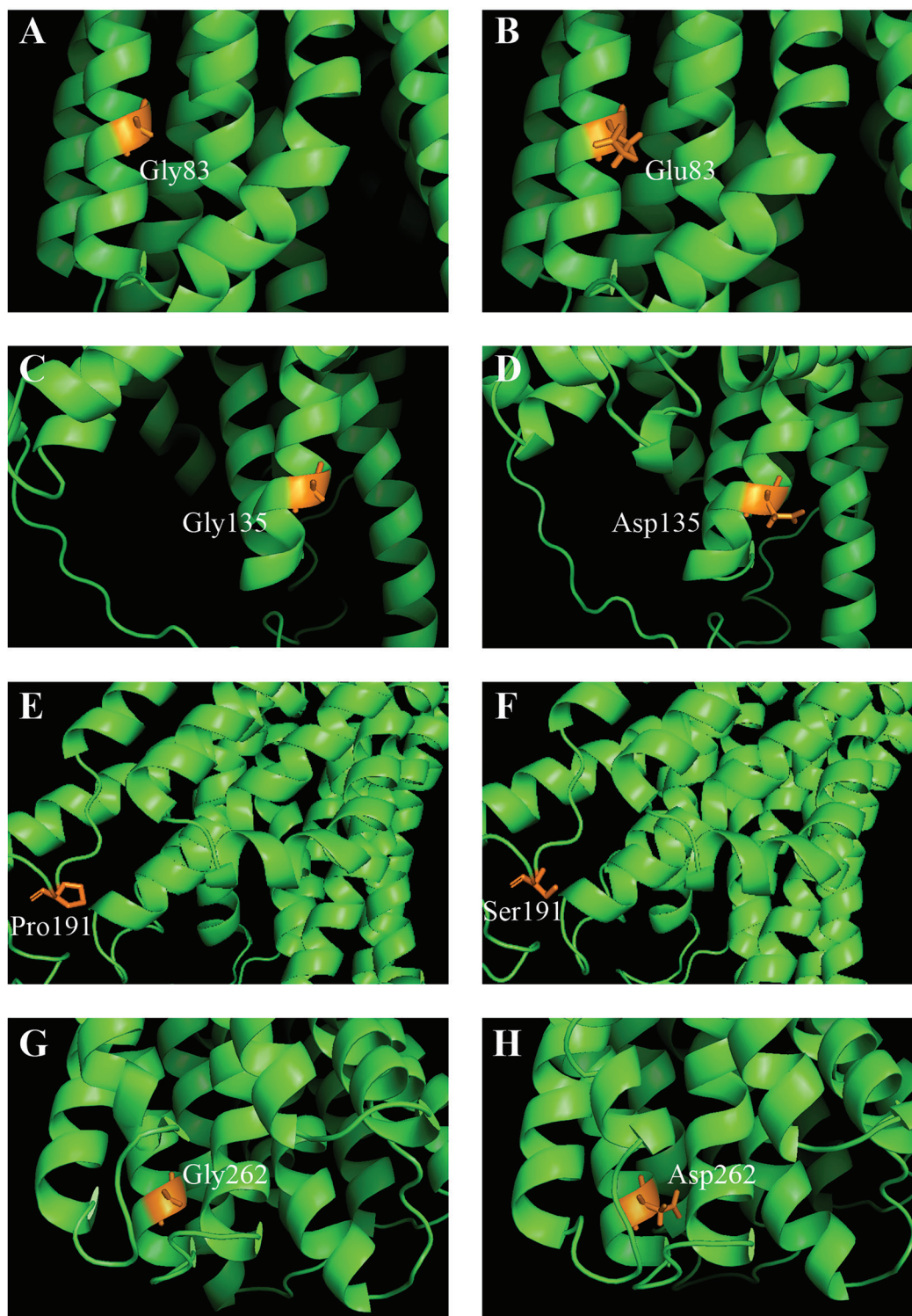
Slika 31. Rezultati in silico translacije wt i izmenjene *SLC37A4* iRNK. A) Prikaz translirane sekvence kodirajućeg regiona neizmenjenog gena *SLC37A4*. Crvenim je označena Gly aminokiselina na poziciji 262. (B) Prikaz translirane sekvence kodirajućeg regiona proteina G6PT sa varijantom p.Ser263Glyfs*33.

Za određivanje evolutivne konzerviranosti aminokiselina na pozicijama 83, 135, 191 i 262 upotrebljen je program Clustal Omega [<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>] koji omogućava poravnanje 3 ili više sekvenci različitih organizama. Simbolom zvezdice (*) označavaju se pozicije na kojima se nalaze evolutivno očuvane aminokiseline, sa (:) polu-konzervirani regioni, a sa (.) nekonzervirani regioni. U ovoj analizi korišćene su sekvence proteina G6PT iz sledećih organizama: *Danio rerio* (NP_999903.1), *Gallus gallus* (XP_001233002.1), *Mus musculus* (NP_001280559.1), *Pan troglodytes* (XP_009422347.1), *Homo sapiens* (NP_001157752.1). Pokazano je da su aminokiseline glicini na pozicijama 83, 135, 262 i prolin na poziciji 191 u proteinu G6PT, visoko konzervirane među ispitivanim organizmima (Slika 32).

NP_999903.1	AISKFI SGVLS DQMSARWLF SIGLFTVGGINVF SQSSSVAVF SGLWFLNGLGQGLGWPP	120
XP_001233002.1	AISKFVSGVLSDRLSARWLF AAGLLLVGVVNVLF SWSGSVG AFAALWFLNGLAQGLGWPP	120
NP_001280559.1	AISKFVSGVLS DQMSARWLFSSG LLLVGLVNVVFSW SSTVSAFAALWFLNGLAQGLGWPP	120
XP_009422347.1	AISKFVSGVLS DQMSARWLFSSG LLLVGLVNIFFSW SSTVPVFAALWFLNGLAQGLGWPP	120
NP_001157752.1	AISKFVSGVLS DQMSARWLFSSG LLLVGLVNIFFAW SSTVPVFAALWFLNGLAQGLGWPP	120
	****:*****:*****: ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
NP_999903.1	CAKVL RKWFEP SQFGT W W A V L S C S M N L A G C L G P I I A T L M A Q S Y S W R S T L S I S G L T C V V T S	180
XP_001233002.1	CGKVL RKWFEP SQFGT W W A I L S T S M N L A G G L G P I V A A L V S L N Y D W R M T L S F S G F I C V I V S	180
NP_001280559.1	CGKIL RKWFEP SQFGT W W A V L S T S M N L A G S L G P I L A T I L A Q S Y S W R S T L A L S G A L C V V V S	180
XP_009422347.1	CGKVL RKWFEP SQFGT W W A I L S T S M N L A G G L G P I L A T I L A Q S Y S W R S T L A L S G A L C V V V S	180
NP_001157752.1	CGKVL RKWFEP SQFGT W W A I L S T S M N L A G G L G P I L A T I L A Q S Y S W R S T L A L S G A L C V V V S	180
	* : *	
NP_999903.1	IFCLIIIRNEP SEVGLPNIEAGAKKKGKGSKN ESTFKEFIFSPYLWMLSLGYLVVFGVK	240
XP_001233002.1	FVCLVLIKNEPADVGLPNIDQGT KKGKKGSPSDNSTLA ELLLSPLYLWVLSGTGLVVFVK	240
NP_001280559.1	FFCLLLIHNEPADVGLRNLD PAPS KKGKGSKEESTLQD LLLSPYLWVLSGTGLVVFVK	240
XP_009422347.1	FLCLLLIHNEPADVGLRNLD PMP SKKGKGSKEESTLQ ELLLSPLYLWVLSGTGLVVFVK	240
NP_001157752.1	FLCLLLIHNEPADVGLRNLD PMPSEKKGKGSKEESTLQ ELLLSPLYLWVLSGTGLVVFVK	240
	: * : *	
NP_999903.1	TAYTDWQFLFIQDKGQSALMGSSFM S A L E I G G L L G S L A A G F L S D R A V A K H G L R L Y G N P R	300
XP_001233002.1	TCCTDWQFLFIQERQSMLVGS S Y M S A L E I G G L V G S I A A G Y L S D R A V A K V G L S N Y G N P R	300
NP_001280559.1	TCCTDWQFFLIQERQSALVGS S Y S I S A L E V G G L V G S I A A G Y L S D R A M A K A G L S Y G N P R	300
XP_009422347.1	TCCTDWQFFLIQEKGQSALVGS S Y M S A L E V G G L V G S I A A G Y L S D R A M A K A G L S N Y G N P R	300
NP_001157752.1	TCCTDWQFFLIQEKGQSALVGS S Y M S A L E V G G L V G S I A A G Y L S D R A M A K A G L S N Y G N P R	300
	* : *	

Slika 32. Analiza evolutivne očuvanosti aminokiselina na pozicijama 83, 135, 191 i 262 u humanom proteinu G6PT upotrebom programa Clustal Omega. Redom su poravnate sekvence proteina G6PT iz sledećih organizama: *Danio rerio* (zebra ribica), *Gallus gallus* (pile), *Mus musculus* (miš), *Pan troglodytes* (šimpanza), *Homo sapiens* (čovek). Simbolom zvezdice (*) označene su pozicije na kojima se nalaze evolutivno očuvane aminokiseline, a sivim su uokvirene aminokiseline na željenim pozicijama.

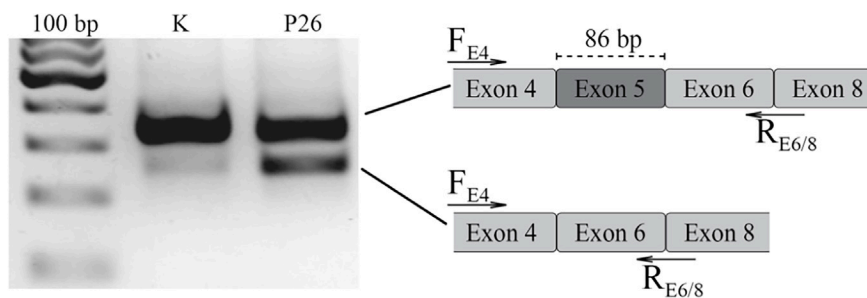
Upotrebom programa i *I-TASSER* [Roy i sar., 2010] konstruisani su 3D modeli proteina G6PT sa novootkrivenim varijantama. Za analizu fajlova .pdb wt i izmenjenog proteina G6PT korišćen je program *PyMOL* [Delano, 2002]. *In silico* 3D modelovanje ukazalo je na to da izmene ak na pozicijama 83, 135, 191 i 262 utiču na sekundarnu strukturu i ukupnu stabilnost proteina G6PT (Slika 33).



Slika 33. Trodimenzionalni molekularni modeli proteina G6PT sa krupnim planom regiona koji sadrže novootkrivene varijante. Proteinske regije predstavljene su zelenom bojom, dok su pojedinačne aminokiseline obojene narandžastom bojom. Prikaz wt delova proteina G6PT dat je na slikama A, C, E, G, dok su regioni proteina sa novootkrivenim varijantama prikazani na slikama B, D, F, H. In silico 3D modelovanje pomoću servera I-TASSER predvidelo je da nesinonimne varijante, u određenoj meri, utiču na sekundarnu strukturu proteina G6PT. Slike su pripremljene upotrebom programa PyMOL V 2.2.3[<https://pymol.org/2/>].

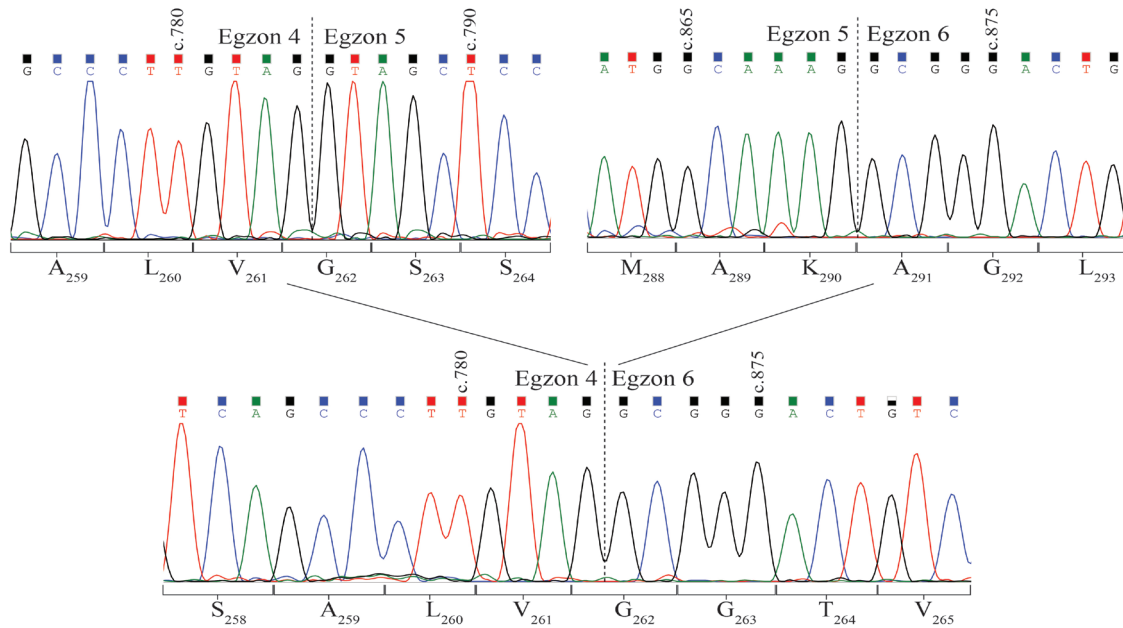
4.2.2. Ispitivanje uticaja varijante c.785G>A u genu *SLC37A4* na alternativno splajsovanje

Budući da je *in silico* predikcija ukazala da varijanta c.785G>A može da utiče na mesto iskrajanja introna gena *SLC37A4*, ispitan je efekat ove varijante pomoću metode RT-PCR. Ukoliko ova varijanta promoviše preskakanje egzona 5, doći će do formiranja transkripta kraćeg za 86 nt (NM_001164277.1: r.785_870del86). Elektroforetskom analizom RT-PCR produkata pacijenta P26 koji je heterozigotni nosilac ove varijante i kontrolnog uzorka, uviđa se postojanje dve trake na gelu, pri čemu kraći produkt odgovara transkriptu u kome izostaje egzon 5, što je prikazano na Slici 34.



Slika 34. Analiza uticaja varijante c.785G>A u genu *SLC37A4* na mesto iskrajanja introna. Poređenje RT-PCR profila kontrolnog uzorka (bunarić 2) sa profilom pacijenta P26 (bunarić 3) koji je heterozigotni nosilac varijate c.785G>A, jasno ukazuje na postojanje kraćeg transkripta koji odgovara preskakanju petog egzona. Prajmeri korišćeni za RT-PCR lokalizovani su u egzonu 4 (ušodni prajmer – F_{E4}) i na granici između egzona 6 i 8 (nishodni prajmer – $R_{E6/8}$) i umnožavaju fragment dužine 334 bp. Iskrajanjem egzona 5 iz transkripta, umnožava se fragment dužine 248 bp.

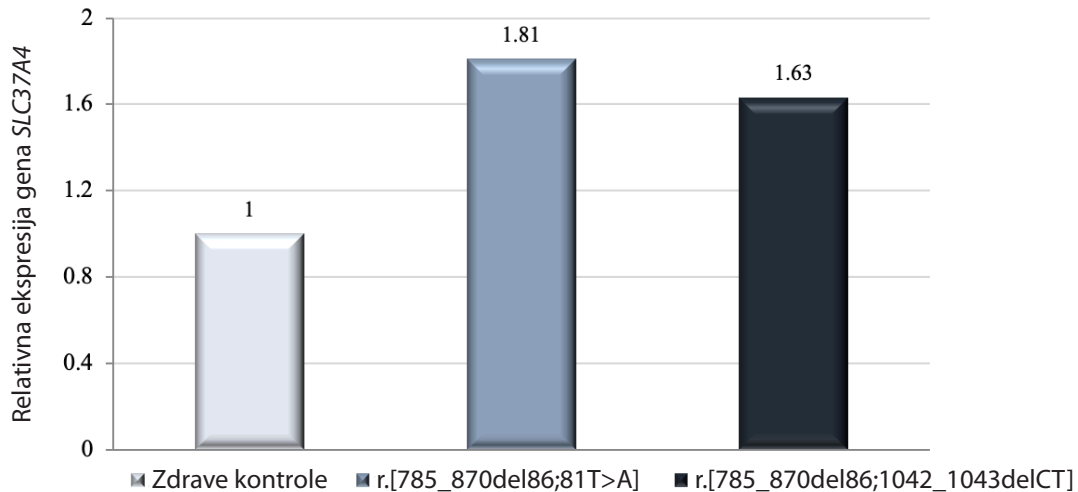
Da bi se definitivno potvrdilo da varijanta c.785G>A dovodi do isecanja egzona 5 prilikom obrade primarnog transkripta gena *SLC37A4*, pristupilo se ekstrakciji pojedinačnih traka sa gela koje su potom sekvencirane po Sangeru. Ovom analizom potvrđeno je da je kod pacijenta (P26), koji je heterozigotni nosilac ove varijante, došlo do iskrajanja egzona 5 i formiranja transkripta r.785_870del86 *SLC37A4* koji dovodi do sinteze proteina kraćeg za 134 aa (NP_0011557752.1: p.Ser263Glyfs*33). Prikaz delova sekvenci pojedinačnih transkripata *SLC37A4* kontrolnog ispitanika i pacijenta P26 dat je na Slici 35.



Slika 35. Analiza pojedinačnih transkripata pacijenta P26 i kontrolnog ispitanika izolacijom sa gela i sekvenciranjem po Sangeru. Na gornjim elektroferogramima prikazani su delovi sekvence wt transkripta kontrolnog ispitanika koji odgovaraju granicama egzona 4, 5, 6. Na donjem elektroferogramu prikazan je deo sekvence kraćeg transkripta pacijenta P26 koji je heterozigotni nosilac varijante c.785G>A. Jasno se može uočiti da varijanta c.785G>A dovodi do preskakanja egzona 5 prilikom obrade primarnog transkripta gena *SLC37A4*.

4.2.3. Ispitivanje uticaja varijante c.785G>A na nivo ekspresije gena *SLC37A4*

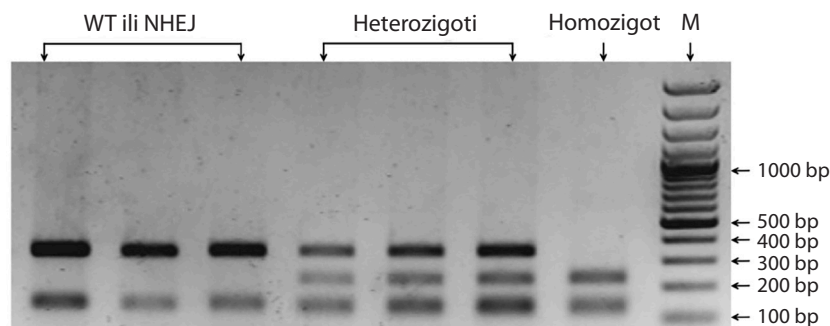
S obzirom da se na gelu uočava prisustvo transkripta r.785_870del86 *SLC37A4* i kod kontrolnog ispitanika (Slika 34), a u literaturi je on opisan kao varijanta alternativnog splajsovanja u hematopoetskim progenitorskim ćelijama zdravih ljudi [Ihara i sar., 2000], radi utvrđivanja razlike u relativnoj ekspresiji gena *SLC37A4* kod pacijenata koji su heterozigotni nosioci varijante c.785G>A i kontrolnih ispitanika usledila je analiza relativne ekspresije gena *SLC37A4* metodom RT-qPCR. Rezultati analize ukazali su da je relativna ekspresija transkripta r.785_870del86 *SLC37A4* za 60-80% veća kod pacijenata koji su heterozigotni nosioci varijante c.785G>A u poređenju sa kontrolnim ispitanicima (Slika 36). Time je potvrđeno da je c.785G>A patogena varijanta koja remeti iskrajanje gena *SLC37A4*.



Slika 36. Analiza relativne ekspresije gena SLC37A4 kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib i zdravih ispitanika. RT-qPCR studija pokazuje relativnu ekspresiju gena SLC37A4 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata P26 i P3 u poređenju sa četiri zdrave kontrole koje su prema polu i godinama odgovarale pacijentima. Kao kalibrator upotrebljena je medijana dCt vrednosti kontrolnih ispitanika. Za specifično detektovanje transkripta r.785_870del86 SLC37A4, korišćen je ushodni prajmer lociran na granici egzona 4 i 6. U cilju normalizacije dobijenih rezultata, gen GAPDH je upotrebljen kao endogena kontrola.

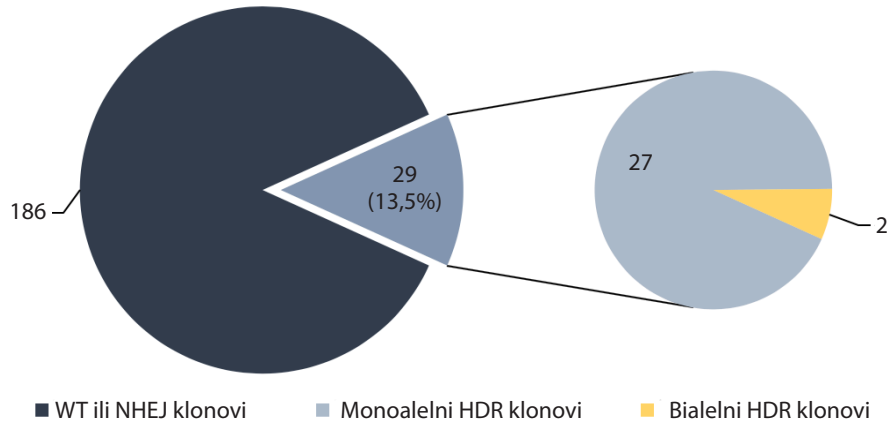
4.2.4. Karakterizacija c.248G>A varijante u novom *in vitro* modelu sistema za GSD tip Ib

Za potrebe funkcionalne karakterizacije novootkrivene c.248G>A varijante formiran je novi *in vitro* model sistem za GSD tip Ib. Za formiranje ovog novog *in vitro* model sistema korišćena je metoda CRISPR/Cas9 za precizno editovanje genoma ćelijske linije HEK293FlpIn. Upotrebom specifično dizajnirane sgRNK i ssODN, izvršena je kotransfekcija bubrežne ćelijske linije u cilju uvođenja varijante c.248G>A u gen SLC37A4. Nakon ekspanzije pojedinačnih ćelijskih klonova izvršena je RFLP analiza za brzu detekciju HDR klonova. Rezultati ove analize potvrdili su uspešnost primenjenog optimizovanog pristupa *knockin* za formiranje ćelijskih linija sa željenom varijantom (Slika 37).



Slika 37. RFLP analiza reprezentativnih wt, monoalelnih i bialelnih klonova ćelijske linije HEK293FlpIn.

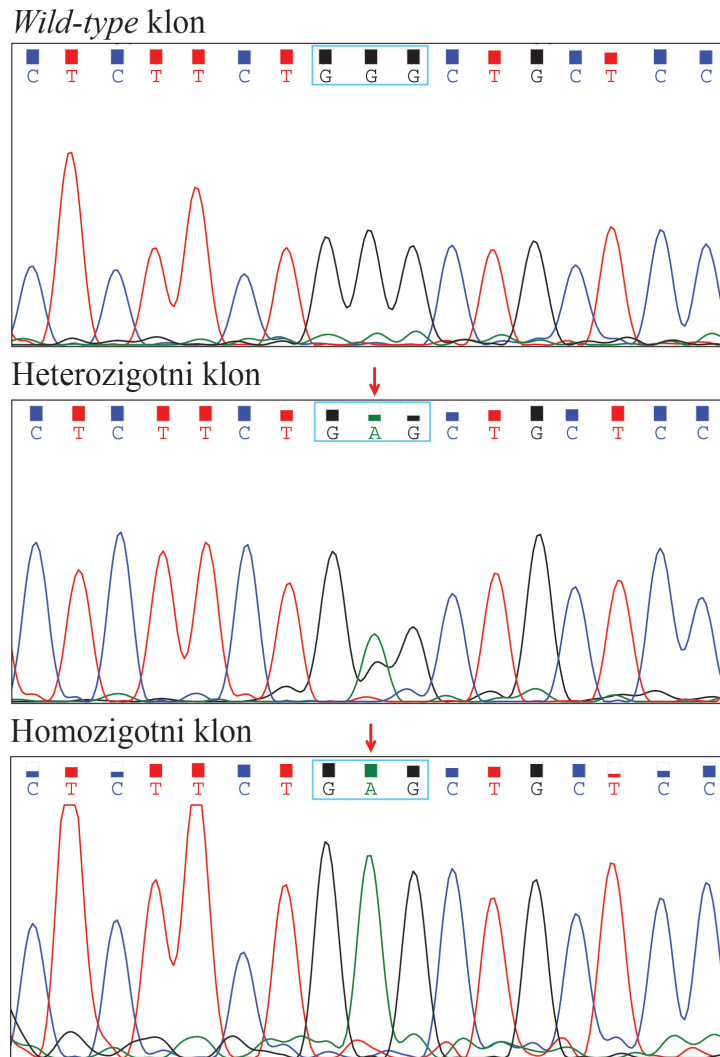
Metodom RFLP analizirano je ukupno 215 klonalnih ćelijskih linija HEK293FlpIn. Rezultati ove analize pokazali su da je među analiziranim klonovima bilo 27 monoalelnih i 2 bialelna *knockin* klona. Ukupna efikasnost HDR bila je 13,5%, što je grafički predstavljeno na Slici 38.



Slika 38. Grafički prikaz HDR efikasnosti

Svaki klon sa monoalelnim i bialelnim promenama ponovo je testiran upotrebom Sangerovog sekvenciranja kako bi se identifikovalo precizno editovanje genoma ćelijske linije HEK293FlpIn (Slika 39). Sekvenciranjem monoalelnih *knockin* klonova pokazano je da su u većini slučajeva klonovi posedovali kombinaciju NHEJ alela i HDR alela.

Da bi se ispitalo postojanje potencijalnih *off*-targeta u našim klonovima, specifični prajmeri su dizajnirani da amplifikuju odgovarajuće regione potencijalnih *off*-target lokusa koji su potom bili podvrgnuti sekvenciranjem po Sangeru. Rezultat ove analize pokazao je da nije bilo promena u *off*-target regionima monoklonalnih linija HEK293FlpIn.

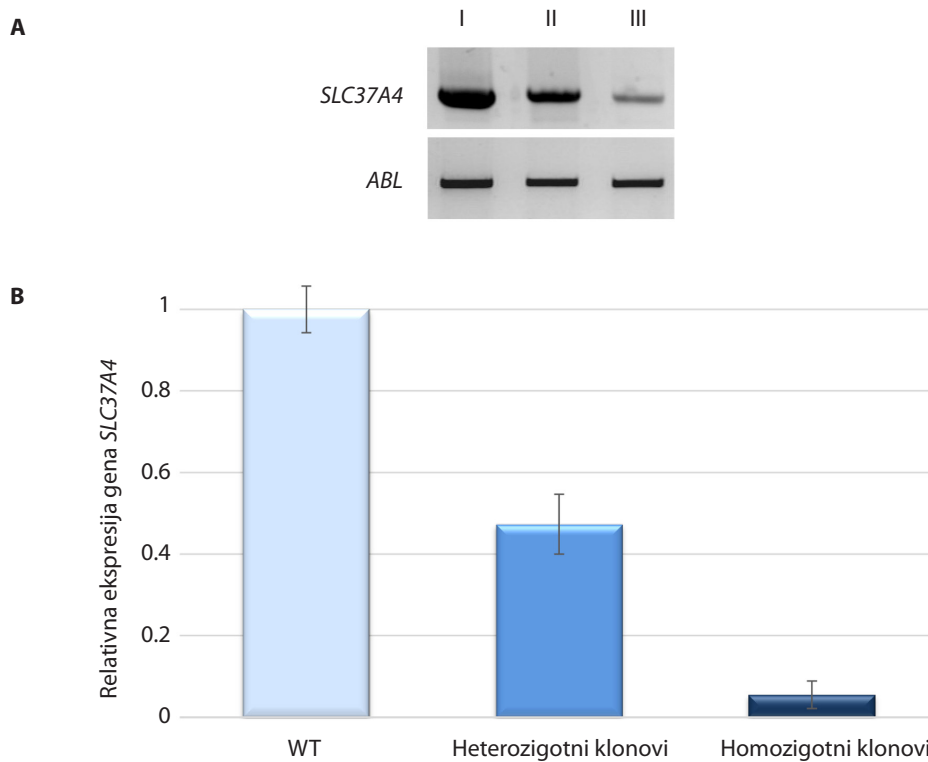


Slika 39. Efikasno inkorporiranje novootkrivene humane varijante c.248G>A (p.Gly83Glu) u gen *SLC37A4* ćelijske linije HEK293FlpIn. Elektroferogram delova sekvenci gena *SLC37A4* reprezentativnih wt, monoalelnih i bialelnih klonova ćelijske linije HEK293FlpIn.

4.2.5. Ispitivanje uticaja varijante c.248G>A na nivo ekspresije gena *SLC37A4* u HDR klonovima ćelijske linije HEK293FlpIn

Da bi se ispitalo kako novootkrivena varijanta c.248G>A utiče na ekspresiju gena *SLC37A4*, izolovana je celokupna RNK iz wt, heterozigotnih i homozigotnih HDR klonova i analizirana pomoću RT-PCR i RT-qPCR. Analiza transkripcionog profila precizno editovanih klonova pokazala je da varijanta c.248G>A dovodi do značajnog smanjenja količine transkripta *SLC37A4* u homozigotnom HDR klonu u poređenju sa wt ćelijama (Slika 40A). Osim toga, RT-qPCR studija pokazala je da je relativna ekspresija gena *SLC37A4* u homozigotnom HDR klonu gotovo nemerljiva ($0,023 \pm 0,00005$), a nivo ekspresije *SLC37A4* iRNA u heterozigotnoj klonalnoj ćelijskoj liniji smanjen je za

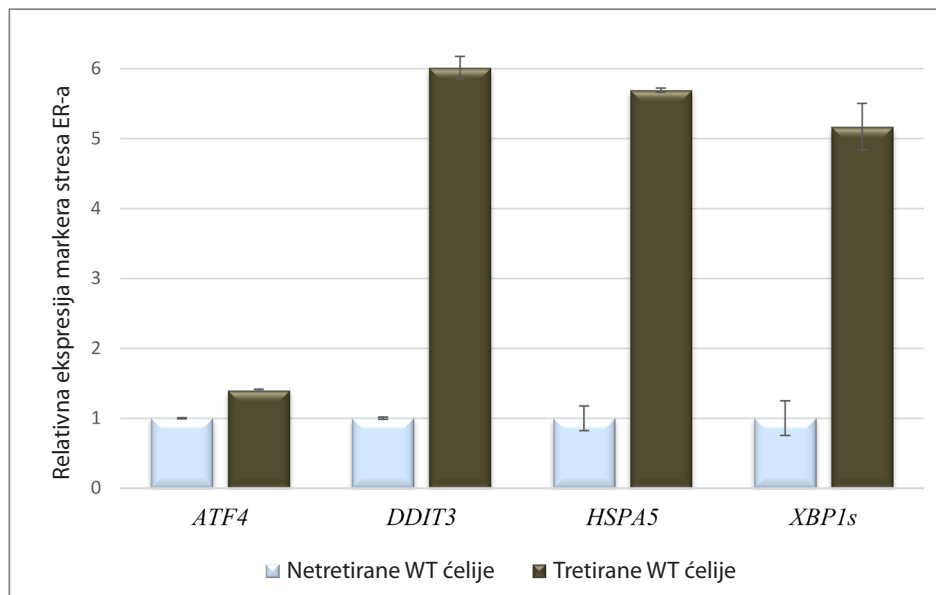
skoro 55 % ($0,446 \pm 0,078$) u poređenju sa nivoom ekspresije *wt* klona (Slika 41B). Ovi rezultati potvrđuju patogenost c.248G>A varijante. Šta više, odsustvo ekspresije gena *SLC37A4* u ćelijskoj liniji HEK293FlpIn koja je homozigotni nosilac humane *SLC37A4* varijante c.248G>A, prevazilazi njegovu svrhu samo za funkcionalnu karakterizaciju ove varijante i čini ga novim *in vitro* model sistemom za pogodnim za proučavanje molekularnih mehanizama patogeneze GSD tip Ib.



Slika 40. Analiza ekspresije gena *SLC37A4* ćelijske linije HEK293FlpIn_ *SLC37A4*_c.248G>A. A) Poređenje RT-PCR profila *wt* (I), heterozigotnog (II) i homozigotnog (III) HDR klona ćelijske linije HEK293FlpIn_ *SLC37A4*_c.248G>A pokazuje značajno smanjenje količine transkripta *SLC37A4* u homozigotnom HDR klonu. Gen *ABL* korišćen je kao endogena kontrola za određivanje količine i kvaliteta *cDNA*. B) RT-qPCR predstavlja relativnu ekspresiju *SLC37A4* iRNK u knockin ćelijama u poređenju sa kontrolnom ćelijskom linijom HEK293FlpIn koja je definisana kao kalibrator. RT-qPCR analiza urađena je sa dva klona svakog ćelijskog modela. Gen *GAPDH* upotrebljen je kao endogena kontrola u cilju normalizacije dobijenih rezultata. Greške na grafiku predstavljaju srednju vrednost relativne ekspresije \pm SD replika PCR reakcija jednog eksperimenta.

4.3. Analiza molekularnih markera stresa ER-a i apoptoze u *in vitro* modelu sistema za GSD tip Ib

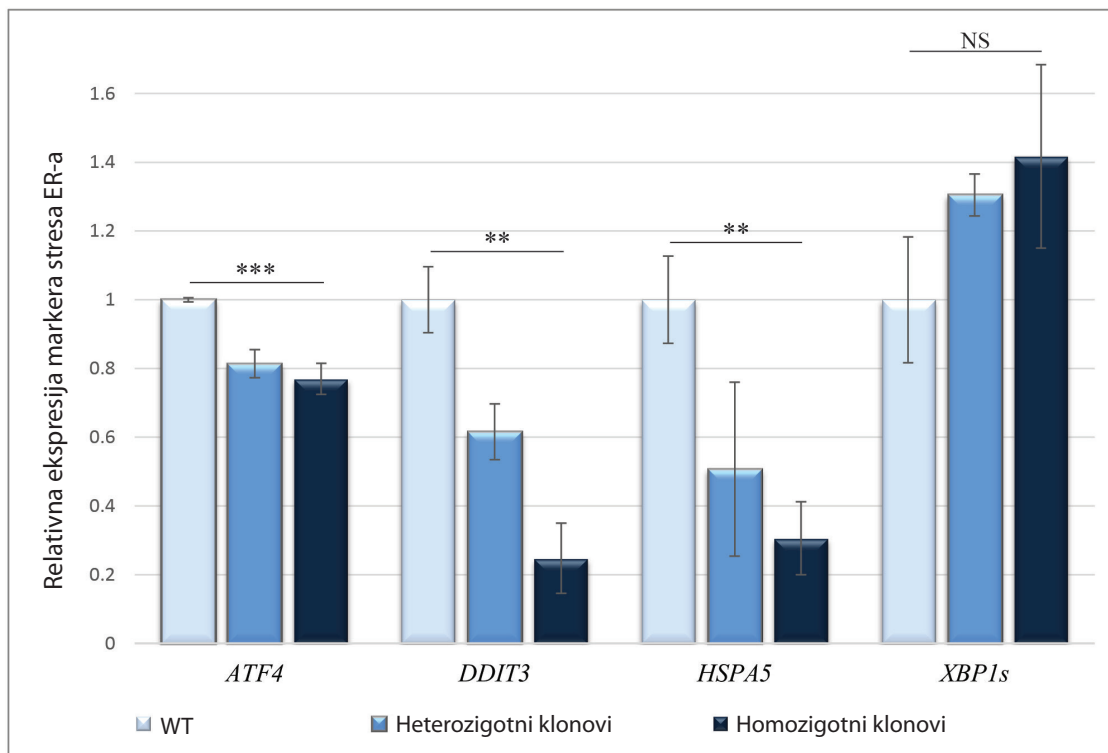
Za ispitivanje uticaja odsustva ekspresije gena *SLC37A4* na stres ER-a u novoformiranom *in vitro* modelu sistema za GSD tip Ib, analizirana je relativna ekspresija ćelijskih markera uključenih u UPR (*ATF4*, *DDIT3*, *HSPA5* i *XBP1s*) u *wt*, heterozigotnom i homozigotnom HDR klonu. HEK239FlpIn ćelije tretirane 40 min sa 2 mM ditiotreitola (DTT, *QIAGEN, Venlo, Netherlands*) korišćene su kao pozitivna kontrola za indukciju stresa ER-a [Rubio i sar., 2011]. Očekivano, akutni tretman sa ovom dozom DTT bio je dovoljan da generiše aktivaciju svih UPR ćelijskih markera, čija ekspresija je bila znatno povišena u odnosu na ekspresiju ovih gena netretirane ćelijske linije HEK293FlpIn (Slika 41).



Slika 41. Analiza ekspresije markera UPR odgovora u *wt* ćelijama HEK293FlpIn pod uticajem farmakološkog stresora. RT-qPCR predstavlja relativnu ekspresiju UPR ciljnih gena u HEK293FlpIn ćelijama tretiranim sa 2 mM DTT tokom 40 min u poređenju sa netretiranim ćelijama koje su upotrebljene kao kalibrator. RT-qPCR analiza urađena je sa dva klona svakog ćelijskog modela. Greške predstavljaju srednju vrednost relativne ekspresije \pm SD od replika PCR reakcija jednog eksperimenta.

RT-qPCR analizom nivoa ekspresije markera *ATF4*, *DDIT3* i *HSPA5*, pokazano je značajno smanjenje ekspresije ovih gena u heterozigotnom i homozigotnom HDR klonu u poređenju sa roditeljskom ćelijskom linijom (Slika 42), uprkos povišenoj vrednosti ovih markera u kontrolnoj ćelijskoj liniji koja je bila pod dejstvom akutnog stresa. Ovakav rezultat sugerira da hronični stres, nastao kao posledica prisustva varijante c.248G>A u genu *SLC37A4* editovanih ćelijskih linija, suprimira ekspresiju markera Stres ER-a. U poređenju sa *wt* ćelijama, nivo ekspresije *ATF4* značajno je bio smanjen, za skoro 20%, u heterozigotnim i homozigotnim ćelijskim linijama, a vrednosti su bile $0,814 \pm 0,041$

i $0,770 \pm 0,045$, respektivno ($P = 0,0002$). Nivo ekspresije *DDIT3* bio je niži za 40% u heterozigotnom HDR klonu ($0,616 \pm 0,081$), a za 75% u homozigotnom HDR klonu ($0,248 \pm 0,102$) u poređenju sa nivoom ekspresije *DDIT3* wt klona ($P = 0,002$). Slično tome, pokazano je da je, u poređenju sa wt ćelijama, nivo ekspresije *HSPA5* značajno smanjen za 50% u heterozigotnom HDR klonu ($0,507 \pm 0,253$), a za 70% u homozigotnom HDR klonu ($0,306 \pm 0,106$) ($P = 0,003$). Analizom nivoa ekspresije regulatora transkripcije *XBP1s*, detektovano je statistički beznačajno povećanje ekspresije *XBP1s* u heterozigotnim i homozigotnim *knockin* klonovima u poređenju sa wt ćelijskom linijom, a vrednosti ekspresije bile su $1,305 \pm 0,061$ i $1,417 \pm 0,367$, respektivno ($P > 0,05$).

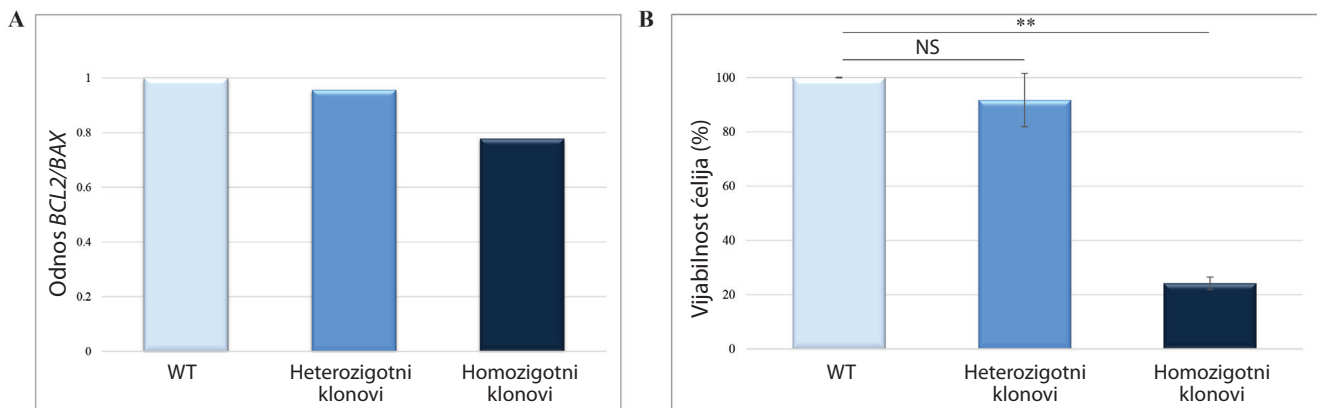


Slika 42. Kvantitativna analiza ekspresije markera Stres ER-a u GSD tip Ib in vitro model sistemu. Kvantitativna analiza ekspresije markera stres ER-a pokazuje relativni nivo ekspresije gena *ATF4*, *DDIT3*, *HSPA5* i *XBP1s* u heterozigotnim i homozigotnim *knockin* klonovima u poređenju sa wt ćelijama koji je korišćen kao kalibrator. Gen *GAPDH* upotrebljen je kao unutrašnja kontrola za normalizaciju dobijenih podataka. Relativna kvantifikaciona analiza postignuta je primenom komparativne *ddCt* metode. RT-qPCR analiza urađena je sa dva klona svakog ćelijskog modela. Greške predstavljaju srednju vrednost relativne ekspresije \pm SD od replika PCR reakcija dva eksperimenta. Statistička značajnost između grupa određena je jednosmjernim ANOVA testom i post-hoc t-testom: *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; NS = nema statističke značajnosti.

Za ispitivanje markera apoptoze izazvane hroničnim stresom ER-a, analizirana je relativna ekspresija anti-apoptotskog gena *BCL2* i pro-apoptotskog gena *BAX*. Rezultati ove analize pokazali su povećanje ekspresije gena *BCL2* i *BAX* u HDR klonovima ćelijske linije HEK293FlpIn u poređenju sa wt ćelijama (podaci nisu prikazani).

Budući da odnos između anti- i pro-apoptotskih markera odlučuje da li će ćelija aktivirati programiranu ćelijsku smrt, dalje je analiziran odnos relativnih ekspresija gena *BCL2/BAX*. Ovom analizom ustanovljeno je da je odnos *BCL2/BAX* je smanjen za 23% u homozigotnom HDR klonu u poređenju sa *wt* ćelijskom linijom, čime se može zaključiti da je nivo apoptoze povišen u GSD tip Ib *in vitro* model sistemu (Slika 43A).

Za potvrdu povišenog nivoa apoptoze u *knockin* klonovima, dodatno je analizirano preživljavanje ćelija upotrebom MTT testa (Slika 43B). Rezultati jasno pokazuju značajnu supresiju rasta homozigotnog HDR klona za 76% ($24,2 \pm 2,3$) u poređenju sa roditeljskom ćelijskom linijom ($P = 0,002$). U heterozigotnom HDR klonu zabeležena je statistički beznačajna supresija rasta za 10% ($91,8 \pm 9,8$) u poređenju sa *wt* ćelijskom linijom HEK293FlpIn.



Slika 43. GSD tip Ib *in vitro* model sistem pokazuje povećani nivo apoptoze i smanjenu vijabilnost i proliferaciju ćelija. (A) Odnos između ekspresionih nivoa *BCL2* i *BAX* iRNA u *knockin* klonovima u poređenju sa *BCL2/BAX* odnosom *wt* klona. Vrednosti manje od 1 odgovaraju povećanom nivou apoptoze u heterozigotnim i homozigotnim klonovima. RT-qPCR analiza urađena je u biološkom i tehničkom duplikatu. (B) Nivo vijabilnost ćelija procenjena je pomoću MTT testa, koji meri redukciju mitohondrijske boje tetrazolijuma i pokazuje brzinu proliferacije ćelija. Svi uzorci su pušteni u tehničkom triplikatu. Eksperiment je ponovljen dva puta. Apsolutna vrednost dobijena za svaku apsorbanciju uzorka izražena je procentualno u odnosu na apsolutnu vrednost dobijenu za *wt* ćelije (postavljenu kao 100%). Apsorbanca je direktno proporcionalna procentu vijabilnih ćelija. Statistička značajnost između grupa procenjena je jednosmernim ANOVA testom post-hoc t-testom: ** = $p < 0,01$, NS = nema statističke značajnosti.

Na osnovu predstavljenih rezultata može se zaključiti da se GSD tip Ib *in vitro* model sistem nalazi u stanju hroničnog stresa i povišene apoptoze nastale kao posledica odsustva ekspresije gena *SLC37A4*.

5. DISKUSIJA

5.1. Genomski profil pacijenata dečijeg uzrasta sa hepatičnim GSD u Srbiji

Prvi deo ovog istraživanja imao je za cilj identifikaciju gena uzročnika bolesti kod pacijenata suspektih na GSD u Srbiji, kao i određivanje spektra i frekvencije varijanti u identifikovanim genima. Prikazana je molekularno-genetička karakterizacija ukupno 41 pacijenata suspektih na GSD. Utvrđeno je da je 5 obolelo od GSD tip Ia, 31 od GSD tip Ib, po jedan pacijent od GSD tip III, VI i IXa. Takođe, kod dva pacijenta koji su bili suspekti na GSD, upotrebom NGS tehnologije utvrđeno je da ne postoji genetički defekt u genima uzročnicima GSD i istovremeno su identifikovane patogene varijante u genima uzročnicima bolesti nakupljanja holesterol estara i *Shwachman-Bodian-Diamond* sindroma. U okviru ove studije identifikovane su 4 nove varijante u genu *SLC37A4*, za koje je pokazano da do sada nisu bile prijavljene u različitim bazama podataka kao ni u dostupnoj literaturi.

5.1.1. Epidemiološki podaci i kliničke manifestacije pacijenata obolelih od GSD tip I

U ovoj studiji analizirana je jedna od najvećih GSD tip Ib kohorti ikada prijavljenih u Evropskim populacijama. Najveće ranije prijavljene kohorte bile su u Italiji (25 pacijenata), Nemačkoj (21 pacijenata), Ujedinjenom Kraljevstvu (17 pacijenata) i Francuskoj (11 pacijenata) [Santer i sar., 2000; Rake i sar., 2002; Trioche i sar., 2004; Melis i sar., 2005]. Istovremeno, ovo je najveća kohorta iz jugoistočne Evrope i prva studija koja se bavi epidemiološkim, molekularnim i fenotipskim karakteristikama pacijenata iz Srbije obolelih od GSD tip I.

Epidemiološki podaci o GSD I u Srbiji prikupljeni su za period od 1999. do 2015. godine. U cilju tačnije epidemiološke procene, uključena su 2 pacijenta obolela od GSD tip Ib i 3 od GSD tip Ia, rođenih između 2008. i 2012. godine čija je genotipizacija odrađena nezavisno od ove studije. U tom periodu rođeno je 1.209.225 živorođenih beba, među kojima je dijagnostifikovano 27 dece sa GSD tip I (7 pacijenata sa GSD tip Ia i 20 pacijenata sa GSD tip Ib). Na osnovu toga, ukupna incidenca GSD tip I u Srbiji procenjena je na 1:44.786 živorođenih. Izračunata incidenca za GSD tip Ib je 1:60.461, a za GSD tip Ia 1:172.746. Navedeni epidemiološki podaci ukazuju da u Srbiji postoji najviša incidenca GSD tip Ib do sada zabeležena u svetskim okvirima.

Kada je reč o apsolutnom broju pacijenata sa GSD tip Ib u našoj studiji (ukupno 31), važno je naglasiti da se radi o najvećoj nacionalnoj kohorti pacijenata obolelih od ove retke bolesti. U istraživanjima baziranim na rezultatima Evropske studije za

GSD tip I, koja su obuhvatila pacijente iz 12 evropskih zemalja, prijavljeno je svega 57 pacijenata obolelih od GSD tip Ib [Rake i sar., 2002].

Prosečna starost u kojoj je kod pacijenata u ovoj studiji uspostavljena dijagnoza GSD tip I iznosila je 10 meseci, dok se period između pojave prvih simptoma bolesti i uspostavljanja dijagnoze kretao u rasponu od 0 do 42 meseca života. U studiji Rake i sar. navodi se da 90% obolelih od GSD tip Ib biva dijagnostikovano u prvoj godini života (medijana uzrasta od 6 meseci), u odnosu na 80% pacijenata sa GSD tip Ia (medijana uzrasta od 4 meseci) [Rake i sar., 2002]. Analizom naše grupe pacijenata pokazano je da je dijagnoza postavljena u ranijem uzrastu kod bolesnika sa GSD tip Ia (prosečna starost od 6 meseci) u odnosu na obolele od tipa Ib (prosečna starost 10 meseci). S obzirom da je GSD tip Ib udružena sa neutropenijom, rekurentnim bakterijskim infekcijama i težim kliničkim tokom bolesti, mogao bi se očekivati obrnut rezultat. Međutim, kod 20% pacijenata obolelih od GSD tip Ib neutropenija nije bila izražena prilikom uspostavljanja dijagnoze. Analizom vremena pojave neutropenije u ispitivanoj grupi pacijenata, može se zaključiti da odložena pojava neutropenije kod mnogih ispitanika dovodi do kasnijeg uspostavljanja precizne dijagnoze, što sugerise na potencijalno postojanje gena modifikatora koji ublažavaju težinu kliničke slike kod ovih pacijenata [Miltenberger-Miltenyi i sar., 2005; Chou i sar., 2010a].

5.1.2. Spektar i učestalost detektovanih varijanti u genu *G6PC* kod pacijenata obolelih od GSD tip Ia iz Srbije

Budući da se GSD tip Ia javlja gotovo četiri puta češće od GSD tip Ib, značajan broj pacijenata sa GSD tip Ia analiziran je širom sveta. Prema podacima iz baze podataka HGMD *Professional* iz marta 2019. godine, identifikovano je 118 genetičkih varijanti u genu *G6PC*.

Kod pet pacijenata sa GSD tip Ia koji su analizirani u ovoj studiji, detektovane su samo dve različite patogene varijante u genu *G6PC* koje su ranije prijavljene u literaturi [Lei i sar., 1995; Li i sar., 2007]. Identifikovana je izuzetno visoka zastupljenost varijante c.247C>T (p.Arg83Cys), koja je bila prisutna na 90% alela, što implicira da su svi pacijenti, osim jednog, homozigotni nosioci ove varijante. Pokazano je da aminokiseline Arg-83, His-119 i His-176 čine aktivno mesto enzima *G6PC* [Lei i sar., 1993; Ghosh i sar., 2002], što sugerise da promene aminokiselina na ovim pozicijama dovode do narušavanja aktivnog mesta i kompletnog ukidanja aktivnosti enzima *G6PC* [Shieh i sar., 2002].

Druga detektovana varijanta u genu *G6PC* bila je c.518T>C (p.Leu173Pro) kod dečaka koji je kombinovani heterozigot za navedenu promenu i najčešću varijantu c.247C>T (p.Arg83Cys). U oba slučaja, genetske varijante nisu nastale *de novo*. Segre-

gacionom analizom pokazano je da su svi roditelji heterozigotni nosioci detektovanih varijanti. Ovakva homogenost pacijenata u odnosu na genotip prijavljena je jedino u populaciji iz Izraela, sa učestalošću varijante p.Arg83Cys od 93% [Parvari i sar., 1995].

Iako je GSD tip Ia poremećaj panetničkog karaktera, učestalost varijanti u genu *G6PC* varira između etničkih grupa. U Evropskim populacijama prijavljene genetičke varijante sa najvišom frekvencijom su p.Arg83Cys i p.Gln347Ter i javljaju se sa približnom incidencijom od 33% i 18%, respektivno [Chou i Mansfield, 2008]. Tako je u populaciji iz Holandije varijanta p.Arg83Cys detektovana u 32,5% slučajeva, a p.Gln347Ter u 14,3% slučajeva [Rake i sar., 2000]. Primer heterogenosti genotipova u kohorti pacijenata sa GSD tip Ia prikazan je u radu Chevalier-Porst i sar., gde je detektovano 14 različitih varijanti u genu *G6PC* kod 24 nesrodna pacijenta iz Francuske. Varijanta p.Arg83Cys je kod ovih pacijenata druga po učestalosti (19%) [Chevalier-Porst i sar., 1996]. Kada je reč o regionima koji su geografski bliži našoj sredini, kao što su Mađarska i Italija, prijavljena je heterogenost genotipova među kojima je varijanta p.Arg83Cys takođe sa najvišom učestalošću, 33,3% i 46%, respektivno. U grupi pacijenata iz Turske učestalost ove varijante dostiže 60% [Rake i sar., 2000]. Ipak, u većini navedenih zemalja prisustvo varijante p.Arg83Cys ne dostiže frekvenciju koja se susreće kod pacijenata iz Srbije.

U analiziranoj kohorti iz Srbije varijanta p.Leu173Pro detektovana je u heterozigotnom obliku kod samo jednog pacijenta obolelog od GSD tip Ia. Interesantno je da dečak iz naše studije predstavlja prvog pacijenta sa ovom promenom koji je prijavljen na području Evrope. Do danas, ova promena nije prijavljena ni u jednoj etničkoj grupi osim u kineskoj. U nedavno objavljenom prikazu slučaja novorođenčeta rođenog iz konsangvine porodice u Kini, koje je homozigotni nosilac ove varijante, evaluirani su efekti ove promene na aktivnost enzima *G6PC*. Takođe, navodi se specifičnost ovog genotipa za područje Dalekog Istoka [Lu i sar., 2016]. Varijanta p.Leu173Pro detektovana je prvi put kod pacijenta koji je kombinovani heterozigot (p.[Arg83His;Leu173Pro]) takođe iz Kine [Li i sar., 2007]. Radilo se o devojčici kod koje je u uzrastu od dve godine postavljena dijagnoza GSD tip Ia na osnovu hepatomegalije udružene sa biohemijskim karakteristikama tipičnim za ovu bolest (hepatomegalija, hipoglikemija, hiperlipidemija, hiperurikemija).

5.1.3. Korelacija genotipa i fenotipa kod pacijenata obolelih od GSD tip Ia iz Srbije

Najpotpunija dosadašnja studija učestalosti varijanti u genu *G6PC* i korelacije genotipa i fenotipa objavljena je u radu Matern i sar., i obuhvatila je 424 pacijenata različitog etničkog porekla. Detektovano je 76 različitih varijanti, a najčešće detektovana

varijanta je p.Arg83Cys sa frekvencijom od 36% [Matern i sar., 2002]. U ovom radu ilustrovano je odsustvo jasne korelacije genotipa i fenotipa kod pacijenata obolelih od GSD tip Ia. Takođe, u radu Rake i sar., opisan je varijabilni fenotip kod pacijenata u srodstvu sa istim genotipom [Rake i sar., 2000]. Ovakva opažanja ukazuju ili na neadekvatnost *in vitro* ekspresionih sistema koji se koriste za procenu funkcije enzima, ili na prisustvo gena modifikatora koji mogu kompenzovati ili stabilizovati ekspresiju niskog nivoa G6PC *in vivo*.

Kod 4 pacijenta iz ove studije koji su homozigotni nosioci varijante p.Arg83Cys nije detektovana značajna fenotipska razlika. Kod svih pacijenata prvi simptomi bolesti ispoljili su se u prvim mesecima života, a hepatomegalija i hipoglikemija bili su ključni simptomi. Pacijent koji je nosilac varijanti p.Arg83Cys i p.Leu173Pro takođe je ispoljio prve simptome bolesti tokom prvih meseci života sa klasičnim biohemijskim profilom karakterističnim za GSD tip Ia.

5.1.4. Spektar i učestalost detektovanih varijanti u genu *SLC37A4* kod GSD tip Ib pacijenata iz Srbije

Pre više od dvadeset godina identifikovane su prve genetičke varijante u genu *SLC37A4* [Gerin i sar., 1997]. Od tada zabeleženo je 116 različitih varijanti (HGMD *Professional*, mart 2019. godine). Iako je molekularna heterogenost gena *SLC37A4* velika, a GSD tip Ib bolest koja nije vezana za neku etničku grupu, izgleda da određene patogene varijante pokazuju izvesnu etničku varijabilnost. Na osnovu literaturnih podataka određena je učestalost detektovanih varijanti sa najvišom frekvencijom u različitim populacijama [Chou i sar., 2002; Matern i sar., 2002; Qiu i sar., 2011; Kido i sar., 2013; Liang i sar., 2013; Chou i Mansfield, 2014; Choi i sar., 2017]. Skorašnji pregledi literature ukazuju da se varijante p.Leu348Valfs*53 i p.Gly339Cys najčešće javljaju u populaciji belaca i da zajedno predstavljaju oko 45% svih pogođenih *SLC37A4* alela [Chou i sar., 2018]. Interesantno je napomenuti da varijanta p.Gly339Cys, prethodno detektovana u različitim populacijama širom Evrope, nije otkrivena ni u jednom od 29 nesrodnih GSD tip Ib pacijenata iz Srbije. Varijanta p.Leu348Valfs*53 predstavlja panetnički prisutnu varijantu, koja visoku učestalost ima u kohortama koje su obuhvatale pacijente evropskog porekla (38,1% u Nemačkoj, 20% u Italiji) [Janecke i sar., 2001; Melis i sar., 2005], ali i pacijente iz geografski udaljenih regiona (22,2% kod pacijenata arapskog porekla, 16,6% u Južnoj Koreji) [Chou i sar., 2002; Choi i sar., 2017]. Kod pacijenata iz Srbije varijanta p.Leu348Valfs*53 dostiže učestalost od 33,87%.

Varijanta koja je prva po učestalosti u našoj studiji je c.81T>A (p.Asn27Lys) i čini gotovo polovinu svih analiziranih hromozoma (48,39%). Pacijenti iz analizirane

kohorte koji su nosioci ove varijante potiču iz 14 različitih gradova. Zanimljivo je istaći da je varijanta p.Asn27Lys prvi put prijavljena u homozigotnom obliku kod pacijenta poreklom iz Bosne i Hercegovine [Santer i sar., 2000] i od tada nije detektovana ni u jednoj drugoj studiji. Visoka učestalost ove varijante kod pacijenata iz Srbije ukazuje da promena p.Asn27Lys u genu *SLC37A4* najverovatnije predstavlja autohtonu varijantu nastalu na području Srbije. Dodatno, još jedna od varijanti prisutnih u našoj grupi pacijenata c.162C>A (p.Ser54Arg), prvi put je opisana pri analizi germanskih populacija, ali sa napomenom da se radilo o pacijentu austrijsko-slovenskog porekla [Janecke i sar., 2000]. Drugi poznati pacijent je prijavljen u našoj studiji. Stoga predstavljeni spektar varijanti u genu *SLC37A4* (Tabela 23 u poglavlju 4.1.2.) koji se nalazi u analiziranoj kohorti pacijenata sa GSD tip Ib ne samo da predstavlja molekularno-genetičku osnovu pacijenata iz Srbije, već ukazuje i na genetske karakteristike pacijenata iz jugoistočne Evrope. Štaviše, frekvencije alela ovih klinički relevantnih varijacija mogu se iskoristiti za istraživanje protoka gena između populacija, proučavanje demografske istorije i najvažnije za optimizaciju genetičkog testiranja u jugoistočnoj Evropi [Viennas i sar., 2017].

5.1.5. Nove varijante u genu *SLC37A4*

Slično istraživanjima o drugim retkim bolestima [Stojiljkovic i sar., 2016; Andjelkovic i sar., 2018], zahvaljujući opsežnom genetskom testiranju kodirajućih regiona i egzon-intron granica relevantnih gena, identifikovane su 4 nove varijante u genu *SLC37A4* kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib. Nukleotidne zamene c.248G>A (p.Gly83Glu), c.404G>A (p.Gly135Asp), c.571C>T (p.Pro191Ser) i c.785G>A (p.Gly262Asp ili p.Ser263Glyfs*33) detektovane pri genomskom profilisanju pacijenata iz Srbije nisu bile prijavljene kod obolelih ni u jednoj bazi podataka kao ni u dostupnoj literaturi. S obzirom da je reč o varijantama koje potencijalno dovode do razvoja GSD tip Ib, ove promene su najpre podvrgnute *in silico* analizi. Radi verodostojnosti rezultata *in silico* predikcije, korišćeno je više bioinformatičkih alata, pri čemu su rezultati ove analize nedvosmisleno ukazali na patološki efekat svih novootkrivenih varijanti u genu *SLC37A4*.

Varijanta c.248G>A (p.Gly83Glu) nije primećena u kontrolnim ispitanicima u različitim bazama podataka (ExAC, HGMD, VarSome, dbSNP, EVS, 1000 Genomes), ni u internoj bazi formiranoj iz *TruSight One Sequencing* platforme koja je uključila 75 ispitanika iz Srbije. Rezultati višestruke *in silico* predikcije sugerisali su da ova genetička varijanta narušava funkciju translokaze G6PT. Takođe, analizom evolutivne konzerviranosti Gly-83, pokazano je da se ova aminokiselina nalazi kod svih odabra-

nih kičmenjaka, što ukazuje na evolutivnu očuvanost ove aminokiselinske rezidue u proteinu G6PT (poglavlje 4.1.4., Slika 32). Varijanta p.Gly83Glu nalazi se u transmembranskom domenu drugog heliksa (H2) translokaze, za koji je pokazano da je važan za aktivnost transportera. U studijama koje su se bavile funkcionalnom karakterizacijom nesinonimnih varijanti p.Leu85Pro i p.Gly88Asp u drugom heliksu G6PT, dokazano je da potpuno ukidaju mikrosomalni transport G6P [Chen i sar., 2002; 2008a], što sugeriše da varijanta p.Gly83Glu može uticati na funkcionalnost proteina G6PT. Rezultati funkcionalne karakterizacije ove varijante (poglavlje 4.2.4.) potvrdili su da se radi o patogenoj varijanti. Takođe, ova promena detektovana je kod tri nesrodna pacijenta iz Srbije, koji manifestuju karakteristične simptome za GSD tip Ib, uključujući tešku neutropeniju od ranog uzrasta (poglavlje 4.1.2.1., Tabela 24).

Iako varijanta c.404G>A (p.Gly135Asp) nikada nije prijavljena kod pacijenta obolelog od GSD tip Ib, ova promena funkcionalno je okarakterisana *in vitro* [Pan i sar., 2003]. Imajući u vidu da proteini koji vrše transport fosforilisanih metabolita (GlpT, uhpT, uhpC, PgtP, G6PT) dele *signature* motiv (ProSite PDOC00726), Pan i saradnici želeli su da pokažu da su aminokiseline na pozicijama od 133-149 u *signature* motivu humanog proteina G6PT važne za transport G6P u lumen ER-a. Pored tri varijante koje su detektovane kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib (p.Gln133Pro, p.Ala148Val i p.Gly149Glu) [Hiraiwa i sar., 1999; Chen i sar., 2002], generisane su sve moguće promene aminokiselina u ovom motivu i svaki aberantni protein funkcionalno je okarakterisan. Pokazano je da varijanta p.Gly135Asp ne utiče na ekspresiju i stabilnost G6PT, ali potpuno ukida njegovu aktivnost i mogućnost transporta G6P u lumen ER-a [Pan i sar., 2003]. Genotipizacijom pacijenata iz Srbije, identifikovan je prvi pacijent sa varijantom p.Gly135Asp u genu *SLC37A4* koga karakteriše hepatomegalija i tipičan biohemijski profil za GSD tip Ib, uključujući razvoj neutropenije tokom druge godine života (poglavlje 4.1.2.1., Tabela 24). Identifikacija varijante p.Gly135Asp u *signature* motivu kod pacijenta obolelog od GSD tip Ib, dodatno potvrđuje važnost ovog motiva za aktivnost proteina G6PT.

U ovoj studiji otkrivena je još jedna nova nesinonimna varijanta c.571C>T (p.Pro191Ser) u genu *SLC37A4* kod dve sestre koje su kombinovani heterozigoti i za funkcionalno okarakterisanu varijantu c.81T>A (p.Asn27Lys). Osim ove dve promene, kod pacijentkinja nisu detektovane druge promene u genu *SLC37A4*. Kod sestara dijagnoza je uspostavljena u 3 i 5. godini života, na osnovu hepatomegalije, usporenog rasta, tipičnog biohemijskog profila za GSD tip Ib i prisustva neutropenije (poglavlje 4.1.2.1., Tabela 24). Varijanta p.Pro191Ser u genu *SLC37A4* nije primećena u kontrolnim ispitanicima u već navedenim bazama podataka, kao ni u internoj bazi formiranoj sa *TruSight One Sequencing* panela.

Aminokiselina prolin je jedina kod koje je bočni lanac dva puta povezan sa proteinskom okosnicom, formirajući petočlani prsten koji sadrži azot, što implicira da prolin nije u stanju da zauzme različite konformacije u lancu [Betts i Russell, 2007]. Višestruka *in silico* predviđanja ukazala su da zamena prolina serinom na poziciji 191 dovodi do gubitka petlje i narušavanja funkcije transportera G6PT (poglavlje 4.1.4., Tabele 26 i 27). Analizom evolutivne konzerviranosti pokazano je da je Pro-191 evolutivno očuvan među ispitivanim organizmima (poglavlje 4.1.4., Slika 32). Takođe, Pro-191 nalazi se u drugoj citoplazmatskoj petlji (C2) za koju je pokazano da varijante u ovom domenu menjaju konformaciju translokaze [Pan i sar., 1999]. Štaviše, funkcionalna karakterizacija varijante p.Pro191Leu pokazala je potpuno odsustvo transportne aktivnosti proteina G6PT [Chen i sar., 2002; 2008a], što ide u prilog pretpostavci da varijanta p.Pro191Ser negativno utiče na konformacionu promenu i aktivnost proteina G6PT. Patološki uticaj varijante p.Pro191Ser na transport G6P-a kroz membranu ER-a biće potvrđen u budućim studijama funkcionalne karakterizacije.

Analizom genomske DNK pacijenata obolelih od GSD tip Ib, identifikovana je varijanta c.785G>A (p.Gly262Asp ili p.Ser263Glyfs*33) koja se nalazi na prvom nukleotidu egzona 5 u genu *SLC37A4*, što je čini nesinonimnom (eng. *missense variant*) i/ili varijantom koja menja mesto iskrajanja introna (eng. *splice site variant*). S obzirom da je pri *in silico* predikciji neophodno koristiti nekoliko različitih bioinformatičkih alata radi verodostojnosti rezultata, pri analizi varijante c.785G>A korišćeni su različiti programi za predviđanje efekta aminokiselinskih zamena i promene mesta iskrajanja introna. Svi programi za analizu efekta nesinonimne varijante p.Gly262Asp su nedvosmisleno ukazali da je reč o patološkoj varijanti koja narušava aktivnost transportera. Poravnanjem sekvenci pet odabranih organizama koje je izvršeno pomoću programa *Clustal Omega* pokazano je da se kod svih na poziciji 262 nalazi upravo aminokiselina glicin, što ukazuje na evolutivnu očuvanost ovog aminokiselinskog ostatka u proteinu G6PT (poglavlje 4.1.4., Slika 32).

Istovremeno, *in silico* predikcijom pokazano je da varijanta c.785G>A može da utiče na mesto iskrajanja introna tako što dovodi do preskakanja egzona 5 prilikom obrade primarnog transkripta *SLC37A4* (poglavlje 4.1.4.). Upotrebom bioinformatičkog softvera za *in silico* translaciju (*ExPASy Translate Tool*), pokazano je da varijanta c.785G>A dovodi do promene okvira čitanja i formiranja kraćeg transkripta čijom translacijom se uvodi prevremeni stop kodon 33 ak od mesta promene i sintetiše protein dužine 295 ak (p.Ser263Glyfs*33). Studije koje su se bavile funkcionalnom karakterizacijom varijanti koje menjaju okvir čitanja gena *SLC37A4*, pokazale su da sinteza proteina kojima nedostaje karboksi-terminalni domen (Lys-Lys-Ala-Glu ili KKAE) nophodan za zadržavanje transportera G6PT u membrani ER-a i njegovu sta-

bilnost, ozbiljno narušavaju mikrozomalni transport G6P i/ili P_i [Chen i sar., 2000; Santer i sar., 2000; Chen i sar., 2002]. Rezultati ovih studija ukazuju da je strukturni integritet transmembranskih spirala kritičan za stabilnost proteina G6PT [Chou i Mansfield, 2014], što ukazuje da varijanta c.785G>A narušava aktivnost translokaze G6PT. Rezultati funkcionalne karakterizacije ove varijante (poglavlja 4.2.1. i 4.2.2.) potvrdili su da se radi o patogenoj varijanti. Dodatno, ova varijanta detektovana je kod 4 nesrodna pacijenta iz Srbije kod kojih je zabeležena izražena hepatomegalija i pojava neutropenije i teških bakterijskih infekcija u prvim mesecima života (poglavlje 4.1.2.1., Tabela 24).

5.1.6. Korelacija genotipa i fenotipa kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib iz Srbije

Prema podacima iz literature, kao i kod pacijenata obolelih od GSD tip Ia, striktna korelacija genotipa i fenotipa nije utvrđena ni kod GSD tip Ib pacijenata. Analizom kohorte koja je obuhvatala 120 pacijenata različitog etničkog porekla sa ovim retkim poremećajem kod kojih je detektovano 68 različitih varijanti u genu *SLC37A4*, nije pokazano postojanje veze između bilo koje pojedinačne promene i prisustva određenih manifestacija bolesti, kao što su neutropenija, rekurentne bakterijske infekcije i sistemske komplikacije [Janecke i sar., 2001]. U literaturi postoji nekoliko izveštaja o pacijentima obolelih od GSD tip Ib koji nisu razvili neutropeniju. U radu Kure i sar., opisana su dva pacijenta iz Japana sa promenama u genu *SLC37A4* koji su razvili sve biohemijske karakteristike tipične za GSD tip Ib, ali bez pojave neutropenije. Varijante koje su prijavljene kod ovih pacijenata, omogućavaju rezidualnu aktivnost translokaze, što se smatra objašnjenjem za ovaj neobično redak fenotip [Kure i sar., 2000]. U našoj studiji, svi pacijenti oboleli od GSD tip Ib razvili su neutropeniju do treće godine života, a inflamatorna bolest creva slična Kronovoj bolesti detektovana je kod 20,6% GSD tip Ib pacijenata. Uniformno prisustvo neutropenije među pacijentima sa GSD tip Ib opisano je i u studiji korejskih pacijenata gde se navodi postojanje inflamatorne bolesti creva kod 22% ispitivanog uzorka što korespondira sa podacima iz naše studije [Choi i sar., 2017].

Takođe, u radu Melis i sar., opisani su pacijenti koji su homozigotni nosioci varijante p.Leu348Valfs*53 koji poseduju spektar različitih kliničkih manifestacija. Prijavljeni su pacijenti sa hroničnom neutropenijom, teškim i učestalim infekcijama i teškim oblikom inflamatorne bolesti creva. Neki su razvili cikličnu neutropeniju povezanu sa povremenim bakterijskim infekcijama, dok je određeni broj pacijenata posedovao normalan broj neutrofila [Melis i sar., 2005]. Isti genotip prisutan je kod pet pacijenata u našoj studiji. U ovoj podgrupi pacijenata, 40% ih je razvilo tešku

neutropeniju, a inflamatornu bolest creva 60%. Važno je naglasiti da se kod jednog pacijenta iz naše studije, koji je bio homozigotni nosilac varijante p.Leu348Valfs*53, dogodio smrtni ishod bolesti usled hronične insuficijencije jetre.

Podaci o fenotipskom efektu drugih ranije prijavljenih varijanti detektovanih u ovoj studiji p.Asn27Lys i p.Ser54Arg su retki. Jedini opisani pacijent koji je homozigotni nosilac varijante p.Asn27Lys u genu *SLC37A4* posedovao je karakterističan profil bolesti sa razvojem neutropenije u prvim mesecima života [Santer i sar., 2000]. U radu Janecke i sar., opisan je pacijent koji je nosilac varijante p.Ser54Arg zajedno sa velikom delecijom na drugom alelu, sa retardacijom rasta, neutropenijom i hepatomegalijom u starosti od 11 meseci života i smrtnim ishodom bolesti [Janecke i sar., 2001]. Jedini pacijent u našoj studiji koji je kombinovani heterozigot za varijante p.Ser54Arg i p.Leu348Valfs*53 vrlo rano je ispoljio prve simptome bolesti, dijagnoza je uspostavljena u 4. mesecu života na osnovu hepatomegalije i tipičnog biohemijskog profila karakterističnog za GSD tip Ib.

Za razliku od dosadašnjih studija koje nisu potvrdile korelaciju genotipa i težine i vremena ispoljavanja neutropenije kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib, rezultati iz ove studije nagoveštavaju da bi određene varijante mogle da predstavljaju faktor rizika za ranu pojavu neutropenije. Naime, kombinovani heterozigoti za novootkrivenu varijantu c.785G>A u genu *SLC37A4* (bez obzira na promenu na drugom alelu) razvili su neutropeniju u prvim mesecima života (1-6 meseci). Takođe, kod ovih pacijenata zabeležene su teške bakterijske infekcije i izražena hepatomegalija. Jedan pacijent razvio je inflamatornu bolest creva sličnu Kronovoj bolesti u 8. godini života. S obzirom da je ova varijanta prvi put opisana među pacijentima iz Srbije sa GSD tip Ib i da je broj ovih pacijenata relativno mali, za definitivnu potvrdu fenotipskog efekta ove varijante neophodan je veći broj ispitanika. Ipak, identifikovana povezanost ima veliki značaj, jer predstavlja jednu od retkih opservacija o korelaciji određenih varijanti u genu *SLC37A4* sa mijeloidnom disfunkcijom kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib.

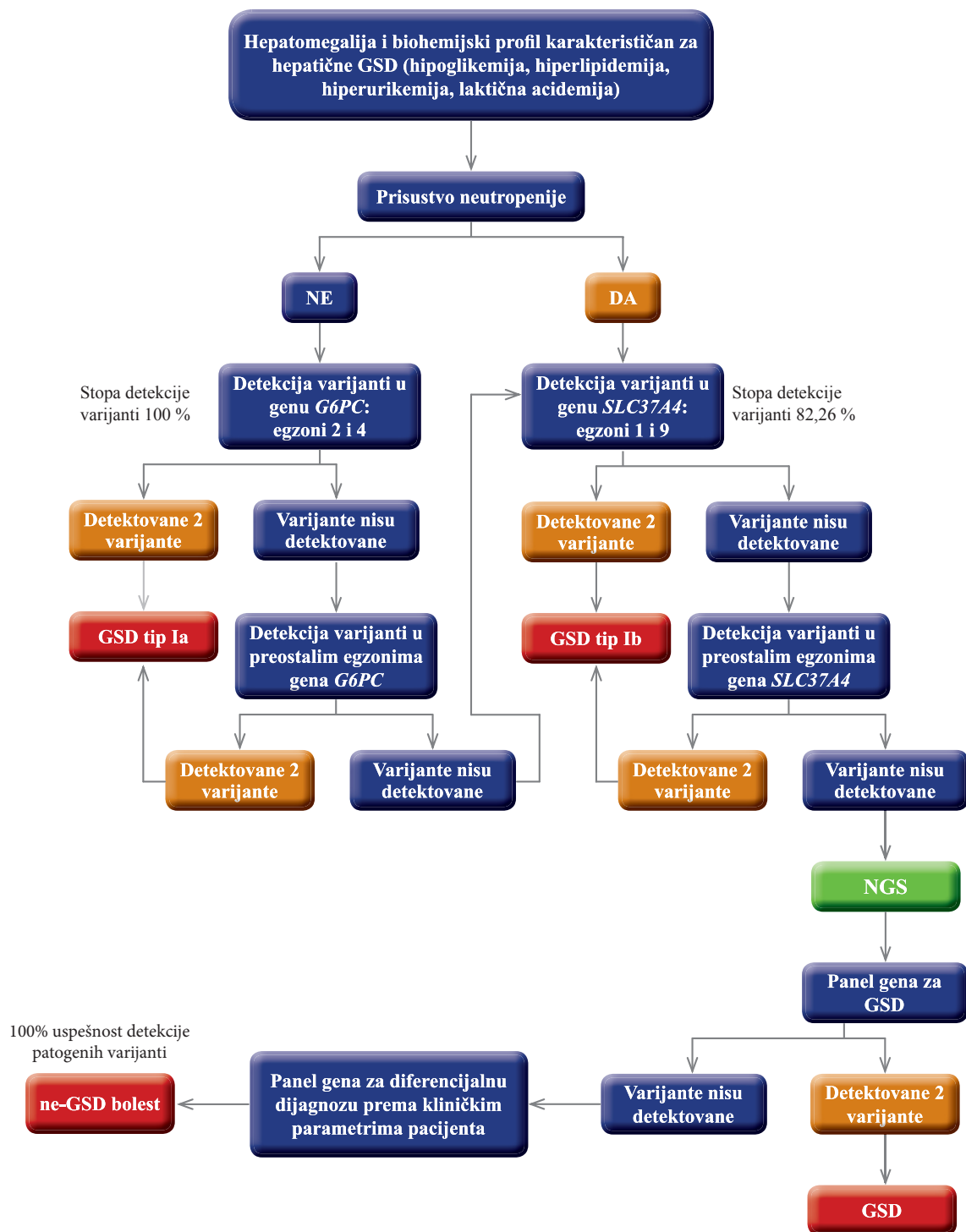
5.1.7. Određivanje strategije za uspostavljanje rutinske molekularno-genetičke dijagnostike hepatičnih glikogenoza u Srbiji

Dijagnostička procedura za poremećaje sa širokom fenotipskom varijacijom i heterogenom genetičkom osnovom koji uključuju defekte u većem broju gena nekada je bila kompleksna i predstavljala je veliki izazov pre nego što je metoda NGS ušla u dijagnostičke okvire. Naime, diferencijalna dijagnoza bolesnika sa hepatičnom GSD može uključivati nekoliko tipova GSD koji dovode do pojave hepatomegalije i hipoglikemije (Ia, Ib, III, 0, XI, IX, VI i IV) kao i stanja sa veoma različitom patofiziologijom

koja iziskuju specifičan terapijski pristup (npr. *Shvachman-Bodian-Diamond* sindrom, kongenitalni hiperinzulinizam, itd.) [Arnoux i sar., 2011; Donadieu i sar., 2011].

U analiziranoj kohorti koja se sastojala od 41 pacijenata suspektnih na hepatične GSD, genotipizacija je uspešno izvedena kod svih pacijenata. Na osnovu kliničkih i biohemijskih manifestacija i sekvenciranjem po Sangeru, dijagnoza GSD tip I uspešno je uspostavljena kod 36 pacijenata. Kod preostalih pet pacijenata precizna dijagnoza upostavljena je upotrebom NGS tehnologije. Genetičko testiranje je kod tri pacijenta potvrdilo druge oblike hepatičnih GSD koji su takođe povezani sa hepatomegalijom i hipoglikemijom - tip III, tip VI i tip IXa. Zanimljivo je da su kod pacijenta sa teškom kongenitalnom neutropenijom identifikovane patogene genetičke varijante u genu *SBDS* odgovornom za razvoj *Shvachman-Bodian-Diamond* sindroma. Bolest skladištenja holesteril estera potvrđena je kod petog pacijenta, što mu je omogućilo adekvatno i pravovremeno lečenje enzimskom susptitucionom terapijom. Stoga, naša studija podržala je značajnost upotrebe NGS tehnologije za uspostavljanje precizne dijagnoze GSD i diferencijalne dijagnoze kod pacijenata sa preklapajućim fenotipovima [Vega i sar., 2016].

Studija genomskog profilisanja pacijenata i identifikacija patogenih varijanti u genima uzročnicima GSD nije važna samo sa stanovišta populacione genetike, već ima izuzetno značajnu primenu i u osmišljavanju optimalnog dijagnostičkog pristupa za Srbiju. Imajući u vidu zastupljenost određenih tipova GSD u analiziranoj populaciji, može se konstruisati odgovarajući algoritam za postizanje precizne molekularno-genetičke dijagnoze (Slika 44). Prema ovom algoritmu, na osnovu podatka o prisustvu neutropenije kod ispitanika i primenom DNK sekvenciranja po Sangeru, moguće je detektovati patogene varijante kod 87,8 % pacijenata. Ukoliko se kod pacijenata ne detektuju promene sekvenciranjem kodirajućih i okolnih intronskih sekvenci gena *G6PC* i *SLC37A4*, onda je upotrebom NGS tehnologije i adekvatnog pristupa za analizu dobijenih podataka moguće pravovremeno postaviti dijagnozu kod pacijenata sa preklapajućim simptomima bolesti. Ovakav dijagnostički algoritam bi, uzimajući u obzir učestalost svake pojedinačne varijante detektovane kod pacijenta sa GSD u Srbiji, omogućio bržu, lakšu i pristupačniju detekciju patogenih varijanti kod pacijenata kod kojih se uoči hepatomegalija i hipoglikemija. Precizno uspostavljanje molekularno-genetičke dijagnoze je od suštinskog značaja za osmišljavanje i implementaciju optimalnog medicinskog tretmana svakog pacijenta i za pravilno genetsko savetovanje u pogođenim porodicama. Takođe, uspostavljanje tačne dijagnoze je važno kako bi se izbeglo ireverzibilno oštećenje organa ili primena neefikasnih tretmana. U ovoj studiji uspostavljena je 100 % uspešnost detekcije patogenih varijanti, a samim tim i preciznih molekularno-genetičkih dijagnoza, što je postavilo osnovu za upotrebu NGS tehnologije u istraživačke i dijagnostičke svrhe u Srbiji i regionu.



Slika 44. Strategija za uspostavljanje precizne molekularno-genetičke dijagnoze kod pacijenata suspektih na GSD. Svi pacijenti analizirani u ovoj studiji imali su hepatomegaliju i biohemijski profil karakterističan za neki od tipova hepatičnih GSD. Detekcijom varijanti u genima *G6PC* i *SLC37A4* postavljena je dijagnoza GSD tip I kod 87,8 % pacijenata. Kombinovanim pristupom koji podrazumeva upotrebu sekvenciranja po Sangeru i tehnologije NGS, postignuta je 100 % uspešnost detekcije patogenih varijanti kod pacijenata suspektih na hepatične GSD iz Srbije.

5.2. Funkcionalna karakterizacija novootkrivenih varijanti u genu *SLC37A4* kod GSD tip Ib pacijenata iz Srbije

Drugi deo ovog istraživanja imao je za cilj funkcionalnu karakterizaciju novootkrivenih varijanti u kodirajućem regionu gena *SLC37A4*. Od četiri varijante koje ranije nisu bile prijavljene, za tri u literaturi nisu postojali podaci o funkcionalnosti transportera, dok je p.Gly135Asp već bila okarakterisana *in vitro* [Pan i sar., 2003]. Naša opsežna *in silico* predikcija ostalih varijanti, c.248G>A (p.Gly83Glu), c.571C>T (p.Pro191Ser) i c.785G>A (p.Gly262Asp ili p.Ser263Glyfs*33), nedvosmisleno je ukazala na potencijal svih varijanti da naruše funkciju translokaze G6PT. U ovoj studiji dalje su detaljno analizirane c.248G>A (p.Gly83Glu) i c.785G>A (p.Gly262Asp ili p.Ser263Glyfs*33) varijante u genu *SLC37A4*, jer su bile detektovane kod više od jedne porodice. Za ove promene urađena je funkcionalna analiza u cilju potvrde njihovog patološkog efekta i boljeg razumevanja fenotipa na osnovu genotipa kod ovih pacijenata.

5.2.1. Funkcionalna analiza varijante c.785G>A (p.Gly262Asp ili p.Ser263Glyfs*33) u genu *SLC37A4*

Genotipizacijom pacijenata obolelih od GSD tip Ib detektovana je nova, neokarakterisana varijanta c.785G>A u genu *SLC37A4* kod 4 nesrodna pacijenta iz Srbije. Svi oboleli bili su kombinovani heterozigoti sa već prijavljenim i funkcionalno okarakterisanim varijantama (p.Asn27Lys ili p.Leu348Valfs*53). S obzirom da se ova promena nalazi na mestu prvog nukleotida egzona 5 u genu *SLC37A4*, višestruki predikcioni alati ukazali su na postojanje potencijalnog dvojnog patogenog efekta ove promene.

Ispitan je uticaj ove varijante na alternativno splajsovanje gena *SLC37A4* i rezultati RT-PCR analize ukazali su da varijanta c.785G>A dovodi do preskakanja egzona 5 i sinteze kraćeg transkripta (pogavlje 4.2.1., Slika 34). Izolacijom pojedinačnih traka sa gela i njihovim sekvenciranjem dokazano je postojanje transkripta r.785_870del86 kod pacijenta obolelog od GSD tip Ib (pogavlje 4.2.1., Slika 35). Ovakav rezultat ide u prilog *in silico* prediktivnom modelu u kome je pokazano da varijanta c.785G>A formira prigušivač mesta splajsovanja egzona (ESS), koji onemogućava korišćenje ovog mesta splajsovanja, što rezultira preskakanjem kompletnog egzona 5 i formiranjem *SLC37A4* iRNK kraće za 86 nt (r.785_870del86).

Budući da je ovaj transkript zabeležen u manjoj meri i u kontrolnom uzorku, urađen je ekspresioni profil gena *SLC37A4* kod GSD tip Ib pacijenata koji su nosioci varijante c.785G>A i kod kontrolnih ispitanika. Ekspresionom analizom pokazano

je da je kod pacijenata koji su heterozigotni nosioci varijante c.785G>A ekspresija alternativnog transkripta povišena za 60-80% u odnosu na kontrolne ispitanike.

U studiji koja se bavila kvantitativnom ekspresijom gena *SLC37A4* i njegovih alternativnih transkripata u različitim humanim tkivima, pokazano je da gen *SLC37A4* ima slab akceptorski kraj egzona 5, koji osim transkripta pune dužine dovodi do sinteze kraćeg transkripta u leukocitima i kod zdravih osoba [Ihara i sar., 2000]. Zbog prisustva varijante c.785G>A kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib, dolazi do alternativnog splajsovanja prilikom obrade primarnog transkripta gena *SLC37A4* i formiranja kraćeg transkripta u znatno većoj meri u odnosu na kontrolne ispitanike. Alternativnim splajsovanjem gena *SLC37A4* menja se okvir čitanja, pri čemu se uvodi prevremeni stop kodon koji najverovatnije pokreće degradaciju *SLC37A4* iRNK posredovanu prevremenim stop kodonom (NMD, eng. *Nonsense-Mediated mRNA Decay*). Međutim, ovaj mehanizam nije podjednako efikasan u svim ćelijskim tipovima, tako da je određena količina transkripta i dalje prisutna u uzorcima [Kervestin i Jacobson, 2012]. Ukoliko ipak dođe do translacije transkripta r.785_870del86 koji se nalazi u tragovima u zdravim kontrolama, a u većoj meri kod GSD tip Ib pacijenata, sintetisaće se skraćeni nefunkcionalni protein G6PT (p.Ser263Glyfs*33), kome nedostaje karboksi-terminalna sekvenca (KKAE) neophodna za zadržavanje translokaze u membrani ER-a [Chen i sar., 2000; 2002; Chou i sar., 2002]. Pokazano je da varijante u C-terminalnom domenu utiču na pravilno savijanje proteina G6PT i na njegovu stabilnost i dovode do degradacije nefunkcionalnog proteina, a samim tim se onemogućava mikrozomalni transport G6P i/ili P_i [Chen i sar., 2000; Chou i Mansfield, 2014].

Za razliku od intronskih varijanti koje menjaju mesta iskrajanja introna, *splice site* varijante u egzonu utičuće na funkciju proteina čak i u slučaju transkripcije iRNK pune dužine. U slučaju da mašinerija za splajsovanje uspe da sintetiše kompletnu *SLC37A4* iRNK, rezultujući protein G6PT bi posedovao nesinonimnu varijantu (p.Gly262Asp) za koju su *in silico* analize takođe predvidele patogenost. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da dualna priroda varijante c.785G>A, koja rezultira sintezom proteina G6PT sa varijantom p.Ser263Glyfs*33 ili eventualno p.Gly262Asp, nedvosmisleno proizvodi patogeni efekat i dovodi do razvoja GSD tip Ib. U saglasnosti sa dokazanom patogenošću varijante *in vitro* je i težina kliničke slike sva 4 pacijenta sa varijantom c.785G>A u genu *SLC37A4* koji su razvili izrazitu hepatomegaliju, tipičan biohemijski profil GSD tip Ib i tešku neutropeniju tokom prvih meseci života (poglavlje 4.1.2.1., Tabela 24).

5.2.2. Funkcionalna analiza nove varijante c.248G>A (p.Gly83Glu) u genu *SLC37A4*

Kod tri nesrodna pacijenta obolelih od GSD tip Ib iz Srbije, identifikovana je još jedna nova varijanta, c.248G>A (p.Gly83Glu) u genu *SLC37A4*. Svi pacijenti sa ovom promenom bili su kombinovani heterozigoti sa prethodno prijavljenim i funkcionalno analiziranim varijantama (p.Asn27Lys ili p.Leu348Valfs*53). Višestruki prediktivni softveri za analizu potencijalnog patogenog efekta aminokiselinske supstitucije, ukazali su da varijanta c.248G>A u genu *SLC37A4* najverovatnije narušava funkciju transportera G6PT i dovodi do razvoja GSD tip Ib.

Upotrebom tehnologije CRISPR/Cas9 i pristupa *knockin* za uvođenje nove, neokarakterisane humane varijante c.248G>A u gen *SLC37A4* ćelijske linije HEK293FlpIn formiran je novi *in vitro* model sistem za funkcionalnu karakterizaciju nove varijante i ispitivanje uloge ove promene u patogenezi GSD tip Ib. Izvršena je optimizacija protokola za precizno editovanje ćelijske linije HEK293FlpIn, koja je podrazumevala sinhronizaciju ćelijskog ciklusa i isporuku optimizovane količine ekspresionog konstrukta. Ovim pristupom ostvarena je efikasnost reparacije homologom rekombinacijom od 13,5%. Analizirano je ukupno 215 monoklonskih ćelijskih linija HEK293FlpIn, među kojima su identifikovane 2 klonalne ćelijske linije sa homozigotnom humanom varijantom c.248G>A u genu *SLC37A4*. Analizom *off-target* regiona precizno editovanih monoklonskih linija, potvrđeno je da nije došlo do nespecifičnog vezivanja sgRNK i uvođenja dvolančanih prekida na neželjenim mestima u genomu ćelijske linije HEK293FlpIn_ *SLC37A4_c.248G>A*.

Da bi se utvrdilo kako nukleotidna zamena c.248G>A u genu *SLC37A4* ostvaruje svoj patogeni efekat, analiziran je ekspresioni profil gena *SLC37A4* u *in vitro* model sistemu za GSD tip Ib. Kvantitativna ekspresiona analiza pokazala je da je nivo ekspresije gena *SLC37A4* u homozigotnom *knockin* klonu gotovo nemerljiv u odnosu na ekspresiju zabeleženu u roditeljskoj ćelijskoj liniji HEK293FlpIn (poglavlje 4.2.4, Slika 40). Ovakav rezultat je neočekivan i pretpostavka je da varijanta c.248G>A u genu *SLC37A4* utiče na stabilnost prekursora *SLC37A4* iRNK. Takođe, moguće je da ova promena detektovana kod GSD tip Ib pacijenata povećava afinitet za vezivanje miRNK i time uzrokuje degradaciju *SLC37A4* iRNK. Različiti bioinformatički alati predvideli su da postoji nekoliko miRNK čiji je target upravo *SLC37A4* iRNK [Bartoloni i Antonarakis, 2004; Zhang i sar., 2014; Kozomara i sar., 2018], međutim još uvek ostaje da se eksperimentalno utvrdi da li miRNK ima uticaj na post-transkripcionu regulaciju ekspresije gena *SLC37A4*. Takođe, u budućim studijama biće urađena detaljnija karakterizacija ćelijske linije HEK293FlpIn_ *SLC37A4_c.248G>A*. Dodatno, funkcionalni nedostatak G6PT prikazivanjem akumulacije triglicerida i/ili glikogena u precizno editovanim ćelijama omogućio bi potvrdu fenotipa GSD tip Ib.

Izrazito snižena ekspresija gena *SLC37A4* u *knockin* ćelijskoj liniji HEK293FlpIn sugerije da humana varijanta c.248G>A narušava stabilnost prekursora *SLC37A4* iRNK, a samim tim i mogućnost transporta G6P-a u lumen ER-a. Takođe, sva 3 pacijenta koji su nosioci ove varijante karakterišu hepatomegalija, usporen rast, biohemijske manifestacije tipične za GSD tip Ib, kao i razvoj neutropenije u ranom uzrastu (poglavlje 4.1.2.1., Tabela 24). Ovi rezultati potvrđuju patogeni efekat varijante c.248G>A u genu *SLC37A4* koja dovodi do razvoja GSD tip Ib.

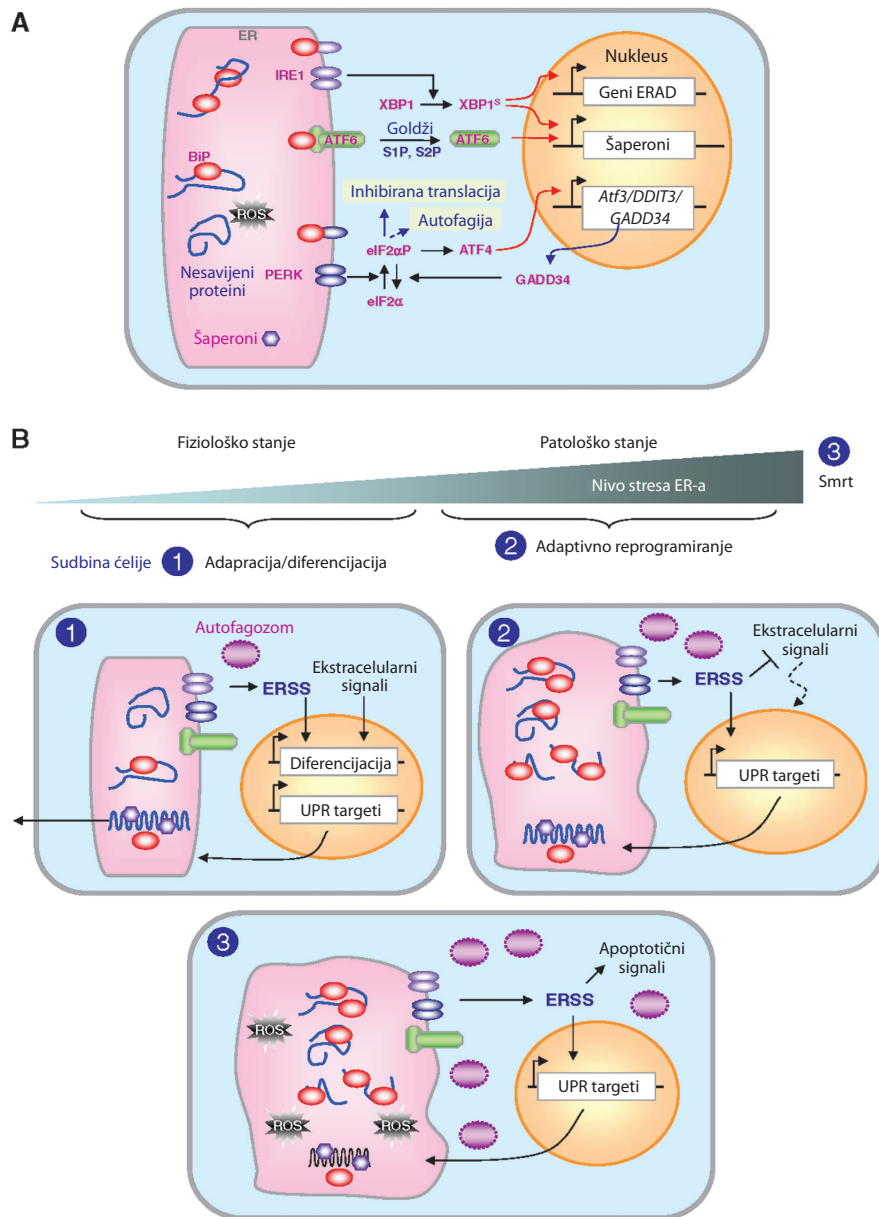
Obe varijante su u sklopu ove studije prijavljene kao patogene u VarSome bazi podataka.

5.3. Stres ER-a i apoptoza u GSD tip Ib *in vitro* model sistemu

Nakon uspostavljanja adekvatnog *in vitro* modela sistema za GSD tip Ib kod kog je potvrđen izostanak ekspresije gena *SLC37A4*, bilo je moguće ispitati da li su transport i hidroliza G6P-a u lumenu ER-a neophodni za održavanje homeostaze glukoze i normalne funkcije bubrežnih ćelija. Stoga, treći deo ove studije bavio se pitanjem da li dolazi do razvoja hroničnog stresa ER-a u precizno editovanoj ćelijskoj liniji HEK293FlpIn sa homozigotnom, humanom, patogenom varijantom c.248G>A u genu *SLC37A4* odnosno u novom model sistemu sa nultom ekspresijom G6PT. Takođe, cilj ovog dela studije bio je ispitati da li je hronični stres ER-a, bar delimično, povezan sa dugoročnim renalnim komplikacijama kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib.

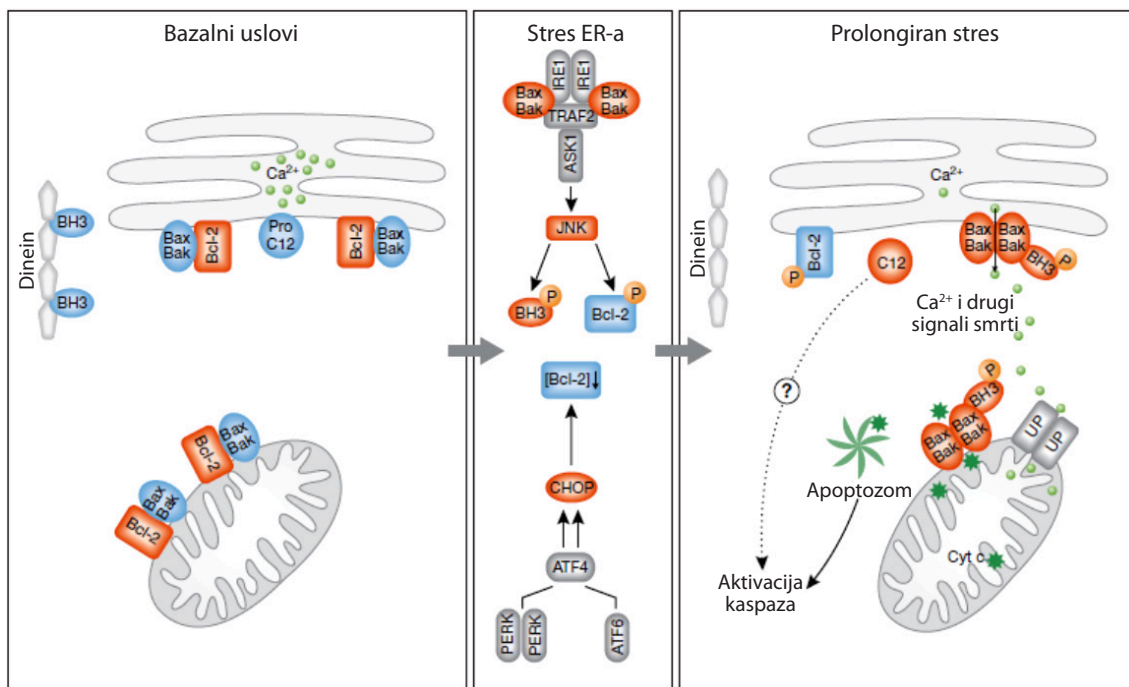
Termin stres ER-a se definiše kao bilo koja promena koja negativno utiče na pravilno savijanje proteina ili funkciju ER-a. Pored toga što je ER mesto sinteze proteina, ova organela učestvuje u metabolizmu lipida, sintezi oligosaharida, skladištenju kalcijuma, a u ćelijama jetre, bubrega, creva i pluća vrši detoksikaciju mnogih štetnih materija [Kaufman, 2002; Marciniak i Ron, 2006]. Prema tome, izloženost različitim farmakološkim agensima, virusnim infekcijama, kao i postojanje genetičkih varijanti u ER šaperonima, dovodi do razvoja stresa ER-a koji se ogleda u aktivaciji UPR senzora [Oslowski i Urano, 2011; Ozcan i Tabas, 2012; Gomez i Rutkowski, 2016]. Takođe, UPR odgovor može biti pokrenut usled poremećaja metaboličke homeostaze i neravnotežne koncentracije glukoze u krvi [Kaufman, 2002], što su glavne biohemijske manifestacije GSD tip Ib. Aktivacija UPR senzora (PERK, IRE1 i ATF6) i drugih signalnih puteva kao što su JNK i nishodni regulatori transkripcije XBP1s, ATF4 i CHOP, imaju za cilj da povrate homeostazu ER-a, ali takođe mogu da indukuju i ćelijsku smrt [Szegezdi i sar., 2006] (Slika 45). Za razliku od akutnog i teškog stresa koji za vrlo kratko vreme može da dovede do apoptoze, hronični stres će verovatno rezultirati ne u iniciranju programirane ćelijske smrti (bar ne svih ćelija), već u stalnom opterećenju funkcije ER-a i prilagođavanjem stanju hroničnog stresa. U ovom kontekstu, čak iako neke ćelije ipak aktiviraju apoptozu, većina će se adaptirati i preživeti [Rutkowski i Kaufman, 2007]. U literaturi postoji podatak da je hronični stres povezan sa inhibicijom UPR-zavisnih transkripcionih puteva [Rutkowski i sar., 2006; Gomez i Rutkowski, 2016], što korespondira sa rezultatima naše studije i implicira da su svi UPR targeti suprimirani u stanjima hroničnog stresa. Analizom ekspresije molekularnih markera UPR odgovora u *knockin* monoklonalnim linijama HEK293FlpIn u kojima izostaje ekspresija gena *SLC37A4*, detektovane su značajno snižene ekspresije gena *ATR4*, *HSPA5* i *DDIT3* u heterozigotnim i homozigotnim HDR ćelijskim klonovima u poređenju sa *wt* ćelijskom linijom. Takođe, detektovana je statistički beznačajno povišena ekspresija regulatora transkripcije *XBP1s* u *knockin* klonovima. Ovi ekspresioni profili heterozigotnih i homozigotnih ćelijskih linija

HEK293FlpIn_SLC37A4_c.248G>A ukazuju da je UPR-zavisna transkripciona regulacija suprimirana tokom stanja hroničnog stresa uzrokovanog disfunkcijom G6PT.



Slika 45. Šematski prikaz stresa ER-a i adaptacije ćelija na različite nivoe stresa. (A) Pogrešno savijeni proteini akumulirani u ER-u dovode do disocijacije proteina BiP sa tri glavna ER senzora stresa (ERSS) PERK, IRE1, ATF6, što inicira aktivaciju nishodnih signalnih puteva za ponovno uspostavljanje homeostaze ER-a. (B) Ishod ćelijskog odgovora može biti različit u zavrsnosti od težine i dužine trajanja stresa ER-a. 1) Fiziološki stres ER-a tokom razvoja je blag i kontrolisan. Čelija može da se oporavi ili adaptira na stres. Takođe, može da se diferencira u specijalizovani tip ćelija na način koji zavisi od komponenti ERSS i odgovarajućih razvojnih signala. (2) U teškom patološkom stresu ER-a, ERSS je inicijalno adaptivni odgovor, međutim, prolongiranje stresa, zbog kontinuirane i/ili ciklične ekspresije deficijentnog proteina, može dovesti do interferencije sa razvojnim signalima i poremećajem ekspresije ERSS i disfunkcije ćelija nastale kao posledica izmenjene proliferacije i diferencijacije ćelija. (3) U uslovima ekstremnog stresa, aktivira se apoptotički signal koji postaje dominantan, što dovodi do smrti ćelija. Preuzeto i modifikovano iz [Tsang i sar., 2010].

Za vreme teškog ili prolongiranog stresa ER-a, signalizacija kroz bazalne UPR grane, PERK, IRE1 i ATF6 takođe može da dovede i do ćelijske smrti. Međutim, oni ne izazivaju apoptozu direktno, već iniciraju aktivaciju nishodnih molekula kao što su CHOP ili JNK, koji dalje guraju ćelije u smrt preko Bcl-2 familije proteina, koja igra važnu ulogu u regulaciji apoptoze [Szegezdi i sar., 2006]. Dok neki članovi porodice Bcl-2 antagonizuju ćelijsku smrt, drugi pokazuju proapoptotičke aktivnosti. Bax i Bak su glavni proapoptotički članovi porodice Bcl-2 koji se ekspimiraju u različitim tkivima. Nalaze se u citoplazmi ili u spoljašnjoj membrani mitohondrija [Hsu i sar., 1997], a pokazano je njihovo prisustvo i u membrani ER-a [Zong i sar., 2003]. Stres ER-a indukuje konformacione promene i oligomerizaciju Bax i na membranama mitohondrija i ER-a, što sugeriše da Bax može da izazove ER-posredovanu apoptozu kao odgovor na apoptotske stimulse [Zong i sar., 2003] (Slika 46). Važna karakteristika proteina Bcl-2 je njegova sposobnost da formira heterodimere sa proteinom Bax, i na taj način neutrališe njegov proapoptotički efekat. Relativni odnos i ravnoteža između pro- i anti-apoptotičkih homodimera i heterodimera smatra se ćelijskim reostatom koji određuje preživljavanje ili smrt ćelija nakon apoptotskog stimulusa [Antonsson, 2001]. Štaviše, pokazano je da su nivoi ekspresije Bax u neutrofilima G6PT^{-/-} miševa bili značajno povišeni u poređenju sa kontrolnim uzorcima [Kim i sar., 2008].



Slika 46. Uloga familije proteina Bcl-2 u bazalnim i uslovima prolongiranog stresa ER-a. U uslovima mirovanja, pro-apoptotički Bax i Bak ostaju neaktivni interakcijom sa Bcl-2 na membranama mitohondrija i ER-a. Prolongiran stres ER-a dovodi do aktivacije JNK i indukcije proteina CHOP, koji eliminišu anti-apoptotički efekat Bcl-2. Preuzeto i modifikovano iz [Szegezdi i sar., 2006].

U ovoj studiji, detektovan je povišen nivo *BAX* iRNK u HEK293FlpIn_*SLC37A4* deficijentnoj ćelijskoj liniji u poređenju sa *wt* ćelijskom linijom HEK293FlpIn. Takođe, zabeležen je snižen odnos *BCL2/BAX* u ćelijskom klonu u kome nema ekspresije G6PT transportera. Dodatno, MTT test pokazao je značajno smanjenu vijabilnost i proliferaciju u homozigotnom klonu, što sugerije da hronični stres uzrokovan nedostatkom G6PT u ćelijskoj liniji HEK293FlpIn_*SLC37A4_c.248G>A* dovodi do iniciranja programirane ćelijske smrti. Apoptotska funkcija Bcl-2 porodice regulisana je na više nivoa - na nivou transkripcije gena, fosforilacije i proteolize nekih članova porodice Bcl-2 (Bad i Bid), i njihovom translokacijom iz citosola u membrane mitohondrija [Burlacu, 2003]. Stoga, analizirajući nivoe ekspresije *BCL2* i *BAX* mRNA delimično je moguće razumeti mehanizam ER-posredovane apoptoze.

Sveukupno gledano, naši rezultati ukazuju da je humana varijanta *c.248G>A* u genu *SLC37A4* u ćelijskoj liniji HEK293FlpIn odgovorna za razvoj hroničnog stresa ER-a i povišenu apoptozu, što dodatno potvrđuje njen patogeni efekat. Dobijeni rezultati ukazuju na inhibiciju signalnih UPR grana PERK (snižena ekspresija gena *ATF4* i *DDIT3*) i ATF6 (snižena ekspresija gena *HSPA5*) i aktivaciju senzora IRE1 (povišena ekspresija gena *XBP1s*, iako nije statistički značajna), a time verovatno aktivaciju JNK i nishodnog pro-apoptotskog signala. Ćelije reaguju na hronični metabolički stres inhibiranjem UPR signalnih puteva koji dovode do adaptacije i preživljavanja. Međutim, postojanje hroničnog stresa ER-a koji ćelije nisu u stanju da prevaziđu, dovodi do narušavanja proliferacije i vijabilnosti bubrežnih ćelija koja rezultira povišenom apoptozom, čime se bar delimično može objasniti poremećaj funkcije bubrega kod osoba obolelih od GSD tip Ib. Precizan mehanizam kojim se narušava balans između adaptacije ćelija na postojanje hroničnog metaboličkog stresa uzrokovanog disfunkcijom G6PT i apoptoze ostaje da se utvrdi u budućim istraživanjima.

Naši podaci dodatno rasvetljavaju molekularne mehanizme stresa ER-a, UPR i apoptoze i njihove povezanosti sa bubrežnim komplikacijama kod pacijenata sa GSD tip Ib. Štaviše, novi *in vitro* GSD tip Ib model sistem bi mogao biti koristan za proučavanje patogeneze bolesti i potencijalnih targeta za molekularnu terapiju dizajniranu da koriguje metaboličke abnormalnosti povezane sa disfunkcijom bubrega kod GSD tip Ib pacijenata.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata moguće je izvesti sledeće zaključke:

1. Sveobuhvatnom molekularno-genetičkom analizom 41 pacijenata suspektih na hepatične GSD iz Srbije, postignuta je 100 % uspešnost detekcije patogenih varijanti, postavljena precizna dijagnoza kod svih ispitanika, čime je omogućena rana primena odgovarajuće terapije specifične za genotip pacijenta. Takođe, formirana je prva biobanka GSD u Srbiji sa uzorcima poznatog genomskog profila koja predstavlja osnovu za buduća istraživanja GSD u Srbiji.
2. Prikazan je genomski profil ukupno 41 pacijenata, od kojih je 5 obolelo od GSD tip Ia, 31 od GSD tip Ib, po jedan pacijent od GSD tip III, tip VI i tip IXa. Kod dva pacijenta koji su bili suspekti na GSD, upotrebom NGS tehnologije utvrđeno je da ne postoji genetički defekt u genima uzročnicima GSD i istovremeno su identifikovane patogene varijante u genima uzročnicima za bolest nakupljanja holesterol estara i *Shwachman-Bodian-Diamond* sindrom.
3. Na osnovu zastupljenosti određenih tipova GSD u analiziranoj populaciji, kao i spektra i učestalosti varijanti u pojedinim genima, konstruisan je optimalan algoritam koji omogućava brzu, laku i pristupačnu detekciju varijanti u genima uzročnicima GSD. Takođe, ova studija istakla je značajnost upotrebe NGS tehnologije za postavljanje precizne dijagnoze GSD i diferencijalne dijagnoze kod pacijenata sa preklapajućim fenotipovima.
4. Na osnovu epidemioloških podataka pokazano je da u Srbiji postoji najviša incidenca GSD tip Ib do sada zabeležena u svetskim okvirima. Takođe, grupa pacijenata iz Srbije sa GSD tip Ib (ukupno 31) predstavlja najveću nacionalnu kohortu obolelih od ove retke bolesti.
5. Kod pacijenata obolelih od GSD tip Ia u genu *G6PC* detektovane su dve poznate patogene varijante, c.247C>T (p.Arg83Cys) i c.518T>C (p.Leu173Pro). Varijanta c.247C>T (p.Arg83Cys) bila je prisutna na 90 % analiziranih hromozoma GSD tip Ia pacijenata. Ovakav rezultat ukazuje na veću uniformnost genotipa kod ovih pacijenata u Srbiji nego u drugim populacijama.
6. Kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib u genu *SLC37A4* detektovano je sedam različitih varijanti, među kojima su 3 poznate varijante c.81T>A (p.Asn27Lys), c.162C>A (p.Ser54Arg), c.1042_1043delCT (p.Leu348Valfs*53), a 4 varijante su prvi put identifikovane u ovoj studiji c.248G>A (p.Gly83Glu), c.404G>A (p.Gly135Asp), c.571C>T (p.Pro191Ser) i c.785G>A (p.Gly262Asp ili p.Ser263Glyfs*33). Varijanta c.81T>A (p.Asn27Lys) je prva po učestalosti (48,39 %) i najverovatnije predstavlja autohtonu varijantu nastalu na području Srbije.

7. Ilustrovano je odsustvo jasne korelacije genotipa i fenotipa kod pacijenata obolelih od GSD tip Ia iz Srbije, što se poklapa sa rezultatima drugih studija. I u slučaju GSD tip Ib pacijenata, studije na drugim populacijama nisu potvrdile korelaciju genotipa i fenotipa. Međutim, rezultati ove studije nagoveštavaju da novootkrivena varijanta c.785G>A u genu *SLC37A4* predstavlja faktor rizika za ranu pojavu neutropenije.
8. Bioinformatički softveri za predviđanje potencijalnog patogenog efekta varijanti nedvosmisleno su ukazali da sve novootkrivene promene detektovane u genu *SLC37A4* narušavaju funkciju translokaze G6PT i onemogućavaju mikrozomalni transport G6P i P_i . Takođe, pokazano je da su aminokiseline Gly-83, Gly-135, Pro-191 i Gly-262 u proteinu G6PT visoko konzervirane među ispitivanim organizmima.
9. Višestruka *in silico* analiza, kao i funkcionalna karakterizacija varijante c.785G>A u genu *SLC37A4*, potvrdile su da ova promena kreira novi prigušivač mesta splajsovanja egzona što dovodi do transkripcije *SLC37A4* iRNK kraće za 86 nt (r.785_870del86). Translacijom ovog transkripta sintetiše se nefunkcionalni protein G6PT (p.Ser263Glyfs*33), kome nedostaje karboksi-terminalna sekvenca (KKAE) neophodna za zadržavanje translokaze u membrani ER-a. U slučaju da mašinerija za splajsovanje uspe da sintetiše *SLC37A4* iRNK pune dužine, rezultujući protein G6PT bi posedovao patogenu nesinonimnu varijantu p.Gly262Asp. Rezultati funkcionalne analize, kao i klinički podaci pacijenata, potvrđuju da je varijanta c.785G>A u genu *SLC37A4* patogena promena koja dovodi do razvoja GSD tip Ib.
10. Optimizovan je protokol za precizno editovanje genoma upotrebom tehnologije CRISPR/Cas9. Pristupom *knockin* uvedena je novootkrivena humana varijanta c.248G>A u gen *SLC37A4* bubrežne ćelijske linije HEK293FlpIn koja je upotrebljena za funkcionalnu karakterizaciju ove varijante i ispitivanje njene uloge u patogenezi GSD tip Ib. Ostvarena je efikasnost reparacije homologom rekombinacijom od 13,5%. Analizom *off-target* regiona potvrđeno je da nije došlo uvođenja dvolančanih prekida na neželjenim mestima u genomu ćelijske linije HEK293FlpIn_ *SLC37A4*_c.248G>A.
11. Zabeleženo je odsustvo ekspresije gena *SLC37A4* u ćelijskoj liniji HEK293FlpIn koja je homozigotni nosilac humane varijante c.248G>A u genu *SLC37A4*, što sugeriše da ova promena narušava stabilnost prekursora *SLC37A4* iRNK i rezultuje njenom degradacijom, a samim tim i onemogućava transport G6P-a u lumen ER-a. Rezultati funkcionalne analize, kao i klinički podaci, potvrđuju

- patogeni efekat varijante c.248G>A u genu *SLC37A4* čime je dokazano da ova promena dovodi do razvoja GSD tip Ib.
12. Formirna bubrežna ćelijska linija HEK293FlpIn_*SLC37A4_c.248G>A* koja se karakteriše odsustvom ekspresije gena *SLC37A4* je pogodan novi *in vitro* model sistem za GSD tip Ib.
 13. U novom *in vitro* model sistemu za GSD tip Ib, HEK293FlpIn_*SLC37A4_c.248G>A*, ispitan je efekat disfunkcije G6PT na razvoj hroničnog stresa ER-a i indukcije apoptoze. Dobijeni rezultati ukazuju na inhibiciju signalnih UPR grana PERK (snižena ekspresija gena *ATF4* i *DDIT3*) i ATF6 (snižena ekspresija gena *HSPA5*) i aktivaciju senzora IRE1 (povišena ekspresija gena *XBP1s*, iako nije statistički značajna) i posledičnu aktivaciju nishodnih pro-apoptotskih puteva (povišena ekspresija gena *BAX*, snižen odnos *BCL2/BAX*). Dodatno, MTT testom je pokazana značajno smanjena vijabilnost i proliferacija homozigotnog klona. Dobijeni rezultati pokazuju da je humana varijanta c.248G>A u genu *SLC37A4* u ćelijskoj liniji HEK293FlpIn odgovorna za razvoj hroničnog stresa ER-a, poremećene proliferacije i povišene apoptoze, što dodatno potvrđuje njen patogeni efekat i delimično objašnjava poremećaj funkcije bubrega kod osoba obolelih od GSD tip Ib.
 14. Novi *in vitro* GSD tip Ib model sistem bi mogao biti koristan za dalje proučavanje patogeneze bolesti, kao i potencijalnih targeta za molekularnu terapiju dizajniranu da koriguje metaboličke abnormalnosti povezane sa disfunkcijom bubrega kod pacijenata obolelih od GSD tip Ib.

7. LITERATURA

1. Adessi C, Matton G, Ayala G, Turcatti G, Mermod JJ, Mayer P, i sar. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic acids research*. 2000;28(20):E87.
2. Adeva-Andany MM, Gonzalez-Lucan M, Donapetry-Garcia C, Fernandez-Fernandez C, Ameneiros-Rodriguez E. Glycogen metabolism in humans. *BBA clinical*. 2016;5:85-100.
3. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, i sar. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods*. 2010;7(4):248-9.
4. Anderson MW, Schrijver I. Next generation DNA sequencing and the future of genomic medicine. *Genes*. 2010;1(1):38-69.
5. Andjelkovic M, Minic P, Vreca M, Stojiljkovic M, Skakic A, Sovtic A, i sar. Genomic profiling supports the diagnosis of primary ciliary dyskinesia and reveals novel candidate genes and genetic variants. *PloS one*. 2018;13(10):e0205422.
6. Annabi B, Hiraiwa H, Mansfield BC, Lei KJ, Ubagai T, Polymeropoulos MH, i sar. The gene for glycogen-storage disease type 1b maps to chromosome 11q23. *American journal of human genetics*. 1998;62(2):400-5.
7. Antonsson B. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell and tissue research*. 2001;306(3):347-61.
8. Arion WJ, Ballas LM, Lange AJ, Wallin BK. Microsomal membrane permeability and the hepatic glucose-6-phosphatase system. Interactions of the system with D-mannose 6-phosphate and D-mannose. *Journal of Biological Chemistry*. 1976;251(16):4901-7.
9. Arion WJ, Lange AJ, Walls HE, Ballas LM. Evidence for the participation of independent translocation for phosphate and glucose 6-phosphate in the microsomal glucose-6-phosphatase system. Interactions of the system with orthophosphate, inorganic pyrophosphate, and carbamyl phosphate. *Journal of Biological Chemistry*. 1980;255(21):10396-406.
10. Arion WJ, Wallin BK, Carlson PW, Lange AJ. The Specificity of Glucose 6-Phosphatase of Intact Liver Microsomes. *Journal of Biological Chemistry*. 1972;247(8):2558-65.
11. Arnoux JB, Verkarre V, Saint-Martin C, Montravers F, Brassier A, Valayannopoulos V, i sar. Congenital hyperinsulinism: current trends in diagnosis and therapy. *Orphanet journal of rare diseases*. 2011;6:63.
12. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*. 2005;5(2):209-19.
13. Austin KM, Leary RJ, Shimamura A. The Shwachman-Diamond SBDS protein localizes to the nucleolus. *Blood*. 2005;106(4):1253-8.
14. Austin SL, El-Gharbawy AH, Kasturi VG, James A, Kishnani PS. Menorrhagia in patients with type I glycogen storage disease. *Obstetrics and gynecology*. 2013;122(6):1246-54.
15. Bali DS, Chen Y-T, Austin S, Goldstein JL. Glycogen Storage Disease Type I. In: MP A, HH A, RA P, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2016.

16. Baluchamy S, Sankar N, Navaraj A, Moran E, Thimmapaya B. Relationship between E1A binding to cellular proteins, c-myc activation and S-phase induction. *Oncogene*. 2007;26(5):781-7.
17. Banka S, Newman WG. A clinical and molecular review of ubiquitous glucose-6-phosphatase deficiency caused by G6PC3 mutations. *Orphanet journal of rare diseases*. 2013;8:84.
18. Banugaria SG, Austin SL, Boney A, Weber TJ, Kishnani PS. Hypovitaminosis D in glycogen storage disease type I. *Molecular genetics and metabolism*. 2010;99(4):434-7.
19. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science (New York, NY)*. 2007;315(5819):1709-12.
20. Bartoloni L, Antonarakis SE. The human sugar-phosphate/phosphate exchanger family SLC37. *Pflügers Archiv: European journal of physiology*. 2004;447(5):780-3.
21. Beauchamp NJ, Taybert J, Champion MP, Layet V, Heinz-Erian P, Dalton A, et al. High frequency of missense mutations in glycogen storage disease type VI. *Journal of inherited metabolic disease*. 2007;30(5):722-34.
22. Betts MJ, Russell RB. Amino-Acid Properties and Consequences of Substitutions. In: Barnes MR, editor. *Bioinformatics for Geneticists*. Second ed: John Wiley & Sons, Ltd; 2007. p. 1-16.
23. Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual review of genetics*. 2011;45:273-97.
24. Boztug K, Appaswamy G, Ashikov A, Schaffer AA, Salzer U, Diestelhorst J, et al. A syndrome with congenital neutropenia and mutations in G6PC3. *The New England journal of medicine*. 2009;360(1):32-43.
25. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2003;7(3):249-57.
26. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*. 2009;55(4):611-22.
27. Carr J, Williams D, Hayden R. Molecular Detection of Multiple Respiratory Viruses. In: Wayne W. Grody, Robert M. Nakamura, Charles M. Strom, Frederick L. Kiechle, editors. *Molecular Diagnostics*. St. Jude Children's Research Hospital, Memphis: Academic Press; 2010. p. 289-300.
28. Chen F, Pruett-Miller SM, Huang Y, Gjoka M, Duda K, Taunton J, et al. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nature methods*. 2011;8(9):753-5.
29. Chen LY, Lin B, Pan CJ, Hiraiwa H, Chou JY. Structural requirements for the stability and microsomal transport activity of the human glucose 6-phosphate transporter. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(44):34280-6.
30. Chen LY, Pan CJ, Shieh JJ, Chou JY. Structure-function analysis of the glucose-6-phosphate transporter deficient in glycogen storage disease type Ib. *Human molecular genetics*. 2002;11(25):3199-207.

31. Chen MA, Weinstein DA. Glycogen storage diseases: Diagnosis, treatment and outcome. *Translational Science of Rare Diseases* 2016;1(1):45-72.
32. Chen SY, Pan CJ, Lee S, Peng W, Chou JY. Functional analysis of mutations in the glucose-6-phosphate transporter that cause glycogen storage disease type Ib. *Molecular genetics and metabolism*. 2008a;95(4):220-3.
33. Chen SY, Pan CJ, Nandigama K, Mansfield BC, Ambudkar SV, Chou JY. The glucose-6-phosphate transporter is a phosphate-linked antiporter deficient in glycogen storage disease type Ib and Ic. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008b;22(7):2206-13.
34. Chen YT, Kishnani PS. Glycogen Storage Diseases and Other Inherited Disorders of Carbohydrate Metabolism. In: Casper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL, Loscalzo J, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19th ed. New York: McGraw Hill Education; 1998.
35. Chen YT, Kishnani PS, Koeberl D. Glycogen Storage Diseases. In: Valle D, Beaudet AL, Vogelstein B, Kinzler KW, Antonarakis SE, Ballabio A, editors. *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease: The McGraw-Hill Companies*; 2006.
36. Cheung YY, Kim SY, Yiu WH, Pan CJ, Jun HS, Ruef RA, i sar. Impaired neutrophil activity and increased susceptibility to bacterial infection in mice lacking glucose-6-phosphatase-beta. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(3):784-93.
37. Chevalier-Porst F, Bozon D, Bonardot AM, Bruni N, Mithieux G, Mathieu M, i sar. Mutation analysis in 24 French patients with glycogen storage disease type 1a. *Journal of medical genetics*. 1996;33(5):358-60.
38. Choi R, Park HD, Ko JM, Lee J, Lee DH, Hong SJ, i sar. Novel SLC37A4 Mutations in Korean Patients With Glycogen Storage Disease Ib. *Annals of laboratory medicine*. 2017;37(3):261-6.
39. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2015;31(16):2745-7.
40. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
41. Chou JY. The molecular basis of type 1 glycogen storage diseases. *Current molecular medicine*. 2001;1(1):25-44.
42. Chou JY, Cho JH, Kim GY, Mansfield BC. Molecular biology and gene therapy for glycogen storage disease type Ib. *Journal of inherited metabolic disease*. 2018;41(6):1007-14.
43. Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. Glycogen storage disease type I and G6Pase-beta deficiency: etiology and therapy. *Nature reviews Endocrinology*. 2010a;6(12):676-88.
44. Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. Neutropenia in type Ib glycogen storage disease. *Current opinion in hematology*. 2010b;17(1):36-42.

45. Chou JY, Jun HS, Mansfield BC. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase/glucose-6-phosphate transporter complexes. *Journal of inherited metabolic disease*. 2015;38(3):511-9.
46. Chou JY, Kim GY, Cho JH. Recent development and gene therapy for glycogen storage disease type Ia. *Liver research*. 2017;1(3):174-80.
47. Chou JY, Mansfield BC. Gene therapy for type I glycogen storage diseases. *Current gene therapy*. 2007;7(2):79-88.
48. Chou JY, Mansfield BC. Mutations in the glucose-6-phosphatase-alpha (G6PC) gene that cause type Ia glycogen storage disease. *Human mutation*. 2008;29(7):921-30.
49. Chou JY, Mansfield BC. Recombinant AAV-directed gene therapy for type I glycogen storage diseases. *Expert opinion on biological therapy*. 2011;11(8):1011-24.
50. Chou JY, Mansfield BC. The SLC37 family of sugar-phosphate/phosphate exchangers. *Current topics in membranes*. 2014;73:357-82.
51. Chou JY, Matern D, Mansfield BC, Chen YT. Type I glycogen storage diseases: disorders of the glucose-6-phosphatase complex. *Current molecular medicine*. 2002;2(2):121-43.
52. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, NY)*. 2013;339(6121):819-23.
53. Cori GT, Cori CF. Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *The Journal of biological chemistry*. 1952;199(2):661-7.
54. Davis MK, Valentine JF, Weinstein DA, Polyak S. Antibodies to CBir1 are associated with glycogen storage disease type Ib. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2010;51(1):14-8.
55. Delano WL. The PyMOL Molecular Graphics System 2002 [Available from: <http://www.pymol.org>].
56. Di Resta C, Galbiati S, Carrera P, Ferrari M. Next-generation sequencing approach for the diagnosis of human diseases: open challenges and new opportunities. *Ejifcc*. 2018;29(1):4-14.
57. Dieckgraefe BK, Korzenik JR, Husain A, Dieruf L. Association of glycogen storage disease 1b and Crohn disease: results of a North American survey. *European journal of pediatrics*. 2002;161 Suppl 1:S88-92.
58. Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Mahlaoui N, Chantelot CB. Congenital neutropenia: diagnosis, molecular bases and patient management. *Orphanet journal of rare diseases*. 2011;6:26.
59. Farah BL, Landau DJ, Wu Y, Sinha RA, Loh A, Bay BH, et al. Renal endoplasmic reticulum stress is coupled to impaired autophagy in a mouse model of GSD Ia. *Molecular genetics and metabolism*. 2017;122(3):95-8.
60. Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic acids research*. 2006;34(3):e22.

61. Fernandes J, Smit GPA. The Glycogen Storage Diseases and Related Disorders. In: Fernandes J, Saudubray JM, Van den Berghe G, editors. *Inborn Metabolic Diseases*. 4th ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2000. p. 101-20.
62. Floros KV, Thomadaki H, Florou D, Talieri M, Scorilas A. Alterations in mRNA expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, FAS, caspase-3, and the novel member BCL2L12 after treatment of human leukemic cell line HL60 with the antineoplastic agent etoposide. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1090:89-97.
63. Franco LM, Krishnamurthy V, Bali D, Weinstein DA, Arn P, Clary B, i sar. Hepatocellular carcinoma in glycogen storage disease type Ia: a case series. *Journal of inherited metabolic disease*. 2005;28(2):153-62.
64. Galli L, Orrico A, Marcolongo P, Fulceri R, Burchell A, Melis D, i sar. Mutations in the glucose-6-phosphate transporter (G6PT) gene in patients with glycogen storage diseases type 1b and 1c. *FEBS letters*. 1999;459(2):255-8.
65. Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, i sar. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010;468(7320):67-71.
66. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(39):E2579-86.
67. Gerin I, Veiga-da-Cunha M, Achouri Y, Collet JF, Van Schaftingen E. Sequence of a putative glucose 6-phosphate translocase, mutated in glycogen storage disease type Ib. *FEBS letters*. 1997;419(2-3):235-8.
68. Gerin I, Veiga-da-Cunha M, Noel G, Van Schaftingen E. Structure of the gene mutated in glycogen storage disease type Ib. *Gene*. 1999;227(2):189-95.
69. Ghosh A, Shieh JJ, Pan CJ, Chou JY. Histidine 167 is the phosphate acceptor in glucose-6-phosphatase-beta forming a phosphohistidine enzyme intermediate during catalysis. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(13):12479-83.
70. Ghosh A, Shieh JJ, Pan CJ, Sun MS, Chou JY. The catalytic center of glucose-6-phosphatase. HIS176 is the nucleophile forming the phosphohistidine-enzyme intermediate during catalysis. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(36):32837-42.
71. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research*. 1996;6(10):995-1001.
72. Gomez JA, Rutkowski DT. Experimental reconstitution of chronic ER stress in the liver reveals feedback suppression of BiP mRNA expression. *eLife*. 2016;5.
73. Guschin DY, Waite AJ, Katibah GE, Miller JC, Holmes MC, Rebar EJ. A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2010;649:247-56.
74. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, i sar. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular cell*. 2003;11(3):619-33.

75. Hemrika W, Renirie R, Dekker HL, Barnett P, Wever R. From phosphatases to vanadium peroxidases: a similar architecture of the active site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(6):2145-9.
76. Hendrickx J, Lee P, Keating JP, Carton D, Sardharwalla IB, Tuchman M, i sar. Complete genomic structure and mutational spectrum of PHKA2 in patients with x-linked liver glycogenosis type I and II. *American journal of human genetics*. 1999;64(6):1541-9.
77. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(2):89-102.
78. Hicks J, Wartchow E, Mierau G. Glycogen storage diseases: a brief review and update on clinical features, genetic abnormalities, pathologic features, and treatment. *Ultrastructural pathology*. 2011;35(5):183-96.
79. Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Moses SW, Chou JY. Inactivation of the glucose 6-phosphate transporter causes glycogen storage disease type 1b. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(9):5532-6.
80. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science (New York, NY)*. 2010;327(5962):167-70.
81. Hsu PD, Zhang F. Dissecting neural function using targeted genome engineering technologies. *ACS chemical neuroscience*. 2012;3(8):603-10.
82. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(8):3668-72.
83. <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>.
84. <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
85. <http://exac.broadinstitute.org/>.
86. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.
87. <http://mutpred.mutdb.org/>.
88. <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>.
89. <http://provean.jcvi.org/>.
90. <http://varnomen.hgvs.org/>.
91. <http://wintervar.wglab.org/>.
92. http://www.fruit-fly.org/seq_tools/splice.html.
93. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/>.
94. <http://www.internationalgenome.org/>.
95. <http://www.ngsl.org.uk>.
96. <http://www.restrictionmapper.org/>.
97. <http://www.umd.be/HSE3/>.
98. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_-042380.pdf.
99. <http://chemistry.tutorvista.com/organic-chemistry/glycogen.html>.

100. <https://decipher.sanger.ac.uk/>.
101. https://en.wikipedia.org/wiki/Electropherogram#/media/File:CE_Basic.jpg.
102. <https://eu.idtdna.com/Primerquest/home/Index>.
103. <https://ghr.nlm.nih.gov>.
104. <https://pymol.org/2/>.
105. <https://slideplayer.com/slide/961037/>.
106. <https://support.illumina.com/>.
107. <https://varsome.com/>.
108. <https://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna2aa.cgi>.
109. <https://www.addgene.org/62988/>.
110. <https://www.addgene.org/crispr/guide/#ko-generation>.
111. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.
112. <https://www.encodeproject.org/>.
113. <https://www.ensembl.org/>.
114. <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/qpcr-assay-design>.
115. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.
116. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.
117. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
118. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
119. <https://www.uniprot.org/>.
120. <https://zlab.bio/guide-design-resources>.
121. Hyndman DL, Mitsuhashi M. PCR primer design. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2003;226:81-8.
122. Ihara K, Nomura A, Hikino S, Takada H, Hara T. Quantitative analysis of glucose-6-phosphate translocase gene expression in various human tissues and haematopoietic progenitor cells. *Journal of inherited metabolic disease*. 2000;23(6):583-92.
123. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*. 1987;169(12):5429-33.
124. Janecke AR, Lindner M, Erdel M, Mayatepek E, Moslinger D, Podskarbi T, i sar. Mutation analysis in glycogen storage disease type 1 non-a. *Human genetics*. 2000;107(3):285-9.
125. Janecke AR, Mayatepek E, Utermann G. Molecular genetics of type 1 glycogen storage disease. *Molecular genetics and metabolism*. 2001;73(2):117-25.
126. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, NY)*. 2012;337(6096):816-21.

127. Jun HS, Cheung YY, Lee YM, Mansfield BC, Chou JY. Glucose-6-phosphatase-beta, implicated in a congenital neutropenia syndrome, is essential for macrophage energy homeostasis and functionality. *Blood*. 2012;119(17):4047-55.
128. Jun HS, Lee YM, Cheung YY, McDermott DH, Murphy PM, De Ravin SS, i sar. Lack of glucose recycling between endoplasmic reticulum and cytoplasm underlies cellular dysfunction in glucose-6-phosphatase-beta-deficient neutrophils in a congenital neutropenia syndrome. *Blood*. 2010;116(15):2783-92.
129. Jun HS, Weinstein DA, Lee YM, Mansfield BC, Chou JY. Molecular mechanisms of neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type Ib. *Blood*. 2014;123(18):2843-53.
130. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(10):1389-98.
131. Kecman B, Djordjevic M, Sarajlija A. Principi ishrane dece sa urođenim poremećajima metabolizma ugljenih hidrata. In: Zdravkovic D, Djordjevic M, editors. Problemi u pedijatriji. Beograd: Zavod za udžbenike; 2012. p. 37-50.
132. Kelly PM, Poon FW. Hepatic tumours in glycogen storage disease type 1 (von Gierke's disease). *Clinical radiology*. 2001;56(6):505-8.
133. Kervestin S, Jacobson A. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(11):700-12.
134. Kido J, Nakamura K, Matsumoto S, Mitsubuchi H, Ohura T, Shigematsu Y, i sar. Current status of hepatic glycogen storage disease in Japan: clinical manifestations, treatments and long-term outcomes. *J Hum Genet*. 2013;58(5):285-92.
135. Kikuchi M, Hasegawa K, Handa I, Watabe M, Narisawa K, Tada K. Chronic pancreatitis in a child with glycogen storage disease type 1. *European journal of pediatrics*. 1991;150(12):852-3.
136. Kilimann MW, Oldfors A. Glycogen pathways in disease: new developments in a classical field of medical genetics. *Journal of inherited metabolic disease*. 2015;38(3):483-7.
137. Kim GY, Lee YM, Kwon JH, Cho JH, Pan CJ, Starost MF, i sar. Glycogen storage disease type Ia mice with less than 2% of normal hepatic glucose-6-phosphatase-alpha activity restored are at risk of developing hepatic tumors. *Molecular genetics and metabolism*. 2017;120(3):229-34.
138. Kim SY, Jun HS, Mead PA, Mansfield BC, Chou JY. Neutrophil stress and apoptosis underlie myeloid dysfunction in glycogen storage disease type Ib. *Blood*. 2008;111(12):5704-11.
139. Kishnani PS, Austin SL, Abdenur JE, Arn P, Bali DS, Boney A, i sar. Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*. 2014;16(11):e1.
140. Klima H, Ullrich K, Aslanidis C, Fehringer P, Lackner KJ, Schmitz G. A splice junction mutation causes deletion of a 72-base exon from the mRNA for lysosomal acid lipase in a patient with cholesteryl ester storage disease. *The Journal of clinical investigation*. 1993;92(6):2713-8.

141. Koeberl DD, Kishnani PS, Bali D, Chen YT. Emerging therapies for glycogen storage disease type I. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2009;20(5):252-8.
142. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, i sar. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2018:bty897-bty.
143. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*. 2018;47(D1):D155-D62.
144. Kudo M. Hepatocellular adenoma in type Ia glycogen storage disease. *Journal of gastroenterology*. 2001;36(1):65-6.
145. Kuijpers TW, Maianski NA, Tool AT, Smit GP, Rake JP, Roos D, i sar. Apoptotic neutrophils in the circulation of patients with glycogen storage disease type 1b (GSD1b). *Blood*. 2003;101(12):5021-4.
146. Kure S, Hou DC, Suzuki Y, Yamagishi A, Hiratsuka M, Fukuda T, i sar. Glycogen storage disease type Ib without neutropenia. *The Journal of pediatrics*. 2000;137(2):253-6.
147. Kwon JH, Lee YM, Cho JH, Kim GY, Anduaga J, Starost MF, i sar. Liver-directed gene therapy for murine glycogen storage disease type Ib. *Human molecular genetics*. 2017;26(22):4395-405.
148. Labrune P. Glycogen storage disease type I: indications for liver and/or kidney transplantation. *European journal of pediatrics*. 2002;161 Suppl 1:S53-5.
149. Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda, Md)*. 2007;22:193-201.
150. Lange AJ, Arion WJ, Beaudet AL. Type Ib glycogen storage disease is caused by a defect in the glucose-6-phosphate translocase of the microsomal glucose-6-phosphatase system. *The Journal of biological chemistry*. 1980;255(18):8381-4.
151. Lee YM, Conlon TJ, Specht A, Coleman KE, Brown LM, Estrella AM, i sar. Long-term safety and efficacy of AAV gene therapy in the canine model of glycogen storage disease type Ia. 2018;41(6):977-84.
152. Lee YM, Kim GY, Pan CJ, Mansfield BC, Chou JY. Minimal hepatic glucose-6-phosphatase- α activity required to sustain survival and prevent hepatocellular adenoma formation in murine glycogen storage disease type Ia. *Molecular genetics and metabolism reports*. 2015;3:28-32.
153. Lei KJ, Chen H, Pan CJ, Ward JM, Mosinger B, Jr., Lee EJ, i sar. Glucose-6-phosphatase dependent substrate transport in the glycogen storage disease type-1a mouse. *Nature genetics*. 1996;13(2):203-9.
154. Lei KJ, Chen YT, Chen H, Wong LJ, Liu JL, McConkie-Rosell A, i sar. Genetic basis of glycogen storage disease type 1a: prevalent mutations at the glucose-6-phosphatase locus. *American journal of human genetics*. 1995;57(4):766-71.
155. Lei KJ, Pan CJ, Shelly LL, Liu JL, Chou JY. Identification of mutations in the gene for glucose-6-phosphatase, the enzyme deficient in glycogen storage disease type 1a. *The Journal of clinical investigation*. 1994;93(5):1994-9.
156. Lei KJ, Shelly LL, Pan CJ, Sidbury JB, Chou JY. Mutations in the glucose-6-phosphatase gene that cause glycogen storage disease type 1a. *Science (New York, NY)*. 1993;262(5133):580-3.

157. Li DZ, Liao C, Tang XW. Prenatal diagnosis of glycogen storage disease type Ia, presenting a new mutation in the glucose-6-phosphatase gene. *Prenatal diagnosis*. 2007;27(7):685-6.
158. Liang CL, Liu L, Sheng HY, Jiang MY, Yin X, Mei HF, i sar. [Gene mutations and clinical manifestations in children with glycogen storage disease type Ib]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2013;15(8):661-5.
159. Lin B, Pan CJ, Chou JY. Human variant glucose-6-phosphate transporter is active in microsomal transport. *Human genetics*. 2000;107(5):526-9.
160. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001;25(4):402-8.
161. Lu Y, Wang L, Li J, Wu B, Wu H, Luo Y, i sar. Molecular genetic analysis and phenotypic characteristics of a consanguineous family with glycogen storage disease type Ia. *Molecular medicine reports*. 2016;14(4):3251-4.
162. Lucchiari S, Donati MA, Parini R, Melis D, Gatti R, Bresolin N, i sar. Molecular characterisation of GSD III subjects and identification of six novel mutations in AGL. *Human mutation*. 2002;20(6):480.
163. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, i sar. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature reviews Microbiology*. 2011;9(6):467-77.
164. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor, N. Y: Cold Spring Harbor Laboratory; 1982.
165. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2008;7(18):2902-6.
166. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiological reviews*. 2006;86(4):1133-49.
167. Marcolongo P, Barone V, Priori G, Pirola B, Giglio S, Biasucci G, i sar. Structure and mutation analysis of the glycogen storage disease type 1b gene. *FEBS letters*. 1998;436(2):247-50.
168. Marega A, Fregonese C, Tulissi P, Vallone C, Gropuzzo M, Toniutto PL, i sar. Preemptive liver-kidney transplantation in von Gierke disease: a case report. *Transplantation proceedings*. 2011;43(4):1196-7.
169. Martin CC, Oeser JK, Svitek CA, Hunter SI, Hutton JC, O'Brien RM. Identification and characterization of a human cDNA and gene encoding a ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *Journal of molecular endocrinology*. 2002;29(2):205-22.
170. Matern D, Seydewitz HH, Bali D, Lang C, Chen YT. Glycogen storage disease type I: diagnosis and phenotype/genotype correlation. *European journal of pediatrics*. 2002;161 Suppl 1:S10-9.
171. Melis D, Carbone F, Minopoli G, La Rocca C, Perna F. Cutting Edge: Increased Autoimmunity Risk in Glycogen Storage Disease Type 1b Is Associated with a Reduced Engagement of Glycolysis in T Cells and an Impaired Regulatory T Cell Function. 2017;198(10):3803-8.

172. Melis D, Fulceri R, Parenti G, Marcolongo P, Gatti R, Parini R, i sar. Genotype/phenotype correlation in glycogen storage disease type 1b: a multicentre study and review of the literature. *European journal of pediatrics*. 2005;164(8):501-8.
173. Miltenberger-Miltenyi G, Szonyi L, Balogh L, Utermann G, Janecke AR. Mutation spectrum of type I glycogen storage disease in Hungary. *Journal of inherited metabolic disease*. 2005;28(6):939-44.
174. Minarich LA, Kirpich A, Fiske LM, Weinstein DA. Bone mineral density in glycogen storage disease type Ia and Ib. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*. 2012.
175. Narisawa K, Igarashi Y, Otomo H, Tada K. A new variant of glycogen storage disease type I probably due to a defect in the glucose-6-phosphate transport system. *Biochemical and biophysical research communications*. 1978;83(4):1360-4.
176. Nelson A, Myers K. Shwachman-Diamond Syndrome: University of Washington, Seattle, Seattle (WA); 1993 1993.
177. Nilsson OS, Arion WJ, Depierre JW, Dallner G, Ernster L. Evidence for the involvement of a glucose-6-phosphate carrier in microsomal glucose-6-phosphatase activity. *European journal of biochemistry*. 1978;82(2):627-34.
178. Nordlie RC, Sukalski KA, Munoz JM, Baldwin JJ. Type Ic, a novel glycogenosis. Underlying mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 1983;258(16):9739-44.
179. Oikawa D, Kimata Y, Kohno K. Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1. *Journal of cell science*. 2007;120(Pt 9):1681-8.
180. Osowski CM, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods in enzymology*. 2011;490:71-92.
181. Ozcan L, Tabas I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annual review of medicine*. 2012;63:317-28.
182. Ozen H. Glycogen storage diseases: new perspectives. *World journal of gastroenterology*. 2007;13(18):2541-53.
183. Pan CJ, Chen LY, Mansfield BC, Salani B, Varesio L, Chou JY. The signature motif in human glucose-6-phosphate transporter is essential for microsomal transport of glucose-6-phosphate. *Human genetics*. 2003;112(4):430-3.
184. Pan CJ, Lei KJ, Annabi B, Hemrika W, Chou JY. Transmembrane topology of glucose-6-phosphatase. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(11):6144-8.
185. Pan CJ, Lin B, Chou JY. Transmembrane topology of human glucose 6-phosphate transporter. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(20):13865-9.
186. Parvari R, Moses S, Hershkovitz E, Carmi R, Bashan N. Characterization of the mutations in the glucose-6-phosphatase gene in Israeli patients with glycogen storage disease type 1a: R83C in six Jews and a novel V166G mutation in a Muslim Arab. *Journal of inherited metabolic disease*. 1995;18(1):21-7.
187. Pejaver V, Urresti J, Lugo-Martinez J, Pagel KA, Lin GN, Nam H-J, i sar. MutPred2: inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants. *bioRxiv*. 2017:134981.
188. Pirkmajer S, Chibalin AV. Serum starvation: caveat emptor. *American journal of physiology Cell physiology*. 2011;301(2):C272-9.

189. Qiu ZQ, Lu CX, Wang W, Qiu JJ, Wei M. [Mutation in the SLC37A4 gene of glycogen storage disease type Ib in 15 families of the mainland of China]. *Zhonghua er ke za zhi = Chinese journal of pediatrics*. 2011;49(3):203-8.
190. Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2015;31(5):761-3.
191. Rake JP, ten Berge AM, Visser G, Verlind E, Niezen-Koning KE, Buys CH, i sar. Glycogen storage disease type Ia: recent experience with mutation analysis, a summary of mutations reported in the literature and a newly developed diagnostic flow chart. *European journal of pediatrics*. 2000;159(5):322-30.
192. Rake JP, Visser G, Labrune P, Leonard JV, Ullrich K, Smit GP. Glycogen storage disease type I: diagnosis, management, clinical course and outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSD I). *European journal of pediatrics*. 2002;161 Suppl 1:S20-34.
193. Rake JP, Visser G, Smit GP. Disorders of Carbohydrate and Glycogen Metabolism. In: Blau N, Leonard J, Hoffmann GF, Clarke JTR, editors. *Physician's Guide to the Treatment and Follow-Up of Metabolic Diseases*. Berlin, Germanz: Springer; 2006. p. 161-80.
194. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*. 2013;8(11):2281-308.
195. Reitsma-Bierens WC. Renal complications in glycogen storage disease type I. *European journal of pediatrics*. 1993;152 Suppl 1:S60-2.
196. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, i sar. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. 2015;17(5):405-24.
197. Roach PJ. Glycogen and its metabolism. *Current molecular medicine*. 2002;2(2):101-20.
198. Rodriguez-Jimenez C, Santos-Simarro F, Campos-Barros A, Camarena C, Lledin D, Vallespin E, i sar. A new variant in PHKA2 is associated with glycogen storage disease type IXa. *Molecular genetics and metabolism reports*. 2017;10:52-5.
199. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*. 2010;5(4):725-38.
200. Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, i sar. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS biology*. 2006;4(11):e374.
201. Rutkowski DT, Kaufman RJ. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends in biochemical sciences*. 2007;32(10):469-76.
202. Rybicka KK. Glycosomes--the organelles of glycogen metabolism. *Tissue & cell*. 1996;28(3):253-65.
203. Salani B, Damonte P, Zingone A, Barbieri O, Chou JY, D'Costa J, i sar. New-born liver gene transfer by an HIV-2-based lentiviral vector. *Gene therapy*. 2005;12(10):803-14.

204. Saleh-Gohari N, Helleday T. Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic acids research*. 2004;32(12):3683-8.
205. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-7.
206. Santer R, Rischewski J, Block G, Kinner M, Wendel U, Schaub J, i sar. Molecular analysis in glycogen storage disease 1 non-A: DHPLC detection of the highly prevalent exon 8 mutations of the G6PT1 gene in German patients. *Human mutation*. 2000;16(2):177.
207. Schoenheimer R. Ueber eine eigenartige Stoerung des Kohlenhydratstoffwechsels. *Zeitschr Fysiol Chem*. 1929;182(148).
208. Senior B, Loridan L. Studies of liver glycogenoses, with particular reference to the metabolism of intravenously administered glycerol. *The New England journal of medicine*. 1968;279(18):958-65.
209. Sentner CP, Vos YJ, Niezen-Koning KN, Mol B, Smit GP. Mutation Analysis in Glycogen Storage Disease Type III Patients in the Netherlands: Novel Genotype-Phenotype Relationships and Five Novel Mutations in the AGL Gene. *JIMD reports*. 2013;7:19-26.
210. Shieh JJ, Pan CJ, Mansfield BC, Chou JY. A glucose-6-phosphate hydrolase, widely expressed outside the liver, can explain age-dependent resolution of hypoglycemia in glycogen storage disease type Ia. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(47):47098-103.
211. Shieh JJ, Terzioglu M, Hiraiwa H, Marsh J, Pan CJ, Chen LY, i sar. The molecular basis of glycogen storage disease type 1a: structure and function analysis of mutations in glucose-6-phosphatase. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(7):5047-53.
212. Shihab HA, Rogers MF, Gough J, Mort M, Cooper DN, Day IN, i sar. An integrative approach to predicting the functional effects of non-coding and coding sequence variation. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2015;31(10):1536-43.
213. Sim N-L, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic acids research*. 2012;40(W1):W452-W7.
214. Skakic A, Djordjevic M, Sarajlija A, Klaassen K, Tosic N, Kecman B, i sar. Genetic characterization of GSD I in Serbian population revealed unexpectedly high incidence of GSD Ib and 3 novel SLC37A4 variants. 2018;93(2):350-5.
215. Smit GP, Rake JP, Akman HO, DiMauro S. The Glycogen Storage Diseases and Related Disorders. In: Fernandes J, Saudubray JM, Van den Berghe G, Walter P, editors. *Inborn Metabolic Diseases*. 4th ed. Heidelberg, Germany: Springer; 2000. p. 100-16.
216. Snappes I, Van Creveld S. Un cas d'hypoglycemie avec acetonemie chez un enfant. *Bull Mem Soc Med Hop*. 1928;52(1315-1317).
217. Stankovic B. MOLEKULARNI MARKERI HRONIČNE INFLAMACIJE I APOPTOZE KOD INFLAMATORNIH BOLESTI CREVA. Belgrade: University in Belgrade; 2015.

218. Stojiljkovic M, Klaassen K, Djordjevic M, Sarajlija A, Brasil S, Kecman B, i sar. Molecular and phenotypic characteristics of seven novel mutations causing branched-chain organic acidurias. *Clinical genetics*. 2016;90(3):252-7.
219. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*. 2006;7(9):880-5.
220. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature cell biology*. 2011;13(3):184-90.
221. Trioche P, Petit F, Francoual J, Gajdos V, Capel L, Pous C, i sar. Allelic heterogeneity of glycogen storage disease type Ib in French patients: a study of 11 cases. *Journal of inherited metabolic disease*. 2004;27(5):621-3.
222. Tsang KY, Chan D, Bateman JF, Cheah KS. In vivo cellular adaptation to ER stress: survival strategies with double-edged consequences. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 13):2145-54.
223. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature reviews Genetics*. 2010;11(9):636-46.
224. Van den Hout H, Reuser AJ, Vulto AG, Loonen MC, Cromme-Dijkhuis A, Van der Ploeg AT. Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. *Lancet (London, England)*. 2000;356(9227):397-8.
225. van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, i sar. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Applied and environmental microbiology*. 1992;58(8):2606-15.
226. Vega AI, Medrano C, Navarrete R, Desviat LR, Merinero B, Rodriguez-Pombo P, i sar. Molecular diagnosis of glycogen storage disease and disorders with overlapping clinical symptoms by massive parallel sequencing. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*. 2016;18(10):1037-43.
227. Veiga-da-Cunha M, Gerin I, Chen YT, de Barsy T, de Lonlay P, Dionisi-Vici C, i sar. A gene on chromosome 11q23 coding for a putative glucose- 6-phosphate translocase is mutated in glycogen-storage disease types Ib and Ic. *American journal of human genetics*. 1998;63(4):976-83.
228. Veiga-da-Cunha M, Gerin I, Chen YT, Lee PJ, Leonard JV, Maire I, i sar. The putative glucose 6-phosphate translocase gene is mutated in essentially all cases of glycogen storage disease type I non-a. *European journal of human genetics: EJHG*. 1999;7(6):717-23.
229. Viennas E, Komianou A, Mizzi C, Stojiljkovic M, Mitropoulou C, Muilu J, i sar. Expanded national database collection and data coverage in the FINDbase worldwide database for clinically relevant genomic variation allele frequencies. *Nucleic acids research*. 2017;45(D1):D846-d53.
230. Visser G, Rake JP, Fernandes J, Labrune P, Leonard JV, Moses S, i sar. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib: results of the European Study on Glycogen Storage Disease type I. *The Journal of pediatrics*. 2000;137(2):187-91.
231. Visser G, Rake JP, Labrune P, Leonard JV, Moses S, Ullrich K, i sar. Consensus guidelines for management of glycogen storage disease type 1b - European Study on Glycogen Storage Disease Type 1. *European journal of pediatrics*. 2002;161 Suppl 1:S120-3.

232. von Gierke E. Hepato-nephro-megalia glycogenica (Glykogenspeicher-krankheit der Leber und Nieren). *Beitr Pathol Anat.* 1929;82(497).
233. Waddell ID, Burchell A. Transverse topology of glucose-6-phosphatase in rat hepatic endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 1991;275 (Pt 1):133-7.
234. Wang DQ, Carreras CT, Fiske LM, Austin S, Boree D, Kishnani PS, i sar. Characterization and pathogenesis of anemia in glycogen storage disease type Ia and Ib. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics.* 2012;14(9):795-9.
235. Weinstein DA, Somers MJ, Wolfsdorf JI. Decreased urinary citrate excretion in type 1a glycogen storage disease. *The Journal of pediatrics.* 2001;138(3):378-82.
236. www.omim.org.
237. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods.* 2015;12(1):7-8.
238. Yiu WH, Pan CJ, Mead PA, Starost MF, Mansfield BC, Chou JY. Normoglycemia alone is insufficient to prevent long-term complications of hepatocellular adenoma in glycogen storage disease type Ib mice. *Journal of hepatology.* 2009;51(5):909-17.
239. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001;107(7):881-91.
240. Zhang J, Le TD, Liu L, Liu B, He J, Goodall GJ, i sar. Identifying direct miRNA-mRNA causal regulatory relationships in heterogeneous data. *Journal of biomedical informatics.* 2014;52:438-47.
241. Zingone A, Hiraiwa H, Pan CJ, Lin B, Chen H, Ward JM, i sar. Correction of glycogen storage disease type 1a in a mouse model by gene therapy. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(2):828-32.
242. Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, i sar. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *The Journal of cell biology.* 2003;162(1):59-69.

BIOGRAFIJA

Анита Скакић рођена је 19.07.1986. године у Карловцу, Хрватска. Биолошки факултет Универзитета у Београду, студијска група Молекуларна биологија и физиологија, уписала је школске 2005/2006. године и дипломирала у октобру 2013. године одбранивши дипломски рад под називом: „Анализа варијанти у *FTO*, *FABP2*, *PPARG*, *ADRB2* и *ADRB3* gena код испитаника из српке популације – као предуслов за развој nutrigenetičkog algoritma за гојазност“. Докtorsке студије уписала је школске 2013/2014. године на Биолошком факултету Универзитета у Београду, студијски програм Молекуларна биологија, модул Молекуларна биологија еукариота. У периоду од октобра 2013. године запослена је у Лабораторији за молекуларну биомедицину, Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, као учесник националног пројекта “Ретке болести: молекуларна патофизиологија, дијагностички и терапијски модалитети и социјални, етички и правни аспекти“ (Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, ев. бр. III41004, 2011-2018. године). Звање истраживач сарадник стекла је 2015. године. Anita Skakić је до сада објавила 7 радова у часописима међународног значаја и имала 16 саопштења на међународним научним skupovima и једно саопштење на skupu националног значаја.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Анита Скакић

Број индекса: М3010/2013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Геномски профил пацијената дечијег узраста са хепатичним гликогенозама:
корелација генотипа и фенотипа и функционална карактеризација нових варијанти

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

Потпис аутора

У Београду, 22.04.2019.

Скакић Анита

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Анита Скакић

Број индекса: М3010/2013

Студијски програм: Молекуларна биологија; модул: Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада: Геномски профил пацијената дечијег узраста са хепатичним гликогенозама: корелација генотипа и фенотипа и функционална карактеризација нових варијанти

Ментор: др Маја Стојиљковић, др Соња Павловић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 22.04.2019.

Анита Скакић

Изјава о коришћењу

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

Геномски профил пацијената дечијег узраста са хепатичним гликогенозама:
корелација генотипа и фенотипа и функционална карактеризација нових варијанти

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 22.04.2019.

Снежана Арсенија

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.