

# Identifikacija potencijalnih genskih poremećaja u pozadini slučaja idiopatskog niskog rasta

---

Skupnjak, Magdalena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:084786>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Magdalena Skupnjak**

**Identifikacija potencijalnih genskih poremećaja u  
pozadini slučaja idiopatskog niskog rasta**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021. godina

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Molekularna biologija s genetičkim inženjerstvom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Gordana Lauca.

*Menatoru prof. dr. sc. Gordanu Laucu veliko hvala na pruženoj prilici i realizaciji eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Velike zahvale i izv. prof. dr. sc. Ozrenu Polašku i Marku Tijardoviću, mag. med. biochem, na strpljenju, savjetima, stručnom usmjeravanju i pomoći kod izrade ovog diplomskog rada.*

*Posebna zahvala ide mojim roditeljima Ivici i Brigitti, sestri Elizabeti i bratu Matiji, ali i cijeloj mojoj obitelji jer, realno gledano, bez njih ideje za ovaj diplomski rad ne bi ni bilo.*

*Zahvaljujem i cimerici Ines na svakodnevnom "power" motiviranju i našem vremenu provedenom skupa u studentskom domu uz trash filmove (ništa iznad 6.0 po IMDB ratingu) i dobru klopu.*

*Hvala mojim PKC curama na divnoj podršci i ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Hvala grupi „ne moren“ na pet divnih godina druženja, ali i svim prijateljima i kolegama koji su bili dio ovog razdoblja.*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. GRAĐA I ORGANIZACIJA NUKLEINSKIH KISELINA.....	1
1.2. GEN I GENOM.....	3
1.3. EKSPRESIJA GENA I SINTEZA PROTEINA .....	4
1.4. MUTACIJE I GENETSKI POREMEĆAJI.....	7
1.4.1 Mutacije.....	7
1.4.2 Polimorfizam.....	8
1.4.3 Genetski poremećaj.....	9
1.5 RAST I RAZVOJ .....	10
1.5.1. Longitudinalni rast i regulacija.....	10
1.5.1.1. Endokrina regulacija rasta.....	10
1.5.1.2. Lokalni signalni putovi.....	11
1.5.2 Poremećaji rasta – niski rast.....	14
1.6. ANALIZA SLIJEDA DNA.....	16
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	21
3. MATERIJALI I METODE .....	22
3.1. UZORCI .....	22
3.2. MATERIJALI.....	22
3.3. OPREMA .....	22
3.4. PRIPREMA UZORAKA.....	22
3.5. OBRADA DNA – GENOTIPIZIRANJE.....	25
3.6. RAČUNALNA OBRADA PODATAKA .....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	27
4.1. OSTEONEKTIN (SPARC).....	35
4.2. ETS HOMOLOGNI FAKTOR (EHF) .....	36
4.3. T-KADHERIN (CDH13) .....	37
4.4. DODATNI REZULTATI.....	38
5. ZAKLJUČAK .....	41
6. LITERATURA.....	42
7. SAŽETAK / SUMMARY .....	49
7.1 SAŽETAK.....	49
7.2 SUMMARY .....	49
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENT CARD	

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA

3'UTR	3' netranslatirana regija (od engl. <i>3' untranslated region</i> )
A	adenin
AKT	RAC-alfa serin/treonin-proteinska kinaza ili protein kinaza B
ATP	adenozin-3-fosfat
BAC	bakterijski umjetni kromosom (od engl. <i>bacterial artificial chromosome</i> )
BP	bazni par
BMP	koštani morfogenijski protein (od engl. <i>bone morphogenic protein</i> )
C	citozin
Ca <sup>2+</sup>	kalcij
CDH13	kadherin 13
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
CHR	kromosome (od engl. <i>chromosome</i> )
c-MET	tirozin-protein kinaza Met ili receptor faktora rasta hepatocita
ddNTP	dideoksinukleotid trifosfat
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
ECM	izvanstanični matriks (od engl. <i>extracellular matrix</i> )
eEF	eukariotski elongacijski faktor
EHF	ETS homologni faktor
eIF	eukariotski inicijacijski faktor
eRF	eukariotski oslobađajući faktor (od engl. <i>eucaryotic releasing factor</i> )
FGF	faktor rasta fibroblasta
FGFR	receptor faktora rasta fibroblasta
G	gvanin
g	gravitacijska konstanta
gDNA	genomska deoksiribonukleinska kiselina
GDP	gvanozin-difosfat
GPI	glikozil-fosfatidilinozitol
GSK3β	kinaza glikogen sintaze 3 β
GTP	gvanozin-trifosfat
GWAS	cjelogenomska asocijacijska studija (od engl. <i>genome wide association study</i> )
HA	hidroksiapatit

HR	hormon rasta
HRR	receptor hormona rasta
IGF	inzulinu sličan faktor rasta (od engl. <i>insulin-like growth factor</i> )
IGFBP	peptid koji veže inzulinu sličan faktor rasta (od engl. <i>insulin-like growth factor binding protein</i> )
IHH	indian hedgehog
ILK	integrin-vezana kinaza
JAK2	Janus kinaza 2
K3-EDTA	kalijev etilendiamintetraacetat
LRP	protein povezan s lipoproteinskim receptorima niske gustoće (od engl. <i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i> )
MAPK/ERK	mitogenom-aktivirana protein kinaza 1
miR-29	mikro ribonukleinska kiselina 29
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (od eng. <i>messenger RNA</i> )
MSC	mezenhimske matične stanice (od engl. <i>mesenchymal stem cell</i> )
mTOR	serin/treonin kinaza mete rapamicina (od engl. <i>mammalian target of rapamycin</i> )
NGS	sekvenciranje sljedeće generacije (od engl. <i>next generation sequencing</i> )
OH	hidroksilna skupina
OPN	osteopetin
PCR	lančana reakcija polimeraze (od engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PI3K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
PPxY	motiv prolin-prolin-X-tirozin (gdje je X bilo koja aminokiselina)
PTHR	receptor paratiroidnog hormona
PTHrP	peptid sličan paratiroidnom hormonu
rHHR	rekombinantni humani hormon rasta
rhIGF-1	rekombinantni humani inzulinu sličan faktor rasta
RNA	ribonukleinska kiselina
rNTP	ribonukleozid trifosfat
rRNA	ribosomska ribonukleinska kiselina
RUNX2	RUNX transkripcijski faktor 2
SHOX	od engl. <i>short-stature homeobox</i>
SMARCA4	SWI/SNF i matriksom povezan, o aktinu ovisan regulator kromatina, podobitelji a, član 4

SMRT	mononuklearno sekvenciranje u stvarnom vremenu (od engl. <i>single-molecule real-time sequencing</i> )
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (od engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SP7	transkripcijski faktor SP7
SPARC	osteonektin
STAT	pretvarač signala i aktivator transkripcije (od engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
T	timin
T3	trijodtironin
T4	tiroksin
TAZ/WWTR1	transkripcijski regulator 1 koji sadrži WW domenu
TCF/LEF	Faktori transkripcije faktora T-stanica/faktora limfoidnog pojačivača (enhancer factor)
TDT	od engl. <i>transmission disequilibrium test</i>
TEAD	transkripcijski faktor sa TEA domenom (od engl. <i>TEA Domain Transcription Factor</i> )
TGF- $\beta$	transformirajući faktor rasta $\beta$
tRNA	transportna RNA
TSH	tiroidni stimulirajući hormon
U	uracil
VDR	receptor vitamina D
WNT	Wingless-Int
YAP	Yes-povezani protein
ZMW	vodič vala u nultom-modu (od engl. <i>zero-mode waveguides</i> )

# 1. UVOD

## 1.1. GRAĐA I ORGANIZACIJA NUKLEINSKIH KISELINA

Genetska informacija prenosi se dugim linearnim polimerima – nukleinskim kiselina koje se dijele u dva razreda: deoksiribonukleinska kiselina (DNA) i ribonukleinska kiselina (RNA) koje dijele odgovornost pohranjivanja i raspoređivanja genetske informacije (Clark i sur., 2019).

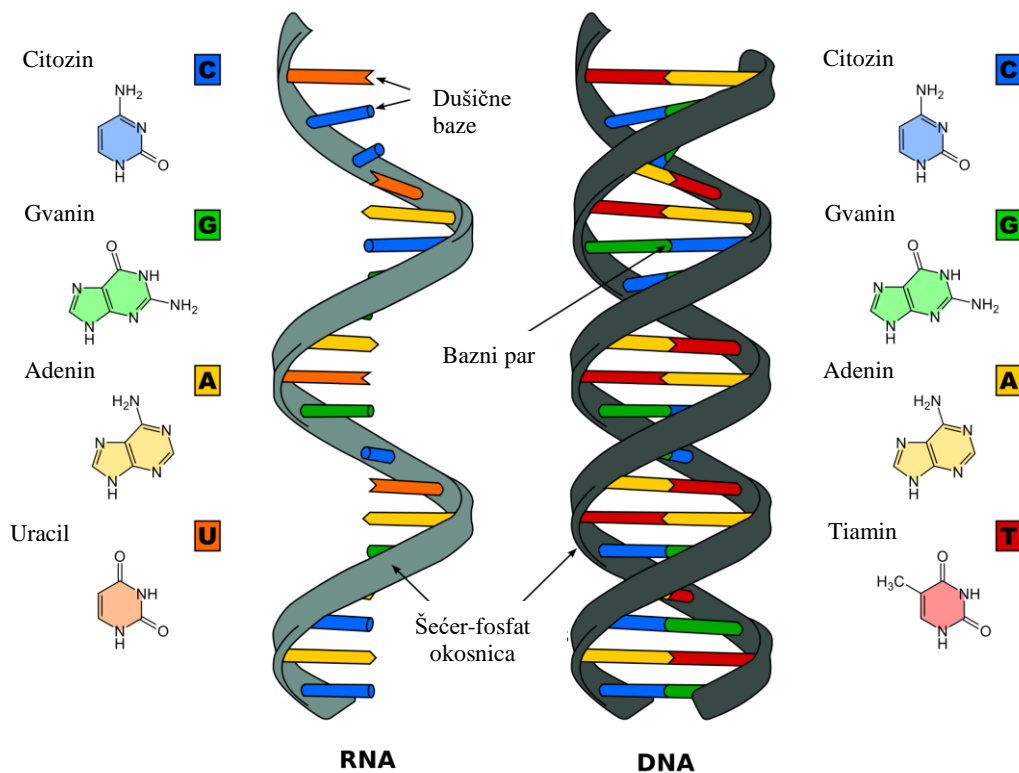
DNA i RNA kemijski su vrlo slične. Primarne strukture obje su linearni polimeri sastavljeni od podjedinica koji se nazivaju nukleotidi. Svaki nukleotid ima tri sastavna dijela: fosfatnu skupinu, pentoze (riboza ili deoksiriboza) i baze. Dva nukleotida su povezana fosfodieterskom vezom 5'-ugljika šećera jednog nukleotida sa 3-OH skupinom sljedećeg nukleotida (Lodish i sur., 2016)

Postoji pet tipova dušičnih baza. DNA sadrži baze adenin (A), gvanin (G), citozin (C) i timin (T), dok RNA sadrži A, G i C, a T je zamijenjen uracilom (U). Iz perspektive genetičke informacije, T u DNA i U u RNA su ekvivalenti (Slika 1.) (Clark i sur., 2019).

Dva lanca od kojih je sastavljena DNA su antiparalelni i oni se uvijaju međusobno u spiralnom rasporedu tvoreći dvostruku uzvojnica DNA. Šećer-fosfat okosnice se nalaze s vanjske strane uzvojnice, a baze u unutrašnjosti. Lanci su zadržani u preciznoj formaciji zbog vodikovih veza između baznih parova: A se povezuje s T s dvije vodikove veze, a G sa C sa tri vodikove veze. Komplementarnost baznih parova posljedica je veličine, oblika i kemijskog sastava baza. Prisutnost tisuća vodikovih veza u molekuli DNA uvelike doprinosi stabilnosti dvostruke uzvojnice, a hidrofobne i van der Waalsove interakcije između susjednih parova baza dodatno stabiliziraju strukturu DNA. Dvostruka uzvojnica DNA presudna je za pojavu nasljeđivanja, prijenos genetski određenih karakteristika s generacije na generaciju (Clark i sur., 2019; Lodish i sur., 2016).

Većina DNA se nalazi u jezgri stanice (nuklearna DNA), dok se mali dio DNA nalazi u mitohondriju (mitohondrijske DNA ili mtDNA) ([www.medlineplus.gov](http://www.medlineplus.gov)). Informacija pohranjena u DNA kopira se u RNA - ribosomsku RNA (rRNA), messenger RNA (mRNA) i transfer RNA (tRNA) (Lodish i sur., 2016)



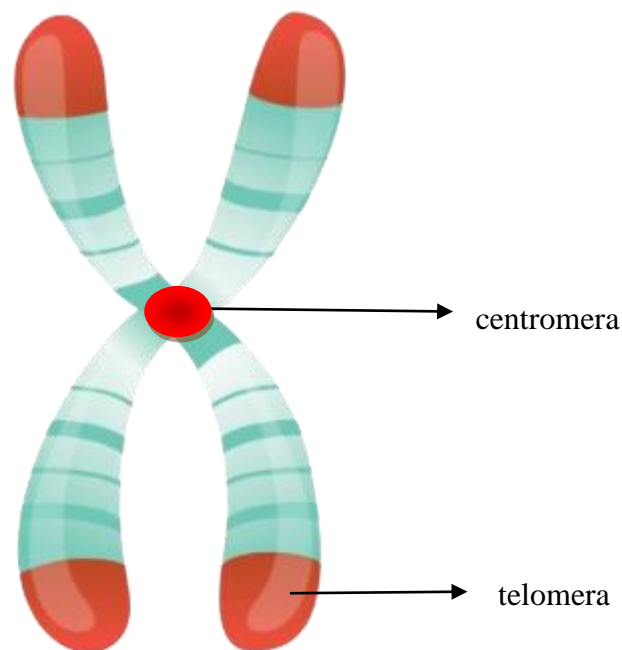


**Slika 1.** DNA i RNA molekula (preuzeto i modificirano sa: [www.thinglink.com](http://www.thinglink.com))

Budući da je ukupna duljina stanične DNA do sto tisuća puta veća od promjera stanice, pakiranje DNA je presudno za staničnu arhitekturu. Zadatak zbijanja i organiziranja kromosomske DNA vrši mnogo nuklearnih proteina nazvanih histoni. Kompleks histona i DNA naziva se kromatin. Kromatin je dispergiran u većem dijelu jezgre u interfaznim stanicama (stanice koje ne prolaze mitozu). Strukturna organizacija kromatina omogućava kompaktnost velike duljine DNA u mikroskopskim ograničenjima stanične jezgre. Ipak, kromatin je organiziran na takav način da su specifične DNA sekvence unutar kromatina lako dostupne za stanične procese kao što su transkripcija, replikacija, popravak i rekombinacija molekula DNA (Lodish i sur., 2016).

Savijanjem i sabijanjem kromatina tijekom mitoze nastaju vidljivi kromosomi metafaze (Slika 2) (Lodish i sur., 2016). Stanice viših organizama sadrže dvije kopije svakog kromosoma. Svaki par identičnih kromosoma posjeduje kopije istih gena, raspoređenih u isti linearni poredak. Eukariotski kromosom uključuje milijune proteina i sadrži samo jednu, izuzetno dugu, linearnu molekulu DNA. Kromosomi imaju centromere, obično smještene više ili manje u sredini, i strukture poznate kao telomere na dva kraja. Centromere i telomere sadrže posebne ponavljajuće sekvence DNA koje omogućuju njihovo prepoznavanje određenim

proteinima. Centromera je važna kod stanične diobe kada se kromosomi repliciraju. Novo-razdvojeni kromosomi stanice kćeri razdvajaju se vretenastim vlaknima (ili mikrotubulama) pričvršćenim na centromere proteinskim strukturama poznatim kao kinetohore. Telomere su vrlo važne za održavanje stabilnosti kromosoma. Zbog mehanizma pokretanja replikacije DNA pomoću RNA-početnice, krajevi se linearnih molekula DNA skraćuju za nekoliko baza u svakom krugu replikacije. U onim stanicama kojima je dopušteno da dalje rastu i dijele se, krajnje sekvence obnavlja enzim telomeraza. Ako telomere postanu prekratke, stanica pokreće proces apoptoze kako bi se spriječili problemi u diferencijaciji stanica, rak i starenje (Clark i sur., 2019)



**Slika 2.** Metafazni kromosom (*preuzeto i modificirano sa [www.seekpng.com](http://www.seekpng.com)*)

## 1.2. GEN I GENOM

Gen se definira kao jedinica DNA koja sadrži informacije za sintezu funkcionalnog genskog produkta (polipeptida ili RNA). Informacija u svakom genu određena je redoslijedom različitih nukleotida. Geni sadrže dva dijela: kodirajuću regiju koja specificira aminokiselinski slijed proteina ili funkcionalnu RNA i regulatornu regiju koja veže specifične proteine i kontrolira kada, u kojim stanicama i u kojoj količini se proizvodi genski produkt. Između gena nalaze se regije DNA koje se nazivaju intergenskim regijama i jako se razlikuju po veličini (Lodish i sur., 2016).

Većina gena nosi informaciju za izgradnju proteinskih molekula, a regulatorni geni i nekodirajuće RNA pomažu u regulaciji transkripcije gena koji kodiraju proteine; stoga su njihovi učinci na organizam manje izravni i složeniji. Regulacija transkripcije omogućava da se različiti setovi gena eksprimiraju u više različitih vrsta stanica koje čine višestanični organizam. Također omogućuju i transkripciju različitih količina mRNA iz različitih gena, što rezultira razlikama u količinama kodiranih proteina u stanici (Lodish i sur., 2016).

Geni mogu biti prisutni u alternativnim oblicima, koji se nazivaju aleli. Različiti aleli istog gena usko su povezani, ali imaju manje varijacije u slijedu nukleotida što može dati značajno različite ishode. Općenito, za svaku je nasljednu osobinu jedan alel naslijeđen od oca, a drugi od majke (Taneri i sur., 2020).

Zbog velikih varijacija alela koje prirodno postoje u ljudskoj populaciji, izraz divlji tip obično označava alel koji je prisutan u mnogo većoj frekvenciji od bilo koje druge alternative (Lodish i sur., 2016).

Iako se u različitim organizmima u populaciji može pojaviti mnogo različitih alela gena, svaki pojedinačni diploidni organizam nosit će dvije kopije svakog gena i na taj način imati najviše dva različita alela. Diploidna jedinka s dva različita alela heterozigotna je za gen, dok je diploidna jedinka koja ima dva identična alela homozigotna za gen (Lodish i sur., 2016).

Potpuna genetska informacija organizma naziva se genom. Ljudski genom sadrži otprilike 3 milijarde baznih parova DNA i sastoji se 20000 protein kodirajućih gena koji se sastoje od egzona (kodirajuća regija) i introna (nekodirajuće sekvence). Također sadrži i oko 22000 gena koji kodiraju samo RNA molekule koje su dio translacijske mašinerije ili reguliraju ekspresiju drugih gena. 80% genoma ima biološku aktivnost koja utječe na strukturu i funkciju stanica. Također genom sadrži i 14000 pseudogena – nesvršene kopije gena koje su izgubile sposobnost kodiranja proteina, ali sudjeluju u regulaciji svojih „gena-srodnika“ (Jackson i sur., 2018).

### **1.3. EKSPRESIJA GENA I SINTEZA PROTEINA**

Središnja dogma molekularne biologije nalaže da se informacija prenosi s DNA na mRNA i s mRNA na protein, a prijenos informacije nije moguć s proteina na protein ili s proteina na nukleinske kiseline (Yockey, 2005).

Proces od gena do finalnog produkta (RNA ili proteina) je kompleksan i strogo kontroliran unutar stanice. Sastoji se od dva glavna koraka: transkripcija i translacija što se zajednički naziva ekspresija gena i taj proces je potreban kako bi stanica normalno funkcionirala (www.medlineplus.gov).

U prvom koraku, **transkripciji**, protein-kodirajuća regija gena prepisuje se u jednolančanu RNA čija sekvenca je ista kao i jedan od dva lanca dvolančane DNA. Enzim, **RNA polimeraza**, katalizira vezanje nukleotida u RNA lanac koristeći DNA kao predložak. Nukleotidna sekvenca **mRNA** sadrži informaciju koja određuje točan redoslijed amino kiselina tijekom sinteze proteina. Transkripcija ima nekoliko faza. Tijekom **inicijacije**, RNA polimeraza uz pomoć inicijacijskih faktora, prepoznaje i veže se za određenu sekvencu dvolančane DNA koja se zove **promotor**. Nakon vezanja RNA polimeraze, inicijacijski faktori razdvoje DNA lance kako bi baze predloška bile dostupne za sparivanje s bazama ribonukleozid tri-fosfata (rNTP) koji će polimerizirati. Inicijacija transkripcije se smatra završenom kada se prva dva ribonukleotida RNA lanca povežu fosfodieterskom vezom. Nakon što je došlo do polimerizacije nekoliko ribonukleotida, dolazi do disocijacije promotora DNA i inicijacijskih faktora. Tijekom faze **elongacije lanca**, RNA polimeraza se kreće po predlošku DNA, otvarajući dvolančanu DNA ispred sebe i usmjeravajući lance ponovno zajedno iza sebe. Tijekom **terminacije** transkripcije, završne faze sinteze RNA, sintetizirana RNA se oslobađa s RNA polimeraze i polimeraza disocira s predloška DNA. Jednom kad se oslobodi, RNA polimeraza je slobodna da ponovno transkribira isti ili neki drugi gen (Lodish i sur., 2016).

Međutim, u eukariotskim stanicama mjesto sinteze RNA - jezgra - odvojeno je od mjesta **translacije** - citoplazma. Tijekom translacije mRNA se "čita" u skladu s genetskim kodom. Svaka skupina od tri baze u mRNA tvori **kodon**, a svaki kodon određuje određenu aminokiselinu (Clancy i sur., 2008).

Translacija se generalno može podijeliti u tri faze: inicijacija, elongacija i terminacija. Unutar svih stanica, translacijski mehanizam nalazi se unutar specijaliziranih organela – ribosoma.

**Inicijacija** zahtjeva vezanje eukariotskih inicijacijskih faktora (eIF). Formira se preinicijacijski kompleks vezanjem 40S podjedinice ribosoma, inicijacijske tRNA i eIF. I on skenira mRNA kako bi identificirala AUG kodon. Nakon prepoznavanja AUG kodona, dolazi

do hidrolize GTP-a vezanog za eIF. Inicijacijski faktori se tada oslobađaju i 60S ribosomska podjedinica se veže za 40S ribosomsku podjedinicu, tvoreći 80S inicijacijski kompleks.

Nakon formiranja inicijacijskog kompleksa, translacija nastavlja s **elongacijom** polipeptidnog lanca. Ribosom ima tri mjesta za vezanje tRNA: P mjesto (peptidil), A mjesto (aminoacil) i E mjesto (exit – izlazak). Inicijacijska metionil-tRNA veže se za P mjesto. Prvi korak elongacije je vezanje sljedeće aminoacil-tRNA na A mjesto uparivanjem sa sljedećim kodonom mRNA. Eukariotski elongacijski faktor (eEF1a) u kompleksu s GTP-om prati aminoacil tRNA do ribosoma. Odabir ispravne aminoacil tRNA za ugradnju u rastući polipeptidni lanac je kritični korak koji određuje točnost sinteze proteina. Umetanje ispravne aminoacil-tRNA u A mjesto pokreće konformacijsku promjenu koja inducira hidrolizu GTP vezanog za eEF1a i oslobađanje elongacijskog faktora vezanog za GDP.

Nakon toga dolazi do stvaranja peptidne veze između inicijacijske metionil-tRNA na P mjestu i aminoacil-tRNA na A mjestu. Tu reakciju katalizira velika ribosomska podjedinica tj. rRNA. Rezultat je prijenos metionina na aminoacil-tRNA na A mjestu ribosoma i formiranje peptidil-tRNA. Sljedeći korak translacije je **translokacija**, koja zahtjeva elongacijski faktor eEF2 združen sa GTP-om. Tijekom translokacije, peptidil tRNA premješta se sa mjesta A na mjesto P i nenabijenu tRNA na E mjesto, ostavljajući sljedećem kodonu slobodno A mjesto. Vezanje nove aminoacil-tRNA na mjesto A potiče otpuštanje nenabijene tRNA sa E mjesta i ribosom je spreman za umetanje nove aminokiseline u polipeptidni lanac.

Elongacija polipeptidnog lanca se nastavlja do trenutka translokacije stop kodona (UAA, UAG ili UGA) u A mjesto ribosoma. Stanice ne posjeduju tRNA sa antikodonom komplementarnim za terminacijske signale, ali posjeduju eukariotske faktore oslobađanja (eRF1) koji prepoznaju signal i zaustavljaju sintezu proteina. eRF1 prepoznaje sva tri stop kodona, veže se za njega na A mjestu i potiče hidrolizu veze između tRNA i polipeptidnog lanca na P mjestu što rezultira sintetiziranog lanca s ribosoma. Nakon toga oslobađa se tRNA i ribosomske jedinice i mRNA disociraju.

Translacijom se završava protok genetskih informacija unutar stanice. Slijed nukleotida u DNA pretvoren je u slijed aminokiselina u polipeptidnom lancu te nakon posttranslacijskih modifikacija i ispravnog smatanja u trodimenzionalnu konformaciju, protein postaje funkcionalan (Cooper, 2018.).

## 1.4. MUTACIJE I GENETSKI POREMEĆAJI

### 1.4.1. Mutacije

Mutacija je trajna i nepovratna promjena nukleotidne sekvence genoma koja se javlja u manje od 1 % populacije i ima patogeno značenje (Alexandrov i sur., 2013). Mutacija može utjecati na gen pa se naziva genska mutacija ili veće strukturne jedinice poput kromosoma (Igaz i Patcos, 2019).

Genske mutacije mogu se klasificirati na dva glavna načina:

- **Nasljedne mutacije ili mutacije germinacijske linije** događa se u stanicama zametne linije, posebnom tkivu koje se izdvaja tijekom razvoja kako bi stvorilo spolne stanice. Ako mutirana spolna stanica sudjeluje u oplodnji, mutacija se prenosi na sljedeću generaciju.
- **Stečene (ili somatske) mutacije** prisutne su samo u određenim stanicama, a ne u svakoj stanici u tijelu. Stečene mutacije u somatskim stanicama (stanice koje nisu spermij i jajne stanice) ne mogu se prenijeti na sljedeće generacije (Griffiths i sur. 2000).

Mutacije možemo podijeliti u nekoliko vrsta:

- **Pogrešna ili missense mutacija** nastaje kada promjena baznog niza mijenja kodon na način da se jedna aminokiselina u proteinu zamijeni drugom aminokiselinom. Jačina mutacije ovisi o lokaciji i prirodi aminokiseline koja je supstituirana (Clark i sur., 2019).
- **Besmisljena (nonsense) mutacija** koja se ponekad naziva i mutacija prekida lanca, događa se kada kodon za aminokiselinu mutira u stop kodon. Ova vrsta mutacije rezultira skraćenim proteinom koji može funkcionirati nepravilno ili uopće ne funkcionirati (Clark i sur., 2019; [www.medlineplus.gov](http://www.medlineplus.gov)).
- **Insercija** je tip mutacije gdje dolazi do umetanja jedne ili više baza u DNA sekvencu. Ako se strani dio DNA umetne u kodirajuće područje, tada je gen prekinut i obično će biti potpuno inaktiviran (Clark i sur., 2019).
- **Delecija** je tip mutacije gdje dolazi do gubitka dijela DNA sekvence. Ako se umetne ili ukloni jedna baza kodirajućeg niza, okvir za čitanje svih kodona iza insercije ili delecije se mijenja. Takve mutacije pomaka okvira čitanja obično uništavaju funkciju proteina, osim ako se ne dogode vrlo blizu kraja. Međutim, insercija ili delecija tri baze dodaje ili uklanja cijeli kodon i okvir za čitanje je zadržan. Osim jedne

aminokiseline koja je dodana ili se gubi, ostatak proteina je nepromijenjen (Clark i sur., 2019).

- **Supstitucija** je tip mutacije gdje se jedna baza zamjenjuje se drugom. Mutacija koja uključuje samo jednu bazu poznata je kao **točkasta mutacija**. (www.medlineplus.gov)
- **Duplikacija** je proces mutacije kromosoma gdje dolazi do stvaranja dodatne kopije neke kromosomske regije (Griffiths i sur., 2000).

Postoji mnogo različitih vrsta mutacija i većina ima samo manje učinke; u stvari, mnoge uopće ne uzrokuju uočljive nedostatke. Takve mutacije nazivaju se i **tihim mutacija (silent mutation)** jer su to promjene DNA sekvence koja nema utjecaja na rad stanice i zbog toga, po definiciji, nema utjecaj na fenotip. Tihe mutacije mogu se pojaviti u nekodirajućoj DNA između gena, u intronima ili u trećoj bazi kodona. To je poznato kao redundancija treće baze ili degeneracija kodona, drugim riječima, aminokiselina može biti kodirana s više od jednog nukleotidnog tripleta i u takvim slučajevima mutacija treće baze ne mijenja slijed proteina.

Također jedan od razloga je i taj što viši organizmi imaju dvije kopije svakog gena. To znači da ako je jedna kopija gena mutirana, postoji sigurnosna kopija koja se može koristiti za proizvodnju ispravnog proteina što često suzbija potencijalni nedostatak, osim ako mutacija nije dominantna (Clark i sur., 2019).

#### 1.4.2. Polimorfizam

**Polimorfizam** se definira kao varijanta sekvence DNA koja ima učestalost pojave u populaciji  $\geq 1\%$  (Cooper, ured., 2005) tj. različiti oblici polimorfizama (alela) češće se uviđaju u populaciji od mutacija (Liu, ured., 2018). Što je veća incidencija u populaciji, to sugerira da se polimorfizam prirodno javlja, bilo s neutralnim ili blagotvornim učinkom (Karki i sur., 2015). Generalno, genetski polimorfizam uključuje: polimorfizme jednog nukleotida (SNP), polimorfizme tandemskih ponavljanja koji uključuju promjenjivi broj tandemskih ponavljanja i kratka tandemska ponavljanja, polimorfizmi insercija/delecija, strukturne promjene i varijacije broja kopija (Liu, ured. 2018).

Najčešći oblici polimorfizama u ljudskom genomu jest SNP. To je promjena jedne baze DNA sekvence s normalnom alternativnom pojavom dva moguća nukleotida na danom položaju i događa se u jednoj na svakih 300 baza DNA (Jackson i sur., 2018; Liu, ured., 2018).

Lokacija SNP-a vrlo je bitna, SNP unutar gena može utjecati na strukturu proteina. SNP u **regulatornoj regiji** izvan gena može utjecati na ekspresiju gena, a posljedično tome na

količinu proizvedenog proteina pa se nazivaju **ekspresijski SNP-ovi**. Mogu utjecati na izrezivanje gena, vezanje transkripcijskih faktora ili sekvence nekodirajuće RNA (Liu, ured., 2018).

SNP-ovi u kodirajućoj regiji mogu se podijeliti u dva tipa: **sinonimni SNP** i **nesinonimni SNP**. **Sinonimni SNP** ne mijenja aminokiselinsku sekvencu proteina ili ne utječe na funkciju proteina. **Nesinonimni SNP** se dalje dijele na dva dijela: **pogrešni (missense)** ili **besmisleni (nonsense)**. Kod pogrešnog (missense) SNP-a promjena jednog nukleotida rezultira kodonom koji kodira drugu aminokiselinu rezultirajući nefunkcionalnim proteinom. Besmisleni (nonsense) SNP je točkasta mutacija DNA koja rezultira prijevremenom STOP kodonom i nefunkcionalnim proteinom (Liu, ured., 2018).

### 1.4.3. Genetski poremećaj

Genetski poremećaj je bolest koja je u cijelosti ili djelomično uzrokovana promjenom sekvence DNA u usporedbi s normalnom sekvencom (www.genome.gov). Glavna zadaća genetike u kliničkoj praksi je utvrditi ulogu varijacije i/ili mutacije u etiologiji velikog broja genetskih poremećaja. Gotovo svaka bolest rezultat je kombiniranog djelovanja gena i okoliša, ali relativna uloga genetske komponente može biti vrlo važna ili neznčajna (Taneri i sur., 2020).

Poremećaji gdje genetski faktori u potpunosti ili djelomično doprinose razvoju određenog stanja, mogu se podijeliti u tri skupine:

- **Monogeniski poremećaj** – uzrokovani su mutacijom jednog gena, a oni mogu biti:
  - **Dominantni** – poremećaj se razvija kada je samo jedan od roditeljskih gena abnormalan
  - **Recesivni** – poremećaj se razvija samo ako su oba roditeljska gena abnormalna
  - **X-vezani** – poremećaj je vezan uz gene na X kromosomu i češće takvi poremećaji pogađaju mušku djecu, dok su ženska djeca prenosioci (Mandel i sur., 2019).
- **Kromosomski poremećaji** – uzrokovani su viškom ili defektom gena u cijelim kromosomima ili njegovim dijelovima.
- **Višefaktorski poremećaj** – rezultat su kombinacije malih varijacija u genima, koje zajedno mogu dovesti do ozbiljnih nedostataka, zajedno s okolišnim čimbenicima (Thompson i sur., 2004).



## 1.5 RAST I RAZVOJ

### 1.5.1. Longitudinalni rast i regulacija

Rast tijela kumulativni je zbroj stanične proliferacije i povećanja stanica koji se događa u više tkiva. Na rast mogu utjecati genetski, prehrambeni, okolišni i hormonski faktori, ali obično se odvija po izuzeto predvidljivom obrascu – rast je brz u ranom životu, postupno usporava s godinama dok na kraju ne prestane kada organizam postigne konačnu veličinu.

Longitudinalni rast kostiju, proces kojim se povećava duljina tijela, događa se u zoni rasta procesom koji se naziva enhondralno okoštavanje. Zona rasta je hrskavične građe na krajevima dugih kostiju i tijela kralješaka. Sastoji se od hondrocita raspoređenih u tri morfološki različita sloja: odmarajući, proliferirajući i hipertrofični sloj. Hondrociti u odmarajućem sloju ponašaju se kao progenitorne stanice, dajući klonove brzo proliferirajućih hondrocita koji su poredani u stupce u proliferirajućem sloju. Dalje prema središtu kosti, hondrociti prestaju proliferirati i podvrgavaju se hipertrofičnoj diferencijaciji. Zatim se novoformirana hrskavica preuređuje u kosti – ti procesi rezultiraju progresivnim stvaranjem novog koštanog tkiva ispod zone rasta i posljedično produljenjem kostiju (Lui i sur., 2015).

#### 1.5.1.1. Endokrina regulacija rasta

Hormon rasta (HR) i inzulinu sličan faktor rasta 1 (IGF-1) su snažni stimulatori rasta. U endokrinoj regulaciji rasta možemo razlikovati dva osnovna razdoblja: os neovisna o HR (embrionalni rast i rani postnatalni rast) i os ovisna o HR, nakon što se aktivira os hipotalamus-hipofiza. Cirkulirajući HR veže se za svoj receptor (HRR, citokinski receptor s aktivnošću Tyr kinaze) u više tkiva pokrećući signalni put JAK2/STAT5b (Lui i sur., 2015). IGF-1 vežući se za IGF-1 receptor (IGF-1R) pokreće signalni put koji s integrira s drugim signalnim putevima kroz serin/treonin kinazu metu rapamicina (engl. *target of rapamycin*) (mTOR) (Klingseisen i Jackson., 2011).

Osim HR i IGF-1, na rast utječu i hormoni štitnjače, estrogeni i androgeni, vitamin D i glukokortikoidi. Estrogen je odgovoran za ubrzani rast u pubertetu čiji efekt je uvelike posredovan osi GH-IGF-1, no estrogen također ima i direktni lokalni učinak na zonu rasta. Estrogen potiče proces starenja zone rasta uzrokujući ranije zaustavljanje proliferacije hondrocita što sekundarno pokreće raniju fuziju epifize. Također starenje zone rasta je uzrokovano i nepovratnim iscrpljivanjem progenitornih stanica u odmarajućem sloju zone rasta (Lui i sur., 2018).

Hormoni štitnjače su trijodtironin T3 i tiroksin T4 te je za konverziju stabilnog oblika T4 u aktivni oblik T3 u hondrocitima potreban enzim dejodinoza 2. Većina djelovanja T3 vrši se kroz receptore hormona štitnjače (super-obitelj nuklearnih receptora). Delecija receptora hormona štitnjače rezultira smanjenim longitudinalnim rastom, oslabljenom hipertrofijom hondrocita, neorganiziranom zonom rasta i odgođenom mineralizacijom. Povećane razine T3 i T4 dovode do pojačanog okoštavanja i smanjenog longitudinalnog rasta zbog preuranjenog sazrijevanja zone rasta. Indirektni učinak hormona štitnjače na zonu rasta vidljiv je i kroz signaliziranje HR, IGF, faktora rasta fibroblasta (FGF), Wnt signalni put i Hedgehog signaliziranje.

Vitamin D ispoljava svoje učinke putem nuklearnog receptora vitamina D (VDR) te pokazuju djelovanje na razvoj kostiju i kod apsorpcije minerala te se pokazalo da endokrini učinci vitamina D su važniji od lokalnog učinka na zonu rasta.

Glukokortikoidi imaju manju ulogu u rastu kostiju te dugotrajno liječenje visokim dozama kortikosteroidima dovodi do zaustavljanja rasta. Vežući se za glukokortikosteroidne receptore zaustavljaju diferencijaciju hondrocita i mogu inducirati njihovu apoptozu. Osim direktnog učinka, glukokortikoidi su u interakciji sa signalima u zoni rasta, posebno sa HR-IGF-1 osi (Roselló-Díez i Loyner, 2015).

#### **1.5.1.2. Lokalni signalni putovi**

Lokalna regulacija zone rasta uključuje unutarstanične regulatore (transkripcijske faktore) i izlučene signale koje proizvode stanice u zoni rasta (odmarajući, proliferirajući i hipertrofični hondrociti) (Roselló-Díez i Loyner, 2015). Odnosno, endokrini faktori ispoljavaju svoje učinke na zonu rasta hondrocita kroz aktivaciju lokalnih signalnih putova unutar zone rasta (Lui i sur., 2018).

Indian hedgehog (IHH)- Peptid sličan paratireoidnom hormonu (PTHrP) negativna povratna sprega regulira proliferaciju hondrocita i hipertrofiju. IHH, kojeg proizvode hipertrofični hondrociti, difundira prema zglobnom kraju hrskavice gdje aktivira ekspresiju PTHrP, PTHrP aktivira PTH/PTHrP receptor 1 (PTHR1) i što je signal za inhibiciju IHH i hipertrofičnu diferencijaciju u određenoj udaljenosti od izvora PTHrP. IHH i PTHrP također promoviraju proliferaciju hondrocita paralelnim mehanizmom. Ta sprega regulira veličinu proliferirajuće zone tijekom enhondralnog okoštavanja. IHH potiče okoštavanje kroz signaliziranje u prekursorima osteoblasta u perihondriju i primarnom spužvastom tkivu.

Faktori rasta fibroblasta (FGF) signaliziraju kroz svoje receptore (FGFR, podskupina receptora tirozin kinaza) kako bi aktivirali unutarstanične puteve kao mitogenom aktivirana protein-kinaza / ekstracelularnim signalom regulirana kinaza (MAPK/ERK) stanični put, Transduktor signala i aktivator transkripcije 1 (STAT1), Fosfoinozimid 3-kinaza (PI3K) koji imaju bitnu ulogu u razvoju organa općenito, razvoju udova i posebno u fizilogiji zone rasta.

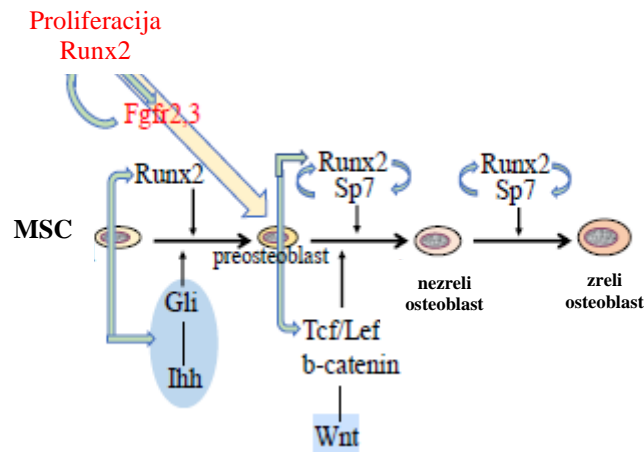
Wingless-Int (WNT) signalni put signalizira kroz Frizzled receptore i Protein 5/6 povezan s lipoproteinskim receptore niske gustoće (LRP5/6). Kanonsko signaliziranje uključuje stabilizaciju  $\beta$ -katenina i njegovu translokaciju u jezgru gdje aktivira gene potrebne za proliferaciju hondrocita i hipertrofičnu diferencijaciju, kao i održavanje sporo cirkulirajućih stanica u zoni rasta i u perihondriju. Nekanonski putevi kontroliraju tempo prijelaza hondrocita kroz slojeve u zoni rasta i uspostavu arhitekture zone rasta.

Koštani morfogenetski proteini (BMP) su članovi superobitelji transformirajućih faktora rasta beta (TGF $\beta$ ) i potiču enhondralno okoštavanje ektopičnih kostiju. BMP-evi signaliziraju kroz Ser/Thr kinazne receptore, dovodeći do fosforilacije i aktivacije SMAD kompleksa koji ulazi u jezgru i potiče transkripciju. TGF $\beta$ /BMP signaliziranje također ulazi u interakciju i sa drugim signalnim putovima kao što su MAPK, PI3K/AKT, WNT, HH i nekoliko citokina. Na primjer, BMP signaliziranje potiče proliferaciju hondrocita sinergistički sa IHH i blokirajući FGF signalizaciju i također odgađa hipertrofičnu diferencijaciju hondrocita.

Hippo-signalni put je jedan od važnijih regulatora veličine organa i tumorigeneze jer kontrolira diferencijaciju i brojnost stanica. Ključni transkripcijski faktori ovog puta su Yes-povezani protein (YAP) i njegov paralog transkripcijski regulator 1 koji sadrži WW domenu (TAZ ili WWTR1). Fosforilacijom YAP i WWTR1 dolazi do njihove aktivacije i translokacije u jezgru gdje ulaze u interakciju sa TEAD1-4 transkripcijskim faktorima. Hippo signalni put također ulazi u interakciju sa drugim signalnim putevima: WNT, IGF i TGF $\beta$ /BMP (Lui i sur., 2015).

Jedan od ključnih transkripcijskih faktora u zoni rasta pokazao se RUNX transkripcijski faktor 2 (RUNX2) koji regulira hipertrofiju hondrocita i popratne promjene u ECM-u (Emons i sur. 2011). RUNX2 potiče diferencijaciju multipotentnih mezenhimskih stanica (MSC) u preosteoblaste, a IHH je potreban za ekspresiju RUNX2 u perihondriju enhondralne kosti. RUNX2 potiče ekspresiju transkripcijskog faktora SP7 što aktivira WNT signalni put i potiče diferencijaciju preosteoblasta u nezrele osteoblaste. RUNX2 i SP7 su također uključeni u

sazrijevanje osteoblasta te RUNX2 regulira proliferaciju preosteoblasta poticanjem ekspresije FGFR2 i FGFR3. Ekspresija RUNX2 i gena IHH, FGF i WNT signalnih putova i SP7 su recipročno regulirani (Slika 3.) (Komori, 2019).



Slika 3. Regulacija proliferacije i diferencijacije osteoblasta transkripcijskim faktorima (preuzeto i modificirano iz Komori, 2019.)

### 1.5.2. Poremećaji rasta – niski rast

Niski rast definira se kao visina veća od dva standardna odstupanja ispod srednje vrijednosti za dob (manja od 3. percentile (vrijednost ispod koje se nalazi 3 posto promatrane skupine) (Brastow i sur., 2015).

U većini dijagnostičkih klasifikacija, uključujući klasifikaciju Europskog društva pedijatrijskih endokrinologa, razlikuju se tri glavne skupine poremećaja rasta: primarni poremećaji rasta (npr. klinički definirani sindromi – Turner, Down, Noonan..., koštane displazije, djeca mala za gestacijsku dob s neuspjehom dostizanja rasta), sekundarni poremećaji rasta (npr. pothranjenost, poremećaji organskih sustava, nedostatak hormona rasta, drugi endokrini poremećaji, metabolički poremećaji, psihosocijalni, jatrogeni) i preostala skupina u kojoj nije pronađen prepoznatljiv uzrok. Ova posljednja skupina trenutno je poznata kao idiopatski niski rast (ISS). ISS je podijeljen na obiteljski i neobiteljski niski rast, a oba se mogu dalje podkategorizirati na djecu s odgođenim i normalnim pubertetom (Oostdijk i sur., 2009).

### **1.5.2. Dijagnoza i terapija**

Za dobru diferencijalnu dijagnozu treba prikupiti podatke o povijesti pacijenta, fizikalnom pregledu i rastu kako bi se utvrdili znakovi i simptomi koji mogu ukazivati na određenu bolest. Dijagnostički pristup djetetu može se podijeliti u tri uzastopna koraka.

Prvi korak sastoji se od temeljitog pregleda medicinske i obiteljske povijesti te fizikalnog pregleda. Relevantne informacije uključuju karakteristike pri rođenju, simptome koji ukazuju na kronične organske bolesti, psihijatrijske bolesti i/ili ozbiljne emocionalne smetnje. Fizički pregled uključuje mjerenje visine, težine, opsega glave i raspona ruku. Također treba razmisliti o mjerenju duljine podlaktice, jer je kratka podlaktica važan biljeg haploinsuficijencije SHOX (short-stature homeobox) gena. Abnormalne proporcije tijela snažno upućuju na oblik koštane displazije. Pažljiv pregled dismorfičnih značajki lica i tijela također treba provesti kako bi se otkrili sindromi.

Drugi se korak sastoji od specifičnih ispitivanja, ovisno o određenim kliničkim tragovima u povijesti bolesti i fizikalnom pregledu, na primjer prisutnost disproporcija ili dismorfničkih obilježja.

Kada se sumnja na koštanu displaziju na temelju tjelesnih disproporcija, radiografska analiza je važna za precizniju dijagnozu ili sužavanje broja mogućnosti. Rezultati radiografske analize mogu voditi ciljanoj molekularnoj analizi DNA i mogu pridonijeti učinkovitom pristupu dijagnosticiranju poremećaja rasta.

Mnogo je sindroma povezanih s niskim rastom. Kada su prisutne dismorfične značajke u djeteta niskog rasta, dijagnostička ispitivanja moraju se usredotočiti na sindrome. Ako se sumnja na sindrom, pedijatar u suradnji s kliničkim genetičarom može razmotriti ciljanu DNA analizu.

Budući da u većini slučajeva neće biti prisutnih posebnih tragova iz povijesti bolesti i fizikalnog pregleda, treći korak je nespecifični radiografski i laboratorijski pregled.

Korisna je radiografija šake i zapešća. Na ovom se rendgenskom snimku određuje dob kostiju, koja se također može koristiti za predviđanje visine odrasle osobe s jednim od dostupnih atlasa. Uz to, na rendgenskom snimku šake/zapešća mogu se uočiti abnormalnosti povezane sa SHOX haploinsuficijencijom, kao i znakovi nedostatka vitamina D.

Laboratorijske studije koje se koriste za procjenu glavnih uzroka niskog rasta u djece uključuju sljedeće:

- Mjerenje razine serumskih razina faktora rasta sličnih inzulinu-I (IGF-I) i proteina-3 koji veže IGF (IGFBP-3)
- Kariotip metodom G-benda
- Mjerenje serumske koncentracije GH - primjenjuje se farmakološko sredstvo (najčešće L-dopa, inzulin i dr.) i zatim se određuje koncentracija hormona rasta tijekom 2 sata svakih 30 minuta i na osnovu maksimalne koncentracije hormona rasta utvrđuje njegova sinteza u prednjoj hipofizi.

Ostali korisni testovi uključuju sljedeće:

- Kompletna krvna slika (CBC) broj za hematološku bolest
- Stopa Wintrobe sedimentacije za upalnu bolest crijeva
- Razine ukupnog tiroksina u serumu (ukupni T4) i tirotropina (TSH) za ispitivanje hipotireoze
- Ispitivanje klorida u znoju kako bi se isključila cistična fibrzoza
- Koncentracija serumskog transferina i prealbumina kod pothranjenosti (Oostadijk i sur., 2009).

Medicinska skrb ovisi o etiologiji niskog rasta. Rekombinantni humani hormon rasta (rhHR) odobren je za različita stanja koja uzrokuju niski rast, uključujući Turnerov sindrom, kronično zatajenje bubrega, Prader-Willi sindrom, stanje „malen za gestacijsku dob“ (small for gestational age), Noonanov sindrom, nedostatak SHOX gena i idiopatski nizak rast. Primjenjuje se svakodnevnim injekcijama tijekom nekoliko godina. Injekcije se općenito dobro podnose, ali zabilježene su rijetke nuspojave (Barstow i Rerucha, 2015).

Rekombinantni humani inzulinu slični faktor rasta 1 (rhIGF-1) indiciran je za dugotrajno liječenje niskog rasta u djece s ozbiljnom primarnom insuficijencijom IGF-Ia koja je okarakterizirana odsutnom proizvodnjom IGF-I unatoč normalnom ili povišenom otpuštanju HR (Clark, 2004).

Studije su pokazale da efikasnost je ovih terapija ograničena na manjinu sa dijagnosticiranim manjkom HR. Studija Sehee Choi i suradnika pokazala je indirubin-3'-oksim kao inhibitor GSK $\beta$  potiče rast u visinu aktivacijom Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta u hondrocitima te se

smatra se da bi Wnt/ $\beta$ -katenin signalni put mogao biti potencijalna meta za razvoj terapije rasta (Choi i sur., 2019).

## 1.6. ANALIZA SLIJEDA DNA

Kod analize slijeda DNA, potrebno je najprije razlučiti dva pojma: sekvenciranje i genotipiziranje. **Sekvenciranje** DNA je postupak utvrđivanja točnog redoslijeda četiri baza (A, T, C, G) u danom DNA predlošku (Tubbs i Stoler, ured., 2009), a **genotipiziranje** je postupak utvrđivanja razlika u genetskom sastavu pojedinca u usporedbi s drugim (Liu i sur. 2017)

**Sekvenciranje DNA Sangerovom dideoksi metodom** omogućuje otkrivanje točnog slijeda nukleotida u jednom segmentu DNA tj. potvrđuje sekvencu bilo kojeg sintetskog biološkog plazmida, potvrđuje prisutnost mutacije, insercije ili delecije gena i može se koristiti za sekvenciranje čitavog genoma. Ovaj pristup uključuje **uzorak DNA predloška** koji varira od nekoliko stotina baznih parova koji je stvoren koristeći **lančanu reakciju polimeraze (PCR)** do desetke tisuća baznih parova iz BAC-ova ili cijeli genom. Kod korištenja Sangerove metode samo se jedan predložak DNA sekvencira tijekom svake reakcije sekvenciranja. U samom postupku, DNA polimeraza kopira ciljanu regiju DNA predloška, a kopije se razlikuju u svojoj duljini za jedan nukleotid. Kako bi se saznao redoslijed nukleotida, posljednji nukleotid je dideksinukleotid trifosfat (ddNTP) kojemu nedostaje 3'-OH što zaustavlja DNA sintezu i označen je fluorescentnim biljekom – svaka baza je označena drugom bojom. Fragmenti se zatim razdvajaju kapilarnom elektroforezom tako da manji fragmenti putuju brže, a veći sporije. Kako fragmenti prolaze kroz laser, on pobuđuje fluorofor na 3' kraju koji emitira svijetlo karakteristične boje za svaku bazu i putujući kroz kapilaru, laser pobuđuje, na taj način, svaki sljedeći fluorofor i identificira zadnju bazu dodanu DNA polimerazom tijekom elongacije, dajući u konačnici potpuni slijed nukleotida (Clark i sur., 2019)

**Sekvenciranje sljedeće generacije** (engl. **Next generation sequencing, NGS**) paralelno koristi više metoda što omogućuje sekvenciranje velikog broja DNA uzoraka jedan uz drugog u istom uređaju. U praksi, zahtjeva minijaturizaciju i visokoosjetljivi fluorescentne detektore (Clark i sur., 2019). Općenito, postupak uključuje inicijalni materijal koji može biti genomska DNA (gDNA), mRNA, nekodirajuća RNA ili bilo koji nukleinski/ribonukleinski materijal dobiven određenim postupkom, a implementacija NGS tehnologije može se vizualizirati kroz četiri glavna koraka:

1. Priprema knjižnice ili procesiranje uzorka. Uzorak se najprije fragmentira mehanički ili enzimski u fragmente veličine kompatibilne sa sekvencerom. Zatim se provodi korak amplifikacije PCR-om kroz 4-12 ciklusa. Tijekom tog koraka, za DNA fragmente se vežu odgovarajući linkeri i barkodovi i potrebni su za naknadnu analizu sekvencerom. DNA barkod, koji je jedinstveni nukleotidni biljeg (6-8 nukleotida), omogućuje udruživanje uzoraka u jednu protočnu ćeliju radi reakcije sekvenciranja.
2. Sekvenciranje: najčešće se koriste sekvenceri kao što su Roche, Illumina, Ion torrent, PacBio i OxfordNano pore
3. Inicijalna provjera kvalitete i analiza neobrađenih podataka. Dostupno je mnogo alata za predobradu kako bi se uklanjanje kopija loše kvalitete. Nakon mapiranja, određuje specifičnost tj. grupiranje fragmenata u klastere
4. Interpretacija podataka koja ovisi o određenom programu. Neke računalno-bazirane metode i bioinformatički alati mogu se koristiti za interpretaciju (Raghavendra i Pullaiah, 2018). Za ljudski genom, referentni genom je dostupan za pregled na web stranici Genome Reference Consortium (Clark i sur., 2019).

Kod **ciljanog sekvenciranja**, serija gena ili regija od interesa se izolira iz cijelog uzorka gDNA prije sekvenciranja koristeći NGS. Budući da regije koje kodiraju za proteine, egzoni, češće uzrokuju štetne pogreške, umjesto sekvenciranja cijelog genoma, sekvenciraju se samo egzoni što se naziva sekvenciranje cijelog egzoma. Trenutno se koriste dvije različite metode za stvaranje DNA knjižnice ciljanim sekvenciranjem. Prva metoda koristi multipleks PCR za umnažanje regije genoma od interesa. Cijela gDNA pomiješa se sa PCR početnicama koje amplificiraju ciljane gene. Druga metoda ciljanog sekvenciranja koristi biotinizirane oligonukleotidne sonde koje imaju sekvence komplementarne s odabranim ciljanim genima ili egzonima (Clark i sur., 2019).

**Sekvenciranje treće generacije** uključuje metode koje omogućuju dekodiranje jednog lanca DNA. Prvi primjer je **sekvenciranje pomoću nanopora**. gDNA prolazi kroz nanopore veličine do 1 nm što dopušta prolaz jednolančane DNA. Kako lanac DNA prolazi, detektor bilježi promjenu struje kroz kanal. Svaka baza ima neznatno različitu strukturu i svaka baza blokira struju drugačije tj. u trenutku kada DNA prolazi kroz kanal, normalna ionska struja je smanjena i smanjenje ovisi o slijedu DNA (G > C > T > A). Prednosti tehnologije nanopora



su brzina i mogućnost obrade dugih DNA molekula te više DNA molekula istovremeno. Drugi primjer je **mononuklearno sekvenciranje u stvarnom vremenu (SMRT)** koristi se tehnologijom „vodiča vala u nultom-modu“ (engl. zero-mode waveguides, ZMW) ili nanokontejnere koji dopuštaju prolazak samo jednog lanca DNA. DNA polimeraza produžuje rastući lanac dodajući nukleotide označene s četiri različita fluorescentna biljega. Nadolazeći nukleotidi emitiraju zrake svijetla nakon vezanja. Nakon toga fluorescentni biljeg se ispire i omogućuje sljedeći krug. Slijed boja emitiranog svijetla omogućuje otkrivanje slijeda nukleotida (Clark i sur., 2019)

**Cjelogenomske asocijacijske studije** (engl. *genome wide association studies*, **GWAS**) je oblik studije za identificiranje genetskih varijanti neke osobine i, posebno, otkrivanje povezanosti između uobičajenim SNP-ova sa određenim fenotipom (Huang, ured., 2018). GWA studije su moguće dostupnošću tehnologije DNA čipova za detekciju više od milijun SNP-ova (Bush i sur., 2012). GWA studije se najčešći provodi u dvije skupine – skupina 1 uključuje ispitanike s bolesti ili osobinom od interesa, a skupina 2 je kontrolna skupina tj. uključuje ispitanike bez bolesti ili osobine od interesa. DNA svakog ispitanika ispituje se na poznate genetske varijante koristeći DNA-čipove koji se sastoje od strateški odabranih genetskih varijanti. Ako je neka genetska varijanta značajno prisutna u skupini ispitanika s bolesti ili osobinom, genetsku varijantu možemo povezati s tom bolesti/osobinom. Slično, ukoliko je neka varijanta prisutna u kontrolnoj skupini, tada odsutnost neke varijante možemo povezati sa bolesti/osobinom (Jiang i Tang, urd. 2020). Također provode se GWA studije bez hipoteze (engl. *hypothesis-free*), detektirani SNP-ovi nakon analize DNA se dovode u vezu sa fenotipom od interesa i prednost ovakvog pristupa je što se može dokazati povezanost SNP-ova sa određenom bolesti, iako se SNP nalazi u području DNA bez gena u blizina tzv. „genskim pustinjama“ Takve studije nazivaju se i populacijske studije (engl. *population based*) i njihove kvalitete prospektivnost i longitudinalne su prirode, uključuju veliki broj fenotipa koji se mogu proučavati i veliki broj ispitanika koji su izloženi sličnim okolišnim čimbenicima. Nedostatak takvog tipa studije je definiranje jasne, čiste kontrolne skupine (Robertson i sur., ured., 2016).

**Obiteljske asocijacijske studije** (engl. *family based association studies*) temelje se na **testu nejednakosti prijenosa** (engl. *transmission disequilibrium test (TDT)*), koji određuje povezanost markera od interesa, osobinu ili bolest i obiteljske veze u najmanje jednom od pogođenih potomaka i dva roditelja. Obiteljske asocijacijske studije koriste za evaluaciju

genetske komponente bolesti oslanjajući se na Mendelove zakone nasljeđivanja tj. da dijete nasljeđuje polovicu gena od svakog roditelja. Obitelji se regrutiraju na temelju fenotipa bolesti u djeteta. Prednosti takvih studija jesu očekivana učestalost genotipa uvjetovana je roditeljskim vezama (očigledna je ista genetska pozadina) i na taj način se izbjegava populacijska struktura, korisno je kod određivanja fenotipa skupo (npr. kod biopsija), a također je i važna metoda procjene kvalitete genotipizacije jer se podaci mogu analizirati na Mendelove pogreške. (Robertson i sur., ured., 2016).

Rezultati genskih analiza često se obrađuju računalno koristeći različite programe i alate.

### **1.6.1. DNA čipovi – prednosti i nedostaci**

**DNA čip (DNA microarray)** najčešće je korištena tehnika posljednja dva desetljeća za genotipiziranje tj. detekciju SNP-ova. DNA-čipovi je zbirka jednolančanih DNA fragmenata poredanih u niz u obliku mreže i pričvršćenih na čvrstu površinu ili membranu. Svaka DNA-čip spot sadrži tisuće kopija određene sekvence DNA, poznatijih kao sonde. Svaki DNA-čip uključuju jednu ili nekoliko setova sondi za svaki ispitivani gen (Walhout i sur., ured., 2013; Hacia i sur., 1999). DNA-čipovi dijele se na oligonukleotide i komplementarnu DNA (cDNA). Oligonukleotidni DNA-čipovi najčešće se koriste za identifikaciju mutacija i DNA varijacija na cjelokupnom genomu te sekvenciranje i analiza genoma dok se cDNA-čip najčešće koristi u proučavanju ekspresije gena i detekciji mutiranih gena (Bolarić i sur., 2009).

DNA čipovi oslanjaju se na hibridizaciju između jednolančane DNA trajno vezane za čip i DNA (ili RNA) u otopini. Više različitih molekula DNA mogu se vezati za jedan DNA čip formirajući niz mjesta (spots) na čvrstoj podlozi (DNA čipu). DNA ili RNA koje se analiziraju moraju biti označene, najčešće fluorescentnim biljekom (Clark i sur, 2019). Temeljni princip izvođenja eksperimenta uključuje pet glavnih koraka: priprema uzoraka, hibridizacijsko pranje, prikupljanje i neutralizacija slike i analiza podataka (Worku i Negassu, 2019).

DNA čipovi imaju neke prednosti i nedostatke. Prednost DNA-čipova jest ta da omogućuju istovremenu analizu detekcije ili ekspresije nekoliko gena na jednom DNA čipu. DNA-čip tehnologija nudi prednost multipleksiranja u minijaturnom formatu što znači i smanjenje potrošnje reagensa i uzoraka što je u nekim slučajevima ograničavajući faktor (Petrik i sur, 2010). Korisni su za identifikaciju različitih bolesti kao što je rak, na polju farmakogenomike,

doprinosu otkrivanju mutacija gena i profiliranju njihove ekspresije, regulacije i otkrivanju genetskih bolesti i SNP-ova (Ranganathan i sur., ured., 2018).

Međutim, nedostaci DNA čipova uključuju dugotrajnu analizu rezultata jer se prekupi velika količina podataka iz svakog DNA-čipa. Rezultati su vrlo složeni za tumačenje i nisu uvijek kvantitativni. Tehnologija je skupa, a nizovi (array) indirektno daju mjeru relativne koncentracije. Pogotovo za složene genome sisavaca, teško je dizajnirati DNA-čipove u kojemu se višestruko povezane DNA sekvence ne vežu za istu sondu. Također, DNA-čip može detektirati samo sekvencu za koju je dizajniran (Worku i Negassu., 2019).

Trenutno najpoznatiji proizvođač DNA-čipova za SNP genotipizaciju jest Illumina koja koristi silikonske mikroznca (microbeads). Na površini svakog DNA-čipa nalazi se stotine tisuća do milijun genotipova za jednu jedinku. Silikonska mikroznca su pažljivo poslagana u jažicama i presvučena s višestrukim kopijama oligonukleotidne sonde usmjerene na određeni lokus u genomu ([www.illumina.com](http://www.illumina.com)).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ovaj diplomski rad analiza je slučaja pacijentice niskog rasta idiopatskog tipa kroz TDT analizu izvedenu na članovima uže i šire obitelji pacijentice.

Početna točka ovog istraživanja bila je dostupna liječnička dokumentacija kojom je zaključeno da ne postoji manjak hormona rasta, prisutne su normalne razine hormona štitnjače, isključena je prisutnost mutacija SHOX gena (engl. *Short Stature Homeobox-Containing gene*) i gena receptora faktora rasta fibroblasta 3 (FGFR3) za koji se najčešće provode analize detekcije mutacije pri dijagnosticiranju niskog rasta.

S ovim saznanjima, pretpostavka je da postoje nizvodni signalni putevi koji nisu pravilno regulirani te je cilj rada bio objasniti genetsku pozadinu i potencijalno otkriti uzrok niskog rasta uzimajući u obzir obiteljske veze, budući da je iz obiteljskog stabla vidljivo da postoji određeni obrazac nasljeđivanja.

Cilj istraživanja je ispitati radi li se o monogenском poremećaju ili je niski rast ispitanice posljedica poligenских učinaka. Istraživanje bi također moglo doprinijeti boljem razumijevanju povezanosti signalnih puteva uključenih u rast i razvoj kao i njihove genske pozadine u različitim tkivima.

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. UZORCI**

Uzorci korišteni u ovom istraživanju uzeti su od 16 ispitanika na temelju detaljne obrade obiteljskog stabla koje je sadržavalo informacije o visini i dobi ispitanika za koje se pretpostavilo da bi mogli sadržavati mutaciju ili polimorfizam od interesa. Sudjelovalo je 8 muških i 8 ženskih ispitanika s rasponom godina od 14 godine do 75 godina. Prikupljen je uzorak krvi svakog ispitanika koristeći pritom vakuumske epruvete s K3-EDTA antikoagulansom (Greiner bio-one VACUETTE® blood collection tubes, 6 ml).

### **3.2. MATERIJALI**

U eksperimentalnom dijelu ovog rada, korištene su sljedeće kemikalije i reagensi:

- etanol 96 %-tni (J.T. Baker)
- ultračista voda
- QIAamp® DNA mini Kit za izolaciju DNA (Qiagen)

### **3.3. OPREMA**

U eksperimentalnom dijelu ovog rada, korištena je sljedeća oprema:

- Vakuumske epruvete VACUETTE® s K3-EDTA antikoagulansom, 6 ml (Greiner bio-one)
- Centrifuga 5804 (Eppendorf)
- Pipeta Pipet-Lite XLS (Rainin)
- Tube za mikrocentrifugu 1,5 ml (Thermo Scientific™)
- Grijač Thermo–Shaker TS-100 (BIOSAN)
- Mješač (Vortex-Genie™)
- Mikrocentrifuga 5415 D (Eppendorf)
- Spektrofotometar NanoDrop 8000 (Thermo Scientific™)

### **3.4. PRIPREMA UZORAKA**

Najprije je bilo potrebno pripremiti trombocitno – leukocitni međusloj (buffy coat) iz pune krvi. Priprema buffy coata iz pune krvi jednostavna je i daje približno 5–10 puta više DNA od ekvivalentnog volumena pune krvi. Uzorci su na sobnoj temperaturi (15-25°C) podvrgnuti centrifugi na 2500 g na 10 minuta. Nakon centrifuge, bilo je moguće razlikovati 3 različite frakcije: gornji sloj – krvna plazma, srednji sloj – buffy coat koji sadrži leukocite i donji sloj –

koncentrirani eritrociti. Nakon dezinfekcije alkoholom, koristeći pipetu, srednji sloj leukocita prenio se u tube za mikrocentrifugu i označio se broj uzorka (1-16), mijenjajući pritom vrh pipete za svaki uzorak.

Za izolaciju DNA korišten je komplet za izolaciju DNA QIAamp® DNA Blood Mini Kit. Komplet sadrži: QIAamp mini spin kolone, sabirne tube (2ml), pufer AL, pufer AW1 (koncentrat), pufer AW2 (koncentrat), pufer AE, QIAGEN® proteaza i otapalo za proteazu.

DNA je izolirana iz buffy coat-a koristeći spin protokol. Prije početka postupka izolacije, bilo je potrebno zagrijati grijači blok na 56°C koji se koristi kasnije u postupku. Za pripremu QIAGEN® proteaze, potrebno je dodati 5,5 ml otapala za proteazu u bočicu koja sadrži liofiliziranu QIAGEN® proteazu. Pufer AW1 i pufer AW2 razrjeđuju se sa 96%-nim etanolom do razine označene na bočici.

Prema protokolu, najprije se pipetom u tubu za mikrocentrifugu doda 20 µl QIAGEN® Protease. Zatim se dodaje 200 µl uzorka (u našem slučaju – buffy coat). Nakon toga dodaje se 200 µl pufera AL i sve zajedno se vorteksira na mješaču 15 sekundi. Sve zajedno inkubira se na 56°C grijačem bloku tijekom 10 minuta. Tube za centrifugu se kratko centrifugiraju koristeći mikrocentrifugu kako bi se uklonile kapljice s unutarnje strane poklopca. Nakon toga doda se 200 µl 96%-tnog etanola u uzorak i ponovo se izmiješa vorteksiranjem 15 sekundi. Nakon vorteksiranja, uzorci se kratko centrifugiraju kako bi se uklonile kapljice s unutarnje strane poklopca. Dobivena smjesa se pažljivo nanese na QIAamp Mini spin kolonu (koja se nalazi u sabirnoj tubi od 2 ml). Nakon zatvaranja poklopca, uzorci se centrifugiraju na 6000 x g (8000 rpm) jednu minutu. Zatim se QIAamp Mini spin kolona prebaci u čistu sabirnu tubu od 2 ml, a tuba s filtratom se odbacuje. Po potrebi, trebalo je ponoviti centrifugu kako bi se QIAamp Mini spin kolona potpuno ispraznila. Nakon centrifuge, u QIAamp Mini spin kolonu doda se 500 µl pufera AW1 oprezno kako se ne bi smočio rub. Ponovo, nakon zatvaranja poklopca, uzorci se centrifugiraju na 6000 x g (8000 rpm) jednu minutu. Zatim se QIAamp Mini spin kolona prebaci u čistu sabirnu tubu od 2 ml, a tuba s filtratom se odbacuje. Nakon toga, u QIAamp Mini spin kolonu doda se 500 µl pufera AW2 i centrifugira na najvećoj brzini (20000 x g, 14 000 rpm) kroz tri minute. Filtrat se odbaci, a QIAamp Mini spin kolona se baci u čistu tubu za mikrocentrifugu od 1.5 ml. Na kolonu se doda 200 µl pufera AE, inkubira se na sobnoj temperaturi jednu minuti i centrifugira na 6000 x g (8000 rpm) jednu minutu.

Za provjeru uspješnosti izolacije DNA koristio se spektrofotometar NanoDrop 8000. Uređaj omogućuje mjerenje koncentracije DNA iz jednog uzorka ili paralelno iz 8 različitih uzoraka. Koncentracija nukleinskih kiselina određuje se mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm. Također, uređaj mjeri i apsorbanciju pri 280 nm što je maksimum apsorbancije proteina pa omjer apsorbancija pri 260 nm i 280 nm ukazuje na čistoću uzorka. Kako bi se uzorak smatrao čistim, omjer apsorbancija mora biti veći od 1,8. Uređaj mjeri i apsorbanciju pri 230 nm što je apsorbancija organskih otapala i poželjan je da omjer bude unutar raspona 2-2,2. Raspon koncentracija koje uređaj mjeri jest od 5 do 3000 ng/μl.

Za mjerenje koncentracije DNA koristio se program „NanoDrop 800, verzija 2.3.2“, modul rada „Nucleic Acids“. Prije nanošenja uzorka, za inicijaciju uređaja bilo je potrebno nanijeti 1,5 μl ultračiste vode. Voda se pipetom nanosi na podnožje uređaja bez razlijevanja i raspršivanja izvan predviđenog područja. Zatvori se ruka za uzorkovanje i pokrene se naredba u računalnom sustavu. Potom se optička površina prebriše papirnatom maramicom i mjeri se apsorbancija slijepe probe koristeći 1,5 mL pufera AE. Nakon toga se nanose uzorci na podnožje uređaja, zatvori se ruka za uzorkovanje i u operativnom sustavu na računalu pokrene se mjerenje apsorbancije pomoću koje će se prema Beer-Lambertovom zakonu izračunati koncentracija. Za daljnju analizu DNA, bio je dovoljan uzorak od 50 μl koncentracije DNA od oko 60 ng/ μl, stoga se svaki od uzorka dodatno razrijedio puferom AE do željene koncentracije. Provjera koncentracije nakon razrjeđivanja provedena je na isti način koristeći Nanodrop 8000. Dobiveni rezultati navedeni su u Tablici 1.

**Tablica 1.** *Koncentracija izolirane DNA i količine uzorka i pufera potrebnih za dobivanje približne koncentracije od 60 ng/μl*

Oznaka uzorka u istraživanju	Originalna koncentracija (ng/μl)	Volumen uzorka (μl)	Volumen pufera AE (μl)	Koncentracija nakon razrijeđivanja (ng/μl)
1	187,3	16,01	33,99	61,51
2	103,3	29,04	20,96	60,84
3	167,1	17,95	32,05	58,2
4	94,86	31,63	18,37	58,01
5	90,49	33,15	16,85	59,75
6	59,28	50	/	59,28
7	115,8	25,91	24,09	58,0
8	197	15,23	34,77	59,9
9	121,1	24,77	25,23	59,44
10	315,1	9,52	40,48	63,17
11	828,9	3,81	46,19	61,33
12	88,52	33,89	16,11	60,06
13	60,21	50	/	60,21
14	90,18	33,26	16,74	57,97
15	145,7	20,59	29,41	57,78
16	181,7	16,51	33,49	59,33

### 3.5. OBRADA DNA – GENOTIPIZIRANJE

Nakon izolacije DNA, uzorci su poslani na genotipizaciju u Helmholtz Zentrum Munchen, njemački istraživački centar za zdravlje i okoliš, Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Oberschleißheim, Njemačka.

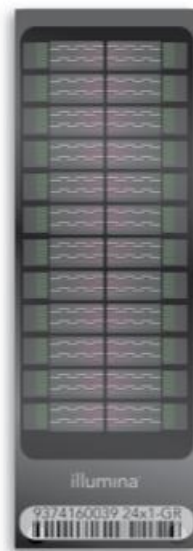
Svi su uzorci genotipizirani s Illumina GSA + Multi-Disease array (Global screening Array-24 + v1.0). Analiza je rađena pomoću softvera GenomeStudio v2.0.

Global Screening Array-24 (GSA) + v1.0 je napredni niz (array) za genotipiziranje koji se koristi za populacijske genetske studije, detekciju varijacija i u istraživanjima precizne medicine. GSA set za genotipizaciju uključuje Illumina DNA-čip i reagense za amplifikaciju,



fragmentiranje, hibridizaciju, označavanje i otkrivanje genetskih varijanti koristeći visokopropusni Infinium tijekom rada ([www.usc.es](http://www.usc.es))

Najprije je potrebno kvantificirati i provesti amplifikaciju DNA, nakon čega slijedi inkubacija DNA tijekom 24 sata. Nakon toga potrebno je provesti fragmentaciju DNA, istaložiti i resuspendirati DNA. Zatim slijedi hibridizacija DNA na DNA-čipu. Svaka sonda veže komplementarnu sekvencu uzorka DNA, zaustavljajući se jednu bazu prije lokusa od interesa. Specifičnost alela se potvrđuje ugradnjom jedne baze obilježene fluorescentnim biljekom. Nakon pobuđivanja laserom, nukleotid emitira svjetlosni signal, a intenzitet signala nam daje informacije o alelnom omjeru na tom lokusu, s svi prikupljeni podaci procjenjuju se koristeći software GenomeStudio v2.0. ([www.support.illumina.com](http://www.support.illumina.com))



Slika 4. Illumina DNA-čip (izvor: [www.usc.es/cegen/wp-content/uploads/2017/06/infinium-commercial-gsa-data-sheet-370-2016-016.pdf](http://www.usc.es/cegen/wp-content/uploads/2017/06/infinium-commercial-gsa-data-sheet-370-2016-016.pdf))

### 3.6. RAČUNALNA OBRADA PODATAKA

Rezultati dobiveni genotipiziranjem, obrađeni su u računalnom programu Plink (parametri: --noweb, --missing, --tdt, --1).

Svi SNP-ovi koje je TDT identificirao i postigli su statističku značajnost, pretraženi su koristeći SNP bazu podataka Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/)) i Ensembl pretraživač genoma (<http://www.ensembl.org>). Nakon što su ustanovljeni geni kojima pojedini SNP-ovi pripadaju, daljnja obrada temeljila se na genima koji su se pojavili više od jednom. Takav pristup povećava vjerojatnost da su odabrani geni uistinu povezani s visinom kao promatranim fenotipom unutar obitelji. Sljedeći

korak u analizi bila je identifikacija prethodno filtriranih gena koji su nekim od do sad provedenih GWAS studija povezani s tjelesnom visinom i razvojem. .

Konačno, ovako odabrani geni učitani su u gensku mrežu ([www. hb.flatironinstitute.org](http://www.hb.flatironinstitute.org)) koja identificira funkcionalnu povezanost gena i pruža detaljan prikaz funkcije proteina i interakcije u određenim ljudskim tkivima.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Nakon genotipiziranja i obrade rezultata u računalnom programu Plink, identificirano je ukupno 618 540 SNP-ova, od kojih je izdvojeno 200 SNP-ova koji su postigli određenu razinu statističke značajnosti, u ovom slučaju  $P \leq 0,0014$  (Tablica 2.). Da bi određeni SNP dosegao GWAS važnost, najčešće prihvaćeni prag je  $P < 5 \times 10^{-8}$  koji se temelji na izvođenju Bonferronijeve korekcije za sve neovisne uobičajene SNP-ove u ljudskom genomu (Xu i sur., 2014), no s obzirom na primjenu TDT-a kao i na relativno mali broja uzoraka prihvaćamo i veću P-vrijednost kao početnu točku analize.

*Tablica 2. Statistički značajni polimorfizmi dobiveni TDT analizom*

CHR	SNP	BP	A1	A2	P	GEN
2	rs1706864	2519911	A	G	0,0014	
2	rs11893330	2674273	T	C	0,0014	AC018685.2
2	rs10181839	5241229	C	T	0,0014	
2	rs72830111	84528915	G	A	0,0014	LOC107985905
2	rs56364655	101471410	A	C	0,0014	NPAS2
2	rs3771166	102986222	C	T	0,0014	IL18R1
2	GSA-rs6758936	102991369	G	A	0,0014	IL18R1
2	rs4954056	134261846	A	G	0,0014	NCKAP5
2	rs6430600	136836365	A	G	0,0014	
2	rs7569447	136863816	A	C	0,0014	LOC112268426
2	rs4954394	136917330	A	G	0,0014	
2	GSA-rs6711997	136922672	T	C	0,0014	
2	rs6718997	140180201	A	G	0,0014	LOC105373645
2	rs11688725	140200435	T	C	0,0014	LOC105373645
2	rs16855933	140204444	C	T	0,0014	LOC105373645

2	rs11678493	140251642	A	G	0,0014	
2	rs1837161	140423871	T	C	0,0014	
2	rs17814868	144068279	G	A	0,0014	ARHGAP1 5
2	rs6430026	144133880	G	T	0,0014	ARHGAP15
2	rs1196661	150325840	C	T	0,0014	LYPD6
2	rs148186958	150360509	G	T	0,0014	
2	GSA-rs7578361	150397218	G	T	0,0014	
2	GSA-rs4667337	150450828	C	T	0,0014	MMADHC-DT
2	rs60076148	151767049	T	G	0,0014	
2	rs58545632	151767050	C	T	0,0014	
2	rs7419518	154536009	G	T	0,0014	
3	rs149863	137482363	G	A	0,0014	SOX14
3	rs66578728	137482795	C	T	0,0014	SOX14
3	rs9821781	149362405	G	A	0,0014	WWTR1
3	rs1464504	195300284	C	T	0,0014	APOD
3	GSA-rs2291652	195477791	A	G	0,0014	MUC4
3	rs12630536	195480414	T	C	0,0014	MUC4
3	rs2688494	195531805	G	T	0,0014	MUC4
3	rs4591526	196346273	A	C	0,0014	
4	rs4697095	25427554	C	T	0,0014	LOC105374536
4	rs2324713	25431010	G	A	0,0014	LOC105374536
4	GSA-rs10008104	25444762	A	G	0,0014	LOC105374536
4	rs7688399	28967598	A	G	0,0014	
4	rs1821685	29311144	A	G	0,0014	
4	GSA-rs13128868	31329383	T	G	0,0014	
4	rs13135059	31339067	A	G	0,0014	
4	GSA-rs13108368	31351228	T	C	0,0014	
4	rs10489008	31718284	T	G	0,0014	LOC105374566
4	rs9996566	37884116	C	A	0,0014	
5	rs1296958	55913744	A	G	0,0014	
5	rs55886308	57924509	G	T	0,0014	RAB3C
5	rs10805402	65132797	T	C	0,0014	NLN

5	GSA-rs67010753	65989593	T	G	0,0014	MAST4
5	GSA-rs446769	110493237	T	C	0,0014	
5	rs1821908	110496071	A	C	0,0014	
5	rs2914184	112964553	A	G	0,0014	
5	exm2270237	113072475	C	T	0,0014	
5	rs10050725	113779421	G	A	0,0014	KCNN2
5	rs749125	139166808	T	C	0,0014	PSD2
5	rs1422780	139185509	A	G	0,0014	PSD2
5	rs10463300	149971345	C	T	0,0014	SYNPO
5	rs1059829	151042029	T	C	0,0014	SPARC
5	rs4362934	151894641	A	C	0,0014	AC008571.2
5	rs1368319	155540311	T	C	0,0014	SGCD
5	GSA-rs7732563	164692816	G	A	0,0014	
5	GSA-rs13179338	164846823	A	G	0,0014	AC008415.1
6	rs2745593	1603402	A	G	0,0014	FOXCUT
6	rs34629179	2597019	T	C	0,0014	
6	rs9405214	3963841	A	G	0,0014	
6	rs2147374	4013741	A	G	0,0014	
6	rs4492236	5954189	A	C	0,0014	LOC105374898
6	GSA-rs1889508	6535234	G	A	0,0014	LY86-AS1
6	rs10458092	6571262	T	C	0,0014	LY86-AS1
6	rs9405948	6612048	T	C	0,0014	LY86-AS1
6	rs7738221	6908368	G	T	0,0014	AL158817.1
6	rs6922018	7918311	A	G	0,0014	BLOC1S5- TXNDC5
6	rs6900613	8351628	T	C	0,0014	AL355499.2
6	rs68066010	10810349	G	A	0,0014	MAK
6	rs518204	10829319	C	T	0,0014	MAK
6	rs6456719	10863325	A	C	0,0014	AL024498.2
6	rs12211124	10886585	C	T	0,0014	SYCP2L
6	rs2153157	10897488	C	T	0,0014	SYCP2L
7	rs4472413	15413574	C	A	0,0014	AGMO

7	rs6951399	15496808	G	T	0,0014	AGMO
7	rs10264031	19254640	C	T	0,0014	
7	rs56260469	22816798	G	A	0,0014	
7	rs7779573	22831386	C	T	0,0014	
7	rs73081509	30230933	T	G	0,0014	
7	rs12056030	51500101	C	A	0,0014	
7	rs139801869	66624517	A	G	0,0014	TYW1
8	rs7844344	58707002	A	G	0,0014	AC104051.1
8	rs6471656	58760048	A	G	0,0014	
10	GSA-rs9420495	82452030	T	C	0,0014	
10	rs3011703	87519043	G	A	0,0014	GRID1
10	rs1870168	87940997	A	G	0,0014	GRID1
10	rs6585998	87943609	T	C	0,0014	GRID1
10	rs11016519	130663526	C	A	0,0014	
10	rs543469	131023108	A	G	0,0014	
10	GSA-rs1891792	132882247	A	G	0,0014	
10	GSA-rs11156481	133647554	T	C	0,0014	
10	GSA-rs10870302	134191738	T	G	0,0014	LRRC27
10	rs4394754	134343062	T	C	0,0014	LOC107984282
11	rs76963787	5168423	A	C	0,0014	OR52A1
11	rs7482505	5172398	A	G	0,0014	OR52A1
11	GSA-rs7940626	5175477	A	G	0,0014	OR52A1
11	GSA-rs7109435	21260658	A	G	0,0014	NELL1
11	rs10833917	23061291	G	A	0,0014	
11	exm2267263	34637669	G	A	0,0014	
11	rs10488740	34648615	A	G	0,0014	EHF
11	rs7945550	34656664	G	A	0,0014	EHF
11	rs286912	34657144	G	A	0,0014	EHF
11	GSA-rs35556136	34657902	T	C	0,0014	EHF
11	GSA-rs2421823	35264055	C	T	0,0014	
11	GSA-rs3847607	35321585	G	T	0,0014	SLC1A2

11	rs4756214	35365938	T	C	0,0014	SLC1A2
11	rs10838269	44378010	C	T	0,0014	
11	rs1991550	44576263	T	C	0,0014	
11	GSA-rs624285	79631786	A	G	0,0014	
11	rs607301	79683501	A	G	0,0014	LOC107984424
11	rs694434	79693196	T	G	0,0014	
11	rs635035	79705861	G	A	0,0014	
11	exm2271629	81006339	T	C	0,0014	rs2032408; AP003464.1, lncRNA
11	GSA-rs7933375	83613351	T	C	0,0014	DLG2
11	rs1787705	116561938	T	C	0,0014	
11	rs582285	117362948	T	C	0,0014	DSCAML1
11	rs7942406	117371563	G	T	0,0014	DSCAML1
11	GSA-rs7112940	117373432	G	A	0,0014	DSCAML1
12	rs11064212	789199	C	T	0,0014	LINC02455
12	rs12368682	3714374	G	A	0,0014	
12	rs10849040	4441906	T	C	0,0014	TIGAR
12	rs17700406	4462598	C	T	0,0014	TIGAR
12	GSA-rs10744643	4475194	C	T	0,0014	AC008012.1
12	rs11168248	48208277	T	G	0,0014	HDAC7
12	rs3825184	49298340	T	C	0,0014	CCDC65
12	rs149411	51380232	C	T	0,0014	SLC11A2
12	rs17739600	53210145	T	C	0,0014	
12	rs10876354	53217701	C	A	0,0014	KRT79
12	rs7303938	59210932	C	T	0,0014	
12	rs6581213	59211708	T	C	0,0014	
12	rs11173807	61589225	G	A	0,0014	
12	rs1371918	62402964	A	G	0,0014	TAF2
12	rs1152966	70319391	A	G	0,0014	MYRFL
12	rs1152965	70320126	C	T	0,0014	MYRFL
12	rs111660403	74025208	A	G	0,0014	
12	GSA-rs11115556	83429797	G	A	0,0014	TMTC2
12	rs12815690	83458530	C	T	0,0014	TMTC2

13	rs9520283	107706240	T	C	0,0014	
13	rs746950	107748663	A	G	0,0014	
13	rs10508184	107840018	C	T	0,0014	FAM155A
13	GSA-rs4142907	107842221	A	G	0,0014	FAM155A
13	rs277841	109713064	A	G	0,0014	MYO16
13	rs7335064	109731736	T	G	0,0014	MYO16
13	GSA-rs4771625	109738100	A	C	0,0014	MYO16
13	rs9301353	109776079	T	C	0,0014	MYO16
13	rs7332168	109804318	A	G	0,0014	MYO16; LOC105370356
13	rs2528768	112073092	T	C	0,0014	LOC107984618
13	rs1028974	112075082	T	C	0,0014	LOC107984618
13	rs1163847	112079633	C	T	0,0014	LOC107984618
14	rs35073208	63110673	G	A	0,0014	
14	rs12436368	63113649	C	A	0,0014	
14	GSA-rs4902350	65422365	T	G	0,0014	RAB15
14	rs2411993	65618655	T	G	0,0014	
14	rs7143324	69755470	A	G	0,0014	GALNT16
14	rs1299911	90980279	T	C	0,0014	
14	rs1280068	97465776	A	G	0,0014	
14	GSA-rs1884062	97516313	T	C	0,0014	LOC105370647
15	rs4134803	22958104	G	A	0,0014	CYFIP1
15	rs3736186	25925195	A	G	0,0014	ATP10A
15	rs34315951	27732700	A	G	0,0014	GABRG3
15	rs3101609	27842699	G	A	0,0014	
15	rs1531502	27847893	T	C	0,0014	
15	rs11629580	33431375	T	C	0,0014	FMN1
16	GSA-rs7192453	75735339	C	T	0,0014	DUXB
16	rs7202210	75820543	T	C	0,0014	LOC105371348
18	rs10460040	45735556	C	T	0,0014	ZBTB7C
18	rs10853572	46381949	C	T	0,0014	CTIF
18	rs9956106	65913720	A	G	0,0014	AC005909.2
18	rs664144	65933548	T	C	0,0014	LINC01912

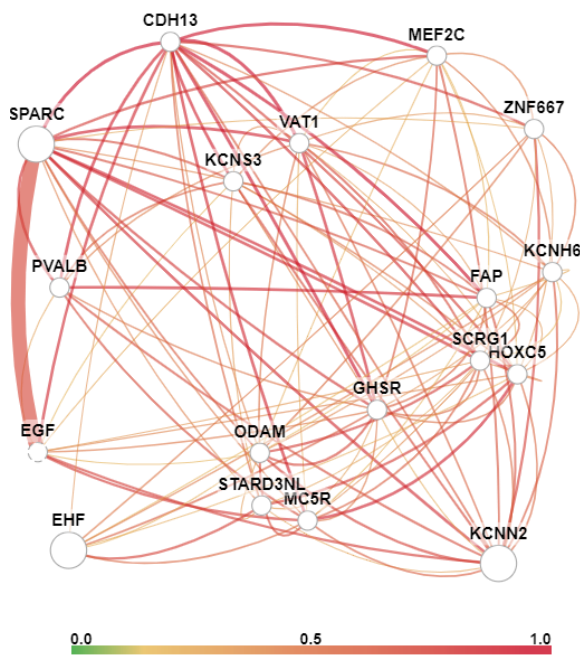
18	rs9789218	66133376	G	A	0,0014	AC005909.2
19	rs1122608	11163601	T	G	0,0014	SMARCA4
19	rs55677033	11166293	T	C	0,0014	SMARCA4
19	rs7246968	12651854	A	G	0,0014	ZNF564
19	rs9917042	14494473	A	G	0,0014	ADGRE5
19	rs11666324	17562969	T	C	0,0014	AC010319.2
19	rs11666579	17590281	G	T	0,0014	SLC27A1
19	rs35002349	17757722	T	G	0,0014	UNC13A
19	rs375947	18180451	G	A	0,0014	IL12RB1
19	GSA-rs2190803	28453315	A	C	0,0014	LOC101927151
19	GSA-rs4805298	29396344	T	C	0,0014	LINC00906
19	GSA-rs2016528	29770679	A	G	0,0014	AC007786.4
19	GSA-rs2865863	29781221	T	C	0,0014	LOC284395
19	rs8113773	30350139	A	G	0,0014	
19	rs1433064	30824105	T	G	0,0014	ZNF536
19	rs7259428	31104579	T	C	0,0014	ZNF536
19	rs1978454	51073579	A	G	0,0014	LRRC4B
20	rs235725	6792145	T	G	0,0014	
20	rs6044166	16594573	A	G	0,0014	LOC105372542
20	rs979242	18201837	A	G	0,0014	
20	rs6136880	19885390	G	A	0,0014	RIN2
20	rs2208139	37908954	C	T	0,0014	
20	rs932384	37994003	T	G	0,0014	
20	GSA-rs1467400	38131089	C	T	0,0014	
20	rs910592	38152488	T	C	0,0014	
22	rs5994256	17798800	T	C	0,0014	

Pregledom literature, SNP-ovi od interesa pokazali su se:

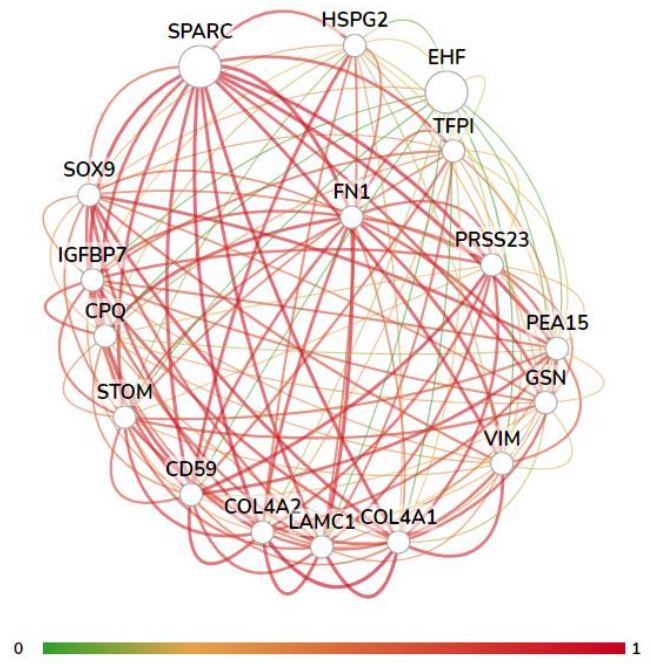
- na kromsomu 5:
  - *rs1059829* unutar gena SPARC (osteonektin)
- na kromosomu 11:
  - *rs10488740*, *rs7945550*, *rs286912* i *rs35556136* unutar gena EHF (ETS homologni faktor)



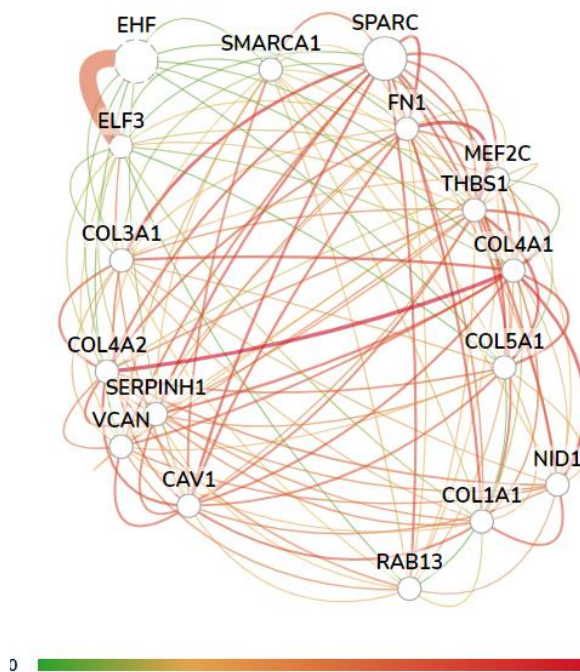
Geni SPARC i EHF učitani su u gensku mrežu kako bismo dobili uvid u povezanost gena u različitim tkivima: hipotalamus (Slika 5.), koštano tkivo (Slika 6.), mišićno tkivo (Slika 7.), osteoblast (Slika 8.) i hondrociti (Slika 9.).



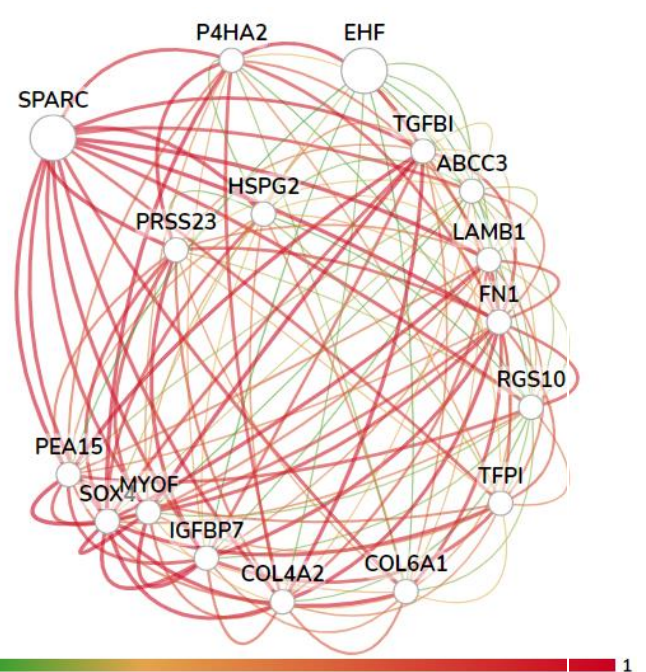
Slika 5. Povezanost gena od interesa u mreži gena u hipotalamusu



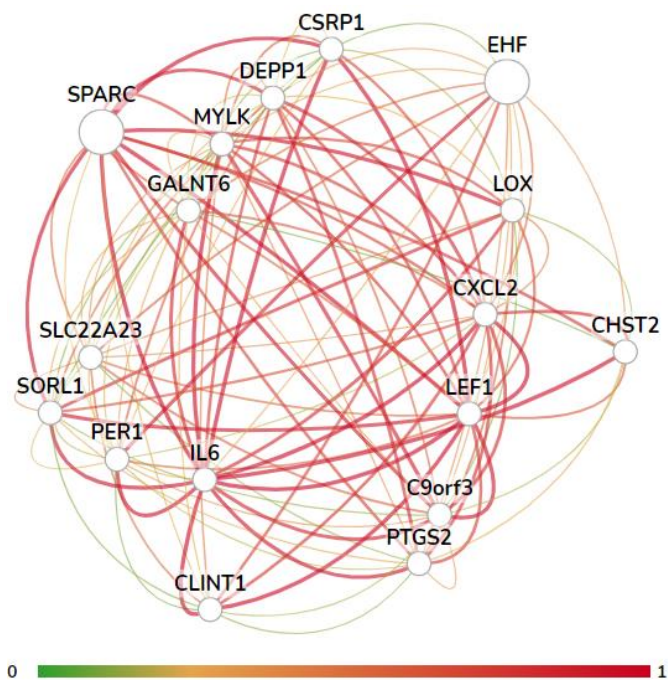
Slika 6. Povezanost gena od interesa u mreži gena u koštanom tkivu



Slika 7. Povezanost gena od interesa u mreži gena u mišićnom tkivu



Slika 8. Povezanost gena od interesa u mreži gena u osteoblastu



Slika 9. Povezanost gena od interesa u mreži gena u hodroocitu

Pokazalo se da u hipotalamusu, kao centru za kontrolu rasta, geni SPARC i EHF pokazuju snažnu povezanost s kadherinom 13 (CDH13) – korelacijski faktor iznosi 0.68 te ćemo njegovu ulogu u rastu također objasniti u raspravi.

#### 4.1. OSTEONEKTIN (SPARC)

Gen koji kodira za osteonektin (SPARC) nalazi se na kromosomu 5q131-q33 i građen je od 10 eksona i 9 introna ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

SNP *rs1059829* dobiven rezultatima analize nalazi se unutar introna 3' netranslatirane regije (3'UTR) tj. nizvodno od protein kodirajuće sekvence SPARC gena i pokazalo se da 3'UTR uključena je u brojne regulatorne procese uključujući cijepanje transkripta, stabilnost i poliadenilaciju, translaciju i lokalizaciju mRNA tj. 3'UTR je bitna za određivanje sudbine mRNA i za vezanje brojnih regulatornih proteina i microRNA (Barett i sur., 2012).

SPARC je matricelularni protein koji veže kalcij, molekularne težine 32 kDa i građen je od domene koja veže kolagen i domene koja veže hidroksiapatit (HA) te ga izlučuju osteoblasti tijekom formiranja kostiju. Također SPARC potiče ekspresiju RUNX2 kao ključnog faktora za formiranje osteoblasta i gena specifičnog za osteoblaste, osteokalcin. te se pokazao kao pozitivni i negativni regulator stanične proliferacije tj. pokazalo se da SPARC inhibira

adipogenezu na račun osteoblastogeneze putem Wnt/ $\beta$ -katenin signalnog puta. SPARC aktivira kinazu povezanu integrinom (ILK) koja fosforilira GSK3 $\beta$  i inhibira njezinu aktivnost te dovodi do nakupljanja  $\beta$ -katenina u citosolu i dolazi do njegove translokacije u jezgru i aktivacije TCF/LEF transkripcijskih faktora koji reguliraju ekspresiju mnogih gena uključujući i gene koji kodiraju faktore rasta i ECM proteine. SPARC aktivira ILK kroz interakciju s integrinima ili preko tirozin-kinaznih receptora (receptora za faktore rasta) (Nie i Sage, 2008; Schiemann i sur. 2003).

Nedostatak ekspresije SPARC-a pokazao je da se smanjuje nakupljanje zrelog kolagena u izvanstaničnom matriksu (ECM) u mnogim vezivnim tkivima. SPARC-knockout miševi pokazuju nedostatak kolagena 1 u koži, kostima i ligamentima. Također fenotip SPARC-knockout miševa uključuje kovrčav rep, smanjenje mineralne gustoće kostiju, osteopeniju u ranoj dobi i smanjena duljina bedrene kosti (Rosset i Bradshaw, 2016). Mutacije SPARC gena uzrokuju osteogenesis imperfekta tip 4 koja je karakterizirana poremećajem u vezivnom tkivu, predispozicijom za rekurentne prijelome kostiju, deformacijama kostiju i niskim rastom (Mendoza-Londono i sur, 2015).

Obitelj mikro-RNA miR-29, koja se sastoji od miR-29a, -29b i 29-c, uključena je u kontrolu ECM. Vezna mjesta miR-29 unutar osteonektina nalaze se u 3'UTR i miR-29 pozitivno regulira diferencijaciju osteoblasta kontrolirajući ekspresiju osteonektina, ali i ostalih faktora (Kapinas i sur, 2009).

Pretpostavka je da prisutan SNP *rs105982* u 3'UTR onemogućuje vezanje miR-29 i ekspresija SPARC-a nije pravilno regulirana što posljedično ima utjecaj na ekspresiju RUNX2 i aktivaciju WNT signalnog puta kao ključnog signalnog puta odgovornog za osteoblastogenezu u zoni rasta, a posljedično tome i longitudinalni rast.

#### **4.2. ETS HOMOLOGNI FAKTOR (EHF)**

Gen koji kodira za ETS homologni faktor nalazi se na kromosomu 11p13 i građen je od 17 eksona i 16 introna ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

SNP-ovi *rs10488740*, *rs7945550*, *rs286912* i *rs35556136* dobiveni rezultatima analize nalaze se unutar introna uzvodno od EHF genskog transkripta. SNP-ovi unutar introna mogu utjecati na alternativno cijepanje ometajući prepoznavanje mjesta cijepanja (Lin i sur., 2019).

EHF dio je ETS obitelji transkripcijskih faktora koji imaju važnu ulogu u hematopoezi, angiogenezi, organogenezi, onkogenezi i razvoju općenito (Kas i sur, 1999). Tijekom razvoja kralježnjaka većina gena ETS obitelji ekspresirana je u različitim tkivima uključujući kosti, pluća, timus, koža i gastrointestinalnom traktu (Raouf i Seth., 2000) . EHF regulira diferencijaciju epitelnih stanica cijelim putem od determinacije sudbine stanice do završetka diferencijacije. Jedan od faktora koji utječe na diferencijaciju stanica, receptor faktora rasta hepatocita (c-MET), čiji gen sadrži, uz vezno mjesto c-MET promotora, i dva vezna mjesta visokog afiniteta za EHF koji, kao dio regulatorne regije, pozitivno regulira ekspresiju c-MET gena (Kas i sur, 1999). Pokazalo se da c-MET-MAPK/ERK-Smad i c-Met-PI3K-AKT-Smad signalni putova pozitivno reguliraju diferencijaciju, ali c-MET signaliziranje negativno regulira diferencijaciju osteoblasta, neovisno o MAPK/ERK-Smad i PI3K-AKT-Smad putevima. U prisutnosti inhibitora c-Met, dolazi do povećanja razine mRNA i proteina RUNX2 i osteokalcina, a nije došlo do značajne promjene u MAPK/ERK-Smad signalnim putovima i dalje su dosljedno stimulirali osteogenu diferencijaciju. Ti rezultati također su dosljedni i u slučaju c-MET-utišanim stanicama gdje su bazne razine RUNX2 više od kontrolne grupe stanica (Jung-Woo i sur., 2017; Shibasaki i sur, 2015).

Pretpostavka je da prisutnost više SNP-ova *rs10488740*, *rs7945550*, *rs286912* i *rs35556136* unutar introna gena EHF utječe na pravilno cijepanje intronskih dijelova gena EHF i postoji mogućnost da nepravilno cijepanje i narušava funkciju EHF proteina koji utječe na ekspresiju c-Met, a posljedično tome na RUNX2 i općenito na osteoblastogenezu.

### **4.3. T-KADHERIN (CDH13)**

Iako nije prisutan genetski polimorfizam u CDH13, genska mreža pokazala je snažnu povezanost gena SPARC i EHF u hipotalamusu, glavnom regulatornom centru za kontrolu rasta.

CDH13 je član superobitelji kadherina. Protein je glikoprotein ovisan o kalciju (Ca<sup>2+</sup>) bitan za adheziju stanica i sastoji se od pet izvanstaničnih kadherinskih ponavljanja, transmembranske, a za razliku od ostalih kadherine, ne posjeduje visoko konzerviranu citoplazmatsku regiju te je za membranu pričvršćen s glikozil-fosfatidil-inozitolom (GPI) sidrom (Ivanov i sur., 2004).

Snažna ekspresija CDH13 također je zabilježena u hondrocitnoj staničnoj liniji i hrskavici rebara, ali njegova uloga u tim tkivima je nepoznata. Moguće je da mehanizam regulacije

visine je povezan s uključenosti kadherina u metabolizmu kosti: kadherinom posredovana stanična adhezija je ključna za pravilnu diferencijaciju osteoblasta (Wise i sur, 2020) Poremećaj diferencijacije MSC prekursora u osteogenom, miogenom ili adipogenom put može objasniti povezanost između CDH13 i okoštavanja stražnjeg uzdužnog ligamenta kralježnice (Axenovich i sur, 2009). Yukinori Okada i suradnici koji su proveli meta-analizu GWAS studija, identificirali su, između ostalog i SNP *rs6563943* unutar gena CDH13 i poveznicu s visinom (Okada i sur., 2000) . Razlog zašto CDH13 i nije detektiran u prošlim GWAS studijama visine može se objasniti postojanjem višestrukih rijetkih alela ovog gena (Axenovich i sur, 2009).

Zbog nedostatka literaturnih izvora, teško je spekulirati o mehanizmu CDH13, no Rubinek T. i suradnici navode utjecaj N-kadherina na lučenje HR tj. inhibicija N-kadherina dovodi do smanjenog lučenja HR iz kultura fetalne hipofize čovjeka (Rubinek i sur, 2003).

#### 4.4. DODATNI REZULTATI

Prilikom analize također su otkriveni:

- na kromosomu 3
  - *rs9821781* unutar gena WWTR1
- na kromosomu 19
  - *rs1122608* i *rs55677033* unutar gena SMARCA4

Zbog mogućnosti lažno pozitivnog rezultata, ovi SNP-ovi nisu uzimani u obzir prilikom konačnog zaključka, no literaturni izvori dali su zanimljive informacije.

Gen koji kodira transkripcijski regulator 1 koji sadrži WW domenu (WWTR1 ili TAZ) nalazi se na kromosomu 3q25.1 i ima 13 eksona i 12 introna ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

SNP *rs9821781* dobiven analizom (za kojeg ne možemo isključiti mogućnost lažno pozitivnog rezultata) nalazi se unutar introna.

WWTR1 je glavni efektor Hippo signalnog puta, no prepoznat je i kao regulator razvoja kostiju kroz WNT signaliziranje. Tijekom „WNT-OFF“ stanja, Protein 1 povezan s yes-motivom (engl. Yes-associated protein 1, YAP) i WWTR1 ključni su za degradaciju b-katenina tj. odvajanje YAP/TAZ dovodi do aktivacije b-katenina i transkripcije gena (Piccolo i sur., 2014). WNT-3a potiče vezanje WWTR1 na promotorska vezna mjesta za RUNX2 u nekim marker genima osteogeneze. WWTR1 također potiče razvoj kostiju kroz direktnu interakciju sa RUNX2 stimulirajući osteogeni transkripcijski program. WW domena

WWTR1 veže PPxYmotiv unutar RUNX2 aktivirajuće domene, što čini WWTR1 ciljnim genom RUNX2. Također pokazalo se da WWTR1 predstavlja potencijalnu metu kod liječenja koštanih displazija povezanih s narušenom diferencijacijom osteoblasta (Xiang i sur., 2018).

Uz pretpostavku da *rs9821781* unutar introna gena WWTR1 utječe na pravilno cijepanje intronskih dijelova gena WWTR1 i postoji mogućnost da nepravilno cijepanje narušava funkciju WWTR1 koji je dio Hippo signalnog puta, Wnt signalnog puta i između ostalog sudjeluje u procesu okoštavanja.

SWI/SNF i matriksom povezan, o aktinu ovisan regulator kromatina, podobitelji a, član 4 (SMARCA4) nalazi se na kromosomu 19p13.2 i ima 40 eksona i 39 introna ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

SNP-evi *rs1122608* i *rs55677033* dobiveni analizom (za koje ne možemo isključiti mogućnost lažno pozitivnog rezultata) nalaze se unutar introna.

SMARCA4 je kritična komponenta SWI/SNF kompleksa za remodeliranje kromatina zbog svoje DNA-ovisne ATPazne aktivnosti. Ima važnu ulogu u regulaciji stanične proliferacije, apoptoze, diferencijacije i migracije stanice. Također je uključen u modulaciju zaustavljanja rasta stanica i starenja MSC-a. Pokazalo se da prekomjerna ekspresija SMARCA4 dovodi do značajno povišene ekspresije RUNX2, SP7, kolagena 1 i osteopontina (OPN) kao glavnih markera osteogeneze. Također RUNX2 ko-precipitira zajedno sa SMARCA4 iz čega zaključujemo SMARCA4 regulira RUNX2 i on se direktno veže na SMARCA4. Prekomjerna ekspresija SMARCA4 povećava sposobnost adhezije i vijabilnost MSC-a, ali nema utjecaj na migraciju. Uz pojačanu ekspresiju RUNX2 zbog prekomjerne ekspresije SMARCA4, aktivirani su i WNT i PI3K/AKT putovi posredovani RUNX2, no u prisustvu inhibitora RUNX2, smanjuje se i ekspresija WNT i PI3K/AKT, sugerirajući da SMARCA4 potiče osteogenu diferencijaciju MSC-a aktiviranjem RUNX2-posredovanih WNT i PI3K/AKT putova (Jing i sur., 2016).

Mutacije koje utječu na gene koji utječu na remodeliranje kromatina dovode do fenotipa usporenog rasta što sugerira njihovu povezanost u jedan kompleks (Muchardt i Yaniv, 1999) Studije null mutacija različitih podjedinica SWI/SNF kompleksa pokazale su nedvojbenu potrebu SWI/SNF funkcija u embrionalnom razvoju. SMARCA4-null mutacija uzrokuje

eksencefaliju (rast mozga izvan lubanje) i kraniofacijalne defekte što potvrđuje ulogu SMARCA4 u razvoju kostiju (Young i sur, 2005).

Uz pretpostavku da *rs1122608* i *rs55677033* unutar introna gena SMARCA4 utječu na pravilno cijepanje intronskih dijelova gena SMARCA4 i postoji mogućnost da nepravilno cijepanje narušava funkciju SMARCA4 koji je glavna ATP-aza SWI/SNF kompleksa za remodeliranje kromatina.

## 5. ZAKLJUČAK

Nije pronađen snažni monogeniski učinak, iako monogeniski učinak nije isključiv samim time jer postoji mogućnost da SNP nije u ovom panelu ili cijela obitelj ima isti SNP pa ga TDT analiza ne identificira.

Na temelju dobivenih rezultata pretpostavlja se da postoji multigeniski učinak kao i da je u pozadini svega kadherin 13 koji pokazuje najsnažniju povezanost s genima na razini hipotalamusa kao centra za razvoj.

Pretpostavka je da je prisutan i utjecaj gena na razvoj kostiju jer smo uspjeli povezati gene EHF i SPARC, ali i WWTR1 i SMARCA4 (iako za njih ne možemo sa sigurnošću tvrditi prisutnost SNP-va) sa RUNX2 koji je jedan od ključnih faktora osteogeneze u zoni rasta.



## 6. LITERATURA

Alexandrov L, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Børresen-Dale AL, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjörd JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Ilicic T, Imbeaud S, Imielinski M, Jäger N, Jones DTW, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, López-Otín C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlesner M, Schumacher TN, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt ANJ, Valdés-Mas R, van Buuren MM, van 't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR, Zucman-Rossi J, Futreal PA, McDermott U, Lichter P, Meyerson M, Grimmond SM, Siebert R, Campo E, Shibata T, Pfister SM, Campbell PJ, Stratton MR. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nat*, 2013, 500, 415-421.

Axenovich TI, Zorkoltseva IV, Belonogova NM, Struchalin MV, Kirichenko AV, Kayser M, Oostra BA, van Duijn CM, Aulchenko YS. Linkage analysis of adult height in a large pedigree from a Dutch genetically isolated population, *Hum Genet*, 2009, 126, 457-471.

Barret LW, Fletcher S, Wilton SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements, *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69 (21), 3613-3634.

Bead-Based Microarray Technology, <https://www.illumina.com/>, pristupljeno 12. 10. 2020.

Bolarić S, Trusk M, Kozumplik V, Vokurka A. DNA-ČIP tehnologija, *Agronom glas*, 2009, 3, 215.

Barstow C, Rerucha C. Evaluation of Short and Tall Stature in Children, *Am Fam Physician*, 2015, 92(1), 43-50.

Bush WS, Moore JH. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies, *PLoS Comput Biol*, 2012, 8(12), e1002822.

Chang M, Lin H, Lei C. An Overview of Genome-Wide Association Studies. U: Computational Systems Biology, Methods and Protocols. Huang T, urednik, New York, Humana Press, 2018, str. 92-108.

Choi S, Cha PH, Kim HY, Choi KY. Indirubin-3'-oxime stimulates chondrocyte maturation and longitudinal bone growth via activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, *Exp Mol Med*, 2019, 51, 1–10.

Clancy S, Brown W. Translation: DNA to mRNA to Protein, *Nat Edu*, 2008, 1(1), 101.

Clark DP, Pazdernik JN, McGehee MR. Molecular Biology Third Edition. Cambridge, Elsevier Academic Press, 2019, str. 64-67, 78-79, 241-248, 266-267, 833, 836-839.

Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. Cary, Oxford University Press, 2019, str 319, 321-323.

Emons J, Dutilh BE, Decker E, Pirzer H, Sticht C, Gretz N, Rappold G, Cameron ER, Neil JC, Stein GS, van Wijnen AJ, Maarten Wit J, Post JN, Karperien M. Genome-wide screening in human growth plates during puberty in one patient suggests a role for RUNX2 in epiphyseal maturation, *J Endocrinol*, 2011, 209(2), 245-254.

ETS homologous factor [Homo sapiens (human)], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 17. 01. 2021.

Genetic Disorders, <https://www.genome.gov/>, pristupljeno 21. 09. 2020.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lweontin RC, Gelbart WM. An Introduction to Genetic Analysis Seventh edition. New York, W.H. Freeman and Company, 2000, 496, 547.

Guigo R. The Coding and the Non-coding Transcriptome. U: Handbook of Systems Biology. Walhout AHM, Vidal M, Dekker J, urednici, Cambridge, Elsevier Academic Press, 2013, 27-41.

Gürsoy G. Criticality of data sharing in genomic research and public views of genomic data sharing. U: Responsible Genomic Data Sharing Challenges and Approaches. Jiang X, Tang H, urednici, Cambridge, Elsevier Academic Press, 2020, str. 3-12.

Hacia JG, Fan JB, Ryder O, Jin L, Edgemon K, Ghandour G, Mayer RA, Sun B, Hsie L, Robbins CM, Brody LC, Wang D, Lander ES, Lipshutz R, Fodor SP, Collins FS. Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays, *Nat Gen*, 1999, 22(2), 164-167.

How do genes direct the production of proteins?, <https://medlineplus.gov/>, pristupljeno 2. 09. 2020.

Igaz P, Patocs A. Genetics of Endocrine Diseases and Syndromes, Budimpešta, Springer, 2019, str. 7.

Ivanov D, Philippova M, Allenspach R, Erne P, Resink T. T-cadherin upregulation correlates with cell-cycle progression and promotes proliferation of vascular cells, *Cardiovasc Res*, 2004, 64(1), 132-143.

Infinium® Global Screening Array-24 v1.0, <http://www.usc.es/>, pristupljeno 12. 10. 2020.

Infinium HTS Assay, <https://support.illumina.com/>, pristupljeno 12. 10. 2020.

Jackson M, Marks L, May GHW, Wilson JB. The genetic basis of disease, *Essays Biochem*, 2018, 62(5), 643-723.

Jing L, Zhixu H, Riguang L, Minxian M, Long Y, Chuan Y. Brg1 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by regulating Runx2-mediated Wnt and PI3K/AKT pathways, *Int J Clin Exp Pathol*, 2016, 9(11), 11074-11082.

Kapinas K, Kessler CB, Delany AM. miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling, *J Cell Biochem*, 2009, 108(1), 216-224.

Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics, *BMC Med Genomics*, 2015, 8, 37.

Kas K, Finger E, Grall F, Oettgen P, Kappeller R, Libermann TA. ESE-3, a Novel Member of an Epithelium-specific Ets Transcription Factor Subfamily, Demonstrates Different Target Gene Specificity from ESE-1, *J Biol Chem*, 2000, 275(4), 2986-2998.

Kaushik S, Sharma D, Functional Genomics. U: Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology. Ranganathan S, Gribskov M, Schonbach C, urednici, Cambridge, Elsevier Academic Press, 2018, str. 1-15.

Kim JW, Lee MN, Jeong BC, Oh SH, Kook MS, Koh JT. Chemical inhibitors of c-Met receptor tyrosine kinase stimulate osteoblast differentiation and bone regeneration, *Eur J pharmacol*, 2017, 806, 10-17.

Klingseisen A, Jackson AP. Mechanisms and pathways of growth failure in primordial dwarfism, *Genes Dev*, 2011, 25(19), 2011-2024.

Komori T. Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2, *Int J Mol Sci*, 2019, 20(7), 1694.

Lin H, Hargreaves KA, Li R, Reiter JL, Wang Y, Mort M, Cooper DN, Zhou Y, Zhang C, Eadon MT, Dolan ME, Ipe J, Skaar TC, Liu Y. RegSNPs-intron: a computational framework for predicting pathogenic impact of intronic single nucleotide variants, *Gen Biol*, 2019, 20, 254.

Liu G, Arnaud P, Offmann B, Picimbon JF. Genotyping and Bio-Sensing Chemosensory Proteins in Insects, *Sens*, 2017, 17(8), 1801.

Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A, Martin KC. Molecular Cell Biology, New York, W.H. Freeman and Company, 2016, str. 8, 168-171, 176, 178, 224-225, 327, 362.

Lui JC, Garrison P, Baron J. Regulation of body growth, *Curr Opin Pediatr*, 2015, 27(4), 502-510.

Mendel Y, Kaisermann J, Pawlowski M. Genética médica 1, Independently published, 2019, str. 6-10.

Mendoza-Londono R, Fahiminiya S, Majewski J, Tétreault M, Nadaf J, Kannu P, Sochett E, Howard A, Stimec J, Dupuis L, Roschger P, Klaushofer K, Palomo T, Ouellet J, Al-Jallad H, Mort JS, Moffatt P, Boudko S, Bächinger HP, Rauch F. Recessive osteogenesis imperfecta caused by missense mutations in SPARC, *Am J H Genet*, 2015, 96(6), 979-985.

Muchardt C, Yaniv M. The mammalian SWI/SNF complex and the control of cell growth, *Semin Cell Dev Biol*, 1999, 10(2), 189-195.

Murugesan G, Procop GW. Direct Genome Sequencing in Diagnostic Pathology. U: Cell and Tissue Based Molecular Pathology. Tubbs RR, Stoler MH, urednici, Philadelphia, Elsevier Churchill Livingstone, 2009, str. 57-63.

Nie J, Sage EH. SPARC functions as an inhibitor of adipogenesis, *Journal of Cell Communication and Signaling*, 2009, 3, 247–254.

Okada Y, Kamatani Y, Takahashi A, Matsuda K, Hosono N, Ohmiya H, Kamatani N. A genome-wide association study in 19 633 Japanese subjects identified LHX3-QSOX2 and IGF1 as adult height loci, *Hum Mol Genet*, 2010, 19(11), 2303–2312.

Oostdijk W, Grote FK, de Muinck Keizer-Schrama SMPF, Wit JM. Diagnostic Approach in Children with Short Stature, *Horm Res*, 2009, 72(4), 206-217.

Petrik J. Microarray blood testing: Pros & cons, *Biologicals*, 2010, 38(1), 2-8.

Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond, *Physiol Rev*, 2014, 94(4), 1287-1312.

Raghavendra PB, Pullaiah T. Advances in Cell and Molecular Diagnostics, Cambridge, Elsevier Academic Press, 2018, str. 77-78.

Raouf A, Seth A. Ets transcription factors and targets in osteogenesis, *Oncogene*, 2000, 19, 6455-6463.

Rogers AJ, Weiss S. Epidemiologic and Population Genetic Studies. U: Clinical and Translational Science. Principles of Human Research. Robertson D, Williams GH, urednici, London, Elsevier's Academic Press, 2009, str. 289-292.

Roselló-Díez A, Loyner AL. Regulation of Long Bone Growth in Vertebrates; It Is Time to Catch Up, *Endocr Rev*, 2015, 36(6), 646-680.

Rosset EM, Bradshaw AD. SPARC/Osteonectin in Mineralized Tissue, *Matrix Biol*, 2016, 52-54, 78-87.

Rubinek T, Yu R, Hadani M, Barkai G, Nass D, Melmed S, Shimon I. The Cell Adhesion Molecules N-Cadherin and Neural Cell Adhesion Molecule Regulate Human Growth

Hormone: A Novel Mechanism for Regulating Pituitary Hormone Secretion, *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(8), 3724–3730.

Schiemann BJ, Neil JR, Schiemann WP. SPARC inhibits epithelial cell proliferation in part through stimulation of the transforming growth factor-beta-signaling system, *Mol Biol Cell*, 2003, 14(10), 3977-3988.

Shibasaki S, Kitano S, Karasaki M, Tsunemi S, Sano H, Iwasaki T. Blocking c-Met signaling enhances bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation, *FEBS Open Bio*, 2015, 5, 341-347.

SMARCA4 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4 [Homo sapiens (human)], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 17. 01. 2021.

SPARC secreted protein acidic and cysteine rich [Homo sapiens (human)], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 17. 01. 2021.

Sukhumsirichart W. Polymorphisms. U: Genetic Diversity and Disease Susceptibility. Liu Y, urednik, London, IntechOpen, 2018, str. 3-6.

Taneri B, Asilmaz E, Delikurt T, Savas P, Targen S, Esemem Y. Human Genetics and Genomics, a practical guide, Weinheim, Wiley-WCH, 2020, str. 16-20.

Teama S. DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine. U: Genetic Diversity and Disease Susceptibility. Liu Y, urednik, London, IntechOpen, 2018, str. 25-30.

Thompson MW, Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. Genética en medicina, Barcelona Elsevier España S.L., 2005, str. 2.

What kinds of gene mutations are possible?, <https://medlineplus.gov/>, pristupljeno 01. 09. 2020.

Wise CA, Sepich D, Ushiki A, Khanshour AM, Kidane YH, Makki N, Gurnett CA, Gray RS, Rios JJ, Ahituv N, Solnica-Krezel L. The cartilage matrisome in adolescent idiopathic scoliosis, *Bone Res*, 2020, 8, 1-13.

Worku T, Negassu D. Review on DNA Micro Array Technology and Its Application, *Am J Zoo*, 2019, 2(4), 44-50.

Wright AF. Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations. U: Encyclopedia of Life Sciences, 20 Volume Set. Cooper DN, urednik, New Jersey, Wiley Blackwell, 2005, str. 1-2.

WWTR1 WW domain containing transcription regulator 1 [Homo sapiens (human)], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 17. 01. 2021.

Xiang L, Yu H, Zhang X, Wang B, Yuan Y, Zhang Q, Ye R, Gong P, Wu Y. The Versatile Hippo Pathway in Oral-maxillofacial Development and Bone Remodeling, *Dev Biol*, 2018, 440(2), 53-63.

Xu C, Tachmazidou I, Walter Ciampi K, Zeggini A, Greenwood E, Celia MT. Estimating Genome-Wide Significance for Whole-Genome Sequencing Studies: Genome-Wide Significance for Rare Variants, *Genet Epidemiol*, 2014, 38(4), 281–290.

Yockey HP. Information Theory, Evolution, and the Origin of Life, Cambridge, Cambridge University Press, 2005, str. 20.

Young DW, Pratap J, Javed A, Weiner B, Ohkawa Y, van Wijnen A, Montecino M, Stein GS, Stein JL, Imbalzano AN, Lian JB. SWI/SNF chromatin remodeling complex is obligatory for BMP2-induced, Runx2-dependent skeletal gene expression that controls osteoblast differentiation, *J Cell Biochem*, 2005, 94(4), 720-30.

## 7. SAŽETAK / SUMMARY

### 7.1 SAŽETAK

DNA kao temeljna molekula kojom se prenosi genetska informacija podložna je promjenama, a promjene patogenog značenja nazivamo mutacijama koje se u konačnici mogu odraziti i na fenotip. Polimorfizmi jednog nukleotida mogu utjecati na ekspresiju gena i funkcionalnost proteina tijekom i nakon njihove sinteze, što u konačnici rezultira određenim genetskim poremećajem. SNP-ove detektiramo analizom slijeda DNA, metodama kao što su Sangerovom dideoksi metodom, ali i GWAS studijama i obiteljskim studijama, a gdje se u pozadini svega koriste DNA-čipovi.

Tijekom rasta i razvoja, osim endokrine regulacije, za rast je bitna i lokalna regulacija rasta, te je cilj istraživanja je ispitati radi li se o monogenom poremećaju ili je niski rast ispitanice posljedica poligenih učinaka. Istraživanje bi također moglo doprinijeti boljem razumijevanju povezanosti signalnih puteva uključenih u rast i razvoj kao i njihove genske pozadine u različitim tkivima.

Pregledom literature i na temelju dobivenih rezultata pretpostavlja se da postoji multigeni učinak kao i da je u pozadini svega kadherin 13 koji pokazuje najsnažniju povezanost s genima na razini hipotalamusa kao centra za razvoj.

Pretpostavka je da je lokalno prisutan utjecaj gena na razvoj kostiju jer smo uspjeli povezati gene EHF i SPARC, ali i WWTR1 i SMARCA4 (iako za njih ne možemo sa sigurnošću tvrditi prisutnost SNP-va) sa RUNX2 koji je jedan od ključnih faktora osteogeneze u zoni rasta.



## 7.2 SUMMARY

DNA as a basic molecule that transmits genetic information is subject to changes, and changes with pathogenic significance are called mutations that can ultimately affect the phenotype. Single nucleotide polymorphisms can affect gene expression and protein functionality during and after their synthesis, resulting in a specific genetic disorder. SNPs are detected by DNA sequence analysis, methods such as Sanger's dideoxy method, but also by GWAS studies and family studies, where DNA chips are used.

During growth and development, in addition to endocrine regulation, local growth regulation is also important, and the aim of the research was to examine whether it is a monogenic disorder or short stature of the subject is result of polygenic effects. Research could also contribute to a better understanding of the interconnections of signaling pathways involved in growth and development as well as their genetic background in different tissues.

A review of the literature and based on the obtained results, we are assuming that there is a multigenic effect and that in the background is cadherin 13 which shows the strongest association with genes at the level of the hypothalamus as a center for development.

It is assumed that the influence of genes on bone development is locally present because we managed to connect the genes EHF and SPARC, but also WWTR1 and SMARCA4 (although we cannot claim with certainty the presence of SNPs) with RUNX2 which is one of the key factors of osteogenesis in the growth plate.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Identifikacija potencijalnih genskih poremećaja u pozadini slučaja idiopatskog niskog rasta

Magdalena Skupnjak

#### SAŽETAK

DNA kao temeljna molekula kojom se prenosi genetska informacija podložna je promjenama, a promjene patogenog značenja nazivamo mutacijama koje se u konačnici mogu odraziti i na fenotip. Polimorfizmi jednog nukleotida mogu utjecati na ekspresiju gena i funkcionalnost proteina tijekom i nakon njihove sinteze, što u konačnici rezultira određenim genetskim poremećajem. SNP-ove detektiramo analizom slijeda DNA, metodama kao što su Sangerovom dideoksi metodom, ali i GWAS studijama i obiteljskim studijama, a gdje se u pozadini svega koriste DNA-čipovi.

Tijekom rasta i razvoja, osim endokrine regulacije, za rast je bitna i lokalna regulacija rasta, te je cilj istraživanja je ispitati radi li se o monogenskom poremećaju ili je niski rast ispitance posljedica poligenских učinaka. Istraživanje bi također moglo doprinijeti boljem razumijevanju povezanosti signalnih puteva uključenih u rast i razvoj kao i njihove genske pozadine u različitim tkivima.

Pregledom literature i na temelju dobivenih rezultata pretpostavlja se da postoji multigeniski učinak kao i da je u pozadini svega kadherin 13 koji pokazuje najснаžniju povezanost s genima na razini hipotalamusa kao centra za razvoj.

Pretpostavka je da je lokalno prisutan utjecaj gena na razvoj kostiju jer smo uspjeli povezati gene EHF i SPARC, ali i WWTR1 i SMARCA4 (iako za njih ne možemo sa sigurnošću tvrditi prisutnost SNP-va) sa RUNX2 koji je jedan od ključnih faktora osteogeneze u zoni rasta.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 50 stranica, 9 grafičkih prikaza, 2 tablice i 69 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: DNA, mutacija, polimorfizam, niski rast

Mentor: **Prof. dr. sc. Gordan Lauc**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Gordan Lauc**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Izv. Prof. Dr. sc. Sanja Dabelić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Prof. dr. sc. Živka Juričić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: veljača 2021.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of biochemistry and molecular biology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Identification of potential genetic disorders in the background of idiopathic short stature

Magdalena Skupnjak

#### SUMMARY

DNA as a basic molecule that transmits genetic information is subject to changes, and changes with pathogenic significance are called mutations that can ultimately affect the phenotype. Single nucleotide polymorphisms can affect gene expression and protein functionality during and after their synthesis, resulting in a specific genetic disorder. SNPs are detected by DNA sequence analysis, methods such as Sanger's dideoxy method, but also by GWAS studies and family studies, where DNA chips are used.

During growth and development, in addition to endocrine regulation, local growth regulation is also important, and the aim of the research was to examine whether it is a monogenic disorder or short stature of the subject is result of polygenic effects. Research could also contribute to a better understanding of the interconnections of signaling pathways involved in growth and development as well as their genetic background in different tissues.

A review of the literature and based on the obtained results, we are assuming that there is a multigenic effect and that in the background is cadherin 13 which shows the strongest association with genes at the level of the hypothalamus as a center for development.

It is assumed that the influence of genes on bone development is locally present because we managed to connect the genes EHF and SPARC, but also WWTR1 and SMARCA4 (although we cannot claim with certainty the presence of SNPs) with RUNX2 which is one of the key factors of osteogenesis in the growth plate.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 50 pages, 9 figures, 2 tables and 69 references. Original is in Croatian language.

Keywords: DNA, mutation, polymorphism, short stature

Mentor: **Gordan Lauc, Ph.D.**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Gordan Lauc, Ph.D.**, *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Sanja Dabelić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Živka Juričić, Ph.D.** *Full Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: February 2021.