

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Bruno Blažević

**Mapiranje gena odgovornog za cističnu  
fibrozu i razvoj genske terapije**

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Bruno Blažević

**Mapping of the gene responsible for cystic  
fibrosis and development of gene therapy**

Bachelor thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa preddiplomskog studija Molekularne biologije na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom Izv. prof. dr. sc. Nenada Malenice.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Završni rad

## Mapiranje gena odgovornog za cističnu fibrozu i razvoj genske terapije

Bruno Blažević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cistična fibroza je progresivna multisistemska monogenska autosomalna recesivna bolest. Lokus gena odgovornog za razvoj cistične fibroze identificiran je analizom rodoslovlja obitelji s oboljelim članovima, usporedbom obrazaca polimorfizma markera RFLP, kloniranjem regije s genom od interesa metodama *chromosome walking* i *chromosome jumping* te identifikacijom kodirajućih sekvenci unutar regije. Gen odgovoran za bolest nazvan je cistično-fibrozni transmembranski regulator provodljivost (*CFTR*). Protein CFTR sudjeluje u aktivnom transportu kloridnih i hidrogenkarbonatnih iona kroz staničnu membranu. Mutacije unutar gena *CFTR* smanjuju njegovu funkcionalnost i uzrokuju nastanak cistične fibroze. Ovisno o utjecaju na biosintezu proteina CFTR, opisane mutacije podijeljene su u šest klasa. Patofiziologija bolesti temelji se na poremećaju prijenosa vode kroz membranu uslijed nefunkcionalnog transporta iona. Gusta izlučena sluz pogodna je podloga za naseljavanje mikroorganizama te blokira mnoge provodne kanaliće u organizmu. Genska terapija nudi trajno izlječenje cistične fibroze korekcijom genskog defekta gena *CFTR*. CRISPR-Cas sustav ili peptidne nukleinske kiseline primjeri su uspješne genske terapije u eksperimentalnoj korekciji cistične fibroze te su mogući oblici genske terapije koji će naći širu primjenu u liječenju

Ključne riječi: cistična fibroza, gensko mapiranje, *CFTR*, genska terapija

(27 stranica, 4 slike, 0 tablica, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Nenad Malenica

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Bachelor thesis

# Mapping of the gene responsible for cystic fibrosis and development of gene therapy

Bruno Blažević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Cystic fibrosis is a progressive monogenic autosomal recessive disease with multisystem readings. The locus of the gene responsible for the development of cystic fibrosis was identified by analyzing the pedigree of a family with affected members, comparing patterns of polymorphism of RFLP markers, cloning the region with the gene of interest using chromosome walking and chromosome jumping methods and identification of coding sequences within the region. The gene responsible for disease is named cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*). The CFTR protein participates in the active transport of chloride and hydrogen carbonate ions through the cell membrane. Mutations within the *CFTR* gene reduce its functionality and cause cystic fibrosis. Depending on the impact on CFTR protein biosynthesis, mutations are divided into six classes. The pathophysiology of the disease is based on the disruption of water transport through the membrane due to dysfunctional ion transport. Thick secreted mucus is a suitable substrate for the settlement of microorganisms and blocks many channels in the body. Gene therapy offers a permanent cure for cystic fibrosis by correcting the genetic defect of the *CFTR* gene. The CRISPR-Cas system or peptide nucleic acids are examples of gene therapy successful in the experimental correction of cystic fibrosis and are possible forms of gene therapy that will find wider application in treatment.

**Keywords:** cystic fibrosis, gene mapping, *CFTR*, gene therapy

(27 pages, 4 figures, 0 tables, 45 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Nenad Malenica

# Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Gensko mapiranje lokusa odgovornog za cističnu fibrozu .....	2
3. Protein CFTR.....	11
4. Patofiziologija cistične fibroze .....	14
5. Genska terapija cistične fibroze.....	19
5.1. CRISPR-Cas genska terapija .....	20
5.2. Genska terapija peptidnom nukleinskom kiselinom .....	21
6. Zaključak .....	23
7. Literatura.....	24
8. Životopis .....	27

# 1. Uvod

Etiologija većine bolesti zasniva se na zajedničkom djelovanju endogenih i egzogenih etioloških čimbenika. Genetski poremećaji su bolesti uzrokovane, u cijelosti ili većinom, promjenom u genomu organizma u odnosu na zdravo stanje (Gamulin i sur., 2011). Jedan od najučestalijih genetskih poremećaja s značajnim posljedicama na zdravlje je cistična fibroza (Scotet i sur., 2020).

Cistična fibroza je nasljedna autosomalna recesivna bolest koju obilježava poremećaj prijenosa iona i vode kroz staničnu membranu. Posljedično nastaje viskoznan sekret unutar dišnog, gastro-intestinalnog, bilijarno-hepatičkog i egzokrinog sustava koji onemogućava njihovu normalnu funkciju. Glavni simptomi cistične fibroze su kronični bronhitis, bilijarna ciroza, insuficijencija egzokrine funkcije gušterače, povišena koncentracija soli u znoju, neplodnost i opstrukcija crijeva (Gamulin i sur., 2011). Cistična fibroza javlja se najčešće u bjelačkoj populaciji s prosječnom učestalošću od jednog oboljelog na 3000 živorođene djece (Scotet i sur., 2020). Prvi puta opisana je 1938. godine u radu Dorothy H. Anderson kao pedijatrijska bolest jer su pacijenti umirali u prvoj godini života. Napretkom u tretiranju simptoma današnji očekivani životni vijek pacijenata s cističnom fibrozom je 50 godina (Scotet i sur., 2020).

Trajno rješenje u liječenju cistične fibroze kao genetskog poremećaja je *in situ* popravak defekta u genomu pacijenta (Wang, 2023). Pretpostavka za taj cilj, kao i za razumijevanje patofiziologije cistične fibroze i unaprjeđenja dijagnostike, jest identifikacija odgovornog gena koji uzrokuje pojavu cistične fibroze. Ovaj završni rad obuhvaća gensko mapiranje lokusa cistične fibroze, identifikaciju defekta u genomu i genskom produktu te aktualne pristupe u trajnome izlječenju cistične fibroze genskom terapijom.

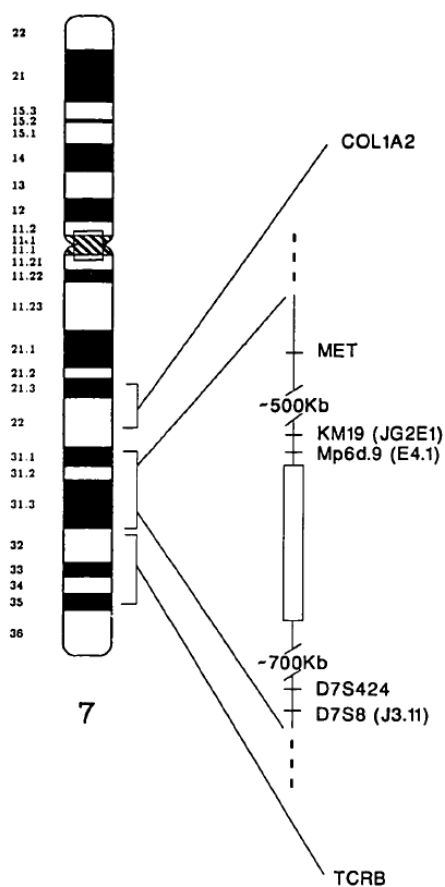
## 2. Gensko mapiranje lokusa odgovornog za cističnu fibrozu

Potruga za uzrokom cistične fibroze započela je praćenjem nasljeđivanja cistične fibroze u obiteljima s oboljelom djecom. Andersen i Hodges (1946), kao i Steinberg i Morton (1956), utvrdili su da nasljeđivanje cistične fibroze prati Mendelove zakone kao monogeno autosomalno recesivno svojstvo. Nadalje, Eidberg i sur., (1985) mjerenjem aktivnosti enzima paraksonaze u serumu zdravih osoba i pacijenata s cističnom fibrozom zamjećuju vezanost gena za paraksonazu i gena čiji defekt uzrokuje cističnu fibrozu. Paraksonaza sprječava nekontroliranu oksidaciju serumskih lipidnih čestica hidrolizom reaktivnih kisikovih radikala nastalih metabolizmom (Reichert i sur., 2021). Polimorfnost gena za paraksonazu očituje se različitom aktivnošću enzima pri fiziološkom pH te omogućuje utvrđivanje vezanosti gena s markerom od interesa. Pomoću vrijednosti LOD (engl. *logarithm of the odds*) iskazana je vezanost gena sa svakim od 64 proučavana markera poznatog lokusa. Unatoč tome što lokus gena za paraksonazu nije bio poznat, nevezanost s markerima poznatog lokusa ograničila je moguće područje pronalaska gena za cističnu fibrozu na jednu trećinu ljudskog genoma (Eiberg i sur., 1985).

Botstein i sur., 1980. godine razvijaju metodu polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP). Metoda se zasniva na digestiji DNA molekula restrikcijskim enzimima na mjestu polimorfni markera DNA u genomu. Pojedini polimorfizmi mjesta su prepoznavanja restrikcijskim endonukleazama, dok drugi polimorfi (aleli) tog markera nisu. Svaka jedinka nasljeđuje svojstven obrazac polimorfizama iz majčinog i očevog genoma. Razdvajanjem fragmenata nastalih restrikcijom pomoću elektroforeze te detekcijom DNA probama dobiva se svojstven signal fragmenata svakog uzorka. Fragmenti tada ukazuju na prisutnost ili odsutnost markera DNA tj. specifičnog restrikcijskog mjesta. Signali dobiveni analizom RFLP ovise o korištenim restrikcijskim endonukleazama i DNA probama za detekciju. Ukoliko je polimorfan marker DNA dovoljno blizu genu od interesa on će u određenoj mjeri segregirati zajedno s genom nakon genetičke rekombinacije u mejozi. Tada je taj vezani polimorfni alel DNA ujedno i marker za gen od interesa. Vezanost gena od interesa sa svakim markerom RFLP iskazuje se pomoću LOD vrijednosti i definira relativnu udaljenost i položaj gena od interesa u odnosu na markere RFLP (Botstein i sur., 1980). Prednost RFLP metode je mogućnost utvrđivanje vezanosti bez prethodnog znanja o sekvenci gena od interesa te je stoga metoda RFLP značajno unaprijedila mapiranje lokusa cistične fibroze. Prvi otkriveni markeri RFLP vezani s genom za cističnu fibrozu, poznate lokacije u genomu, su segment DNA pJ3.11 (kasnije preimenovan u D7S8) u



regiji kromosoma 7cen-q22 i  $\beta$ -lanac receptora T limfocita smješten u regiji 7q3 ( Slika 1; Wainwright i sur., 1985). Ovime je jednoznačno potvrđena lokacija gena za cističnu fibrozu na dugom kraku kromosoma sedam (7q). White i sur., (1985) neovisno otkrivaju vezanost gena za cističnu fibrozu s onkogenom MET te dodatno sužavaju mogući položaj gena za cističnu fibrozu na područja q21-q31 kromosoma 7. Izrazita vezanost onkogene MET i gena za cističnu fibrozu ukazala je na međusobnu udaljenost od približno 1000 kpb (White i sur., 1985). Naposljetku, Rommens i sur., (1988) definiraju dodatna dva markera – D7340 i D7S122, stavljaju ih u međusoban odnos s markerima DS78 i MET te ograničavaju potencijalno područje za pronalazak gena na regiju 7q31-7q32. Raspored navedenih markera u smjeru od centromere prema telomernom kraju 7q je MET-D7340-D7S122-D7S8, a udaljenosti između markera redom su 500, 10 i 980 kpb (Rommens i sur., 1988). Poznavanje relativnog rasporeda markera u blizini gena za cističnu fibrozu i blizina MET markera omogućili su idući korak u mapiranju cistične fibroze – kloniranje DNA u okruženju markera RFLP blisko vezanih s cističnom fibrozom upotrebom metode *chromosome walking*.



**Slika 1.** – Idiogram ljudskog kromosoma 7 s naznačenim položajima gena COL1A2,  $\beta$ -lanca receptora T limfocita (TCRB) te markera MET, KM19, E4.1, D7S424 i D7S8. Preuzeto i prilagođeno iz Berker, 1990.

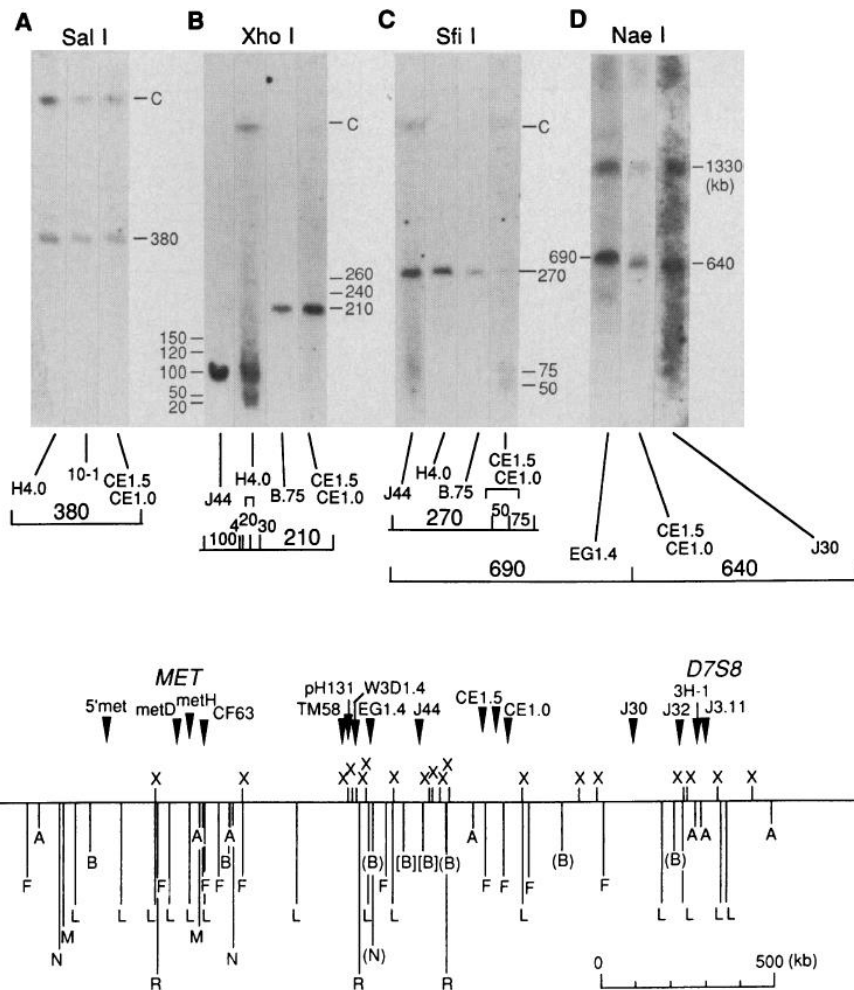
Metoda *chromosome walking* opisana je 1979. godine i temelji se na traženju fragmenata DNA u genskoj biblioteci tako da je sekvenca 5' kraja izoliranog fragmenta jednaka sekvenci 3' kraja prethodno izoliranog fragmenta. Izolirani fragmenti, poretkom kojim su izolirani, čine kopiju proučavane regije (Craig Chinault i Carbon, 1979). S obzirom na to da su analize vezanosti markera RFLP upućivale na smještaj gena za cističnu fibrozu između markera MET i DS78 (Rommens i sur., 1989) ova metoda je upotrijebljena za kloniranje i izolaciju segmenta DNA između navedenih markera. *Chromosome walking* započinje konstrukcijom genske biblioteke regije koja se želi klonirati. Rommens i sur., (1989) upotrijebili su 12 genskih biblioteka, a od toga su konstruirali njih 10 u sklopu istraživanja gena cistične fibroze. 7 genskih biblioteka konstruirano je umnažanjem fragmenata genomske DNA u lambda fagu. Fragmenti DNA dobiveni su djelomičnom ili potpunom razgradnjom limfoblastoidne DNA iz uzorka periferne ljudske krvi ili iz hibridnih stanica čovjeka i hrčka s ljudskim kromosomom 7 (4AF/102/K015) (Rommens i sur., 1989). Djelomična restrikcija provedena je enzimom Sau 3A, a potpuna digestija enzimima Eco RI ili Bam HI. Restrikcijski fragmenti ubačeni su u genom lambda faga metodama rekombinantne DNA i umnoženi u rekombinacijski deficijentnom domaćinu kako bi se očuvali nestabilni sljedovi DNA. Također, konstruirane su tri kozmidne genske biblioteke iz jednakih izvora kao i biblioteke genomske DNA. Restrikcijski fragmenti nastali razgradnjom Sau 3A, Sal I i Mbo I ligirani su unutar odgovarajućih kozmidnih vektora i umnoženi u *E. coli*. Mapiranje genomske regije započinje s poznatih mjesta u genomu i nastavlja se u jednom ili oba smjera duž kromosoma. Poznavanje početnog mjesta nužno je za konstruiranje probe s kojom će započeti pretraživanje genske biblioteke za iduće segmente. Kloniranje regije s genom za cističnu fibrozu započelo je paralelno s više mjesta u genomu: s markera D7S8 u smjeru onkogeneta MET bbite u oba smjera s markera D7340 i D7S122 (Rommens i sur., 1989). Probom pH131 za marker D7S122 te probom TM58 za marker D7340 pretražene su genomske biblioteke. Klonovi fragmenata DNA koji su hibridizirali s probama, izolirani su iz kolonija *E. coli*. Zatim je dio izoliranih fragmenata pročišćen i korišten kao proba u idućem pretraživanju genomske biblioteke. Uz opisanu metodu *chromosome walking* korištena je i slična metoda *chromosome jumping* koja se razlikuje jedino prema načinu konstrukcije fragmenata u genskoj biblioteci; pri konstrukciji genomske biblioteke, restrikcijski fragmenti nastali djelomičnom ili potpunom razgradnjom genomske DNA cirkulariziraju se zajedno sa selekcijskim markerom (npr. gen za supresorsku tRNA) (Collins i Weissman, 1984). Odabirom duljine restrikcijskih fragmenata odabire se i udaljenost na kromosomu na kojoj će se detektirati idući slijed pri kloniranju. Cirkularizacija se provodi pri niskoj koncentraciji restrikcijskih fragmenata i visokoj koncentraciji selekcijskog markera

kako bi se spriječio nastanak multimeri i potaklo označavanje svih fragmenata sa selekcijskim markerom. Slijedi digestija cirkulariziranih produkata restrikcijskom endonukleazom i ligiranje sekvenci  $\lambda$  faga s *cos* slijedovima na 3' i 5' krajevima produkata digestije. Nakon pakiranja zrelih  $\lambda$  čestica slijedi infekcija domaćina, odnosno umnažanje genomske biblioteke u bakteriji. Cirkularizacija produkata restrikcije dovodi dva udaljena slijeda DNA u međusobnu blizinu, samim time preklapanje takve probe identificirat će idući slijed DNA za duljinu restrikcijskog fragmenta duž kromosoma. Genomska biblioteka korištena u kloniranju metodom *chromosome jumping* izolirana je iz DNA ljudskih limfoblastoidnih stanica. (Collins i sur., 1987). Ključne prednosti metode *chromosome jumping* su skraćivanje vremena potrebnog za kloniranje i mogućnost zaobilaska čestih sekvenci u genomu sisavaca koje nije moguće klonirati pri izradi genomske biblioteke (Rommens i sur., 1989). Naime, genom sisavaca bogat je slijedovima koji su u bakterijskoj stanici izrazito nestabilni. Također, postupak kloniranja se ubrzava kloniranjem međusobno nepovezanih sekvenci („skakanjem“ duž kromosoma), za razliku od metode *chromosome walking* kojom se klonira isključivo kontinuirano duž kromosoma. Također, na kraju svakog „skoka“ može se ponovno započeti s metodom *chromosome walking* u oba smjera i dodatno ubrzati kloniranje. Koraci pretraživanja genomske biblioteke, izolacije iduće probe iz kompleksa s prethodnom probom i ponovno pretraživanje ponovljeni su više puta do potpunog kloniranja regije s lokusom za cističnu fibrozu. Tri regije duljine 10, 20 i 25 kpb nije bilo moguće pronaći u genomske bibliotekama, vjerojatno zbog nestabilnost tih slijedova u bakterijskoj kulturi korištenoj u konstrukciji biblioteke, te su ti slijedovi ponovno umnoženi u permisivnim vektorima i domaćinima (Rommens i sur., 1989). Ukupna duljina klonirane regije je 280 kpb i zahtijevala je izolaciju i okarakteriziranje 9 rekombinantnih klonova izoliranih metodom *chromosome jumping* i 49 rekombinantnih klonova izoliranih metodom *chromosome walking* (Rommens i sur., 1989).

Svakome izoliranome fragmentu iz genomske biblioteke potvrđen je položaj na kromosomu i kolinearnost na tri načina: hibridizacijom sa somatskom hibridnom staničnom linijom glodavca i ljudskog kromosoma 7, uspoređivanjem restrikcijske razgradnje fragmenata s restrikcijom genomske DNA i elektroforezom u promjenjivom električnom polju (Rommens i sur., 1989). Potvrda lokalizacije fragmenata izoliranih upotrebom metode *chromosome jumping* važna je zbog toga što su pri izradi biblioteke moguće uzastopne cirkularizacije nepovezanih fragmenata DNA što bi uzrokovalo pogrešno mapiranje. U daljnjim analizama korištena je i biblioteka komplementarne DNA (cDNA). Stanice žlijezda znojnice pacijenata s cističnom fibrozom i zdravih osoba izolirane su i uzgajane u kulturi do prvog presađivanja.

Zatim je izolirana ukupna poliadenilirana RNA (mRNA) koja je korištena za sintezi komplementarne DNA (cDNA). cDNA molekule su potom metilirane, upakirane u  $\lambda$  vektor i umnožene u *E. coli* (Riordan i sur., 1989). Uz provjeru podudarnosti svakog izoliranog fragmenta, konstruirana je i sveobuhvatna restrikcijska karta genomske regije DNA MET-D7S8. Genomska DNA izolirana je iz stanične linije 4AF/102/K015 i razgrađena restrikcijskim endonukleazama. Restrikcijski fragmenti odvojeni su na gelu u promjenjivom električnom polju te su hibridizirani s probama (Slika 2). Rezultati digestije ukazivali su na to da je gen za cističnu fibrozu u cijelosti smješten na fragmentu Sal I veličine 380 kpb (Slika 2A), odnosno svi cDNA klonovi hibridizirali su s navedenim fragmentom. Također, usporedbom Xho I mjesta cijepanja na fragmenatima izoliranim iz biblioteke cDNA i mjesta cijepanja na izoliranim rekombinantnim fragmentima utvrđen je smještaj cDNA fragmenata na restrikcijskoj mapi čitave regije MET-D7S8 (Slika 2E). Pojedina mjesta bila su otporna na razgradnju s restrikcijskim enzimima Bss HII i Not I zbog promijenjenog obrasca metilacije u somatskom hibridu glodavca i čovjeka, no bila su podložna digestiji u ljudskim staničnim linijama (Rommens i sur., 1989).

Nakon što je regija MET-D7S8 uspješno klonirana, posljednji korak u detekciji gena za cističnu fibrozu bio je pronalazak kodirajućih sekvenci. Tijekom traženja kodirajućih sekvenci upotrijebljeno je više tehnika, no pretraživanje je započelo unakrsnom hibridizacijom DNA različitih vrsta. DNA molekule različitih vrsta hibridiziraju u područjima sa sličnom sekvencom, odnosno u evolucijski očuvanim slijedovima koji mogu ukazati na kodirajuće područje homolognog gena. Genomi čovjeka, krave, miša, hrčka i kokoši razgrađeni su s restrikcijskim endonukleazama Eco RI, Hind III i Pst I, fragmenti su odvojeni elektroforezom i hibridizirani probama (Slika 3). Korištene probe rekombinantni su klonovi izdvojeni iz genomske biblioteke metodama *chromosome walking* i *chromosome jumping*. Također, ponavljajuće sekvence zajedničke svim probama (npr. *cos* mjesta), nije bilo potrebno ukloniti s obzirom na to da takvi slijedovi nisu očuvani među genomima udaljenih vrsta. Jasne signale hibridizacije pokazale su četiri regije DNA na segmentu veličine 280 kpb (Rommens i sur., 1989). Prva regija definirana je segmentom DNA G-2 na položaju 13 kpb od 5' kraja proučavanog segmenta DNA. Gen unutar G-2 segmenta nije mogao biti gen odgovoran za cističnu fibrozu na temelju genetičkih analiza (Kerem i sur., 1989) te stoga nije detaljnije istraživao. Druga regija koja je hibridizirala među vrstama definirana je kozmidom CF14 (Slika 3A) i nalazi se u području 100 do 142 kpb od 5' kraja proučavanog segmenta. Mapiranje metodom RFLP na početku hibridizirajuće regije identificiran je lokus već pronađenog gena



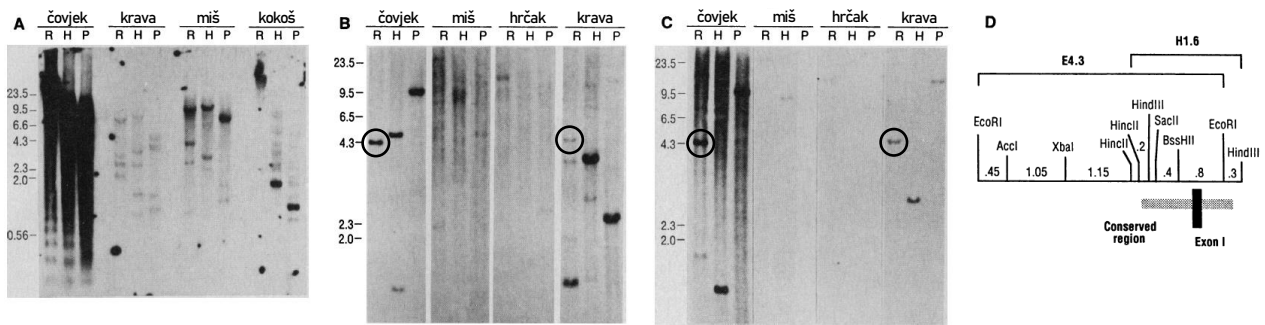
**Slika 2.** – Rezultati hibridizacije restriksijskih fragmenata genomske DNA stanične linije 4AF/102/K015 nakon razgradnje s Sal I (A), Xho I (B), Sfi I (C) i Nae I (D) s probama navedenim ispod gela. Fragmenti su razdvojeni elektroforezom u promjenjivom električnom polju. H4.0, J44, J30 i EG1.4 su probe konstruirane metodama *chromosome walking* i *chromosome jumping*, 10-1, B.75, CE1.5 i CE1.0 su cDNA probe koje pokrivaju različite segmente transkripta gena za cističnu fibrozu. Oznaka „C“ označava granicu između gela za sabijanje i gela za razdvajanje. Ispod svakog gela A-D shematski je prikazan fragment genomske DNA koji je hibridizirao s probom, naznačene duljine su u kilobazama. Restriksijska mapa regije MET-D7S8 (E) s naznačenim mjestima cijepanja restriksijskim enzimima – A, Nae I; B, Bss III; F, Sfi I; L, Sal I; M, Mlu I; N, Not I; R, Nru I i X, Xho. Crni trokuti označavaju mjesta hibridizacije proba na regiji MET-D7S8. Oznake restriksijskih enzima u zagradama su mjesta nepotpunog cijepanja uslijed različitog obrasca metilacije u stanicama hrčka i čovjeka. Preuzeto i prilagođeno iz Rommes i sur., 1989.

*wnt-2*, tada nazvanog IRP (engl. *int*-related protein) (InterPro entry 2023; Estivill i sur., 1987). U preostalom dijelu regije probom CF16 pronađeni su sljedovi DNA koji hibridiziraju s transkriptima izoliranim iz stanica gušterače, ždrijelnog epitela, jetre i mozga. Pretraživanjem biblioteke cDNA probom CF16 izolirano je 10 klonova, no analizom sekvence u bazi podataka nisu pronađeni sljedovi nukleotida koji ukazuju na otvoren okvir čitanja. Štoviše, zbog velike

sličnosti, sljedovi DNA vjerojatno su podrijetlom iz lokusa  $\beta$ -globina očuvanog među vrstama. Treća regija, identificirana probom R14.4E1, nalazila se na položaju 215 kpb od 5' kraja proučavanog segmenta (Rommens i sur., 1989). Analizom produkata restrikcije Eco RI enzimom pronađen je visok udio uzastopnih nukleotida CpG. Ponavljajući hipometilirani nukleotidi CpG karakteristični su za sekvence u blizini 5' krajeva tkivno specifičnih i trajno eksprimiranih gena kralježnjaka (Gardiner-Garden i Frommer, 1987). No pretraživanjem biblioteke cDNA i transkripata RNA probom R14.4E1 nije izdvojen ni jedan klon te je regija također odbačena kao mogući lokus gena odgovornog za cističnu fibrozu. Hibridizacija unutar treće regije vjerojatno je posljedica hibridizacije ponavljajućih sljedova CpG među genomima proučavanih vrsta.

Posljednja regija identificirana je snažnom hibridizacijom probama E4.3 (Slika 3B) i H1.6 (Slika 3C) na položaju 264 do 268 kpb od 5' kraja proučavanog segmenta (Rommens i sur., 1989). Probe E4.3 i H1.6 hibridizacijom daju različit obrazac signala na gelu (uzorak kravlje DNA, Slika 3A i Slika 3B), no međusobno se djelomično preklapaju, stoga očuvane sekvence sadržane su u zajedničkoj regiji. Transkripti RNA iz različitih tkiva pretraženi su s probama E4.3 i H1.6, no do hibridizacije nije došlo. Probama je zatim određena sekvenca. Analiza sekvence utvrdila je prisutnost dugačkog slijeda ponavljajućih nukleotida CpG i više kratkih okvira čitanja. Razina metilacije ponavljajućih nukleotida CpG utvrđen je restrikcijskom razgradnjom enzimima Hpa II i Msp I. Enzim Hpa II prepoznaje slijed 5'-CCGG-3' i cijepa slijed ukoliko citozin na drugom mjestu nije metiliran, dok enzim Msp I cijepa navedeni slijed neovisno o stanju metiliranosti. Produkti digestije genomske DNA fibroblasta i limfoblasta s oba enzima nisu se razlikovali stoga je slijed CpG u genomskoj DNA potvrđeno hipometiliran. Obzirom na snažan signal hibridizacije i prisutnost hipometiliranih slijedova CpG 7 biblioteka cDNA ponovno su pretražene probom H1.6. Na temelju slabog signala hibridizacije izoliran je klon 10-1 iz biblioteke cDNA stanica žlijezda znojnice zdrave osobe. Slab signal pri hibridizaciji i razlog zašto pri prethodnom pretraživanju nije izoliran klon 10-1 posljedica je preklapanje od samo 113 pb između klona 10-1 i probe H1.6 (Rommens i sur., 1989.).

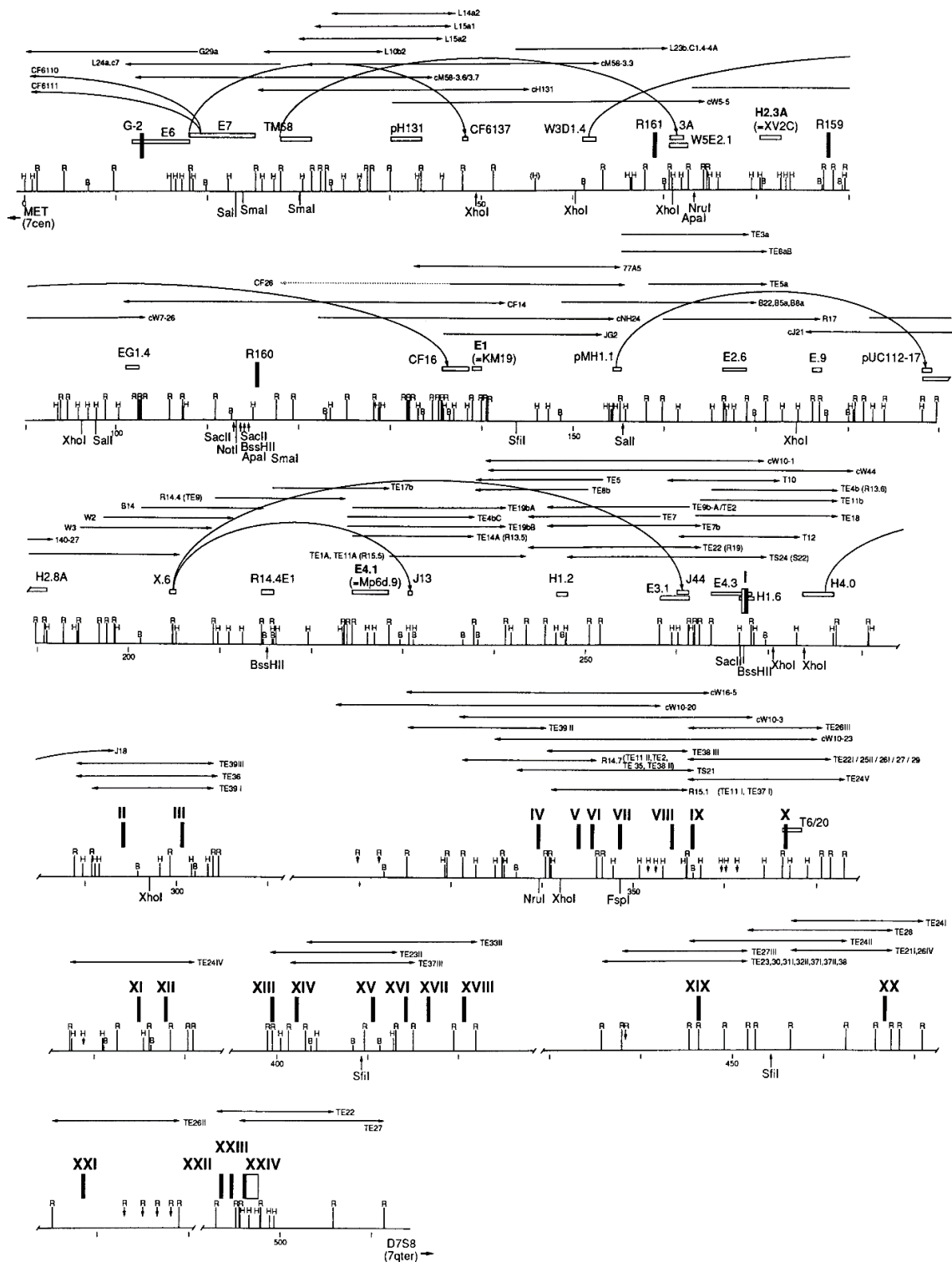
Klonom 10-1 pretraženi su transkripti izolirani iz T84 stanične linije karcinoma debelog crijeva te je izoliran transkript duljine 6.7 kpb (Riordan i sur., 1989). Orijentacijom izoliranog transkripta pomoću klona 10-1 utvrđeno je da ostatak kodirajuće regije gena za cističnu fibrozu nije sadržan u segmentu DNA od 280 kpb kloniranog metodama *chromosome walking* i *chromosome jumping*. Mapiranje je stoga nastavljeno u smjeru markera D7S8 pretraživanjem



**Slika 3.** – Rezultati hibridizacije restriksijskih fragmenata genomske DNA čovjeka, krave, miša, hrčka i kokoši nakon razgradnje enzimima Eco RI (R), Hind III (H) i Pst I (P) s probama CF14 (A), E4.3 (B) i H1.6 (C). Kozmid CF14 kpb pokazuje mnogo signala hibridizacije među svim vrstama zbog zajedničkih područja gena *wnt-2* (IRP) i lokusa  $\beta$ -globina. Proba H1.6 slabo hibridizira s genomskom DNA miša i hrčka, stoga je pri uspoređivanju hibridizacija probi H1.6 i E4.3 korištena genomska DNA krave. Signali sekvenci očuvanih među vrstama (zaokruženo) veličine su 4.3 kpb i nalaze se na jednakim pozicijama na membrani. Obje probe daju signal za isti fragment te se stoga i očuvani slijed nalazi u području preklapanja probi E4.3 i H1.6. D prikazuje restriksijsku mapu kratkog slijeda genomske DNA s kojim hibridiziraju navedene probe. Preuzeto i prilagođeno iz Rommens i sur., 1989.

biblioteka cDNA u potrazi za preostalim egzonomima. Ni jedan od 18 klonova izoliranih iz biblioteka cDNA karcinoma debelog crijeva, žlijezda znojnice, gušterače i pluća nije bio dovoljno veliki da pojedinačno kodira gen za sintezu transkripta duljine 6.7 kbp, no poravnanjem preklapajućih regija klonova određena je sekvenca cDNA odgovorne za sintezu transkripta u cijelosti. Svakome cDNA klonu potvrđen je smještaj na sedmome kromosomu hibridizacijom cDNA klona sa staničnom linijom somatskog hibrida hrčka i čovjekovog kromosoma 7 te su izrađene restriksijske mape izoliranih klonova. Ukupni slijed definiran s cDNA sadrži otvoren okvir čitanja koji kodira protein građen od 1480 aminokiselina (Riordan i sur., 1989). Hibridizacijom cDNA klonova s restriksijskim fragmentima genomske DNA utvrđeno je da više nepreklapajućih fragmenata hibridizira s cDNA klonovima, odnosno da gen odgovoran za cističnu fibrozu sadrži više egzona. Zatim su iz biblioteke cDNA izolirani klonovi nastali od nepotpuno obrađenih transkripata. Sekvenciranjem granica između egzona i introna na takvim klonovima te poravnanjem s restriksijskim mjestima na genomskoj DNA identificirana su 24 egzona gena odgovornog za cističnu fibrozu (Slika 4). Smještaj lokusa gena odgovornog za nastanak cistične fibroze uspješno je postao određen.

Gen odgovoran za nastanak cistične fibroze nazvan je gen za cistično-fibrozni transmembranski regulator provodljivosti (engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, *CFTR*; Riordan et al., 1989; Gamulin i sur., 2011) i kodira za istoimeni protein.



**Slika 4.** – Restriksijska karta kromosoma 7 između markera MET i D7S8 konstruirana metodom *chromosome walking* i *chromosome jumping*. Mjesta prepoznavanja restriksijskim enzimima Eco RI (R), Hind III (H) i Bam HI (B) naznačena su iznad linije, dok restriksijska mjesta enzima s rijetkim mjestom prepoznavanja su naznačena ispod linije. Horizontalne linije označavaju izolirane klonove iz genomske biblioteke odnosno „korake“ u metodi *chromosome walking*, sukladno tome lukovi predstavljaju „skokove“ u metodi *chromosome jumping*. Pravokutnici iznad linije označavaju mjesta hibridizacije korištenih proba s genomskom DNA. Oznake R161, R159 i R160 su mjesta hibridizacije sintetičkih oligonukleotida konstruiranih prema sekvenci *wnt-2* (IRP). Identificirani položaji egzona gena odgovornog za cističnu fibrozu naznačeni su rimskim brojevima. Preuzeto i prilagođeno iz Rommens i sur., 1989.

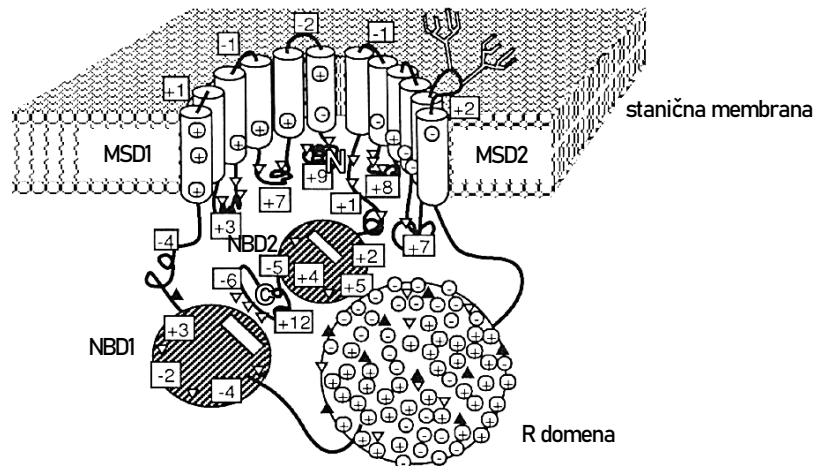


### 3. Protein CFTR

Protein CFTR je anionski kanal iz skupine ATP-vezajućih transportera (engl. ATP-binding cassette, ABC). Glavna uloga proteina CFTR je izmjena kloridnih i manjim dijelom bikarbonantnih aniona kroz staničnu membranu (Gamulin i sur., 2011.). Molekulska masa proteina je 170 kDa, a čine ju 1480 aminokiselina i N-vezani oligosaharidi. Indeks hidropatije i sličnost primarne strukture s porodicom P-glikoproteina ukazali su na modularnu građu od pet domena (Slika 5.) (Riordan i sur., 1989). Domene MSD1 i MSD2 smještene u fosfolipidnom dvosloju građene su od 6 transmembranskih segmenata povezanih ekstracelularnim i citoplazmatskim petljama (CL1-4). 12 transmembranskih segmenata zajedno tvore poru za prolazak iona, dok citoplazmatske petlje ostvaruju interakcije s drugim domenama. Dvije hidrofilne domene za vezanje i hidrolizu nukleotida – NBD1 i NBD2 smještene su s citoplazmatske strane membrane. Pravilno smatanje proteina CFTR stabiliziraju interakcije CL1 (MSD1) i CL4 (MSD2) s NBD1 te interakcije CL2 (MSD1) i CL3 (MSD2) s NBD2 (Pranke i Sermet-Gaudelus 2014). Peta, R domena, sudjeluje u regulaciji proteina CFTR zajedno s domenama NBD1 i NBD2. Domena R sadrži serinske ostatke koje fosforiliraju cAMP-ovisna protein kinaza A (PKA) i protein kinaza C (PKC) te tako reguliraju prohodnost kanala. Povećanjem koncentracije intracelularnog cikličkog AMP, povećava se aktivnost PKA koja fosforilira regulatornu domenu i otvara kanal (Nguyen i sur., 2021). Regulatorna domena posebno je obilježje proteina CFTR i ne posjeduju je preostali članovi ABC obitelji proteina.

Biosinteza proteina CFTR započinje translacijom transkripta gena *CFTR* na ribosomu. Smatanje proteina CFTR u nativnu strukturu započinje kotranslacijski, a nastavlja se duž sekrecijskog puta. Smatanje je kontroliran i hijerarhijski proces koji zahtijeva sudjelovanje šaperona. Domena MSD1 sintetizira se prva te se ugrađuje u membranu ER. Nakon ugrađivanje domene MSD1 sintetiziranu domenu NBD1 vežu šaperoni koji omogućuju pravilno smatanje domene NBD1 dok traje sinteza iduće R domene. R domena stvara interakcije s N-terminalnim krajem proteina CFTR i stabilizira domenu NBD1. Ugrađivanje domene MSD2 stabilizira interakcije domene R i domene NBD1 u potpunosti te se šaperoni otpuštaju. Naposljetku, sintetizira se i domena NBD2 na C-kraju proteina. Ukoliko je protein prošao sve kontrolne točke smatanja unutar ER pakira se u vezikule COPII i prenosi u Golgijev kompleks. Signalni slijed za prijenos u vezikule COPII čine dvije kisele aminokiseline na N-kraju proteina CFTR (Pranke i Sermet-Gaudelus, 2014). Vezikule COPII važne su u sortiranju proteina CFTR. Krivo smotani CFTR će prepoznati kompleks COPII/Sar1p i odaslati protein na razgradnju u različite dijelove ER. Također, retrogradni prijenos COPI vezikulama kontrolira signalni slijed RXR

(dva arginina između kojih se nalazi bilo koja aminokiselina; (Pranke i Sermet-Gaudelus, 2014). Novosintetizirani protein CFTR dodatno sazrijeva postranslacijski u Golgijevom kompleksu. Unutar Golgijevog kompleksa dorađuju se dva N-glikana do potpunog sazrijevanja proteina, nakon čega slijedi pupanje vezikula prema apikalnoj staničnoj membrani i prijenos proteina CFTR u staničnu membranu.



**Slika 5.** – Shematski prikaz modularne građe proteina CFTR. Cilindri prikazuju transmembranske domene MSD1 i MSD2 smještene u fosfolipidnom dvosloju. Osjenčani krugovi su domene NBD1 i NBD2, bijeli pravokutnici simboliziraju mjesta vezanja ATP molekula. Najveći krug predstavlja domenu R koja povezuje MSD1 i NBD1 s MSD2 i NBD2. „+“ oznake označavaju pozitivno nabijene aminokiseline lizin, arginin ili histidin, dok „-“ označava negativno nabijene aminokiseline aspartat ili glutamat. Brojevi u kvadratima označavaju neto naboj petlji između cilindara. Mjesta fosforilacije PKA označena su trokutom s vrhom prema gore, a mjesta fosforilacije PKC trokutom s vrhom prema dolje. Preuzeto i prilagođeno iz Riordan i sur., 1989.

Ekspresija gena *CFTR* ovisi o stupnju razvoja, vrsti stanica i tkiva te prisutnosti mutacija. *CFTR* je eksprimiran na apikalnoj površini većine epitelnih stanica poput epitela dišnih puteva, žlijezda sluznica, znojnice i slinovnice, gušterače, kripti gastrointestinalnog sustava, spolnih cjevčica, mokraćnog mjehura i žučovoda. Uz epitel, *CFTR* je eksprimiran i na površini endotelnih stanica, stanicama svih mišića, eritrocitima, trombocitima, neuronima, spermijima i stanicama imunskog sustava (Pranke i Sermet-Gaudelus, 2014). Regulacija *CFTR* ekspresije u epitelnim stanicama dišnih puteva najviše ovisi o stupnju razvoja. Tijekom embrionske i fetalne faze ekspresija *CFTR* je visoka, no nakon rođenja se smanjuje. Za razliku od regulacije ekspresije u dišnim putevima, ekspresija u kriptama ovisi o alternativnom prekrajanju prvoga introna i specifična je za tu vrstu stanica. Općenitiji oblik regulacije je

antagonističko djelovanje dvaju proteina. Humana acetil transferaza GCN5 s transkripcijskim faktorom ATF-1 potiče transkripciju vezanjem na Y-kutiju (CCAAT) na poziciji +2 promotora, dok protein CDP (engl. CCAAT displacement protein) kompetira za isto mjesto i posljedično uzrokuje smanjenje ekspresije *CFTR* (Pranke i Sermet-Gaudelus, 2014). Povećanje koncentracije cAMP, osim što potiče otvaranje kanala, potiče ekspresiju gena *CFTR*. cAMP se veže s CRE-vezajućim proteinom na cAMP element na poziciji -48 promotora *CFTR*. Različite mutacije u promotorskoj regiji odgovorne su za poremećenu ekspresiju proteina CFTR, a bit će opisane kasnije.

## 4. Patofiziologija cistične fibroze

Cističnu fibrozu uzrokuju mutacije gena *CFTR* (Rommens i sur., 1989). Širok raspon simptoma u kliničkim slikama pacijenata s cističnom fibrozom ukazao je na heterogenost uzroka bolesti (Gurwitz i sur., 1979). Do sada je opisano 2107 mutacija gena *CFTR*, od kojih 431 uzrokuje razvoj cistične fibroze (*CFTR2* 2023). Uz patogene mutacije u razvoju bolesti sudjeluju i drugi faktori poput okolišnih, socioekonomskih i endogenih čimbenika. Mutacije se mogu podijeliti u šest klasa prema utjecaju na protein CFTR.

Mutacije klase I onemogućuju ekspresiju gena *CFTR* i uzrok su cistične fibroze u 2-5% slučajeva (Yu i Sharma, 2022.). Klasu I čine besmislene mutacije, pomaci u okviru čitanja i mutacije u mjestima prekrajanja (Veit i sur., 2016). Primjer su mutacije W1282X, R553X i G542X. U svakoj od mutacija, aminokiselina na naznačenom mjestu zamijenjena je STOP kodonom te rezultira preuranjenom terminacijom polipeptida, odnosno smanjenom ekspresijom proteina CFTR na staničnoj površini. Mutacija W1282X odgovorna je za razvoj cistične fibroze u 60% slučajeva među populacijom Aškenazi židova (Hamosh i sur., 1992). Mutacija terminira sintezu proteina prije domene NBD2. Nedostatak stabilizacije interakcijama NBD1 i NBD2 stvara nestabilan protein bez funkcije (Veit i sur., 2016). G542X također uzrokuje nastanak skraćenog proteina CFTR, a mutacija R553X uzrokuje preskakanje egzona 11 tijekom prekrajanja transkripta. Ukoliko se preskakanje STOP kodona inducira lijekovima (npr. gentamicinom) ili se dogodi slučajno, nastaju proteini s promijenjenim slijedom aminokiselina. Takvi proteini mogu postati funkcionalni ili pokazivati defekte karakteristične za preostale klase mutacija (Veit i sur., 2016).

Klasa II mutacija onemogućuju intracelularni transport proteina CFTR prema staničnoj površini. Razlozi mogu biti pogrešno smatanje, prijevremena razgradnja u kontrolnim točkama ER-a ili neispravna post-translacijska obrada (Veit i sur., 2016). Mutacije  $\Delta F508$  pripada klasi II, prva je otkrivena (Riordan i sur., 1989) te ujedno i najzastupljenija mutacija među pacijentima s cističnom fibrozom (Wang, 2023). 90% pacijenata posjeduje barem jedan alel s  $\Delta F508$  mutacijom (Wang i Li, 2014.). Delecija tri uzastopna nukleotida u rasponu +1519 do +1524 unutar egzona 10 dovodi do nestanka aminokiseline fenilalanina na 508. poziciji (F508) u proteinu. S obzirom na to da mutacija ne uzrokuje pomak u okviru čitanja ostatak aminokiselinskog slijeda nije promijenjen. F508 nalazi se unutar domene NBD1 proteina CFTR. F508 ostvaruje stabilizirajuće interakcije između domene NBD1 i CL4. Nedostatak ove interakcije čini protein nestabilnim i podložnim krivome smatanju, stoga protein CFTR- $\Delta F508$

većinom prepoznaje ER i usmjerava ga u vezikule na razgradnju (Wang i Li, 2014). Dio CFTR- $\Delta$ F508 uspijeva otići do površine stanične membrane, no poluvijek takvog proteina je značajno smanjen u odnosu na divlji tip. Proteini CFTR- $\Delta$ F508 koji dopiru na površinu ne prenose kloridne ione. Moguće zbog toga što  $\Delta$ F508 mijenja konformaciju ATP-veznog mjesta domene NBD1 i utječe na kinetiku izmjene ATP molekula u veznom mjestu (Abreui sur., 2020).

Mutacije klase III čine protein CFTR neosjetljivim na unutarstaničnu signalizaciju (Yu i Sharma 2022). Rezultat takvih mutacija je cjelovit i pravilno smotan protein u staničnoj membrani koji se ne može potaknuti na otvaranje i sudjelovati u prijenosu iona. Mutacija G551D pripada klasi III. G551D smanjuje prepoznavanje aktivacijskih mjesta fosforilacije protein kinazom A (Wang i sur., 2020).

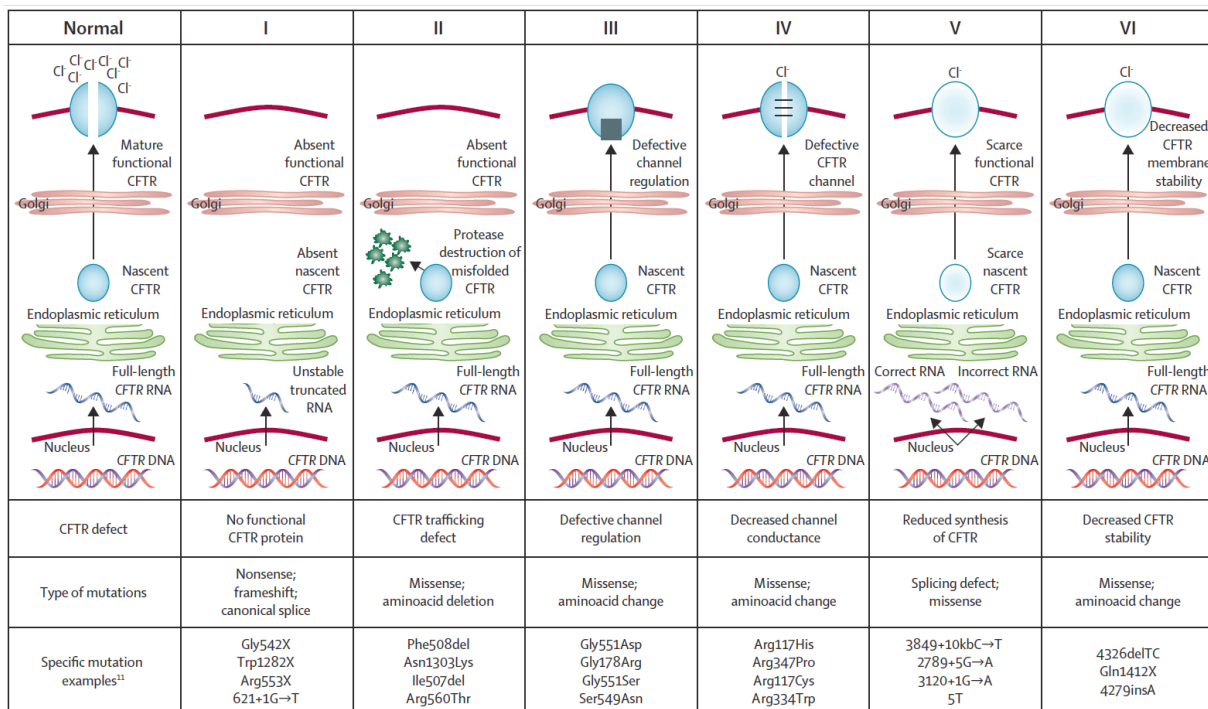
Mutacije klase IV smanjuju provodljivost kloridnog kanala u odnosu na divlji tip uslijed krivog smatanja domena koje oblikuju kanal ili smanjujući vrijeme otvorenosti kanala nakon podraživanja (Yu i Sharma 2022). Primjeri mutacija klase IV su R117H i R334W.

Mutacije klase V nalaze se unutar promotora i na mjestima prekrajanja transkripta. Mutacije ne utječu na strukturu proteina CFTR, već smanjuju njegovu zastupljenost na staničnoj membrani. Primjer mutacije klase V je A455E.

Mutacije klase VI također smanjuju koncentraciju proteina CFTR na staničnoj membrani, no drugačijim mehanizmom od mutacija klase V. Mutacije klase VI smanjuju stabilnost proteina i stvaraju dodatne signale za internalizaciju proteina CFTR (Veit i sur., 2016). Posljedica povećane internalizacije je manjak proteina CFTR na staničnoj površini te stoga i smanjen protok kloridnih iona. Primjeri mutacija klase VI su c.120del23 i frakcija proteina CFTR- $\Delta$ F508 koji unatoč mutaciji  $\Delta$ F508 dopiru na staničnu membranu tzv. *rescued*  $\Delta$ F508 (r $\Delta$ F508). r $\Delta$ F508 istovremeno pripada mutacijama klase II i VI zbog toga što je  $\Delta$ F508 mutacija u proteinu CFTR na staničnoj površini ujedno i signal za pojačanu internalizaciju..

Mnoge mutacije dijele obilježja više klasa te ne mogu biti svrstane isključivo unutar jedne klase. Također, podjela mutacija temelji se na molekularnim istraživanjima gena *CFTR* te nije povezana s opsegom i težinom kliničkih slika pacijenata. Štoviše, pacijenti s jednakim genotipom lokusa *CFTR* mogu razviti različite fenotipe (kliničke slike) obzirom na prethodno navedene etiološke čimbenike. Pacijenti također mogu biti homozigotni mutanti ili heterozigoti s dvije različite mutacije. Zajedničko obilježje svih klasa mutacija je nedostatak funkcionalnih proteina CFTR u staničnoj membrani, a težina kliničke slike preslika je preostale

funkcionalnosti mutiranog lokusa *CFTR*. Mutacije klasa IV, V i VI pokazuju veću funkcionalnost u odnosu na mutacije klasa I, II i III te stoga i uzrokuju nastanak lakših oblika cistične fibroze (Cystic Fibrosis Foundation 2023). Direktna posljedica nedostatka funkcionalnog proteina CFTR u staničnoj membrani su: poremećaj prijenosa kloridnih iona iz stanica, povećana apsorpcija natrijevih iona niz elektrokemijski gradijent nastao zadržavanjem kloridnih iona i povećan ulazak vode niz gradijent vodnog potencijala nastao natrijevim i kloridnim ionima (Yu i Sharma, 2022). Zaostali gusti sekret uzrokuje patološke pojave u gotovo svakom organskom sustavu.



**Slika 6.** – Sumarni prikaz značajki mutacija koje uzrokuju nastanak cistične fibroze ovisno o klasi mutacija. Ilustracija sadrži shemu biosinteze proteina CFTR, defekte proteina CFTR, vrste mutacija koje uzrokuju navedeni defekt i najčešće primjere za svaku od šest klasa patogenih mutacija. Preuzeto i prilagođeno iz Boyle i De Boeck 2013.

Gusti sekret na apikalnoj površini epitelnih stanica dišnih puteva onemogućava funkciju trepetljiki bronhalne sluznice, otežava disanje te stvara opstrukcije donjih dišnih puteva (Viet i sur., 2016). Nedostatno strujanje sluzi iz bronhalnog stabla omogućava mikroorganizmima naseljavanje površina dišnih puteva i pojavu kronične upale. Upalni procesi uz mikroorganizme dodatno oštećuju tkivo dišnog sustava, a stanični otpadci pridonose razvoju mikroorganizama (Gamulin i sur., 2011). Također, neutrofilni uključeni u upalni proces izlučuju interleukin 8 koji dodatno potiče lučenje gustog sekreta. Pluća pacijenata s cističnom fibrozom u maternici, pri

porođaju i nedugo nakon rođenja nisu oštećena, no nakupljanje gustog sekreta i kronična upala dovode do progresivnog pogoršanja. Akumulirana oštećenja dišnog sustava postepeno smanjuju ventilaciju pluća i dovode do smrti pacijenta. Prestanak rada dišnog sustava najčešći je uzrok smrti pacijenata s cističnom fibrozom (Yu i Sharma, 2022). Uz pluća, najčešći organ s patološkim promjenama u pacijenata s cističnom fibrozom je gušterača. Gusti sekret uzrokuje opstrukcije odvodnih cjevčica gušterače. Nakupljanje bjelančevina u proksimalnom dijelu kanalića inducira upalu, fibrozu tkiva, taloženje masnoća i u konačnici odumiranje gušterače (Wang, 2023). Egzokrini produkti gušterače ne izlučuju se u dvanaesnik, zaostaju i započinju razgradnju gušterače. U težim oblicima bolesti razgrađuju se i Langerhasovi otočići te nastaju simptomi nalik na dijabetes tipa I. Osim u razgradnji hrane, gušterača hidrogenkarbonatnim ionima ( $HCO_3^-$ ) neutralizira kiseli pH himusa. Poremećen prijenos  $HCO_3^-$  iona CFTR proteinom u lumen kanalića gušterače stvara nedovoljno lužnat sekret za neutralizaciju kiselog sadržaja želuca. Uslijed manjka enzima i neodgovarajućeg pH, himus nije enzimatski probavljen što dovodi do nastanka masne stolice, pojave abdominalnih bolova i nepotpune apsorpcije nutrijenata, posebice vitamina topljivih u lipidima – D, E, K i A (Wang, 2023). Začepljenje odvodnih kanalića gustim sekretom uzrokuje i patološke promjene unutar bilijarno-hepatičkog sustava. Manjak izlučene žuči dovodi do nepotpune apsorpcije masnih kiselina i oštećenja u mozga. Začepljenje žučovoda javlja se u 15% pacijenata te dovodi do nastanka žučnog kamena i dodatnu blokadu. Nakupljeni bilirubin unutar kanalića prenosi se u jetru te uzrokuje hiperbilirubinemiju i opstruktivnu cirozu jetre (Yu i Sharma, 2022). CFTR u apikalnoj stijenci kolangiocita ne osigurava dovoljnu količinu  $HCO_3^-$  za zaštitu stijenke žučovoda, stoga žučne soli otapaju njihovu staničnu membranu (Wang, 2023). Prvi simptomi cistične fibroze javljaju se unutar gastrointestinalnog sustava. 20% novorođenčadi s cističnom fibrozom rađa se s opstrukcijom tankog crijeva ili jačnim mekonijem. Apsorpcija vode zbog poremećaja kloridnih iona u terminalnom ileumu čini mekonij pregustim za pomicanje crijevnom peristaltikom te ukoliko se ne liječi dovodi do smrti novorođenčadi (Wang, 2023). Opstrukcija distalnih dijelova crijeva i konstipacija nastavljaju biti problem tokom cijelog života pacijenata. Nadalje, usporena peristaltika, zadržavanje mikroorganizama u gustom sekretu i nutrijenti iz hrane pogodni su uvjeti za rast mnogih mikroorganizama. Tanko crijevo odraslih pacijenata prerasta bakterijska mikroflore te aktivira imunski sustav domaćina. Kronična upala dovodi do oticanja crijevne stijenke, oštećenja tkiva, fibrozu i smanjenu apsorpciju. Poremećaji razgradnje i apsorpcije hranjivih tvari u konačnici očituju se poteškoćama u razvoju. Posljedice cistične fibroze na reproduktivni sustav teže su i učestalije u muškaraca nego žena. Većina muškaraca pokazuje kongenitalnu bilateralnu odsutnost vas deferensa, a ukoliko se vas deferens i razvije

često je blokiran gustim sekretom (Wang, 2023). Žene oboljele od cistične fibroze često su manje plodne u odnosu na zdrave žene. Rijetko dolazi i do kongenitalnog nedostatka maternice i rodnice. Prijenos kloridnih iona proteinom CFTR u znojnim žlijezdama, za razliku od ostalih tkiva, odvija se iz ekstracelularnog prostora u unutrašnjost stanice (Gamulin i sur., 2011). Pacijenti s cističnom fibrozom ne reapsorbiraju kloridne ione te imaju povećanu koncentraciju soli u znoju. U uvjetima pojačanog ili produljenog znojenja to može rezultirati pojavom hiponatrijemije i dehidracije (Yu i Sharma, 2022). Slani znoj patogenomski je simptom korišten u ranoj dijagnozi bolesti djece i novorođenčadi. CFTR je glavni kloridni kanal fagocita. Kloridni ioni tijekom biosinteze oksidiraju se u hipokloritnu kiselinu u fagosomu koja ima snažan antimikrobni učinak (Yu i Sharma, 2022). Neutrofili s nefunkcionalnim proteinom CFTR ne uklanjaju učinkovito mikroorganizme što čini imunološki sustav pacijenata neprikladnim za obranu od mikroorganizama. Preostale patološke pojave u neutrofila su smanjena podražljivost, razgradnja receptora CXCR1, preosjetljivost na lipopolisaharide, povećana proizvodnja interleukina 8, odgođena apoptoza, promjena ekspresije inflamazoma i prekasno opuštanje granula iz citoplazme (Wang, 2023). Monocitno-makrofagni sustav također pokazuje smanjenu razinu fagocitoze, uklanjanja nametnika i sposobnosti popravka tkiva. Cistična fibroza uzrokuje i razvoj autoimunih atropatija od kojih je najčešća hipertrofijska pulmonarna osteoatropatija. Bolest najčešće zahvaća kosti zapešća i gležnjeva, no može se javiti i u području drugih zglobova. Simptomi su oticanje u području zgloba, ponavljajuća bol te smanjen raspon pokreta. Patološka slika pacijenata rezultat je sistemskih promjena unutar organizma i njezina težina može varirati ovisno o vrsti mutacije, starosti pacijenta, načinu života i mogućnostima liječenja.



## 5. Genska terapija cistične fibroze

Otkrićem mutacija gena *CFTR* započelo je i razvijanje genske terapije za liječenje cistične fibroze. Glavna prednost genske terapije je mogućnost da mali broj primjena lijeka u potpunosti ukloni uzrok bolesti. Pri osmišljavanju genske terapije za liječenje cistične fibroze potrebno je uzeti u obzir nekoliko ograničenja. Cistična fibroza zahvaća više organskih sustava te genska terapija mora djelovati na više različitih stanica unutar organizma. S obzirom na to da je protein CFTR većinom izražen na epitelnim stanicama, vektor genske terapije može biti isporučen s luminalne strane udisanjem, gutanjem ili nanošenjem. Nedostatci isporučivanja vektora luminalnim putem su fizička blokada gustom sluzi, mukocilijarni sustav koji otplavljuje tvari s epitelne površine, nemogućnost ulaska vektora zbog polarizacije citoskeleta te smještaj ciljanih stanica ispod slojeva drugih stanica (Wang, 2023). Ukoliko se vektor isporuči cirkulacijom mora penetrirati kroz fizičke zapreke endotela, intersticijskog prostora i bazolateralnu membranu, no prednosti su što vektor može doprijeti do svih stanica u organizmu. Kako bi se postiglo trajno izlječenje, genska terapija se mora primijeniti na matičnim ili progenitorskim stanicama. Terminalno diferencirane epitelne stanice imaju ograničen životni vijek te bi nakon nekoliko dioba bile ponovno zamijenjene novim epitelnim stanicama s disfunkcionalnim genom *CFTR*. Cističnu fibrozu uzrokuje više od 2000 mutacija te genska terapija mora biti specifična za svaku mutaciju ili se oslanjati na ugrađivanje ispravnog gena *CFTR* u cijelosti. Obzirom na progresivnu prirodu cistične fibroze, gensku terapiju je potrebno primijeniti što ranije tijekom života. Uz sve uvjete, pri konstrukciji genske terapije, potrebno je i smanjiti šansu za uvođenje promjena u genomu na neočekivanim mjestima tzv. *off-targeting*. Prvi pokušaji genske terapije temeljili su se na ubacivanju cDNA funkcionalnog gena *CFTR* u epitelne stanice dišnog sustava pomoću adenoviralnog vektora s rekombinantno deletiranim genom nužnim za replikaciju (rAd) (Flotte, 1993). Dio stanice je nakon infekcije vektorom rAd pokazao povećan prijenos kloridnih iona kroz staničnu membranu te posljedično razrjeđenje sluzi. No nedostatci rAd vektora, poput kratkotrajnosti ekspresije funkcionalnog gena *CFTR*, visoka razina imunogenosti i niska stopa infekcije epitelnih stanica uslijed blokade gustom sluzi na epitelnim površinama, potakli su nastavak potrage za lijekom. Također, tadašnja ograničenja genske terapije usmjerili su istraživanja prema pronalasku malih molekula (modulatora) koje poništavaju djelovanje mutacija gena *CFTR* ili ublažavaju simptome pacijenata. Tek otkrićem novih tehnika genskog inženjeringa poput sustava CRISPR-Cas9, proteina TALEN i nukleaza s cinkovim prstima započinja razvoj prikladnih genskih terapija. Danas je razvijeno nekoliko

potencijalnih metoda genske terapije, a u nastavku su opisane tri metode koje su mogući kandidati za opću bolničku primjenu.

## 5.1. CRIPR-Cas genska terapija

CRISPR (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) sustav sastoji se od gena za Cas (engl. CRISPR-associated) proteine i pravilno razmaknutih kratkih ponavljajućih sekvenci. Cas proteine s nukleaznom aktivnošću navodi gRNA (engl. *guide RNA*) do ciljane sekvence. Shwank i sur., (2013) prvi su upotrijebili sustav CRISPR-Cas u korekciji stanične kulture matičnih stanica crijeva pacijenta homozigotnog za  $\Delta F508$  mutaciju. CRISPR-Cas sustavom uvedeni su dvolančani lomovi u lokus *CFTR* uzvodno od mutacije  $\Delta F508$  unutar egzona 11 i nizvodno u intronu 11-12. Plazmid s kopijom ispravnog gena korišten je kao kalup za popravak homolognom rekombinacijom. Genetički modificirane stanice razvile su se u organoide koji su pozitivno odgovarali na testove aktivnosti proteina CFTR. Firth i sur., (2015) upotrijebili su CRISPR tehnologiju za korekciju lokusa *CFTR* induciranih pluripotentnih matičnih stanica kožnih fibroblasta s jednakim defektom. Nakon genske korekcije matične stanice potaknute su na diferencijaciju u epitelne stanice dišnog sustava te su također pokazivale CFTR aktivnost. Uređivač dušičnih baza, odnosno protein Cas bez katalitičke aktivnosti fuzioniran s deaminazom, upotrijebljen je za korekciju mutacija klase I. Preuranjen STOP kodona zamijenjen je kodonom za odgovarajuću aminokiselinu promjenom adenina u gvanin djelovanjem deaminaze (Krishnamurthy i sur., 2021). Naknadni eksperimenti dodatno su potvrdili uspješnost primjene CRISPR tehnologije u *in vitro* popravku izoliranih staničnih kultura s mutacijom u lokusu *CFTR* (Wang, 2023).

U svrhu primjene genske terapije na pacijentima, CRISPR tehnologiju potrebno je prilagoditi *in vivo* uvjetima. Eksperimenti kojima je gen *CFTR* modificiran sustavom CRISPR u modelnim organizmima još nisu provedeni, no dva eksperimenta ukazuju na mogućnost dopremanja CRISPR genske terapije do epitelnih stanica dišnog sustava. Krishnamurthy i sur., (2019) dopremili su sustav CRISPR pomoću amfipatskih peptida u epitel dišnih puteva testnih miševa te je 13% stanica sadržavalo izmjenu u genomu. Ista skupina istraživača također je primjenila sličan postupak pri dopremanju uređivača baza ABE8e-Cas9 rezus majmunima i miševima (Kulhankova i sur., 2023). Stanice dišnog epitela uspješno su genetski izmijenjene, a stanice miševa zadržale su se u dišnom epitelu idućih 12 mjeseci. Mogućnost dopreme

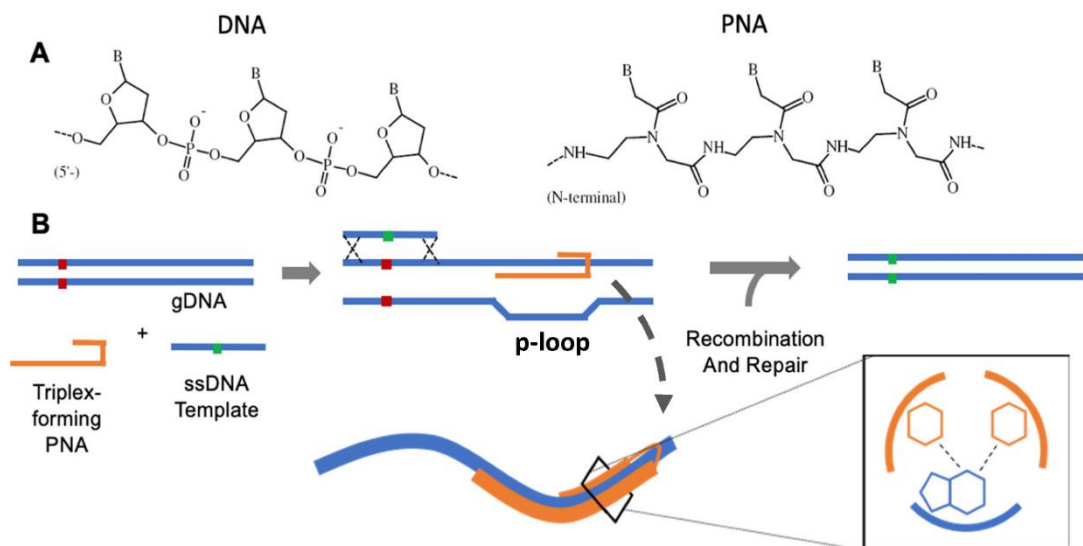
CRISPR tehnologije do ciljanih stanica pruža nadu za moguću primjenu *in vivo* CRISPR genske terapije u liječenju cistične fibroze.

Prednosti sustava CRISPR su pristupačnost, cijena i mogućnost personalizacije. Konstrukcija molekula gRNA relativno je jednostavan i jeftin proces, a omogućava precizno uvođenje jednolančanih ili dvolančanih lomova u genom i popravak mutacija. Odnosno, obzirom na više od 2000 različitih mutacija koje uzrokuju cističnu fibrozu, CRISPR sustav mogao bi se prilagoditi popravku svih mutacija (Wang, 2023). Nedostatak primjene CRISPR tehnologije vidljiv je nakon uvođenja dvolančanog loma u genom. Ukoliko se lom popravi nehomolognim spajanjem krajeva uvode se nove mutacije na mjesto loma. Za pravilan popravak potrebno je unijeti homolognu DNA molekulu s ispravnom informacijom prema kojoj će se lom popraviti homolognom rekombinacijom te istovremeno inducirati dijeljenje ciljnih stanica. Izvedenica sustava CRISPR-Cas– Prime editing, ne zahtijeva stanične enzime za homolognu rekombinaciju i može izmijeniti genom neovisno o staničnom ciklusu (Doman i sur., 2022). Sustav CRISPR-Cas koristi se i za proizvodnju modelnih organizama s cističnom fibrozom za potrebe istraživanja. Pomoću vektora ili mikroinjektiranjem proteini Cas s gRNA i plazmidom koji nosi mutaciju unose se u zigotu i uzrokuju mutacije gena *CFTR* koje izazivaju cističnu fibrozu (Wang, 2023).

## 5.2. Genska terapija peptidnom nukleinskom kiselinom

Peptidna nukleinska kiselina (engl. peptide nucleic acid, PNA) građena je od poli[N-(2-aminoetil)-glicin] okosnice s vezanim purinskim i pirimidinskim dušičnim bazama (Slika 7A; Nielsen i sur., 1991). Okosnica PNA nema naboj te stvara jake nekovalentne interakcije s DNA lancem na temelju komplementarnosti dušičnih baza. Rogers i sur., (2002) opisali su mehanizam mjesno specifične rekombinacije posredovane invazijom PNA u dvostruku uzvojnici DNA. Nastanak trostruke uzvojnice uvodi stres u zavojnicu što potiče popravak DNA mjesno specifičnom rekombinacijom ovisnom o XPA faktoru (Slika 7B; Rogers i sur., 2002). Ukoliko se DNA lanac popravi prema unesenoj komplementarnoj DNA popravak stvara genski izmijenjenu stanicu. PNA je primijenjena u korekciji lokusa *CFTR*. Egan i sur., (2015) upakirali su PNA i donor DNA molekule u polimerne nanočestice. Nanočestice s molekulama PNA dovoljno su male da prođu tkivne prepreke do ciljnih stanica. Odabirom molekula (liganada) pri izradi nanočestica one se usmjeravaju u stanice s kompatibilnim receptorom na površini (McNeer i sur., 2015). Također, nanočestice nemaju veliku razinu imunogeničnosti i

mogu se višestruko primijeniti radi postizanja veće stope korekcije (Wang, 2023). Nanočestice su dodane staničnoj kulturi epitelnih stanica ljudskih bronhiola izoliranih iz  $\Delta F508$  homozigotnih pacijenata i unesene u dišne puteve miševa homozigotnih za  $\Delta F508$  mutaciju. 25% epitelnih stanica ljudskih bronhiola povratile su CFTR aktivnost, a postignuta je i *in vivo* izmjena epitelnih stanica dišnog sustava miša (McNeer i sur., 2015). Piotrowski-Daspit i sur., (2022) unijeli su nanočestice intravenski u homozigotne  $\Delta F508$  miševe. Intravenskim ubrizgavanjem nanočestice su mogle doprijeti do više različitih organa. Genski izmijenjene stanice nalazile su se u epitelu nazofarinksa, dušnika, pluća, ileuma, debelog i ravnog crijeva. Stopa korekcija od samo 0.1 do 2 % stanica bila je dovoljna za ublažavanje simptoma kronične upale i razrjeđenja sluzi (Wang, 2023). Ovi podaci upućuju na moguću primjenu PNA genske terapije u kliničkom liječenju cistične fibroze.



**Slika 7.** – (A) Struktura DNA i PNA molekule s naznačenim veznim mjestima dušičnih baza. (B) Pojednostavljeni koraci indukcije popravka PNA molekulom u genskoj terapiji. PNA (narančasto) invadira dvostruku uzvojniciu gDNA domaćina (plavo) te uzrokuje rekombinantni popravak DNA ovisan o XPA faktoru prema donorskoj DNA. Unutar kvadrata shematski je prikazano Hoogsteen sparivanje baza unutar DNA-PNA trostruke uzvojnice. Preuzeto i prilagođeno iz Economos i sur., 2020.

## 6. Zaključak

Analiza vezanosti fenotipa cistične fibroze s drugim DNA markerima uspješno je suzila moguće područje za pronalazak lokusa odgovornog gena na regiju 7q32. Navedena regija klonirana je metodama *chromosome walking* i *chromosome jumping* te je identificiran položaj gena *CFTR*. Mutacije unutar gena *CFTR* uzrokuju nastanak cistične fibroze. Trajno izlječenje pacijenata zahtijeva primjenu genske terapije. Upotreba CRISPR-Cas sustava i PNA pokazala se uspješnom u *in vitro* i *in vivo* korekciji, no nedovoljno za kliničku primjenu. Genska terapija trenutno se nalazi u začecima zbog otežane dopreme do ciljnih stanica, ograničene učinkovitosti i potencijalne opasnosti od uvođenja neželjenih mutacija. Potrebna su dodatna znanstvena istraživanja zajedno s kliničkim testiranjem kako bi uklonila ograničenja genske terapije te omogućila ispravna i trajna korekcija gena *CFTR* u pacijenata s cističnom fibrozom.

## 7. Literatura

- Abreu B, Lopes EF, Oliveira ASF, Soares CM (2020). F508del disturbs the dynamics of the nucleotide binding domains of *CFTR* before and after ATP hydrolysis. *Proteins* **88**: 113–126.
- Andersen D, Hodges RG (1946). Celiac syndrome: genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* **72**: 62–81.
- Berker PE (1990). Gene mapping and Cystic Fibrosis. *Am J Med Sci* **299**: 69–72.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* **32**: 314.
- Boyle MP, Boeck K De (2013). A new era in the treatment of cystic fibrosis: Correction of the underlying *CFTR* defect. *Lancet Respir Med* **1**: 158–163.
- CFTR*(2023) <https://CFTR2.org/> (pristupljeno 10. 08. 2023.).
- Collins FS, Drumm ML, Cole JL, Lockwood WK, Woude GF Vande, Iannuzzi MC (1987). Construction of a General Human Chromosome Jumping Library, with Application to Cystic Fibrosis. *Science* **235**: 1046–1049.
- Collins FS, Weissman SM (1984). Directional cloning of DNA fragments at a large distance from an initial probe: a circularization method. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 6812.
- Craig Chinault A, Carbon J (1979). Overlap hybridization screening: isolation and characterization of overlapping DNA fragments surrounding the *leu2* gene on yeast chromosome III. *Gene* **5**: 111–126.
- Cystic Fibrosis Foundation (2023) CF Genetics: The Basics <https://www.cff.org/intro-cf/cf-genetics-basics> (pristupljeno 12. 08. 2023.)
- Doman JL, Sousa AA, Randolph PB, Chen PJ, Liu DR (2022). Designing and executing prime editing experiments in mammalian cells. *Nature Protocols* **17**: 2431–2468.
- Economos NG, Oyaghire S, Quijano E, Ricciardi AS, Mark Saltzman W, Glazer PM (2020). Peptide Nucleic Acids and Gene Editing: Perspectives on Structure and Repair. *Molecules* **25**: 735.
- Eiberg H, Mohr J, Schmiegelow K, Nielsen LS, Williamson R (1985). Linkage relationships of paraoxonase (PON) with other markers: indication of PON-cystic fibrosis synteny. *Clin Genet* **28**: 265–271.
- Estivill X, Farrall M, Scambler PJ, Bell GM, Hawley KMF, Lench NJ (1987). A candidate for the cystic fibrosis locus isolated by selection for methylation-free islands. *Nature* **326**: 840–845.
- European Bioinformatics Institute (2023) - InterPro entry - Wnt-2 protein (IPR009140) <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR009140/> (pristupljeno 07. 08. 2023.).
- Firth AL, Menon T, Parker GS, Qualls SJ, Lewis BM, Ke E (2015). Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell Rep* **12**: 1385–1390.
- Flotte TR (1993). Prospects for virus-based gene therapy for cystic fibrosis. *J Bioenerg Biomembr* **25**: 37–42.
- Gamulin Stjepan, Marušić Matko, Kovač Z (2011). Patofiziologija. Medicinska naklada, Zagreb.
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**: 261–282.

- Gurwitz D, Corey M, Francis PWJ, Crozier D, Levison H (1979). Perspectives in Cystic Fibrosis. *Pediatr Clin North Am* **26**: 603–615.
- Hamosh A, Rosenstein BJ, Cutting GR (1992). *CFTR* nonsense mutations G542X and W1282X associated with severe reduction of *CFTR* mRNA in nasal epithelial cells. *Hum Mol Genet* **1**: 542–544.
- Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A (1989). Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. *Science* **245**: 1073–1080.
- Krishnamurthy S, Traore S, Cooney AL, Brommel CM, Kulhankova K, Sinn PL (2021). Functional correction of *CFTR* mutations in human airway epithelial cells using adenine base editors. *Nucleic Acids Res* **49**: 10558–10572.
- Krishnamurthy S, Wohlford-Lenane C, Kandimalla S, Sartre G, Meyerholz DK, Théberge V (2019). Engineered amphiphilic peptides enable delivery of proteins and CRISPR-associated nucleases to airway epithelia. *Nature Communications* **10**: 1–12.
- Kulhankova K, Traore S, Cheng X, Therapeutics F, Benk-Fortin H, Hallée S (2023). Shuttle Peptide Delivers Base Editor RNPs to Rhesus Monkey Airway Epithelial Cells In Vivo.
- McNeer NA, Anandalingam K, Fields RJ, Caputo C, Kopic S, Gupta A (2015). Nanoparticles that deliver triplex-forming peptide nucleic acid molecules correct F508del *CFTR* in airway epithelium. *Nature Communications* **6**: 1–11.
- Nguyen JP, Bianca M, Huff RD, Tiessen N, Inman MD, Hirota JA (2021). Modulation of cAMP metabolism for *CFTR* potentiation in human airway epithelial cells. *Sci Rep* **11**: 904.
- Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (1991). Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **254**: 1497–1500.
- Piotrowski-Daspit AS, Barone C, Lin CY, Deng Y, Wu D, Binns TC (2022). In vivo correction of cystic fibrosis mediated by PNA nanoparticles. *Sci Adv* **8**: 522.
- Pranke IM, Sermet-Gaudelus I (2014). Biosynthesis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Int J Biochem Cell Biol* **52**: 26–38.
- Reichert CO, Levy D, Bydlowski SP (2021). Paraoxonase Role in Human Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants* **10**: 1–26.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon NOA, Rozmahel R, Grzelczak Z (1989). Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. *Science* **245**: 1066–1073.
- Rogers FA, Vasquez KM, Egholm M, Glazer PM (2002). Site-directed recombination via bifunctional PNA-DNA conjugates. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 16695–16700.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping. *Science* **245**: 1059–1065.
- Rommens JM, Zengerling S, Burns J, Melmer G, Kerem B, Plavsic N (1988). Identification and regional localization of DNA markers on chromosome 7 for the cloning of the cystic fibrosis gene. *Am J Hum Genet* **43**: 645.
- Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T (2013). Functional repair of *CFTR* by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* **13**: 653–658.

- Scotet V, L'hostis C, Férec C (2020). The Changing Epidemiology of Cystic Fibrosis: Incidence, Survival and Impact of the *CFTR* Gene Discovery. *Genes (Basel)* **11**: 589.
- Steinberg A, Morton NE (1956). Sequential test for linkage between cystic fibrosis of the pancreas and the MNS locus. *Am J Hum Genet* **8**: 177–189.
- Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW (2016). From *CFTR* biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell* **27**: 424.
- Wainwright B, Scambler P, Schmidtke J (1985). Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen–q22. *Nature* **318**: 384–385.
- Wang G (2023). Genome Editing for Cystic Fibrosis. *Cells* **12**: 1555.
- Wang W, Fu L, Liu Z, Wen H, Rab A, Hong JS, i sur., (2020). Translational Physiology: G551D mutation impairs PKA-dependent activation of *CFTR* channel that can be restored by novel GOF mutations. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **319**: L770.
- Wang XR, Li C (2014). Decoding F508del Misfolding in Cystic Fibrosis. *Biomolecules* **4**: 498.
- White R, Woodward S, Leppert M, O'Connell P, Nature MH (1985). A closely linked genetic marker for cystic fibrosis. *Nature* **318**: 382–384.
- Yu E, Sharma S (2022). Cystic Fibrosis. *StatPearls* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493206> (pristupljeno 16. 08. 2023.).



## 8. Životopis

Rođen sam 2001. godine u Vinkovcima. Osnovnoškolsko obrazovanje stječem u osnovnoj školi Josipa Lovrećića u Otoku. Zatim završavam prirodoslovno-matematički smjer gimnazije Matije Antuna Reljkovića u Vinkovcima. 2020. godine upisujem preddiplomski sveučilišni studij Molekularne Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu sveučilišta u Zagrebu. Tijekom svog osnovnoškolskog i srednjoškolskog natjecanja sudjelovao sam na državnim natjecanjima iz kemije.