

Fluorescentna in situ hibridizacija

Krželj, Slavica

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:008166>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

Slavica Krželj
0058217872

**FLUORESCENTNA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA
ZAVRŠNI RAD**

Predmet: Genetičko inženjerstvo

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Zagreb, godina 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Prehrambena tehnologija ili Biotehnologija ili Nutricionizam

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Fluorescentna *in situ* hibridizacija
Slavica Krželj, 0058217872

Sažetak:

Fluorescentna *in situ* hibridizacija (eng. fluorescent *in situ* hybridization, FISH) je učinkovita vizualna tehnika koja omogućuje identifikaciju i lokalizaciju određenih sekvenci DNA na kromosomima. Ovaj teorijski završni rad bavi se tehnikom FISH, njezinim povijesnim razvojem, primjenom u molekularnoj genetici i genetičkom inženjerstvu, te mogućnostima i ograničenjima pojedinih varijanti ove metode. Rad započinje kratkim povijesnim pregledom razvoja metoda za vizualizacije kromosoma i citogenetičkih postupaka, te razvojem samog FISH-a. Nadalje, u ovom radu opisane su različite varijacije ove metode, uključujući tzv. Multipleks FISH (eng. Multiplex Fluorescent *in situ* Hybridization, M-FISH) Fibre-FISH i interfazni FISH, te i njihove prednosti i ograničenja. Opisane su i kliničke primjene FISH-a, prvenstveno u dijagnostici nasljednih bolesti poput kronične mijeloične leukemije (eng. Chronic Myeloid Leukemia, CML) te razmatrane mogućnosti daljnjeg napretka u FISH tehnologiji.

Ključne riječi: fluorescentna *in situ* hibridizacija, citogenetika, kromosomske aberacije, dijagnostika

Rad sadrži: 22 stranice, 10 slika, 27 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Marina Svetec Miklenić

Datum obrane: 10. rujna 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Fluorescent *in situ* hybridization
Slavica Krželj, 0058217872

Abstract:

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) is an effective visual technique that enables the identification and localization of specific DNA sequences on chromosomes. This theoretical thesis focuses on the FISH technique, its historical development, application in molecular genetics and genetic engineering, and the possibilities and limitations of certain variants of this method. The thesis first brings a brief historical overview of the development of methods for chromosome visualization and cytogenetic procedures, as well as the development of FISH itself. Furthermore, this paper describes various variations of this method, including the so-called Multiplex FISH (eng. Multiplex Fluorescent *in situ* Hybridization, M-FISH) Fibre-FISH and interphase FISH, and their advantages and limitations. Clinical applications of FISH are also described, primarily in the diagnosis of hereditary diseases such as Chronic Myeloid Leukemia (CML), and possibilities for further progress in FISH technology are discussed.

Keywords: fluorescent *in situ* hybridization, cytogenetics, chromosomal aberrations, diagnostics

Thesis contains: 22 pages, 10 figures, 27 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Marina Svetec Miklenić, Associate Professor

Thesis defended: September 10, 2024

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KLASIČNE CITOGENETIČKE METODE	2
2.2. FLUORESCENTNA <i>IN SITU</i> HIBRIDIZACIJA	6
2.2.2. Multipleks FISH (M-FISH)	6
2.2.3. Interfazna FISH	7
2.2.4. Fibre FISH	7
2.2.5. COD-FISH	8
2.2.6. FISHnCHIPS	9
2.2.7. MERFISH	11
2.3. SPEKTRALNA KARIOTIPIZACIJA (SKY)	12
2.4. KOMPARATIVNA GENOMSKA HIBRIDIZACIJA (CGH)	14
2.5. PRIMJENA METODE FISH U KLINIČKIM ISTRAŽIVANJIMA NA PRIMJERU DETEKCIJE PHILADELPHIA KROMOSOMA	17
3. ZAKLJUČAK	19
4. POPIS LITERATURE	20

1. UVOD

Prve slike ljudskih kromosoma dobivene su pomoću svjetlosnog mikroskopa koji je imao ograničenu moć razlučivanja u odnosu na današnje moderne mikroskope, stoga su brojanje i identifikacija kromosoma predstavljali izazov, budući da tadašnje tehnike bojanja i mapiranja visoke rezolucije nisu bile dovoljno razvijene. Rana istraživanja citogenetike bila su obilježena nedostatkom standardnih protokola za pripremu, bojanje i analizu kromosoma. Kao posljedica nedosljednih rezultata istraživanja, točan broj ljudskih kromosoma dugo vremena nije mogao biti precizno određen. Napretkom u tehnikama bojanja i mikroskopiji postupno se poboljšala točnost i pouzdanost analize kromosoma. Razvojem tehnika bojanja, poput Giemsa bojanja, te drugih citoloških tehnika, istraživači su prikupili dovoljno dokaza koji su na koncu doveli do spoznaje da ljudi imaju 46 kromosoma unutar svake somatske stanice. Daljnji razvoj citogenetičkih metoda omogućio je fluorescentnu *in situ* hibridizaciju (FISH) koja omogućuje detekciju i vizualizaciju određene DNA sekvence na kromosomima pomoću DNA sonda s fluorescentnim oznakama. Ukratko, ova tehnika temelji se na hibridizaciji sekvenci DNA koje želimo vizualizirati s DNA ili RNA probama koje su obilježene fluorescentnim skupinama i mogu se detektirati pomoću fluorescentnog mikroskopa. FISH metoda je značajno unaprijedila mogućnosti istraživanja u genetici, omogućujući istraživačima precizniju identifikaciju kromosomskih aberacija.

Ovaj teorijski završni rad donosi kratki povijesni pregled razvoja tehnika vizualizacije kromosoma, te se bavi fluorescentnom *in situ* hibridizacijom. U radu će biti objašnjen osnovni princip metode FISH, te složenijih varijanti ove tehnike, uključujući M-FISH (Multiplex-FISH), Fibre FISH i interfazni FISH. Također objasnit će se princip metoda CGH (eng. Comparative Genome Hybridization, komparativna genomska hibridizacija) i SKY (eng. Spectral Karyotyping, spektralna kariotipizacija), koje se također temelje na fluorescentnoj *in situ* hibridizaciji sekvenci DNA. U zadnjem poglavlju rada navest će se primjer korištenja metode FISH u kliničkim studijama .

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KLASIČNE CITOGENETIČKE METODE

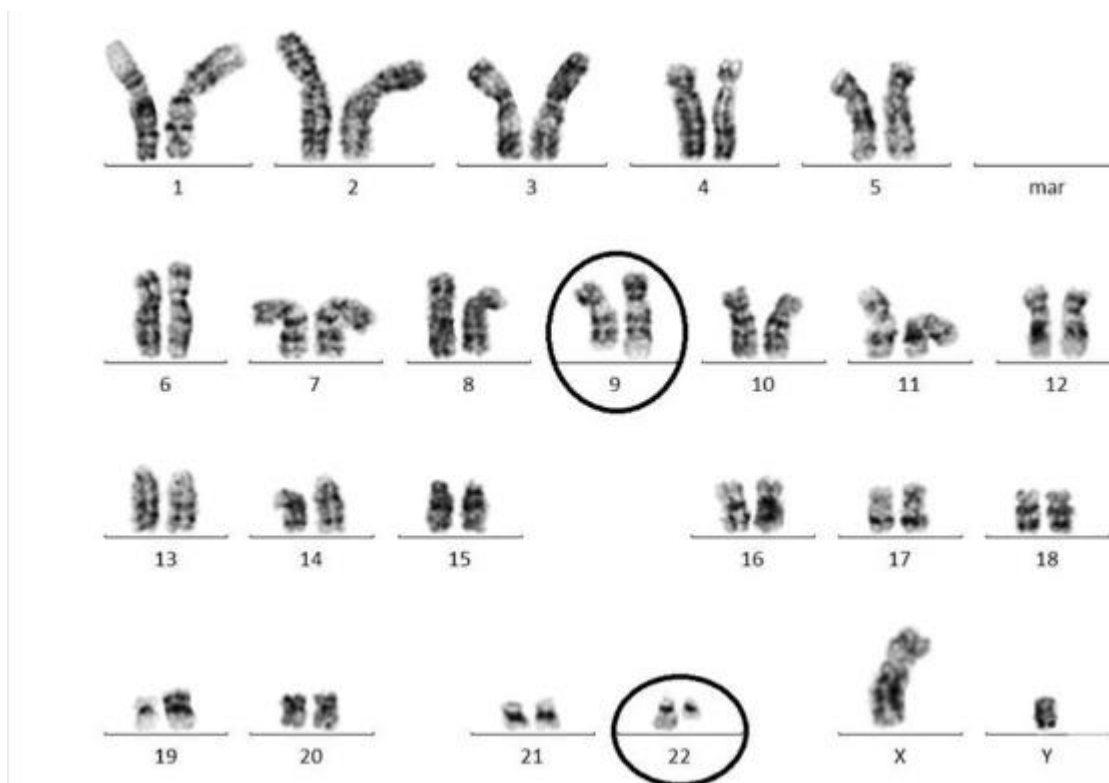
Još početkom 50-tih godina prošlog stoljeća, ograničenja u dostupnim tehnikama pripreme kromosomskih preparata, njihovog bojanja i mikroskopiranja otežavala su citogenetička istraživanja. Istraživanje kojim je naposljetku utvrđeno da ljudske somatske stanice sadrže 46 kromosoma zasnovano je na primarnoj kulturi tkiva ljudskih plućnih fibroblasta. Fibroblasti su izolirani iz ljudskog embrija, a zatim tretirani hipotoničnom otopinom uz dodatak kolhicina kako bi se stanice zaustavile u metafazi. Takve stanice su potom obojane orceinom koji se veže na kromatin i čini kromosome vidljivima (Tjio i Levan, 1956).

Međutim, značajniji napredak u citogenetici započeo je krajem 1950-ih godina kada su postale dostupne pouzdane metode za pripremu kromosomskih preparata, što je omogućilo identifikaciju kromosomskih aberacija povezanih s bolestima poput Downovog sindroma, Klinefelterovog sindroma i Turnerovog sindroma. Ranija istraživanja kromosomskih aberacija temeljila su se na kulturama stanica koje se dijele, što je zahtijevalo punkciju koštane srži ili biopsiju kože kako bi se dobile stanice u metafazi u kojoj su kromosomi u svom najvišem stupnju kondenzacije. Međutim Moorhead i sur. (1960) opisali su metodu za pripremu kromosoma kombiniranjem kulture leukocita iz periferne krvi i sušenja na zraku. Ovom metodom dobiveni su dobro vidljivi metafazni kromosomi pogodni za analizu.

Tijekom istraživanja strukture i broja kromosoma u stanicama, za vizualizaciju su se koristile različite tehnike bojanja, međutim s vremenom su se nametnule neke tehnike koje su u upotrebi i danas, poput Giemsa bojanja, nazvanog po njemačkom bakteriologu Gustavu Giemsi (Giemsa, 1904). Giemsa bojanje prvotno je korišteno za mikrobiološka istraživanja, ali je ubrzo pronašlo svoju primjenu i u histologiji. Naime, Giemsa bojanje se koristi u histologiji zbog svoje izvanredne kvalitete bojanja kromatina, jezgrine membrane i različitih svojstava bojanja citoplazme ovisno o tipu stanice (Barcia, 2007). Giemsa bojanje danas je neprocjenjiva polikromatska metoda bojanja perifernih krvnih uzoraka, cervikalnih razmaza u ginekologiji, *Plasmodium* ili *Trypanosoma* parazita koji uzrokuju malariju, odnosno bolest spavanja, kao i uzoraka harlekin metafaznih kromosoma (Stockert i sur., 2014).

Jedno od najranijih otkrića kromosomske aberacije kod ljudi povezane s određenom bolešću bilo je otkriće tzv. Philadelphia kromosoma. Koristeći metodu sličnu onoj koju su opisali

Moorhead i sur. (1960), proučavajući kromosome u leukocitima iz periferne krvi bolesnika oboljelih od kronične mijeloične leukemije (eng. chronic myelogenous leukemia) i granulocitne leukemije (eng. chronic granulocytic leukemia), Nowell i Hungerford, (1960) su prvi otkrili tzv. Philadelphia kromosom (slika 1). Primijetili su mali kromosom (22. kromosom) koji se mogao pronaći kod gotovo svih bolesnika s dijagnozom kronične mijeloične leukemije, koji je nazvan Philadelphia. Daljnja istraživanja dovela su do otkrića da se zapravo radi o recipročnoj translokaciji između kromosoma 9 i 22 (Nowell i Hungerford, 1960). Više od dvadeset godina kasnije, 1983. godine, identificiran je rezultat navedene recipročne translokacije – nastanak fuzijskog BCR-ABL1 gena. Otkriće ove kromosomske aberacije doprinijelo je kasnijem razvoju tzv. pametnih lijekova za bolesnike s kroničnom mijeloičnom leukemijom (Jessica Wapner i Robert A. Weinberg, 2013), što je značajno unaprijedilo liječenje i kvalitetu života bolesnika s ovom dijagnozom.



Slika 1. Prikaz ljudskog kariotipa u kojem je došlo do recipročne translokacije između kromosoma 22 i 9, rezultirajući tzv. Philadelphia kromosomom (22.kromosom). Yadav A (2016) Philadelphia chromosome by karyotype – Imagebank hematology. <https://imagebank.hematology.org/image/61436/philadelphia-chromosome-by-karyotype>. Pristupljeno 7.lipnja 2024.

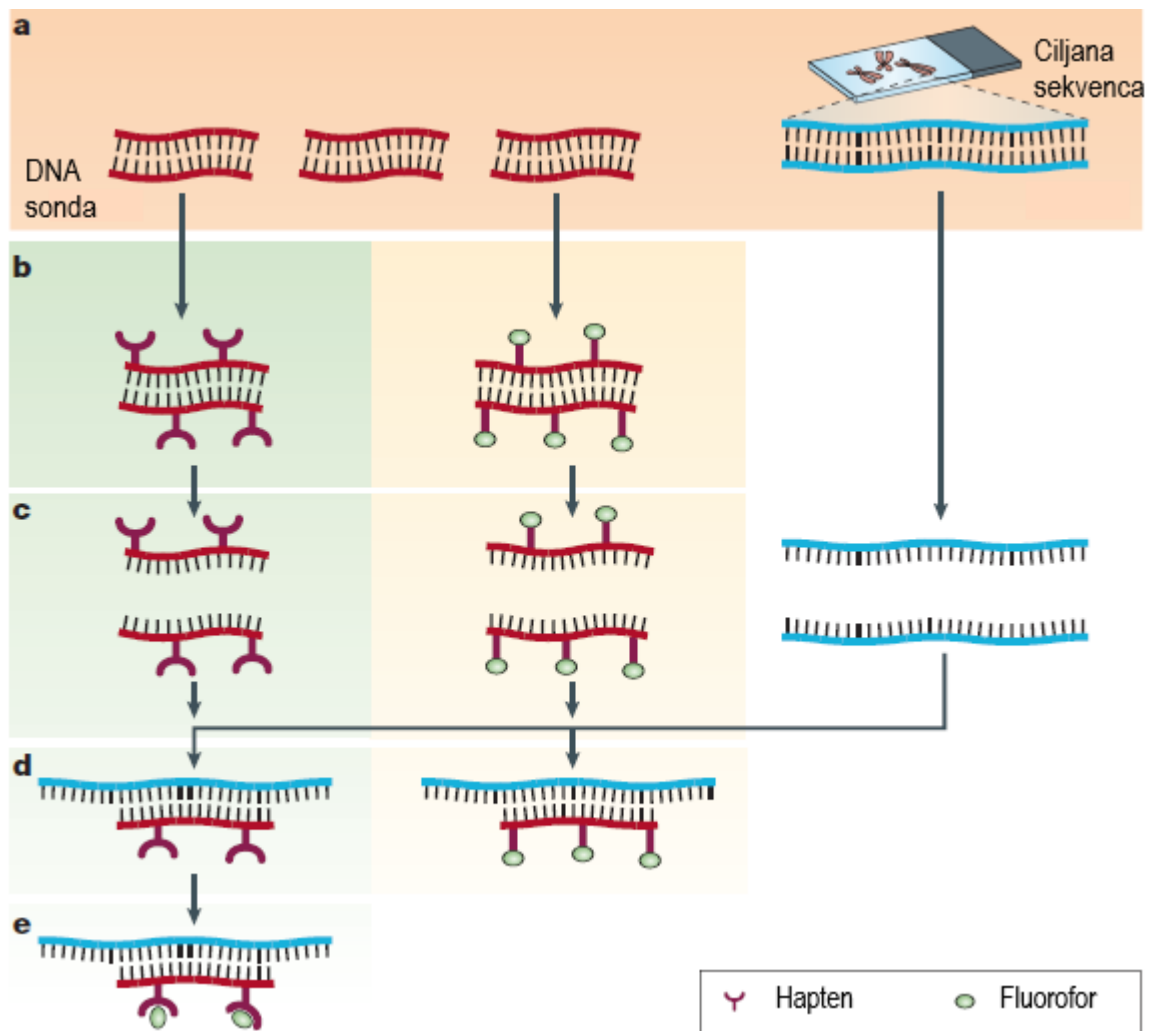
Bez obzira na razvoj tehnika bojanja kromosoma, i dalje je postojao problem nemogućnosti detaljnije analize kromosomskih aberacija. Stoga je s vremenom razvijena tehnika sparivanja (hibridizacije) molekula RNA s njihovim komplementarnim sekvencama na DNA. Procesu hibridizacije prethodi priprema DNA i RNA molekula. Prije početka hibridizacije potrebno je ukloniti sve moguće kontaminante (primjerice proteine) zbog mogućeg negativnog utjecaja na proces hibridizacije. Osim toga, potrebno je i denaturirati DNA, te koristiti radioaktivno označenu komplementarnu RNA probu što omogućava vizualizaciju hibridnih DNA-RNA molekula autoradiografijom (Gall i Pardue, 1969). Ovakve metode prethodile su razvoju FISH metode koja se također temelji na hibridizaciji s obilježenim komplementarnim probama, ali se za obilježavanje ne koristi radioaktivitet nego fluorescencija.

2.2. FLUORESCENTNA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA

Ranih 70-ih godina prošlog stoljeća su se primarno koristile radioaktivno označene RNA i DNA probe koje su predstavljale problem za okoliš te osoblje koje je rukovalo probama. To se promijenilo 1986. godine, kada su radioaktivne oznake na probama zamijenjene fluorescentnim. Metoda koja je koristila hibridizaciju visokospecifičnih DNA sonda obilježenih fluorescentnim oznakama i omogućila tako analizu genetičkih aberacija na molekularnoj razini nazvana je fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) (Pinkel i sur., 1986).

2.2.1. Osnovni princip metode FISH

Osnovni elementi FISH metode su DNA sonda i ciljana sekvenca u genomu. Prije hibridizacije, DNA sonda se označava raznim metodama kao što su pomicanje zareza, nasumično započinjanje i PCR. Dvije su uobičajene strategije označavanja — indirektno i direktno označavanje (slika 2). Za indirektno označavanje, sonde su označene modificiranim nukleotidima koji sadrže haptenu, dok se za direktno označavanje koristi inkorporacija nukleotida koji su direktno modificirani tako da sadrže fluorofor. Označena sonda i ciljana DNA se denaturiraju kako bi bile u jednolančanom obliku, nakon čega se inkubiraju zajedno, što omogućuje sparivanje komplementarnih DNA sekvenci. Ako je sonda bila označena indirektno, potreban je dodatni korak za vizualizaciju ne-fluorescentnog haptena koristeći enzimski ili imunološki sustav detekcije. Iako je FISH metoda brža s direktno označenim sondama, indirektno označavanje može pojačati signal korištenjem nekoliko slojeva antitijela i može stoga proizvesti signal koji je svjetliji u usporedbi s pozadinom.



Slika 2. Princip fluorescencijske *in situ* hibridizacije. a. Prikaz DNA sonde i ciljane sekvence u genomu. b. Proces označavanja DNA sonde direktno (fluorofor) ili indirektno (hapten). c. Denaturacija DNA sonde te ciljane sekvence u genomu. d. Komplementarno sparivanje DNA sonde i ciljane sekvence u genomu. e. Dodatna vizualizacija haptena pomoću imunološke detekcije (prema Speicher i Carter, 2005).

Važno je napomenuti da je velika prednost metode FISH, za razliku od ranije dostupnih metoda, mogućnost analize jezgri stanica koje se ne dijele. Naime, konvencionalna citogenetička analiza zahtijeva izolaciju stanica tijekom mitoze. Međutim, izolacijom kromosoma iz nekih uzoraka, primjerice čvrstih tumora, često se ne mogu pronaći metafazni kromosomi koji su pogodni za analizu. Upravo upotrebom FISH tehnologije sa specifičnim probama komplementarnim određenim lokusima na kromosomima, moguće je brojati individualne kromosome svake jezgre i utvrditi deleciju ili duplikaciju pojedinačnog gena (Trask, 2002).

Metoda FISH danas se rutinski koristi, kako za dijagnostički, tako i za istraživački rad. Komercijalno su dostupne već sintetizirane sonde za dijagnosticiranje sindroma uzrokovanih suptilnijim kromosomskim aberacijama koje se ne mogu pouzdano identificirati kroz standardne tehnike bojanja. Na primjer, testiranje na Smith-Magenis sindrom (sindrom nastao kao posljedica aberacije kromosoma 17, uključuje intelektualni invaliditet, uglati oblik lica, široko čelo, urođene srčane mane standardno se provodi metodom FISH korištenjem sonde za malu regiju delecije na kromosomu 17 (Kuwano i sur., 1991). U znanstvenim istraživanjima niz je primjera u kojima se FISH metoda koristi za određivanje i vizualiziranje točno određenih DNA sekvenci na kromosomu (Levsky i Singer, 2003). Osim toga, koristi se u kliničkim istraživanjima infektivnih bolesti, prenatalnoj dijagnostici (Ju i sur., 2022), ali i u biotehnologiji (Amann i Fuchs, 2008).

2.2.2. Multipleks FISH (M-FISH)

Metoda M-FISH (eng. Multiplex Fluorescent *In situ* Hybridization) je citogenetička metoda za vizualizaciju više različitih regija na kromosomima tijekom jednog koraka hibridizacije sa nekoliko različitih fluorescentno obilježenih sonda. Ova metoda koristi kompleksan set sonda, označenih različitim fluorescentnim bojama, koje se mogu pobuditi UV svjetlom i analizirati pomoću fluorescencijskog mikroskopa. Analizom fluorescentnih signala s različitih kromosoma, M-FISH omogućuje razlikovanje normalnih od abnormalnih kariotipova te detekciju složenih kromosomskih aberacija koji su teško uočljive drugim metodama.

Metoda M-FISH se pokazala kao važna metoda za otkrivanje translokacija i drugih složenih aberacija. Osim toga, M-FISH omogućuje proučavanje oštećenja na kromosomima izazvanih zračenjem, te se pomoću nje mogu pratiti i vizualizirati molekule DNA tijekom procesa popravka. M-FISH je također potaknula industriju standardnih komercijalno dostupnih setova proba za detekciju više lokusa odjednom radi otkrivanja suptilnih aberacija, primjerice koristeći probe poput onih koje hibridiziraju s jedinstvenim sekvencama blizu svake telomere kako bi otkrili aberacije u blizini krajeva kromosoma (Speicher i sur., 1996).

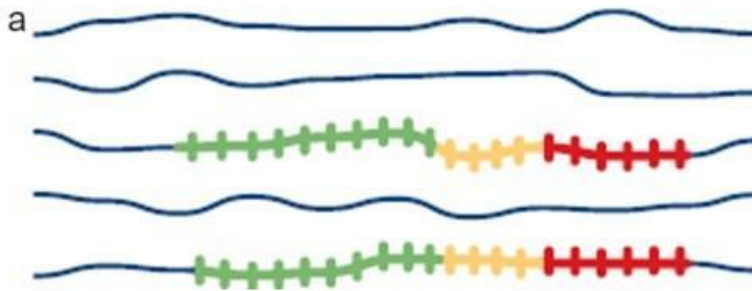
2.2.3. Metoda interfazni FISH

Metoda interfazni FISH (IFISH) je varijanta metode FISH koja se izvodi na cijelim interfaznim jezgrama, bez potrebe za izolacijom metafaznih kromosoma, te se može raditi i na tkivima i stanicama koje su bile sačuvane u parafinu i jezgrama takvih stanica, jezgrama koje su bile zamrznute, kao i jezgrama dobivenim klasičnim citogenetičkim metodama. IFISH omogućava usporedbu različitih tipova stanica, a o pojavi kromosomskih aberacija zaključuje se na temelju promjene u relativnom položaju fluorescentnih signala na kromosomima u interfaznoj jezgri.

Na primjer, pomoću ove metode moguće je detektirati duplikaciju veličine od oko 1.000.000 parova baza na interfaznom kromosomu 17, koja je povezana s Charcot-Marie-Tooth sindromom. Charcot-Marie-Tooth sindrom je nasljedni poremećaj perifernih živaca. Najčešći simptomi uključuju slabost mišića, gubitak osjeta u udovima (posebno u stopalima), otežano hodanje i koordinaciju pokreta. Pomaci u relativnom položaju fluorescentnih signala na kromosomima mogu otkriti i druge strukturne aberacije kao što su translokacije, inverzije ili duplikacije (Tibiletti, 2007).

2.2.4. Fibre FISH

Metoda Fibre FISH je varijanta fluorescentne *in situ* hibridizacije koja omogućava bitno veću rezoluciju u odnosu na druge varijante FISH-a, od oko 500 kb pa čak do samo 1 kb. Za provođenje ove metode s izolirane DNA se najprije uklone histoni, što omogućuje da se lanci DNA u potpunosti razmotaju, a zatim se fiksiraju na površinu stakalca. U idealnom slučaju, lanci DNA moraju biti ravnomjerno razmotani kako bi se omogućila kvalitetna analiza. Ova metoda se koristi za razrješavanje nejasnoća o redoslijedu nukleotida unutar regija, kao i za analizu duplikacija te otkrivanje malih aberacija unutar kromosoma. Tako primjerice velika rezolucija fibre FISH metode može omogućiti vizualizaciju delecija X-kromosoma kod pacijenata s Duchenneovom mišićnom distrofijom i precizno određivanje veličine delecija. Fibre FISH predstavlja jedan od najboljih alata za vizualizaciju DNA sekvenci na uskim specifičnim regijama u genomu. Također, fibre FISH omogućava vizualizaciju sekvenci DNA koje se djelomično preklapaju (slika 3). U tom slučaju jedna sekvenca hibridzira se s probom koja nosi fluorescenciju jedne boje, druga sekvenca hibridzira s probom obilježenu sa fluorescencijom druge boje, a preklapanja u tim dvjema sekvencijama mogu se detektirati kao mješovita fluorescencija dviju proba (slika 3) (Speicher i Carter, 2005).



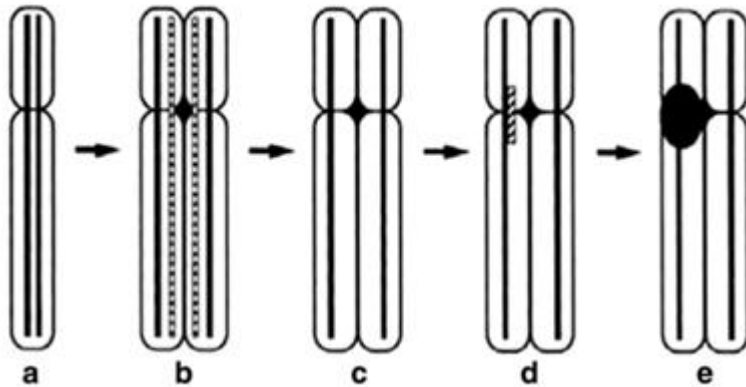
Slika 3. Primjena fibre FISH metode za detekciju preklapajućih sekvenci DNA. Lanci DNA se hibridiziraju s probama. Istovremena hibridizacija dviju različitih proba prikazana je zelenom i crvenom bojom. Žuta boja označava preklapanje dviju proba (prema Speicher i Carter, 2005).

2.2.5. COD-FISH

Metoda COD-FISH (eng. Chromosome Orientation and Direction FISH) je metoda koja može odrediti orijentaciju lanaca DNA i utvrditi inverzije i druge kromosomske aberacije na sestrinskim kromatidama. COD-FISH se u početku koristila za proučavanje kromosomskih aberacija, ali kasnije se koristila i za detekciju izmjene nasljednog materijala između sestrinskih kromatida.

COD-FISH metoda polazi od kulture stanica koje se repliciraju u prisutnosti analoga timidina, 5-bromo-2-deoksiuridina (BrdU) (slika 4). Novosintetizirani lanci DNA nakon replikacije sadržavaju BrdU. Potom se takvi metafazni kromosomi fiksiraju na mikroskopsko stakalce, nakon čega se izlože UV-zračenju koje potiče fragmentiranje novosintetiziranih lanaca DNA. Jednolančani lomovi koji su nastali na novosintetiziranim lancima DNA su supstrat za egzonukleazu III koja se dodaje na predmetno stakalce.

Egzonukleaza III uklanja lance DNA u kojima se nalaze jednolančani lomovi, time ostavljajući metafazne kromosome jednolančanima. Ovakve kromatide sadrže po jedan od početnih roditeljskih lanaca, čime su povoljna ciljana regija za hibridizaciju s DNA sondom. Različiti uzorci hibridizacije pokazuju relativnu orijentaciju dviju sekvenci kromosomske DNA. Probe za oba lanca DNA hibridiziraju i proizvode vidljive signale na istoj kromatidi ako su sekvence orijentirane paralelno, dok signali na različitim kromatidama ukazuju na antiparalelnu orijentaciju (Williams i sur., 2011).



Slika 4. Koraci COD-FISH metode. Kromosom prije replikacije. b. Integracija BrdU (analog timidina). c. Uklanjanje nosintetiziranih lanaca. d. Hibridizacija s probom. e. Detekcija probe (prema Williams i sur., 2011).

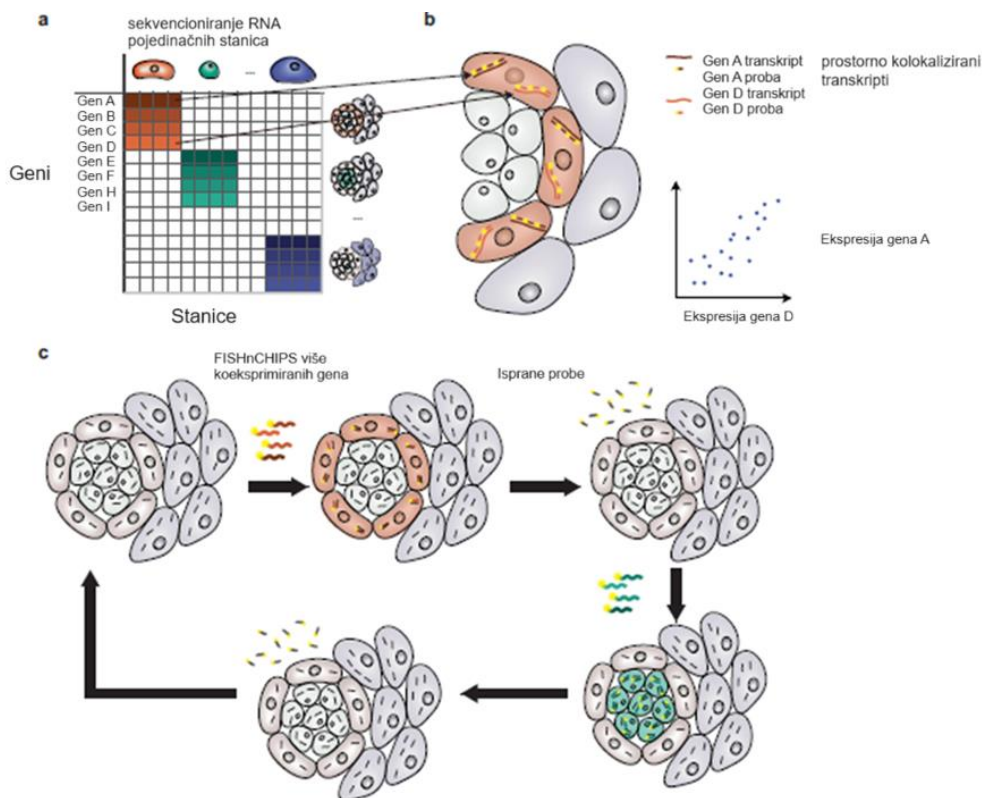
Sve navedene varijante FISH se koriste u molekularnoj biologiji i citogenetici za detekciju ciljnih sekvenci na DNA i istraživanje strukture kromosoma. Najveća razlika između ovih metoda jest usmjerenje na cijeli genom ili istraživanje pojedinačnih promjena na malim lokusima unutar kromosoma. Metode interfazni FISH i fibre FISH ističu se u pružanju strukturnih uvida, dok metode M-FISH i COD-FISH nude širu primjenjivost koja obuhvaća genetička istraživanja i kliničku dijagnostiku.

2.2.6. FISHnCHIPS

Osim prethodno navedenih FISH metoda, znanstvenici su napravili određene iskorake u posljednjih 10 godina, usavršavajući pojedine aspekte provođenja same metode. Trenutno dvije najnaprednije varijante FISH metode su FISHnCHIPS (eng. FISH of Cellular Heterogeneity and Gene Expression Programs) te MERFISH (eng. Multiplexed Error-Robust FISH). FISHnCHIPS je metoda pomoću koje se mogu razlikovati različiti tipovi stanica u tkivu na temelju činjenice da je u određenom tipu stanica koeksprimiran određeni set gena. U ovoj metodi koristi se referentni skup scRNA-seq (eng. Single-Cell RNA-sequencing - sekvencioniranje mRNA iz jedne vrste stanica) podataka pomoću kojih se identificiraju grupe koeksprimiranih gena i prema kojem se dizajniraju oligonukleotidne probe koje će se komplementarno spariti s takvim genima kako bi se točno profilirale stanice (slika 5) (Haque i sur., 2017).

FISHnCHIPS omogućava profiliranje stanica istovremenim snimanjem do 35 koeksprimiranih gena grupiranih unutar određenih tkiva. U usporedbi sa standardnom FISH metodom, ovo je puno osjetljivija metoda (2 do 20 puta veća osjetljivost). FISHnCHIPS omogućuje brzo tipiziranje stanica različitih tkiva s normalnim fiziološkim mehanizmima ili onih koji prolaze kroz

maligne promjene. Također nudi veću ekonomičnost procesa u usporedbi s metodama multipleksnog imunofluorescentnog bojenja, budući da se koriste jeftinije oligonukleotidne sonde koje se mogu individualno prilagoditi. Ograničenje metode FISHnCHIPs jest da se njome ne može točno odrediti broj kopija nekog gena, stoga ne može istovremeno pružiti točne podatke o broju RNA molekula. Razlog tome je što u ovoj metodi dolazi do preklapanja fluorescentnih signala DNA sonda, budući da se vežu na genske klustere. U slučajevima kada je potrebno utvrditi točan broj RNA molekula, FISHnCHIPs se može kombinirati sa smFISH (eng. Single Molecule FISH) kako bi omogućio istovremenu analizu stanica i transkripata, budući da smFISH metoda može kvantificirati RNA molekule koristeći DNA sonde koje se mogu komplementarno spariti s točno određenom RNA (Zhou i sur., 2024).



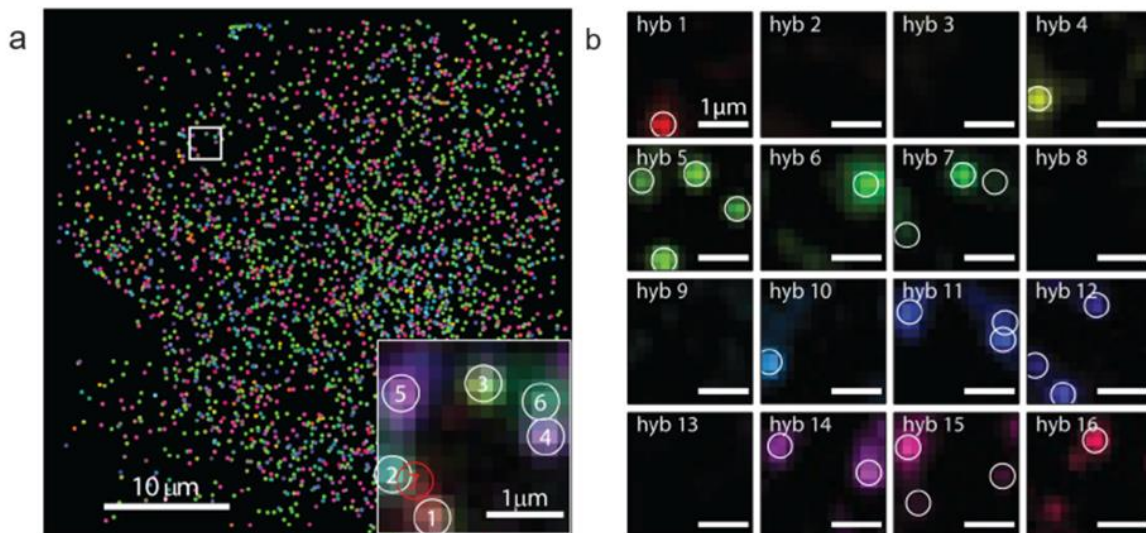
Slika 5. Shematski prikaz metode FISHnCHIPs a. Matrica jednoničane RNA koja je sekvenirana (scRNA-seq) te se može koristiti za klasteriranje tipova stanica, koje su karakterizirane svojim jedinstvenim profilima ekspresije gena (crvene stanice ekspimiraju gene A–D; zelene stanice izražavaju gene E–I). b. Geni koji su koeksprimirani su prostorno lokalizirani u istim stanicama unutar tkiva. Dizajniranjem fluorescentno označenih oligonukleotidnih sonda za ciljanje velikog skupa koeksprimiranih transkripata, FISHnCHIPs može poboljšati osjetljivost fluorescentne detekcije. c. FISHnCHIPs omogućuje vizualizaciju tipova stanica u uzorcima tkiva (prema Zhou i sur., 2024).

2.2.7. MERFISH

Metoda MERFISH (eng. Multiplexed Error-Robust FISH) se pojavila kao tehnika od velike važnosti za mjerenje broja kopija gena unutar pojedinih stanica. Pristup uključuje fiksiranje i permeabilizaciju stanica prije dodavanja fluorescentno označenih oligonukleotidnih sonda koje se komplementarno uparuju s određenim regijama RNA od interesa u stanicama.

Glavne komponente ove metode uključuju kombinatno označavanje (ako se detektira fluorescencija, to se označava s 1, ako se ne detektira onda se označava s 0) i barkodove (DNA sekvence koje se nalaze na krajevima DNA sonda na koje se vežu fluorescentno označene sonde kako bi se mogle identificirati različite vrste RNA molekula). Barkodiranje se postiže korištenjem kombinacije različitih fluorescentnih sonda u više ciklusa hibridizacije. Na primjer, jedna ciljana RNA molekula može biti prepoznata korištenjem više različitih sonda koje su označene različitim fluorescentnim bojama. Proces hibridizacije ponavlja se više puta s različitim setovima fluorescentnih sonda.

Svaki set sonda označava različitu kombinaciju fluorescentnih boja, stvarajući jedinstveni kod za svaku ciljanu regiju unutar RNA. Kada se uzorak pregleda pod fluorescentnim mikroskopom, uzorak se može dekodirati kako bi se identificirala svaka RNA molekula. Korištenjem različitih kombinacija fluorescentnih sonda se smanjuje mogućnost pogrešnog identificiranja RNA molekule (Wang i sur., 2023)



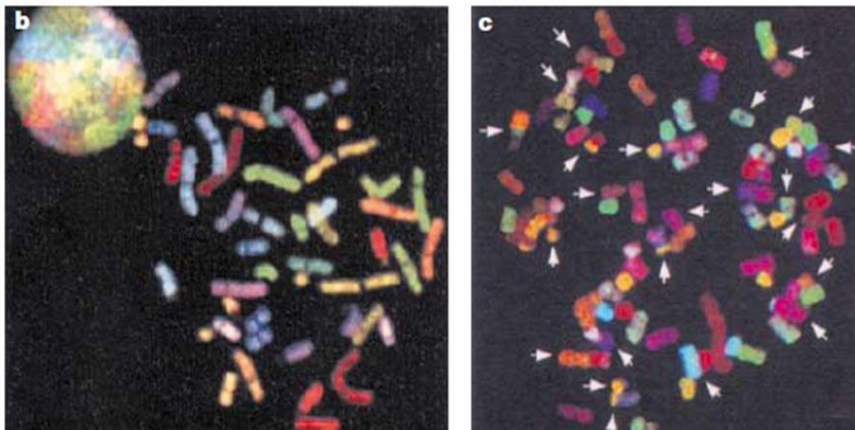
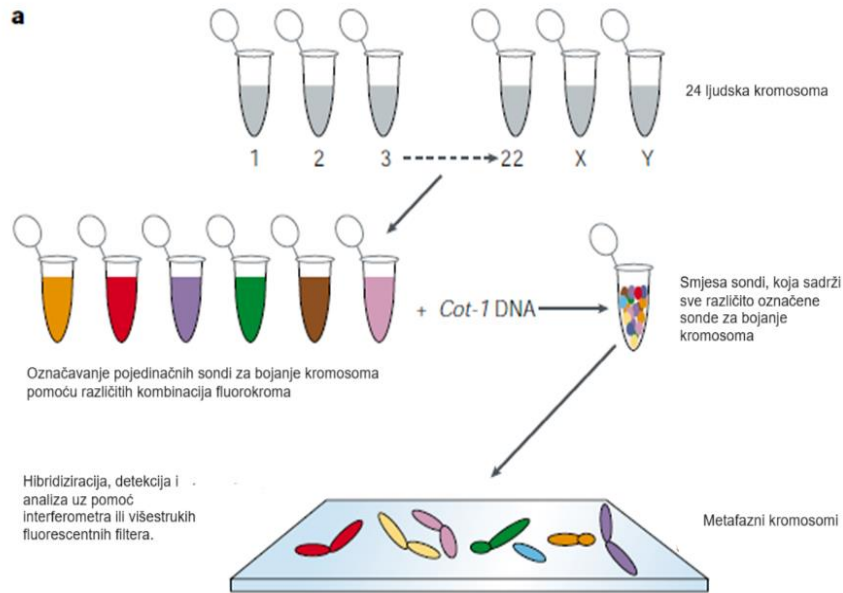
Slika 6. MERFISH. a. Lokalizacija svih pojedinačnih RNA molekula u ovoj stanici koje su obojene prema svojim barkodovima. b. Slike koje prikazuju 16 ciklusa hibridizacije za označeno područje, s brojevima u krugovima koji označavaju potencijalne RNA molekule. (prema Chen i sur., 2015)

Glavni izazov MERFISH metode leži u optimizaciji algoritama i računalnih alata za dekodiranje fluorescencijskih signala i mapiranje RNA. Osim toga, spektralno preklapanje signala predstavlja problem za interpretaciju rezultata. Ova metoda je vrlo skupa zbog korištenja specijalizirane opreme i brojnih reagensa. MERFISH je izuzetno korisna tehnika koja omogućuje mjerenja točnog broja kopija i prostorne distribucije pojedinačnih mRNA unutar pojedinih stanica u različitim tkivima (Moffitt i Zhuang, 2016).

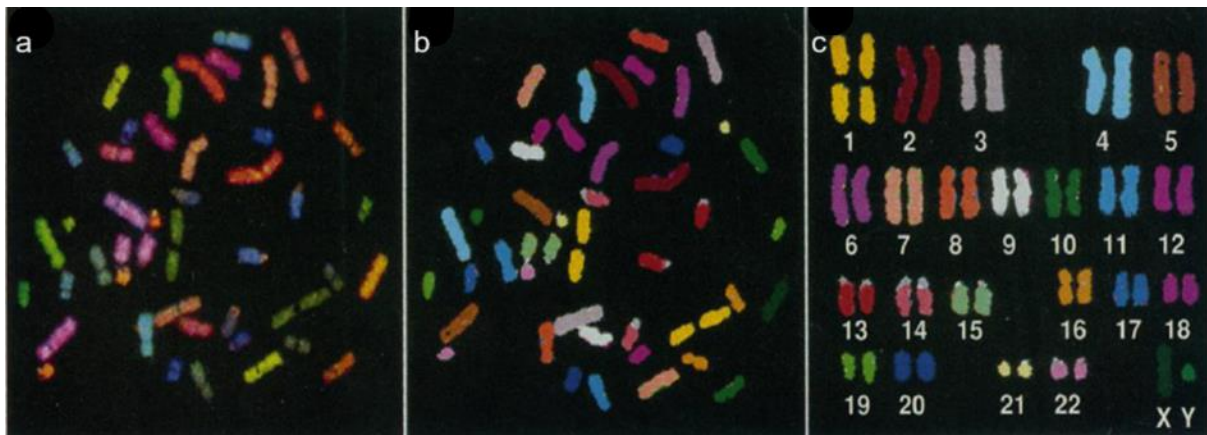
2.3. SPEKTRALNA KARIOTIPIZACIJA (SKY)

Spektralna kariotipizacija (eng. Spectral Karyotyping) je citogenetička metoda koja omogućava označavanje pojedinih kromosoma u kariotipu različitim fluorescentnim bojama, zbog čega se koristi za detaljnu analizu kromosomskih aberacija. Ova metoda može precizno utvrditi mjesto na kojem se dogodila promjena u kromosomu (Schröck i sur., 1996).

U sklopu ove metode koriste se DNA sonde specifične za kromosom koje su označene različitim kombinacijama fluorescentnih boja. U tu smjesu se dodaje Cot-1 DNA (slika 7) koja je bogata ponavljanjima pa se može vezati na ponavljanja unutar fluorescentno označenih DNA sonda i time spriječiti nespecifično vezanje DNA sonda. DNA sonde i preparat metafaznih kromosoma se denaturira i hibridizira, te zatim promatra pod fluorescentnim mikroskopom. Mikroskop je opremljen posebnim filterima i spektralnim sustavom za snimanje koji može razlikovati različite kombinacije fluorescentnih boja. Sustav snimanja bilježi fluorescentne emisijske spektre svakog kromosoma (slika 8). Ove spektralne informacije zatim obrađuje i analizira softver, koji dodjeljuje boju svakom kromosomu na temelju njegovog jedinstvenog spektra. Krajnji rezultat je kariotip u kojem se svaki par kromosoma vizualizira u različitoj boji (Schröck i sur., 1996).



Slika 7. Spektralna kariotipizacija. a. Prikaz bojanja 24 ljudska kromosoma različitim fluoroformima, te dodavanje Cot-1 DNA. Takva smjesa se nanosi na mikroskopsko stakalce te dolazi do hibridizacije s fluorescentno označenom DNA sondom, a potom slijedi detekcija kromosomskih aberacija. b. Primjena SKY na normalne interfazne i metafazne ljudske stanice. c. Prikaz kariotipa stanice raka mjehura primjenom SKY. Bijele strelice pokazuju interkromosomalne aberacije (*prema* Trask, 2002).



Slika 8. SKY ljudskih kromosoma nakon istovremene hibridizacije 24 označene sonde za bojanje kromosoma. a. Prikaz boja. b. Prikaz boja po klasifikaciji temeljenoj na spektru. c. Kariotip metafaznih kromosoma prikazanih u b. (*prema* Schröck i sur., 1996).

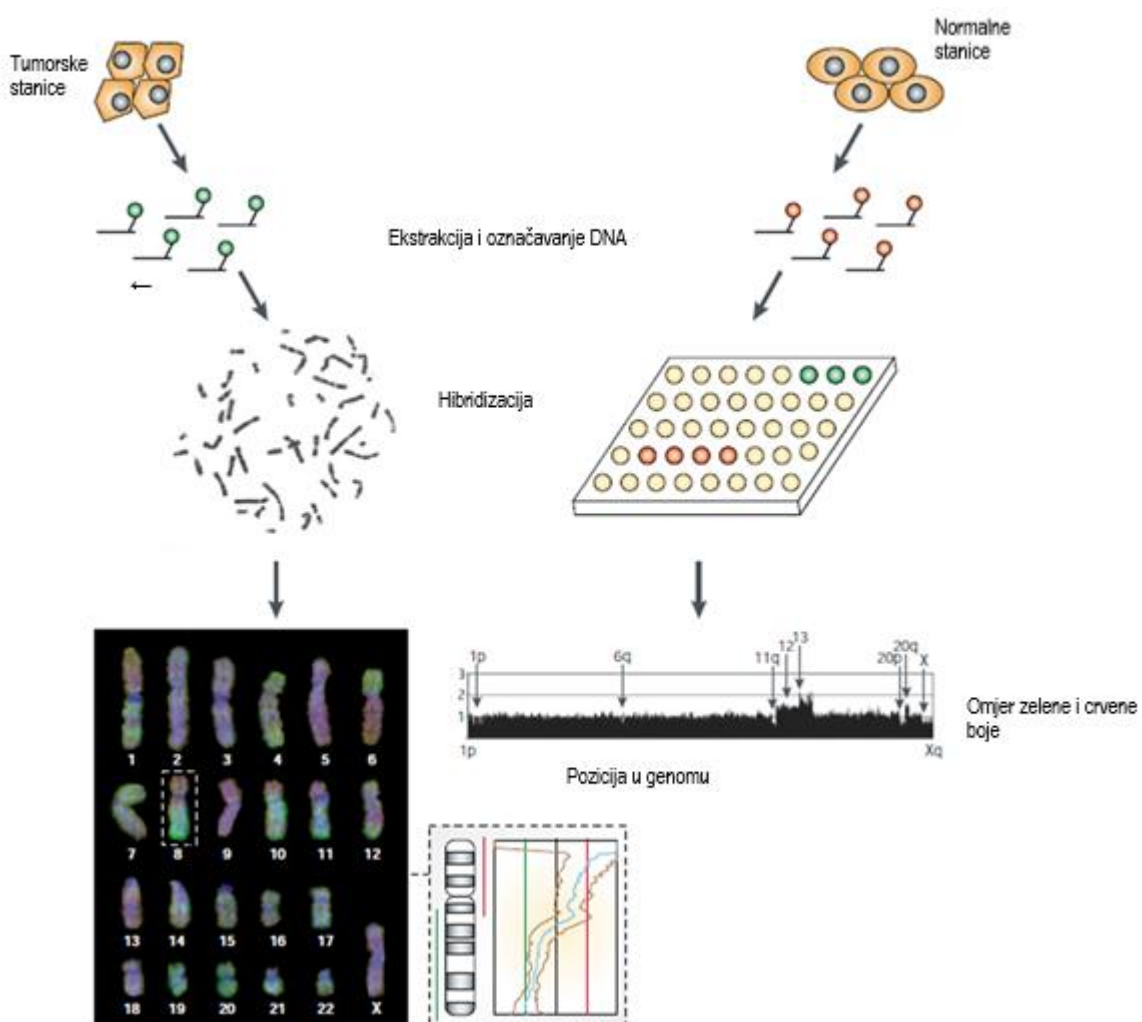
SKY metoda danas ima mnogobrojne praktične primjene. Spektralni kariotip dobiven kao krajnji rezultat SKY-a omogućuje lako prepoznavanje kromosomskih promjena, kao što su translokacije, delecije, duplikacije, što je od osobite važnosti u genetici raka i drugim područjima gdje je precizna identifikacija kromosoma ključna za dijagnozu i liječenje. SKY se koristi u dijagnosticanju genetičkih bolesti, u reproduktivnoj medicini kao i u svrhu praćenja kromosomskog integriteta matičnih stanica u istraživačkim i terapijskim primjenama. SKY može služiti ne samo za dijagnostičke svrhe, već je također vrlo korisna i u istraživanju evolucijskih razlika među vrstama primjerice između ljudi i primata (Trask, 2002).

2.4. KOMPARATIVNA GENOMSKA HIBRIDIZACIJA (CGH)

Komparativna genomska hibridizacija (eng. Comparative Genomic Hybridization) je inovativna molekularna citogenetička tehnika koja omogućava usporedbu relativnog broja pojedinih sekvenci DNA između kontrole (npr. normalne stanice) i uzorka (npr. tumorske stanice) i to na razini cjelokupnog genoma. Pomoću ove tehnike može se utvrditi gdje je došlo do amplifikacije dijela genoma ili delecije (Kallioniemi i sur., 1992).

Metoda se provodi tako da se jedan uzorak DNA (primjerice DNA iz zdravog tkiva) fragmentira i diferencijalno označi primjerice zelenom fluorescentnom bojom, a drugi (primjerice iz tumora) crvenom. Zatim se tako označeni i denaturirani fragmenti hibridiziraju s metafaznim kromosomima kako bi se detektiralo njihovo vezanje na komplementarne sekvence. Osim metafaznih kromosoma, označeni fragmenti se mogu hibridizirati i s BAC (eng. Bacterial

Artificial Chromosome) klonovima u kojima se nalaze inserti određenih DNA fragmenata. Prije toga, radi postizanja jasnijeg signala, ponavljajuće sekvence se hibridiziraju s komplementarnom predhibridizacijskom DNA sondom. Na kraju, mjeri se omjer crvene i zelene fluorescencije duž svakog kromosoma (slika 9). Kromosomske regije jednako zastupljene između testnih i kontrolnih uzoraka pojavljuju se u narančastoj boji; one koje su deletirane ili duplicirane pojavljuju se pretežito u crvenoj ili pretežito zelenoj boji, ovisno o tome je li se njihova delecija/duplikacija dogodila u testnom uzorku koji sadržava DNA tumorske stanice u odnosu na kontrolni uzorak koji sadrži DNA normalne stanice (Kallioniemi i sur., 1992).



Slika 9. Komparativna genomska hibridizacija. DNA u testnim i referentnim uzorcima je označena zelenim i crvenim fluorokromima, a hibridizacija se odvija na metafaznim kromosomima (lijevo) ili na nizu BAC klonova u kojima se nalaze inserti fragmenata DNA

(desno). Područja u kojima je zelena boja uočljivija su duplikacije u testnom uzorku, a područja u kojima je uočljivija crvena boja su delecije u testnom uzorku. Donja lijeva slika pokazuje rezultat CGH koristeći staničnu liniju raka prostate PC-3 kao testni uzorak; delecija i duplikacija nekoliko kromosomskih regija su vidljive kao crvena, odnosno zelena područja (*prema* Trask, 2002).

Čvrsti tumori često predstavljaju izazov za istraživanja u odnosu na tipove leukemija kod kojih se metafazni kromosomi mogu lakše izolirati i mnogo su detaljnije analizirani nego što je slučaj sa čvrstim tumorima. Naime, metafazni kromosomi izolirani iz stanica čvrstih tumora nisu pogodni za analizu. Međutim, obzirom da za CGH nisu potrebni isključivo metafazni kromosomi nego samo DNA iz normalne ili tumorske stanice, ova tehnika bitno je olakšala proces istraživanja čvrstih tumora.

Naime, standardna kariotipizacija nije u mogućnosti detektirati kromosomske aberacije koje su manje od nekoliko megabaza, dok to nije prepreka za CGH. Također, CGH može identificirati određene promjene koje se učestalo pojavljuju u genomu u različitim uzorcima koje mogu upućivati na aberacije koje uzrokuju maligne bolesti. Kao možda i najveća prednost CGH u odnosu na druge metode jest mogućnost korištenja različitih stanica (izoliranih iz nekog organizma ili izoliranih iz kulture stanica). CGH metoda je uspješno korištena na tumorskim staničnim linijama pacijenata s tumorom mjehura kao i na primarnim uzorcima tumora mjehura kako bi se otkrilo 16 različitih amplifikacijskih regija koje prethodno nisu bile primijećene (Kallioniemi i sur., 1992). Još jedan od primjera uključuje identifikaciju onkogeno PIK3CA u raku jajnika (Gray i sur., 1999).

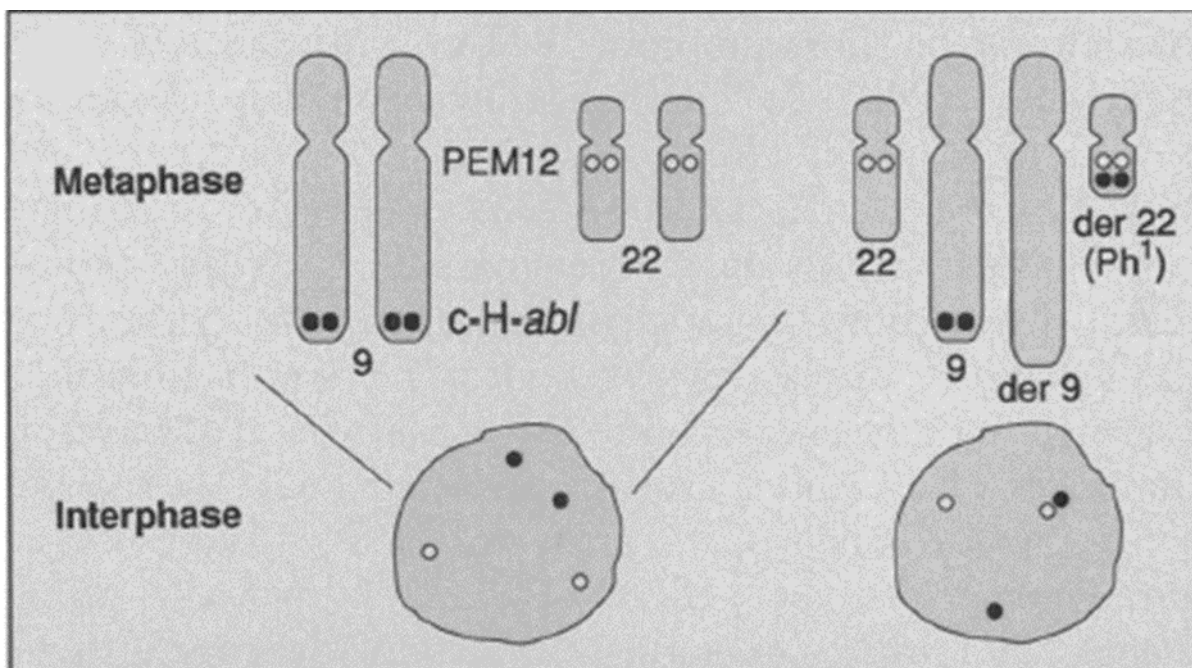
Iako je CGH metoda koja je mnogo doprinijela razvoju citogenetike, ova metoda se ipak ne može koristiti za otkrivanje recipročnih translokacija i inverzija, kao niti za utvrđivanje delecija i duplikacija koje ujedno uključuju strukturalna preslagivanja kromosomskih segmenata. Unatoč tome, obzirom na brojne ranije navedene prednosti, CGH ostaje jedna od najčešće korištenih tehnika u citogenetici (Speicher i Carter, 2005).

2.5. PRIMJENA METODE FISH U KLINIČKIM ISTRAŽIVANJIMA NA PRIMJERU DETEKCIJE PHILADELPHIA KROMOSOMA

Kako je ranije opisano, bolesnici s kroničnom mijeloičnom leukemijom (CML) često pokazuju fuziju proto-onkogen ABL s kromosoma 9 s genom BCR na kromosomu 22. Ova fuzija nastaje kao posljedica recipročne translokacije, kojom se dobiva tzv. Philadelphia kromosom. Kako bi se mogle precizno detektirati fuzije gena ABL i BCR u pojedinačnim stanicama krvi i koštane srži bolesnika, koristi se dvobojna fluorescentna *in situ* hibridizacija (dcFISH), (slika 10). Ova metoda se pokazala brzom i osjetljivom u procjeni učestalosti ove kromosomske aberacije.

Dvobojna hibridizacija s ABL i BCR probama na interfaznim kromosomima rezultira jednim crvenim i jednim zelenim hibridizacijskim signalom na nasumičnom mjestu unutar jezgre, te jednim crveno-zelenim signalom koji je rezultat preklapanja probi koje su na udaljenosti manjoj od 1 μm (slika 10). Ovom metodom dobivena udaljenost između crvenih i zelenih komponenti fuzijskog signala na Philadelphia kromosomu odgovara studijama koje pokazuju da bi se DNA sekvence udaljene manje od 250 kb trebale nalaziti na udaljenosti do jednog mikrona u dvodimenzionalnim interfaznim jezgrama.

Lažno pozitivni rezultati otkriveni su u oko 1 % slučajeva (9 od 750 stanica sakupljenih iz četiri zdrave osobe), pri čemu tri slučaja pokazuju lažno pozitivne fuzijske signale na svakih 150 analiziranih stanica, što znači da koristeći ovu metodu dobijemo rezultat da je učestalost CML stanica u populaciji oko 1 %. Druge metode kojima se može detektirati fuzijski gen su Southern blotting ili *in vitro* PCR cDNA transkripta dobivenog iz mRNA tumorske stanice. Međutim, Southern blotting i PCR ne mogu dati podatke o učestalosti fuzijskog gena u CML stanicama, jer ne dopuštaju genetičku analizu na pojedinačnoj staničnoj razini na način da se rezultati analize mogu povezati s fenotipom stanice. Stoga je procjena distribucije genotipa CML ovim dvjema metodama kroz linije stanica nemoguća (Tkachuk i sur., 1990).



Slika 10. Ilustracija koja prikazuje uzorke prilikom hibridizacije proba u normalnim stanicama te u CML stanicama tijekom metafaze i interfaze. Crni krugovi predstavljaju crvene signale od c-H-abl (abl sonda), a bijeli krugovi predstavljaju zelene signale od PEM 12 (bcr sonda). Lijeva strana slike pokazuje normalnu metafazu s c-H-abl bojanjem blizu kraja 9q i PEM12 na 22q. Odgovarajući interfazni uzorak hibridizacije pokazuje slučajni raspored sva četiri signala. Desna strana slike pokazuje klasični Ph' u CML-u. bcr-abl fuzija je predstavljena jednim setom zelenih i crvenih signala u blizini u metafazi i interfazi (*prema Tkachuk i sur., 1990*)

3. ZAKLJUČAK

1) Razvoj fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) značajno je unaprijedio citogenetiku, omogućujući vizualizaciju specifičnih gena i precizno otkrivanje kromosomskih promjena.

2) Napredne verzije FISH-a, poput M-FISH, fibre FISH i interfazne FISH, proširile su mogućnosti analize, dok najnovije metode kao FISHnCHIPS i MERFISH omogućuju detaljno profiliranje stanica i simultano detektiranje većeg broja molekula unutar jedne stanice. Ove tehnike doprinijele su razumijevanju genske ekspresije, etiopatogeneze genetičkih bolesti i onkogenih promjena, te omogućile rano otkrivanje genetičkih poremećaja.

3) Budući napredak u FISH tehnologijama usmjeren je na još precizniju i bržu analizu, što bi dodatno olakšalo, znanstvena istraživanja i primjenu ove tehnike u dijagnostici.

4. POPIS LITERATURE

- Amann R, Fuchs BM (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* **6(5)**, 339-348. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1888>
- Barcia JJ. (2007) The Giemsa stain: Its history and applications. *Int J Surg Pathol* **15(3)**, 292-296. <https://doi.org/10.1177/1066896907302239>
- Chen KH, Boettiger AN, Moffitt JR, Wang S, Zhuang X (2015) Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science* **348(6233)**, aaa6090. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6090>
- Gall JG, Pardue ML (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **63(2)**, 378-383. <https://doi.org/10.1073/pnas.63.2.378>
- Gray JW, Shayesteh L, Lu YL, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, i sur. (1999) PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* **21(1)**, 99-102. <https://doi.org/10.1038/5042>
- Giemsa G (1904) Eine vereinfachung und vervollkommung meiner methyleneazur-methylenblau-eosin-färbemethode zur erzielung der Romanowsky-Nochteschen chromatinfärbung. *Zentralbl Bakteriol*, **37**, 308–311.
- Haque A, Engel J, Teichmann SA, Lönnberg, T (2017) A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. In *Genome Med* **9(1)**, 75. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0467-4>
- Wapner J, Weinberg RA (2013) The Philadelphia Chromosome: A Genetic Mystery, a Lethal Cancer, and the Improbable Invention of a Lifesaving Treatment, 1. izd., The Experiment, New York.
- Ju D, Li X, Shi Y, Ma Y, Guo L, Wang Y, i sur. (2022) Evaluation of the practical applications of fluorescence *in situ* hybridization in the prenatal diagnosis of positive noninvasive prenatal screenings. *J Matern Fetal Neonatal Med* **35(25)**, 7422-7429. <https://doi.org/10.1080/14767058.2021.1949449>
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, i sur. (1992) Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors. *Science* **258(5083)**, 818-821. <https://doi.org/10.1126/science.1359641>
- Kuwano A, Ledbetter SA, Dobyns WB, Emanuel BS, Ledbetter DH (1991) Detection of deletions and cryptic translocations in Miller-Dieker syndrome by *in situ* hybridization. *Am J Hum Genet* **49(4)**, 707-714. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc1683159/>
- Levsky JM, Singer RH (2003) Fluorescence *in situ* hybridization: Past, present and future. *J*

Cell Sci **116(14)**, 2833-2838. <https://doi.org/10.1242/jcs.00633>

Moffitt JR, Zhuang X (2016) RNA Imaging with Multiplexed Error-Robust Fluorescence *in situ* Hybridization (MERFISH). *Methods Enzymol* **572**, 1-49. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.03.020>

Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford, DA (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* **20**, 613-616. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(60\)90138-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(60)90138-5)

Nowell PC, Hungerford DA (1960) Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* **25**, 85-109. <https://doi.org/10.1093/jnci/25.1.85>

Pinkel, D, Straume, T, & Gray, JW (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83(9)**, 2934-2938. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2934>

Schröck E, Du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, i sur. (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* **273(5274)**, 494-497. <https://doi.org/10.1126/science.273.5274.494>

Speicher MR, Ballard SG, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* **12(4)**, 368-375. <https://doi.org/10.1038/ng0496-368>

Speicher MR, Carter NP (2005) The new cytogenetics: Blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* **6(10)**, 782-792. <https://doi.org/10.1038/nrg1692>

Stockert JC, Blázquez-Castro A, Horobin RW (2014) Identifying different types of chromatin using giemsa staining. *Methods Mol Biol* **1094**, 25-38. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-706-8_3

Tibiletti MG (2007) Interphase FISH as a new tool in tumor pathology. *Cytogenet Genome Res* **118(2-4)**, 229-236. <https://doi.org/10.1159/000108305>

Tjio JH, Levan A (1956) The chromosome number of man. *Hereditas* **42**, 1-2. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1956.tb03010.x>

Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreeff M, Donlon TA, Cleary ML, Suryanarayan K, i sur. (1990) Detection of bcr - abl Fusion in Chronic Myelogenous Leukemia by *in situ* Hybridization. *Science* **250(4980)**, 559-562. <https://doi.org/10.1126/science.2237408>

Trask, BJ (2002) Human cytogenetics: 46 Chromosomes, 46 years and counting. *Nat Rev Genet* **3(10)**, 769-778. <https://doi.org/10.1038/nrg905>

Wang Y, Liu B, Zhao G, Lee YJ, Buzdin A, Mu X, i sur. (2023) Spatial transcriptomics: Technologies, applications and experimental considerations. *Genom* **115(5)**, 110671. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2023.110671>

Williams ES, Cornforth N, Goodwin EH, Bailey SM (2011) CO-FISH, COD-FISH, ReD-FISH, SKY-FISH. *Methods Mol Biol* **735**, 113-124. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-092-8_11

Zhou X, Seow WY, Ha N, Cheng TH, Jiang L, Boonruangkan J, i sur. (2024) Highly sensitive

spatial transcriptomics using FISHnCHIPs of multiple co-expressed genes. *Nat Commun* **15(1)**, 2342. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-46669-y>

Izjava o izvornosti

Ja, Slavica Krželj, izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis