

Usporedba programa u molekularnoj analizi sindroma fragilnog X kromosoma

Fabijanić, Valeria

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:449745>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

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



Valeria Fabijanić

**Usporedba programa u molekularnoj analizi
sindroma fragilnog X kromosoma**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb pod stručnim vodstvom izv.prof.dr.sc. Marije Grdić Rajković i suvoditeljstvom dr.sc. Ivane Rako.

Zahvaljujem izv.prof.dr.sc. Mariji Grdić Rajković na ukazanoj prilici za izradu ovog diplomskog rada. Veliko hvala dr.sc. Ivani Rako na uloženom trudu i pruženoj pomoći pri pisanju diplomskog rada. Također zahvaljujem mag. Andreji Šmerc iz Asuragena te djelatnicima Odjela za molekularnu laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb na ugodnoj suradnji. Hvala Vam na svim savjetima i prenesenom znanju.

Veliko hvala mojoj obitelji, posebice roditeljima Renati i Damiru te sestri Lei na brizi i potpori tijekom studiranja. Hvala što ste bili uvijek tu za mene kao moja najveća podrška.

Za kraj, od srca hvala svim kolegama i prijateljima koji su mi uljepšali studentske dane i učinili studiranje jednim predivnim, bogatim i nezaboravnim iskustvom. Hvala vam na svakom lijepom trenutku.

SADRŽAJ

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | UVOD..... | 1 |
| 1.1 | Sindrom fragilnog X kromosoma | 1 |
| 1.2 | FMR1 gen i FMRP protein | 1 |
| 1.3 | Mozaicizam..... | 5 |
| 1.4 | Nasljeđivanje..... | 6 |
| 1.5 | Molekularna dijagnostika..... | 8 |
| 1.6 | Kliničke manifestacije | 11 |
| 1.7 | Terapija | 14 |
| 2 | OBRAZLOŽENJE TEME..... | 16 |
| 3 | MATERIJALI I METODE..... | 17 |
| 3.1 | Ispitanici..... | 17 |
| 3.2 | Metoda | 17 |
| 3.3 | Postupak izdvajanja DNA..... | 17 |
| 3.4 | PCR..... | 18 |
| 3.5 | PCR protokol | 21 |
| 3.6 | Kapilarna elektroforeza..... | 21 |
| 3.7 | Priprema uzoraka za kapilarnu elektroforezu | 26 |
| 3.8 | GeneMapper Software | 27 |
| 3.9 | AmplideX Reporter Software | 29 |
| 4 | REZULTATI | 33 |
| 5 | RASPRAVA..... | 50 |
| 5.1 | Razlika u broju CGG ponavljanja..... | 50 |
| 5.2 | Dodatni pikovi | 50 |
| 5.3 | Mozaicizam..... | 52 |
| 5.4 | Rascjep alela | 53 |
| 5.5 | Preporuke za ponavljanje analize..... | 54 |

| | | |
|-----|-------------------------------------|----|
| 5.6 | Optimizacija sustava | 55 |
| 6 | ZAKLJUČAK..... | 57 |
| 7 | POPIS KRATICA, OZNAKA, SIMBOLA..... | 58 |
| 8 | LITERATURA | 60 |
| 9 | SAŽETAK/SUMMARY | 64 |
| 9.1 | Sažetak | 64 |
| 9.2 | Summary | 65 |

1 UVOD

1.1 Sindrom fragilnog X kromosoma

Sindrom fragilnog X kromosoma (engl. *Fragile X Syndrome*, FXS) najčešći je nasljedni oblik mentalne retardacije i poteškoća u razvoju te predstavlja najpoznatiji monogenetski uzrok poremećaja iz spektra autizma (engl. *Autism Spectrum Disorder*, ASD). Prvi je identificirani sindrom skupine fragilnih X poremećaja kojoj pripadaju genetski poremećaji poput sindroma fragilnog X povezanog s tremorom i ataksijom (engl. *Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome*, FXTAS) i primarne insuficijencije jajnika povezane s fragilnim X (engl. *Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency*, FXOI) (Usdin i sur., 2017). Radi se o X vezanoj dominantnoj bolesti s nepotpunom penetracijom (Tassone i Montserrat, 2017). Prevalencija bolesti jest 1:4000 muškaraca te 1:7000 žena (Richter i Zhao, 2021). Posljedica je mutacije u FMR1 genu (engl. *Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1*) koja se očituje ekspanzijom polimorfnih CGG ponavljajućih sljedova u 5'-nekođirajućoj regiji FMR1 gena. Utišana je transkripcija FMR1 gena te posljedično smanjena sinteza FMR1 proteina (engl. *Fragile X Mental Retardation Protein*, FMRP) (Berry-Kravis i sur., 2002). Mutacija, odnosno ekspanzija dinamičke je prirode što znači da se povećava broj CGG tripleta sa svakom sljedećom generacijom (Acero-Garcés i sur., 2023). Budući da klinički simptomi nisu specifični te se razlikuju između pojedinaca, testiranje na FXS obično je dio osnovne genetske procjene u slučaju muškaraca ili žena sa zastojem u razvoju, mentalnim poteškoćama i/ili problemima u ponašanju (Biancalana i sur., 2014).

1.2 FMR1 gen i FMRP protein

Gen FMR1 lociran je na kromosomu Xq27.3, odnosno u regiji 27.3 dugog kraka X kromosoma te kodira za RNA-vezujući protein FMRP (Biancalana i sur., 2014). FXS je uzrokovan nedostatkom ili deficijencijom FMRP proteina uslijed mutacije u FMR1 genu. U više od 99% slučajeva dolazi do ekspanzije CGG ponavljajuće sekvence u 5'-nekođirajućoj regiji FMR1 gena. Velike ekspanzije CGG ponavljanja u ovoj regiji povezane su s hipermetilacijom i inhibicijom transkripcije, što rezultira nedostatkom FMRP proteina (Spector i sur., 2021).

U općoj populaciji, broj CGG ponavljanja u FMR1 genu je polimorfan te normalni aleli sadrže 5 do 44 CGG tripleta. Stabilni su i ne dolazi do njihove ekspanzije prilikom nasljeđivanja te ne

predstavljaju rizik za potomstvo niti kod pozitivne obiteljske anamneze. Druga klasa alela jesu intermedijarni aleli s 45 do 54 CGG ponavljanja. Još se nazivaju sivom zonom te stabilnost takvih alela ovisi o prisutnosti AGG ponavljanja koji uzrokuju prekide unutar niza CGG tripleta. Manjak AGG prekida povećava nestabilnost alela. Osim kod intermedijarnih, AGG prekidi također se nalaze u normalnim i premutacijskim alelima (Tassone i Montserrat, 2017). Najčešće slijede 10 ili 11 te 20 ili 21 uzastopnih CGG ponavljanja (Usdin i sur., 2017). Smatra se da je biološka funkcija ovakvih prekida održavanje stabilnosti gena i osiguravanje adekvatne replikacije DNA (Tassone i Montserrat, 2017). Uočene su i ekspanzije i kontrakcije broja CGG ponavljanja u intermedijarnim alelima kod oba spola (Spector i sur., 2021). Intermedijarni aleli mogu prijeći u premutacijske alele u sljedećim generacijama. Premutacijski aleli predstavljaju treću klasu alela s brojem CGG tripleta između 55 i 200. Za razliku od normalnih i intermedijarnih alela kod kojih ne dolazi do metilacije te su uredne razine FMR1 glasničke RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) i FMRP, premutacijski aleli skloni su metilaciji u vrlo niskim količinama te njihova transkripcija rezultira povišenim razinama mRNA i blago sniženom ekspresijom FMRP. Poput intermedijarnih alela, nestabilni su s tendencijom povećanja broja CGG tripleta u idućim generacijama. Ukoliko se nasljeđuju od majke, postoji mogućnost ekspanzije u punu mutaciju već u sljedećoj generaciji (Tassone i Montserrat, 2017). Takva ekspanzija je moguća i kod premutacijskih alela s malim brojem CGG ponavljanja, i to već pri 56 do 59 ponavljanja (Wakeling i sur., 2014). Ekspanzija prilikom nasljeđivanja od oca jest minorna te ostaje u granicama broja CGG ponavljanja koje odgovaraju premutacijskim alelima. Kćeri čiji očevi imaju premutacijski alel bit će nositeljice takvog alela (Tassone i Montserrat, 2017). Osim rizika od ekspanzije u punu mutaciju u sljedećoj generaciji, nositelji alela s premutacijom povećanog su rizika od razvoja FXTAS i FXPOI (Wakeling i sur., 2014). Aleli s punom mutacijom sadrže više od 200 CGG ponavljanja. Uglavnom su metilirani te ne sadrže AGG prekide. Metilacija uzrokuje utišavanje gena u embriogenezi što rezultira inhibicijom transkripcije i nedostatkom FMRP. Upravo je nedostatak FMRP i puna mutacija uzrok FXS (Neri, 2017). Muškarci s punom mutacijom oboljevaju dok samo 30-50% žena s punom mutacijom razvije bolest. Kod žena s punom mutacijom postoji 50% vjerojatnost prijenosa alela na potomstvo. Muškarci nikada ne prenose mutacijske alele na potomstvo već isključivo premutacijske alele. Razlog tome jest gubitak pune mutacije tijekom spermogeneze, dok premutacije opstaju u spermijima te se prenose (Tassone i Montserrat, 2017).

Utišavanje FMR1 gena posljedica je epigenetskih modifikacija koje uzrokuju strukturne promjene i formiranje heterokromatina, kondenziranog transkripcijski inaktivnog kromatina

(Acero-Garcés i sur., 2023). Aleli s više od 200 CGG ponavljanja na 5'-nekodirajućem kraju podložni su povećanoj metilaciji u području ekspanzije i području CpG otoka u promotorskoj regiji što ometa vezanje DNA polimeraze za promotor i transkripciju gena (Kraan i sur., 2018). Kod takvih alela postoji regija 650-800 nukleotida uzvodno od CGG ponavljanja koja potiče metilaciju tzv. FREE1 (engl. *Fragile X-Related Epigenetic Element 1*) i FREE2 (engl. *Fragile X-Related Epigenetic Element 2*) regija lociranih u promotoru i intronu 1 FMR1 gena. Nadalje, metilacija i deacitilacija histona uzrokuju promjene u kvartarnoj strukturi FMR1 gena što ometa vezanje transkripcijskih faktora za DNA. U konačnici je spriječena transkripcija gena u mRNA koja kodira za FMRP što rezultira nedostatkom ili neadekvatnom količinom FMRP (Acero-Garcés i sur., 2023).

U više od 95% slučajeva sindrom uzrokuje upravo ekspanzija CGG ponavljanja na 5'-nekodirajućem kraju FMR1 gena (Sherman i Hunter, 2017). Međutim, mutacije poput točkastih mutacija ili delecija također uzrokuju gubitak funkcije FMR1 gena što može rezultirati FXS ili fenotipu sličnom FXS (Acero-Garcés i sur., 2023).

Osim FXS, mutacije u FMR1 genu povezane su s FXTAS i FXPOI. Međutim, bolesti se razlikuju prema kliničkoj slici i patofiziologiji te su FXTAS i FXPOI uzrokovane povećanom transkripcijom FMR1 gena (Neri, 2017).

FMRP je RNA-vezujući protein s domenama za interakciju s RNA, kromatinom i proteinima (Acero-Garcés i sur., 2023). Široko je rasprostranjen u tijelu te se u visokim razinama nalazi u mozgu, primarno u somi i dendritima neurona te u testisima (Neri, 2017). Bitan je protein u progenitorskim stanicama neurona (engl. *Neural Stem Cells*, NSCs) (Richter i Zhao, 2021). U citoplazmi se nalazi u poliribosomima, veže se za ciljnu mRNA tako sprječavajući translakciju ribosoma na mRNA i transkripciju gena. Također, stupanjem u interakciju s RISC (engl. *RNA Induced Silencing Complex*) modulira translaciju mRNA (Acero-Garcés i sur., 2023). Za razliku od većine RNA-vezujućih proteina koji se vežu za 5' ili 3' nekodirajuće regije, FMRP se veže za kodirajuće regije mRNA (Richter i Zhao, 2021).

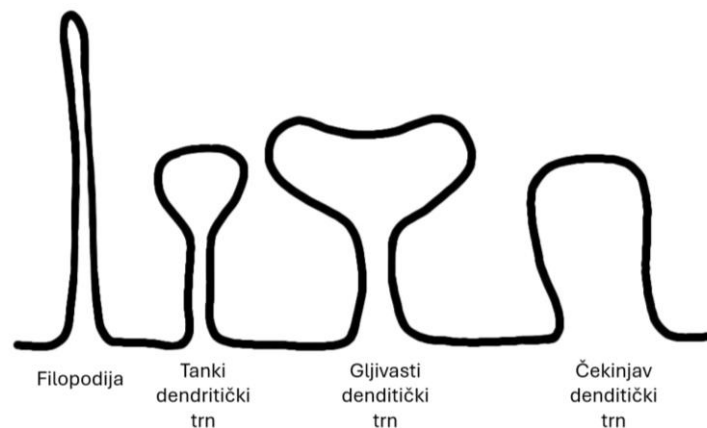
U općoj populaciji, najčešća je izoforma 7 FMRP sa 611 aminokiselina koja sadrži tri RNA-vezujuće domene: dvije nuklearne ribonukleoproteinske K homologne (KH) domene te tzv. arginin-glicin-glicin domenu (engl. *RGG box*) (Richter i Zhao, 2021). Dokazano je postojanje i KH0 domene, no potrebne su dodatne studije kako bi se objasnila njezina uloga u regulaciji mRNA (Gross i sur., 2015). Na amino-terminalnom kraju, FMRP sadrži dvije tzv. Tudor domene koje stupaju u interakciju s RNA, kromatinom i drugim proteinima. Također sadrži

sekvence za lokalizaciju jezgre (engl. *Nuclear Localization Sequence*, NLS) te za izlazak iz jezgre (engl. *Nuclear Export Sequence*, NES) pomoću kojih kontrolira prijenos iz jezgre u citoplazmu i obratno. No, u ravnotežnom se stanju pretežno nalazi u citoplazmi (Richter i Zhao, 2021).



Slika 1. Domene FMRP ključne za funkciju proteina (preuzeto iz Richter i Zhao, 2021)

Esencijalan je protein za normalan neuralni razvoj te nedostatak uzrokuje promjene u morfogenezi živčanih stanica. Uslijed nedostatka, promijenjena je morfologija sinaptičkih dendritičkih trnova koje poprimaju nezrelu strukturu. Dendritički trnovi, umjesto čekinjavog i gljivastog oblika karakterističnog za normalan razvoj neurona, postaju tankog dugačkog oblika (Slika 2.). Povećava se količina sinaptičkih dendritičkih trnova što upućuje na neadekvatnu eliminaciju sinapsi (Neri, 2017).



Slika 2. Izgled normalnih i abnormalnih dendritičkih trnova. U slučaju nedostatka FMRP, bodlje poprimaju nezreo, tanak i izdužen izgled.

FMRP modulira ekspresiju raznih proteina poput aktina, elastina i metaloproteinaze matriksa 9 (engl. *Matrix Metalloproteinase 9*, MMP9). MMP9 izvanstanični je enzim uključen u

remodeliranje sinapsi čije je ekspresija povećana uslijed snižene razine FMRP (Acero-Garcés i sur., 2023). Osim morfogeneze, također je ključan za učinkovitu komunikaciju između neurona zbog utjecaja na neurotransmitere i ione koji sudjeluju u prijenosu informacija u sinapsi. Njegov nedostatak oslabljuje vezu među neuronima u sinapsi što posljedično smanjuje neuralnu plastičnost. U konačnici dolazi do zastoja u normalnom intelektualnom razvoju. Nedostatak FMRP povećava ekspresiju glutamatnih receptora te ometa mehanizam povratne sprege koji regulira aktivnost metabotropnih glutamatnih receptora 5 (engl. *Metabotropic Glutamate Receptor 5*, mGluR5). Normalno, FMRP regulira aktivnost mGluR5 mehanizmom negativne povratne sprege. Aktivirani mGluR5 povećavaju sintezu FMRP koji onda sprječava pretjeranu aktivnost receptora. U nedostatku FMRP, dolazi do poremećaja navedenog mehanizma i pojačane aktivnosti mGluR5 te posljedično disbalansa u neuralnoj signalizaciji. Dodatno, nedostatak FMRP smanjuje sintezu gama-aminomaslačne kiseline (engl. *Gamma-Aminobutyric Acid*, GABA) kao i njezinog receptora što pridonosi neravnoteži između glutamatnih (ekscitatornih) i GABA (inhibitornih) neurotransmitera. U konačnici takva neravnoteža utječe na plastičnost neurona. FMRP je također uključen u regulaciju ionskih kanala. Stupa u interakciju s kalijevim Slack kanalima aktiviranim natrijem. Na taj način regulira akcijski potencijal te indirektno utječe na otpuštanje neurotransmitera u sinaptičku pukotinu. Regulaciju akcijskog potencijala postiže i kontrolom kalijevih BK kanala aktiviranih kalcijem. Dodatno, veže se na mRNA kalijevih Kv3.1b i Kv4.2 kanala ovisnih o naponu što omogućuje direktnu regulaciju njihove ekspresije (Protic i sur., 2022). Dokazano je da FMRP smanjuje translaciju mRNA Kv3.1b kanala, no još uvijek nije u potpunosti razjašnjen način na koji FMRP djeluje na Kv4.2 kanale, odnosno djeluje li kao supresor ili aktivator translacije (Gross i sur., 2015).

Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se u potpunosti shvatila uloga FMRP u ljudskom organizmu. Dokazano je da FMRP djeluje na više razina na ekspresiju drugih gena te stupa u interakciju s različitim proteinima i mRNA u različitim stanicama (Richter i Zhao, 2021).

1.3 Mozaicizam

Pojam mozaicizma opisuje prisutnost stanica s različitim genotipovima u istom pojedincu. U dijagnostici FXS, razlikuju se dva oblika mozaicizma, s obzirom na veličinu i status metilacije, te je moguća i kombinacija navedenih mozaicizma (Pretto i sur., 2014). Mozaicizam s obzirom na veličinu najčešći je oblik mozaicizma u FXS. Rezultat je somatske nestabilnosti alela s

punom mutacijom tijekom rane embriogeneze uslijed čega dolazi do prestanka, odnosno povlačenja ekspanzije CGG ponavljanja (Tassone i Montserrat, 2017). Takva mitotička nestabilnost koja dovodi do mozaicizma na temelju veličine prisutna je samo u ranoj embriogenezi, prije metilacije gena. U odraslom tkivu, puna mutacija mitotički je stabilna uslijed metilacije (Biancalana i sur., 2014). Mozaicizam s obzirom na veličinu javlja se kod osoba koje imaju i premutacijske i alele s punom mutacijom, točnije dio stanica sadrži FMR1 s premutacijom koje uspijevaju sintetizirati FMRP, a dio sadrži FMR1 s punom mutacijom. Zabilježeni su i slučajevi mozaicizma u kojima muškarci imaju kombinaciju normalnih ili intermedijarnih i mutacijskih alela. Pretpostavka je da takva kombinacija mozaicizma nastaje u ranim stadijima sazrijevanja, prije segregacije zametnih stanica od somatskih stanica, prilikom prijenosa premutacijskog alela od majke. Dolazi do promjene u broju CGG ponavljanja što može rezultirati ekspanzijom u punu mutaciju ili rjeđe redukcijom veličine alela (Jiraanont i sur., 2017).

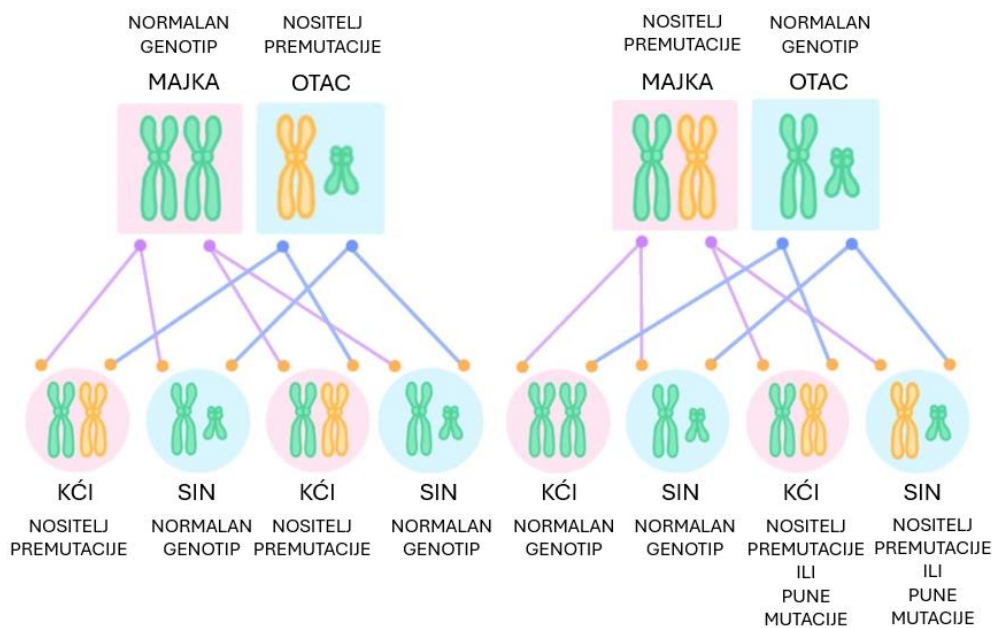
Mozaicizam s obzirom na status metilacije sastoji se od kombinacije metiliranih i nemetiliranih alela (Neri, 2017). Pretežno se metiliraju aleli s >200 CGG ponavljanja, no moguća je i metilacija alela u premutacijskom rasponu. Stupanj metilacije varira unutar i između različitih tkiva u istom pojedincu. Metilacija uzrokuje utišavanje gena te smanjenu ili nedostatnu sintezu FMRP potrebnog za razvoj i funkcioniranje mozga. Nemetilirani aleli transkripcijski su aktivni, često s pojačanom ekspresijom što omogućuje translaciju i sintezu FMRP. Međutim, razine FMRP obrnuto su proporcionalne s brojem CGG tripleta, odnosno što je veći broj CGG ponavljanja u alelu manje će se FMRP sintetizirati (Jiraanont i sur., 2017).

Mozaični aleli prisutni su u podskupu populacije stanica. Nedostatak sinteze FMR1 proteina u tako maloj količini stanica nema veliki utjecaj na fenotip FXS (Filipovic-Sadic i sur., 2010). Sukladno navedenom, posljedica mozaicizma jesu blaži i varijabilni fenotipovi zbog djelomične ekspresije FMR1 mRNA i sinteze FMRP (Tassone i Montserrat, 2017), odnosno razine sinteze FMRP koja se razlikuje između različitih stanica (Acero-Garcés i sur., 2023).

1.4 Nasljeđivanje

Spol roditelja predstavlja rizični faktor za prijenos FXS na potomstvo, no nije rizični faktor za nasljeđivanje ekspanzije. Muškarci nositelji premutacijskog alela prenose X kromosom svim svojim kćerima s istim brojem ponavljanja u alelu. Kod nasljeđivanja s oca na kćeri ne dolazi

do povećanja broja ponavljanja ili je ono zanemarivo te ostaje u rasponu premutacijskog alela (Acero-Garcés i sur., 2023). No, kći nasljeđuje rizik da njezini sinovi imaju FXS ili da rodi heterozigotne kćeri (Spector i sur., 2021). Sinovi od očeva nasljeđuju Y kromosom zbog čega nemaju rizik od nasljeđivanja FXS (Acero-Garcés i sur., 2023). Rizik postoji za njihove unuke i praunuke jer može doći do ekspanzije alela kod njihovih kćeri. Prilikom nasljeđivanja od majke, premutacija se može prenijeti i na kćeri i na sinove sa ili bez ekspanzije uz mogućnost prelaska u punu mutaciju već u sljedećoj generaciji. Do ekspanzija dolazi ukoliko se alel s premutacijom nalazi na aktivnom X kromosomu majke (Usdin i sur., 2017). Vjerojatnost ekspanzije također ovisi o broju AGG prekida unutar ponavljajuće regije. Premutacijski aleli bez AGG prekida nose rizik od ekspanzije u punu mutaciju u sljedećoj generaciji, dok su aleli s AGG prekidima stabilniji prilikom nasljeđivanja iz generaciju u generaciju (Spector i sur., 2021). Svaki muškarac s FXS, tj. s punom mutacijom ima majku nositeljicu ili s punom mutacijom (Acero-Garcés i sur., 2023). Osobina nasljeđivanja pune mutacije preko majke objašnjava neobičan obrazac nasljeđivanja u obiteljima s FXS. Rizik od nasljeđivanja sindroma ovisi o poziciji pojedinca u obiteljskom stablu (Usdin i sur., 2017). Vjerojatnost ekspanzije ovisi o: broju CGG ponavljanja, starosti majke i broju AGG prekida. Starija dob majke prilikom začeća te veći broj CGG ponavljanja u FMR1 genu povećavaju vjerojatnost ekspanzije prilikom nasljeđivanja, dok veći broj AGG tripleta unutar CGG regije smanjuje vjerojatnost povećanja CGG ponavljanja (Acero-Garcés i sur., 2023). Zbog utjecaja majčine dobi na broj ponavljanja postavlja se sumnja da su starije oocite sklonije ekspanziji ili da se ekspanzije s vremenom nakupljaju u oocitama. Dodatno, broj neprekinutih CGG ponavljanja na 3'-kraju ponavljajućeg niza jedini je poznati faktor koji služi za predikciju ekspanzije prilikom nasljeđivanja od majke. Pretpostavlja se da su aleli s barem 34 uzastopnih CGG tripleta povezani sa značajnim rizikom od ekspanzije (Usdin i sur., 2017).



Slika 3. Obrazac nasljeđivanja FXS. Muškarci posjeduju samo jedan X kromosom. U slučaju oca nositelja premutacije, njegove kćeri nasljeđuju premutaciju, no prilikom nasljeđivanja ne dolazi do ekspanzije alela. Sinovi nasljeđuju Y kromosom te ne nasljeđuju premutaciju. Kod nasljeđivanja preko majke, može doći do ekspanzije alela u punu mutaciju. Žene imaju dva X kromosoma, no većina žena s mutacijom sadrže mutacijski ili premutacijski alel na samo jednom X kromosomu što znači da postoji 50% vjerojatnost da dijete naslijedi normalan ili premutacijski/mutacijski alel.

1.5 Molekularna dijagnostika

Molekularna dijagnostika FXS temelji se na broju CGG ponavljanja i statusu metilacije CpG otkrivanja lociranih u promotorskoj regiji gena. Nakon otkrića FMR1 gena 1991. godine, Southern blot postaje zlatni standard u dijagnostici FXS (Rousseau i sur., 2011). Primjena dviju restrikcijskih endonukleaza omogućila je određivanje veličine ekspanzije i metilacijskog statusa. Međutim, Southern blot dugotrajna je metoda, zahtijeva puno koraka u radu te velike količine DNA za analizu. Dodatno, nedovoljno je precizna za određivanje točnog broja CGG tripleta, posebice u normalnim i premutacijskim alelima (Tassone i Montserrat, 2017) te za određivanje AGG prekida (Rajan-Babu i Chong, 2019). Danas se, uz Southern blot, za dijagnostiku FXS koristi i PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) metoda. PCR predstavlja jeftiniju, bržu i precizniju metodu te omogućava točnu kvantifikaciju CGG ponavljanja u vrlo

maloj količini DNA pomoću fluorescentno obilježenih *primera*, tj. početnica koje omeđuju CGG područje u alelu. Upravo je precizan broj CGG tripleta ključan za razlikovanje normalnih, premutacijskih i intermedijarnih alela. Mala razlika u broju ponavljanja može dovesti do pogrešnog zaključka i dijagnoze (Tassone i Montserrat, 2017). Nedostatak PCR produkata u muškaraca upućuje na patološku ekspanziju tripleta u alelu jer je klasičnom PCR metodom nemoguće umnožiti velike mutacijske alele (Filipovic-Sadic i sur., 2010). Konvencionalne PCR metode koriste dva lokus specifična *primera* koji se vežu za sekvence koje omeđuju CGG ponavljajući slijed FMR1 gena te omogućavaju njegovo umnažanje. Veličina dobivenih PCR produkata određuje se pomoću gel elektroforeze usporedbom sa standardnom DNA koji sadrži fragmente poznate veličine. PCR metoda s fluorescentno obilježenim početnicama u kombinaciji s kapilarnom elektroforezom za analizu dobivenih PCR produkata omogućava bolju rezoluciju alela i prosudbu njihove veličine (Rajan-Babu i Chong, 2019). No, PCR ima svoja ograničenja. Zbog velikog broja CGG ponavljanja u premutacijskim i alelima s punom mutacijom te sklonosti stvaranja sekundarnih struktura između citozina i gvanina koje se ne mogu denaturirati, amplifikacija CGG nije uvijek moguća. Nije moguća ni diferencijacija između alela homozigotnih žena i heterozigotnih žena s jednim alelom u normalnom rasponu, a drugim veličine >100 CGG ponavljanja. Također, analiza ne daje informaciju o prisutnosti AGG prekida i statusa metilacije. U posljednjem desetljeću razvijene su PCR metode koje omogućuju analizu cijelog raspona mutacija te pružaju informaciju o AGG prekidima i statusu metilacije (Tassone i Montserrat, 2017).

TP-PCR (engl. *Triplet Repeat-Primed Polymerase Chain Reaction*) koristi lokus specifične početnice koje omeđuju regiju CGG ponavljanja uz početnice koje se vežu na sljedove unutar same regije. Na taj način omogućena je amplifikacija velikih ekspanzija te saznanje o prisutnosti AGG prekida (Tassone i Montserrat, 2017). TP-MS-PCR (engl. *Triplet Repeat-Primed Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*) predstavlja kombinaciju određivanja statusa metilacije korištenjem restriksijskih endonukleaza osjetljivih na metilaciju, umnažanja slijeda pomoću specifičnih obilježenih *primera* i određivanja veličina alela kapilarnom elektroforezom (Chen i sur., 2011).

Preporuke *American College of Medical Genetics and Genomics* navode kombinaciju tradicionalnog PCR-a i Southern blota za određivanje CGG ponavljajućeg slijeda i statusa metilacije u dijagnostici FXS (Spector i sur., 2021). Konvencionalne PCR metode omogućavaju precizno određivanje alela do 100 ili 150 CGG tripleta, dok Southern blot omogućava detekciju, određivanje veličine i statusa metilacije ekspandiranih alela (Wakeling

i sur., 2014). Međutim, novije metode poput TP-PCR metode ili metilacijskog PCR-a eliminiraju potrebu za Southern blot analizom svakog uzorka jer se kapilarnom elektroforezom mogu uspješno razdvojiti ekspanzirani aleli (Spector i sur., 2021).

U slučaju točkaste mutacije ili delecije u FMR1 genu, navedene molekularne metode nisu adekvatne za dijagnostiku FXS te neće otkriti prisutnost takvih mutacija. Potrebno je sekvenciranje cijelog genoma (engl. *Whole Genome Sequencing*, WGS) ili sekvenciranje cijelog egzoma (engl. *Whole Exome Sequencing*, WES). Ove metode genetskog testiranja mogu otkriti rijetke točkaste mutacije bilo gdje u genomu uključujući i FMR1 genu. Ukoliko se postavi sumnja na FXS, ali je standardno testiranje negativno, WGS i WES bi se mogli preporučiti za identifikaciju potencijalnih točkastih mutacija ili delecija u FMR1 genu (Protic i sur., 2022).

Mozaični aleli predstavljaju izazov u dijagnostici FXS. Takvi aleli nisu prisutni u svim stanicama, već samo u udjelu populacije stanica. PCR metodom moguća je detekcija alela s punom mutacijom u oko 5% stanica, ponekad čak u samo 1% stanica. Nedostatak sinteze FMR1 proteina u tako maloj količini stanica nema veliki utjecaj na fenotip FXS. Međutim, testiranje se provodi s klinički dostupnim uzorkom pune krvi koji je samo zamjena za ispitivanje ciljnih tkiva, odnosno mozga odgovornog za neurološke posljedice FXS-a. Studije su pokazale neslaganja u broju CGG ponavljanja istog pacijenta u punoj krvi u usporedbi s epidermalnim stanicama, koje su sličnije stanicama mozga. Kod uzoraka koji pokazuju alele s punom mutacijom u krvnim stanicama moguće je dodatno testiranje u epidermalnim stanicama pacijenta kako bi se razumjeli učinci ovakvih mutacija, čak i kad su prisutne u malim količinama. Dodatno testiranje može biti korisno u slučaju FXPOI kao FMR1 poremećaja čije se biološke posljedice ostvaruju u stanicama koje nisu krvne (Filipovic-Sadic i sur., 2010).

Moguća je i prenatalna dijagnostika FXS. Uzorak izbora jesu korionske resice, no analiza se može provesti i iz DNA stanica amnionske tekućine i krvi. Metode osjetljive na metilaciju nisu prikladne za ranu prenatalnu dijagnostiku jer DNA korionskih resica nije u potpunosti metilirana prije 14. tjedna trudnoće. Uzorkovanje stanica amnionske tekućine može imati manji rizik od pobačaja. Odabir uzorka ovisi o preporuci liječnika i želji pacijenta. Utvrđivanje genotipa s obzirom na veličinu ekspanzije obično je dovoljno za dijagnozu. Za potvrdu, testiranje stanica amnionske tekućine može otkriti ili isključiti somatski mozaicizam kada se pronađe premutacija u DNA korionskih resica, osobito ako postoji značajna nestabilnost nakon prijenosa s majke. Ako majka ima malu premutaciju ili otac nosi potpunu mutaciju, preporuča

se analiza stanica amnionske tekućine. Kod otkrića velike premutacije ili male potpune mutacije u DNA korionskih resica, određivanje statusa metilacije je kritično, a test osjetljiv na metilaciju na DNA stanica amnionske tekućine neophodan je za konačan rezultat. Kod prenatalne dijagnostike, ključna je analiza DNA majke kako bi se isključila kontaminacija majčinih stanica u fetalnom uzorku (Biancalana i sur., 2014).

1.6 Kliničke manifestacije

Klinička slika FXS varira ovisno o spolu. S obzirom da imaju samo jedan X kromosom, simptomi su kod muškaraca teži i izraženiji dok su žene slabije zahvaćene tj. imaju blaži fenotip (Protic i sur., 2022). Težina bolesti u žena ovisi o stupnju aktivacije X kromosoma. Somatske stanice nasumično inaktiviraju jedan X kromosom potpunom metilacijom što znači da se aktivacijom nepromijenjenog X kromosoma u jednim stanicama postiže kompenzacija za promjenjeni X kromosom u drugim stanicama. Žene s punom mutacijom imat će blaži fenotip ukoliko aktiviran X kromosom sadrži normalan alel koji se uredno prepisuje. Selektivna inaktivacija X kromosoma s punom mutacijom odvija se tijekom ranog djetinjstva i puberteta što uzrokuje raznoliku ekspresiju fenotipa kod žena nositeljica mutacije (Acero-Garcés i sur., 2023). Posljedično, samo 25-30% žena s FXS ima intelektualne poteškoće, 30% ima granični IQ dok žene s normalni IQ-om imaju emocionalne probleme ili poteškoće pri učenju (Protic i sur., 2022). Moguća je pojava anksioznosti i depresije uz sramežljivost, poteškoće pri socijalnim interakcijama te razvoj fobija. Fizički fenotip kod žena nije osobito uočljiv, ukoliko je uopće ispoljen. Kod žena s vidljivim fenotipom, sličan je kao i kod muškaraca s izduženim licem i velikim ušima, no znatno je manje izražen (Neri, 2017).

FXS se manifestira različitim neurobiheviornalnim stanjima uz karakteristične fizičke osobine. Fizički fenotip varijabilan je te se očituje rasponom od blažih anomalija prema ozbiljnijim poput hipotonije i displazije vezivnog tkiva što daje koži baršunastu teksturu. Češće je manifestiran i izraženiji kod muškaraca. Pojedinci imaju relativnu makrocefaliju, izduženo lice s velikim izraženim ušima, visoko nepce i istaknutu čeljust. Povećana je fleksibilnost zglobova, posebice zapešća i interfalangealnih zglobova. Ravna stopala, spuštenu ramena, *pectus excavatum* ili tzv. kokošja prsa, odnosno udubljenje prednje stijenke prsnog koša te valgus položaj lakta i koljena, tzv. X-noge uobičajene su pojave kao posljedica opuštenih ligamenata i mišićne hipotonije. Kod pojedine djece javlja se povećana želja za hranom zbog čega postaju pretili te su niži od prosječne visine (Neri, 2017). Fizički fenotip obično nije

vidljiv kod novorođenčadi već se takav izgled postupno razvija tijekom ranog djetinjstva s djetetovim rastom. Jedini indikator FXS kod novorođenčadi može biti smanjen tonus mišića, odnosno hipotonija. Kod muških osoba može se javiti i makroorhizam, odnosno povećanje testisa tijekom i nakon puberteta (Protic i sur., 2022). Volumen testisa može biti povećan čak do 50 mL dok normalan volumen iznosi 20-30 mL (Neri, 2017).



Slika 4. Dječak s klasičnim fizičkim karakteristikama FXS s izduženim licem i velikim izbočenim ušima (preuzeto i prilagođeno prema Neri, 2017)

Od simptoma na razini živčanog sustava, karakteristične su intelektualne poteškoće, ASD, ADHD (engl. *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*) i anksioznost popraćeni s odgođenim prvim govorom te poteškoćama pri govoru, izostankom kontakta očiju, agresivnim ponašanjem, epileptičnim napadajima, problemima sa spavanjem, sramežljivosti, repetitivnim ponašanjem te čak s OCD (engl. *Obsessive-Compulsive Disorder*). Više od 90% dječaka s FXS pati od zastoja u razvoju (Protic i sur., 2022).

Intelektualne poteškoće neizostavni su dio kliničke slike kod muškaraca s FXS. Raspon IQ-a seže između 35 i 55 sa srednjom vrijednošću oko 40. Postoji velika varijabilnost u intelektualnim poteškoćama između pojedinaca ovisno o raznim modificirajućim faktorima od kojih su mnogi još nepoznati. Primjerice, prisutnost mozaicizma može ublažiti kognitivni zaostatak što objašnjava veći IQ i smanjene intelektualne poteškoće (Neri, 2017).

Obrazac ponašanja karakterističan za FXS predstavlja učestaliji fenotip od fizičkog. Definiraju ga smanjena pažnja, izbjegavanje kontakta očima, hiperaktivnost, impulzivnost, eholalija tj. ponavljanje riječi i fraza koje je druga osoba izgovorila, preosjetljivost na senzorne stimulanse poput zvuka i svjetla te ponavljajući pokreti i riječi ili fraze. Većina ovakvog ponašanja proizlazi iz visoke razine anksioznosti i loše prilagodbe na neočekivane situacije. Anksioznost predstavlja prepreku u dnevnim aktivnostima pacijenata te se smatra ozbiljnim problemom u svakodnevnom životu (Neri, 2017).

Često se uz FXS dijagnosticira ADHD ili ASD ili pak oboje. ASD predstavlja teški komorbiditet FXS te kombinacija FXS i ASD predstavlja poseban izazov u tretiranju bolesti zbog izraženijih poteškoća u razvoju i ponašanju. Također, osobe češće pate od anksioznosti i ADHD-a. FXS je najčešći monogenetski uzročnik ASD, no odgovoran je za samo 2-6% slučajeva. Pojedinci koji ne zadovoljavaju kriterije za dijagnozu ASD, ipak pokazuju obrasce ponašanja povezanih s ASD (Neri, 2017).

Navodi se da prevalencija epilepsije kod osoba s FXS iznosi 20%. Benigne je prirode, uglavnom se javlja između četvrte i desete godine života s tendencijom spontanog povlačenja nakon puberteta. Uspješno se liječi monoterapijom, no prekid terapije može uzrokovati rekurentne napadaje (Neri, 2017).

Novorođenčad ima blagu kliničku sliku s manje izraženim simptomima, no ponekad je zastoj u razvoju vidljiv već u prvoj godini života djeteta. Simptomi su puno izraženiji tijekom druge i treće godine posebice ukoliko dijete još nije progovorilo. U tim godinama javlja se i zastoj u razvoju motorike djeteta te dolaze do izražaja simptomi autizma (Protic i sur., 2022). Zbog varijabilnih manifestacija sindroma, ponekad je izazovno postaviti dijagnozu. No, nakon druge godine života dijagnoza FXS ne smije se izostaviti budući da su tada zastoji u razvoju očiti, posebice izostanak napretka u motorici i govoru, dok promjene u izgledu ne moraju doći do izražaja (Neri, 2017).

Odrasle osobe sklone su zdravstvenim komplikacijama poput pretilosti, povišenog krvnog tlaka i gastrointestinalnih poremećaja (Raspa i sur., 2022). Imaju izraženiju mišićnu hipotoniju i hiperfleksibilnost zglobova. Može se razviti i prolaps mitralnog zaliska kao posljedica displazije vezivnog tkiva (Neri, 2017).

Osim FXS, od ostalih kliničkih fenotipova povezanih s mutacijom u FMR1 genu potrebno je naglasiti FXPOI i FXTAS. Za FXPOI kod žena te FXTAS kod žena i muškaraca zaslužna je premutacija koja dovodi do pretjerane ekspresije i toksičnosti. Vjerojatnost razvoja FXPOI-a

povećava se s povećanjem broja ponavljanja do 100 CGG tripleta, dok se nakon toga stabilizira ili čak smanjuje. Simptomi FXTAS-a postaju izraženiji s godinama i povećanjem broja CGG tripleta premutacijskog alela (Biancalana i sur., 2014). U slučaju FXPOI, kod žena s 80-100 CGG ponavljanja ranije dolazi do zatajenja jajnika. Također je povećan rizik od poremećaja menstrualnog ciklusa i razvoja neplodnosti (Hall i Berry-Kravis, 2018). Potrebno je testirati žene s prijevremenom insuficijencijom jajnika, posebice kod pozitivne obiteljske anamneze. Čak 21% žena s premutacijom razvije prijevremenu insuficijenciju jajnika koja uzrokuje menopauzu prije četrdesete godine života, odnosno prijevremeno zatajenje jajnika što je znatno više od opće populacije. FXTAS predstavlja neurodegenerativni poremećaj kod starijih osoba s premutacijom. Javlja se nakon pedesete godine života. Karakterizira ga intencijski tremor, tj. tremor pri pokušaju ciljnih pokreta, cerebralna ataksija, kognitivni pad ili poremećaj, periferna neuropatija, parkinsonizam te urinarna i fekalna inkontinencija (Biancalana i sur., 2014).

1.7 Terapija

Ne postoji specifična terapija za liječenje isključivo FXS već se koriste tradicionalne metode liječenja u svrhu ublažavanja simptoma i zadovoljavanja potreba pojedinca (Neri, 2017).

Postoje dva pristupa liječenju: farmakološki i nefarmakološki, s time da se naglasak stavlja upravo na terapiju bez primjene lijekova. Nefarmakološka terapija sastoji se od fizikalne terapije, radne terapije i govorno-jezične terapije te je ključna u ranom razvoju djeteta dok se terapija lijekovima pripisuje po potrebi. Dodatno, kod djece koja uz FXS imaju dijagnosticiran i ASD preporučuje se tzv. ABA terapija (engl. *Applied Behavior Analysis*). Ovakav pristup omogućuje poboljšanje u ponašanju te kontrolu agresije, hiperaktivnosti i izljeva bijesa. Kognitivno-bihevioralna terapija pomaže pojedincima s anksioznošću, depresijom i ADHD-om te socijalno neprilagođenim osobama (Protic i sur., 2022).

Rana intervencija u području psihomotorne stimulacije, govorne terapije, školovanja i socijalne integracije ključna je za poboljšanje kognicije djeteta (Neri, 2017). Pokazalo se da osobe s FXS pokazuju napredak u ponašanju i prilagodbu na okolinu kada su njihova okolina i terapijski program dobro usklađeni s njihovim potrebama. Potreban je visoko individualiziran bihevioralni, terapijski i obrazovni plan intervencije za kućno te školsko ili radno okruženje (Gross i sur., 2015).

Farmakološka terapija služi za liječenje ADHD, anksioznosti, agresije i problema sa spavanjem kao čestih komorbiditeta FXS. Potrebno je terapiju započeti niskom dozom koja se postupno povećava jer oboljeli od FXS mogu imati izraženije nuspojave pri istim dozama u usporedbi sa zdravim osobama (Protic i sur., 2022). Psihofarmakološka terapija uključuje stimulanse za pažnju i hiperaktivnost, selektivne inhibitore ponovne pohrane serotonina (engl. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*, SSRI) za anksioznost, alfa-agoniste za hiperaktivnost i pretjeranu uzbuđenost, te antipsihotike za iritabilna i agresivna ponašanja. Terapija se pokazala učinkovitom u 50-70% pacijenata (Gross i sur., 2015).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

U svrhu dijagnostike FXS, na Odjelu za molekularnu laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog Bolničkog Centra Zagreb koristi se TP-PCR metoda pomoću koje se umnaža CGG ponavljajuća regija FMR1 alela, a dobiveni fragmenti DNA razdvajaju se kapilarnom elektroforezom. Rezultati analize pohranjuju se u obliku odgovarajućih datoteka koje omogućavaju interpretaciju rezultata u prikladnim programima. U rutinskoj praksi primarno se za analizu koristi GeneMapper software v6.0 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD). Međutim, software nije osmišljen specifično za detekciju ponavljajućih tripleta u genu, već omogućuje općenitiju analizu svih vrsta DNA fragmenata i genotipizaciju zbog čega se, osim za FXS, primjenjuje i u dijagnostici drugih nasljednih poremećaja. Rezultati analize, tj. aleli očitavaju se i identificiraju manualno zbog čega je nužna edukacija laboratorijskog osoblja radi točne interpretacije rezultata. S ciljem poboljšanja dijagnostike FXS i smanjenja manualnog rada, na Odjelu je implementiran AmplideX Reporter software v3.0.4 (Asuragen, Austin, Texas, SAD). Novi software dizajniran je za rad u kombinaciji s AmplideX Reporter PCR/CE FMR1 kitom (Asuragen, Austin, Texas, SAD) u svrhu preciznijeg određivanja broja CGG ponavljanja zahvaljujući korištenju internog standarda s ROX ljestvicom. Omogućava automatsku detekciju i identifikaciju alela, odnosno genotipizaciju. Cilj ovog rada je usporediti rezultate dobivene iz dva programa i utvrditi može li AmplideX Reporter zamijeniti GeneMapper software u rutinskoj praksi te predstavlja li osjetljiviji i pouzdaniji alat za dijagnostiku FXS, posebice u detekciji mozaicizma.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

Za usporedbu GeneMapper i AmplideX Reporter softwarea korišteni su rutinski uzorci pacijenata koji su upućeni na genotipizaciju FMR1 gena u svrhu dijagnostike FXS. Korišteni su podaci analize od ukupno 130 uzoraka, od čega je 129 uzoraka pacijenata te jedan negativan kontrolni uzorak.

3.2 Metoda

U svrhu dijagnostike FXS radi se PCR analiza i kapilarna elektroforeza te se dobiveni rezultati interpretiraju pomoću odgovarajućeg softwarea. Za analizu je potreban uzorak pune periferne krvi pacijenta uzorkovane u epruvetu s ljubičastim čepom (K₂EDTA antikoagulans). Prvo se radi izdvajanje DNA, a potom se PCR reakcijom umnaža fragment DNA od interesa. Kod FXS, fragment od interesa jest CGG ponavljajuća regija FMR1 alela. Za amplifikaciju je korišten AmplideX PCR/CE FMR1 protokol (Asuragen, Austin, Texas, SAD). Nakon umnažanja slijedi razdvajanje PCR produkata kapilarnom elektroforezom. Pritom se koristi 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD). Rezultati analize konvertiraju se u tzv. .fsa datoteke koje omogućavaju analizu rezultata u prikladnom softwarea. U svrhu dijagnostike FXS, prvenstveno se koristi GeneMapper software te se rezultati uspoređuju s AmplideX Reporter softwareaom.

3.3 Postupak izdvajanja DNA

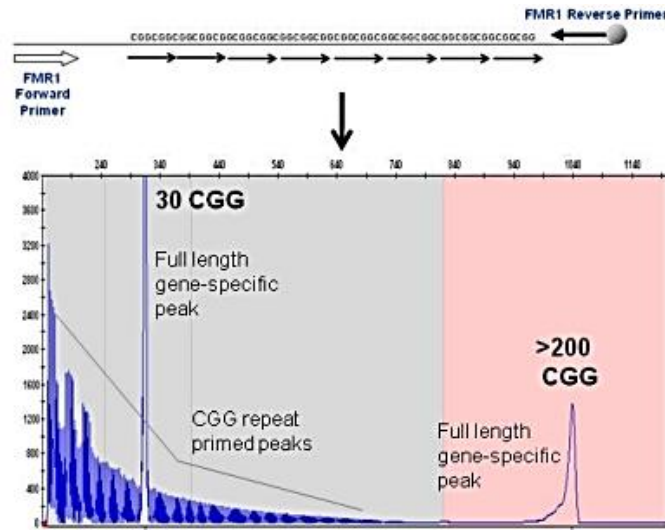
Izdvajanje DNA iz uzorka pune krvi provodi se na uređaju QIAcube (Qiagen, Hilden, Njemačka) pomoću reagensa QIAamp Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka).

U mikrocentrifugalnu epruvetu, prvo se dodaje 20 µL proteinaze K, zatim 200 µL uzorka te 200 µL pufera AL. Pripremljena smjesa vorteksira se 15 sekundi kako bi se osigurala učinkovita liza stanica. Slijedi inkubacija od 10 minuta na 56°C. Mikrotubice se zatim kratko centrifugiraju kako bi se uklonile kapljice sa stijenke i čepića. Dodaje se 200 µL 96-100%-tnog etanola te se dobivena smjesa prvo vorteksira 15 sekundi, a potom kratko centrifugira kako bi se uklonile kapljice. Smjesa se pažljivo nanosi na QIAamp Mini kolonu za centrifugu koja sadrži

sabirnu tubicu od 2 mL te se centrifugira 1 minutu na 8000 okretaja/minuti. Nakon centrifuge, kolona se stavlja u novu sabirnu tubicu od 2 mL, a tubica s filtratom se baca u otpad. Slijedi uklanjanje zaostalih onečišćenja pomoću pufera. U kolonu se dodaje 500 μ L AW1 pufera. Ponovno slijedi centrifugiranje smjese 1 minutu na 8000 okretaja/minuti. Kolona se prebacuje u novu tubicu od 2 mL, a tubica s filtratom se baca u otpad. U kolonu se dodaje 500 μ L AW2 pufera i dobivena smjesa se centrifugira 3 minute na 14000 okretaja/minuti. Kolona se stavlja u mikrotubicu od 1,5 mL, dok se tubica s filtratom baca u otpad. Za eluciju DNA, u kolonu se dodaje 200 μ L pufera AE ili destilirane vode, a smjesa se zatim inkubira 1 minutu na sobnoj temperaturi (15-25°C) te potom centrifugira 1 minutu na 8000 okretaja/minuti. U konačnici, iz 200 μ L uzorka dobije se 3-12 μ g DNA (Qiagen, 2024).

3.4 PCR

Nakon izolacije DNA iz uzorka od interesa, potrebno je napraviti PCR analizu. PCR je metoda molekularne dijagnostike koja omogućava umnažanje specifičnog DNA fragmenta (Garibyan i Avashia, 2013). Za umnažanje CGG ponavljajućeg slijeda unutar FMR1 alela korištena je TP-PCR metoda s tri početnice. Dvije gen specifične početnice tzv. *forward* i *reverse primeri* omeđuju CGG ponavljajuću regiju. Jedna početnica veže se uzvodno, na 5'-kraj ponavljajućeg slijeda, dok se druga početnica veže nizvodno, na 3'-kraj ponavljajućeg slijeda. PCR produkti dobiveni pomoću gen specifičnih početnica predstavljaju alele pune duljine. Treća početnica komplementarna je CGG ponavljajućoj regiji (Asuragen, 2016). Sadrži 3' sekvencu koja hibridizira s DNA molekulom unutar ponavljajućeg slijeda. Može se nasumice vezati za različita mjesta na CGG ponavljajućoj regiji zbog čega generira *pool* umnoženih fragmenata koji se razlikuju prema veličini za 3 parova baza (pb). Veličina PCR produkta ovisi o mjestu vezanja početnice. Ukoliko se početnica vezala pri početku ponavljajuće sekvence, nastat će duži produkt (Rajan-Babu i Chong, 2019). U uzorcima s ekspanzijom, TP-PCR metodom nastaju visoko heterogeni fragmenti amplicona koji stvaraju tzv. *stutter* pikove na elferogramu uslijed elektroforeze (Rajan-Babu i sur., 2022).



Slika 5. Primjer elferograma heterozigotne pacijentice s normalnim i mutacijskim alelom. Na elferogramu su vidljivi i mali *stutter* pikovi uslijed nasumičnog vezanja početnice unutar CGG ponavljajuće regije i posljedičnog nastajanja PCR produkata s razlikom u veličini za jedan triplet (preuzeto iz Asuragen, 2016).

TP-PCR omogućava amplifikaciju alela u normalnom, intermedijarnom, premutacijskom i mutacijskom rasponu (Tassone i Montserrat, 2017), za razliku od klasičnog PCR-a koji omogućava umnažanje normalnih, intermedijarnih i premutacijskih alela zbog otežane amplifikacija alela s velikim brojem CGG ponavljanja, odnosno učinkovitosti PCR-a koja je obrnuto proporcionalna broju ponavljanja (Sherman i sur., 2005). Dodatno, optimizacija uvjeta pri kojima se provodi PCR analiza te korištenje posebnog pufera za umnažanje GC bogatih regija također je omogućilo amplifikaciju mutacijskih alela. Primjenjuju se uvjeti koji snižavaju temperaturu mekšanja amplikona, no i dalje omogućuju vezanje početnica i učinkovitu amplifikaciju (Filipovic-Sadic i sur., 2010).

Općenito, za PCR amplifikaciju potrebne su sljedeće sastavnice: DNA kalup, DNA polimeraza, početnice, deoksinukleozid trifosfati (dNTP-ovi), Mg^{2+} i pufer. DNA polimeraza ključan je enzim koji povezuje nukleotide u PCR produkt. Nukleotidi se u DNA molekuli sastoje od šećera deoksiriboze, fosfatne skupine i jedne od četiri dušične baze, a to su: adenin (A), gvanin (G), citozin (C) i timin (T). DNA polimeraza koristi nukleotide za sintezu fragmenta komplementarnog DNA kalupu. *Primeri* u reakcijskoj smjesi određuju točan DNA fragment koji je potrebno umnožiti. To su kratki fragmenti DNA s definiranom sekvencom komplementarnom ciljnoj DNA koju treba detektirati i umnožiti. Vezanjem DNA polimeraze

na početnice omogućena je amplifikacija DNA fragmenta (Garibyan i Avashia, 2013). Prema AmplideX PCR/CE FMR1 protokolu (Asuragen, Austin, Texas, SAD), za PCR analizu potrebni su GC-Rich Amp pufer, FMR1 *forward* i *reverse* početnice obilježene FAM fluorescentnom bojom, FMR1 CGG početnica, otapalo, GC Rich smjesa polimeraza te DNA uzorak (Asuragen, 2016).

Reakcijska smjesa pripravlja se u epruvetama ili pločicama koje se potom stavljaju u termalni blok PCR uređaja. Uređaj podiže i snižava temperaturu bloka u preciznim i unaprijed programiranim koracima. Reakcija se odvija u tri koraka: denaturacija, vezanje početnica, tj. hibridizacija i elongacija. Reakcijska smjesa prvo se zagrijava iznad točke taljenja dvaju komplementarnih lanaca DNA kalupa što omogućuje denaturaciju, odnosno odvajanje lanaca. Temperatura se zatim snižava kako bi se omogućilo vezanje specifičnih *primera* na ciljane fragmente DNA s komplementarnom sekvencom. Nakon hibridizacije *primera* i DNA kalupa, temperatura se ponovno podiže što omogućava DNA polimerazi elongaciju *primera* dodavanjem nukleotida. Sa svakim ponavljanjem ova tri koraka, broj DNA molekula se udvostručuje (Garibyan i Avashia, 2013). U skladu s AmplideX PCR/CE FMR1 protokolom (Asuragen, Austin, Texas, SAD) za amplifikaciju CGG ponavljajuće sekvence, denaturacija DNA odvija se pri 95°C te pri 97°C kako bi se osiguralo potpuno odvajanje DNA lanaca u GC bogatoj regiji, vezanje početnica odvija se pri 62°C i 68°C ovisno o vrsti početnice, dok se elongacija DNA fragmenata odvija pri temperaturi od 72°C (Asuragen, 2016).

Kombinacija TP-PCR metode i kapilarne elektroforeze značajno poboljšava mogućnost pouzdane detekcije FMR1 alela s ekspanzijom, određivanje veličine alela u rasponu od normalnog broja CGG tripleta do <200 CGG tripleta te određivanja zigotnosti kod žena. TP-PCR otkrit će ekspanziju u alelu bez obzira na veličinu. Broj AGG ponavljanja unutar CGG ponavljajućeg slijeda također se može otkriti iz uzorka elferograma. Zbog navedenog, TP-PCR s kapilarnom elektroforezom najprikladnija je opcija za procjenu CGG ponavljajućeg slijeda FMR1 gena, dok se Southern blot i drugi PCR testovi specifični za otkrivanje statusa metilacije mogu koristiti za analizu potvrde veličine ponavljajućeg slijeda i/ili određivanje statusa metilacije u uzorcima s premutacijskim i mutacijskim alelima (Rajan-Babu i Chong, 2019).

3.5 PCR protokol

PCR metoda provodi se prema AmplideX PCR/CE FMR1 protokolu (Asuragen, Austin, Texas, SAD).

U mikrotubice od 1,5 mL komponente reakcijske smjese dodaju se sljedećim redoslijedom: 11,45 μL GC-Rich Amp pufera, 0,5 μL FMR1 *forward* i *reverse* FAM obilježenih *primera*, 0,5 μL FMR1 CGG *primer*, 0,5 μL diluenta te 0,05 μL GC-Rich Polymerase smjese. Prije same reakcije, sve reagense osim smjese GC-Rich Polymerase potrebno je temperaturno stabilizirati na sobnoj temperaturi 10-ak minuta, dok se GC-Rich Polymearse smjesa drži na ledu. Pripremljena reakcijska smjesa kratko se vorteksira, a potom se 13 μL otpipetira u PCR tubicu ili jažicu unutar PCR pločice. U svaku jažicu ili tubicu dodaje se 200 μL uzorka DNA te se smjesa promiješa pipetom. Pločica ili tubica se lagano izvorteksira te centrifugira 1 minutu na 1600 g kako bi se uklonili mjehurići u smjesi. Pripremljene PCR pločice ili tubice stvljaju se u PCR uređaj koji omogućava PCR reakciju kontrolom temperature. Pri temperaturi od 95°C tijekom 5 minuta odvija se odvajanje DNA lanaca. Zatim se, u svakom od ukupno 10 ciklusa, temperatura povisuje na 97°C 35 sekundi kako bi se osiguralo potpuno odvajanje DNA lanaca te snižava na 62°C 35 sekundi i povisuje na 68°C 4 minuta kako bi se osiguralo vezanje početnica na lance. Slijedi 20 ciklusa, a u svakom ciklusu se temperatura povisuje na 97°C 35 sekundi, snižava na 62°C 35 sekundi te povisuje na 68°C 4 minute uz ekstenziju od 20 sekundi po ciklusu. Pri završetku svih ciklusa, temperatura se snižava na 72°C 10 minuta, a zatim se dalje snižava na 4°C što osigurava kraj PCR-a (Asuragen, 2016).

3.6 Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza elektrokinetska je tehnika koja omogućuje razdvajanje nabijenih iona u vodenoj ili organskoj fazi na temelju razlika u brzini kretanja kada se podvrgnu električnom polju (Aupiais i Chartier, 2020). Općenito, kationi se kreću prema negativno nabijenoj katodi, anioni prema pozitivno nabijenoj anodi, dok na neutralne molekule na utječe električno polje te one ostaju stacionarne. Nakon injiciranja uzorka u kapilaru, uzorak putuje kapilalom te se komponente uzorka odvajaju i eluiraju pri različitim vremenskim razmacima, ovisno o naboju i veličini. Rezultat provedene kapilarne elektroforeze je elferogram, prikaz koji pruža kvantitativne i kvalitativne informacije o analiziranom uzorku (chem.libretexts.org). Zbog visoke razlučivosti i učinkovitosti metode, brze analize, male količina uzorka potrebnog za analizu te *online* detekcije, tehnika je široko rasprostranjena u području medicinske

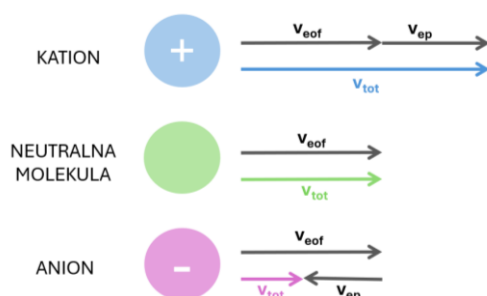
dijagnostike (Aupiais i Chartier, 2020). Kapilarna elektroforeza, nakon provedene PCR reakcije, omogućava kvantitativno mjerenje snage signala u jedinicama relevantne fluorescencije (engl. *Relative Fluorescence Units*, RFU) pomoću elferograma. RFU predstavlja magnitudu signala u vrhu odabranog pika. Na ordinati elferograma nalazi se intenzitet fluorescentnog signala u RFU, dok se na apscisi nalazi broj parova baza. Pikovi na grafu odgovaraju DNA fragmentima. Visina pika u RFU predstavlja koncentraciju fragmenta, a pozicija na apscisi ukazuje na veličinu, odnosno duljinu fragmenta (Asuragen, 2023).

Komponente instrumenta za kapilarnu elektroforezu jesu: uska staklena kapilara, dva spremnika s puferom, dvije elektrode spojene na napajanje visokog napona, izvor lasera, detektor fluorescencije, tzv. *autosampler* za držanje epruveta ili pločice s uzorcima i računalo za kontrolu ubrizgavanja i detekciju uzoraka. Razdvajanje fragmenata provodi se unutar kapilare, promjera obično oko 50 μm radi lakše kontrole temperature te duljine 20-50 cm, ovisno o vrsti analize za koju se kapilara koristi. Krajevi kapilare uronjeni su u spremnike s elektrolitom, kao i elektrode, kako bi se zatvorio strujni krug. Kapilara se uranja u uzorak te, primjenom električnog polja ili tlaka, uzorak se ubrizga u kapilaru (Chang-Hui, 2023). Primjena električnog polja za uvođenje uzorka u kapilaru je tzv. *elektrokinetičko injiciranje* gdje se određeni vremenski period na uzorak uronjen u jedan kraj kapilare primjenjuje napon. Molekule DNA negativno su nabijene u neutralnom pH području, stoga pozitivan napon uvlači DNA u kapilaru (Butler, 2012). *Hidrodinamičko injiciranje* koristi tlak, točnije razliku u tlakovima kroz kapilaru za uvlačenje male količine uzorka u kapilaru (chem.libretexts.org).

Struja visokog napona omogućuje kretanje DNA fragmenata kroz kapilaru do detektora gdje se informacije prikupljaju i pohranjuju pomoću odgovarajućeg sustava za prikupljanje podataka (Chang-Hui, 2023). Kapilare su građene od stakla ili taljenog silicija, odnosno silicijevog dioksida (SiO_2). Unutarnju stijenku kapilare oblaže silanol (SiOH) čija je hidroksilna skupina negativno nabijena pri pH većem od 5. Puferi koji se koriste za kapilarnu elektroforezu imaju pH 8 što uzrokuje ionizaciju silanolnih skupina i nastajanje negativno nabijenih siloksi iona (SiO^-). Nastali negativno nabijeni ioni privlače pozitivne ione iz pufera duž unutarnje stijenke kapilare tako tvoreći dvosloj (Butler, 2012). Sam dvosloj se sastoji od nepokretnog i difuznog sloja. Kationi u nepokretnom sloju djelomično neutraliziraju negativno nabijenu stijenku kapilare, dok susjedni difuzni sloj sadrži više kationa nego aniona (chem.libretexts.org). Primjenom električnog polja na kapilaru, pozitivni ioni iz difuznog sloja se kreću prema negativnoj elektrodi (katodi). Nastaje tzv. *elektroosmotski tok* koji pokreće otopinu unutar kapilare zahvaljujući kationima u otopini (Butler, 2012). Anioni, koje prirodno

privlači pozitivna anoda, također putuju prema katodi zbog suviška kationa u otopini te posljedično elektroosmotskog toka. Elektroosmotska sila dovoljna je za pokretanje svih molekula kroz detektor prema katodi (Chang-Hui, 2023).

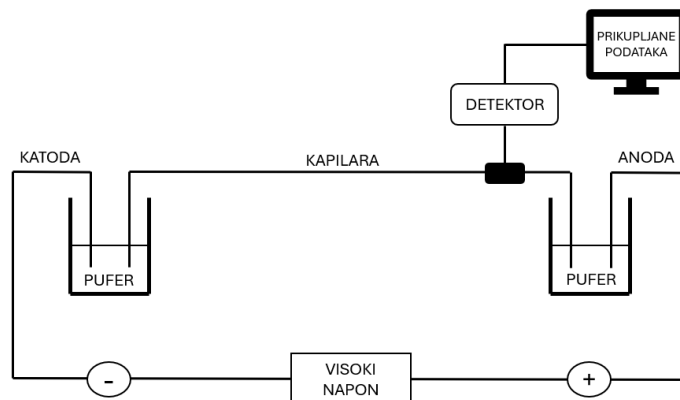
Općenito, na pokretljivost analita u uzorku, uz elektroosmotski tok otopine, utječe i njegova elektroforetska pokretljivost (Chang-Hui, 2023). Elektroforetska pokretljivost predstavlja odgovor otopine na primijenjeno električno polje što znači da kationi putuju prema negativnoj elektrodi, anioni prema pozitivnoj elektrodi, a neutralne molekule ostaju stacionarne (chem.libretexts.org). Pojedinačni analiti migriraju elektroforetskim smjerom i brzinom određenom njihovim nabojem i masom (Chang-Hui, 2023). Na elektroforetsku pokretljivost uzorka također utječu: vrsta, koncentracija i pH pufera, vrijeme trajanja elektroforeze, količina primijenjenog napona te vrsta korištenog polimera (Applied Biosystems, 2014). U konačnici, brzina kretanja analita kroz kapilaru određena je brzinom njegove elektroforetske pokretljivosti i elektroosmotskog toka. Svaki analit ima jednaku brzinu elektroosmotskog toka, no različitu elektroforetsku pokretljivost ovisno o naboju i veličini. Kationi se eluiraju prvi, s time da se visoko nabijeni mali kationi eluiraju prije većih i slabije nabijenih kationa. Neutralne molekule eluiraju se brzinom jednakoj brzini elektroosmotskog toka. Anioni se zadnji eluiraju, posebice mali visoko nabijeni anioni (chem.libretexts.org).



Slika 6. Opći redoslijed elucije u kapilarnoj elektroforezi. Ukupna brzina analita (engl. *total velocity*, v_{tot}) koji putuje kapilaram jednaka je zbroju elektroforetske brzine (engl. *electrophoretic velocity*, v_{ep}) i brzine elektroosmotskog toka (engl. *electroosmotic flow velocity*, v_{eof}). Svaki analit, neovisno o veličini i naboju, ima jednaku brzinu elektroosmotskog toka. Kationi se eluiraju prvi jer imaju pozitivnu elektroforetsku brzinu koja se zbraja s brzinom elektroosmotskog toka. Anioni se eluiraju posljednji jer njihova negativna elektroforetska brzina parcijalno kompenzira brzinu elektroosmotskog toka. Neutralne molekule eluiraju se brzinom jednakoj brzini elektroosmotskog toka (chem.libretexts.org).

Kada se na sustav primjeni napon, pojedinačni analiti migriraju elektroforetskim smjerom i brzinom određenom nabojem i masom analita. Na odvajanje također utječu kapilara i pufer za elektroforezu (Chang-Hui, 2023). Neto kretanje pufera prema katodi nastaje zbog elektroosmotske sile koja je posljedica negativnog naboja silike na unutarnju površinu kapilare. Kationi duž stijenke kapilare tvore dvostruki sloj koji se, primjenom električnog polja, pomiče duž stijenke prema negativno nabijenoj katodi. Elektroosmotska sila dovoljna je za pokretanje svih molekula kroz detektor prema katodi. To uključuje i negativno nabijene analite koji su elektroforetski privučeni prema negativno nabijenoj anodi kada se polarnost kreće od anode, preko detektora, do katode. Brže se kreću manje molekule zbog čega one prve prolaze kroz detektor, dok se veće molekule sporije kreću te kasnije prolaze kroz detektor (chem.libretexts.org).

Kako su sve DNA molekule negativno nabijene, odvajaju se samo na temelju veličine te putuju elektroforetskim tokom od negativno nabijene katode prema pozitivno nabijenoj anodi, s minimalnim ili u potpunosti reduciranim utjecajem elektroosmotskog toka na njihovo kretanje (Chang-Hui, 2023). Unutar kapilare nalazi se viskozna polimerna otopina koja služi kao medij za razdvajanje. Linearni i fleksibilni polimerni lanci prepreke su negativno nabijenoj DNA na putu do pozitivne elektrode. Veće molekule DNA kreću se sporije kroz kapilaru od manjih i agilnijih DNA molekula koje lakše prolaze kroz polimerne lance što omogućuje njihovo razdvajanje na temelju veličine (Butler, 2012). Polimeri također minimaliziraju ili u potpunosti eliminiraju utjecaj elektroosmotskog toka na razdvajanje tako što maskiraju negativan naboj unutarnja stijenka kapilare te ju čine kemijskim inertnom prema DNA (Smith i Nelson, 2003).



Slika 7. Shematski prikaz aparature za kapilarnu elektroforezu DNA. Kapilara ispunjena polimerom omogućava razdvajanje fragmenata DNA na temelju njihove veličine. Uzorak se injicira u kapilaru pomoću napona. Nakon ulaska uzorka u kapilaru, visoki napon se primjenjuje uzduž kapilare kako bi se razdvojili DNA fragmenti. Prolazak fluorescentno označenih fragmenata kroz detekcijski prozor te njihova ekscitacija laserskom zrakom omogućava analizu. Dobiveni podaci prikupljaju se na računalu te se rezultati spremaju za interpretaciju (Butler, 2012).

Detekcija uzorka vrši se mjerenjem vremenskog raspona od injiciranja uzorka do detekcije uzorka laserom postavljenog pri kraju kapilare. Laser obasjava DNA fragmente kroz prozor na kapilari prilikom njihovog prolaska. Manje DNA molekule prve stižu na mjesto detekcije te ih slijede veće DNA molekule što je u skladu duljinom, tj. brojem parova baza. U smjesu svakog uzorka za analizu potrebno je dodati interni standard koji predstavlja DNA fragmente poznate veličine radi korelacije rezultata između serija (Butler, 2012).

Molekule DNA fluorescentno su obilježene. Fluorescentna boja veže se na početnice ukomponirane u umnožene DNA fragmente (Butler, 2012). Prije dolaska do pozitivne elektrode, fluorescentno obilježeni i prema veličini odvojeni DNA fragmenti prolaze kroz put laserske zrake koja pobuđuje fluorescenciju bojila DNA fragmenata (Applied Biosystems, 2014).

Prolazak svake molekule DNA kroz detektor prikazuje se pikom na elektroferogramu. Detektor je fotosenzitivni uređaj koji mjeri intenzitet svjetlosti koju emitira fluorofora (Butler, 2012). Fluorescentni signali se međusobno odvajaju pomoću difrakcijskog sustava te tzv. CCD (engl. *Charge-Coupled Device*) kamera detektira fluorescenciju. Pobuđena laserom, svaka

fluorescentna boja emitira svjetlost različite valne duljine što omogućuje diferencijaciju alela unutar serije (Applied Biosystems, 2014). Udaranjem fotona na detektor svjetlosni signal pretvara se u električni te je jakost nastale struje proporcionalna intenzitetu emitirane svjetlosti koji se iskazuje u RFU jedinicama (Butler, 2012). U konačnici se fluorescentni signal konvertira u digitalne podatke koji se spremaju u formate datoteka kompatibilne sa softwareom za analizu (Applied Biosystems, 2014).

Za analizu na 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD) koristi se kapilara duljine 50 cm s naponom ubrizgavanja od 2,5 kV tijekom 20 sekundi. Vrijeme analize iznosi 2400 sekundi. Prije analize, u svaku jažicu s uzorkom potrebno je dodati Hi-Di formamid kako bi uzorak resuspendirao prije elektrokinetičkog ubrizgavanja te ROX 1000 interni standard, tj. standard veličine (Asuragen, 2016).

3.7 Priprema uzoraka za kapilarnu elektroforezu

Postupak kapilarne elektroforeze provodi se prema se prema AmplideX PCR/CE FMR1 protokolu (Asuragen, Austin, Texas, SAD) na uređaju 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, SAD).

Za početak, potrebno je temperaturno stabilizirati formamid i ROX1000 interni standard na sobnoj temperaturi te ih temeljito izvorteksirati. Reakcijska otopina priprema se dodavanjem 11 μL Hi-Di formamida i 2 μL ROX1000 internog standarda. Pripremljena otopina kratko se vorteksira i centrifugira, a zatim se 13 μL otopine pipetira u svaku jažicu pločice za kapilarnu elektroforezu. U jažice se dodaje 2 μL PCR produkata. Smjesa se promiješa laganim pipetiranjem. Pločica se vorteksira i centrifugira kako bi se uklonili mjehurići unutar jažica te se prenosi na termalni blok. Uzorci se denaturiraju 2 minute na 95°C nakon čega se temperatura snižava na 4°C te su uzorci spremni za ubrizgavanje u uređaj za kapilarnu elektroforezu. Uređaj sadrži kapilaru duljine 50 cm sa POP-7 polimerom za razdvajanje. Ubrizgavanje se odvija pri naponu od 2,5 kV tijekom 20 sekundi, a vrijeme razdvajanja iznosi 2400 sekundi. Nakon elektroforeze, dobiveni podaci se analiziraju kako bi se odredila veličina amplikona i izračunao broj CGG ponavljanja (Asuragen, 2016).

3.8 GeneMapper Software

GeneMapper jest program koji služi za genotipizaciju. Omogućuje određivanje veličine DNA fragmenata nakon njihovog umnažanja PCR-om i separacije kapilarnom elektroforezom.

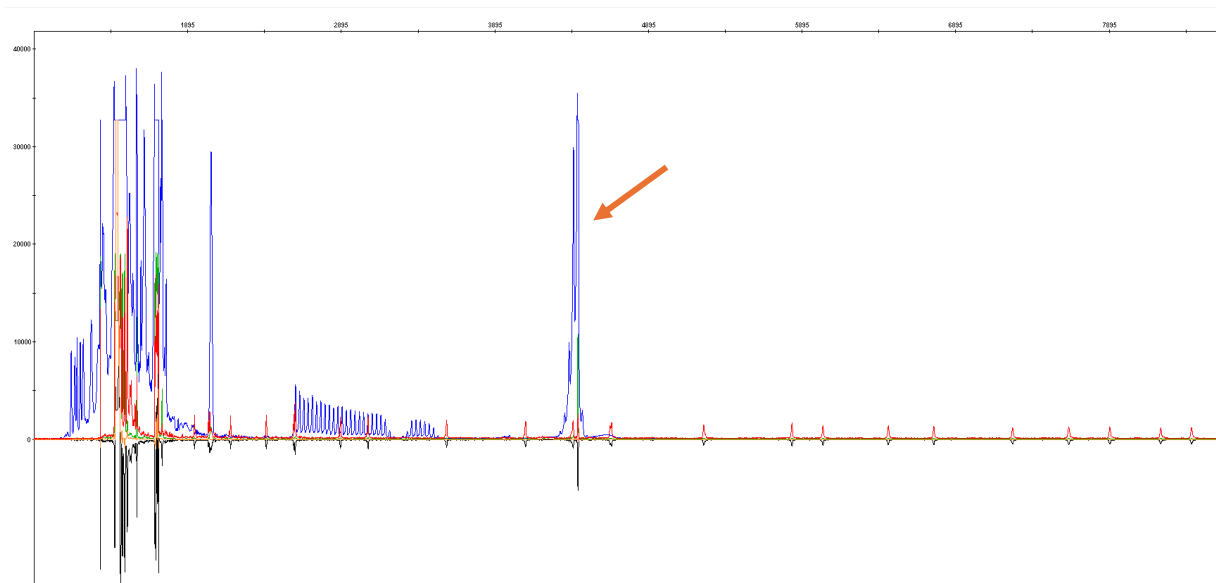
Software analizira prikupljene podatke u obliku .fsa datoteka koje generira software za prikupljanje podataka u sklopu instrumenta za kapilarnu elektroforezu. Analizirani fragmenti označeni su fluorescentnim bojama. U jednom uzorku moguća je detekcija više različitih fluorescentnih boja. Pritom jedna fluorescentna boja pripada internom standardu koji se nalazi u svakom uzorku. Standard služi za ekstrapolaciju veličine parova baza pikova DNA produkata. Software koristi standard za određivanje standardne krivulje u svakom uzorku. Usporedbom fragmenata sa standardnom krivuljom, software određuje relativnu veličinu svakog fluorescentno obilježenog DNA fragmenta. Budući da su poznate veličine, tj. broj parova baza pikova standarda, veličine pikova uzorka određene su usporedbom brzina migracije tijekom elektroforeze. Veličina DNA fragmenta od interesa izračuna se na temelju fragmenta standarda s kojim putuje tijekom elektroforeze. Ujednačen razmak između fragmenata standarda osigurava precizno određivanje u cijelom rasponu veličine. Neki standardi imaju pikove koji se ne koriste za određivanje veličine fragmenata već služe kao indikatori preciznosti unutar serije. Također, standard služi za smanjivanje razlika uslijed ubrizgavanja uzorka u sustav kako bi se osigurala usporedivost istih DNA fragmenata te smanjila varijacija rezultata pri analizi s različitim kapilarama i instrumentima između serija. Prilikom detekcije, detektiraju se samo pikovi s visinama koje prelaze *cutoff* vrijednost.

Kako bi software uspješno odredio veličinu pikova, potrebno je postići podudaranje omjera koji se temelji na relativnoj visini i udaljenosti susjednih pikova. Software traži očekivan broj alela i očekivane obrasce pikova umjesto specifičnih podatkovnih točaka. Kvalitativne vrijednosti izvodi statističkim ispitivanjem sličnosti između teoretskih fragmenata iz definiranog internog standarda i stvarnih tj. opaženih fragmenata uzorka. Pritom software za analizu mora uskladiti barem tri vrha te zanemaruje anomalne vrhove koji ne odgovaraju očekivanim obrascima. Zatim konstruira tzv. *best-fit* krivulju pomoću točaka svakog otkrivenog fragmenta standarda. Uspoređuju se veličine izračunate pomoću krivulje i njihovi podudarni pikovi iz definicije standarda. Usklađivanje veličina te posljedično njihovo određivanje nije uspješno ukoliko se pronađu značajne razlike u obrascima pikova ili izostaje podudarnost na temelju očekivanih obrazaca te u slučaju kad nisu pronađeni svi pikovi (Applied Biosystems, 2014). Manualnom analizom određuju se pikovi koji odgovaraju FMR1

alelima te se na temelju broja parova baza izračunava broj CGG ponavljanja prema sljedećoj jednadžbi:

$$CGG_i = \frac{Pik_i - c_0}{m_0}$$

gdje je Pik_i veličina pika alela od interesa u parovima baza; c_0 je korekcijski faktor veličine; i je m_0 je korekcijski faktor mobilnosti za svako CGG ponavljanje. Korekcijski faktori ovise o instrumentu, vrsti polimera, duljini kapilare i uvjetima rada te se mogu razlikovati od laboratorija do laboratorija. Nužni su radi izdavanja točnog broja ponavljanja. Prema prethodno navedenom, veličina amplitudona od interesa derivira se pomoću usporedbe s internim standardom. Međutim, PCR produkti regije bogate CGG tripletima brže migiriraju od generičke DNA standarda zbog velikog udjela GC u strukturi. Bez uporabe korekcijskih faktora, prijavljivao bi se lažno snižen broj CGG ponavljanja (Asuragen, 2016).



Slika 8. Elferogram dobiven na GeneMapper softwareu. Istaknuti pik na elferogramu ukazuje na prisutnost normalnog alela veličine 340 pb, odnosno 36 CGG tripleta.

Dobar elferogram mora sadržavati pikove visine ≥ 50 RFU, dok je idealna visina pikova ≥ 175 RFU za 3500xL Genetic Analyzer. Pikovi visine < 50 RFU smatraju se pozadinskim šumom. Također, pikovi bi trebali biti oštri, bez cijepanja vrhova. Ako pikovi različitih boja nisu jednakog intenziteta, podaci za manje intenzivne boje trebaju biti jasno razlučivi pri većem

povećanju. U elferogramu moraju biti detektirani svi pikovi te njihova veličina mora biti ispravno određena u skladu sa standardom. Rezultati moraju biti reproducibilni. Usporedba površina i visina pikova te njihovih veličina u parovima baza moguća je jedino kod fragmenata označenih istom bojom. Moguća je usporedba samo onih podataka koji su prikupljeni pod istim uvjetima analize s obzirom na duljinu kapilare, vrstu polimera i uvjete elektroforeze jer navedene stavke utječu na relativnu veličinu fragmenata (Applied Biosystems, 2014).

3.9 AmplideX Reporter Software

AmplideX Reporter jest software za analizu podataka i vizualizaciju dizajniran za analizu .fsa datoteka dobivenih kapilarnom elektroforezom CGG ponavljanja u FMR1 genu. Algoritam softwarea osmišljen je specifično za dijagnostiku FXS te omogućava automatsku analizu rezultata.

Za analizu je potrebno jasno definirati *cutoff* vrijednost, odnosno prag. Prag odražava minimalnu razinu signala iznad koje će identificirani pik biti označen u tablici rezultata te određuje potrebnu granicu detekcije (engl. *Limit of Detection*, LOD) koja podržava odgovarajuću detekciju svih vrhova na ili iznad definirane razine praga. U postavkama software zadani prag iznosi 5% od signala najvećeg pika u uzorku, no moguća je izmjena vrijednosti u skladu s potrebama laboratorija. Vrijednost praga treba biti viša od LOD-a specifičnog za uzorak. Ako je vrijednost praga unutar raspona signala i šuma uzorka, uzorak zadovoljava kriterije kontrole kvalitete (engl. *Quality Control*, QC) i svi aleli iznad *cutoff* vrijednosti bit će izviješteni u rezultatima. Uzorci s niskom kvalitetom signala rezultiraju smanjenim LOD-om. U slučaju kad je vrijednost LOD-a veća od vrijednosti praga, uzorci neće zadovoljiti QC zbog nedostatka alela niske razine signala (Asuragen, 2015).

Nakon završene kapilarne elektroforeze, instrument za kapilarnu elektroforezu konvertira podatke u .fsa datoteke koje je potrebno učitati u AmplideX Reporter software za analizu. Takve datoteke sadrže informaciju o lokaciji uzoraka u pojedinim kivetama ili mikrotitarskim pločicama te o vrsti korištenog instrumenta. Podaci o spolu unose se ručno za svaki uzorak te pružaju pomoćnu informaciju radi li se o hemizigotnom uzorku što je slučaj kod muškaraca s obzirom da imaju samo jedan X kromosom. Software koristi algoritam za analizu .fsa datoteka kapilarne elektroforeze koji omogućuje automatsko skaliranje i podešavanje neobrađenih podataka kapilarne elektroforeze, automatiziranu procjenu kvalitete signala i nepravilnosti

signala u uzorku i ljestvici kalibracije, automatizirano otkrivanje značajnih FMR1 alela te automatizirano određivanje veličine i kategoričku klasifikaciju svih otkrivenih FMR1 alela. Generirane analitičke informacije specifične su za svaki uzorak. Kategorička klasifikacija podrazumijeva svrstavanje alela u kategorije u skladu s brojem ponavljanja CGG tripleta. Normalnom rasponu pripadaju aleli s 5-44 CGG ponavljanja, intermedijarnom rasponu aleli s 45-54 ponavljanja, premutaciji aleli s 55-200 ponavljanja, dok punoj mutaciji pripadaju aleli s <200 CGG ponavljanja (Asuragen, 2016).

Broj CGG ponavljanja u vrhu pika svakog alela dobiva se iz broja parova baza oduzimanjem veličine ne-CGG ponavljanja iz PCR produkta i dijeljenjem relativnom veličinom područja CGG ponavljanja. Pritom se koristi jednaka jednadžba kao i kod analize pomoću GeneMapper software-a. Veličina pika konvertira se u broj CGG tripleta prema jednadžbi:

$$CGG_i = \frac{Pik_i - c_0}{m_0}$$

gdje je Pik_i veličina pika alela od interesa u parovima baza; c_0 je korekcijski faktor veličine; i je korekcijski faktor mobilnosti za svako CGG ponavljanje. Korekcijski faktori ovise o instrumentu, vrsti polimera, duljini kapilare i uvjetima rada te se mogu razlikovati od laboratorija do laboratorija. Software automatski izračunava broj CGG ponavljanja uzimajući u obzir i CGG profil i ROX ljestvicu veličine. Veličina amplikona derivira u usporedbi s internim standardom veličine (ROX ljestvicom) injiciranim sa svakim uzorkom. S obzirom na broj CGG ponavljanja, software svrstava alele u odgovarajuće kategorije na temelju čega se određuje genotip pacijenata. Veličina alela izvještava se prema referentnom rasponu. U uzorku s više pikova, označava se alel najvećeg pika (Asuragen, 2016).

Za svaki određeni pik, software prikazuje veličinu fragmenta u broju parova baza i CGG tripleta, te intenzitet fluorescencije u samom vrhu pika u RFU uz napomenu je li alel automatski određen pomoću software ili je ručno određen. Također, korisnik može svakom uzorku dodati komentar (Asuragen, 2016).

Na Slici 9 prikazani su rezultati analize na AmplideX Reporter softwareu koji za svaki uzorak pruža informacije o oznaci uzorka pacijenta, pripadajućoj seriji analize, spolu pacijenta, genotipu (normalan, intermedijaran, premutacijski, mutacijski) te statusu kontrole kvalitete. U svrhu utvrđivanja je li kontrola kvalitete zadovoljavajuća, software prati sljedeće parametre: magnitudu signala, status internog standarda (ROX ljestvica), stupanj kontaminacije, osjetljivost te status analiziranih pozitivnih kontrola.

Sample Overview

Sample:
Batch:
Project:
Operator:
Date Analyzed:

Process Control:
Sensitivity Control:

Analysis Settings

Minor Allele Frequency: .05
Show All Peaks: Yes

Sample Details

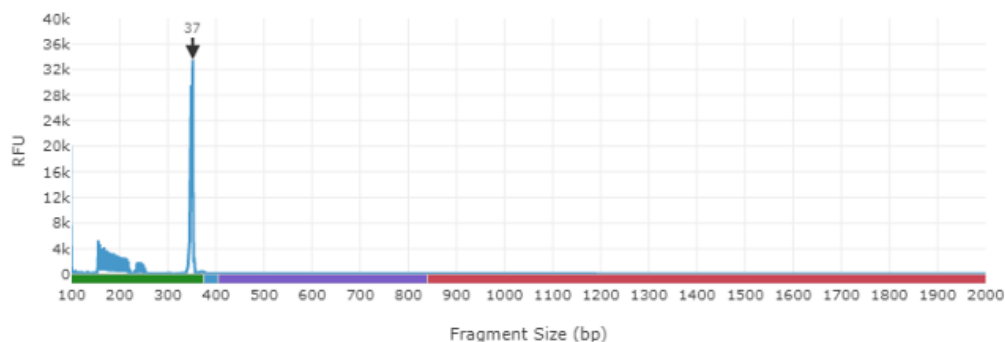
Genotype Category: Normal
Gender: Male
Edited: No
Overall QC Status: AT RISK
Marked for Rerun: True

Quality Controls

Ladder QC: PASS
Signal Magnitude QC: PASS
Sensitivity QC: PASS
Contamination QC: PASS
Controls QC: FAIL

Results

Raw CE Data



Genotype Report

| Peak | Size (Base Pairs) | Size (CGG Repeats) | RFU | Automatic Call |
|--------|-------------------|--------------------|-------|----------------|
| Peak 1 | 352 | 37 | 32720 | Yes |

Comments

Slika 9. Elferogram dobiven na AmplideX Reporter softwareu. Osim elferograma, software prikazuje i druge podatke relevantne za interpretaciju rezultata analize. Prikazan je elferogram muškog pacijenta s normalnim alelom veličine 352 pb, odnosno 37 CGG tripleta.

Magnituda signala ukazuje je li signal dovoljno jak za određivanje veličine. Analiza se temelji na profilu ponavljanja za utvrđivanje veličine, stoga signali s profilom ponavljanja koji se ne može jasno razlikovati od pozadinskog šuma instrumenta predstavljaju rizik za netočno određivanje veličine pika. Kontrola nije zadovoljavajuća kod niskog ili nedetektiranog signala. U tom slučaju potrebno je povećati količinu DNA te ponoviti analizu uzorka. Nezadovoljavajuća kontrola kvalitete internog standarda moguća je ukoliko interni standard

nedostaje u uzorku ili je abnormalan, gdje derivirani oblik ljestvice nije u skladu s očekivanim ili u uzorcima u kojima se korekcijski faktori ne mogu pouzdano odrediti. Potrebno je ponoviti analizu uzorka kako ne bi došlo do pogrešnog određivanja veličine pika uslijed pojave neočekivanih abnormalnih pikova u ROX kanalu koji su veličinom i oblikom slični očekivanim pikovima ROX ljestvice. Software prepoznaje kontaminaciju kao neočekivane i abnormalne signale artefakata uslijed neadekvatne pripreme uzorka. Nepotpuna denaturacija može otežati analizu i dovesti do netočnog određivanja veličine. Uzorke kod kojih je detektirano jedan ili više kontaminacijskih pikova potrebno je ponovno analizirati. U uzorcima s nezadovoljavajućom kontrolom kvalitete za magnitudu signala, internog standarda i stupnja kontaminacije software ne određuje genotip. Kod nedovoljne osjetljivosti, definirana *cutoff* vrijednost za određivanje veličine pika manja je od LOD vrijednosti. Rezultate analize potrebno je tumačiti s oprezom jer potencijalno nedostaju aleli niske frekvencije. Kontrola osjetljivosti omogućava korisnicima prilagodbu količine analizirane DNA u svrhu detekcije alela niske frekvencije na očekivanim pozicijama. U slučaju nedovoljne osjetljivosti moguće je ručno odrediti pikove alela na elferogramu. Prilikom analize svake serije uzoraka potrebno je analizirati i dvije pozitivne kontrole: radnu kontrolu (engl. *Process Control*, PC) i kontrolu osjetljivosti (engl. *Sensitivity Control*, SC). PC sadrži pikove koji obuhvaćaju cijeli raspon FMR1 genotipova, dok SC sadrži niskofrekventne mutacijske alele za procjenu analitičke osjetljivosti. Analiza kontrolnih uzoraka nije zadovoljavajuća ukoliko očekivani pikovi nisu unutar preciznih granica ili su detektirani neočekivani pikovi. u tom slučaju potrebno je ponoviti analizu cijele serije. Međutim, u uzorcima s nezadovoljavajućom osjetljivošću i rezultatima analize PC i SC software određuje genotip uzoraka (Asuragen, 2023).

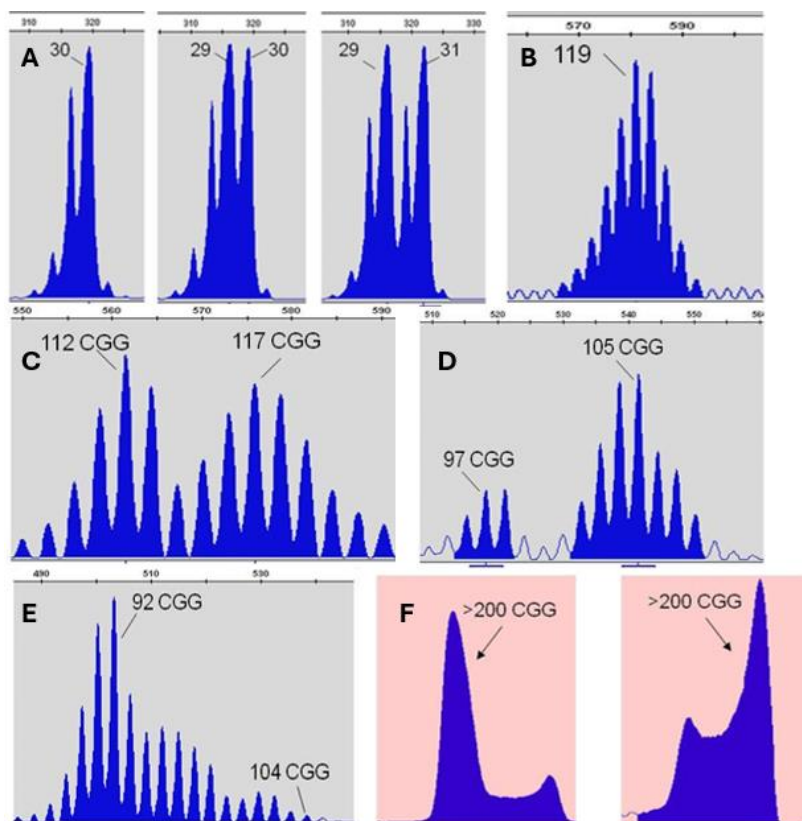
Zadovoljavajući ukupni status kontrole kvalitete (oznaka *Pass*) upućuje da su analizom detektirani svi aleli do *cutoff* vrijednost, tj. praga za određivanje pikova. Oznaka *At Risk* upućuje da su analizom detektirani neki aleli, no zbog slabog signala uzorka moguće je da software nije detektirao neke alele. Uzorak ne zadovoljava kontrolu kvalitete (oznaka *Fail*) ukoliko su ukupni signal i/ili interni standard nedovoljni ili abnormalni. Uzorke koji ne zadovolje kontrolu kvalitete software automatski označava kao potrebne za ponavljanja analize (Asuragen, 2023).

4 REZULTATI

U ovom diplomskom radu napravljena je usporedba rezultata 129 uzoraka pacijenata te jednog negativnog kontrolnog uzorka u programima GeneMapper i AmplideX Reporter software. Analizirani uzorak negativne kontrole je uzorak pacijenta s normalnim genotipom.

Nakon detekcije kapilarnom elektroforezom, PCR produkti iz uzorka svakog pacijenta analizirani su pomoću GeneMapper i AmplideX Reporter softwarea. Veličina pikova u broju parova baza određena je usporedbom broja parova baza pikova uzorka s pikovima internog standarda pomoću kalibracijske krivulje. Svi aleli u rasponu 5-200 CGG ponavljanja izvješćuju se točnim brojem tripleta dok se aleli >200 ponavljanja identificiraju kao >200 CGG tripleta.

Primjena GeneMapper softwarea zahtijeva manualnu identifikaciju pika koji odgovara alelu. Pritom je potrebno držati se sljedećih smjernica. Ukoliko je pik veličine u rasponu 245-400 pb ili ima karakteristike normalnog i intermedijarnog alela, potrebno je označiti najviši pik koji je obično na najdesnijoj poziciji u navedenom rasponu. Moguća je i prisutnost više pikova u normalnom rasponu (npr. 30 ili 29,30 ili 30,31 CGG) (Slika 10A). Pikove veličine 400-820 pb pripadaju premutacijskim alelima. Ukoliko premutacijski alel sadrži populaciju pika manju od 8 pikova od središnjeg pika do kraja, označava se najviši pik (npr. 119 CGG) (Slika 10B). Premutacijski aleli mogu sadržavati kompleksnu distribuciju pikova te se, u tom slučaju, označavaju središnji pikovi dviju skupina alela. Ako pikovi između alela premašuju *cutoff* vrijednost signala, potrebno je identificirati obje grupe pisanjem broja tripleta sa spojnicom (npr. 112-117 CGG) (Slika 10C). Ako pikovi između alela ne premašuju *cutoff* vrijednost signala, tj. manji su od 50 RFU, aleli se mogu identificirati kao različiti aleli pisanjem zareza (npr. 97, 105 CGG) (Slika 10D). Za alele koji imaju više od 8 pikova od središnjeg do kraja, potrebno je označiti središnji pik i zadnji pik koji je veći od 50 RFU, odnosno premašuje *cutoff* (npr. 92-104 CGG) (Slika 10E). Ukoliko su pikovi veličine >820 pb radi se o mutacijskim alelima. U tom slučaju, označava se samo komponenta grupe pikova koja sadrži najviši pik. Označeni pik identificira se kao >200 CGG (Slika 10F) (Asuragen, 2016).



Slika 10. Prikaz primjera elferograma prema kategorijama ponavljanja tripleta za FMR1 gen. Elferograma s alelima u normalnom rasponu (A). Premutacijski alel s više pikova na elferogramu (B, C, D, E). Pikovi alela s punom mutacijom (F).

Za preračunavanje veličine alela iz broja parova baza u broj CGG ponavljanja koristi se sljedeća formula:

$$CGG_i = \frac{Pik_i - c_0}{m_0}$$

gdje c_0 iznosi 232,6 te m_0 iznosi 2,962. Kod primjene GeneMapper softwarea potrebno je izračunati broj CGG tripleta preko navedene formule, dok AmplideX Reporter software automatski izračunava broj CGG ponavljanja korištenjem iste formule uzimajući u obzir i ROX ljestvicu. Genotip se određuje u skladu s *American College of Medical Genetics and Genomics* smjernicama za normalne (5-44 CGG ponavljanja), intermedijarne (45-54 CGG ponavljanja), premutacijske (55-200 CGG ponavljanja) te alele s punom mutacijom (<200 CGG ponavljanja) (Spector i sur., 2021). AmplideX Reporter software automatski određuje genotip pacijenta na temelju izračunatog broja ponavljanja, dok kod uporabe GeneMapper softwarea za

dijagnostiku FXS odgovoran laboratorijski djelatnik na temelju izračunatog broja CGG ponavljanja određuje genotip pacijenta.

U Tablici 1 nalaze se rezultati analize 130 uzorka u programima GeneMapper software i Amplidex Reporter software. Od ukupnog broja analiziranih uzoraka, 129 uzoraka jesu uzorci pacijenata te je jedan negativan kontrolni uzorak. S obzirom da je pomoću AmplideX Reporter softwarea identificiran veći broj pikova, u tablici se oni ne navode kao aleli. Oznaka „ / “ označava da nedostaju podaci o broju pb za posljednja tri uzorka te za uzorak 12274 zbog neuspjele detekcije alela i interpretacije rezultata analize uslijed nezadovoljavajuće kontrole kvalitete na AmplideX Reporter softwareu.

Od 129 uzoraka pacijenata, analizirano je 76 uzoraka žena i 53 uzoraka muškaraca. Homozigotne žene s alelima iste veličine i muškarci imaju jedan pik na elferogramu, dok heterozigotne žene s dva različita alela imaju dva pika. Prema dobivenim rezultatima, 105 uzoraka pacijenata ima normalan genotip, što znači da oba alela kod žena te jedan alel kod muškaraca sadrži broj CGG ponavljanja u normalnom rasponu. Intermedijarni aleli uočeni su u 3 uzoraka, od toga su 2 muška uzoraka te 1 ženski uzorak s jednim alelom u intermedijarnom, a drugim u normalnom rasponu. Premutacijski aleli uočeni su u 8 uzoraka, s time da je 1 muški uzorak, a 7 ženskih uzoraka s jednim alelom u premutacijskom te jednim u normalnom rasponu. Aleli s punom mutacijom dokazani su u 9 analiziranih uzoraka, od čega je 7 muških uzoraka što znači da je riječ o pacijentima oboljelih od FXS te 2 ženska uzoraka s jednim mutacijskim i jednim normalnim alelom. Mozaicizam je utvrđen u 3 analizirana uzorka. Jedan je uzorak pacijentice 12740 s jednim alelom u normalnom te dva alela u premutacijskom rasponu. Druga dva uzorka jesu uzorci pacijenata 13324 i 13237. Oba pacijenta imaju jedan premutacijski i jedan mutacijski alel.

Tablica 1. Rezultati analize uzoraka na GeneMapper i AmplideX Reporter softwareu

| Redni broj | Broj uzorka | GeneMapper Software | | | | | | Amplidex Reporter Software | | | | | |
|------------|-------------|---------------------|---------|----------|----------|---------|---------|----------------------------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | | Alel 1 | Alel 2 | Alel 1 | Alel 2 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 |
| | | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG |
| 1 | 9483 | 317 | 323 | 28 | 30 | 327 | 333 | | | 29 | 31 | | |
| 2 | 12340 | 340 | | 36 | | 347 | 351 | | | 36 | 37 | | |
| 3 | 12371 | 320 | 324 | 30 | 31 | 325 | 329 | | | 28 | 30 | | |
| 4 | 12456 | 355 | 1022 | 41 | 266 | 364 | 365 | 1042 | | 41 | 42 | >200 | |
| 5 | 12461 | 323 | | 30 | | 331 | 334 | | | 30 | 31 | | |
| 6 | 12466 | 291 | 330 | 20 | 33 | 298 | 340 | | | 19 | 33 | | |
| 7 | 12472 | 1022 | | >200 | | 1044 | | | | >200 | | | |
| 8 | 12646 | 289 | 289 | 19 | 19 | 301 | 301 | | | 20 | 20 | | |
| 9 | 12652 | 321 | 332 | 30 | 34 | 330 | 339 | 342 | | 30 | 33 | 34 | |
| 10 | 12656 | 1029 | | 269 | | 1052 | | | | >200 | | | |
| 11 | 12666 | 321 | 324 | 30 | 31 | 330 | 333 | | | 30 | 31 | | |
| 12 | 12671 | 320 | 320 | 30 | 30 | 330 | 330 | | | 30 | 30 | | |
| 13 | 12674 | 321 | 330 | 30 | 33 | 330 | 340 | | | 30 | 33 | | |
| 14 | 12687 | 318 | 326 | 29 | 32 | 327 | 336 | | | 29 | 32 | | |
| 15 | 12694 | 303 | 455 | 24 | 75 | 311 | 468 | | | 24 | 76 | | |
| 16 | 12695 | 318 | 536 | 29 | 102 | 327 | 550 | | | 29 | 103 | | |
| 17 | 12703 | 321 | 326 | 30 | 32 | 330 | 336 | | | 30 | 32 | | |
| 18 | 12725 | 321 | 321 | 30 | 30 | 330 | 330 | | | 30 | 30 | | |
| 19 | 12740 | 318 | 504 | 29 | 91 | 326 | 516 | 532 | | 29 | 92 | 97 | |
| 20 | 12744 | 321 | | 30 | | 330 | | | | 30 | | | |

| Redni broj | Broj uzorka | GeneMapper Software | | | | | | AmplideX Reporter Software | | | | | |
|------------|-------------|---------------------|---------|----------|----------|---------|---------|----------------------------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | | Alel 1 | Alel 2 | Alel 3 | Alel 4 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 |
| | | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG |
| 21 | 12747 | 292 | | 20 | | 299 | 370 | | | 20 | 43 | | |
| 22 | 12325 | 317 | 320 | 28 | 29 | 330 | 330 | | | 30 | 30 | | |
| 23 | 12329 | 317 | 352 | 29 | 40 | 325 | 363 | | | 28 | 41 | | |
| 24 | 12333 | 340 | | 36 | | 352 | | | | 37 | | | |
| 25 | 12351 | 317 | 320 | 28 | 29 | 330 | 330 | | | 30 | 30 | | |
| 26 | 12352 | 311 | 320 | 26 | 30 | 321 | 330 | 333 | | 27 | 30 | 31 | |
| 27 | 12373 | 291 | 294 | 20 | 21 | 301 | 301 | | | 20 | 20 | | |
| 28 | 12375 | 329 | 363 | 33 | 44 | 339 | 376 | | | 33 | 45 | | |
| 29 | 12385 | 320 | 460 | 30 | 77 | 330 | 474 | | | 30 | 78 | | |
| 30 | 12395 | 317 | 338 | 29 | 35 | 327 | 348 | | | 29 | 36 | | |
| 31 | 12407 | 317 | 317 | 29 | 29 | 324 | 326 | | | 28 | 29 | | |
| 32 | 12414 | 320 | 326 | 30 | 32 | 330 | 336 | | | 30 | 32 | | |
| 33 | 12415 | 318 | 318 | 29 | 29 | 327 | 327 | | | 29 | 29 | | |
| 34 | 12586 | 352 | | 40 | | 364 | | | | 41 | | | |
| 35 | 12591 | 300 | 359 | 23 | 43 | 308 | 367 | 369 | | 23 | 42 | 43 | |
| 36 | 12592 | 359 | | 43 | | 364 | 370 | | | 41 | 43 | | |
| 37 | 12600 | 320 | | 29 | | 330 | | | | 30 | | | |
| 38 | 12601 | 299 | | 22 | | 306 | | | | 22 | | | |
| 39 | 12604 | 323 | | 31 | | 334 | | | | 31 | | | |
| 40 | 12605 | 320 | | 29 | | 330 | | | | 30 | | | |

| Redni broj | Broj uzorka | GeneMapper Software | | | | | | AmplideX Reporter Software | | | | | |
|------------|-------------|---------------------|---------|----------|----------|---------|---------|----------------------------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | | Alel 1 | Alel 2 | Alel 3 | Alel 4 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 |
| | | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG |
| 41 | 12607 | 324 | | 31 | | 333 | | | | 31 | | | |
| 42 | 12608 | 300 | 321 | 23 | 30 | 309 | 331 | | | 23 | 30 | | |
| 43 | 12609 | 291 | | 20 | | 300 | | | | 20 | | | |
| 44 | 12612 | 347 | | 39 | | 357 | | | | 39 | | | |
| 45 | 12613 | 318 | 324 | 29 | 31 | 327 | 333 | | | 29 | 31 | | |
| 46 | 12616 | 321 | | 30 | | 331 | | | | 30 | | | |
| 47 | 12617 | 321 | | 30 | | 330 | | | | 30 | | | |
| 48 | 12623 | 320 | | 30 | | 330 | | | | 30 | | | |
| 49 | 12624 | 300 | | 23 | | 310 | | | | 23 | | | |
| 50 | 12625 | 321 | 347 | 30 | 39 | 327 | 330 | 354 | 357 | 29 | 30 | 38 | 39 |
| 51 | 12627 | 321 | | 30 | | 331 | | | | 30 | | | |
| 52 | 12631 | 321 | | 30 | | 331 | | | | 30 | | | |
| 53 | 12632 | 321 | | 30 | | 331 | | | | 30 | | | |
| 54 | 12653 | 479 | | 83 | | 491 | | | | 84 | | | |
| 55 | 12754 | 321 | 321 | 30 | 30 | 327 | 331 | | | 29 | 30 | | |
| 56 | 12755 | 310 | 351 | 26 | 40 | 314 | 317 | 360 | | 25 | 26 | 40 | |
| 57 | 12760 | 293 | 327 | 20 | 32 | 300 | 336 | | | 20 | 32 | | |
| 58 | 12761 | 322 | 322 | 30 | 30 | 331 | 331 | | | 30 | 30 | | |
| 59 | 12762 | 319 | 328 | 29 | 32 | 327 | 336 | | | 29 | 32 | | |
| 60 | 12767 | 342 | | 37 | | 352 | | | | 37 | | | |

| Redni broj | Broj uzorka | GeneMapper Software | | | | | | AmplideX Reporter Software | | | | | |
|------------|-------------|---------------------|---------|----------|----------|---------|---------|----------------------------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | | Alel 1 | Alel 2 | Alel 3 | Alel 4 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 |
| | | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG |
| 61 | 12656 | 1023 | | >200 | | 1042 | | | | >200 | | | |
| 62 | 12694 | 304 | 456 | 24 | 75 | 311 | 468 | | | 24 | 76 | | |
| 63 | 12695 | 319 | 537 | 29 | 103 | 327 | 549 | | | 29 | 103 | | |
| 64 | 12740 | 319 | 505 | 29 | 92 | 327 | 514 | 531 | | 29 | 91 | 97 | |
| 65 | 12653 | 479 | | 83 | | 490 | | | | 83 | | | |
| 66 | 12244 | 309 | 318 | 26 | 29 | 317 | 326 | | | 26 | 29 | | |
| 67 | 12253 | 320 | 320 | 30 | 30 | 327 | 330 | | | 29 | 30 | | |
| 68 | 12267 | 300 | 341 | 23 | 36 | 305 | 351 | | | 22 | 37 | | |
| 69 | 12274 | 323 | | 31 | | / | | | | / | | | |
| 70 | 12281 | 320 | 323 | 30 | 31 | 333 | 333 | | | 31 | 31 | | |
| 71 | 12291 | 319 | 319 | 29 | 29 | 330 | 330 | | | 30 | 30 | | |
| 72 | 12298 | 370 | | 46 | | 378 | | | | 46 | | | |
| 73 | 12303 | 1395 | | >200 | | 1056 | | | | >200 | | | |
| 74 | 12304 | 320 | 326 | 30 | 32 | 327 | 329 | 333 | | 29 | 30 | 31 | |
| 75 | 12248 | 300 | 318 | 23 | 29 | 307 | 326 | | | 22 | 29 | | |
| 76 | 12321 | 320 | 320 | 30 | 30 | 327 | 330 | | | 29 | 30 | | |
| 77 | 12322 | 321 | 321 | 30 | 30 | 327 | 327 | | | 29 | 29 | | |
| 78 | 12244 | 308 | 317 | 26 | 29 | 318 | 327 | | | 26 | 29 | | |
| 79 | 12267 | 299 | 342 | 22 | 37 | 305 | 348 | 351 | | 22 | 36 | 37 | |
| 80 | 12281 | 320 | 324 | 30 | 31 | 329 | 329 | | | 30 | 30 | | |

| Redni broj | Broj uzorka | GeneMapper Software | | | | | | AmplideX Reporter Software | | | | | |
|------------|-------------|---------------------|---------|----------|----------|---------|---------|----------------------------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | | Alel 1 | Alel 2 | Alel 3 | Alel 4 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 |
| | | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG |
| 81 | 12291 | 320 | 320 | 29 | 29 | 327 | 330 | | | 29 | 30 | | |
| 82 | 12298 | 370 | | 46 | | 378 | | | | 46 | | | |
| 83 | 12303 | 1025 | | >200 | | 1043 | | | | >200 | | | |
| 84 | 12248 | 301 | 318 | 23 | 29 | 308 | 326 | | | 23 | 29 | | |
| 85 | 12321 | 321 | 321 | 30 | 30 | 327 | 330 | | | 29 | 30 | | |
| 86 | 12776 | 320 | 326 | 30 | 32 | 327 | 331 | 333 | | 29 | 30 | 31 | |
| 87 | 12796 | 318 | 324 | 29 | 31 | 327 | 330 | | | 29 | 30 | | |
| 88 | 12806 | 321 | 329 | 30 | 33 | 330 | 339 | | | 30 | 33 | | |
| 89 | 12811 | 318 | 370 | 29 | 46 | 327 | 382 | | | 29 | 47 | | |
| 90 | 12828 | 321 | 321 | 30 | 30 | 329 | 329 | | | 30 | 30 | | |
| 91 | 12829 | 327 | | 32 | | 336 | | | | 32 | | | |
| 92 | 12830 | 347 | | 39 | | 354 | 358 | | | 38 | 39 | | |
| 93 | 12832 | 321 | 321 | 30 | 30 | 330 | 330 | | | 30 | 30 | | |
| 94 | 12836 | 327 | | 32 | | 337 | | | | 32 | | | |
| 95 | 12850 | 322 | | 30 | | 327 | 330 | | | 29 | 30 | | |
| 96 | 12857 | 292 | 341 | 20 | 37 | 299 | 351 | | | 20 | 37 | | |
| 97 | 12864 | 341 | | 37 | | 349 | 351 | | | 36 | 37 | | |
| 98 | 12868 | 301 | 324 | 23 | 31 | 309 | 334 | 365 | | 23 | 31 | 42 | |
| 99 | 12870 | 321 | 329 | 30 | 33 | 330 | 340 | | | 30 | 33 | | |
| 100 | 12873 | 348 | | 39 | | 355 | 357 | | | 38 | 39 | | |

| Redni broj | Broj uzorka | GeneMapper Software | | | | | | AmplideX Reporter Software | | | | | |
|------------|-------------|---------------------|---------|----------|----------|---------|---------|----------------------------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | | Alel 1 | Alel 2 | Alel 3 | Alel 4 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 |
| | | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG |
| 101 | 12863 | 321 | 336 | 30 | 35 | 330 | 346 | | | 30 | 35 | | |
| 102 | 12303 | 1034 | | >200 | | 1055 | | | | >200 | | | |
| 103 | 12881 | 321 | 353 | 30 | 41 | 330 | 363 | | | 30 | 41 | | |
| 104 | 12893 | 321 | 321 | 30 | 30 | 330 | 330 | | | 30 | 30 | | |
| 105 | 12897 | 321 | | 30 | | 299 | 300 | | | 20 | 30 | | |
| 106 | 12899 | 301 | 304 | 23 | 24 | 308 | 312 | | | 23 | 24 | | |
| 107 | 12907 | 321 | 321 | 30 | 30 | 330 | 330 | | | 30 | 30 | | |
| 108 | 12910 | 336 | | 35 | | 308 | 345 | | | 23 | 35 | | |
| 109 | 12922 | 322 | 324 | 30 | 31 | 299 | 330 | 333 | | 20 | 30 | 31 | |
| 110 | 12925 | 353 | | 41 | | 299 | 363 | | | 20 | 41 | | |
| 111 | 12935 | 318 | 321 | 29 | 30 | 326 | 326 | | | 29 | 29 | | |
| 112 | 12936 | 292 | 1019 | 20 | 266 | 299 | 2040 | | | 20 | >200 | | |
| 113 | 12953 | 344 | | 38 | | 355 | | | | 38 | | | |
| 114 | 12955 | 347 | | 39 | | 355 | 358 | | | 38 | 39 | | |
| 115 | 12960 | 298 | 301 | 22 | 23 | 305 | 308 | 351 | | 22 | 23 | 37 | |
| 116 | 12962 | 318 | 362 | 29 | 44 | 326 | 372 | | | 29 | 44 | | |
| 117 | 12967 | 318 | 318 | 29 | 29 | 328 | 328 | | | 29 | 29 | | |
| 118 | 12979 | 301 | | 23 | | 309 | | | | 23 | | | |
| 119 | 12981 | 321 | | 30 | | 299 | 330 | | | 20 | 30 | | |
| 120 | 12984 | 327 | | 32 | | 299 | 333 | 336 | | 20 | 31 | 32 | |

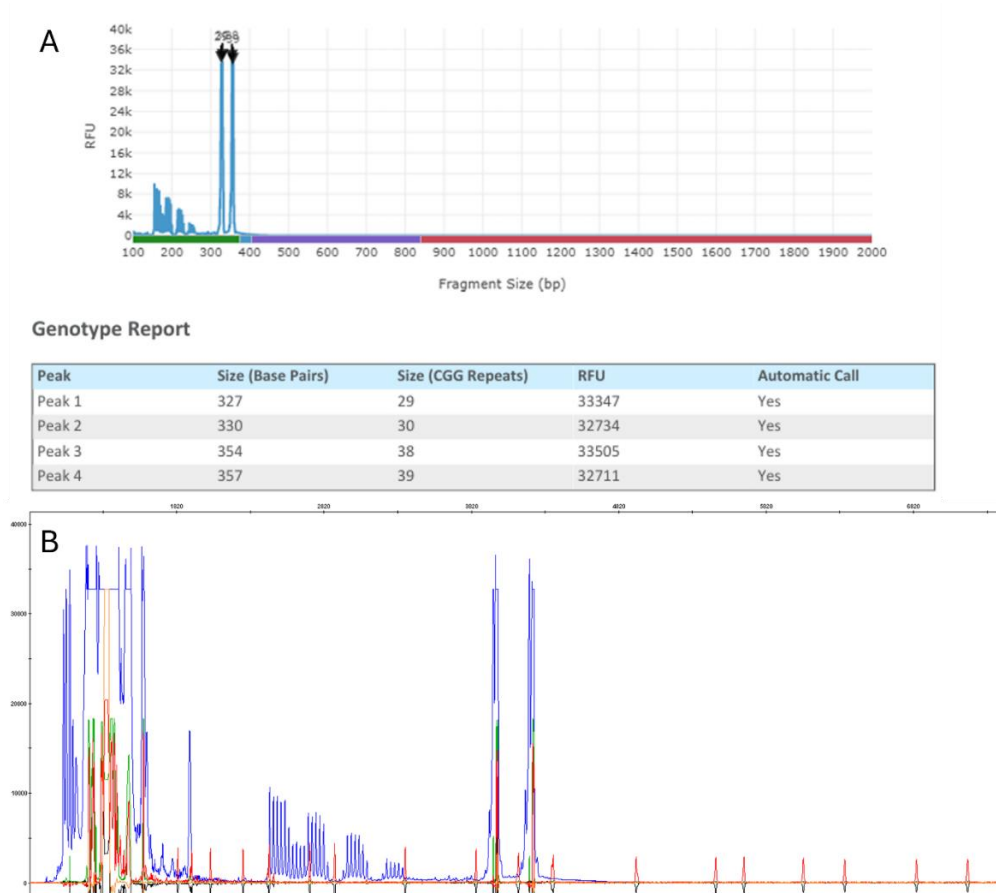
| Redni broj | Broj uzorka | GeneMapper Software | | | | AmplideX Reporter Software | | | | | | | |
|------------|---------------------|---------------------|---------|----------|----------|----------------------------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
| | | Alel 1 | Alel 2 | Alel 3 | Alel 4 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 | Pik 1 | Pik 2 | Pik 3 | Pik 4 |
| | | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj pb | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG | Broj CGG |
| 121 | 12985 | 321 | | 30 | | 331 | | | | 30 | | | |
| 122 | 12986 | 321 | | 30 | | 330 | | | | 30 | | | |
| 123 | 12990 | 357 | | 42 | | 367 | | | | 42 | | | |
| 124 | 12991 | 320 | | 29 | | 328 | | | | 29 | | | |
| 125 | 12993 | 319 | | 29 | | 327 | | | | 29 | | | |
| 126 | 13323 | 324 | 580 | 31 | 117 | 333 | 593 | | | 31 | 118 | | |
| 127 | 13324 | 564 | / | 112 | >200 | 576 | 1043 | | | 112 | >200 | | |
| 128 | 13237 | / | / | 77 | >200 | 473 | 1042 | | | 78 | >200 | | |
| 129 | 13319 | / | / | >200 | | 1051 | | | | | >200 | | |
| 130 | 12254 NEG. KONTROLA | 291 | 317 | 20 | 29 | 298 | 328 | | | 19 | 29 | | |

U 41 uzorku uočena je razlika u broju CGG ponavljanja između dva programa. Broj CGG ponavljanja u tim uzorcima razlikuje se za jedan CGG triplet u barem jednom alelu, dok je u trima uzorcima pronađena razlika u broju dva CGG tripleta u jednom od alela. Razlika u broju CGG tripleta pronađena je u 30 uzoraka s normalnim alelima, 1 uzorku s intermedijarnim alelom i 9 uzoraka s premutacijskim alelom. Uočene razlike predstavljaju problem prilikom određivanja zigotnosti žena, tj. je li pacijentica homozigot ili heterozigot za FMR1 gen. Kod pacijentice koja je prema rezultatima GeneMapper softwarea homozigot, zbog razlike u broju CGG tripleta u jednom alelu u AmplideX Reporter softwareu navodi se kao heterozigot. Također vrijedi i obrnuto. Takav je slučaj kod 12 analiziranih uzoraka pacijentica s oba alela u normalnom rasponu. Također, razlike u broju tripleta, iako male, mogu uzrokovati različitu klasifikaciju alela s graničnim brojem CGG ponavljanja za određenu kategoriju. Nepodudarnost klasifikacije alela zbog razlike u broju tripleta uočena je jedino u uzorku pacijentice 12375 gdje razlika u broju jednog CGG tripleta u jednom alelu dovodi do različite kategorizacije tog alela. Analizom u GeneMapper softwareu dobivena je veličina alela od 44 CGG tripleta što je u rasponu normalnih alela (5 do 44 CGG tripleta), dok rezultat analize pomoću AmplideX Reporter softwarea ukazuje na alel veličine 45 CGG tripleta što pripada intermedijarnom rasponu alela (45 do 54 CGG tripleta).

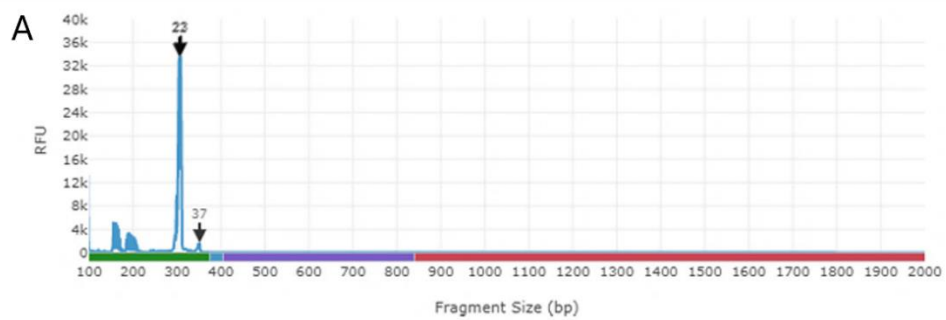
U 19 uzoraka pacijenata, odnosno u 15% analiziranih uzoraka uočen je tzv. *splitting* ili razdvajanje alela u AmplideX Reporter softwareu kada, umjesto jednog pika, software identificira dva pika s razlikom u broju do nekoliko CGG tripleta. Naveden je primjer heterozigotne pacijentice s rascjepom alela zbog čega je automatskom detekcijom na AmplideX Reporter softwareu određeno četiri alela (Slika 11A), dok su pomoću GeneMapper softwarea određena dva alela (Slika 11B).

Analizom uzoraka pomoću AmplideX Reporter softwarea uočeni su dodatni pikovi koji nisu uočeni prilikom analize na GeneMapper softwareu. Budući da se za analizu koriste jednake .fsa datoteke, potrebno je odrediti razlog nepodudarnih rezultata analize navedenih softwarea. Dodatni pikovi pronađeni su u 11 uzoraka pomoću AmplideX Reporter softwarea te se nalaze u rasponu visine 744-8239 RFU i veličine 20-43 CGG ponavljanja. To su uzorci 12747, 12897, 12910, 12922, 12925, 12960, 12981, 12984, 12868 te uzorak 12740 koje je analiziran dva puta. Potrebno je utvrditi kliničku važnost dodatnih pikova. Prikazan je primjer heterozigotne pacijentice 12960 s alelima ponavljajuće regije od 22 i 23 CGG ponavljanja (Slika 12). Rezultat analize uspoređen je na AmplideX Reporter (Slika 12A) i GeneMapper softwareu (Slika 12B). Analizom uzorka na oba programa vidljiv je dodatan malen pik desno od predominantnih

pikova. AmplideX Reporter software automatski je detektirao dodatan pik, dok ručnom analizom u GeneMapper softwareu piku nije pridonijet nikakav značaj. Nadalje, analizom uzorka pacijentice (12740) automatskom detekcijom na AmplideX Reporter softwareu identificirana su tri alela, jedan normalan alel veličine 29 CGG i dva u premutacijskom rasponu veličine 92 i 97 CGG (Slika 13A). Ponovljena analiza dala je rezultate jednakog kliničkog značaja (Slika 13C). Analizom rezultata pomoću GeneMapper softwarea nije identificiran dodatan pik u premutacijskom rasponu, već su određena dva pika, jedan normalan veličine 29 CGG i jedan premutacijski veličine 92 alela (Slika 13B i 13D). Međutim, uzorak je mozaičan. Pacijentica ima premutaciju te prezentira dvije različite populacije stanica, obje u premutacijskom rasponu.

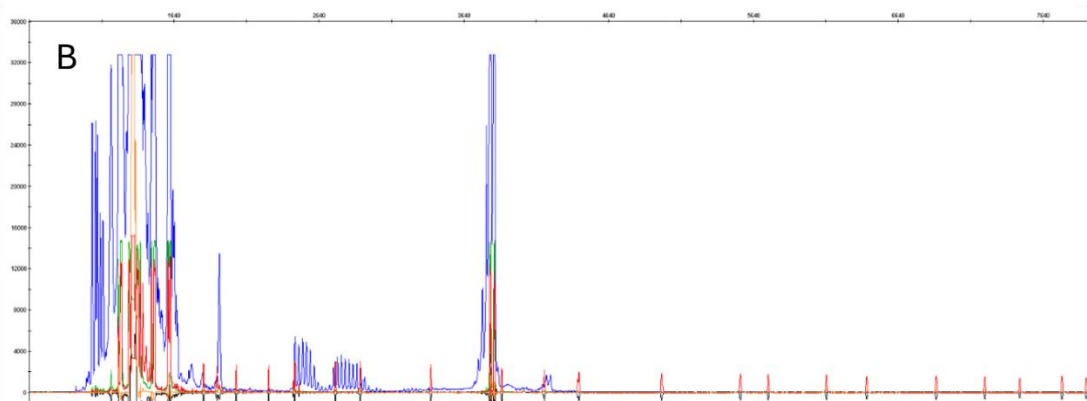


Slika 11. Rascjep alela uočen automatskom detekcijom na AmplideX Reporter softwareu (A). Prikazani su rezultati analize uzorka heterozigotne pacijentice (12625). Elferogram dobiven na GeneMapper softwareu normalnog je izgleda te su jasno vidljiva dva dominantna pika (B). U skladu sa smjernicama, odabrani su pikovi najveće visine kao klinički značajni.

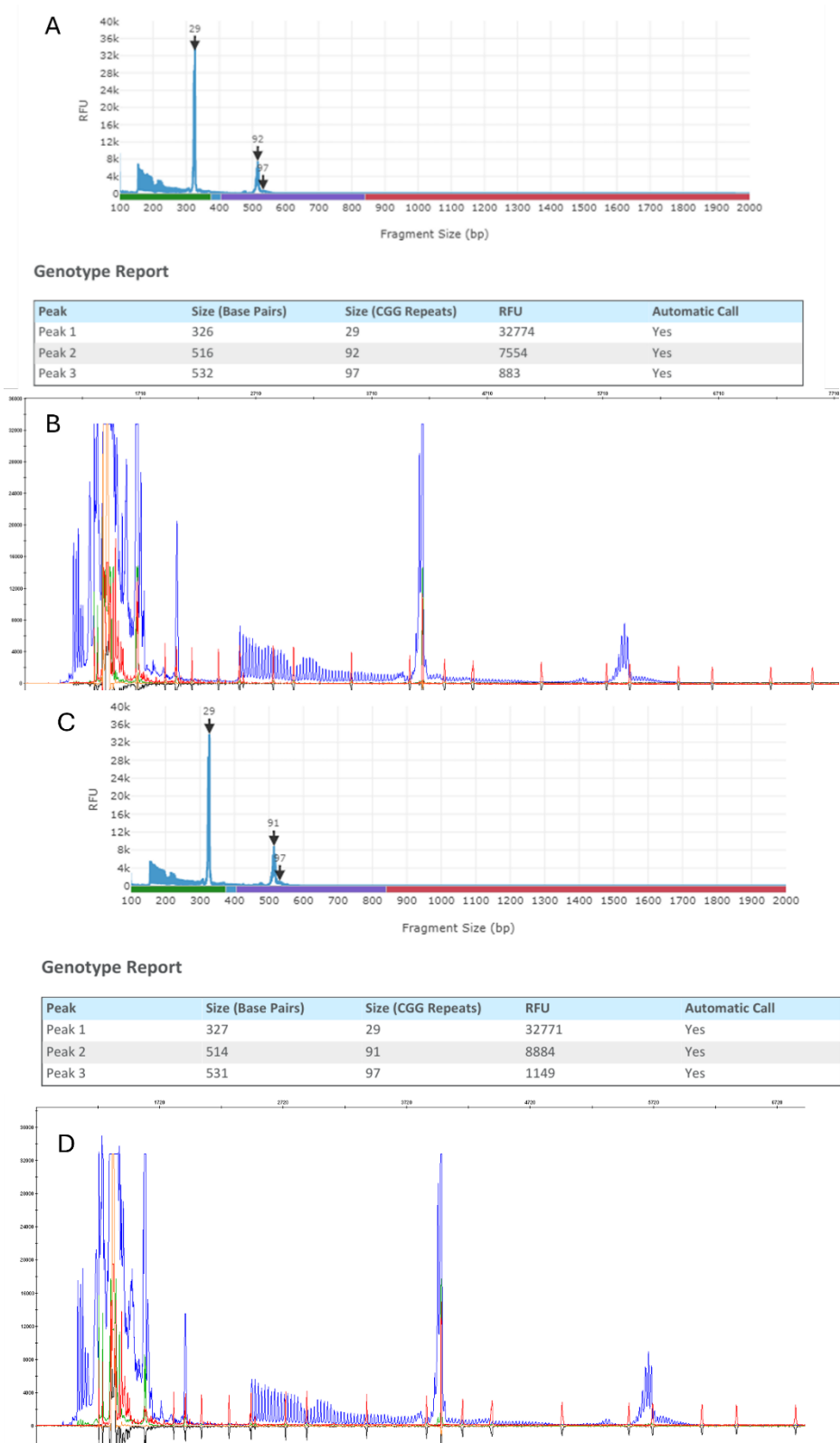


Genotype Report

| Peak | Size (Base Pairs) | Size (CGG Repeats) | RFU | Automatic Call |
|--------|-------------------|--------------------|-------|----------------|
| Peak 1 | 305 | 22 | 32766 | Yes |
| Peak 2 | 308 | 23 | 32766 | Yes |
| Peak 3 | 351 | 37 | 1651 | Yes |



Slika 12. Prikaz elferograma heterozigotne pacijentice (12960) s dodatnim pikom niskog signala desno od predominantnih alela



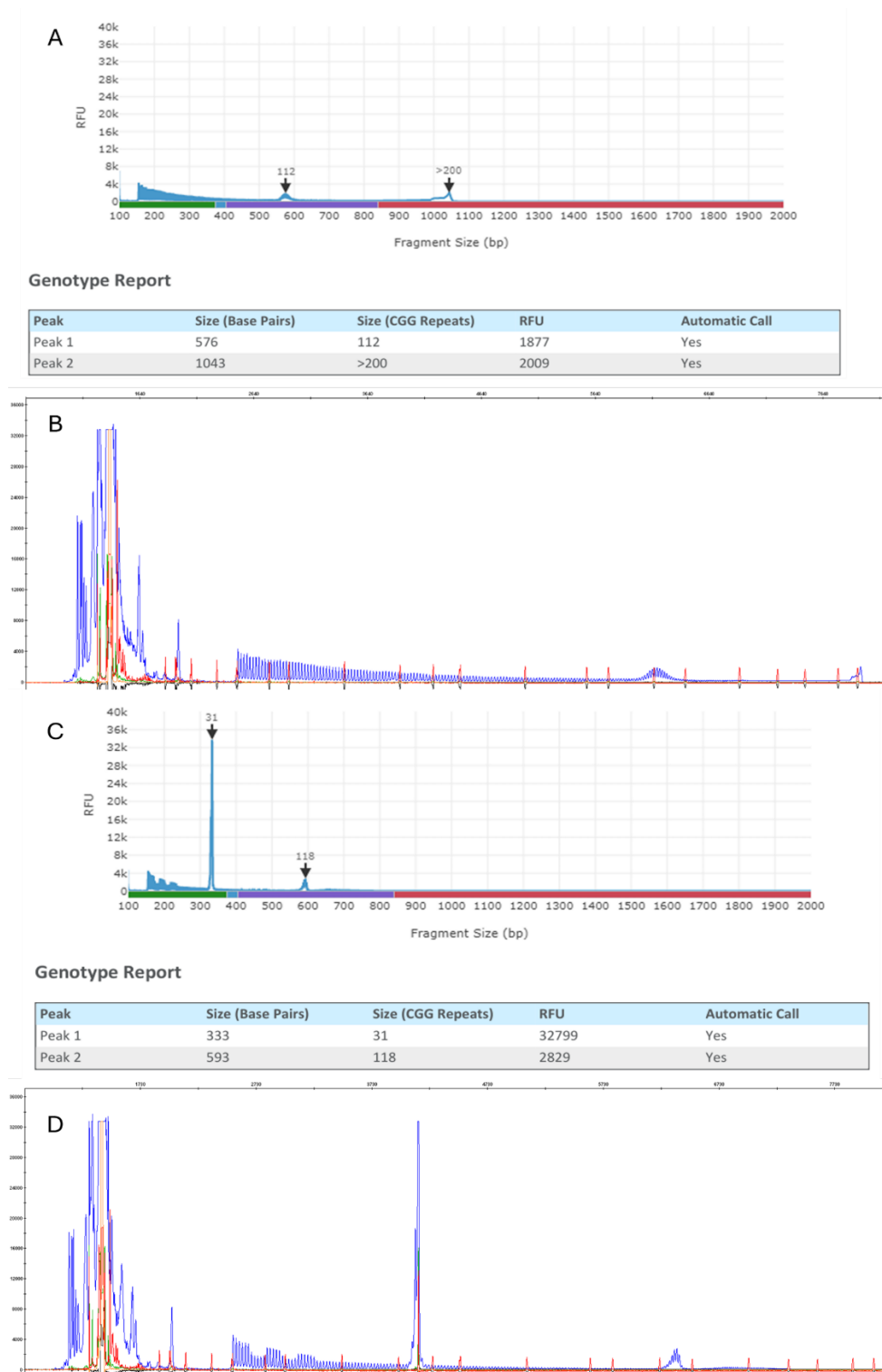
Slika 13. Pacijentica (12740) s mozaicizmom u premutacijskom rasponu. Prikazani su rezultati analize na AmplideX Reporter softveru (A i C) i GeneMapper softveru (B i D).

U dva slučaja identificirani su dodatni pikovi na oba softwera, a njihova prisutnost posljedica je mozaicizma. Riječ je o muškim pacijentima 13324 i 13237. Oba pacijenta imaju jedan premutacijski alel i jedan alel s punom mutacijom.



Slika 14. Rezultati analize pacijenta (13237) dobiveni pomoću AmplideX Reporter (A) i GeneMapper softwera (B). Uzorak je mozaičan, s jednim premutacijskim i jednim mutacijskim alelom.

Kod pacijenta 13324 postavila se sumnja na mozaicizam zbog čega je testirana i majka. Kod pacijenta je određen jedan premutacijski alel veličine 112 CGG i jedan mutacijski alel veličine >200 CGG. Isti rezultat je dobiven na oba softwera (Slika 15A i 15B). Rezultati majčinog uzorka ukazuju na postojanje jednog normalnog alela od 31 CGG te jednog premutacijskog alela od 118 CGG. Također je identičan rezultat dobiven analizom pomoću oba softwera (Slika 15C i 15D).



Slika 15. Muški pacijent (13324) s tipičnim oblikom mozaicizma koji zahvaća jedan alel u premutacijskom i jedan u mutacijskom rasponu (A i B). U svrhu utvrđivanja porijekla alela testirana je i majka (13323) (C i D).

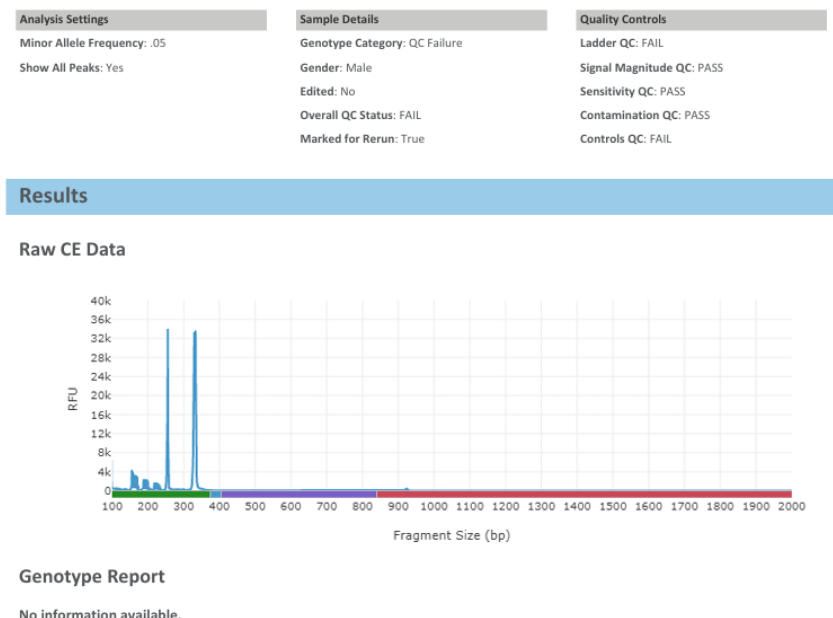
Također, svi uzorci osim uzoraka oznake 13323, 13324, 13237 te 13319 koji pripadaju istoj seriji, ne zadovoljavaju ukupnu kontrolu kvalitete na AmplideX Reporter softwaru (oznaka *Overall QC Status: At Risk*) (Slika 16). Rezultati analize kontrolnih uzoraka nisu zadovoljavajući (oznaka *Controls QC: Fail*). Nisu zadovoljavajući kontrolni uzorci radne kontrole (PC) i kontrole osjetljivosti (SC) te su uzorci pacijenata označeni za ponovnu analizu.

Process Control: POZ_KONTROLA_H05_2023-09-11-08-58-34: FAIL
Sensitivity Control: FMR_KONTROLA_G05_2023-09-11-08-58-34: FAIL

| Analysis Settings | Sample Details | Quality Controls |
|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Minor Allele Frequency: .05 | Genotype Category: Normal | Ladder QC: PASS |
| Show All Peaks: Yes | Gender: Male | Signal Magnitude QC: PASS |
| | Edited: No | Sensitivity QC: PASS |
| | Overall QC Status: AT RISK | Contamination QC: PASS |
| | Marked for Rerun: True | Controls QC: FAIL |

Slika 16. Primjer uzorka pacijenta s nezadovoljavajućim rezultatom analize kontrolnih uzoraka na AmplideX Reporter softwaru

U uzorku 12774, osim nezadovoljavajućih rezultata analize kontrolnih uzoraka, nije zadovoljena niti kontrola internog standarda na AmplideX Reporter softwaru (oznaka *Overall QC Status: Fail*).



Slika 17. Uzorka 12774 s nezadovoljavajućim rezultatom analize kontrolnih uzoraka (oznaka *Controls QC: Fail*) te internog standarda na AmplideX Reporter softwaru (oznaka *Ladder QC: Fail*)

5 RASPRAVA

5.1 Razlika u broju CGG ponavljanja

Razlike u broju jedan do dva CGG ponavljanja ne dovode do različite interpretacije rezultata analize te nisu od kliničkog značaja u 40 analiziranih uzoraka s uočenom razlikom. Ne utječu na klasifikaciju alela, odnosno alel i s razlikom od jednog CGG ponavljanja pripada istoj kategoriji (normalan alel, intermedijaran alel, premutacijski alel, alel s punom mutacijom). U jednom uzorku razlika u broju CGG ponavljanja utječe na klasifikaciju alela. Riječ je o uzorku pacijentice čijom je analizom utvrđena veličina jednog alela od 33 CGG tripleta u oba softwarea, dok se veličina drugog alela razlikuje te razlika u veličini dovodi do različite klasifikacije alela. Analizom u GeneMapper softwarea dobivena je veličina alela od 44 CGG tripleta što je u rasponu normalnih alela (5 do 44 CGG tripleta), dok rezultat analize pomoću AmplideX Reporter softwarea ukazuje na alel veličine 45 CGG tripleta što pripada intermedijarnom rasponu alela (45 do 54 CGG tripleta). Međutim, razlika u klasifikaciji alela nije od kliničkog značaja za pacijenticu jer intermedijarni aleli ne uzrokuju FXS. Jedino predstavljaju rizik za potomke zbog moguće nestabilnosti prilikom transmisije, no zabilježeni su rijetki slučajevi ekspanzije u premutaciju (Biancalana i sur., 2014).

Razlike u broju CGG ponavljanja također utječe na određivanje je li pacijentica homozigot ili heterozigot za FMR1 gen. Kod pacijentice koja je prema rezultatima GeneMapper softwarea homozigot, zbog razlike u broju CGG tripleta u jednom alelu u AmplideX Reporter softwarea navodi se kao heterozigot. Vrijedi i obrnuto. No, oba alela pacijentica nalaze se u normalnom rasponu te razlika u broju tripleta nije od kliničkog značaja.

Prilikom interpretacije rezultata, treba uzeti u obzir potencijalnu netočnost kod određivanja veličine ponavljajućeg slijeda. Prihvaća se maksimalna pogreška od $\pm 5\%$ od ukupnog broja ponavljanja (npr. 50 ± 2 , 60 ± 3 , 80 ± 4 , 100 ± 5). Laboratorij mora utvrditi točnost svoga testa. Na nalazu je uputno veličine alela, tj. ponavljajućeg slijeda izdavati kao *približan broj*, osim ako broj ponavljanja nije direktno određen (npr. sekvenciranjem) (Biancalana i sur., 2014).

5.2 Dodatni pikovi

Automatskom analizom uzoraka pomoću AmplideX Reporter softwarea detektirani su dodatni pikovi koji nisu uočeni prilikom analize na GeneMapper softwarea. Mogući uzroci dodatnih

pikova jesu artefakti specifični za test, aneuploidija tj. prisutnost abnormalnog broja kromosoma u stanici te somatski mozaicizam. Potrebno je utvrditi kliničku važnost dodatnih pikova (Wakeling i sur., 2014).

Identificirani dodatni pikovi niži su te imaju manje CGG ponavljanja od predominantnih alela. Nalaze se u rasponu visine 744-8239 RFU i veličine 20-43 CGG ponavljanja što odgovara normalnom rasponu alela. Općenito, veličina pika ovisi o količini uzorka i veličini ponavljajućeg fragmenta te su dodatni pikovi uglavnom veličine 250 do 3500 RFU, dok su alel specifični pikovi u većini slučajeva >9000 RFU. Dodatni pikovi uočeni su u uzorcima i muških i ženskih pacijenata. S obzirom da dodatni pikovi imaju <55 CGG ponavljanja, veličina alela ne može objasniti razliku u visini pikova budući da zabilježeni aleli u normalnom i intermedijarnom rasponu imaju veći intenzitet fluorescencije (cca. 30000-34000 RFU). Razlog tome je jača amplifikacija normalnih i intermedijarnih alela u usporedbi s premutacijskim i mutacijskim alelima.

Mala visina dodatnih pikova sugerira prisutnost niskofrekventnih FMR1 alela, no s obzirom da su dodatni pikovi niskog intenziteta fluorescencije u normalnom rasponu detektirani na AmplideX Reporter softwareu u uzorcima koji većinski pripadaju istoj seriji, vjerojatno se radi o test specifičnom artefaktu ili kontaminaciji (Wakeling i sur., 2014). Uzorci analizirani u istoj seriji jesu 12897, 12910, 12922, 12925, 12960, 12981 i 12984.

Kod pacijentice 12740 dodatan pik rezultat je mozaicizma. U 3 od preostalih 9 uzoraka, dodatan pik ima veći broj ponavljanja od predominantnih alela. Razlog tome mogući je nedostatak AGG prekida zbog čega je povećana nestabilnost ponavljajućeg slijeda i mogućnost ekspanzije (Wakeling i sur., 2014).

Heterodupleksi, oblici DNA nastali spajanjem dviju jednolančanih DNA različitog porijekla, također mogu uzrokovati dodatne pikove na elferogramu. Takav nalaz je moguć jedino kod heterozigotnih žena. Homozigotne žene imaju identične alele, dok muškarci sadrže samo jedan alel te se heterodupleksi u tim slučajevima ne mogu formirati. Heterodupleksi sporije putuju kapilarom tijekom elektroforeze zbog čega bi se na elferogramu prikazali kao pikovi veličine veće od alela heterozigota. Međutim, dodatni pikovi su uočeni i u uzorcima muškaraca zbog čega se isključuje postojanje heterodupleksa u analiziranim uzorcima (Wakeling i sur., 2014).

Aneuploidije X kromosoma mogući su uzrok dodatnih FMR1 alela. Klinefelterov sindrom, odnosno XXY kariotip javlja se u otprilike 1:500 muškaraca, dok se trisomija X kromosoma, odnosno kariotip XXX javlja u otprilike 1:1000 žena. U uzorcima s aneuploidijom, pikovi na

elferogramu otprilike su iste visine. Zbog rijetke učestalosti aneuploidija te obrasca pikova na elferogramu koji se ne podudara s navedenim, opaženi dodatni pikovi nisu posljedica aneuploidija kod pacijenata (Wakeling i sur., 2014).

Kod pojedinaca s normalnim kariotipom, dodatni FMR1 aleli moguća su posljedica prikrivene duplikacije FMR1 lokusa ili somatske varijacije. Nadalje, dodatni aleli mogući su uslijed povećanja ili smanjenja CGG ponavljajuće regije FMR1 gena nakon tvorbe zigote. Moguće su duplikacije mjesta za vezanje *primera* u 5'-nekođirajućoj regiji FMR1 gena što uzrokuje nastajanje dva PCR produkta od jednog alela. Također, moguće su i intersticijske i interkromosomske duplikacije FMR1 gena za čiju je detekciju potrebna primjena citogenetskih metoda uključujući fluorescentnu *in situ* hibridizaciju. Navedeni slučajevi mogući su primjerice kod muških pacijenata kod kojih je detektiran dodatan alel u normalnom rasponu. Do nastanka dodatnih alela može doći i kao posljedica somatske nestabilnosti CGG ponavljajućeg slijeda. Normalni aleli smatraju se stabilnima i u mitozu i u mejozi. Nestabilno se prenose u 1,5% do 3% slučajeva kod muškaraca te 0,2% do 0,6% slučajeva kod žena. Veličina promjene u broju ponavljanja varira ± 1 CGG triplet, no može se kretati u rasponu od smanjenja slijeda za 10 tripleta do ekspanzije za 5 tripleta. Dodatni normalni aleli vjerojatno nisu od kliničkog značaja ni za prenosiocice ni za osobe zahvaćene FXS-om (Wakeling i sur., 2014).

5.3 Mozaicizam

Mozaicizam s obzirom na veličinu javlja se kod pacijenata sa subpopulacijom stanica u mutacijskom ili premutacijskom rasponu. Kod takvih osoba vidljivi su dodatni pikovi u navedenim rasponima na elferogramu (Wakeling i sur., 2014). Algoritam AmplideX PCR/CE FMR1 analitičkog modula konfiguriran je za osjetljivu detekciju mozaične ekspanzije niske razine intenziteta. Glavni aleli definirani su kao pikovi s najvećim RFU vrijednostima u skladu sa spolom pojedinca, dva najviša pika za uzorke označene kao ženske i jedan najviši pik za muške uzorke. Manji aleli su svi ostali pikovi otkriveni u uzorku i predstavljaju genetski mozaicizam (Asuragen, 2023).

Mozaicizam je uočen u tri analizirana uzorka. U uzorcima pacijentice utvrđen je mozaicizam s dva alela u premutacijskom rasponu te takav mozaicizam nije od kliničkog značaja za pacijenticu. No, zbog nestabilnosti premutacija prilikom nasljeđivanja od majke, postoji rizik

od ekspanzije kod potomaka (Biancalana i sur., 2014). U dva uzorka pronađen je mozaicizam s jednim premutacijskim i jednim mutacijskim alelom. Radi se o muškim pacijentima koji prezentiraju dvije različite populacije stanica, jedne s premutacijom i druge s puno mutacijom.

Elferograme treba tumačiti s oprezom. Ne predstavlja svaki dodatan pik mozaičan alel. Kod sumnje na mozaične alele, potrebno je poznavati pravila mozaicizma i obrasce nasljeđivanja kako bi se pravilno interpretirali nalazi. Kad god je moguće, korisno je napraviti genotipizaciju roditelja kako bi se utvrdilo porijeklo mutacije. U slučaju jednog pacijenta je, zbog postavljene sumnje na mozaicizam, testirana i majka. Analizom je utvrđeno da pacijent ima jedna premutacijski i jedan mutacijski alel, a majka jedan normalan i jedan premutacijski alel. Na oba softwera dobiveni su identični rezultati za oba uzorka. U svrhu dodatne potvrde ponovljena je analiza uzoraka te su rezultati bili jednaki prethodnima. Pacijent je oba alela naslijedio od majke. Prilikom nasljeđivanja premutacijskih alela od majke može doći do ekspanzije u punu mutaciju, što je slučaj kod ovog pacijenta. Jedna populacija stanica sadrži premutacijski, dok druga populacija sadrži mutacijski alel (Biancalana i sur., 2014). Na temelju dobivenih rezultata donosi se zaključak da je došlo do ekspanzije premutacijskog alela prilikom nasljeđivanja od majke. U nekim stanicama veličina alela ostala je u premutacijskom rasponu, dok je u drugim stanicama došlo do ekspanzije.

Dodatno, analizom više vrsta tkiva može se utvrditi opseg somatskog mozaicizma (Wakeling i sur., 2014). Može se javiti tkivni mozaicizam gdje je puna mutacija prisutna u tkivu koje nije krv (Biancalana i sur., 2014). Također, korisno je testirati potomke takvih pojedinaca kako bi se ustanovilo jesu li dodatni aleli prisutni u zametnoj liniji (Wakeling i sur., 2014).

5.4 Rascjep alela

Uzrok rascjepa alela u zabilježenim slučajevima je saturirani signal koji uzrokuje netočne rezultate. Pikovi, odnosno FAM signali ne smiju biti saturirani. FAM signali jesu fluorescentni signali koje emitira FAM boja u sklopu PCR *primera* kako bi obilježila DNA fragmenate tijekom razdvajanja kapilarnom elektroforezom. Ukoliko je koncentracija DNA previsoka, intenzitet signala bit će prevelik ili saturiran. Potrebna je prilagodba uzorka kako bi se osigurao intenzitet signala unutar preporučenih granica. Za korištenje 3500xL Genetic Analyzer instrument, preporučena razina signala iznosi 175-10000 RFU. Unutar navedenog raspona moguća je točna detekcija i diferencijacija DNA fragmenata. Granica fluorescentne saturacije

za instrument iznosi 30000 RFU što znači da je iznad navedene razine signal saturiran i nije moguća precizna detekcija. Ta činjenica objašnjava rascjep pikova budući da su svi detektirani pikovi >30000 RFU. U svim analiziranim uzorcima pikovi u normalnom rasponu intenziteta su 30000-34000 RFU što nadmašuju granicu saturacije. Potrebno je ponoviti analizu takvih uzoraka nakon razrjeđenja ili s kraćim vremenom ubrizgavanja, 10 sekundi umjesto 20 sekundi. Dobivene PCR produkte potrebno je razrijediti prije razdvajanja kapilarnom elektroforezom i to prije dodavanja standarda u mix reagensa kako bi visine pikova alela bile u preporučenom rasponu za instrument (Applied Biosystems, 2014).

5.5 Preporuke za ponavljanje analize

Sve uzorke s dodatnim alelima potrebno je ponovno testirati. Analiza se radi iz istog, već prikupljenog uzorka uz novu izolaciju DNA uzorka pacijenta. Na taj način isključuje se moguća kontaminacija s DNA drugog uzorka te pogreške i varijacije moguće pri procesu analize koje uzrokuju nastanak dodatnih pikova na elferogramu. Općenito, u svrhu dijagnostike FXS na nalazu je potrebno izdati sve reproducibilne dodatne alele. Za probir na prenositelje FXS, potrebno je na nalazu izdati sve reproducibilne dodatne pikove veličine u rasponu normalnih alela s intenzitetom >2000 RFU. Sve dodatne alele s ≥ 45 CGG ponavljanja potrebno je izdati na nalazu neovisno o visini pika. Preporuka je izrada kariotipa kako bi se isključila potpuna ili mozaična aneuploidija X kromosoma u uzorcima s dodatnim pikovima. Također se preporučuje genetsko savjetovanje svim pacijentima s dodatnim FMR1 alelima. Kod pacijenata s normalnim kariotipom, dodatni normalni aleli vjerojatno su posljedica smanjenja ili povećanja broja CGG tripleta u ponavljajućem slijedu te su neznatnog kliničkog značaja i za testove probira i za dijagnostičke testove. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo predstavlja li somatska nestabilnost veću vjerojatnost nastanka promjena u zametnim stanicama, odnosno može li se pomoću promjena u somatskim stanicama predvidjeti nastanak promjena tijekom formacije zametnih stanica i prijenosa na potomstvo. Ako bi somatska nestabilnost bila pokazatelj mejotičke nestabilnosti, to bi moglo imati važne implikacije za genetsko savjetovanje i procjenu rizika. Na primjer, ako somatske promjene ukazuju na sklonost mejotičkim promjenama, pojedinci bi mogli biti izloženi većem riziku da imaju djecu s promijenjenim brojem CGG ponavljanja, što u konačnici može uzrokovati FXS. Također, TP-PCR testovi osjetljiviji su od Southern blota i tradicionalnih PCR testova. Upravo je

povećana osjetljivost u usporedbi s prijašnjim metodama razlog zašto se somatski mozaicizmi čine učestalijima (Wakeling i sur., 2014).

Općenito, rezultati dobiveni pomoću AmplideX Reporter softwarea smatraju se pouzdanijim od rezultata dobivenih pomoću GeneMapper softwarea jer AmplideX Reporter software koristi algoritam za izračun broja ponavljanja koji uzima u obzir i CGG profil i ROX ljestvicu, tj. interni standard. Također, automatska detekcija alela AmplideX Reporter softwareom osigurava detekciju svakog pika (Asuragen, 2016). Smanjena je vjerojatnost pogrešne interpretacije ili izostanka detekcije alela uslijed manualne analize. Manualna identifikacija alela nije dovoljno pouzdana jer ovisi o djelatniku koji pik će biti određen kao alel. Dodatno, automatska detekcija ubrzava radni proces te rasterećuje laboratorijsko osoblje. No, potrebna je optimizacija sustava kako bi se osiguralo da su svi detektirani pikovi od kliničkog značaja te smanjila pojavnost dodatnih pikova bez kliničkog značaja i saturacije signala. Potrebno je smanjiti koncentraciju uzorka za analizu i/ili vrijeme ubrizgavanja uzorka u sustav kapilarne elektroforeze kako bi se zadovoljio preporučeni raspon intenziteta signala za analizu na 3500xL Genetic Analyzer instrumentu (Applied Biosystems, 2014).

5.6 Optimizacija sustava

Kod uzoraka s nezadovoljavajućom kontrolom kvalitete (oznaka *Overall QC Status: At Risk*), rezultati analize kontrolnih uzoraka, tj. radne kontrole (PC) i kontrole osjetljivosti (SC) nisu zadovoljavajući (oznaka *Controls QC: Fail*). Kontrolni uzorci nisu zadovoljavajući kada očekivani pikovi nisu unutar određenih granica ili su detektirani neočekivani pikovi. Potrebno je ponoviti analizu cijelih serija. Ako je razlog nezadovoljavajuće kontrole uzrokovan očekivanim pikovima koji nisu detektirani, potrebno je pregledati uzorak očekivanih pikova i pribilježiti ih ukoliko su prisutni. U slučaju pikova uzrokovanih kontaminacijom u kontrolnim uzorcima, potrebno je ukloniti označene vrhove i ponoviti analizu. Ako rezultati analize kontrolnih uzoraka nisu zadovoljavajući nakon dodavanja ili uklanjanja pikova, potrebno je ponoviti analizu serije počevši od pripreme PCR master mixa i termičkog ciklusa (Asuragen, 2023).

U jednom uzorku, uz nezadovoljavajući rezultat analize kontrolnih uzoraka, nije zadovoljena niti kontrola internog standarda na AmplideX Reporter softwareu. Oznaka *Overall QC Status: Fail* označava da je ukupan signal i/ili interni standard nedovoljan ili anomalan. Zbog

nezadovoljene kontrole kvalitete, software nije automatski odredio alele i genotip pacijenta. Nezadovoljavajuća kontrola internog standarda ukazuje na problem s ROX ljestvicom, intenzitetom pika ili na nedostatak standarda u uzorku. S obzirom da je riječ o muškom pacijentu, a na elferogramu su vidljiva dva pika velikog intenziteta (Slika 17), uzrok neadekvatne kontrole kvalitete vjerojatno je abnormalno veliki intenzitete jednog pika. Popravna radnja uključuje pregled rezultata analize ROX ljestvice kako bi se utvrdilo nalaze li se svi očekivani pikovi na elferogramu. Ukoliko nedostaju pikove ili su loše kvalitete, potrebno je ponoviti ubrizgavanje. Ubrizgavanje uzorka s internim standardom ponavlja se ukoliko je prošlo manje od 48 sati od pripreme uzorka za analizu. U suprotnom, potrebno je ponovno pripremiti uzorak za analizu prema protokolu. Starost kapilare također može utjecati na konzistentnost migracije te dovesti do abnormalnog rezultata analize internog standarda (Asuragen 2023).

6 ZAKLJUČAK

Zbog svoje složenosti, FXS predstavlja značajne izazove u dijagnostici. Ekspanzije broja CGG tripleta u ponavljajućoj regiji tijekom nasljeđivanja dovode do razvoja sindroma, no mogući su blaži fenotipovi zbog varijabilnosti uslijed mozaicizma gdje različite populacije stanica sadrže različite varijacije broja ponavljanja. Točna detekcija i interpretacija ovih genetskih varijacija ključna je kako bi se postavila ispravna dijagnoza i pacijentu pružila adekvatna zdravstvena skrb. Stoga, dijagnostika FXS zahtijeva visokoosjetljive i pouzdane analitičke alate koji osiguravaju točnu interpretaciju rezultata.

GeneMapper software namijenjen je za široku upotrebu u analizi DNA fragmenata. Potrebna je prilagodba softwera kako bi se postigla razina specifičnosti potrebna za detekciju složenih obrazaca FXS-a. Manualna interpretacija rezultata i identifikacija alela unosi varijabilnost u dijagnostiku i povećava vjerojatnost ljudske pogreške prilikom tumačenja rezultata na elferogramu. Automatska detekcija i genotipizacija alela na AmplideX Reporter softwareu uklanja potrebu za manualnom detekcijom alela. Njegov algoritam pruža osjetljivost i točnost prilikom identifikacije premutacijskih i mutacijskih alela te mozaičnih obrazaca. Automatizacija te reproducibilnost i točnost rezultata osiguravaju jednostavnu i učinkovitu uporabu AmplideX Reporter softwera u rutinskoj praksi.

Rezultate dobivene u oba programa možemo smatrati podudarnima, uz potrebnu optimizaciju sustava, validaciju i prilagodbu radnog procesa prije implementacije novog programa u rutinski rad.

7 POPIS KRATICA, OZNAKA, SIMBOLA

| | |
|---------------------|---|
| ABA | engl. <i>Applied Behavior Analysis</i> |
| ADHD | engl. <i>Attention Deficit Hyperactivity Disorder</i> |
| AGG | adenin-gvanin-gvanin |
| ASD | engl. <i>Autism Spectrum Disorder</i> |
| BK | engl. <i>Big Potassium</i> |
| c ₀ | korekcijski faktor veličine |
| CCD | engl. <i>Charge-Coupled Device</i> |
| CGG | citozin-gvanin-gvanin |
| CpG | 5'-citozin-fosfat-gvanin-3' |
| DNA | engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| dNTP | engl. <i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> |
| FAM | 6-karboksifluorescein |
| FMR1 | engl. <i>Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1</i> |
| FMRP | engl. <i>Fragile X Mental Retardation Protein</i> |
| FREE1 | engl. <i>Fragile X-Related Epigenetic Element 1</i> |
| FREE2 | engl. <i>Fragile X-Related Epigenetic Element 2</i> |
| FXOI | engl. <i>Fragile X Associated Primary Ovarian Insufficiency</i> |
| FXS | engl. <i>Fragile X Syndrome</i> |
| FXTAS | engl. <i>Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome</i> |
| GABA | engl. <i>Gamma Aminobutyric Acid</i> |
| GC | gvanin-citozin |
| IQ | engl. <i>Intelligence Quotient</i> |
| K ₂ EDTA | dikaljeva sol etilendiaminotetraoctene kiseline |
| KH | K homologna |
| LOD | engl. <i>Limit of Detection</i> |
| m ₀ | korekcijski faktor mobilnosti |
| Mg ²⁺ | dvovalentni magnezijev ion |
| mGluR5 | engl. <i>Metabotropic Glutamate Receptor 5</i> |
| MMP9 | engl. <i>Matrix Metalloproteinase 9</i> |
| mRNA | engl. <i>messenger RNA</i> |

| | |
|------------------|---|
| NES | engl. <i>Nuclear Export Sequence</i> |
| NLS | engl. <i>Nuclear Localization Sequence</i> |
| NSCs | engl. <i>Neural Stem Cells</i> |
| OCD | engl. <i>Obsessive-Compulsive Disorder</i> |
| pb | parovi baza |
| PC | engl. <i>Process Control</i> |
| PCR | engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| QC | engl. <i>Quality Control</i> |
| RGG | arginin-glicin-glicin |
| RISC | engl. <i>RNA Induced Silencing Complex</i> |
| RNA | engl. <i>Ribonucleic acid</i> |
| ROX | 5(6)-karboksi-X-rodamin |
| SC | engl. <i>Sensitivity Control</i> |
| SiO ⁻ | siloksi ion |
| SiO ₂ | silicijev dioksid |
| SiOH | silanol |
| SSRI | engl. <i>Selective Serotonin Reuptake Inhibitors, SSRI</i> |
| TP-MS-PCR | engl. <i>Triplet Repeat Primed Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction</i> |
| TP-PCR | engl. <i>Triplet Repeat-Primed Polymerase Chain Reaction</i> |
| WES | engl. <i>Whole Exome Sequencing</i> |
| WGS | engl. <i>Whole Genome Sequencing</i> |

8 LITERATURA

Acero-Garcés DO, Saldarriaga W, Cabal-Herrera AM, Rojas CA, Hagerman RJ. Fragile X syndrome in children. *Colomb Med*, 2023, 54.

AmplideX® PCR/CE FMR1 Reagents (RUO), Protocol Guide, PC-0170v2, Asuragen®, 2016. <https://biotechne.my.site.com>, pristupljeno 31.7.2024.

AmplideX® PCR/CE FMR1 Reporter Software, User Guide, PC-0261 v1.0, Asuragen®, 2015. <https://biotechne.my.site.com>, pristupljeno 11.6.2024.

AmplideX® PCR/CE Reporter FMR1 Analysis Module, Version 2.0 Software, User Guide, 00002205v5, Asuragen®, 2023. <https://biotechne.my.site.com>, pristupljeno 20.8.2024.

AmplideX® PCR/CE Reporter FMR1 Kit, Protocol Guide, 00002205v7, Asuragen®, 2023. <https://biotechne.my.site.com>, pristupljeno 22.8.2024.

Aupiais J, Chartier F. Capillary electrophoresis. U: Sample Introduction Systems in ICPMS and ICPOES. Beauchemin D, urednici, Elsevier, 2020, str. 299–356.

Berry-Kravis E, Grossman A, Crnic L, Greenough W. Understanding fragile X syndrome PRACTICE POINTS. *Current Pediatrics*, 2002, 12, 316-324.

Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet*, 2014, 23, 417–425.

Butler JM. Capillary Electrophoresis. U: Advanced Topics in Forensic DNA Typing. Butler JM, urednici, Elsevier, 2012, str. 141–165.

Chang-Hui S. Quantification and analysis of nucleic acids. U: Diagnostic Molecular Biology. Chang-Hui S, urednici, Academic Press, 2023, str. 181-208.

Chen L, Hadd AG, Sah S, Houghton JF, Filipovic-Sadic S, Zhang W, i sur. High-resolution methylation polymerase chain reaction for fragile X analysis: Evidence for novel FMR1 methylation patterns undetected in Southern blot analyses. *Genet Med*, 2011, 13, 528–538.

Electrophoresis, 2019, <https://chem.libretexts.org>, pristupljeno 7.8.2024.

Filipovic-Sadic S, Sah S, Chen L, Krosting J, Sekinger E, Zhang W, et al. A Novel FMR1 PCR Method for the Routine Detection of Low Abundance Expanded Alleles and Full Mutations in Fragile X Syndrome. *Clin Chem*, 2010, 56, 399–408.

Gariyban L, Avashia N. Polymerase Chain Reaction. *J Invest Dermatol*, 2013, 133, 1–4.

Gross C, Hoffmann A, Bassell GJ, Berry-Kravis EM. Therapeutic Strategies in Fragile X Syndrome: From Bench to Bedside and Back. *Neurotherapeutics*, 2015, 12, 584–608.

Hall DA, Berry-Kravis E. Fragile X syndrome and fragile X-associated tremor ataxia syndrome. U: Handbook of Clinical Neurology. Geschwind DH, Paulson HL, Klein C, urednici, Elsevier, 2018, str. 377–391.

Jiraanont P, Kumar M, Tang HT, Espinal G, Hagerman PJ, Hagerman RJ, i sur. Size and methylation mosaicism in males with Fragile X syndrome. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017, 17, 1023–1032.

Kraan CM, Godler DE, Amor DJ. Epigenetics of fragile X syndrome and fragile X-related disorders. *Dev Med Child Neurol*, 2018, 61, 121–127.

Nelson DL, Santoro MR, Warren ST. Fragile X Syndrome Genetics. U: Fragile X Syndrome: From Genetics to Targeted Treatment. Willemsen R, Kooy F, urednici, Amsterdam, Academic Press, 2017, str. 19-39.

Neri G. The Clinical Phenotype of the Fragile X Syndrome and Related Disorders. U: Fragile X Syndrome: From Genetics to Targeted Treatment. Willemsen R, Kooy F, urednici, Amsterdam, Academic Press, 2017, str. 1-16.

Pretto D, Yrigollen CM, Tang HT, Williamson J, Espinal G, Iwahashi CK, I sur. Clinical and molecular implications of mosaicism in FMR1 full mutations. *Front Genet*, 2014, 5.

Protic DD, Aishworiya R, Salcedo-Arellano MJ, Tang SJ, Milisavljevic J, Mitrovic F, i sur. Fragile X Syndrome: From Molecular Aspect to Clinical Treatment. *Int J Mol Sci*, 2022, 23.

QIAamp DNA Mini Blood Mini Handbook, Qiagen®, 2024. <https://www.qiagen.com/us>, pristupljeno 12.9.2024.

Rajan-Babu I, Lian M, Chong SS. Triplet-Primed PCR Assays for Accurate Screening of *FMR1* CGG Repeat Expansion and Genotype Verification. *Curr Protoc*, 2022, 2.

Rajan-Babu IS, Chong SS. Triplet-Repeat Primed PCR and Capillary Electrophoresis for Characterizing the Fragile X Mental Retardation 1 CGG Repeat Hyperexpansions. *Method Mol Biol*, 2019, 1972, 199–210.

Raspa M, Wheeler A, Okoniewski KC, Edwards A, Scott S. Research Gaps in Fragile X Syndrome: An Updated Literature Review to Inform Clinical and Public Health Practice. *J Dev Behav Pediatr*, 2022, 44, 56–65.

Richter JD, Zhao X. The molecular biology of FMRP: new insights into fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci*, 2021, 22, 209–222.

Rousseau F, Labelle Y, Bussi eres J, Lindsay C. The Fragile X Mental Retardation Syndrome 20 Years After the FMR1 Gene Discovery: an Expanding Universe of Knowledge. *Clin Biochem Rev*, 2011, 32, 135-162.

Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA. Fragile X syndrome: Diagnostic and carrier testing. *Genet Med*, 2005, 7, 584–587.

Sherman SL, Hunter JE. Epidemiology of Fragile X Syndrome. U: Fragile X Syndrome: From Genetics to Targeted Treatment. Willemsen R, Kooy F, urednici, Amsterdam, Academic Press, 2017, str. 57-76.

Smith A, Nelson R. Capillary Electrophoresis of DNA Contributed by Purification and Analysis. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*, 2003.

Spector E, Behlmann A, Kronquist K, Rose NC, Lyon E, Reddi HV. Laboratory testing for fragile X, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *GIM*, 2021, 23, 799–812.

Tassone F, Montserrat M. Molecular Diagnostics and Genetic Counseling in Fragile X Syndrome and FMR1-Associated Disorders. U: *Fragile X Syndrome: From Genetics to Targeted Treatment*. Willemsen R, Kooy F, urednici, Amsterdam, Academic Press, 2017, str. 41-55.

Usdin K, Gazy I, Zhao X. Mechanisms of Repeat Instability in Fragile X Syndrome. U: *Fragile X Syndrome: From Genetics to Targeted Treatment*. Willemsen R, Kooy F, urednici, Amsterdam, Academic Press, 2017, str. 77-102.

User Guide: DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis, Applied Biosystems®, 2014. <https://www.thermofisher.com>, pristupljeno 26.6.2024.

Wakeling E, Nahhas F, Feldman G. Extra Alleles in FMR1 Triple-Primed PCR Artifact, Aneuploidy, or Somatic Mosaicism? *J Mol Diagn*, 2014, 16, 689-696.

9 SAŽETAK/SUMMARY

9.1 Sažetak

Sindrom fragilnog X kromosoma najčešći je nasljedni oblik mentalne retardacije i poteškoća u razvoju. Posljedica je dinamičke mutacije u FMR1 genu X kromosoma koja se očituje ekspanzijom CGG ponavljajućeg slijeda u 5'-nekodirajućoj regiji gena. S obzirom na broj CGG ponavljanja, razlikuju se četiri klase alela: normalni (5-44 CGG), intermedijarni (45-54 CGG), premutacijski (55-200 CGG) te aleli s punom mutacijom (>200 CGG). U sindromu fragilnog X karakterističan je i mozaicizam, prisutnost različitih alela u različitim subpopulacijama stanica. Cilj ovog rada bio je usporediti rezultate dobivene pomoću GeneMapper i AmplideX Reporter softwera te utvrditi može li automatizirani AmplideX Reporter zamijeniti GeneMapper software u rutinskoj dijagnostici. Analizirano je ukupno 130 uzoraka, uključujući 129 uzoraka pacijenata i 1 negativan kontrolni uzorak. Analizirani uzorci obuhvaćali su sve četiri kategorije alela, dok je u 3 uzoraka utvrđen mozaicizam. U 41 uzorku pronađene su razlike u broju ponavljanja za 1 ili 2 CGG tripleta između dva programa što, međutim, ne predstavlja klinički značajnu razliku. U AmplideX Reporter softwera uočen je rascjep alela u 19 uzoraka te su detektirani dodatni pikovi u 11 uzoraka. Usporedbom je utvrđena veća osjetljivost i specifičnost AmplideX Reporter softwera u otkrivanju mozaicizama zbog automatskog izračuna broja CGG ponavljanja s obzirom na CGG profil i ROX ljestvicu veličine te razmatranja kontrole kvalitete prilikom analize. Potrebna je optimizacija sustava kako bi u potpunosti bila zadovoljena kontrola kvalitete svakog analiziranog uzorka te se osigurala točnost dobivenih rezultata.

9.2 Summary

Fragile X syndrome is the most common inherited form of mental retardation and developmental disorders. It results from a dynamic mutation in the *FMRI* gene on the X chromosome, characterized by the expansion of a CGG repeat sequence in the 5'-untranslated region of the gene. Based on the number of CGG repeats, four allele classes are distinguished: normal (5-44 CGG), intermediate (45-54 CGG), premutation (55-200 CGG), and full mutation (>200 CGG). The syndrome is also characterized by mosaicism, the presence of different alleles in different subpopulations of cells. The aim of this study was to compare the results obtained using GeneMapper and AmplideX Reporter software and to determine whether the automated AmplideX Reporter can replace GeneMapper software in routine diagnostics. A total of 130 samples were analysed, including 129 patient samples and 1 negative control sample. The analysed samples covered all four categories of alleles, and mosaicism was detected in 3 samples. Differences in the number of repeats by 1 or 2 CGG triplets between the two programs were found in 41 samples but with no significance in clinical interpretation. In the AmplideX Reporter software, allele splitting was observed in 19 samples, and additional peaks were detected in 11 samples. The comparison showed greater sensitivity and specificity of the AmplideX Reporter software in mosaicism detection due to its automatic calculation of the number of CGG repeats based on the CGG profile and ROX size ladder, as well as its consideration of quality control during the analysis. System optimization is needed to fully satisfy the quality control requirements for each analysed sample and to ensure the accuracy of the obtained results.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Usporedba programa u molekularnoj analizi Sindroma fragilnog X kromosoma

Valeria Fabijanić

SAŽETAK

Sindrom fragilnog X kromosoma najčešći je nasljedni oblik mentalne retardacije i poteškoća u razvoju. Posljedica je dinamičke mutacije u FMR1 genu X kromosoma koja se očituje ekspanzijom CGG ponavljajućeg slijeda u 5'-nekodirajućoj regiji gena. S obzirom na broj CGG ponavljanja, razlikuju se četiri klase alela: normalni (5-44 CGG), intermedijarni (45-54 CGG), premutacijski (55-200 CGG) te aleli s punom mutacijom (>200 CGG). U sindromu fragilnog X karakterističan je i mozaicizam, prisutnost različitih alela u različitim subpopulacijama stanica. Cilj ovog rada bio je usporediti rezultate dobivene pomoću GeneMapper i AmplideX Reporter softwarea te utvrditi može li automatizirani AmplideX Reporter zamijeniti GeneMapper software u rutinskoj dijagnostici. Analizirano je ukupno 130 uzoraka, uključujući 129 uzoraka pacijenata i 1 negativan kontrolni uzorak. Analizirani uzorci obuhvaćali su sve četiri kategorije alela, dok je u 3 uzoraka utvrđen mozaicizam. U 41 uzorku pronađene su razlike u broju ponavljanja za 1 ili 2 CGG tripleta između dva programa što, međutim, ne predstavlja klinički značajnu razliku. U AmplideX Reporter softwareu uočen je rascjep alela u 19 uzoraka te su detektirani dodatni pikovi u 11 uzoraka. Usporedbom je utvrđena veća osjetljivost i specifičnost AmplideX Reporter softwarea u otkrivanju mozaicizama zbog automatskog izračuna broja CGG ponavljanja s obzirom na CGG profil i ROX ljestvicu veličine te razmatranja kontrole kvalitete prilikom analize. Potrebna je optimizacija sustava kako bi u potpunosti bila zadovoljena kontrola kvalitete svakog analiziranog uzorka te se osigurala točnost dobivenih rezultata.

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

Rad sadrži: 65 stranica, 17 grafičkih prikaza, 1 tablica i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: sindrom fragilnog X kromosoma, FMR1, dinamična mutacija, analiza

Mentor: **Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ivana Rako, *Klinički bolnički centar Zagreb.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ivana Rako, *Klinički bolnički centar Zagreb.*

Rad prihvaćen: rujan 2024.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of laboratory diagnostics UHC Zagreb
Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Software comparison in the molecular analysis of Fragile X Syndrome

Valeria Fabijanić

SUMMARY

Fragile X syndrome is the most common inherited form of mental retardation and developmental disorders. It results from a dynamic mutation in the FMR1 gene on the X chromosome, characterized by the expansion of a CGG repeat sequence in the 5'-untranslated region of the gene. Based on the number of CGG repeats, four allele classes are distinguished: normal (5-44 CGG), intermediate (45-54 CGG), premutation (55-200 CGG), and full mutation (>200 CGG). The syndrome is also characterized by mosaicism, the presence of different alleles in different subpopulations of cells. The aim of this study was to compare the results obtained using GeneMapper and AmpliX Reporter software and to determine whether the automated AmpliX Reporter can replace GeneMapper software in routine diagnostics. A total of 130 samples were analysed, including 129 patient samples and 1 negative control sample. The analysed samples covered all four categories of alleles, and mosaicism was detected in 3 samples. Differences in the number of repeats by 1 or 2 CGG triplets between the two programs were found in 41 samples but with no significance in clinical interpretation. In the AmpliX Reporter software, allele splitting was observed in 19 samples, and additional peaks were detected in 11 samples. The comparison showed greater sensitivity and specificity of the AmpliX Reporter software in mosaicism detection due to its automatic calculation of the number of CGG repeats based on the CGG profile and ROX size ladder, as well as its consideration of quality control during the analysis. System optimization is needed to fully satisfy the quality control requirements for each analysed sample and to ensure the accuracy of the obtained results.

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

Thesis includes: 65 pages, 17 figures, 1 tables and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Fragile X Syndrome, FMR1, dynamic mutation, analysis

Mentor: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivana Rako, Ph.D. University Hospital Centre Zagreb

Reviewers: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivana Rako, Ph.D. University Hospital Centre Zagreb

The thesis was accepted: September 2024.