Validacija metode za probir dinamičkih mutacija u genu FMR1

Škrlec, Ivana

Professional thesis / Završni specijalistički

2017

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:163:822131

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Škrlec

VALIDACIJA METODE ZA PROBIR DINAMIČKIH MUTACIJA U GENU *FMR1*

Specijalistički rad

Zagreb, 2016.

Poslijediplomski specijalistički studij: Molekularna dijagnostika

Mentorice rada: prof. dr. sc. Karmela Barišić

doc. dr. sc. Jasenka Wagner

Specijalistički rad obranjen je dana 9. prosinca 2016. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
2. prof. dr. sc. Karmela Barišić, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
3. prof. dr. sc. Jadranka Sertić, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

Rad ima 50 listova.

Predgovor

Istraživanje je provedeno na Klinici za pedijatriju u Kliničkom bolničkom centru Osijek te u Laboratoriju za medicinsku genetiku pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Sažetak

Ciljevi istraživanja su sljedeći: a) validacija metode izravnoga PCR-a s tri početnice (engl. *direct triplet-primed PCR*, dTP-PCR) za određivanje dinamičkih mutacija u genu *FMR1*, te b) usporedba rezultata dobivenih metodom dTP-PCR s rezultatima dobivenim *Southern blot* metodom.

Uzorak ispitanika sastojao se od 40 pacijenata upućenih u Klinički bolnički centar (KBC) Osijek s dijagnozom intelektualnog zaostajanja. Ispitanici su nasumično izabrani i validacija je provedena slijepim istraživanjem. Izolacija genomske DNA napravljena je iz pune krvi. Broj tripleta CGG gena *FMR1* utvrđen je metodom izravne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu s tri početnice (dTP-PCR) uz analizu krivulje mekšanja DNA. Analizom krivulje mekšanja utvrđena je temperatura mekšanja za svaki umnoženi uzorak DNA ispitanika. Temeljem razlike u temperaturi mekšanja ispitivanoga uzorka i kontrolnih uzoraka s poznatim brojem ponavljanja tripleta CGG (30, 41 i 53 ponavljanja) svi su ispitanici svrstani u četiri kategorije (normalan broj CGG tripleta ≤ 44 CGG, siva zona od 45 do 54 CGG, premutacija od 55 do 200 CGG i puna mutacija > 200 CGG).

Prisutnost proširenih alela (> 200 tripleta CGG) kod osoba oba spola imala je drugačiju krivulju mekšanja DNA od normalnih alela (< 30 tripleta CGG). Klinička značajnost testa na 40 prethodno analiziranih ispitanika pokazala je 100 %-tnu osjetljivost i 90,48 %-tnu specifičnost kod utvrđivanja povećanja broja ponavljanja tripleta CGG (> 30) u genu *FMR1*.

Metoda dTP-PCR-a primjerena je za brzi probir promjene broja ponavljanja tripleta CGG, kao i za otkrivanje nositelja premutacija i mutacija u genu *FMR1* u populaciji ispitanika koja obuhvaća osobe s intelektualnim poteškoćama nepoznatoga uzroka.

Summary

Validation of screening method for dynamic mutation in the *FMR1* gene

Objectives of this study are validation of the direct triplet-primed PCR method (dTP-PCR) for determination of dynamic mutation in the *FMR1* gene, and comparison of the results of dTP-PCR method and Southern blot analysis.

In this study 40 patients from Osijek University Hospital with diagnosis of the intellectual disability were included. The patients were chosen randomly and validation of the method was conducted as a blind study. DNA was extracted from the whole blood. The number of the CGG repeats in the *FMR1* gene is determined by direct triplet-primed PCR method and melting curve analysis. Cut-off temperature between normal and permutation of the CGG repeats is determined by control samples with known number of CGG repeats. All patients are classified in four categories based on DNA melting curve (normal number of CGG repeats ≤44, grey zone 45 to 54 CGG repeats, premutation 55 to 200 CGG repeats, and full mutation >200 CGG repeats).

Presence of expanded alleles (>200 CGG repeats) in both sex had different DNA melting curve than the melting curve of normal allele (<30 CGG repeat). The clinical performance of the assay was established with 40 previously analyzed samples, yielding results of 100% sensitivity and 90,48% specificity in detection expansions of CGG (>30) repeats in *FMR1* gene.

This method is appropriate for quick determination of allelic changes in the *FMR1* gene, screening population and defining mutations or permutation carriers in the population with intellectual disabilities with unknown cause.

Sadržaj

1. UVOD....1

1.1. Dinamičke mutacije....3

1.2. Gen *FMR1* i FMR protein....8

1.2.1. Sindrom fragilnoga X kromosoma....11

1.2.2. Primarna insuficijencija ovarija povezana s fragilnim X kromosomom....14

1.2.3. Sindrom tremora i ataksije povezan s fragilnim X kromosomom....15

1.2.4. Životinjski modeli sindroma fragilnoga X kromosoma....16

1.3. Molekularna dijagnostika dinamičkih mutacija gena *FMR1*....17

1.4. Mogućnosti liječenja....19

2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA....22

2.1. Hipoteza....22

2.2. Ciljevi istraživanja....22

3. ISPITANICI I METODE....23

3.1. Ispitanici....23

3.2. Metode....24

3.2.1. Izolacija DNA iz pune krvi....25

3.2.2. Izravna lančana reakcija polimeraze s tri početnice....25

3.3. Interpretacija rezultata....28

3.4. Statističke metode....31

4. REZULTATI....32

5. RASPRAVA....39

6. ZAKLJUČAK....43

7. LITERATURA....44

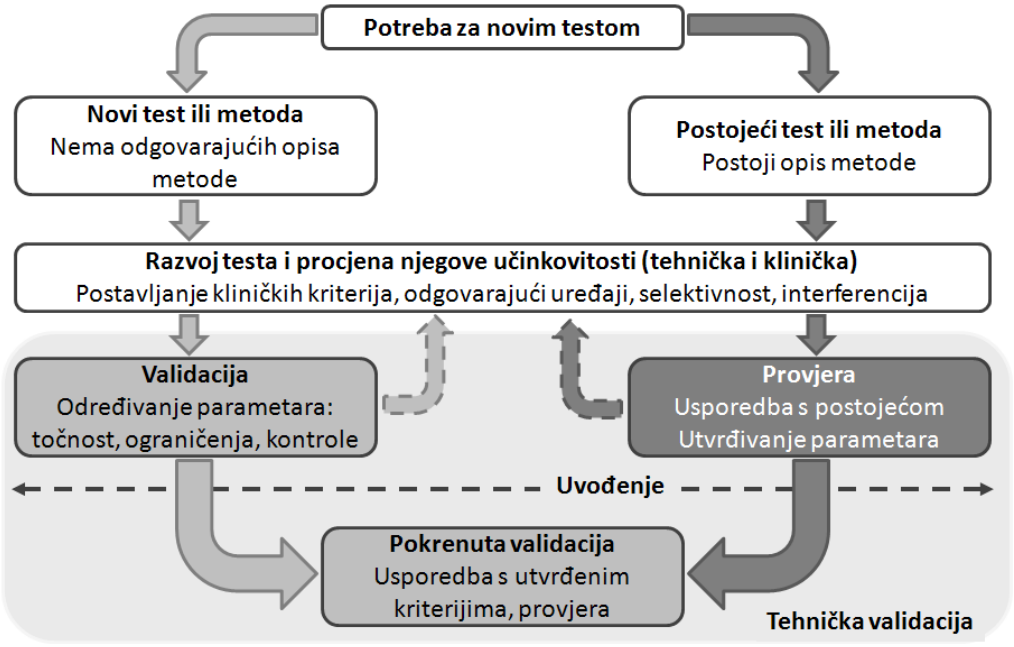
8. POPIS KRATICA....49

9. ŽIVOTOPIS....51

1. UVOD

Validacija metode jest proces utvrđivanja parametara i limita nekog metodološkoga postupka, uvjeta izvođenja i čimbenika koji moduliraju te uvjete. Svrha validacije je da se ispitivanjem i prikupljanjem objektivnih dokaza potvrdi da je odabrana metoda prikladna za korištenje u dijagnostici i da služi svrsi (1, 2).

Postupak validacije metode koja se koristi u molekularnoj dijagnostici jest dugotrajan i skup proces, stoga ga je potrebno pomno isplanirati i oprezno postaviti odgovarajuće kriterije. Prilikom validacije metode treba obratiti pozornost na određene parametre kao što su: osjetljivost, specifičnost, točnost, ponovljivost i reproducibilnost metode (1, 3 – 5). Kombinacijom tih parametara oblikuje se plan validacije za svaki novi test i/ili metodu koji se uvode u dijagnostički laboratorij (Slika 1).



Slika 1. Postupak uvođenja nove metode u molekularnu dijagnostiku. Prikazana su dva općenita puta za uvođenje novog testa/metode ovisno o dostupnosti određenih parametara: validacija (svjetlije) i provjera (tamnije). Iscrtane strelice predstavljaju okolnosti kada validacija ili provjera testa/metode ne zadovoljava postavljene kriterije. Prilagođeno prema Mattocks i suradnici (1).

Svaki akreditirani dijagnostički laboratorij obvezan je prije uvođenja novoga testa ili metode napraviti njihovu validaciju ili provjeru prema međunarodnim standardima koji se odnose na genska ispitivanja, ISO 15189 (6) i ISO 17025 (7).

Ako određeni test ili metoda imaju IVD ili CE oznaku tada je dovoljna provjera funkcionalne ispravnosti. Međutim, ako su napravljena neka odstupanja u bilo kojem koraku provjere testa ili metode (npr. promjena volumena reakcije, korištenje drugog uređaja i slično), tada je potrebno provesti cjelokupan postupak validacije (1, 8).

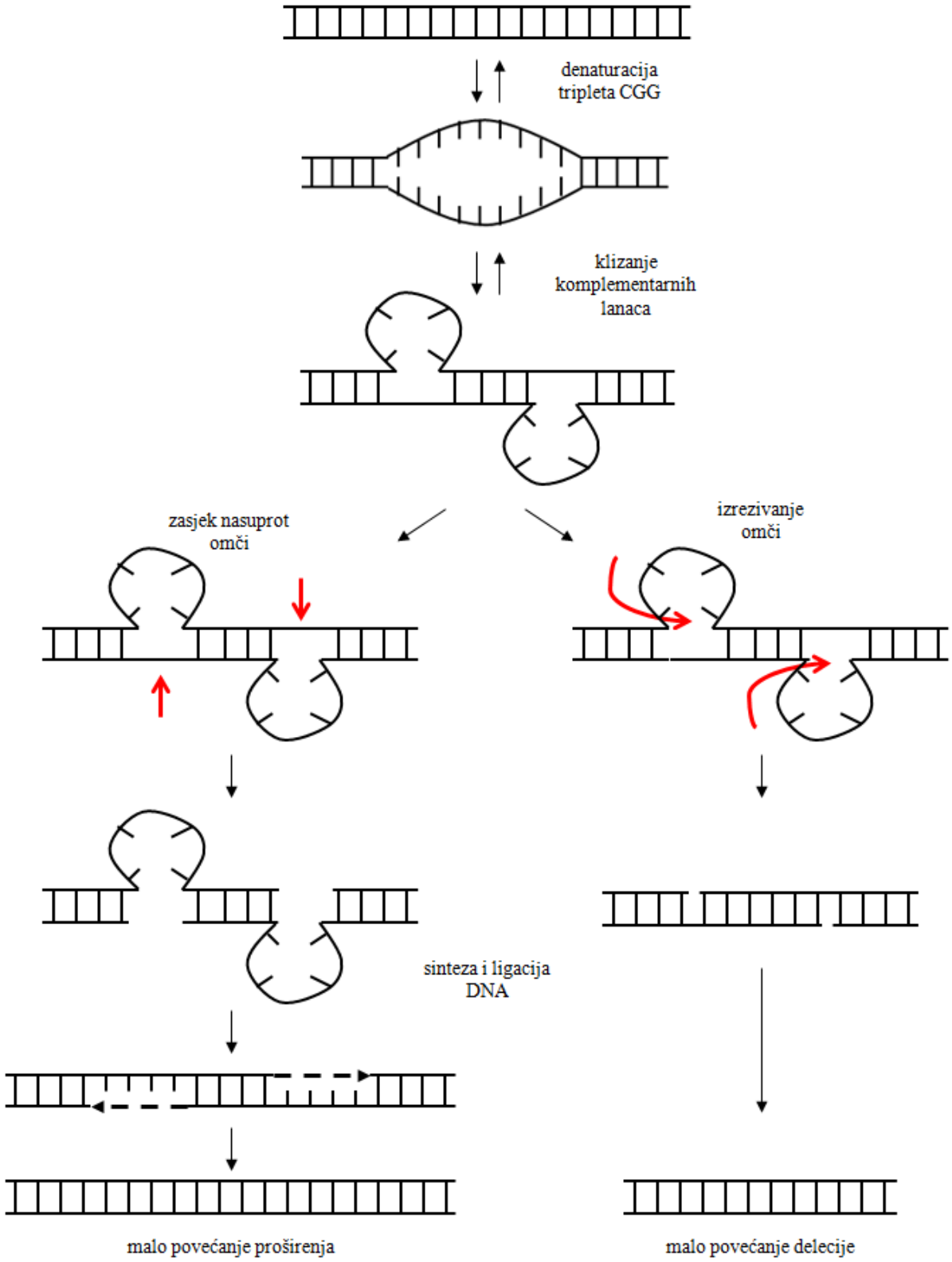
Nakon što je validacija novog testa ili metode prihvaćena, kreće se s uvođenjem testa ili metode u dijagnostičku upotrebu. Nakon uvođenja testa ili metode važno je nastaviti provoditi validaciju jer se tijekom vremena nakupi veći broj uzoraka od početnoga, te se na taj način test ili metoda mogu stalno poboljšavati u smislu točnosti i kvalitete. Kod testova i metoda koji se koriste u molekularnoj dijagnostici potrebna je stalna validacija putem provođenja unutarnjih i vanjskih kontrola kvalitete (1, 9, 10).

Validacija metoda i testova kojima se analiziraju geni naročito je važna jer se u pravilu takvim analizama osobe podvrgavaju jednokratno, a rezultati analize mogu se koristiti tijekom cijeloga života te osobe. Ovaj se rad bavi validacijom metode za probir dinamičkih mutacija u genu *FMR1* (engl. *Fragile X Mental Retardation 1 gene*) analizom krivulje mekšanja DNA.

1.1. Dinamičke mutacije

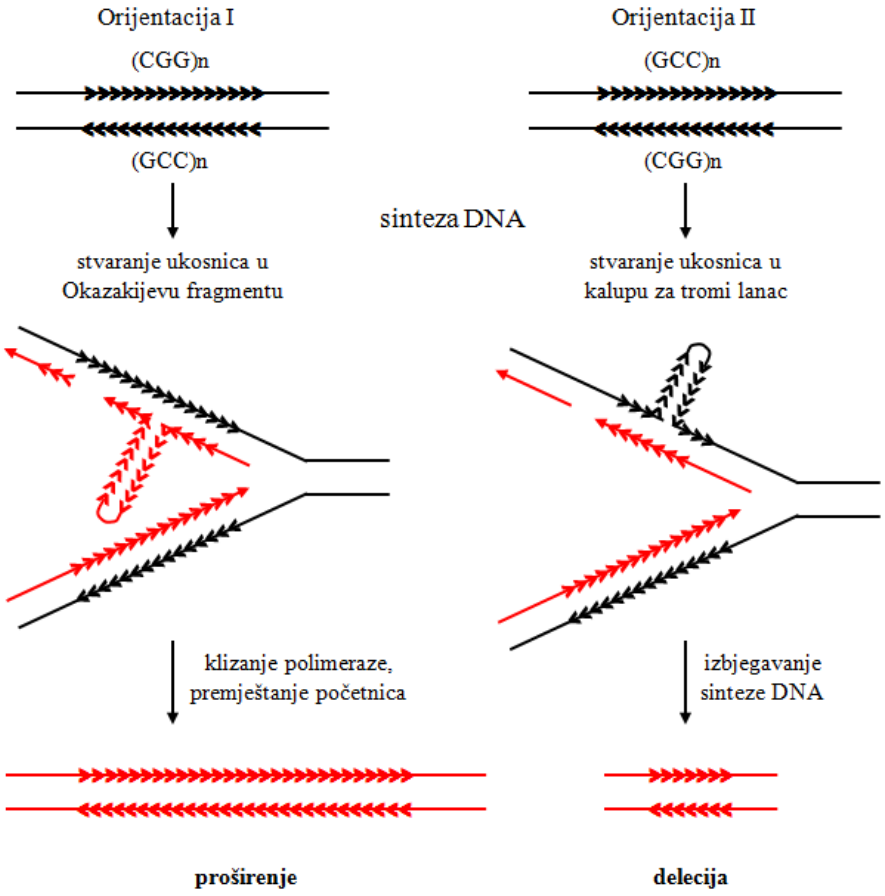
Dinamičke mutacije nastaju kao rezultat nestabilnosti ponavljajućih sljedova nukleotida i uzrokom su niza nasljednih poremećaja. Ponavljajući sljedovi nukleotida rasprostranjeni su cijelim ljudskim genomom te mogu biti različitih duljina. Jednostavni motivi ponavljanja sastoje se od jednoga do četiri nukleotida, čine oko 2 % ljudskog genoma i nazivaju se mikrosatelitima (11, 12). U normalnoj populaciji mikrosatelitne regije visoko su varijabilne, a povremeno pokazuju mejotsku ili mitotsku nestabilnost koja može dovesti do povećanja broja ponavljanja iznad određene granice i time uzrokuju nastanak bolesti. Broj ponavljanja povećava se iz generacije u generaciju, a samo iznimno smanjuje, te se ove mutacije nazivaju dinamičkim mutacijama (11, 13). Ovakav način nasljeđivanja odgovoran je za anticipaciju, odnosno ranije javljanje i težu kliničku sliku bolesti unutar zahvaćene obitelji u svakoj sljedećoj generaciji (11). Dinamičke mutacije povezane su s više od 40 različitih neuroloških, neurodegenerativnih i neuromuskularnih poremećaja, a uglavnom nastaju produljenjem sljedova trinukleotida (13 – 15).

Stvaranjem neobičnih sekundarnih struktura DNA tijekom replikacije, popravka i rekombinacije nastaju dinamičke mutacije (Slika 2). Tijekom replikacije nastaju ukosnice ponavljanih sljedova trinukleotida koje mogu rezultirati povećanjem ili smanjenjem broja tripleta u jednom od lanaca DNA (Slika 3). Ako ukosnica nastane u kalupu za tromi lanac (orijentacija II), zbog termostabilnosti ukosnice DNA polimeraza ju zaobilazi što rezultira delecijom. Proširenje broja tripleta nastat će ako dođe do stvaranja ukosnice u tromom lancu u orijentaciji I (11).



Slika 2. Načini nastanka malih promjena duljine molekule DNA. Nakon denaturacije DNA i stvaranja replikacijskog mjehurića unutar regije trinukleotidnih ponavljanja zbog pogreške prilikom popravka omči može doći do malog povećanja broja nukleotida nasuprot omči i/ili manje delecije nakon izrezivanja omči. Prilagođeno prema Parniewski i suradnici (11).

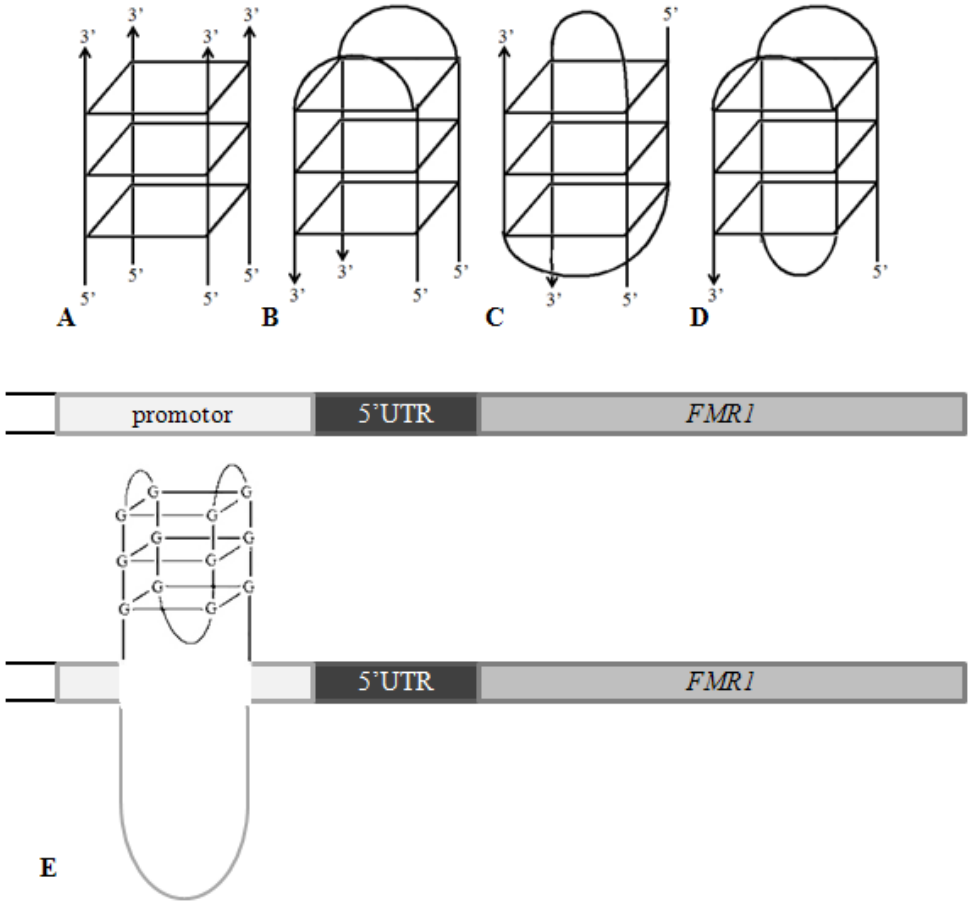
Popravak DNA događa se tijekom replikacije ili prilikom održavanja cjelokupnog genoma stanice. Uvođenjem dvolančanoga loma u molekulu DNA zbog nastalih ukosnica može doći do promjena u broju tripleta. Također, tijekom homologne rekombinacije DNA može doći do povećanja ili smanjenja broja tripleta (11, 15).



Slika 3. Mehanizam genetičke nestabilnosti ponavljanja tripleta tijekom replikacije. Stvaranje strukture ukosnice u novosintetiziranom Okazakijevom fragmentu, premještanje početnica i sinteza DNA rezultira velikim proširenjem, dok izbjegavanje sinteze preko ukosnice nastale u kalupu za tromi lanac dovodi do velike delecije. Također, delecija i proširenje mogu se dogoditi i pri sintezi vodećeg lanca, ali su takvi događaji vrlo rijetki. Prilagođeno prema Parniewski i suradnici (11).

Kod sindroma fragilnoga X kromosoma (FXS, engl. *Fragile X Syndrome*) dolazi do dinamičke mutacije povećanja broja tripleta CGG u 5'UTR regiji (5' netranslantirani kraj, engl. *5' Untranslated Region*) gena *FMR1*. Povećanje broja tripleta CGG u genu *FMR1* uzrokuje smanjenje ili potpuni izostanak transkripcije navedenoga gena te posljedično i smanjenje ili potpuni izostanak sinteze odgovarajućega proteina, FMRP-a (FMRP, engl. *Fragile X Mental Retardation Protein*) (16). Do smanjenja ili izostanka transkripcije dolazi zbog metilacije CGG ponavljanja i promotora gena *FMR1*, hipoacetilacije histona, sprječavanja formiranja nukleosoma te kondenzacije kromatina.

Osim toga, lanci DNA ili RNA koji sadrže dva ili više gvanina povezanih Hoogsteenovim vodikovim vezama mogu stvarati sekundarne strukture koje se zovu G-kvadrupleksi (17, 18). G-kvadrupleksi mogu biti sastavljeni od jednog lanca DNA ili RNA, ili pak od dva ili četiri odvojena lanca nukleinskih kiselina (Slika 4, A – D), a takve su sekundarne strukture zapažene u tumorima i kod osoba s neurološkim poremećajima (17). Kvarteti gvanina slažu se jedan na drugoga i na taj način stvaraju G-kvadruplekse koji su stabilizirani interakcijama između aromatskih prstenova i često inter-kvartetnim kationom. Poznato je da G-kvadrupleksi mogu aktivirati ili inhibirati izražaja gena (18). Kod FXS-a tripleti CGG u genu *FMR1* mogu stvarati ukosnice i paralelne DNA G-kvadruplekse (Slika 4, E) što utječe na transkripciju samog gena (17). Zanimljiva je i činjenica da sam FMRP prepoznaje i veže se na takve sekundarne strukture u ciljnim mRNA (glasnička RNA, engl. *messenger RNA*), u dendritima živčanih stanica i tako ometa njihovu translaciju (17, 19). Utvrđeno je da G-kvadrupleksi posreduju interakciji FMRP-a s *Fmr1, Map1b, Psd95, Sema3F, App* mRNA te mnogim drugim mRNA molekulama (16). Vezanjem FMRP-a na vlastitu *Fmr1* mRNA sprječava izražaj samog FMRP-a.



Slika 4. Shematski prikaz G-kvadrupleksa. Moguće strukture kvarteta gvanina unutar G-kvadrupleksa: A – četiri paralelna lanca, B – dva lanca koja se ne sijeku, C – dva lanca koja se sijeku, D – jedan lanac. E – shematski prikaz utišavanja izražaja gena *FMR1* pomoću G-kvadrupleksa. Prilagođeno prema Shing i suradnici (18).

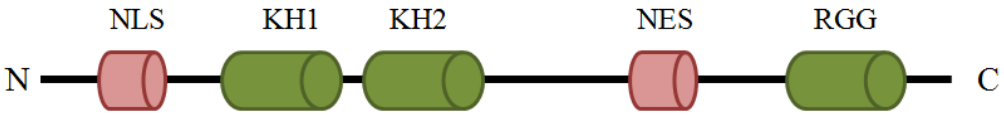
1.2. Gen *FMR1* i FMR protein

Gen *FMR1* smješten je na dugom kraku kromosoma X (Xq27.3). Sadrži 18 egzona i dug je 40 kb. Gen i protein konzervirani su kod ljudi, miševa, *Caenorhabditis elegans, Xenopus laevis* i *Drosophila melanogaster*. Najviše se eksprimira u mozgu, testisima, ovarijima, timusu, očima i slezeni. Molekula mRNA ima nekoliko alternativnih mjesta kidanja u egzonima 12, 14, 15 i 17. Time nastaju različite mRNA i različite izoforme proteina, od kojih svaki ima drugačija biokemijska svojstva (20, 21).

U 5' nekodirajućoj regiji nalazi se ponavljajući slijed tripleta CGG (22, 23). U normalnoj populaciji taj slijed tripleta visoko je polimorfan i sadrži od 6 do 50 ponavljanja tripleta CGG koji su isprekidani s dva tripleta AGG. Kada broj tripleta dosegne kritičnu granicu od 44 do 45 tripleta (tzv. siva zona) cijela regija postaje nestabilna i sklona širenju. Kada je broj ponavljanja tripleta veći od 200 dolazi do FXS-a za koji je karakteristično intelektualno zaostajanje. Kako je prethodno navedeno, povećanjem broja tripleta CGG dolazi do hipermetilacije CpG otoka u promotorskoj regiji gena i sprječavanja transkripcije i nastanaka FMRP-a. Ako je broj ponavljanja CGG veći od 200 i promotor je metiliran, radi se o punoj mutaciji gena *FMR1* (21). Što je veći broj tripleta AGG između tripleta CGG to je ta regija stabilnija i manje sklona širenju i nastanku premutacije ili mutacije. Somatska nestabilnost tijekom stadija rane embriogeneze stabilizirana je metilacijom DNA. Sama metilacija DNA povezana je s drugim epigenetičkim modifikacijama kromatina kao što su smanjena acetilacija histona H3 i H4 i smanjena metilacija lizina 4 histona H3, te povećana metilacija lizina 9 histona H3 (24, 25).

FMRP ima brojne funkcije. Izražen je u fetalnom tkivu i u tkivu odraslih osoba, ali najviše u mozgu i testisima (21, 26). Sadrži dvije ribonukleinske domene K homologije (KH1 i KH2

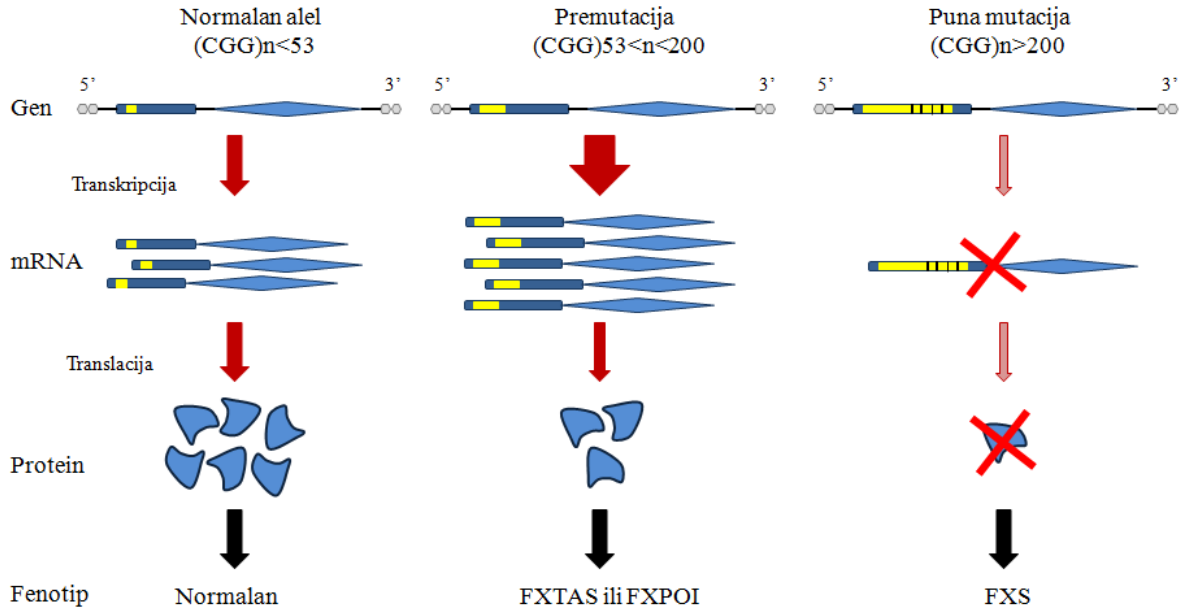
domene) i klastere argininskih i glicinskih ostataka (RGG slogovi) koji vežu molekule RNA. Također sadrži NLS regiju (engl. *Nuclear localization signal*) i NES regiju (engl. *Nuclear export signal*) (20, 26, 27) (Slika 5). RGG slog FMRP-a može se vezati na G-kvadrupleks molekule RNA smješten ili u 5'UTR ili u kodirajućoj regiji, te se FMRP ponaša kako represor translacije jer stabilizira tu strukturu i ometa vezanje ribosoma (27).



Slika 5. Shematski prikaz domena FMRP-a. NLS domena (engl. *Nuclear localization signal*), KH1 i KH2 domene (domene K homologije), NES domena (engl. *Nuclear export signal*), RGG domena (klasteri argininskih i glicinskih ostataka). Prilagođeno prema Valverde i suradnici (26).

FMRP je povezan s poliribosomima u citoplazmi i dendritima te aksonima živčanih stanica. U citoplazmi je povezan s polisomima gdje može spriječiti translaciju jer se veže na 5'-7-metilgvanozinsku kapu na mRNA (26, 28), ili može odugovlačiti vezanje ribosoma na mRNA koja zaostaje u citoplazmatskim granulama. Taj je proces selektivan i reverzibilan te uključuje fosforilaciju FMRP-a i njegovu interakciju s miRISC kompleksom (engl. *micro RNA induced silecing complex*) (21, 29, 30). Također, FMRP sudjeluje u transportu mRNA u sinapse gdje se odvija sinteza proteina te njegova količina raste nakon sinaptičke aktivacije (31, 32). FMRP ima važnu ulogu u razvoju središnjega živčanoga sustava jer u neuronima sisavaca djeluje kao regulator sinteze proteina na sinaptičkim mjestima dendrita gdje potiče sazrijevanje sinapsi. Stoga se smatra da intelektualno zaostajanje nastaje zbog neodgovarajućeg izražaja gena za vrijeme razvoja i održavanja sinapsi (21).

Dinamičke mutacije gena *FMR1* povezane su s tri različita poremećaja u kojima klinički fenotip ovisi o broju tripleta CGG (Slika 6).



Slika 6. Povezanost fenotipa s mutacijama u genu *FMR1*. Kod zdravih osoba broj tripleta CGG u 5'UTR regiji je od 5 do 53 (žuto) što dovodi do normalne transkripcije *FMR1* i normalne izražajnosti FMRP-a. Kod premutacije (od 53 do 200 tripleta CGG) nastaju veće količine *FMR1* mRNA, ali je smanjena izražajnost FMRP-a. To povećava rizik za razvoj FXTAS (engl. *Fragile X-associated temor/ataxia syndrome*) u muškaraca i FXPOI (engl. *Fragile X-associated primary ovarian insufficiency*) u žena. Puna mutacija (više od 200 tripleta CGG) dovodi do utišavanja gena *FMR1* zbog hipermetilacije promotora. U tom slučaju nema stvaranja proteina te nastaje FXS. Prilagođeno prema Hagerman i Hagerman (31).

Najčešća mutacija gena *FMR1* je promjena broja tripleta CGG u 5'UTR regiji, ali postoje i točkaste mutacije koje mogu uzrokovati FXS no one su vrlo rijetke (< 1 %). Također, u blizini ovog gena nalazi se FRAXE lokus gena *FMR2* (engl. *Fragile X Mental Retardation 2 gene*) koji može dovesti do lomljivog mjesta na X kromosomu. Gen *FMR2* sadrži nestabilna CCG ponavljanja čijim proširenjem može doći do nastanka blažeg fenotipa nesindromskog intelektualnog zaostajanja (22).

1.2.1. Sindrom fragilnoga X kromosoma

Najčešći uzrok nasljednog intelektualnoga zaostajanja nakon trisomije kromosoma 21 jest FXS te je to i najčešći genski uzrok autizma (23). FXS nazvan je prema prvobitnom načinu postavljanja dijagnoze. Za dijagnozu se koristila citogenetička analiza kromosoma limfocita nakon njihovoga kultiviranja u mediju siromašnom folnom kiselinom pri čemu postaje vidljivo lomljivo mjesto na dugom kraku X kromosoma u regiji Xq27.3 (33). FXS vezan je uz mutacije gena *FMR1*, od kojih je najčešća mutacija promjena broja ponavljanja tripleta CGG (22, 32, 34). Bolest se nasljeđuje kao X vezano dominantno svojstvo s nepotpunom penetracijom (80 % za muškarce i 35 % za žene) (22, 32). Učestalost premutacija u općoj populaciji je 1 na 259 žena te 1 na 813 muškaraca, dok je učestalost pune mutacije u općoj populaciji 1 : 7000 u muškaraca i 1 : 11000 u žena (35, 36). Nositelji premutacije su normalnih intelektualnih sposobnosti i uglavnom bez smetnji, premda se i kod njih opažaju određene smetnje ponašanja, sklonost depresiji, a kod žena i prerana insuficijencija ovarija. Ukoliko su žene nositeljice premutacije ili pune mutacije, tijekom oogeneze može doći do daljnje ekspanzije i prijenosa bolesti na potomke oba spola, premda je tijek bolesti kod djevojčica zbog inaktivacije jednoga X kromosoma tijekom rane embriogeneze blaži i varijabilan (22, 32, 35).

Fenotipsko očitovanje bolesti ovisi o količini stvorenoga FMRP-a te kod žena ono ovisi o aktivacijskom omjeru normalnoga i mutiranoga X kromosoma. Klinička slika nositelja punih mutacija ovisi o spolu i jače je izražena kod muškaraca. Glavna je osobina umjereno do izraženo intelektualno zaostajanje, a prisutne su i promjene ponašanja te anatomske promjene. Karakteristične osobine su izduženo lice s izbočenom bradom, velike uši, govorni i jezični

problemi, motorna i senzorna zakašnjenja te disfunkcije u ponašanju (20). Aleli koji sadrže od 54 do 200 ponavljanja CGG nazivaju se premutacijama, obično su nemetilirani i imaju normalnu ekspresiju i količinu FMRP-a, ali su izrazito nestabilni prilikom prenošenja na sljedeću generaciju. Osobe ženskoga spola koje imaju punu mutaciju pokazuju blaže simptome (13, 15, 21, 23, 32, 37, 38). Kod muškaraca s punom mutacijom nalazimo različit stupanj intelektualnog zaostajanja, a od fizičkih obilježja prisutne su povećane uši, izbočeno čelo, dugačko lice s istaknutom bradom te veliki testisi koji se pojavljuju nakon puberteta. Prisutne su i smetnje ponašanja kao hiperaktivnost, anksioznost, stidljivost, impulzivnost te smetnje učenja (20). Žene s punom mutacijom pokazuju općenito blaže simptome. Oko 60 % ima određen stupanj intelektualnog zaostajanja, a smetnje ponašanja i fenotipska obilježja sindroma kao dugo lice, izbočeno čelo, grube crte lica, krupan nos te istaknuta brada varijabilno su prisutni, ovisno o obrascu inaktivacije X kromosoma. Žene nositelji premutacijskih alela gena *FMR1* mogu imati povećani rizik ulaska u prijevremenu menopauzu jer se gen *FMR1* eksprimira u gonadama te utječe na razvoj jajnika (20).

Normalan broj tripleta CGG (6 – 44) prenosi se u stabilnom broju na potomstvo, dok se aleli s većim brojem tripleta mogu, ali i ne moraju, prenositi stabilno od roditelja na djecu (20). Aleli s 45 – 53 tripleta mogu biti nestabilni, no najmanji premutirani alel kod kojega je zabilježeno proširenje u samo jednoj generaciji imao je 59 tripleta CGG koji nisu isprekidani s tripletom AGG (20, 22, 39, 40). Istraživanja na životinjama pokazala su da je broj tripleta CGG puno stabilniji u miševa. Premutacijski aleli (54 – 200 tripleta CGG) su vrlo nestabilni kada se prenose s roditelja na djecu i obično se broj tripleta poveća u sljedećoj generaciji. Povećanje broja tripleta pozitivno je povezano s majčinim brojem tripleta CGG, gdje se > 90 tripleta gotovo uvijek poveća na punu mutaciju (> 200 tripleta CGG) u sljedećoj generaciji. Smatra se da se prijelaz od premutacije do pune mutacije događa prije stadija zigote (20, 27). Prijenos

FXS-a od premutacije do pune mutacije može se dogoditi tijekom oogeneze ili ranih postzigotnih događaja. Muškarci s FXS imaju punu mutaciju i metilirane CGG u 5'UTR regiji gena *FMR1* u svim tkivima, osim u spermi gdje je prisutna nemetilirana premutacija gena *FMR1* (15). Prijenos od premutacije do pune mutacije u djece putem oca vrlo je rijetko. Puna mutacija alela dovodi do hipermetilacije promotora gena *FMR1* i deacetilacije histona što dovodi do utišavanja transkripcije (20, 27). Metilacija CpG *cis*-elementa može stabilizirati proširenje tripleta CGG. Somatska nestabilnost tripleta CGG u FXS ograničena je na rani embrionalni i fetalni razvoj te završava u vrijeme koje se podudara s neprirodnom metilacijom proširenih CGG alela (15).

1.2.2. Primarna insuficijencija ovarija povezana s fragilnim X kromosomom

Nositeljice premutacijskih alela gena *FMR1* imaju povećani rizik za ulazak u prijevremenu menopauzu. Gen *FMR1* eksprimira se u gonadama te utječe na razvoj jajnika i primarnu insuficijenciju ovarija povezanu s FXS-om (engl. *Fragile X-associated primary ovarian insufficiency,* FXPOI). Žene ulaze u menopauzu s prosječnom dobi od 51 godine, dok žene s FXPOI-om ulaze u menopauzu prije 40-e godine života (23, 38).

Samo 1 % žena ulazi u menopauzu prije 40-e godine života, dok je kod nositeljica premutacije gena *FMR1* to 23 %. Smatra se da mRNA ima toksičan učinak na dinamiku ovarijskih folikula, te je FMRP visoko izražen u oocitama i granuloznim stanicama humanih jajnika tijekom folikulogeneze (21).

Istraživanja na miševima pokazala su da životinje s mutiranim genom brže gube primordijalne folikule jajnika što upućuje na problem unutar samog jajnika. Također, mnoge oocite akumuliraju velike količine FMRP-a i imaju povećanu ubikvitinaciju, dok su primordijalne folikule manje i sadrže manje granuloznih stanica. Sve to ukazuje da su u molekularnu pozadinu FXPOI-a uključene promjene u oocitama i granuloznim stanicama jajnika (41).

1.2.3. Sindrom tremora i ataksije povezan s fragilnim X kromosomom

Osobe oba spola koje su nositelji premutacije imaju povećan rizik za razvoj blažih kognitivnih poremećaja i poremećaja u ponašanju ili pak sindroma tremora i ataksije povezanog s FXS-om (engl. *Fragile X-associated temor/ataxia syndrome*, FXTAS) (23, 38). Klinički simptomi variraju od progresivne demencije, periferne neuropatije i parkinsonizma. Pogođene ženske osobe, nositeljice premutacije, imaju blažu kliničku sliku od muškaraca. Penetrantnost FXTAS-a povećava se sa životnom dobi i brojem tripleta CGG, iako postoje i iznimke. Tako je FXTAS dijagnoza postavljena osobi u 55. godini života koja je imala samo 52 tripleta CGG (42). Otprilike 40 % nositelja premutacije i 8 – 16 % nositeljica premutacije razvije FXTAS nakon 50-e godine života. Smatra se da je drugi X kromosom bez premutacije razlog manje penetrantnosti FXTAS-a u žena (21, 43, 44). Istraživanja na miševima pokazala su da kod FXTAS-a dolazi do poremećaja funkcije mitohondrija što utječe na samu staničnu funkciju, te su takve promjene vidljive već u neonatalnom razvoju miša (45).

Kod FXS-a dolazi do gubitka funkcije FMRP-a jer nema transkripcije i translacije, dok je zbog toksičnosti velike količine mRNA s premutacijom otežano vezanje RNA za proteine (37, 46). Smatra se da stvaranje DNA G-kvadrupleksa u regiji tripleta CGG gena *FMR1* ima ulogu u nastanku FXTAS-a, jer malo povećanje broja tripleta ne utječe značajno na transkripciju gena, ali je smanjena razina FMRP-a (17).

1.2.4. Životinjski modeli sindroma fragilnoga X kromosoma

Razvijeni su brojni životinjski modeli za proučavanje utjecaja nedostatka FMRP-a na ponašanje. Ni jedan od životinjskih modela nije isti kao humani, jer se utišavanje gena *FMR1* ne događa zbog metilacije, nego su životinjski modeli dobiveni potpunim gubitkom transkripta gena *Fmr1* (21).

Protein dFmrp vinske mušice (*D. melanogaster*) dijeli 56 % sličnosti s humanim proteinom. Vinska mušica bez gena *dFmr* anatomski je normalna mušica s promijenjenim ponašanjem te s problemima pamćenja i učenja. *Drosophila* je korištena za pretraživanje kemijske baze od 2000 molekula te je otkriveno da devet molekula ima mogućnost spašavanja fenotipa, od kojih tri sudjeluju u inhibitornom putu receptora za gama-amino-maslačnu kiselinu (engl. *Gamma-Aminobutyric Acid*, GABA). Korištenje tih molekula dovelo je do spašavanja fenotipa *dFmr* mutiranih mušica (32, 47). Na FXS modelu *Drosophile* otkriven je toksičan učinak glutamata te su prvi lijekovi za FXS, anatagonisti glutamatskoga receptora, testirani na vinskoj mušici (47).

Model zebrice (*Danio rerio*) s isključenim genom *Fmr1* dobar je za proučavanje embrionalnog razvoja te ima sličan fenotip kao i FXS, uključujući abnormalno grananje aksona, ali nema klinički očitoga fenotipa (32).

Prvi miš (*Mus musculus*) s isključenim genom *Fmr1* napravljen je prekidom egzona 5 pomoću neomicina. Mišji model nije potpuno isti kao humani model FXS-a jer gen nije utišan zbog metilacije nakon povećanja broja tripleta CGG. Model s neomicinom ima gotovo potpuni nedostatak transkripta Fmr1 i potpuni gubitak Fmrp-a. Miševi s isključenim genom *Fmr1* pokazuju poteškoće u učenju i povećanu lokomotornu aktivnost (32, 48, 49).

1.3. Molekularna dijagnostika dinamičkih mutacija gena *FMR1*

Rousseau i suradnici objavili su 1991. godine kako *Southern blot* metodom odrediti točan broj tripleta CGG u genu *FMR1* i status metilacije promotora istoga gena. Za određivanje promjena broja ponavljanja tripleta CGG u genu *FMR1* najčešće se koristi *Southern blot* metoda koja predstavlja zlatni standard za dijagnostiku promjene broja tripleta CGG u genu *FMR1*. Ta je metoda dugotrajna i zahtjeva korištenje radioaktivno obilježenih sondi te velike količine genomske DNA (46, 50, 51). Tek 2011. godine napravljeni su testovi koji se temelje na lančanoj reakciji polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), a kojima je moguće odrediti tip mutacije gena *FMR1* (normalan, premutacija ili mutacija) kao i status metilacije. Većina testova temeljenih na PCR metodi zahtijeva i sekvenciranje 5' regije gena *FMR1* (52, 53). Brži probir osoba s intelektualnim zaostajanjem za određivanje promjena broja ponavljanja CGG u genu *FMR1* moguć je primjenom metode lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real time PCR*) uz analizu krivulje mekšanja DNA. Na ovaj se način može brže utvrditi je li netko nositelj mutacije ili premutacije ako u obitelji postoji pozitivna anamneza za FXS, FXPOI ili FXTAS (22, 46, 50, 51) ili pak klinička slika koja odgovara FXS-u (54).

Metoda hibridizacije po Southernu najčešće se koristi za molekularno otkrivanje bolesti. Genomska DNA razgradi se s određenim restrikcijskim endonukleazama, a nastali odsječci koji sadrže slijed tripleta elektroforetski se razdvoje i prenesu na membranu. Nakon hibridizacije sa specifično obilježenom sondom i autoradiografije može se odrediti veličina odsječaka usporedbom s biljegom poznate molekularne mase te dokazati prisutnost produljenog slijeda tripleta (38, 55, 56).

Najčešće se koristi kombinacija PCR metode i hibridizacije po Southernu kao potvrda PCR-a. Postoji više načina izvedbe PCR reakcije za određivanje broja tripleta.

Prvo: neradioaktivna produžena PCR metoda (57). PCR-om se umnožavaju tripleti CGG normalnoga i premutiranoga alela kao i alela s punom mutacijom u genu *FMR1*. Nakon prvih 10 ciklusa reakcija se zaustavlja stavljanjem na led, zatim slijedi denaturacija i dodavanje enzima te se nastavlja još 30 ciklusa. PCR produkti se razdvajaju na 1,2 %-tnom agaroznom gelu s molekularnim markerom te se prenesu na pozitivno nabijenu najlonsku membranu. Nakon toga slijedi denaturacija i neutralizacija. DNA se imobilizira na membrani pomoću UV svjetla. Slijedi prehibridizacija od jednog sata, zatim hibridizacija sa sondom obilježenom digoksigeninom, (DIG) $5'$-$(CGG)_5$-$3'$, u hibridizacijskom puferu na 60 °C tijekom 16 sati. Nakon ispiranja membrane, vrpce se detektiraju luminiscentnim test kompletom (58, 59).

Druga metoda obuhvaća uporabu bisulfitnoga tretmana nakon izolacije DNA. Potom slijedi PCR reakcija u kojoj se koriste početnice za umnožavanje CpG otoka smještenih uzvodno od ponavljajućih tripleta koji su specifični za umnožavanje metiliranih citozina prisutnih u osoba s FXS-om i normalnom genu *FMR1* inaktiviranog X kromosoma. Za umnožavanje fragmenata koji sadrže ponavljanja tripleta koriste se druge početnice. PCR produkti razdvoje se na 2 %-tnom agaroznom gelu koji sadrži etidijev bromid te se fotografiraju. Nedostatak ovoga metilacijskog PCR-a je da se ne mogu dijagnosticirati pacijentice s FXS-om zbog činjenice da je inaktivirani X kromosom već metiliran (38).

Novije metode za probir mutacija gena *FMR1* mogu se primijeniti na razini populacije zbog relativno velike učestalost premutacija i mutacija u genu *FMR1* (20).

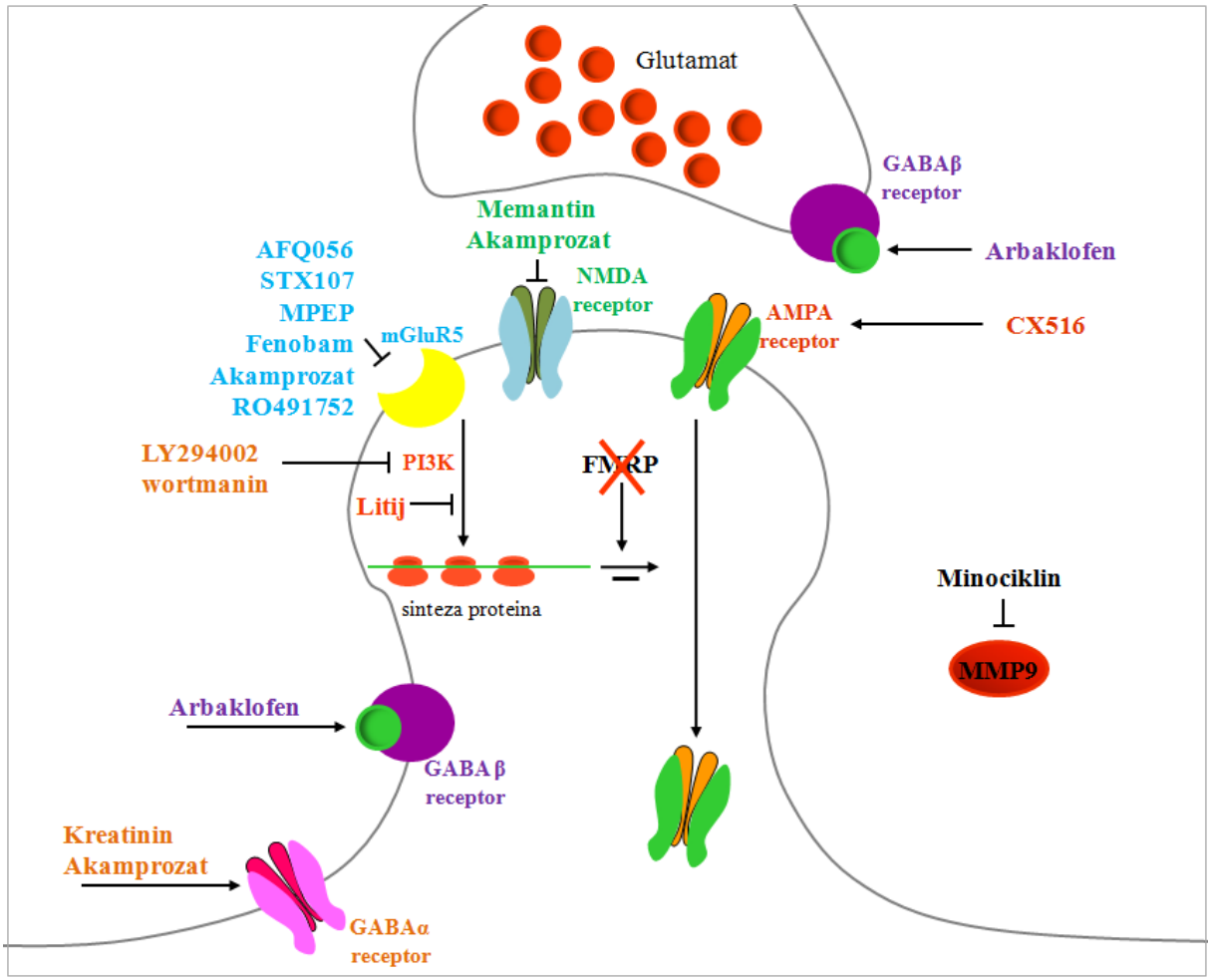
1.4. Mogućnosti liječenja

Kod FXS-a važna su dva neurotransmiterska receptora na sinaptičkoj membrani: glutamatski receptor (engl. *metabotropic glutamate receptors*, mGluR) i receptor za GABA. mGluR izražen je u cijelom mozgu i važan je za plastičnost sinapsi (21, 60, 61). Poremećaj mGluR-a ima slične simptome kod ljudi kao i kod miševa s isključenim genom *Fmr1*: povećana sinteza dendritičkih proteina nakon aktivacije receptora te slično ponašanje. Receptori za GABA imaju važnu ulogu u mnogim kliničkim entitetima kao što su epilepsija, hiperaktivnost, učenje, autizam – što je vidljivo u osoba s FXS-om i potvrđeno na životinjskim modelima miševa i *D. melanogaster* (21).

Nove mogućnost liječenja zasnivaju se na uključenosti mGluR-a i receptora za GABA u FXS-u (21,62). *D. melanogaster* s mutiranim genom *Fmr1* umire ako je hranjena hranom s velikim udjelom glutamata, što potvrđuje teoriju da gubitak *FMR1* dovodi do povećane signalizacije i aktivacije glutamatskoga receptora. Takve su mušice okarakterizirane kao mušice koje boluju od sindroma kineskog restorana, jer je mutacija *Fmr1* u nekim laboratorijima bila letalna, a u nekima nije. Ispostavilo se da je to zbog velikog udjela glutamata u hrani baš kao kod ljudi koji su patili od istog sindroma (47).

Prema teoriji mGluR-a nedostatak FMRP-a dovodi do pretjerane sinteze proteina u FXS-a te aktivacije mGluR-a. mGluR5 je potencijalna meta lijekova, jer se blokiranjem toga receptora smanjuje pretjerana sinteza proteina i promijenjena sinaptička plastičnost kod FXS-a. Antagonisti mGluR-a ispitivani su na životinjskim modelima FXS-a kod kojih je došlo do poboljšanja nekih kliničkih manifestacija sindroma (32). Napravljene su i kliničke studije antagonista mGluR-a. Ispitivan je utjecaj mavogluranata (AFQ056), antagonista mGluR-a

(Slika 7), te je u dvostruko slijepoj studiji od 30 muškaraca s FXS-om pokazano da poboljšava ponašanje i kognitivne funkcije u odnosu na grupu u kojoj se koristio placebo (21, 32, 63).



Slika 7. Mogućnosti liječenja FXS-a. Shematski prikaz ekscitorne i inhibitorne sinapse kod nedostataka FMRP. Nekoliko tipova lijekova može djelovati na različite receptore neurona što može dovesti do spašavanja poremećene transmisije sinapsi kod FXS. Prilagođeno prema Levenga i suradnici (61).

Prema drugoj je teoriji kod FXS-a pogođen GABA-put zbog čega dolazi do epileptičkih napadaja i poremećaja spavanja. U životinjskim modelima pokazano je kako agonist GABA-receptora, alfaksalon, smanjuje anksioznost i napadaje, dok agonist, gaboksadol, smanjuje hiperaktivnost. U kliničkom istraživanju STX209, agonist GABA, u dvostruko slijepoj studiji,

uz korištenje placeba na 63 ispitanika s FXS-om pokazano je da utječe na socijalno ponašanje ispitanika (32, 48, 63, 64), kao i arbaklofen (agonist GABA-receptora) (21) (Slika 7).

Kada nema FMRP-a dolazi do povećanoga stvaranja metaloproteinaze 9 u matriksu (MMP9, engl. *matrix metaloproteinase*) što je povezano s epileptičkim napadajima. Preliminarna studija provedena na 50 ispitanika s FXS-om koji su dobivali minociklin (djeluje na MMP9) najmanje dva tjedna, pokazala je poboljšanje u njihovu pamćenju, jeziku i ponašanju, a druga studija na 20 ispitanika s FXS-om zabilježila je poboljšanje u ponašanju (32, 63) (Slika 7).

Sva do sada provedena klinička istraživanja različitih lijekova za FXS dovela su do slabljenja određenih simptoma ovoga sindroma, ali ne dovoljno da bi se nastavio njihov razvoj i faza III kliničkih ispitivanja jer je ustanovljeno kako lijekovi pomažu samo kod blagoga intelektualnog zaostajanja, ali ne i kod teškoga (65). Tako su faze II kliničkih istraživanja Novartisa za AFQ056 i Rochea za RG7090 prekinute 2014. godine jer testirani lijekovi, antagonosti mGluR5, nisu pokazali značajno poboljšanje simptoma u odnosu na grupu s placebom.

2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA

2.1. Hipoteza

Osnovna pretpostavka istraživanja je da će se upotrebom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu moći odrediti okviran broj tripleta CGG te utvrditi premutacija i puna mutacija gena *FMR*1.

2.2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi provedenoga istraživanja su sljedeći:

1. Validacija metode izravnoga PCR-a s tri početnice (engl. *direct triplet-primed PCR*, dTP-PCR) za određivanje dinamičkih mutacija gena *FMR1*.

2. Usporedba rezultata dobivenih metodom dTP-PCR-a s rezultatima dobivenim *Southern blot* metodom.

3. ISPITANICI I METODE

Validacija metode provedena je kao slijepo istraživanje u kojem je korišteno 40 nasumično izabranih uzoraka pacijenta sa sumnjom na FXS. Istraživanje je odobreno od strane Etičkoga povjerenstva KBC-a Osijek pod brojem R2-1:18722-12/2015 i Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 251-62-03-16-2.

3.1. Ispitanici

Uzorak ispitanika sastojao se od pacijenata upućenih u Ambulantu za genetiku i bolesti metabolizma pri Klinici za pedijatriju KBC-a Osijek. U Ambulanti za genetiku i bolesti metabolizma obrađeni su pedijatrijski pacijenti te odrasli članovi njihovih obitelji ukoliko je utvrđeno postojanje nasljednoga poremećaja.

Kriteriji za uključivanje ispitanika u istraživanje jesu fenotipske karakteristike povezane s FXS-om prema kontrolnoj listi navedenoj u Tablici 1.

Kriteriji za isključivanje su fenotipske osobine koje ukazuju na neki od sindroma povezanih s intelektualnim zaostajanjem (npr. trisomija 21) i promjene kromosoma (translokacije, delecije, duplikacije).

Istraživanje je provedeno na skupini od 40 ispitanika.

Od svih skrbnika ispitanika zatražen je pristanak obaviještene osobe za sudjelovanje u istraživanju.

U istraživanju su korišteni kontrolni uzorci koji su komercijalno dostupni te nabavljeni od Coriell instituta za medicinska istraživanja (GM06890, GM20244, GM20230, Camden, New Jersey, USA).

Tablica 1. Kontrolna lista za uključivanje ispitanika.

Fenotipske karakteristike FXS-a
Intelektualno zaostajanje
Pozitivna obiteljska anamneza za intelektualno zaostajanje
Poremećaji ponašanja (hiperaktivnost, pljeskanje rukama, slab kontakt očima)
Velike ili istaknute uši
Izduženo lice
Makrocefalija

3.2. Metode

Broj ponavljanja tripleta CGG određen je u dva neovisna postupka tako da se dobije uvid u ponovljivost testa. Točnost svih analiza provjerena je temeljem nalaza dobivenih referentnom *Southern blot* metodom za određivanje broja ponavljanja tripleta CGG.

Osjetljivost i specifičnost metode od > 90 % postignuta je validacijom metode s najmanje 30 uzoraka prema ‘pravilu od 3’ (3/n = vjerojatnost lažno negativnog rezultata, 100 % - [100*(3/n)] = % osjetljivosti = % specifičnosti, gdje je n broj korištenih uzoraka za validaciju) (1). Ponovljivost analize utvrđena je na temelju rezultata dobivenih za isti uzorak u duplikatu. Srednja točnost metode određena je analizom istih uzoraka u istom laboratoriju i istom

metodom, ali nakon određenog vremenskog perioda. Reproducibilnost dTP-PCR metode utvrđena je na temelju rezultata dobivenih za isti uzorak u različitim laboratorijima i različitim metodama (usporedba rezultata metode krivulje mekšanja DNA i referentne *Southern blot* metode).

3.2.1. Izolacija DNA iz pune krvi

Izolacija genomske DNA iz 200 µl pune krvi napravljena je prema standardnom protokolu proizvođača (66).

Izolacija je napravljena na tzv. „mini spin“ kolonama pomoću kompleta kemikalija *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany). Od kemikalija korištena je proteinaza K za razgradnju proteina, AL pufer za lizu stanica i etanol za precipitaciju DNA, te puferi različite ionske jakosti. Na kraju izolacije, DNA se čuvala u AE puferu na -20 °C.

3.2.2. Izravna lančana reakcija polimeraze s tri početnice

Okviran broja tripleta CGG određen je metodom izravne fluorescentne lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu s tri početnice uz analizu krivulje mekšanja DNA (50, 51) kompletom kemikalija FastFraX^{TM} FMR1 Identification kit (The Biofactory, Singapur) na Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR uređaju (Thermo Fisher Scientific, Foster City, California, USA).

U ovoj metodi koristi se fluorescentno obilježena uzvodna početnica uzvodno od (CGG)n regije i kimerna nizvodna početnica koja se veže unutar (CGG)n regije. Kimerna početnica

hibridizira na mnoga mjesta unutar (CGG)n regije te pri tome nastaju PCR produkti različite duljine (51, 67).

PCR reakcija napravljena je u volumenu od 25 µl uz korištenje 50 ng genomske DNA te je svaki uzorak napravljen u duplikatu. Uvjeti PCR reakcije prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Uvjeti PCR reakcije

Korak	Temperatura i vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95 °C, 15 minuta	1
Denaturacija	99 °C, 2 minute	40
Vezanje početnica	65 °C, 2 minute	
Sinteza komplementarnog lanca	72 °C, 3 minute	
Konačno produženje	72 °C, 10 minuta	1
Denaturacija	95 °C, 1 minuta	1
Krivulja taljenja	60 °C, 1 minuta	1
	99,9 °C, 30 sekundi	1

dTP-PCR metodom moguće je razlikovati normalan broj ponavljanja tripleta od premutacije kao i punu mutaciju kod pogođenih muškaraca i žena. Metoda se temelji na kombinaciji umnožavanja sljedova unutar samih tripleta CGG. Koriste se dva para početnica napravljena tako da umnožavaju nemodificiranu DNA. Jedan par početnica veže se na 3' kraj regije ponavljanja tripleta, dok se drugi veže na 5' kraj ponavljajućih tripleta (Slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz mjesta vezanja početnica u odnosu na regiju tripleta CGG.

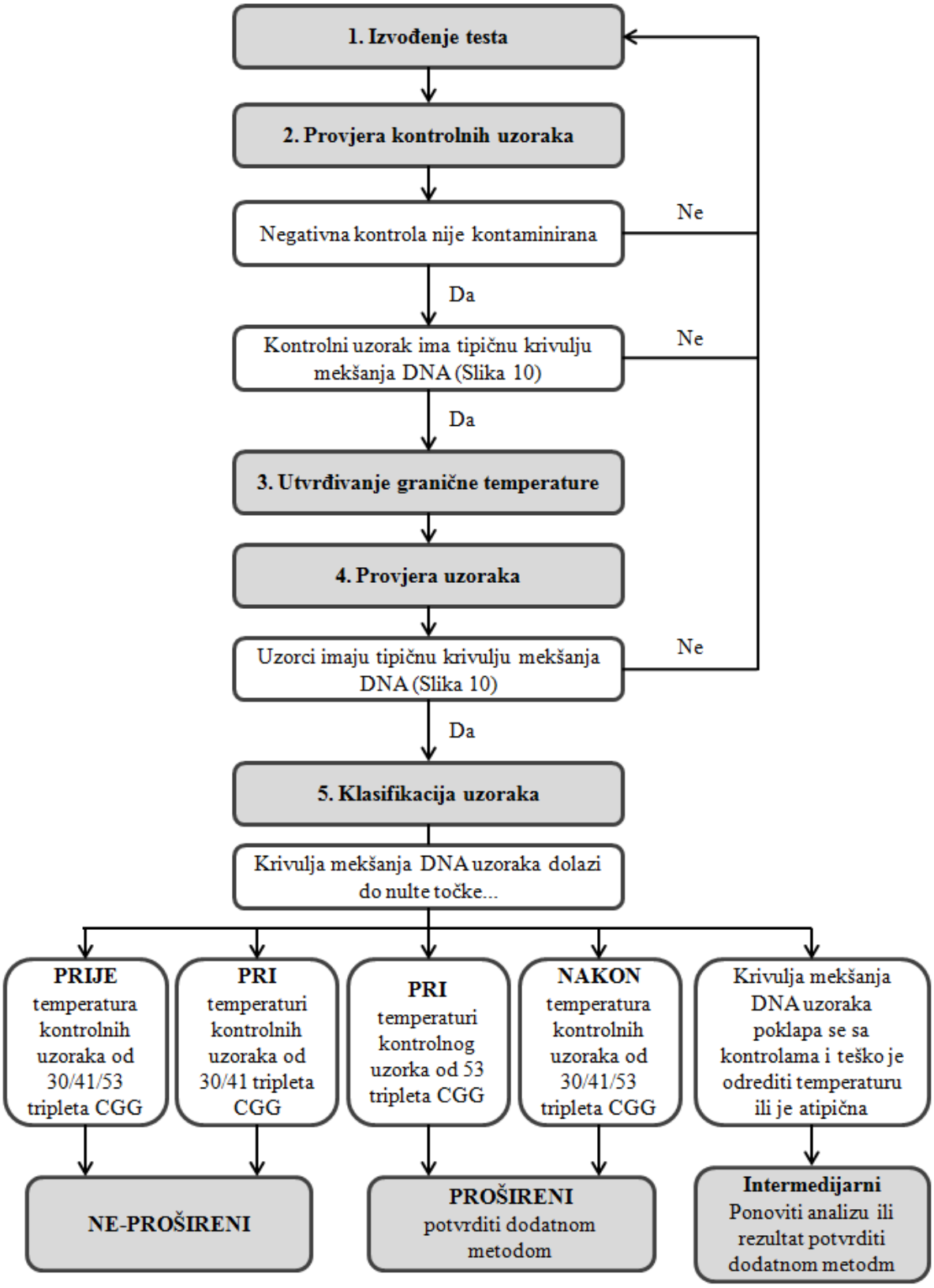
Nakon umnožavanja napravljena je krivulja mekšanja DNA povišenjem temperature od 60 °C do 99,9 °C u koracima od 0,5 °C uz praćenje intenziteta fluorescencije. Kako dolazi do razdvajanja lanaca dvolančane DNA povećanjem temperature, tako količina fluorescencije pada. Temperatura mekšanja PCR produkata određuje se iz ovisnosti intenziteta fluorescencije i temperature, kao prva derivacija pada intenziteta fluorescencije u odnosu na porast temperature (-dF/dT). Temperatura denaturacije DNA ovisi o sastavu dušičnih baza i veličini PCR produkta. PCR produkti proširenih alela su veći i imaju više tripleta CGG nego normalni aleli, stoga se krivulja mekšanja takvih uzoraka razlikuje od normalnih alela, a nultu vrijednost -dF/dT dostižu na većim temperaturama. Što je veći broj ponavljanja tripleta CGG to je viša temperatura pri kojoj dolazi do denaturacije lanaca DNA jer se gvanin i citozin međusobno sparuju stvarajući tri vodikove veze te je potrebno uložiti veću energiju (što se postiže višom temperaturom) da bi se pokidao veći broj vodikovih veza između dva komplementarna lanca DNA. Također, na temperaturu mekšanja DNA utječe i ionska jakost. Kako su fosfatne skupine u okosnici molekule DNA negativno nabijene, u prosjeku na svaki par baza dolaze i po dva negativna naboja na okosnici. Tolika koncentracija negativnog naboja destabilizira zavojnicu. Veća ionska jakost i veći PCR produkti povećavaju dielektričnu konstantu te raste temperatura mekšanja DNA. Osim sastava baza i ionske jakosti, na temperaturu mekšanja DNA utječe pH i molekule koje mogu stvoriti vodikove

veze s funkcionalnim skupinama baza u sastavu DNA. Kod mutacije gena *FMR1* na temperaturu mekšanja utječe sastav baza i ionska jakost, odnosno veličina PCR produkta. Točka mekšanja normalnoga alela i premutacije, te alela s punom mutacijom, određuje se primjenom kontrolnih uzoraka s poznatim brojem tripleta CGG. Na temelju različitih krivulja mekšanja mogu se razlikovati normalni, premutacijski aleli kao i aleli s punom mutacijom (51, 67).

Svi ispitanici na temelju krivulje mekšanja DNA svrstani su u četiri kategorije: normalan broj tripleta CGG (≤ 44 ponavljanja CGG), siva zona (od 45 do 53 ponavljanja CGG), premutacija (od 54 do 200 ponavljanja CGG) i puna mutacija (> 200 ponavljanja CGG).

3.3. Interpretacija rezultata

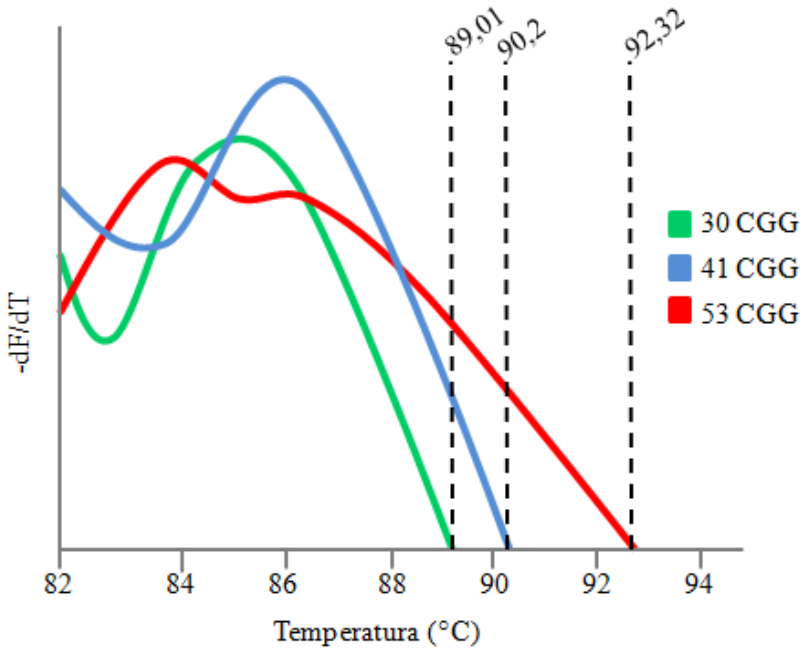
Nakon završetka procesa denaturacije DNA program automatski generira grafički prikaz krivulje mekšanja DNA s negativnom prvom derivacijom fluorescencije u odnosu na temperaturu. Interpretacija rezultata nakon provedenog testa izvodi se prema shemi na Slici 9.



Slika 9. Shema interpretacije rezultata nakon provedene dTP-PCR metode.

Temperature pri kojoj –dF/dT dosegne nultu točku za kontrolne uzorke, uzima se kao granična vrijednost (67). Na temelju dobivenih graničnih vrijednosti temperatura za kontrolne uzorke, ispitivani uzroci svrstavaju se u kategorije. Ako je nulta točka –dF/dT uzorka postignuta prije granične temperature, za kontrolne uzorke kažemo da je alel normalan. Ako je nulta točka –dF/dT uzorka postignuta nakon granične temperature, za kontrolne uzorke kažemo da je alel proširen.

Pacijente svrstavamo u jednu od kategorija na temelju rezultata krivulje mekšanja kontrolnih uzoraka koji su dostupni komercijalno. Potrebna su tri kontrolna uzorka: 53, 41 i 30 tripleta CGG da bismo pacijenta mogli svrstati u određenu kategoriju. Kontrolnim uzorkom koji sadrži 30 ponavljanja tripleta CGG određuje se radi li se o normalnom ili proširenom alelu, dok kontrolnim uzorcima koji sadrže 41 i 53 ponavljanja tripleta CGG može se točno odrediti pripada li pacijent kategoriji s normalnim alelom, sivoj zoni, premutaciji ili pak punoj mutaciji (Slika 10).



Slika 10. Krivulja mekšanja DNA kontrolnih uzoraka.

3.4. Statističke metode

Napravljena je deskriptivna statistička obrada dobivenih rezultata i korištene su adekvatne statističke metode iz programskog paketa Statistica 12.7 (StatSoft Inc. TULSA, OK, USA).

U postupku validacije dTP-PCR metode određena je osjetljivost, specifičnost metode te njena pozitivna i negativna prediktivna vrijednost kao i podudarnost s referentnom metodom prema formulama u Tablici 3.

Tablica 3. Matematičke formule korištene u validaciji dTP-PCR metode.

SP – stvarno pozitivan nalaz LP – lažno pozitivan nalaz PPV – pozitivna prediktivna vrijednost	SN – stvarno negativan nalaz LN – lažno negativan nalaz NPV – negativna prediktivna vrijednost
$Osjetljivost = \frac{SP}{SP + LN}$	$Specifičnost = \frac{SN}{SN + LP}$
$PPV = \frac{SP}{SP + LP}$	$NPV = \frac{SN}{SN + LN}$
$Podudarnost = \frac{SP + SN}{SP + SN + LP + LN} = \frac{broj\ pozitivnih\ procjena}{sve\ procjene}$	

4. REZULTATI

Na temelju krivulje mekšanja DNA tri kontrolna uzorka Coriell instituta za medicinska istraživanja određene su srednje vrijednosti graničnih temperatura (Tablica 4) za razvrstavanje uzoraka ispitanika u četiri kategorije.

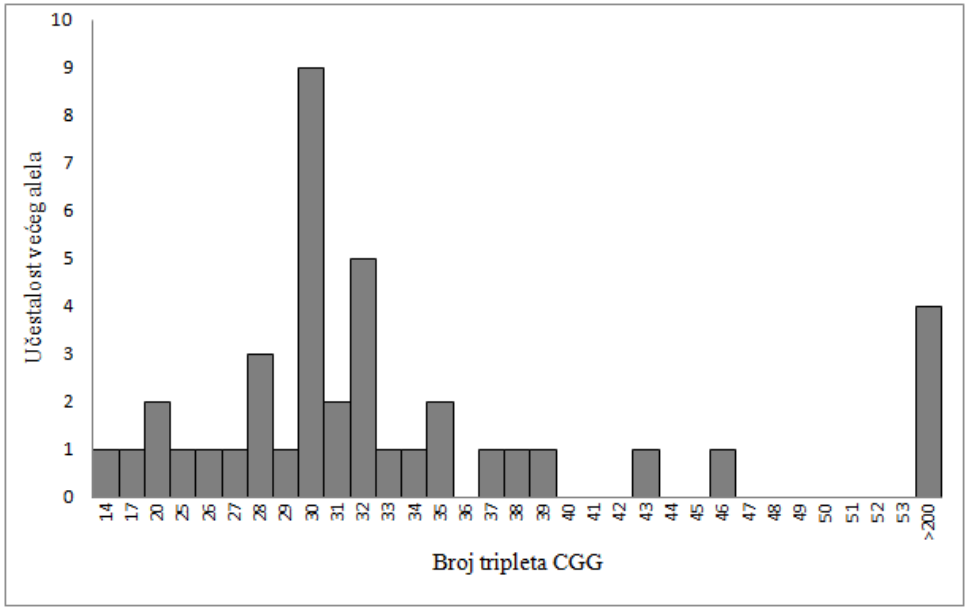
Tablica 4. Srednja temperatura mekšanja DNA kontrolnih uzoraka.

Broj tripleta CGG	30 CGG	41 CGG	53 CGG
Srednja Tm / °C	89,01	90,20	92,32

Analizirano je 40 nasumičnih uzoraka ispitanika čiji je broj tripleta CGG prethodno određen *Southern blot* metodom (Tablica 5). Od osam ženskih uzoraka ispitanika njih pet su heterozigoti za broj tripleta CGG na dva alela gena *FMR1*. Učestalost različitih veličina tripleta CGG prikazana je na Slici 11 iz koje je vidljivo da je najveći broj ispitanika imao 30 tripleta CGG (22,5 %), dok ispitanika s premutacijom (54 – 200 tripleta CGG) nije bilo u ispitivanom uzorku.

Tablica 5. Genotipovi nasumičnih uzoraka DNA pacijenata sa sumnjom na FXS (n = 40)

		Broj CGG određen Southern blotom	
Laboratorijska oznaka	Spol	Alel 1	Alel 2
Normalni aleli (≤ 30 CGG)			
1	M	14	
2	M	17	
3	M	20	
4	Ž	20	20
5	M	25	
6	M	26	
7	M	27	
8	M	28	
9	M	28	
10	M	28	
11	M	29	
12	M	30	
13	M	30	
14	M	30	
15	M	30	
16	M	30	
17	M	30	
18	M	30	
19	M	30	
20	Ž	30	30
Siva zona (31 – 53 CGG)			
21	Ž	27	31
22	Ž	27	31
23	M	32	
24	M	32	
25	M	32	
26	M	32	
27	Ž	32	32
28	M	33	
29	M	34	
30	Ž	22	35
31	Ž	24	35
32	M	37	
33	M	38	
34	M	39	
35	M	43	
36	M	46	
Premutacija / puna mutacija (≥ 54 CGG)			
37	Ž	32	>200
38	M	>200	
39	M	>200	
40	M	>200	



Slika 11. Učestalost veličine tripleta CGG kod 40 ispitanika. Kod heterozigotnih uzoraka (osobe ženskog spola) samo alel s većim brojem tripleta uzet je u obzir.

Na temelju krivulje mekšanja DNA uzoraka ispitanika pomoću graničnih vrijednosti temperatura kontrolnih uzoraka, ispitanici su razvrstani u četiri kategorije (Tablica 6), te je najviše onih koji imaju alele s do 30 tripleta CGG.

Tablica 6. Klasifikacija ispitanika na temelju rezultata krivulje mekšanja DNA.

	Normalan alel (≤ 30 CGG)	Siva zona (31-53 CGG)	Premutacija (54-200 CGG)	Puna mutacija (≥ 200 CGG)	Ukupno
Muškarci	18	11	0	3	32
Žene	2	5	1	0	8
Ukupno	20	16	1	3	40

Učinkovitost dTP-PCR metode ovisi o korištenim graničnim vrijednostima temperature mekšanja DNA različitih kontrolnih uzoraka za interpretaciju samih rezultata. Kao što je vidljivo iz Tablice 7, uzorci se klasificiraju kao prošireni ako imaju alele od > 30, > 41 ili pak > 53 tripleta CGG. Podudarnost rezultata dTP-PCR metode i referentne metode iznosi 90 %,

95 % i 97,5 % kada su korištene granične vrijednosti temperatura kontrolnih uzoraka od 30, 41 i 53 tripleta CGG.

Tablica 7. Klasifikacija uzoraka DNA ispitanika dTP-PCR metodom korištenjem graničnih vrijednosti temperatura različitih kontrolnih uzoraka.

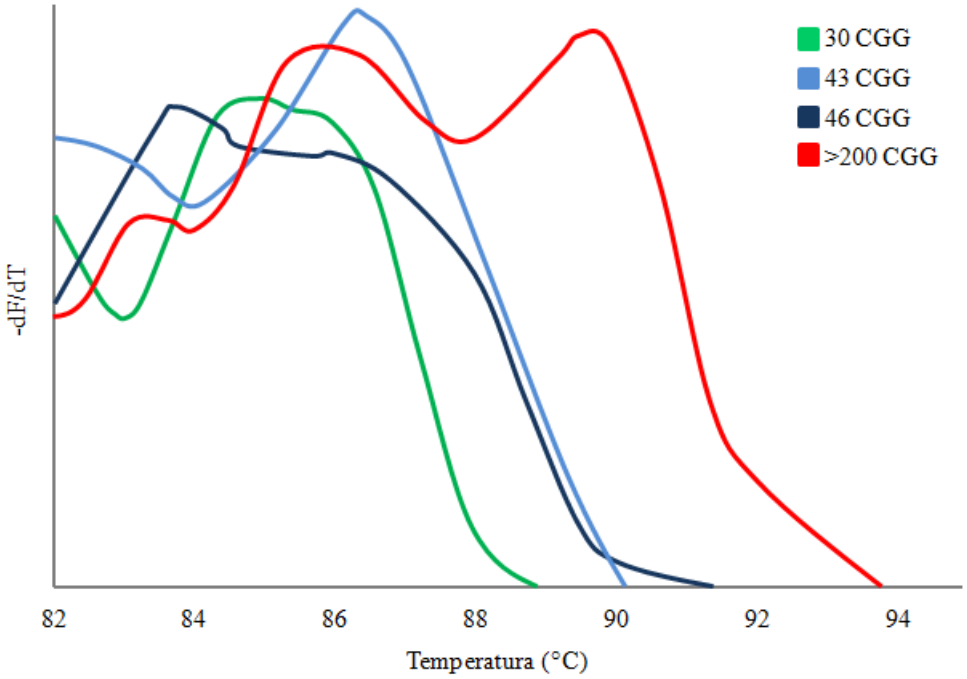
	Genotipovi uzoraka (n=40)				
Klasifikacija nakon krivulje mekšanja	Normalan (≤30 CGG)	Siva zona (31-53 CGG)	Premutacija (54-200 CGG)	Puna mutacija (≥200 CGG)	Podudarnost, %*
Granična vrijednost kontrolnog uzorka 53 CGG					
Normalan (≤53 CGG)	20	15	0	1	95
Intermedijarni	0	0	0	0	
Proširen (>53 CGG)	0	1	0	3	
Granična vrijednost kontrolnog uzorka 41 CGG					
Normalan (≤41 CGG)	20	15	0	0	97,5
Intermedijarni	0	0	0	0	
Proširen (>41 CGG)	0	1	0	4	
Granična vrijednost kontrolnog uzorka 30 CGG					
Normalan (≤30 CGG)	17	15	0	0	90
Intermedijarni	0	0	0	0	
Proširen (>30 CGG)	3	1	0	4	
Ukupan broj uzoraka	20	16	0	4	

*Postotak podudarnosti određen je na temelju udjela uzoraka koji su određeni kao normalni i prošireni (prošireni i intermedijarni) u odnosu na genotipove dobivene referentnom metodom s različitim graničnim vrijednostima temperatura mekšanja DNA kontrolnih uzoraka.

Srednja temperatura mekšanja DNA 40 ispitivanih uzoraka dobivena dTP-PCR metodom dana je u Tablici 8, dok su na Slici 12 prikazane krivulje mekšanja DNA četiri uzorka ispitanika iz tri kategorije alela (normalan, siva zona i puna mutacija).

Tablica 8. Srednja temperatura mekšanja DNA ispitivanih uzoraka.

Broj tripleta CGG	≤ 30 CGG	31-53 CGG	> 54 CGG
Srednja Tm / °C	86,42	87,19	92,58



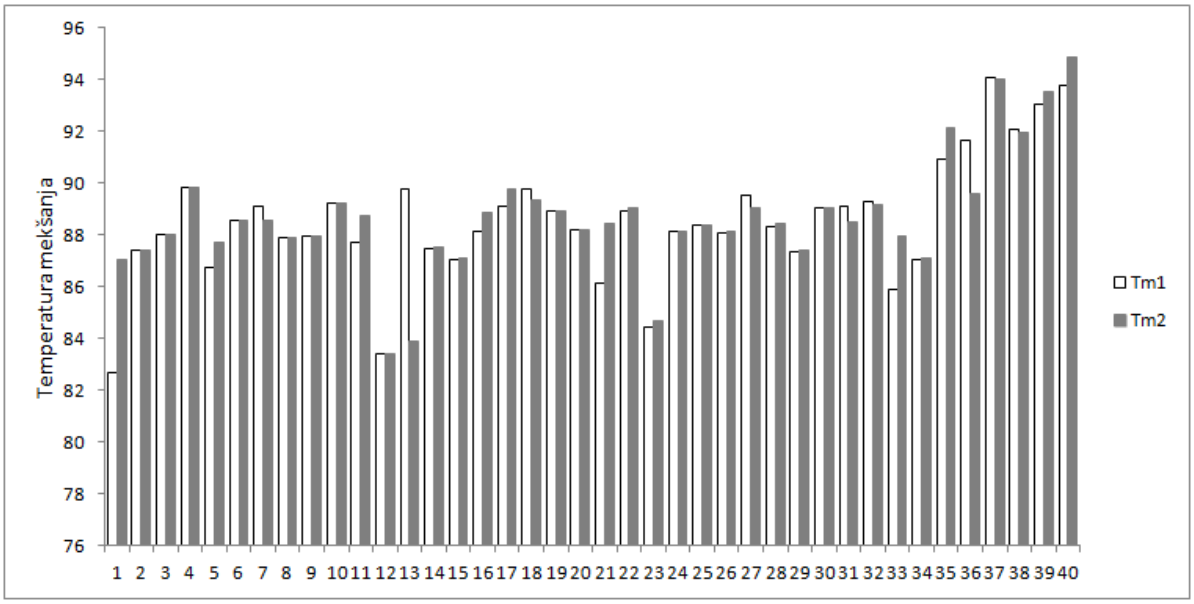
Slika 12. Krivulje mekšanja DNA četiri uzorka ispitanika.

Točnost, istinitost i reproducibilnost rezultata dobivenih dTP-PCR metodom određena je usporedbom naših rezultata s rezultatima referentne *Southern blot* metode što je prikazano u Tablici 9, te ona iznosi 95 %.

Tablica 9. Točnost i reproducibilnost dTP-PCR metode nasuprot Southern blot metodi.

Broj ispitanika	dTP-PCR	Southern blot	Točnost, %	Reproducibilnost
Normalan alel i siva zona (< 53 CGG)	35	36	95	95 %
Premutacija (54 – 200 CGG)	2	0		
Puna mutacija (> 200 CGG)	3	4		

Ponovljivost rezultata analize dTP-PCR metode utvrđena je na temelju rezultata temperature mekšanja DNA dobivenih za isti uzorak ispitanika u duplikatu (Slika 13).



Slika 13. Rezultati temperature mekšanja DNA svakog uzorka ispitanika u duplikatu (Tm1 – temperatura mekšanja DNA uzorka, Tm2 – temperatura mekšanja DNA istog uzorka drugi put).

Određena je osjetljivost i specifičnost dTP-PCR metode (Tablica 10), kao i njena pozitivna (PPV) i negativna (NPV) prediktivna vrijednost (Tablica 11).

Tablica 10. Osjetljivost i specifičnost dTP-PCR metode (svi uzorci napravljeni u duplikatu).

	Osjetljivost (%)	95 % CI	Specifičnost (%)	95 % CI
≤ 30 CGG	100	89,7-100	90,48	77,4-97,3
31-53 CGG	96,97	84,2-99,9	91,89	78,1-98,3
> 54 CGG	88,89	51,8-99,7	98,61	92,5-99,9

Rezultati temperatura mekšanja 40 ispitivanih uzoraka tumačeni su u odnosu na granične vrijednosti temperatura dobivene korištenjem različitih kontrolnih uzoraka. Tako je uz kontrolu od 53 tripleta CGG 20 uzoraka klasificirano kao normalni, 15 kao siva zona te tri kao

proširen. Stoga je klinička osjetljivost uz korištenje tog kontrolnog uzorka 88,89 % (CI 52,9-99,7) (Tablica 10). Jedan je uzorak određen kao proširen, iako pripada sivoj zoni što daje pozitivnu prediktivnu vrijednost od 88,89 %. Jedan uzorak pune mutacije klasificiran je kao normalan što daje specifičnost od 98,61 %, te je negativna prediktivna vrijednost 98,61% (Tablica 11).

Korištenjem 41 tripleta CGG kao kontrolnog uzorka za postavljanje granične temperature mekšanja DNA samo je jedan uzorak krivo svrstan u punu mutaciju što daje osjetljivost od 96,97 % i specifičnost od 91,89 % (Tablica 10).

Ako je za kontrolni uzorak uzet alel s 30 tripleta CGG postignuta je osjetljivost od 100 % i specifičnost metode od 90,48 % (Tablica 10).

Tablica 11. Pozitivna i negativna prediktivna vrijednost dTP-PCR metode

(svi uzorci napravljeni u duplikatu).

	PPV (%)	95 % CI	NPV (%)	95 % CI
≤ 30 CGG	89,47	75,2-97,1	100	95,5-100
31-53 CGG	91,43	76,9-98,2	97,4	85,1-99,9
> 54 CGG	88,89	51,8-99,7	98,61	92,5-99,9

5. RASPRAVA

Prvi začetci dTP-PCR metode datiraju iz 1996. godine, a metoda se zasnivala na tri para početnica te je razvijena za probir populacije s intelektualnim zaostajanjem. Dobivena klinička specifičnost te metode iznosila je 98,6 % i osjetljivost 98 % (68). Tada metoda još nije bila dovoljno usavršena da bi se mogla koristiti u svakodnevnoj dijagnostici, ali je olakšala probir na FXS.

Prvu validaciju *in-house* RP-PCR (engl. *Repeat Primed PCR*) metode napravili su Chen i suradnici 2010. godine na 171 uzorku i proveli su slijepo istraživanje na 146 kliničkih uzoraka (69, 70). Time je pokazano da ta metoda može zamijeniti *Southern blot* metodu u dijagnostici broja tripleta CGG gena *FMR1*, ali da je i dalje potrebna *Southern blot* metoda za utvrđivanje statusa metilacije.

Iako korišteni komplet kemikalija za određivanje promjene broja ponavljanja tripleta CGG gena *FMR1* ima IVD CE oznaku, ipak je bilo potrebno napraviti validaciju ove metode jer je korišten drugačiji uređaj za PCR u stvarnom vremenu od preporučenog od strane proizvođača. Umjesto ABI 7500 Fast Real-Time PCR uređaja (Thermo Fisher Scientific, Foster City, California, USA) korišten je Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR uređaj (Thermo Fisher Scientific, Foster City, California, USA). Jedina razlika među uređajima je blok u kojem se odvija PCR reakcija, koji je kod 7500 Fast Real-Time PCR uređaja manjeg volumena (10 – 30 µl). Manji volumeni mu pomažu u bržem postizanju željene temperature i reakcije od 40 ciklusa završe za 40 minuta.

Metodom dTP-PCR jedan je heterozigotni uzorak (32/>200) u jednoj od analiza svrstan u kategoriju premutacije s obzirom na temperaturu mekšanja DNA, dok je u dvije naknadne analize okarakteriziran kao puna mutacija (Tablica 6). Jedan uzorak pune mutacije (> 200 tripleta CGG) ovom metodom proglašen je premutacijom, dok je naknadnom analizom dobivena vrijednost temperature mekšanja DNA odgovarala punoj mutaciji.

Na temelju rezultata iz Tablice 7 vidljivo je da je najveća podudarnost (97,5 %) dTP-PCR metode sa *Southern blot* metodom ako se za postavljanje granične vrijednosti temperature mekšanja koristi kontrolni uzorak s 41 tripletom CGG. Nešto manja podudarnost (95 %) je ako se koristi kontrolni uzorak s 53 tripleta CGG, dok je najmanja podudarnost (90 %) ako se koristi kontrola s 30 tripleta CGG. Slične su rezultate dobili Lim i suradnici validirajući isti komplet kemikalija s istim kontrolnim uzorcima (67). Kod njih je podudarnost iznosila 94,2; 97,1 i 88,6 % za kontrolne uzroke s 53, 41 i 30 tripleta CGG.

Najveća klinička značajnost ove metode postignuta je korištenjem kontrolnog uzorka s 30 tripleta CGG s kliničkom osjetljivošću od 100 % i kliničkom specifičnošću od 90,48 %. Klinička značajnost kontrolnih uzoraka od 41 i 53 tripleta CGG je nešto manja (Tablica 10).

Visoka dijagnostička osjetljivost i specifičnost dTP-PCR metode potvrđena je i drugim kliničkim istraživanjima (51, 71).

Iako je *Southern blot* metoda zlatni standard u dijagnostici bolesti tripleta, uključujući i FXS, pojava polimorfizma jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) može dovesti do gubitka ili stvaranja restrikcijskog mjesta te lažno pozitivnih rezultata prilikom analize broja ponavljanja tripleta CGG gena *FMR1* (22, 72). Također, ponekad je moguća samo djelomična digestija enzimima što opet može dovesti do lažno pozitivnih rezultata (22).

Prednosti ove dTP-PCR metode su što je moguć probir velikog broja uzorka istovremeno za određivanje radi li se o normalnom alelu, premutaciji ili punoj mutaciji u smislu broja tripleta CGG te je stoga vrlo praktična za prenatalni probir na FXS.

Robusnost ove metode vidljiva je u jasnom razdvajanju krivulja mekšanja DNA normalnog alela od alela s punom mutacijom (Slika 12). Iako se granične temperature mekšanja DNA kontrolnih uzoraka dobivenih na Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR uređaju nisu puno razlikovale od temperatura istih uzoraka dobivenih na ABI 7500 Fast Real-Time PCR uređaju, pokazalo se da granične temperature variraju ovisno o broju tripleta CGG prilikom svakog izvođenja reakcije. Stoga je potrebno koristiti kontrolne uzorke prilikom svakog izvođenja reakcije i za svaku analizu posebno odrediti granične temperature mekšanja DNA što je pokazano i u drugim validacijama ovakve metode (51, 67).

Nedostatci ove metode su to što se njome ne može odrediti točan broj ponavljanja tripleta CGG, nego se ispitanici svrstavaju u jednu od kategorija (normalan broj i siva zona, premutacija i puna mutacija). Također nema određivanja statusa metilacije nositelja pune mutacije. Ako se radi o punoj mutaciji mora se odrediti status metilacije, jer ako gen *FMR1* nije metiliran bez obzira na > 200 tripleta CGG, neće doći do razvoja FXS-a.

U slučaju ženskih osoba ne može se procijeniti utjecaj mutacije na fenotip zbog nasumične inaktivacije jednog od X kromosoma. Sve ženske osobe s premutacijom imaju velik rizik od primarne insuficijencije jajnika povezane sa sindromom fragilnoga X kromosoma, dok sve osobe nositelji premutacije imaju povećan rizik od sindroma tremora i ataksije povezanog sa sindromom fragilnoga X kromosoma u kasnijoj životnoj dobi (> 60 – 70 godina). Na točnost rezultata analize mogu utjecati: prisutnost mozaicizma, prekidanje CGG ponavljanja tripletima AGG te moguća mutacija u genu *FMR2* koja se ovim testom ne analizira. Tripleti

CGG mogu biti prekinuti s više tripleta AGG te tada neće doći do pravilnog vezanja početnica i moguće je donijeti krivi zaključak na temelju analize krivulje mekšanja DNA. Ponekad su moguće mutacije u genu *FMR2* (promjena broja tripleta CCG) koje uzrokuju blaži fenotip i nesindromsku mentalnu retardaciju. Također su mogući razni oblici mozaicizma s malim udjelom te je takve uzorke potrebno posebno analizirati *Southern blot* metodom. Isti ovi problemi odnose se i na analizu mutacija gena *FMR1 Southern blot* metodom, jer je prije hibridizacije potrebno umnožiti 5' regiju gena *FMR1* PCR-om te se rutinski obično samo radi analiza mutacija gena *FMR1*.

6. ZAKLJUČAK

Gensko testiranje važno je za potvrdu kliničke dijagnoze FXS-a i povezanih poremećaja te za utvrđivanje nositelja alela s premutacijom kod planiranja potomstva.

Metoda dTP-PCR-a primjerena je za otkrivanje nositelja premutacija i mutacija gena *FMR1* u populaciji ispitanika koja obuhvaća osobe s intelektualnim poteškoćama nepoznatoga uzroka, osobe s prijevremenom menopauzom te osobe s pozitivnom obiteljskom anamnezom za FXS.

Navedena metoda može se koristiti kao test probira za određivanje prisutnosti premutacije i/ili mutacije gena *FMR1* kod osoba s intelektualnim zaostajanjem nepoznatoga uzroka.

7. LITERATURA

1. Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Pratt V, i sur. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. Eur J Hum Genet. 2010;18:1276–88.

2. Burke W. Genetic tests: clinical validity and clinical utility. Curr Protoc Hum Genet. 2014;81:9.15.1–8.

3. Halling KC, Schrijver I, Persons DL. Test verification and validation for molecular diagnostic assays. Arch Pathol Lab Med. 2012;136:11–3.

4. Prence EM. A practical guide for the validation of genetic tests. Genet Test. 1999;3:201–5.

5. Gašljević V. Validacija i mjerna nesigurnost. Biochem Medica. 2010;20:57–63.

6. International Organisation for Standardization. Medical laboratories - Requirements for quality and competence. ISO 15189. 2012.

7. International Organisation for Standardization. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO/IEC 17025. 2005.

8. Berwouts S, Morris MA, Dequeker E. Approaches to quality management and accreditation in a genetic testing laboratory. Eur J Hum Genet. 2010;18:S1–19.

9. OECD Guidelines for Quality Assurance in Genetic Testing. 2007.

10. Guidelines for the validation and verification of chemical test methods. NATA. 2006;1:1–6.

11. Parniewski P, Staczek P. Molecular mehanisms of TRS instability. In: Triple repeat diseases of the nervous system. 1st ed. Timchenko LT, editor. Huston, Texas, USA: Springer Science New York; 2002. p. 1–25.

12. Inden RRS, Otaman VNP, Ussatcheva EAO, Earson CEP, Yubchenko Y, Hlyakhtenko L. Triplet repeat DNA structures and human genetic disease: dynamic mutations from dynamic DNA. J Biosci. 2002;27:53–65.

13. Niwa O. Indirect mechanisms of genomic instability and the biological significance of mutations at tandem repeat loci. Mutat Res. 2006;598:61–72.

14. Groh M, Silva LM, Gromak N. Mechanisms of transcriptional dysregulation in repeat expansion disorders. Biochem Soc Trans. 2014;42:1123–8.

15. Pearson CE, Edamura KN, Cleary JD. Repeat instability: Mechanisms of dynamic mutations. Nat Rev Genet. 2005;6:729–42.

16. Santoro MR, Bray SM, Warren ST. Molecular mechanisms of fragile X syndrome: a twenty-year perspective. Annu Rev Pathol. 2012;7:219–45.

17. Simone R, Fratta P, Neidle S, Parkinson G, Isaacs AM. G-quadruplexes: emerging roles in neurodegenerative diseases and the non-coding transcriptome. FEBS Lett. 2015;589:1653–68.

18. Shing P, Carter M. DNA Structure: Alphabet Soup for the Cellular Soul. In: DNA Replication - Current Advances. Seligmann H, editor. DNA Replication-Current Advances. InTech; 2011.

19. Bernat V, Disney MD. RNA Structures as Mediators of Neurological Diseases and as Drug Targets. Neuron. 2015;87:28–46.

20. Crawford DC, Acuña JM, Sherman SL. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. Genet Med. 2001;3:359–71.

21. Willemsen R, Levenga J, Oostra BA. CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. Clin Genet. 2012;80:214–25.

22. 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. 2015;23:417–25.

23. Kidd SA, Lachiewicz A, Barbouth D, Blitz RK, Delahunty C, McBrien D, i sur. Fragile X syndrome: a review of associated medical problems. Pediatrics. 2014;134:995–1005.

24. Alpatov R, Lesch BJ, Nakamoto-Kinoshita M, Blanco A, Chen S, Stützer A, i sur. A chromatin-dependent role of the fragile X mental retardation protein FMRP in the DNA damage response. Cell. 2014;157:869–81.

25. Yrigollen CM, Martorell L, Durbin-Johnson B, Naudo M, Genoves J, Murgia A, i sur. AGG interruptions and maternal age affect FMR1 CGG repeat allele stability during transmission. J Neurodev Disord. ; 2014;6:20.

26. Valverde R, Pozdnyakova I, Kajander T, Venkatraman J, Regan L. Fragile X mental retardation syndrome: structure of the KH1-KH2 domains of fragile X mental retardation protein. Structure. 2007;15:1090–8.

27. Maurin T, Zongaro S. Fragile X Syndrome: From molecular pathology to therapy. Neurosci Biobehav Rev. 2014;46:242–55.

28. Contractor A, Klyachko VA, Portera-Cailliau C. Altered Neuronal and Circuit Excitability in Fragile X Syndrome. Neuron. 2015;87:699–715.

29. Doxakis E. RNA binding proteins: a common denominator of neuronal function and dysfunction. Neurosci Bull. 2014;30:610–26.

30. Richter JD, Bassell GJ, Klann E. Dysregulation and restoration of translational homeostasis in fragile X syndrome. Nat Rev Neurosci. 2015;16:595–605.

31. Hagerman RJ, Hagerman PJ. The fragile X premutation: into the phenotypic fold. Curr Opin Genet Dev. 2002;12:278–83.

32. Bagni C, Oostra BA. Fragile X Syndrome: From Protein Function to Therapy. Am J Med Genet Part A. 2013;161A:2809–21.

33. De Vries BB, Halley DJ, Oostra BA, Niermeijer MF. The fragile X syndrome. J Med Genet. 1998;35:579–89.

34. Raymond FL. X linked mental retardation: a clinical guide. J Med Genet. 2006;43:193–200.

35. Hunter J, Rivero-Arias O, Angelov A, Kim E, Fotheringham I, Leal J. Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. Am J Med Genet A. 2014;164A:1648–58.

36. Hill MK, Archibald AD, Cohen J, Metcalfe SA. A systematic review of population screening for fragile X syndrome. Genet Med. 2010;12:396–410.

37. Tassone F. Newborn screening for fragile X syndrome. JAMA Neurol. 2014;71:355–9.

38. Steinbach P. Draft Best Practice Guidelines for Molecular Analysis in Fragile X Syndrome. EMQN. 2001.

39. Nolin SL, Glicksman A, Ersalesi N, Dobkin C, Brown WT, Cao R, i sur. Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. Genet Med. Springer Nature; 2015;17:358–64.

40. Nolin SL, Sah S, Glicksman A, Sherman SL, Allen E, Berry-Kravis E, i sur. Fragile X AGG analysis provides new risk predictions for 45-69 repeat alleles. Am J Med Genet A. 2013;161A:771–8.

41. Hoffman GE, Le WW, Entezam A, Otsuka N, Tong Z-B, Nelson L, i sur. Ovarian abnormalities in a mouse model of fragile X primary ovarian insufficiency. J Histochem Cytochem. 2012;60:439–56.

42. Liu Y, Winarni TI, Zhang L, Tassone F, Hagerman RJ. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) in grey zone carriers. Clin Genet. 2013;84:74–7.

43. Hagerman PJ, Hagerman RJ. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. Ann N Y Acad Sci. 2015;1338:58–70.

44. Brown SSG, Stan AC. Fragile X premutation carriers: A systematic review of neuroimaging findings. J Neurol Sci. 2015;352:19–28.

45. Hagerman P. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS): pathology and mechanisms. Acta Neuropathol. 2013;126:1–19.

46. Tejada M, Glover G, Martínez F, Guitart M, Diego-Otero Y De, Fernández-Carvajal I, i sur. Molecular Testing for Fragile X: Analysis of 5062 Tests from 1105 Fragile X Families — Performed in 12 Clinical Laboratories in Spain. Hindawi Publ Corp. 2014;1–8.

47. Chang S, Bray SM, Li Z, Zarnescu DC, He C, Jin P, i sur. Identification of small molecules rescuing fragile X syndrome phenotypes in Drosophila. Nat Chem Biol. 2008;4:256–63.

48. Brandler WM, Sebat J. From De Novo Mutations to Personalized Therapeutic Interventions in Autism. Annu Rev Med. 2015;66:487–507.

49. Berry-Kravis E. Mechanism-Based Treatments in Neurodevelopmental Disorders: Fragile X Syndrome. Pediatr Neurol. 2014;50:297–302.

50. Tassone F, Pan R, Amiri K, Taylor AK, Hagerman PJ. A rapid polymerase chain reaction-based screening method for identification of all expanded alleles of the fragile X (FMR1) gene in newborn and high-risk populations. J Mol Diagn. 2008;10:43–9.

51. Teo CRL, Law H, Lee CG, Chong SS. Screening for CGG Repeat Expansion in the FMR1 Gene by Melting Curve Analysis of Combined 5’ and 3' Direct Triplet-Primed PCRs. Clin Chem. 2012;58:568–79.

52. Rousseau F, Heitz D, Biancalana V, Blumenfeld S, Kretz C, Boué J, i sur. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. N Engl J Med. 1991;325:1673–81.

53. Juusola JS, Anderson P, Sabato F, Wilkinson DS, Pandya A, Ferreira-Gonzalez A. Performance evaluation of two methods using commercially available reagents for PCR-based detection of FMR1 mutation. J Mol Diagn. 2012;14:476–86.

54. Sherman S, Pletcher BA, Driscoll DA. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. Genet Med. 2005;7:584–7.

55. Murray J, Cuckle H, Taylor G, Hewison J. Screening for fragile X syndrome. Health Technol Assess. 1997;1:1–71.

56. Oostra BA, Jacky PB, Brown WT, Rousseau F. Guidelines for the diagnosis of fragile X syndrome. National Fragile X Foundation. J Med Genet. 1993;30:410–3.

57. Saluto A, Brussino A, Tassone F, Arduino C, Cagnoli C, Pappi P, i sur. An enhanced polymerase chain reaction assay to detect pre- and full mutation alleles of the fragile X mental retardation 1 gene. J Mol Diagn. 2005;7:605–12.

58. Fu Y-HH, Kuhl DPA, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, i sur. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. Cell. 1991;67:1047–58.

59. Hećimović S, Barisić I, Müller A, Petković I, Barić I, Ligutić I, i sur. Expand Long PCR for fragile X mutation detection. Clin Genet. 1997;52:147–54.

60. Gallagher A, Hallahan B. Fragile X-associated disorders: a clinical overview. J Neurol. 2012;259:401–13.

61. Levenga J, de Vrij FMS, Oostra BA, Willemsen R. Potential therapeutic interventions for fragile X syndrome. Trends Mol Med. 2010;16:516–27.

62. Hagerman RJ, Polussa J. Treatment of the psychiatric problems associated with fragile X syndrome. Curr Opin Psychiatry. 2015;28:107–12.

63. Jacquemont S, Berry-Kravis E, Hagerman R, von Raison F, Gasparini F, Apostol G, i sur. The challenges of clinical trials in fragile X syndrome. Psychopharmacology (Berl). 2014;231:1237–50.

64. Olmos-Serrano JL, Paluszkiewicz SM, Martin BS, Kaufmann WE, Corbin JG, Huntsman MM. Defective GABAergic neurotransmission and pharmacological rescue of neuronal hyperexcitability in the amygdala in a mouse model of fragile X syndrome. J Neurosci. 2010;30:9929–38.

65. Schaefer TL, Davenport MH, Erickson CA. Emerging pharmacologic treatment options for fragile X syndrome. Appl Clin Genet. 2015;8:75–93.

66. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. Hilden, Germany: Fourth Edition, Qiagen; 2015.

67. Lim GXY, Loo YL, Mundhofir FEP, Cayami FK, Faradz SMH, Rajan-Babu I-S, i sur. Validation of a Commercially Available Screening Tool for the Rapid Identification of CGG Trinucleotide Repeat Expansions in FMR1. J Mol Diagn. 2015;17:302–14.

68. Haddad LA, Mingroni-Netto RC, Vianna-Morgante AM, Pena SDJ. A PCR-based test suitable for screening for fragile X syndrome among mentally retarded males. Hum Genet. 1996;97:808–12.

69. Chen L, Hadd A, Sah S, Filipovic-Sadic S, Krosting J, Sekinger E, i sur. An information-rich CGG repeat primed PCR that detects the full range of fragile X expanded alleles and minimizes the need for southern blot analysis. J Mol Diagn. 2010;12:589–600.

70. Filipovic-Sadic S, Sah S, Chen L, Krosting J, Sekinger E, Zhang W, i sur. 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.

71. Rajan-Babu I-S, Law H-Y, Yoon C-S, Lee CG, Chong SS. Simplified strategy for rapid first-line screening of fragile X syndrome: closed-tube triplet-primed PCR and amplicon melt peak analysis. Expert Rev Mol Med. 2015;17:e7.

72. Monaghan KG, Lyon E, Spector EB. ACMG Standards and Guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. Genet Med. 2013;15:575–86.

8. POPIS KRATICA

5'UTR	5' netranslatirani kraj (engl. *5' UnTranslated Region*)
App	engl. *Amyloid Precursor Protein*
CI	interval pouzdanosti (engl. *Confidence Interval*)
CpG	citozin gvanin dinukleotid
dFmr1	engl. *Drosophila fragile X mental retardation 1 gene*
DIG	digoksigenin (engl. *Digoxigenin*)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. *DeoxyriboNucleic Acid*)
dFmrp	engl. *D. Melanogaster fragile X mental retardation protein*
dTP-PCR	izravni PCR s tri početnice (engl. *direct Triplet-Primed PCR*)
FMR1	engl. *Fragile X Mental Retardation 1 gene*
Fmr1	engl. *M. Musculus fragile X mental retardation 1 gene*
FMRP	engl. *Fragile X Mental Retardation Protein*
FXPOI	primarna insuficijencija ovarija povezana s fragilnim X sindromom (engl. *Fragile X-Associated Primary Ovarian Insufficiency*)
FXS	sindrom fragilnog X kromosoma (engl. *Fragile X Syndorme*)
FXTAS	sindrom tremora i ataksije povezan s fragilnim X sindromom (engl. *Fragile X-Associated Temor/Ataxia Syndrome*)
GABA	gama-amino-maslačna kiselina (engl. *Gamma-AminoButyric Acid*)
kb	kilobaza
KBC	Klinički bolnički centar
KH	engl. *K-homology*
LN	lažno negativan nalaz
LP	lažno pozitivan nalaz
Map1b	engl. *Microtubule Associated Protein 1B*
mGluR	glutamatski receptor (engl. *metabotropic glutamate receptor*)

miRISC	engl. *micro RNA Induced Silecing Complex*
mRNA	glasnička RNA (engl. *messenger RNA*)
MMP	metaloproteinaza matriksa
NES	engl. *Nuclear Export Signal*
NLS	engl. *Nuclear Localization Signal*
NPV	negativna prediktivna vrijednost
PCR	lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase Chain Reaction*)
PPV	pozitivna prediktivna vrijednost
Psd95	engl. *Postsynaptic Density Protein 95*
RGG	arginin glicin slog (engl. *Arginine Glycine box*)
RNA	ribonukleinska kiselina (engl. *Ribonucleic Acid*)
RP-PCR	engl. *Repeat Primed PCR*
Sema3F	engl. *Semaphorin 3F*
SN	stvarno negativan nalaz
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)
SP	stvarno pozitivan nalaz
Tm	temperatura mekšanja (engl. *melting temperature*)