

# Značaj hrvatske banke genoma i združene analize genoma u klasifikaciji uzročne varijante na primjeru djeteta sa spinocerebelarnom ataksijom

---

Šimunović, Anđela

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:406410>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-15**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Anđela Šimunović**

**Značaj hrvatske banke genoma i združene analize genoma u  
klasifikaciji uzročne varijante na primjeru djeteta sa  
spinocerebelarnom ataksijom**

**DIPLOMSKI RAD**



Zagreb, 2024.

„Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Maria Ćuka, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023./2024.“

Popis korištenih kratica:

ACMG – Američko društvo za medicinsku genetiku i genomiku (*eng. American College of Medical Genetics and Genomics*)

ALS – amiotrofična lateralna skleroza (*eng. amyotrophic lateral sclerosis*)

ASO – antisense oligonukleotid (*eng. antisense oligonucleotide*)

cDNA- komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (*engl. complementary deoxyribonucleic acid*)

CGAD – hrvatska baza agregiranog genoma (*eng. Croatian Genome Aggregated Database*)

CGPD – hrvatska baza fenotipiziranog genoma (*eng. Croatian Genome-Phenotype Database*)

CRISPR – grupirane pravilno razmaknute kratke ponavljajuće palindromske sekvence (*engl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (*eng. deoxyribonucleic acid*)

EEG - elektroencefalografija

EMNG – elektromioneurografija

ER – endoplazmatski retikulum (*eng. endoplasmic reticulum*)

GDPR – opća uredba o zaštiti podataka (*eng. General Data Protection Regulation*)

GWAS – studije povezanosti na razini genoma (*eng. Genome-Wide Association Studies*)

HPO – ontologija humanog fenotipa (*eng. The Human Phenotype Ontology*)

INDEL – insercije i delecije (*engl. insertions and deletions*)

ITPR1 – inozitol 1,4,5-trifosfat receptor tip 1 (*eng. inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1*)

MR – magnetska rezonanca

mtDNA – mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina (*eng. mitochondrial deoxyribonucleic acid*)

nDNA – nuklearna deoksiribonukleinska kiselina (*eng. nuclear deoxyribonucleic acid*)

NGS – nova generacija sekvenciranja (*engl. next-generation sequencing*)

PGS – preventivno genomsko sekvenciranje (*eng. preventive genomic sequencing*)

ROH – nizovi homozigotnosti (*eng. Runs of homozygosity*)

QC – kontrola kvalitete (*eng. Quality Control*)

SAD – Sjedinjene Američke Države

SCA – spinocerebelarna ataksija (*eng. spinocerebellar ataxia*)

SNV – promjene jednog nukleotida (*eng. single nucleotide variants*)

SV – strukturalna varijacija (*eng. structural variation*)

UZV – ultrazvuk

UTR – netranslatirana regija (*eng. untranslated region*)

VUS – varijante nepoznatog/neizvjesnog značaja (*eng. variant of uncertain/unknown significance*)

WES – sekvenciranje egzoma (*eng. whole exome sequencing*)

WGS – sekvenciranje genoma (*eng. whole genome sequencing*)

# SADRŽAJ

<b>SAŽETAK</b> .....	
<b>SUMMARY</b> .....	
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. CROSEQ-GENOMEBANK</b> .....	<b>2</b>
2.1. O PROJEKTU .....	2
2.2. ZDRUŽENA ANALIZA GENOMA (JOINT-WGS) .....	3
2.3. PREVENTIVNA GENOMIKA .....	10
2.4. POSTUPNIK .....	11
<b>3. PRIKAZ DJETETA SA SPINOCEREBELARNOM ATAKSIJOM</b> .....	<b>15</b>
3.1. SPINOCEREBELARNE ATAKSIJE .....	15
3.2. PRIKAZ BOLESNIKA .....	22
3.3. NAPREDNA, VISOKOPRECIZNA I BIOINTELIGENTNA ZDRUŽENA ANALIZA GENOMA DJETETA I NJEGOVE OBITELJI S BAZOM PODATAKA .....	23
<b>4. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>25</b>
<b>ZAHVALE</b> .....	<b>27</b>
<b>LITERATURA</b> .....	<b>28</b>
<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>36</b>

## SAŽETAK

### **Značaj hrvatske banke genoma i združene analize genoma u klasifikaciji uzročne varijante na primjeru djeteta sa spinocerebelarnom ataksijom**

Autor Anđela Šimunović

Ovaj pregledni rad omogućava uvid u izniman projekt koji za cilj ima uvesti genomsku medicinu u hrvatsku pedijatriju kako bi se unaprijedili prevencija, dijagnostika i terapija bolesti. CROseq-GenomeBank, prva hrvatska banka genoma, projekt je sekvenciranja genoma djece koja boluju od nedijagnosticiranih bolesti i njihovih obitelji. Preciznom združenom analizom genoma stvaraju se baze podataka. Na početku ovog rada prikazani su ciljevi, metode i analize stvaranja dviju baza hrvatske banke genoma (Genoma i FeGena), a zatim i sam postupak za uključivanje u projekt. Značaj ovog projekta važan je za poboljšanu prevenciju i liječenje rijetkih bolesti jer pruža uvid u ciljanu terapiju i preventivne strategije koje se temelje na genomskim podacima. Osim toga, važnost je i u napredovanju znanstvenih istraživanja te u unapređenju javnog zdravlja primjenom genomskih istraživanja u javnozdravstvenim politikama s ciljem boljeg ishoda liječenja genetski uvjetovanih bolesti. Prethodno navedeni ciljevi projekta prikazani su na primjeru reklasifikacije uzročne varijante u djeteta s dijagnozom spinocerebelarne ataksije. Korištenjem združene genomske analize i podataka prve hrvatske banke genoma, identificirana je specifična genomska varijanta u podlozi ove rijetke neurodegenerativne bolesti. Ova precizna genetička dijagnoza omogućila je potvrdu kliničke dijagnoze i koncipiranje individualiziranog terapijskog plana prilagođenog specifičnim potrebama djeteta.

Ključne riječi: cjelogenomsko sekvenciranje, CROseq-GenomeBank, spinocerebelarna ataksija

## SUMMARY

### **Significance of the Croatian genome bank and joint analysis in the classification of the causal variant in a child with spinocerebellar ataxia**

Author Anđela Šimunović

This review provides insight into an exceptional project aimed at integrating genomic medicine into Croatian pediatrics to advance the prevention, diagnosis, and treatment of diseases. CROseq-GenomeBank, the first Croatian genome bank, is a genome sequencing project for children suffering from undiagnosed diseases and their families. High-precision joint genome analysis is used to create databases. This paper initially presents the goals, methods, and analyses involved in forming the two databases of the Croatian genome bank (Genoma and FeGena), followed by the procedure for inclusion in the project. The significance of this project is crucial for improved prevention and treatment of rare diseases as it provides insight into targeted therapies and preventive strategies based on genomic data. Moreover, its importance extends to advancing scientific research and improving public health by incorporating genomic research into public health policies to achieve better outcomes in the treatment of genetically determined diseases. The stated project goals are illustrated by the example of reclassifying a causal variant in a child diagnosed with spinocerebellar ataxia. Using combined genomic analysis and data from the first Croatian genome bank, a specific genomic variant underlying this rare neurodegenerative disease was identified. This precise genetic diagnosis facilitated the confirmation of the clinical diagnosis and the development of an individualized therapeutic plan tailored to the child's specific needs.

Key words: whole genome sequencing (WGS), CROseq-GenomeBank, spinocerebellar ataxia



## 1. Uvod

U posljednjim desetljećima znanost se eksponencijalno razvija. Razvojem tehnologije i otkrivanjem naprednijih metoda rada u znanstvenom svijetu, otvoren je put novim mogućnostima u dijagnostici. Otkrivanje rijetkih bolesti predstavlja jedan od ključnih izazova moderne medicine, s obzirom na njihovu složenost i često nejasnu etiologiju. Iako je postotak oboljelih od rijetkih bolesti mali, globalno gledajući, zahvaćaju velik broj ljudi. Često su genetski uvjetovane i mogu imati ozbiljne, ponekad i smrtonosne posljedice. U prepoznavanju ovih bolesti, zbog njihove rijetkosti i raznovrsnosti simptoma, tradicionalne metode dijagnostike često nisu dovoljno učinkovite. Međutim, napredak u genetičkim istraživanjima, posebno metodama združene analize genoma, donosi novu nadu u prepoznavanju i razumijevanju ovih bolesti. Nove metode i biointeligentne analize golemih količina podataka omogućuju istraživačima identificirati genetske varijante koje su povezane s određenim bolestima. (1) Združenom analizom genoma moguće je otkriti genomske varijante, koje bi inače ostale neopažene, čime se značajno povećava mogućnost rane dijagnoze i bolje razumijevanje patogeneze bolesti. (3) Prva hrvatska banka genoma, nastala prikupljanjem svih analiziranih genoma u okviru programa CROseq-GenomeBank, ima značaj u prioritizaciji i filtriranju varijanti, klasifikaciji varijanti i identifikaciji uzročne varijante. (3) Znanja proizašla analiziranjem pohranjenih genomskih podataka mogu doprinijeti transformaciji medicinske prakse, omogućavajući precizniji, učinkovitiji i personaliziraniji pristup bolesniku, unaprijediti otkrivanje bolesti, pomoći preciznijoj klasifikaciji bolesti i poboljšanju zdravlja. Rana i brza dijagnoza smanjuje stopu obolijevanja i smrtnosti, usmjerava i određuje terapijske mogućnosti, precizira prognozu i značajno smanjuje troškove zdravstvene skrbi. (3)

## 2. CROseq-GenomeBank

### 2.1. O projektu

CROseq-GenomeBank projekt je koji provodi napredno, biointeligentno i visokoprecizno istraživanje genoma djece i njihovih obitelji te stvara dvije baze podataka hrvatskih genoma: Genoma, prva hrvatska baza agregiranog genoma (*Croatian Genome Aggregated Database*, CGAD) i FeGena, prva hrvatska baza fenotipiziranog genoma (*Croatian Genome-Phenotype Database*, CGPD). (1) Prema dosadašnjim rezultatima istraživanja projekta CROseq-GenomeBank, utvrđeno je da 16,1% zdravih odraslih osoba ima predispozicije za razvoj bolesti s genetskom osnovom. (1) Dodatno, 7,2% pozitivnih rezultata pokazuje klinički značajne genske varijante povezane s kardiovaskularnim i malignim bolestima. (1) Pravovremene molekularne dijagnostičke analize genoma optimizirat će terapiju. (1)

Projekt sekvenciranja hrvatskog genoma djece i njihovih obitelji pokrenut je uz potporu Zaklade „Mila za Sve“. (2) Projekt se odvija u suradnji s Dr. Arezou Ghazani (Mass General Brigham, and Harvard Medical school, Boston, USA) te nudi svim sudionicima najnovije i inovativne genomske metode i biointeligentne analize za otkrivanje genomskih nepoznanica i očuvanje zdravlja. (3)

Kod djece s nedijagnosticiranim bolestima ili bolestima nejasnog genetičkog uzroka, istražuju se patološke promjene u genomu kako bi se identificirala moguća genetička osnova ključna za postavljanje dijagnoze te pravovremeno otkrivanje potencijalnih genomskih rizika za njihovo zdravlje i zdravlje njihovih obitelji. (1, 3)

Kada se bolest već prezentirala, ključ svakog uspješnog liječenja pravovremena je dijagnoza. Pravovremeno otkrivene patogene varijante gena čine osnovu za potvrdu dijagnoze i brzo započinjanje terapije. (3) Pretpostavlja se da 1 od 10 djece ima genske promjene koje mogu ugroziti zdravlje ili život, dok su djeca u oko 80% slučajeva nositelji određenih recesivnih alela. (3)

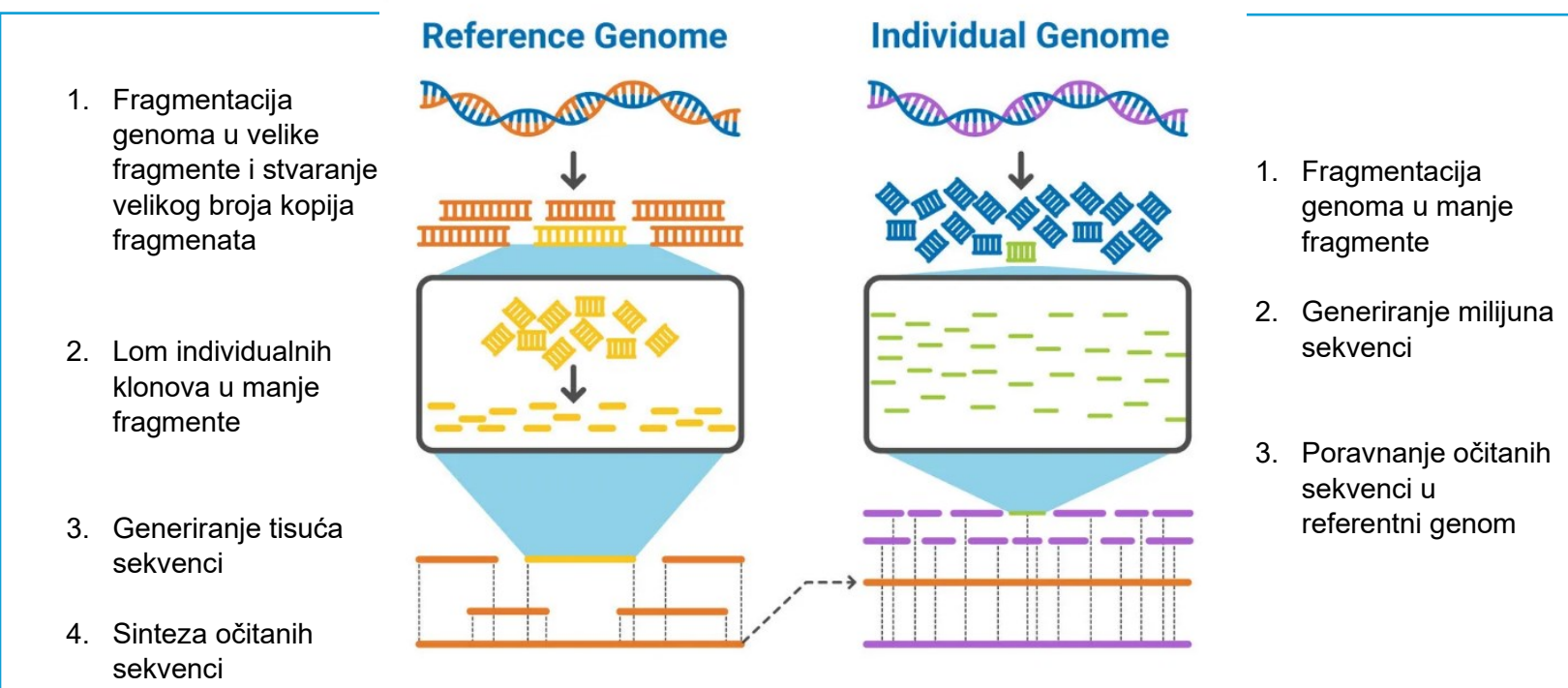
## 2.2. Združena analiza genoma (Joint-WGS)

Projekt ljudskog genoma omogućio je integraciju genetike u svakodnevnu medicinsku praksu i utemeljio genomsku medicinu. (4) Nadalje, značajno je unaprijedio tehnologiju i alate za genetička istraživanja, počevši od otkrića strukture DNA, razvoja tehnologije rekombinantne DNA i metoda sekvenciranja. (4) Potpuna sekvenca ljudskog genoma dovršena je 2022.godine. (5)

Cjelogenomsko sekvenciranje (WGS) postaje sve zastupljeniji dijagnostički genetički test i u sve većem broju indikacija, test prvog izbora. (6) Sve se češće koristi u dijagnostici rijetkih bolesti jer omogućuje istovremeno otkrivanje jednonukleotidnih varijanti (SNVs), manjih insercija i/ili delecija (INDELs) i manjih strukturnih varijanti (SVs). Na poboljšanju identifikacije drugih tipova varijanti poput ekspanzija ponavljanja se još uvijek radi. (7) Prednost sekvenciranja genoma je istovremeno očitavanje i kodirajućih i nekodirajućih regija, i to poznatih i nepoznatih varijanti, što povećava dijagnostički prinos. Studije povezanosti na razini genoma (GWAS) identificirale su mnoge varijante povezane s kompleksnim bolestima i osobinama, a većina ovih varijanti nalazi se u nekodirajućim regijama, što otežava njihovu interpretaciju. (8) Nekodirajuće varijante unutar ili blizu cis-regulatornih elemenata, poput promotora i pojačivača (npr. 5'-UTR i uzvodna sekvencija), mogu igrati ključnu ulogu u bolesti reguliranjem ekspresije gena. (3, 8) Upravo zbog navedenih prednosti, WGS je učinkovitiji od WES-a u otkrivanju potencijalno uzročnih varijanti bolesti unutar WES regija, osobito mutacija uzrokovanih SNVs-om. (9)

WGS ne cilja specifičan gen ili varijantu, već pruža podatke o čitavoj DNA sekvenciji. U tome je razlika od ostalih klasičnih genetskih testiranja. (1)

Tehnologije sekvenciranja nove generacije (NGS) omogućile su analizu genoma jer su sposobne za brzo stvaranje velikih količina podataka o DNK sekvencijama. (10) To je moguće zahvaljujući računalnim i biomedicinskim resursima koji omogućuju obradu ovih kompleksnih podataka. Daljnji razvoj NGS tehnologije smanjio je troškove i učinio WGS analizu dostupnijom. (10)

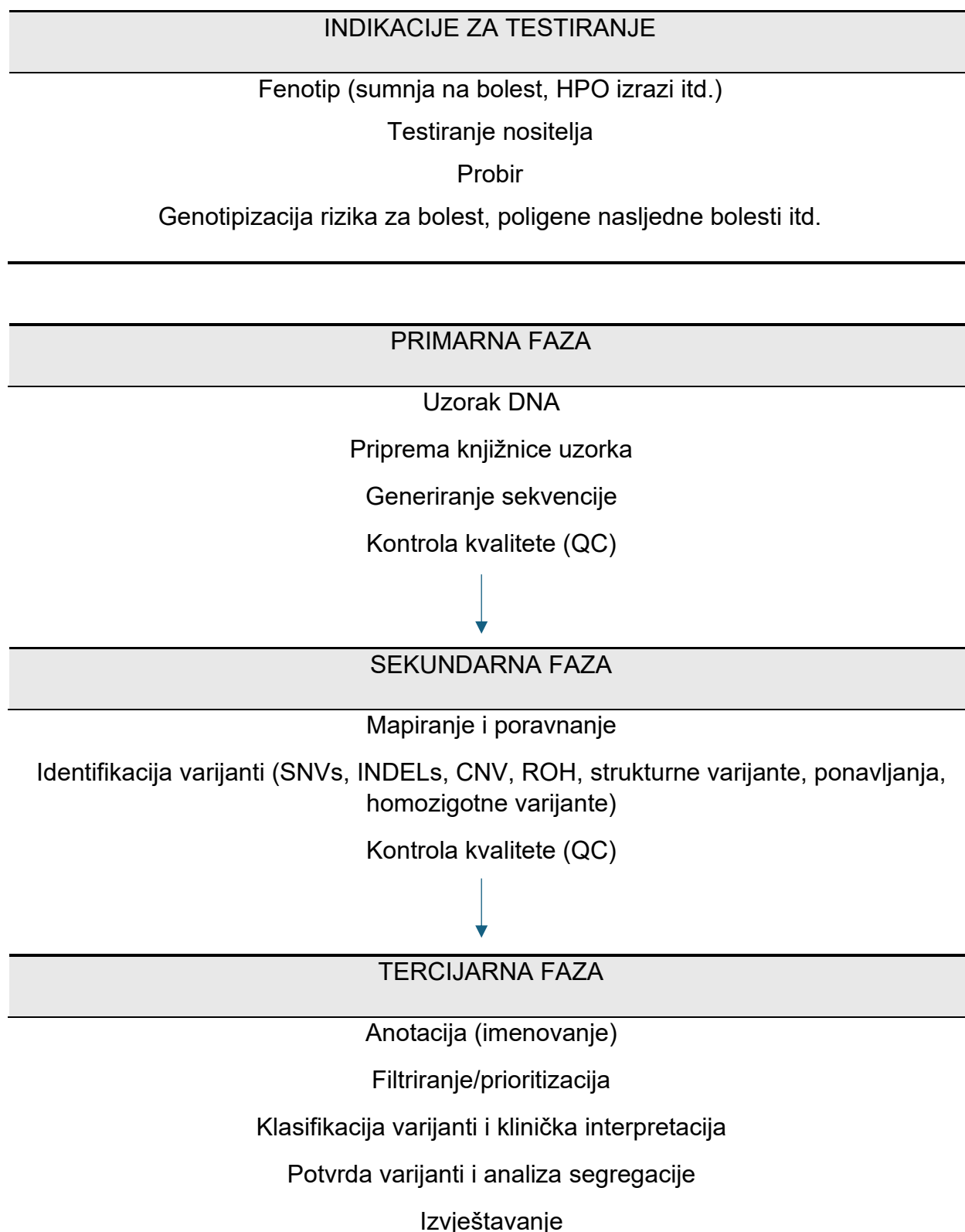


Slika 1. Postupak cjelogenomskog sekvenciranja. Preuzeto i prilagođeno prema: *Sequencing.com (11)*

U okviru projekta CROseq-GenomeBank koristi se uređaj Illumina NovaSeq 6000. (1) NovaSeq 6000 sekvencijska je platforma iz Illumine koja omogućava sekvenciranje kratkih očitavanja s maksimalnim izlazom do 6 Tb. (12) Ova platforma koristi standardni Illumina sekvencijski postupak koji uključuje pripremu knjižnice, generiranje klastera putem *in situ* amplifikacije i sekvenciranje sintezom. (12) Jedna od ključnih prednosti NovaSeq 6000 njena je fleksibilnost. (12)

Klinički dijagnostički testovi genomskog sekvenciranja mogu se podijeliti u primarnu, sekundarnu i tercijarnu fazu. (13) Primarna obuhvaća tehničke aspekte testa, a to su ekstrakcija DNA, priprema knjižnice, generiranje sekvenci i preliminarna kontrola kvalitete podataka (QC). (13) Sekundarna faza uključuje bioinformatičke procese, kao što su poravnanje sirovih podataka sekvencije s referentnim genomom, identifikacija varijanti i dodatne QC operacije koje ispravljaju tehničke pristranosti prije analize. (13) Tercijarna faza obuhvaća interpretativne sastavnice, kao što su anotacija, filtriranje, prioritizacija i klasifikacija varijanti, klinička interpretacija i izvještavanje. (13)

Tablica 1: Indikacije za kliničko testiranje i faze testiranja. Preuzeto i preuređeno prema:  
*Austin-Tse CA, Jobanputra V i sur. (2022) (13)*



Važno je naglasiti da podaci WGS-a sami po sebi nisu dovoljni za postavljanje dijagnoze dok ne prođu detaljnu analizu i usporedbu s fenotipom pojedinca te postojećim bazama genetskih podataka. Združena analiza genoma omogućuje identifikaciju vjerojatno patogenih ili patogenih varijanti koje mogu objasniti genetičku podlogu bolesti u pacijenta. (1) Bez populacijske i/ili interne baze genomskih podataka određene identificirane varijante bi se teže mogle povezati s fenotipom pacijenta. (14) Primjena združene analize genoma omogućuje identifikaciju neopisanih, rijetkih i/ili složenih genetičkih varijanti i/ili obrazaca koji bi lako mogli biti propušteni standardnim pristupom. (3)

Ova tehnika ima široku primjenu u istraživanju složenih bolesti. Unatoč svojim prednostima, združena analiza genoma suočava se s izazovima u interpretaciji složenih podataka i potvrdi rezultata. (14) Međutim, s napretkom tehnologije sekvenciranja genoma i razvojem naprednih statističkih metoda, ova tehnika postaje sve preciznija i pouzdanija.

Tablica 2: Prednosti cjelogenomskog sekvenciranja. Uređeno prema (1,6,7,9)

<b>PREDNOSTI CJELOGENOMSKOG SEKVENCIRANJA</b>	<b>OPIS</b>
Identifikacija većine vrsta genomskih varijanti	Omogućuje detekciju većine vrsta genomskih varijanti, uključujući jednonukleotidne varijante, INDELS, CNV, ROH, strukturne varijacije i neka ponavljanja.
Povećana osjetljivost	Pruža veću osjetljivost za otkrivanje rijetkih i novih genetskih varijanti koje se možda ne bi otkrile drugim metodama sekvenciranja.
Istovremeno otkrivanje većine varijanti	Omogućuje istovremeno otkrivanje većine varijanti u genomu, čime se smanjuje potreba za više testova ili sekvenciranja ciljanih područja.
Bolje razumijevanje genetičkih bolesti	Pruža dublji uvid u genetičku osnovu bolesti jer obuhvaća sve dijelove genoma, što može pomoći u boljem razumijevanju mehanizama bolesti.
Univerzalna primjena	Može se koristiti u različite svrhe, uključujući dijagnostiku genetskih bolesti, istraživanje, farmakogenomiku i personaliziranu medicinu.
Mogućnost istraživanja	Omogućuje istraživanje različitih aspekata genoma, poput strukture kromosoma, genomske regulacije i interakcija između gena, što doprinosi napretku znanja o genomu.



Osim dijagnostike rijetkih bolesti, WGS se koristi u farmakogenomici. Farmakogenomika ima ključnu ulogu u transformaciji medicinske prakse prema individualizaciji, odnosno razvoju personalizirane medicine. (15,16,19) Ova grana biomedicine istražuje kako geni utječu na metabolizam lijekova i farmakološki učinak, farmakodinamiku i farmakokinetiku. Glavni su to faktori koji utječu na to kako će pacijent reagirati na određenu dozu lijeka. (16)

WGS omogućuje sveobuhvatnu analizu genetskog profila djeteta i otkrivanje genetskih varijanti koje utječu na metabolizam lijekova. Ove varijante mogu mijenjati funkciju enzima, transportnih proteina i receptora koji sudjeluju u metabolizmu lijekova, što može dovesti do različitih brzina razgradnje lijekova i individualiziranih terapijskih odgovora. (16) Otkrivanje genskih varijanti, koje utječu na metabolizam lijekova, omogućuje personalizirano propisivanje lijekova. (17) Na taj način može se odabrati najprikladniji lijek i njegova doza, što smanjuje rizik od neželjenih nuspojava i povećava terapijsku učinkovitost. (17, 18)

Farmakogenetički podaci zajedno s kliničkim informacijama, odnosno anamnestičkim podacima i karakteristikama bolesti, omogućuju cjeloviti uvid u individualni odgovor pacijenta na terapiju. Ovakav pristup pomaže u donošenju utemeljenih odluka o liječenju. Primjena ovog pristupa osobito je važna u područjima gdje postoji velika razlika u odgovoru pacijenata na standardne terapije. (6) Primjer je i područje onkologije gdje optimalna personalizirana terapija može biti odlučujuća u daljnjem tijeku bolesti, odnosno u ozdravljenju. (6)

Osim što omogućuje personaliziranu terapiju, farmakogenomika doprinosi smanjenju troškova zdravstvene skrbi i poboljšanju sigurnosti pacijenata. Ukratko, farmakogenomika ima potencijal revolucionirati način na koji se liječe bolesti, omogućujući prilagođavanje terapije prema genetskom profilu svakog pacijenta.

### 2.3. Preventivna genomika

Genomska medicina ima ključnu ulogu u pružanju modernog, inovativnog i personaliziranog pristupa. (3) Preventivno postupanje posebno je važno u pedijatrijskoj medicini jer se preventivnim inovativnim pristupom može promijeniti cijeli život i očuvati zdravlje. Cilj je otkriti genetske varijante povezane s bolestima u ranoj životnoj dobi i što prije primijeniti personalizirane medicinske mjere jer se prevencija, kao i dijagnostika i terapija, temelje na genetskoj varijabilnosti djeteta. (3) Rana prevencija može potpuno ili djelomično ukloniti problem u predsimptomatskoj fazi bolesti, odgoditi klinički značajnu pojavu bolesti, omogućiti pravovremeno započinjanje terapije i poboljšati ishode liječenja. (3)

Pristup zasnovan na principima preventivne genomike u sklopu projekta CROseq-GenomeBank mogao bi unaprijediti takvu kliničku praksu. Postoji nada da će budućnost personalizirane pedijatrije biti usmjerena na rane i preventivne intervencije za svako dijete.

Brojne prednosti preventivne genomike u pedijatrijskoj populaciji mogu se primijeniti i u odrasloj populaciji. Napredak u genomici doveo je do ideja za razvojem preventivnog genomskog sekvenciranja (PGS) na razini populacije s ciljem otkrivanja genetskih rizika za zdravlje kod odraslih bez poznatih čimbenika rizika. (20) Takvi zahtjevi suočavaju se s brojnim etičkim, pravnim i medicinskim pitanjima. (20)

## 2.4. Postupnik

Postupnik za uključivanje u projekt CROseq-GenomeBank sastoji se od niza koraka koje je nužno temeljito i precizno pratiti.

### Identifikacija bolesnika:

Proces započinje prepoznavanjem pacijenta s mogućom genetički uvjetovanom bolešću (nejasna, rijetka bolest, djeca konsangvinih roditelja, precizno fenotipizirane kohorte bolesnika s heterogenim bolestima). To čini nadležni liječnik. Nakon identifikacije, dogovara se združena cjelogenomska analiza s voditeljem projekta CROseq. (1,3)

### Informirani pristanak i privola:

Prikupljanje suglasnosti oba roditelja obavezno je. Na obrascima se navode datum rođenja i dob svih ispitanika. Sudionici se upoznaju s osnovnim načelima analize, prednostima i mogućim nedostacima, zaštitom osobnih podataka te ostalim relevantnim pitanjima. Kompletna administrativna dokumentacija projekta CROseq dostupna je elektronički za bolju pripremu bolesnika i roditelja te suradnju. (1,3)

### Detaljna fenotipizacija:

Prikupljanje klasične pedijatrijske anamneze i strukturiranog teksta o bolesniku ključno je za uspješnu analizu genoma (rodoslovno stablo, obiteljska anamneza, osobna anamneza, sadašnja bolest). Koriste se standardizirani izrazi HPO (The Human Phenotype Ontology) za opis fenotipa. Svaki simptom, fenotip ili nalaz treba precizno opisati koristeći odgovarajuće izraze HPO. (1,3)

### Uzorkovanje:

Uzorkovanje se provodi u dnevnoj bolnici Klinike za pedijatriju, KBC Rebro. Prikupljaju se uzorci krvi djeteta i roditelja (po jedna epruveta EDTA od 3 ml periferne krvi za svakog pojedinačnog ispitanika), te se označavaju imenom i prezimenom ispitanika i datumom rođenja. Uzorci se pohranjuju u hladnjak na +4°C. (1,3)

### Deidentifikacija, anonimizacija i kodiranje:

Uzorci se deidentificiraju i anonimiziraju u skladu s općom uredbom o zaštiti podataka (GDPR) kako bi se osigurala zaštita osobnih podataka. (1,3)

### Transport:

Uzorci se šalju na sobnoj temperaturi kurirskom službom u SAD zajedno s potrebnom dokumentacijom i administrativnim odobrenjima. (1,3)

### Izolacija i ekstrakcija DNA:

Provodi se izolacija nDNA (nuklearna DNA) i mtDNA (mitohondrijska DNA) te provjera kvalitete i koncentracije. (1,3)

### Sekvenciranje cijelog genoma:

Sekvenciranje se obavlja na platformi Illumina NovaSeq 6000 s visokim pokrivanjem (>95%). Obuhvaća se sve preporučene gene i varijante prema Američkom društvu za medicinsku genetiku i genomiku (ACMG). (1,3)

### Validacija i procjena očitavanja:

Procjenjuje se pokrivenost gena i varijanti te analiziraju strukturne aberacije sekvencije. (1)

### Primarna i sekundarna analiza:

Provodi se poravnavanje referentne sekvencije, filtracija i personalizirane računalne modifikacije očitavanja. (1,3)

#### Interpretacija i klasifikacija varijanti:

Varijante se klasificiraju prema pravilima ACMG te se uspoređuju s biobazama podataka. Razlikuju se uzročne i vjerojatno uzročne varijante od onih nejasnog značaja (VUS), vjerojatno benignih i benignih varijanti. (1,3)

#### Izveštaj:

Izrađuje se izvještaj o interpretiranim i klasificiranim uzročnim varijantama (patogene i vjerojatno patogene). Također se sastavlja popis varijanti nejasnog značaja (VUS) i sekundarnih varijanti. (1,3)

#### Konačna klinička dijagnoza:

Dijagnoza se postavlja konsenzusom liječničkog tima temeljem genetskih i kliničkih kriterija. To uključuje identifikaciju uzročne varijante i kliničko promišljanje genotipa u kontekstu fenotipa djeteta. (1,3)

#### Sangerovo PCR potvrđivanje:

Provodi se potvrđivanje odabranih varijanti metodom Sangerovog sekvenciranja za dodatnu preciznost. (1,3)

#### Kliničko preventivno ili terapijsko djelovanje:

Na temelju rezultata istraživanja, provodi se kliničko djelovanje s ciljem pružanja najbolje moguće skrbi za dijete. (1,3)

#### Pohranjivanje genomskih podataka:

Deidentificirani i anonimizirani podaci pohranjuju se u CROseq-GenomeBank biobanku u oblaku (Genoma, i FeGena). Ova biobaza je kibernetički zaštićena i u skladu s GDPR pravilima. (1,3)

#### Udruživanje s međunarodnim biobazama:

Postoji mogućnost povezivanja s drugim biobankama i istraživanjima radi unapređenja znanja i suradnje. (1,3)

### Intervalna reanaliza i reinterpretacija varijanti:

Periodički se reanaliziraju genetski podaci u skladu s novim otkrićima i tehnologijama. Cilj je identificirati biološki značajne rijetke varijante koristeći digitalnu medicinu i umjetnu inteligenciju. (1,3)

### Naknadno očitavanje i interpretacija genomskih varijanti:

Moguće je provesti dodatna očitavanja i interpretacije za roditelje radi presimptomatskog predviđanja za varijante gena na popisu ACMG s potencijalom ranog otkrivanja i transformiranja tijekom bolesti. (1,3)

### 3. Prikaz djeteta sa spinocerebelarnom ataksijom

#### 3.1. Spinocerebelarne ataksije

Spinocerebelarne ataksije (SCA) nasljedne su neurodegenerativne bolesti koje se mogu naslijediti autosomno dominantno, autosomno recesivno ili X-vezano. (21) Prvenstveno pogađaju mali mozak (cerebellum), a zatim leđnu moždinu, odakle i potječe ime bolesti. (22) Osim toga su i heterogena skupina poremećaja sa širokim spektrom genotip-fenotip. (23).

#### Ataksija

Ataksija je neurološki simptom, poremećaj koordinacije mišićne aktivnosti koji se manifestira kao izostanak dobrovoljne koordinacije mišića, što dovodi do poteškoća u kontroliranju pokreta. (24) To može utjecati na različite tjelesne funkcije, uključujući hod, pokrete očiju i govor. (24) Ataksija se klinički prezentira hodanjem na širokoj osnovi, poteškoćama u održavanju ravnoteže, intencijskim tremorom, disdijadahokinezom (poremećajem izvođenja ponavljanih pokreta), disartrijom (skandiranim govorom) i nistagmusom. (21). Klinički se jasno očituje tek kad dijete prohoda. (21) S obzirom na etiologiju može biti nasljedna, stečena i nenasljedna degenerativna ataksija, a prema tijeku progresivna, neprogresivna, epizodna, intermitentna i akutna. Ataksija se prema lokalizaciji dijeli na cerebelarnu, senzornu (nastaje uslijed gubitka propioceptivne) i vestibularnu (oštećenje vestibularnog sustava). (24) Osim navedenih simptoma, pacijenti oboljeli od spinocerebelarne ataksije, mogu pokazivati i simptome zahvaćenosti drugih područja mozga, poput bazalnih ganglija, piramidalnog sustava (hiperrefleksija, spasticitet), perifernih živaca. (25)

Cerebelarna ataksija klinički se očituje ovisno o dijelu malog mozga koji je zahvaćen oštećenjem. Ako su oštećeni središnji dijelovi malog mozga (vermis i spinocerebelarni putovi), očitovat će se ataksijom trupa, a ako su oštećene hemisfere malog mozga i cerebrocerebelarni putovi, očitovat će se ataksijom udova. (26) Utvrđivanje uzroka cerebelarne ataksije kompleksno je, ali pristupi, koji se provode postupno, mogu olakšati dijagnostički postupak. (26) Klasifikacija ataksija navedena je u Tablici 3.

Tablica 3: Podjela ataksija. Uređeno prema: *Mardešić i sur. (2016) (21)*

<b>ATAKSIJE</b>		
<i>Etiološka podjela</i>	<i>Lokalizacijska podjela</i>	<i>Prema tijeku bolesti</i>
Nasljedne Stečene Nenasljedne degenerativne	Cerebelarne Senzorne Vestibularne	Progresivne Neprogresivne Epizodne (intermitentne) Akutne

### Etiologija

Mnoge SCA, pa tako i one najčešće, uzrokovane su ponavljanjem CAG nukleotida koji kodiraju poliglutamin, što dovodi do stvaranja toksičnih proteina. (23) Ponavljanje CAG nukleotida vidljivo je u SCA 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 i 17. (27) Ponavljanje različitih pentanukleotida vidi se u SCA 10, 31, 36, 37. (27) Rjeđi uzroci nastanka SCA su promjene jednog nukleotida (25). „Missense“ varijante krivog smisla su u genetičkoj podlozi tipova SCA5, SCA13, SCA14, SCA19, SCA29, a genetička podloga tipova SCA15, SCA20 i SCA39 uključuje deleciju ili duplikaciju gena. (28)

### Epidemiologija

Prevalencija SCA na globalnoj razini kreće se između 1 i 5 na 100.000 ljudi. Još uvijek nedostaje sustavan pregled epidemiologije SCA u Europi (29), ali detaljnim pregledom literature došlo se do zaključka da se prevalencija kreće od 0,9 do 3 na 100.000, s određenim varijacijama po zemljama: u Italiji je 2 na 100.000, u Norveškoj 4 na 100.000, a u Portugalu 5 na 100.000. (23, 27)



### Dijagnostički postupak

Dijagnoza spinocerebelarne ataksije postavlja se na temelju detaljno uzete osobne i obiteljske anamneze, fizikalnog pregleda, neurološkog pregleda, radioloških pretraga, magnetske rezonance (MR) mozga, i genetičkog testiranja. (26) Prilikom uzimanja anamneze važno je postavljati usmjerena pitanja kako bi razlikovali različite vrste ataksija. Iako je prepoznavanje ataksije ključni prvi korak, simptomi, koji prate ataksiju, mogu često pomoći u postavljanju dijagnoze. Stoga je važno postavljati pitanja o simptomima poput periferne neuropatije, parkinsonizma, poremećaja spavanja, autonomnih simptoma, napadaja, gubitka sluha te obiteljskoj povijesti ataksije i problema s ravnotežom. Također, važno je pitati o vremenu nastanka ataksije. (26) Neurološki pregled može se podijeliti na pregled očiju, govora, udova, ravnoteže, odnosno hoda. U tablici 4 navedeni su znakovi ataksije u fizikalnom statusu kod pacijenata. Od radioloških pretraga kod pacijenata s ataksijom preporučuje se napraviti MR mozga kako bi se otkrile strukturne i vaskularne lezije, kao što su tumori mozga, apscesi, ishemijski i hemoragijski moždani udari ili multipla skleroza. Najčešći nalaz je atrofija cerebeluma. (26) Genetičko testiranje opisano je zasebno.

Prema izvoru *Jayadev S, Bird T. (2013)* (30) postoji više od 40 tipova spinocerebelarnih ataksija, no kasnije u tekstu naglasak će biti na opisivanju spinocerebelarne ataksije tip

29

Tablica 4: Znakovi cerebelarne ataksije u fizikalnom statusu kod pacijenata. Preuzeto i preuređeno prema: *Shakkottai i Fogel. 2013 (31)*

<b>Znakovi oštećenja malog mozga</b>
Nistagmus izazvan pogledom
Abnormalni pokreti očiju
Dizartrija
Disdijadohokineza
Gubitak kontrole prilikom uklanjanja otpora ekstremiteta
Trunkalna ataksija i/ili titubacija glave
Hod na širokoj osnovi
Nemogućnost hodanja u liniji (tandem hod)

### Spinocerebelarna ataksija tipa 29

SCA29 nasljedna je, autosomno-dominantna, neprogresivna cerebelarna ataksija koja se prezentira u djetinjstvu. (32) Rijetka je bolest s nekoliko desetina opisanih obitelji u svijetu. (34) Karakterizirana je hipotonijom, kašnjenjem u razvoju grubih motoričkih sposobnosti i blagim do umjerenim oštećenjem kognitivnih funkcija. (33) Ataktičan je hod nesiguran, kolebljiv, a za bolest su karakteristični nistagmus, disartrija i dismetrija. (34) Prema istraživanju *Zambonini i sur. (2017)* (32) koji su analizirali 15 obitelji pronađena je značajna klinička heterogenost među oboljelima i atrofija cerebeluma kod 72% pacijenata.

U spinocerebelarnoj ataksiji tipa 29 (SCA29) genetičkim analizama su identificirane različite heterogene „missense“ varijante krivog smisla u genu inozitol 1,4,5-trifosfata tipa 1 (*ITPR1*). (34) Varijante u genu za receptor *ITPR1* otkrivene su i u obiteljima s kasnim početkom SCA15, no nisu identificirane kod sporadičnih slučajeva infantilne cerebelarne ataksije. (35) Receptori za inozitol 1,4,5-trifosfat su unutarstanični kalcijevi kanali koji omogućuju oslobađanje kalcija iz unutarstaničnih skladišta, kao što su endoplazmatski retikulum (ER) i Golgijevo tijelo. (36) Prema *Sugawara i sur., (2013)* (37) ustanovljena je velika gustoća *ITPR1* u malom mozgu, posebno u cerebelarnim Purkinjeovim stanicama, ali je također koncentriran i u neuronima u hipokampalnoj regiji, striatumu i korteksu. (40) U istraživanju prema *Ogura i sur. (2001)* (38) dokazano je da miševi s nedostatkom *ITPR1* receptora imaju izraženu ataksiju i motoričke deficite. (38)

Težina ataksije i intelektualnog oštećenja može varirati kod pojedinih članova iste obitelji. (39, 41)

## Terapija

Terapija spinocerebelarnih ataksija (SCA) simptomatska je i suportivna jer trenutno ne postoji lijek koji bi zaustavio ili promijenio tijek bolesti. Sveobuhvatni plan liječenja često uključuje multidisciplinarni tim stručnjaka, uključujući neurologa, ortopeda, genetičara, fizioterapeuta, radnog terapeuta, logopeda i psihologa, kako bi se poboljšala kontrola simptomima i unaprijedila kvaliteta života pacijenata.

Riluzol, lijek koji se primarno koristi za liječenje amiotrofične lateralne skleroze (ALS), pokazao je povoljan učinak na simptome cerebelarnih poremećaja kod pacijenata oboljelih od različitih tipova degenerativnih ataksija u okviru manjih kliničkih ispitivanja (42) Njegovo se djelovanje povezuje s otvaranjem kalcijem aktiviranih kalijevih kanala, što dovodi do regulacije aktivnosti dubokih cerebelarnih neurona i/ili Purkinjeovih stanica, te posljedično smanjenja hiperekscitabilnosti u tim područjima mozga. (42). S obzirom na učestalu disfunkciju ionskih kanala kao zajednički temeljni mehanizam kod različitih ataksija, treba pridati veću pažnju modulatorima ionskih kanala kao potencijalnim terapijskim pristupima. (43) Amantadin je neselektivni agonist N-metil-D-aspartatnih receptora koji je pokazao korist u liječenju simptoma parkinsonizma i degenerativnih ataksija, koristi se za poboljšanje motoričkih funkcija. (44) Baklofen je također pokazao korisnost u liječenju disfunkcije ionskih kanala povezane s nepravilnim radom Purkinjeovih stanica u životinjskim modelima te se koristi za ublažavanje spastičnosti. (45) Za kontrolu tremora i mioklonusa koristi se klonazepam. U slučaju da pacijenti imaju napadaje propisuju se antiepileptici za liječenje istih, a ako su prisutni simptomi depresije, daju se i antidepresivi. Vrlo je važna fizikalna terapija i izvođenje vježbi ravnoteže, trening hoda, jačanje mišića i vježbe koordinacije pomažu u poboljšanju motoričkih sposobnosti i smanjenju rizika od padova. Zajedno s navedenim rehabilitacijskim programima preporučena je i radna terapija za svakodnevne aktivnosti. Radna terapija pomaže pacijentima da budu neovisni u svakodnevnim aktivnostima koristeći njima prilagođene tehnike i alate. (46) Važna su i ortopedska pomagala kao što su hodalice i štapovi za pomoć pri hodanju i sprječavanju padova. (31)

Logopedijska terapija provodi se za poboljšanje govora i gutanja kod pacijenata s disfagijom ili disartrijom. Genetsko savjetovanje preporuča se obiteljima pogođenim spinocerebelarnom ataksijom zbog nasljedne prirode bolesti. Neizostavan dio je i psihološka podrška mentalnom zdravlju kako pacijentima, tako i njihovoj obitelji zbog psiholoških izazova koje bolest može donijeti. Napredak u genetskim studijama i tehnologijama sekvenciranja sljedeće generacije poboljšava dijagnozu nasljednih ataksija. Nove buduće terapije za spinocerebelarne ataksije mogu uključivati gensku terapiju, uređivanje gena pomoću grupirane pravilno razmaknute kratke ponavljajuće palindromske sekvence (CRISPR-a), terapiju matičnim stanicama, (antisense oligonukleotide (ASO)). (47). Na primjer, CRISPR je uspješno korišten za brisanje CAG ponavljanja u induciranim pluripotentnim matičnim stanicama osoba sa SCA3. S obzirom da je primjena bila na staničnim modelima, potrebno je još istraživanja na životinjskim modelima. (48) Antisense oligonukleotidi kratki su, sintetski nukleotidi koji se koriste u terapiji genskih bolesti. Mogu se vezati za ciljane dijelove RNA molekule i na taj način modulirati njezinu funkciju na nekoliko načina, uključujući blokiranje procesa translacije ili poticanje razgradnje ciljane RNA. (49)

### 3.2. Prikaz bolesnika

Dječak u dobi od 7 godina boluje od kompleksne bolesti, čije su glavne odrednice usporen motorički razvoj i ataksija nepoznate genetske osnove. (3) Obiteljska anamneza je bez osobitosti. Dječak je rođen hitnim carskim rezom zbog ne napredovanja poroda, a po rođenju Apgar je bio 10/10. U dobi od 3 mjeseca prijavljena je anizokorija uz uredne reakcije na direktno i konsenzualno osvjetljenje, namještaj glavicom bio je češće ulijevo. Prisutan je bio hipertonus, osobito u šakama i stopalima. EEG je bio uredan, a UZV mozga pokazao je stanje nakon perinatalne hipoksije s krvarenjem u pleksusima koroideusima u kolikvaciji. (3) MR mozga u dobi od 6 mjeseci nije pokazao značajna odstupanja. Samostalno je sjedio s 10 mjeseci. (3) U dobi od dvije godine, kasnio je u motoričkom razvoju, a pri pokušaju prihvaćanja predmeta, primijećeni su znakovi ataksije. Osim toga, prisutni su bili ataksija i hipotonija trupa te hipotonija i hipotrofija ramena. Kognitivno uredan razvoj. Hodao je većim koracima na široj osnovi. EMNG nije bio informativan. (3) U dobi od 3 godine učinjen je MR mozga. Prema usmenom izlaganju voditelja projekta *Ćuk M. CROseq-GenomeBank (2024)* (3): „MR mozga pokazao je novonastalu simetričnu atrofiju kaudalnog pola cerebeluma i vermisa malog mozga te povišen T2/FLAIR signal tegmentuma ponsa.“ S tri godine starosti pojavili su se intencijski tremor i ataksija trupa. U dobi od pet godina intencijski tremor i ataksija trupa su perzistirali, ali su hipotonija i ataksija bili manje izražene. Govor je bio slabije razumljiv. U laboratorijskim nalazima blago povišene alanin aminotransferaze i koncentracije neuron specifične enolaze. UZV abdomena je bio uredan. (3) Naknadno se saznalo, da je u dobi od pet i pol godina učinjen genski panel za ataksije BpG (Blueprint Genetics) koji je otkrio VUS (varijantu nepoznatog značaja) u genu *ITPR1*. (3) Govor je bio skandirajući, dislaličan, blaža dismetrija i diskretni intencijski tremor bili su prisutni. Hodao je na široj osnovi. Uočena anizokorija, lijeva zjenica šira i reaktivna. S navršениh 6 godina razvio je hiperglikemijsku krizu i dijabetes melitus tipa 1. (3)

*Napomena: roditelji su dali suglasnost za prikaz pacijenta u radu.*

### 3.3. Napredna, visokoprecizna i biointeligentna združena analiza genoma djeteta i njegove obitelji s bazom podataka

Združenom analizom genoma ovog dječaka i njegove obitelji (PENTA-WGS) identificirana je uzročna varijanta. (3) Proveden je PENTA-WGS test, odnosno istodobna analiza genoma djeteta, koji je do tada bolovao od nedijagnosticirane bolesti, i njegovih bioloških roditelja te brata i sestre. (1, 3) Prema e-izvještaju voditelja projekta *Cuk M. CROseq-GenomeBank:eREPORT* (2024) (3) „Identificirana je uzročna NM\_001378452.1(ITPR1):c.3281T>G (p.Phe1094Cys) *de novo* monoalelna varijanta na kromosomu 3 u egzonu 27 gena *ITPR1*.“ Riječ je o supstitucijskoj pogrešci u kojoj je timinska baza (T) zamijenjena gvaninskom bazom (G) u egzonu 27 gena *ITPR1* na poziciji c.3281T>G. (3) Zamjena baza dovodi do promjene supstitucije aminokiseline fenilalanin u kodonu proteina *ITPR1* (p.Phe1094Cys). (3) Segregacijski, identificirana mutacija gena nastala je *de novo* i to u genu *ITPR1* koji se povezuje s prijavljenim fenotipom (**PS2**- *de novo* mutacija u bolesnika čiji je fenotip povezan s odgovarajućim genom, *ITPR1*, uz urednu obiteljsku anamnezu i s potvrđenim majčinstvom i očinstvom). (3) Za identificiranu mutaciju NM\_001378452.1(ITPR1):c.3281T>G (p.Phe1094Cys) *in silico* računalne analize (50, 53) predviđaju štetan učinak (*deleterious*): *Aggregated Prediction 0,888; FATHMM Score -3,1; GERP 4,5; MUTation TASTER D, experimental EVE Score 0,728* (**PP3**- višestruki računalni dokazi uključujući konzervacijske, evolucijske i druge, podupiru štetan učinak mutacije na gen i/ili genski proizvod). (3) **PM2** – identificirana mutacija gena NM\_001378452.1(ITPR1):c.3281T>G (p.Phe1094Cys) nije zabilježena u međunarodnim populacijskom bazama (*Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, Exome Aggregation Consortium, genomAD*), niti u hrvatskoj bazi (Genoma i FeGena) (3) Na temelju dosadašnjih spoznaja i dokaza, predviđanjem i kalkuliranjem patogenosti identificirane ekstremno rijetke *de novo* varijante gena *ITPR1* NM\_001378452.1(ITPR1):c.3281T>G (p.Phe1094Cys), i ručnim uključivanjem dodatnih kriterija ACMG: PM2, PS2 i PP3, ovu varijantu smo reklasificirali vjerojatno patogenu. (3, 51, 52)

Nositelji varijante nisu roditelji, ni sestra i brat dječaka. (3) U tom trenutku ostale otkrivene varijante u genomima djeteta i roditelja nisu imale značajan klinički utjecaj. Važno je naglasiti da, iako tada nisu imale klinički značaj, ne isključuje se mogućnost da se ove varijante naknadno izraze u fenotipu. (3)

Kliničkom analizom genotipa ove izuzetno rijetke *de novo* monoalelne varijante u kontekstu djetetovog fenotipa i njihovog uzročno-posljedičnog odnosa, zaključeno je da je ova vjerojatno patogena varijanta uzrok spinocerebelarne ataksije tipa 29. (3)



#### 4. Zaključak

Genetski poremećaji predstavljaju jedan od vodećih uzroka mortaliteta i morbiditeta u djece. Gotovo 70% hospitalizirane djece ima značajan genetski doprinos svojoj bolesti. (54) Stoga je od ključne važnosti kontinuirano istraživanje i unapređivanje znanja o genomu i molekularnim patomehanizmima koji su uključeni u razvoj pedijatrijskih bolesti. Tradicionalni pristupi sve se više nadopunjuju ili zamjenjuju suvremenim, detaljnim, inovativnim i personaliziranim pristupima utemeljenim na genomskoj informaciji. Kod dobro definiranih monogenetskih bolesti s potpunom penetrantnošću i ekspresivnošću, klinička slika ili pojedinačna dijagnostička pretraga omogućuju odabir jednog gena za molekularnu analizu. Međutim, ovaj pristup nije dovoljno precizan za istraživanje monogenetskih, digenetskih, oligogenetskih i poligenetskih bolesti s nepotpunom penetrantnošću i varijabilnom ekspresivnošću. (3) Impresivna brzina i učinkovitost novih tehnologija sekvenciranja s visoko obuhvatnom i naprednom analizom genoma od velike su važnosti jer pomažu razjasniti složene mehanizme bolesnih stanja u djece. (55) Kako bi se osigurala autentična interpretacija pojedinačnih varijanti, njihova klasifikacija i klinički značaj, ključno je kontinuirano usuglašavati stavove i kriterije.

S porastom obujma genomskih podataka postaje nužno provoditi sve složenije i sofisticiranije biointeligentne analize. Analiza velike količine genomskih podataka pomoću digitalne medicine i umjetne biointeligencije omogućuje pedijatru da u kliničkoj praksi upotrijebi inovativnu i inteligentnu informaciju za presimptomatsko predviđanje varijante. Pravovremeno otkrivanje ovih varijanti može značajno utjecati na tijek bolesti i ishode liječenja. (56)

Nedostatak baza podataka za određenu populaciju ključan su problem u klasifikaciji varijanti. U tu svrhu je uspostavljena prva hrvatska banka genoma (Genoma i FeGena). Time je osiguran ključan i moćan alat za bolju klasifikaciju identificiranih varijanti u Republici Hrvatskoj. Združena biointeligentna analiza genoma i hrvatska banka genoma omogućuju razjašnjavanje bolesti čije genetske varijante nisu jasne u trenutno dostupnim svjetskim bazama podataka.

Važno je naglasiti da je uz automatizirane analize genoma za klasifikaciju uzročne varijante u prethodno navedenog bolesnika, bila ključna ručna reklasifikacija. (3) Upravo zbog toga, esencijalno je posjedovati znanje koje čitatelju DNA omogućuje detaljnu provjeru genomske pozicije, poznavanje i razumijevanje cijelog procesa nastajanja, očitavanja i interpretacije genomske informacije, korištenje segregacijskih podataka obitelji, integraciju dodatnih *in silico* prediktora te ručnu procjenu patogenosti varijante i prikupljanje potrebnih dokaza.

CROseq-GenomeBank je inicijativa koja koristi najsuvremeniju tehnologiju i biointeligentne računalne sustave za združenu analizu genoma. Ova platforma uključuje upotrebu internih (*in-house*) analitičkih procesa koji su prilagođeni specifičnim potrebama projekta. Korištenjem umjetne inteligencije, ručnog filtriranja i klasifikacije, te integracije kliničke interpretacije, CROseq-GenomeBank omogućuje preciznu analizu genoma pacijenata s većim dijagnostičkim prinosom. Interakcija sa stručnjacima omogućava operativnom timu da u realnom vremenu uči od stručnjaka, stječe dublje razumijevanje metodologija i procesa te na taj način unapređuje kvalitetu svojih analitičkih kapaciteta. Ova interakcija doprinosi boljem razumijevanju genetskih varijacija i njihovog kliničkog značaja, što je ključno za pružanje personalizirane medicinske skrbi temeljene na genomskim podacima.

## ZAHVALE

Zahvaljujem svom mentoru prof.dr.sc. Mariu Ćuku, dr. med na ukazanom povjerenju, stručnim savjetima, pomoći i susretljivosti tijekom izrade ovog rada.

Na poseban način želim zahvaliti svojoj obitelji, mami Dragici, tati Juri i bratu Stjepanu. Hvala vam na velikoj ljubavi i bezuvjetnoj podršci tijekom svih ovih godina. Zbog vas sam danas to što jesam. Hvala mami koja je uvijek vjerovala u mene, posebno u onim težim trenutcima i pratila me molitvom na ovom putu školovanja.

Hvala mom dečku Marinu. Hvala ti na ljubavi, motivaciji i ohrabrenju da uvijek idem naprijed i što se ponosiš svakim mojim uspjehom, kakav god on bio.

Hvala mojim prijateljima. Vi ste moj mali krug velikih ljudi. Ispunili ste moje studentske dane smijehom, radošću, ljubavlju. Hvala mojoj Mari! Bez tebe ništa ne bi bilo isto.

Hvala dragom Bogu!

## LITERATURA

1. CroSeq. CroSeq-GenomBank [internet]. Zagreb: Zaklada "Mila za SVE" ; 2020 [ažurirano 2024; pristupljeno 28. svibnja 2024.]. Dostupno na: <https://croseq.eu/>
2. Ćuk M, Lovrenčić L, Belužić R, Sulić P, Bevanda A, Živković N, i sur. CROseq-GenomeBank – ishodi združene analize genoma 100 hrvatskih obitelji. Liječnički vjesnik. 2023;145 Suppl 5:307-315.
3. Ćuk M. CROseq-GenomeBank: The First Croatian Joint Genome Analysis and Aggregate Database. Usmeno izlaganje na: Croatian Student Summit – CROSS; 9.-12. travnja 2024.; Zagreb, Hrvatska.
4. Collins FS, McKusick VA. Implications of the Human Genome Project for medical science. JAMA. 2001 Feb 7;285(5):540-4. doi: 10.1001/jama.285.5.540. PMID: 11176855.
5. Nurk S, Koren S, Rhie A, Rautiainen M, Bizikadze AV, Mikheenko A, i sur. The complete sequence of a human genome. Science. 2022 Apr;376(6588):44-53. doi: 10.1126/science.abj6987. Epub 2022 Mar 31. PMID: 35357919; PMCID: PMC9186530.
6. Brlek P, Primorac D. Budućnost cjelogenomskog sekvenciranja u pedijatriji. Liječnički vjesnik. 2023;145 Suppl 5:51-58.
7. Souche E, Beltran S, Brosens E, Belmont JW, Fossum M, Riess O, i sur. Recommendations for whole genome sequencing in diagnostics for rare diseases. Eur J Hum Genet. 2022 Sep;30(9):1017-1021. doi: 10.1038/s41431-022-01113-x. Epub 2022 May 16. PMID: 35577938; PMCID: PMC9437083.
8. Zhong W, Liu W, Chen J, Sun Q, Hu M, Li Y. Understanding the function of regulatory DNA interactions in the interpretation of non-coding GWAS variants. Front Cell Dev Biol. 2022 Aug 19;10:957292. doi: 10.3389/fcell.2022.957292. PMID: 36060805; PMCID: PMC9437546.

9. Belkadi A, Bolze A, Itan Y, Cobat A, Vincent QB, Antipenko A, i sur. Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr 28;112(17):5473-8. doi: 10.1073/pnas.1418631112. Epub 2015 Mar 31. PMID: 25827230; PMCID: PMC4418901.
10. Yin R, Keong Kwoh C, Zheng J. Whole Genome Sequencing Analysis. U: *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology. ABC of Bioinformatics, Three Volume Set* [internet]. Selangor, Malaysia: Elsevier Inc.: 2019. [pristupljeno 04. 06. 2024.]. Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128096338200952>
11. Sequencing.com. Whole Genome Sequencing [slika s interneta] 2013 [pristupljeno 04. lipnja 2024.]. Dostupno na: <https://sequencing.com/education-center/whole-genome-sequencing>
12. Modi A, Vai S, Caramelli D, Lari M. The Illumina Sequencing Protocol and the NovaSeq 6000 System. *Methods Mol Biol*. 2021;2242:15-42. doi: 10.1007/978-1-0716-1099-2\_2. PMID: 33961215.
13. Austin-Tse CA, Jobanputra V, Perry DL, Bick D, Taft RJ, Venner E, i sur. Best practices for the interpretation and reporting of clinical whole genome sequencing. *NPJ Genom Med*. 2022 Apr 8;7(1):27. doi: 10.1038/s41525-022-00295-z. PMID: 35395838; PMCID: PMC8993917
14. Čupić A, Krakar G, Belužić R, Sulić P, Bevanda A, Živković N. Važnost internih baza podataka za uspješnu združenu analizu genoma u djeteta sa Schuurs-Hoeijmakersovim sindromom. *Liječnički vjesnik*. 2023;145 Suppl 5:200-211.
15. Primorac D, Bach-Rojecky L, Vađunec D, Juginović A, Žunić K, Matišić V, i sur. Pharmacogenomics at the center of precision medicine: challenges and perspective in an era of Big Data. *Pharmacogenomics*. 2020 Jan;21(2):141-156. doi: 10.2217/pgs-2019-0134. Epub 2020 Jan 17. PMID: 31950879.

16. Matišić V, Brlek P, Molnar V, Pavelić E, Čemerin M, Vrdoljak K, i sur. Experience with comprehensive pharmacogenomic multi-gene panel in clinical practice: a retrospective single-center study. *Croat Med J.* 2022 Jun 22;63(3):257-264. doi: 10.3325/cmj.2022.63.257. PMID: 35722694; PMCID: PMC9284022.
17. Crisafulli C, Romeo PD, Calabrò M, Epasto LM, Alberti S. Pharmacogenetic and pharmacogenomic discovery strategies. *Cancer Drug Resist.* 2019 Jun 19;2(2):225-241. doi: 10.20517/cdr.2018.008. PMID: 35582724; PMCID: PMC8992635.
18. Crona D, Innocenti F. Can knowledge of germline markers of toxicity optimize dosing and efficacy of cancer therapy? *Biomark Med.* 2012 Jun;6(3):349-62. doi: 10.2217/bmm.12.19. PMID: 22731909; PMCID: PMC3704209.
19. Mancinelli L, Cronin M, Sadée W. Pharmacogenomics: the promise of personalized medicine. *AAPS PharmSci.* 2000;2(1):E4. doi: 10.1208/ps020104. PMID: 11741220; PMCID: PMC2750999.
20. Lázaro-Muñoz G, Conley JM, Davis AM, Van Riper M, Walker RL, Juengst ET. Looking for Trouble: Preventive Genomic Sequencing in the General Population and the Role of Patient Choice. *Am J Bioeth.* 2015;15(7):3-14. doi: 10.1080/15265161.2015.1039721. PMID: 26147254; PMCID: PMC4493927.
21. Mardešić D, i sur. Bolesti živčanog sustava i mišića: Ataksije. U: Barišić N, ur. *Pedijatrija.* 8. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2016. Str. 1004-1006.
22. Bhandari J, Thada PK, Samanta D. Spinocerebellar Ataxia. 2023 Sep 15. In: *StatPearls [Internet].* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 32491748.
23. Sullivan R, Yau WY, O'Connor E, Houlden H. Spinocerebellar ataxia: an update. *J Neurol.* 2019 Feb;266(2):533-544. doi: 10.1007/s00415-018-9076-4. Epub 2018 Oct 3. PMID: 30284037; PMCID: PMC6373366.
24. Hafiz S, De Jesus O. Ataxia. 2023 Aug 23. In: *StatPearls [Internet].* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 32965955.

25. Soong BW, Morrison PJ. Spinocerebellar ataxias. *Handb Clin Neurol*. 2018;155:143-174. doi: 10.1016/B978-0-444-64189-2.00010-X. PMID: 29891056.
26. Kuo SH. Ataxia. *Continuum (Minneap Minn)*. 2019 Aug;25(4):1036-1054. doi: 10.1212/CON.0000000000000753. PMID: 31356292; PMCID: PMC7339377.
27. Bhandari J, Thada PK, Samanta D. Spinocerebellar Ataxia. 2023 Sep 15. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 32491748.
28. Huang M, Verbeek DS. Why do so many genetic insults lead to Purkinje Cell degeneration and spinocerebellar ataxia? *Neurosci Lett*. 2019 Jan 1;688:49-57. doi: 10.1016/j.neulet.2018.02.004. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29421540.
29. De Mattei F, Ferrandes F, Gallone S, Canosa A, Calvo A, Chiò A, Vasta R. Epidemiology of Spinocerebellar Ataxias in Europe. *Cerebellum*. 2024 Jun;23(3):1176-1183. doi: 10.1007/s12311-023-01600-x. Epub 2023 Sep 12. PMID: 37698771; PMCID: PMC11102384.
30. Jayadev S, Bird TD. Hereditary ataxias: overview. *Genet Med*. 2013 Sep;15(9):673-83. doi: 10.1038/gim.2013.28. Epub 2013 Mar 28. PMID: 23538602.
31. Shakkottai VG, Fogel BL. Clinical neurogenetics: autosomal dominant spinocerebellar ataxia. *Neurol Clin*. 2013 Nov;31(4):987-1007. doi: 10.1016/j.ncl.2013.04.006. Epub 2013 Jul 30. PMID: 24176420; PMCID: PMC3818725.
32. Zamboni JL, Bellomo A, Ben-Pazi H, Everman DB, Frazer LM, Geraghty MT, et al. Spinocerebellar ataxia type 29 due to mutations in ITPR1: a case series and review of this emerging congenital ataxia. *Orphanet J Rare Dis*. 2017 Jun 28;12(1):121. doi: 10.1186/s13023-017-0672-7. PMID: 28659154; PMCID: PMC5490223.

33. Parolin Schnekenberg R, Perkins EM, Miller JW, Davies WI, D'Adamo MC, Pessia M, i sur. De novo point mutations in patients diagnosed with ataxic cerebral palsy. *Brain*. 2015 Jul;138(Pt 7):1817-32. doi: 10.1093/brain/awv117. Epub 2015 May 16. Erratum in: *Brain*. 2016 Feb;139(Pt 2):e14. PMID: 25981959; PMCID: PMC4572487.
34. Huang L, Chardon JW, Carter MT, Friend KL, Dudding TE, Schwartzenruber J, i sur. Missense mutations in ITPR1 cause autosomal dominant congenital nonprogressive spinocerebellar ataxia. *Orphanet J Rare Dis*. 2012 Sep 17;7:67. doi: 10.1186/1750-1172-7-67. Erratum in: *Orphanet J Rare Dis*. 2022 Mar 29;17(1):143. PMID: 22986007; PMCID: PMC3545966.
35. Sasaki M, Ohba C, Iai M, Hirabayashi S, Osaka H, Hiraide T, i sur. Sporadic infantile-onset spinocerebellar ataxia caused by missense mutations of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 gene. *J Neurol*. 2015 May;262(5):1278-84. doi: 10.1007/s00415-015-7705-8. Epub 2015 Mar 21. PMID: 25794864.
36. Krizanova O, Ondrias K. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor--transcriptional regulation and modulation by phosphorylation. *Gen Physiol Biophys*. 2003 Sep;22(3):295-311. PMID: 14986882.
37. Sugawara T, Hisatsune C, Le TD, Hashikawa T, Hirono M, Hattori M, i sur. Type 1 inositol trisphosphate receptor regulates cerebellar circuits by maintaining the spine morphology of Purkinje cells in adult mice. *J Neurosci*. 2013 Jul 24;33(30):12186-96. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0545-13.2013. PMID: 23884927; PMCID: PMC6618669.
38. Ogura H, Matsumoto M, Mikoshiba K. Motor discoordination in mutant mice heterozygous for the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Behav Brain Res*. 2001 Aug 1;122(2):215-9. doi: 10.1016/s0166-4328(01)00187-5. PubMed PMID: 11334652.
39. Tada M, Nishizawa M, Onodera O. Roles of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in spinocerebellar ataxias. *Neurochem Int*. 2016 Mar;94:1-8. doi: 10.1016/j.neuint.2016.01.007. Epub 2016 Jan 28. PubMed PMID: 26827887.



40. Matsumoto M, Nakagawa T, Inoue T, Nagata E, Tanaka K, Takano H, i sur. Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature*. 1996 Jan 11;379(6561):168-71. doi: 10.1038/379168a0. PMID: 8538767.
41. Ngo KJ, Poke G, Neas K, Fogel BL. Spinocerebellar Ataxia type 29 in a family of Māori descent. *Cerebellum Ataxias*. 2019 Oct 12;6:14. doi: 10.1186/s40673-019-0108-3. PMID: 31632679; PMCID: PMC6790028.
42. Romano S, Coarelli G, Marcotulli C, Leonardi L, Piccolo F, Spadaro M, i sur. Riluzole in patients with hereditary cerebellar ataxia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2015 Oct;14(10):985-91. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00201-X. PMID: 26321318.
43. Bushart DD, Shakkottai VG. Ion channel dysfunction in cerebellar ataxia. *Neurosci Lett*. 2019 Jan 1;688:41-48. doi: 10.1016/j.neulet.2018.02.005. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29421541; PMCID: PMC6077100.
44. van de Warrenburg BP, van Gaalen J, Boesch S, Burgunder JM, Dürr A, Giunti P, i sur. EFNS/ENS Consensus on the diagnosis and management of chronic ataxias in adulthood. *Eur J Neurol*. 2014 Apr;21(4):552-62. doi: 10.1111/ene.12341. Epub 2014 Jan 13. PMID: 24418350.
45. Bushart DD, Huang H, Man LJ, Morrison LM, Shakkottai VG. A Chlorzoxazone-Baclofen Combination Improves Cerebellar Impairment in Spinocerebellar Ataxia Type 1. *Mov Disord*. 2021 Mar;36(3):622-631. doi: 10.1002/mds.28355. Epub 2020 Nov 5. PMID: 33151010; PMCID: PMC7987844.
46. Martineau L, Noreau A, Dupré N. Therapies for ataxias. *Curr Treat Options Neurol*. 2014 Jul;16(7):300. doi: 10.1007/s11940-014-0300-y. PMID: 24832479.
47. Ghanekar SD, Kuo SH, Staffetti JS, Zesiewicz TA. Current and emerging treatment modalities for spinocerebellar ataxias. *Expert Rev Neurother*. 2022 Feb;22(2):101-114. doi: 10.1080/14737175.2022.2029703. PMID: 35081319; PMCID: PMC9048095.

48. Ouyang S, Xie Y, Xiong Z, Yang Y, Xian Y, Ou Z, i sur. CRISPR/Cas9-targeted deletion of polyglutamine in spinocerebellar ataxia type 3-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2018 Jun 1;27(11):756-70. doi: 10.1089/scd.2017.0209. Epub 2018 May 18. PMID: 29661116.
49. Bennett CF, Krainer AR, Cleveland DW. Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Neurosci.* 2019 Jul 8;42:385-406. doi: 10.1146/annurev-neuro-070918-050501. PMID: 31283897; PMCID: PMC7427431.
50. Hauser BM, Luo Y, Nathan A, Al-Moujahed A, Vavvas DG, Comander J, i sur. Structure-based network analysis predicts pathogenic variants in human proteins associated with inherited retinal disease. *NPJ Genom Med.* 2024 May 27;9(1):31. doi: 10.1038/s41525-024-00416-w. PMID: 38802398; PMCID: PMC11130145.
51. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, i sur. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24. doi: 10.1038/gim.2015.30. Epub 2015 Mar 5. PMID: 25741868; PMCID: PMC4544753.
52. National Library of Medicine (NLM)/ National Center for Biotechnology Information (NCBI) [internet]. Bethesda (SAD): National Institutes of Health (NIH); 1988 - . ClinVar Genomic variation as it relates to human health; [pristupljeno 19. 06. 2024.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/50985/>
53. Dong C, Wei P, Jian X, Gibbs R, Boerwinkle E, Wang K. Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies. *Hum Mol Genet.* 2015 Apr 15;24(8):2125-37. doi: 10.1093/hmg/ddu733. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25552646; PMCID: PMC4375422.

54. McCandless SE, Brunger JW, Cassidy SB. The burden of genetic disease on inpatient care in a children's hospital. *Am J Hum Genet.* 2004 Jan;74(1):121-7. doi: 10.1086/381053. Epub 2003 Dec 12. Erratum in: *Am J Hum Genet.* 2004 Apr;74(4):788. PMID: 14681831; PMCID: PMC1181899.
55. Han JY, Lee IG. Genetic tests by next-generation sequencing in children with developmental delay and/or intellectual disability. *Clin Exp Pediatr.* 2020 Jun;63(6):195-202. doi: 10.3345/kjp.2019.00808. Epub 2019 Nov 4. PMID: 32024334; PMCID: PMC7303420.
56. Moore AM, Richer J. Genetic testing and screening in children. *Paediatr Child Health.* 2022 Jul 18;27(4):243-253. doi: 10.1093/pch/pxac028. PMID: 35859684; PMCID: PMC9291346.

## ŽIVOTOPIS

Rođena sam 04. kolovoza 1999. godine u Zagrebu. Završila sam Osnovnu školu Granešina u Zagrebu 2014. godine i svoje obrazovanje nastavila sam u XV. gimnaziji u Zagrebu. Nakon završene srednje škole, 2018. godine upisujem Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studiranja sudjelovala sam aktivno i pasivno na brojnim kongresima i simpozijima. Član sam studentske organizacije CroMSIC, unutar koje sam sudjelovala na brojnim seminarima i radionicama. Volontirala sam u projektu promicanja mentalnog zdravlja „Pogled u sebe“ u srednjim školama. Na trećoj sam godini, u sklopu izbornog predmeta Experimental pharmacology and pathology, volontirala u laboratoriju na Zavodu za kliničku farmakologiju. Od samog početka studiranja aktivna sam članica odbojkaške sekcije na fakultetu, s kojom sam osvojila i nagrade, a od 2023. godine sam postala i dio vodstva. Posjedujem vještine govorenja, čitanja i pisanja na engleskom jeziku.