

54899

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

FRAJİL-X SENDROMLU AİLELERDE
DNA ANALİZİ ÇALIŞMALARI

DOKTORA TEZİ

İBRAHİM KESER

T 54899

TEZ DANIŞMANI

Prof.Dr.Güven LÜLEÇİ

"Tezimden kaynakça gösterilerek yararlanılabilir."

ANTALYA- 1996

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ VE YÖNTEM	15
BULGULAR	28
TARTIŞMA	36
ÖZET	42
SUMMARY	44
KAYNAKLAR	46

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada; tez konusunun seçiminde ve çalışma süresince her koşulda yardımcı, uyarı ve yapıcı eleştirileri ile araştırmanın başlaması, yürütülmesi, olumlu yönde gelişmesi ve sonuçlanmasında büyük emeği geçen, danışmanım değerli hocam Prof.Dr. Güven LÜLECI'ye,

Anabilim Dalımız öğretim üyelerinden Doç.Dr. Gülseren BAĞCI'ya, katkılarından dolayı Doç.Dr. Hüseyin BAĞCI'ya,

Laboratuvarlarında çalışma imkanı sağlayan Doç.Dr. Tayfun ÖZÇELİK'e, DETAM Moleküler Genetik-Anabilim Dalından arkadaşım sevgili Dr.Uğur ÖZBEK'e,

MAM-GMBAE- Moleküler Patoloji- Gebze'den Prof.Dr. Engin BERMEK ve Prof.Dr.Beyazıt ÇIRAKOĞLU hocalarıma, Dr. Erol ATALAY'a, Arş.Gör. Berrin ERDAĞ'a, Tenisyen Aydın BAHAR'a,

İsviçre Bern Üniversitesi'nden sevgili hocam Prof.Dr. Mualla ALKAN'a,

Çalışmamızda kullandığımız StB12.3 probunu gönderen Prof.Dr.Jean-Louis MANDEL'e(Fransa),

İşaretleme Kiti ve Radyoaktif(alfa-32P-dCTP) madde alımına katkılarından dolayı Aspendos Rotary Klubü'ne,

Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji'den
Yrd.Doç.Dr.O.Nidai ÖZEŞ'e,

Yardımlarından dolayı arkadaşım Dr. Ergün PINARBAŞI'na,
Asistan arkadaşlarım, Dr. Sibel BERKER-KARAÜZÜM'e, Arş.Gör.
Selda SAMAKOĞLU'na, Arş.Gör. Özgül ALPER'e, Arş.Gör. İbrahim
AÇIKBAŞ'a, Arş.Gör.Arzu ÖZTÜRK'e,

Teknisyenimiz Ali O. KETENCİ'ye, yazım işlerine yardım eden
emektar sekreterimiz Neriman GALIN'a,

Tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen, sorunun çözümü
için özveride bulunan Frajil X Sendromlu ailelere,

Her zaman olduğu gibi, bu tez çalışmalarım da desteğini
esirgemeyen aileme teşekkür ederim.



GİRİŞ

Frajil X sendromu sitogenetik olarak X kromozomunun q27.3 bölgesindeki frajilite ile karakterize, folik asit yetmezliği ile ortaya çıkan, popülasyonda X'e bağılı zeka geriliğinin %30-40'nı oluşturan, erkeklerde 1/1500, dişilerde 1/2500 sıklıkta görülen ve ailesel zeka geriliğine neden olan bir sendromdur. Ergenlik çağındaki erkek bireylerde temel klinik bulgular, orta ve ağır derecede zeka geriliği, ergenlik çağı, otistik davranışlar, büyük testis, uzun yüz, büyük kulaklar, yüksek damak ve düzensiz dişler, kalp bozuklukları, hipotoni şeklinde sıralanırken, bu özellikler dişi heterozigot bireylerde daha az görülmekte veya hiç görülmemektedir. Sendromun X'e bağılı olarak kalıtlanmasına karşılık, pedigri analizlerinde bu kalıtım modeline uymayan erkek ve dişi bireylerin görülmesi ve sitogenetik olarak prenatal tanı konulamaması ile moleküler çalışmalar zorunlu hale gelmiştir.

Rekombinant DNA teknolojisindeki son gelişmeler, genetik hastalıkların teşhisi için yeni yöntemlere önderlik etmiştir. Bunlardan biri, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; farklı restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA polimorfizmlerinin tayininde kullanılan metod) olmuş, hastalıklardan sorumlu gen bölgelerinin teşhisinde önemli rol oynamışlardır. Frajil X sendromundan sorumlu

bölgenin çalışılmasında da bunlardan faydalanılmış, insan DNA'sının YAC (yeast artificial chromosomes) klonlanması ile de sorumlu FMR-1 (Frajil X Mental Retardasyon-1) geni tanımlanmıştır. Genin proksimal kısmının CpG metillenmiş dinükleotid dizilim gösterdiği, hemen yanında ise "CGG"_n trinükleotid tekrarlarının varlığı saptanmıştır. Frajil X sendromlu ailelerde yapılan çalışmalarda, klinik ve sitogenetik bulgular ile korelasyon gösteren, CGG tekrarları görülmüştür. Fenotipik ve sitogenetik olarak normal olan bireylerde 6-53 arası tekrarlayan CGG dizileri bulunmuştur. Taşıyıcı dişi ve NTM (normal taşıyıcı erkek) bireylerde 50-230 CGG sonucu premütasyon, frajil X sendromlu olgularda ve bazı taşıyıcı dişi bireylerde 230'dan fazla CGG tekrarları ise full mutasyon olarak tanımlanmıştır. Frajil X sendromu geni olarak belirlenen FMR-1 geninin; 17 ekzon ve 16 introndan meydana geldiği ve alternatif kırılmalar (splaysingler) yaptığı ileri sürülmektedir. Mutasyonlara bağlı olarak, genin ürünü FMRP (FMR-1 proteini)'nin azlığı veya yokluğu, sendromun fenotipinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Dünyada değişik laboratuvarlarda yapılan ailesel çalışmalarda, fenotip-genotip arasındaki korelasyonlar, mutasyonların mekanizması ve yansımaları, aile içi klinik ve genotipik farklılıklar ele alınmıştır. Ülkemizde ilk defa yapılan bu çalışmada, daha önce sitogenetik olarak çalışılan ailelerin, hem frajil X pozitif hem de negatif olmak üzere tüm bireylerinde, Southern blot analizi ve StB12.3 probu kullanılarak, direkt DNA analizi ile mutasyon tiplerini belirlemeyi, dolayısıyla taşıyıcı dişi ve erkekleri belirleyerek genetik danışma vermeyi, sitogenetik ve moleküler sonuçları karşılaştırarak aile içi ve aileler arasındaki FMR-1 geninin durumunu Türkiye popülasyonu için araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

Zeka geriliğinin nedenlerini incelemek amacıyla yapılan genetik çalışmalar, 1938 yılında Penrose'un klinik ve genetik olarak incelediği 1280 olguda, erkeklerde zeka geriliğinin dişilerden daha fazla görüldüğüne dikkat çekmesiyle başlamıştır (1). 1943'de Martin ve Bell, ilk defa ailesel X'e bağlı zeka geriliği gösteren bir aileye ait pedigriyi ve klinik bulguları ile ilgili ilk detaylı bilgileri verdiklerinden yıllarca frajil X sendromu Martin-Bell sendromu ismi ile tanımlanmıştır.(2). Lubs 1969 yılında, X'e bağlı kalıtımla geçen zeka geriliklerinin bir bölümünden X kromozomu üzerinde bulunan frajil bölgenin sorumlu olduğunu üç kuşakta göstermiş ve bu kromozomu marker X kromozomu olarak isimlendirmiştir (3). Bantlama yöntemleri ve tekniklerindeki ilerlemelerden sonra, Sutherland 1977 yılında, frajil bölgenin ortaya çıkışında, hücre kültür ortamındaki folik asit yetersizliğinin önemli bir faktör olarak rol oynadığını kanıtlamıştır (4-7). Bu araştırmacı, folik asitten fakir bir besi ortamı olan Medium 199'a % 5 gibi düşük oranda FCS (Fetal Calf Serumu) eklediğinde, frajil X kromozomunun ortaya çıktığını göstermiştir. Frajil bölgeler üzerindeki çalışmaların yoğun olarak sürdürülmesinin temelini iki anahtar bulgu kamçulamıştır. Birincisi X'e bağlı zeka geriliği ile fraXq27.3 bölgesinin ilişkili olduğunun bulunması, ikincisi ise frajil bölgelerin gösterilmesinde özel doku kültürlerinin kullanılmasıdır.

Kromozomların daima aynı bölge ve bantlarında görülen, boya almayan, gap olarak adlandırılan frajil bölgeler görülme sıklığına ve indüklenebildikleri kimyasal ajanlara göre iki ana başlık altında sınıflandırılmaktadır.

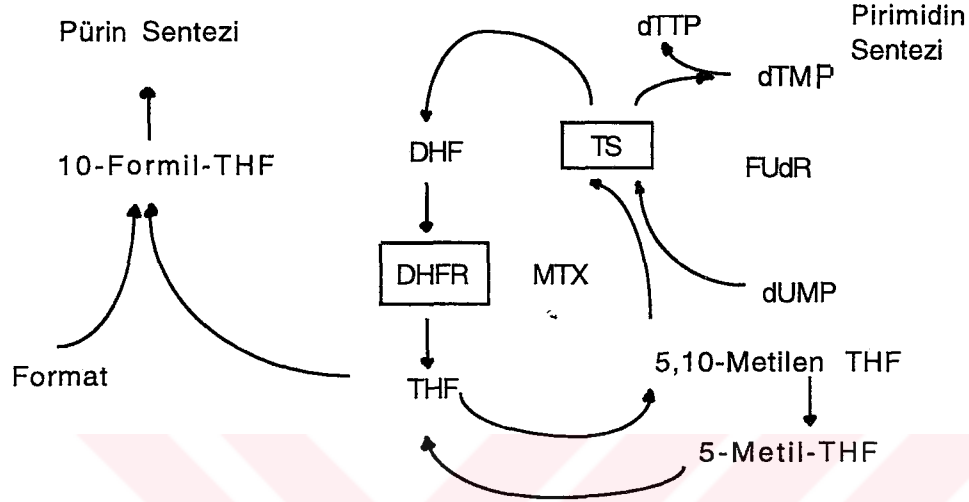
- 1) Folat sensitif olan, distamisin-A, BrdU (Bromodeoksi üridin) MTX (Metotroxate) ile uyarılabilen seyrek görülen frajil bölgeler,
- 2) Afidokolin, 5-azasitidin, BrdU ile uyarılabilen sık görülen frajil bölgeler.

Frajil X kromozomu, Xq27.3 (FRAXA) bölgesindeki frajilite ile karakterize, seyrek görülen ve folat sensitif olan bir bölgeyi içermekte ve birinci grupta yer almaktadır (Şekil 1). Frajil X kromozomu frajil X sendromlu bireylerin her metafazında görülmez. Kullanılan besi ortamının içeriğine ve pH değişimlerine bağlı olarak frajil X kromozomunun metafazlardaki görülme sıklığı değişir (8,9). Bu durum tam olarak açıklanamamıştır. Ayrıca, Xq27-28 bölgesinde iki folat sensitif frajil bölge daha klonlanmıştır. Bunlardan FRAXE' nin, FRAXA' ya 600 kb uzaklıkta telomerik yönde ve GCC tekrarları içerdiği, frajil bölge FRAXF' in ise, FRAXE' ye 600 kb distal yönde haritalandığı ve GCC tekrarlarını içerdiği saptanmıştır (10,11). FRAXE ile yapılan çalışmalarda şimdilik, klinik olarak fenotipe yansıma gözlenmemiş zeka geriliği ile ilgisinin olup olmadığı ise kesinlik kazanmamıştır (12,13).



Şekil 1. Frajil X sendromlu bir erkek olguya ait GTG bantlı metafaz örneği.

Xq27.3'de frajil bölgenin, folik asit metabolizması bozukluğu ile ilgili olduğu, folat bileşikleri ve timidin bakımından fakir ortamlarda kurulan kültürlerde veya folik asitten, pirimidin sentezinin metabolik yolunun bloke edilmesi ile ortaya çıktığı görülmüştür (Şekil 2).



Şekil 2. Frajil X ifadesini etkileyen metabolik yollar. Sutherland, GR.: Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. Science, 197: 265-266,1977.

DHF: Dihidrofolat, **THF:** Tetrahidrofolat, **dUMP:** Uridilat, **dTMP:** Timidilat, **DHFR:** Dihidrofolatredüktaz, **TS:** Timidilat sentetaz, **FUdR:** Fluorodeoksiüridin.

Sitogenetik yöntemlerin geliştirilmesine, özel kültür ortamlarının hazırlanmasına ek olarak, klinik öneme sahip olduğu bilinen tek frajil bölge frajil X olduğundan, yoğun çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar başlangıçta, hasta erkek ve taşıyıcı dişilerin bulunduğu ailelerde klinik ve sitogenetik ifade arasındaki ilişki üzerinde yoğunlaşmıştır (14-17). Çünkü, frajil X taşıyan dişilerin yaklaşık 1/3' nin değişen derecelerde zeka gerisi olduğu halde, 2/3' si sendromun klinik özelliklerini göstermezler (18,19). Bu nedenle frajil X kromozomunun sitogenetik olarak incelenmesi için, önceleri tek başına folik asit içermeyen kültür ortamları kullanılmasına karşın, bugün bunun yeterli olmadığı, ek uyarabilen ajanların kullanılması gerektiği ileri sürülmektedir (8,9). Yapılan çalışmalar arttıkça, frajil X sendromu hakkında daha fazla bilgiler elde edilmiş, yapılan popülasyon

çalışmaları sendromun sıklığı, ailesel ve bireysel çalışmaların yoğunluğu ile de önemli klinik veriler sağlanmıştır. Buna göre frajil X sendromu, sitogenetik olarak X kromozomunun q27.3 bölgesindeki frajilite ile karakterize, folik asit yetmezliği ile ortaya çıkan, popülasyonda X'e bağlı zeka geriliğinin %30-40' nı oluşturan, Down sendromundan sonra zeka geriliğinin ikinci en genel nedeni olarak tanımlanmaktadır (19,20). Down sendromundan en önemli farkı ise, X'e bağlı olarak dişiler taşıyıcı olduğundan, kalıtsal özellik göstermesi olmuştur.

Dünyada değişik toplumlarda ve ülkemizde yapılan tarama çalışmalarında, değişik bulgular bulunmakla birlikte genellikle, frajil X sendromunun erkeklerde 1/1500, dişilerde ise 1/2500 sıklıkta görüldüğü ortaya çıkmıştır (21,22). Sendromun X'e bağlı olarak kalıtlanması, erkek ve dişi bireylerde fenotipe yansımada büyük farklılıklar göstermektedir. Frajil X sendromunda görülen başlıca klinik bulgular Tablo-1' de görülmektedir (20).

Tablo-1: Frajil X sendromunda görülen başlıca klinik bulgular:

FİZİKSEL BULGULAR

- İnce ve uzun yüz hatları
- İri ve dışarı çıkık kulaklar
- Yüksek ve dar damak tavanı
- Belirgin bir alın ve çene yapısı
- Büyük testisler
- Eklemelerde hiperekstansibilite
- Hipotoni
- Mitral kapak prolapsi
- Skolyoz
- İçeri dönük göğüs
- Kalça çıkığı
- Düz tabanlılık
- Gözlerde kayma
- Parmakların ısırılmasından dolayı ellerde nasırlaşma
- Yumuşak bir ten
- Avuç içinde simian veya sydney çizgisi
- Epileptik nöbetler ve sık sık tekrarlanan göz dalmaları

DAVRANIŞ BOZUKLUKLARI

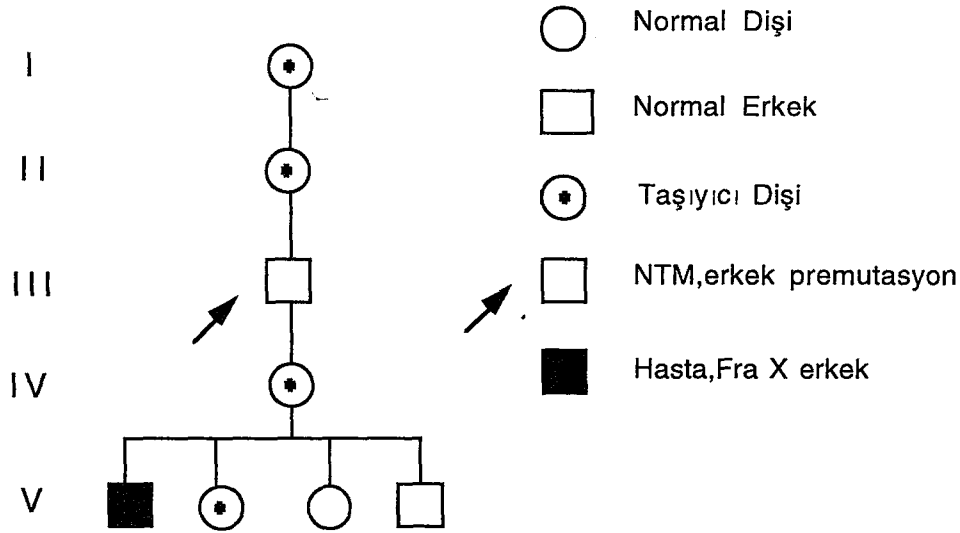
- Hiperaktivite
- Konsantrasyon güçlüğü ve kısa dikkat süresi
- Dikkatin kolaylıkla bozulması

- Otistik benzeri hareketler
 - El çırpma ve el ısırma
 - Ellerde stereotipi hareketler
 - Zayıf göz kontağı
 - Dokunsal duyarlılık
 - Tokalaşmada tüm bedeninin ters yöne dönmesi
- Aşırı ve devamlı konuşma
- Hızlı ve tekrarlayıcı konuşma modeli
- Konuşma bozukluğu ve dil gelişiminde gecikme
- Düşüncelerde organizasyon bozukluğu
- ince ve kaba motor gelişiminde gecikme
- İçe kapanıklılık
- Depresyon
- Arkadaş gruplarına katılmada zorluk
- Sebepsiz öfke ve ağlama krizleri
- Atılgnlık (düşünmeden acele hareket etme)
- Günlük rutin programın değıştirilmesine uyum sağlamada güçlük
- Saldırgan hareketler

ZİHİNSEL YETERSİZLİKLER

- Mental retardasyon(Zeka geriliğı)
 - Sınır düzeyden ağır zihinsel yetersizliğe kadar uzanan geniş bir yayılım gösterir
- Öğrenme güçlükleri
 - Özellikle sendromdan etkilenen kızlarda çeşitli derecelerde öğrenme güçlüğü saptanmıştır. Genelde matematiksel işlemlerin öğrenilmesinde bariz zorlanma vardır.
- Konu kavramada yetersizlik
- Geçmişe ait kuvvetli ve şaşırtıcı bellek
- Çok kuvvetli taklit yeteneğı
- Soyut konuları anlamada güçlük
- Düşüncelerde tutarsızlık

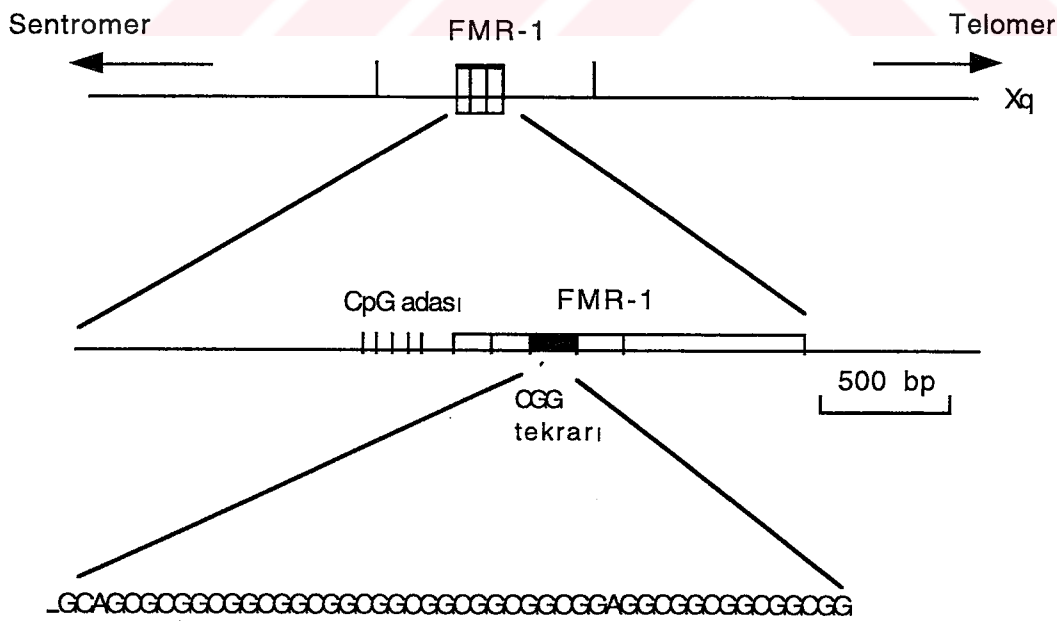
Bu üç grupta belirtilen bulgular kişiden kişiye değışebilir. Bazen hepsi bir arada olabildiğı gibi, bazen de birkaçı bulunabilir. Bu bulguların çoğı erkek hastalarda gözlenirken, taşıyıcı dişilerde daha az veya hiç görülmemektedir. Pedigri analizlerinde, sendromun herhangi bir klinik özelliğini taşımayan, sitogenetik olarak negatif olan erkek bireyler gözlenmiştir. Bunların oranı % 20 olup, sendromu kız çocuklarına, onlar da erkek çocuklarına aktarırlar. Klinik olarak normal görünömlü, ancak taşıyıcı bu erkekler "normal transmitting male; NTM; normal taşıyıcı erkekler" olarak tanımlanırlar. Frajil X sendromunun kalıtımındaki bu kuşak atlama pozisyonu (normal transmitting erkeklerin erkek torunlarının zeka gerisi olması) da "Sherman Paradoksu İkilemi" olarak isimlendirilmektedir (Şekil3) (19).



Şekil 3: Sherman paradoksunun şematik gösterimi. Sherman, S.:Epidemiology. In: Hagerman, RJ., Silverman,AC.,eds. Fragile X syndrome: diagnosis,treatment, and research. Baltimore; Johns Hopkins Press,69- 97, 1991.

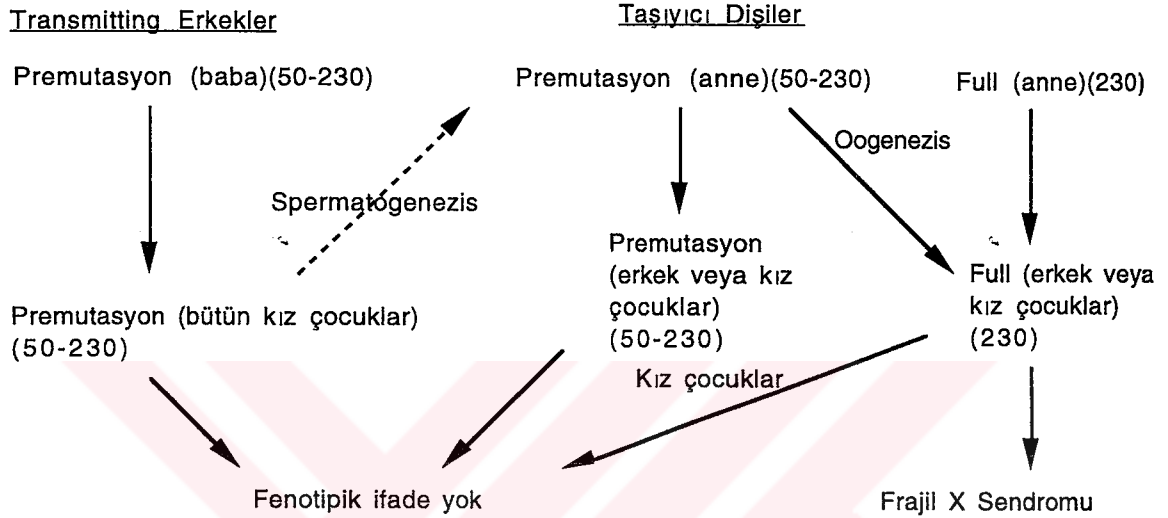
Frajlil X sendromu ile ilgili sitogenetik çalışmalar arttıkça, sendromun X'e bağlı kalıtıma uymayan hastaların bildirilmesi, klinik ve zeka geriliği derecelerinin değişkenlik göstermesi, olması gerektiği halde bazı annelerde ve erkek çocuklarda frajlil X saptanamaması, her zaman sitogenetik olarak prenatal tanının konulamaması sendromla ilgili moleküler çalışmaların yapılmasını zorunlu kılmıştır. Bu nedenle frajlil X sendromu, kalıtımının mekanizmasını ve modelini açıklama, frajlil X bölgesinde meydana gelen düzenlenmeyi moleküler temelde inceleme ve araştırma yönünde geniş bir çalışma alanı oluşturmuştur. Rekombinant DNA teknolojisindeki son gelişmeler, genetik hastalıkların teşhisi için yeni yöntemlere önderlik etmektedir. Bu yeni teknikler, RFLP' lerin kullanılması ile teşhise yardım etmektedir. Önceleri bu yaklaşım, frajlil X mutasyonunun açıklanması için de temel taşı olarak kullanılmıştır (24-30). Bu tip çalışmalar linkaj (bağlantı) analizi olarak isimlendirilirler. Son yıllarda , insan DNA'sının YAC'lerde klonlanması ile hem normal hem de frajlil X'e ait YAC kütüphaneleri elde edilmiştir. Frajlil bölge YAC'larına sıkıca bağlı olan RFLP' ler kullanılarak yapılan kromozomal in situ çalışmalarında, frajlil bölgenin proksimal ve distalinde kromozomun sıkı paketlenmiş yerlerde floresan işaret aldığı, işaret almayan yerde kromozomal paketlenmenin olmadığı görülmüştür (31,32). Daha sonra X kromozomunun uzun kolunun distal bölgesine ilişkin yapılan

çalışmalarda, frajil X bölgesinin CpG metillenmiş dinükleotid dizilimler gösterdiği, frajil X sendromlu erkeklerde metilasyon sensitif restriksiyon enzimlerine bu bölgenin dirençli olduğu gösterilmiştir (33,34). CpG'deki sitozinin metilasyonunun ifade gösteren bir genin kapanmasına neden olacağı düşüncesi ileri sürülmüştür (35). CpG adasının etrafındaki dizilerin subklonlanması ile elde edilen bölgeler prob olarak kullanılmış ve frajil X sendromlu erkeklerde bu bölgenin aşırı derecede metillendiği saptanmıştır. CpG' ye bitişik klonlara dizi analizi yapıldığında, frajil X kromozomunda stabil olmayan DNA bölgesi belirlenmiştir (34-38). Stabil olmayan bu DNA bölgesinin Sitozin-Guanin-Guanin tekrarlarını "(CGG) n " içerdiği görülmüştür. Bu CGG tekrarları normal populasyonda polimorfik olup, 6 ile 53 tekrar arasında değişmektedir. Yapılan çalışmalarda, klinik olarak etkilenmemiş bireylerde (NTM ve taşıyıcı dişilerde) CGG tekrarları 50-230 arasında olup, premütasyon olarak tanımlanır ve bu allelin dişi birey tarafından kalıtıldığı zaman, stabil olmadığı görülür. Eğer CGG tekrarlarının sayısı 230' dan fazla ise bu durum full (tam) mutasyon olarak değerlendirilir (38-45). Beyinde, testislerde ve overlerde yüksek olmak üzere diğer dokularda da ifade gösteren, 4.4 kb mRNA' ya (39-70 kDa protein kodlayan) eşdeğer cDNA klonu düşünülen gen, FMR-1 şeklinde isimlendirilmiştir (Şekil 4)(46).



Şekil 4 Frajil bölge Xq27.3'deki FMR-1 geninin haritası Tarleton, JC., Saul, RA.: Molecular genetic advances in fragile X syndrome. J Pediatrics, 122(2): 169-185,1993.

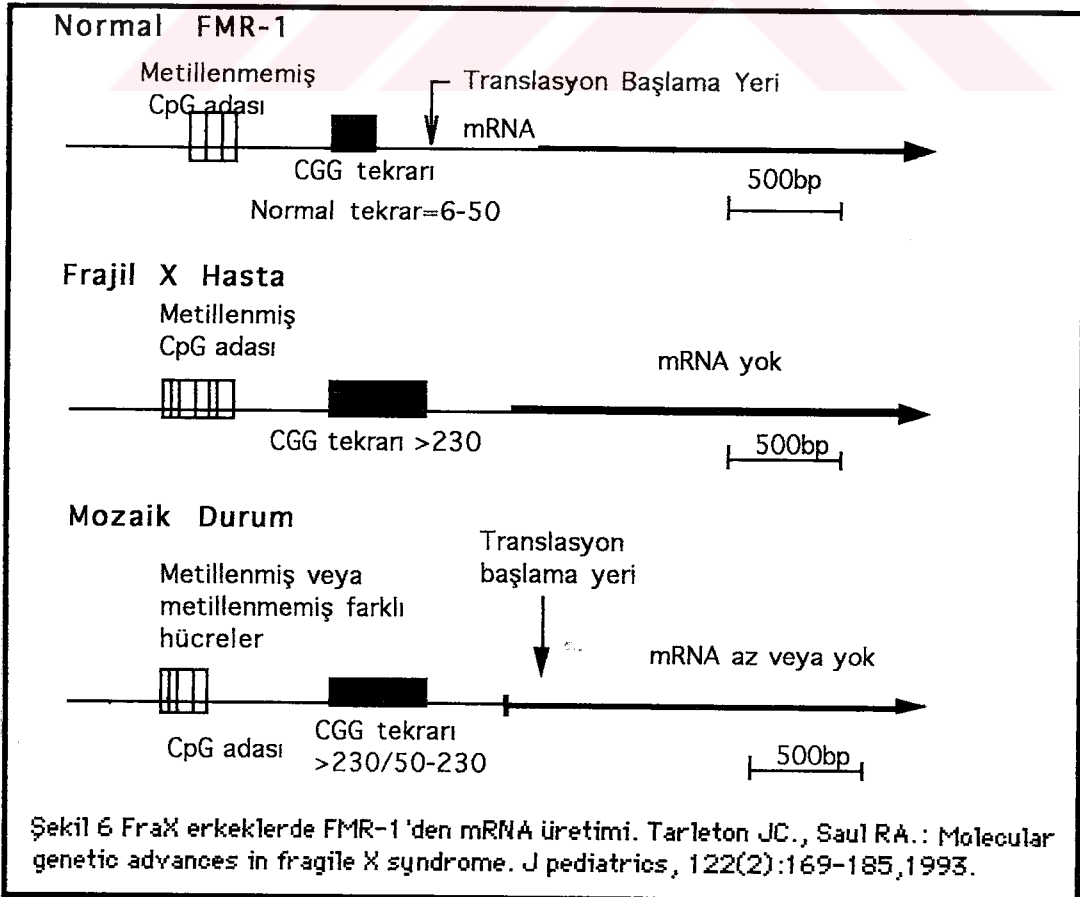
FMR-1 genindeki normal stabil durumun premutasyona, premutasyonun full mutasyona dönüşümündeki CGG trinükleotid artışına neden olan spesifik mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir. Premutasyon ve full mutasyon arasındaki kalıtım biçimi Şekil 5' de görülmektedir.



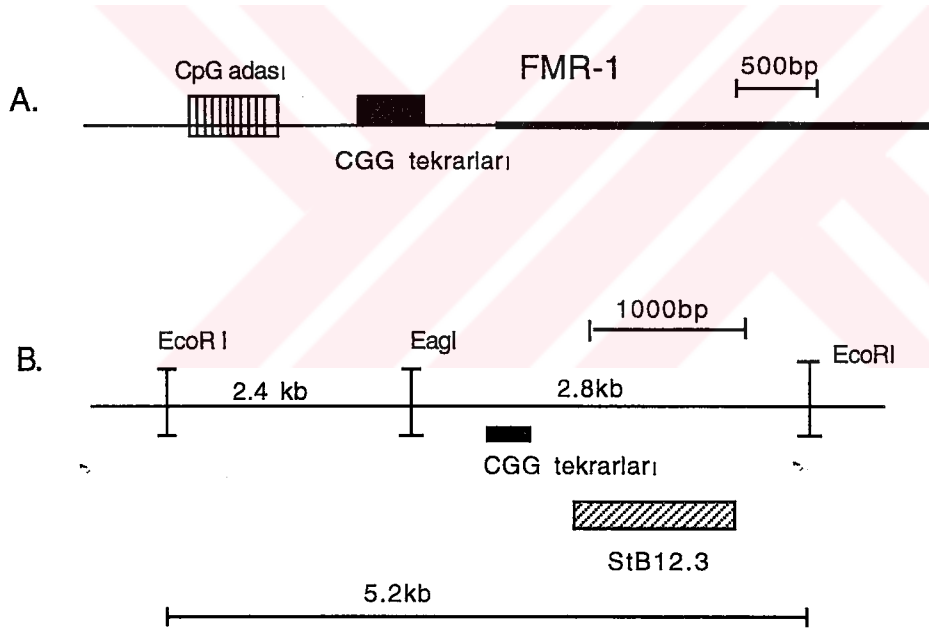
Şekil 5. Frajil X sendromundaki premutasyon ve full mutasyonların kalıtımı. Tarleton, JC., Saul, RA.: Molecular genetic advances in fragile X syndrome. J Pediatrics, 122(2): 169-185,1993.

FMR-1 geninin ince yapısı üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda genin bulunduğu lokusun yaklaşık 50 kb, gen büyüklüğünün 38 kb, 17 ekzon ve 16 introndan meydana geldiği, ifadesinde bazı ekzonların alternatif kırpılmalar gösterdiği belirlenmiştir (46-48). Böylece, frajil X sendromundaki klinik bulguların, FMR-1 geninin kodladığı FMRP proteininin yokluğunda ortaya çıktığına inanılmaktadır. Ashley ve arkadaşlarının FMRP üzerine yaptıkları çalışmalarda, mRNA bağlanan bir protein olduğu gösterildi (49). Ancak, FMRP' nin fonksiyonu halen tam olarak anlaşılammıştır. Premutasyon alleller genelde metillenmediğinden, FMRP normal olarak ifade edilmektedir. Full mutasyonlu frajil X hastalarda, CGG tekrar bölgelerinin metilasyonu ile FMR-1 mRNA ifadesinin olmayışı arasında % 100 korelasyon gözlenmiştir (49-53).

FMR-1 geninin 5' ekzonunda stabil olmayan CGG tekrarlarının uzaması, frajil X sendromunun fenotipi ile korelasyon gösterirken, full mutasyonun varlığı, CGG tekrarının ve önde yer alan CpG adasının aşırı metilasyonu ile uygun bulunmaktadır (54). Sonuçta, FMR-1 mRNA' sının ifadesinin baskılanması ve FMR-1 proteinin sentez edilememesi ile frajil X sendromunun klinik fenotipinin ortaya çıktığı tezi ileri sürülmektedir (54). Frajil X sendromunun klinik bulgularının ortaya çıkışında, sadece CGG tekrarlarındaki artışın değil, aynı zamanda FMR-1 genindeki delesyonların ve nokta mutasyonların da etkili olduğu bildirilmiştir (55-63). Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, frajil X sendromlu erkeklerde, FMR-1 geninden mRNA sentezinin engellenmesinin üç şekilde olduğu tahmin edilmektedir. Birincisi FMR-1 genindeki CGG tekrarının artışına bağlı olarak, anormal metilasyon sonucu mRNA sentezinin durması, ikincisi FMR-1 mRNA stabilitesini etkileyen CGG tekrarlarının artması veya artan CGG tekrarları yüzünden mRNA'nın ribozoma bağlanamaması ve translasyonun bozulması, üçüncüsü hem premutasyon hem de full mutasyonun birlikte bulunduğu mozaik durumlara göre değişkenlik göstermesidir (Şekil 6).



Frajil X' in sitogenetik teşhisindeki farklılıkları ortadan kaldırmak için, alternatif yöntemler geliştirilmiştir. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve Southern blot analizi ile birlikte kullanılmaktadır (64-66). Frajil X sendromundaki full mutasyonlar, PCR' a dayalı çalışmalarla tam olarak çözülemediğinden, Southern blot analizi tercih edilmektedir. Southern blot analizi ile hem frajil X mutasyonunun varlığı hem de FMR-1'deki metilasyon dereceleri çok iyi belirlenebilmektedir. Southern blot analizinde mutasyonun belirlenmesi için belirli problardan yararlanılmaktadır (67). Frajil X sendromlu birey ve ailelerde mutasyonu belirlemek için, FMR-1 geni ve restriksiyon enzim kesim düzenlenmesi Şekil 7' de görülmektedir.



Şekil 7. Frajil X hastalarının teşhisi için FMR-1 ve enzim kesim bölgelerinin genel düzenlenmesi; Tarleton, JC., Saul, RA.: Molecular genetic advances in fragile X syndrome. J Pediatrics, 122(2): 169-185,1993.

EagI, metilasyon sensitif bir enzim olup, kesim bölgesi CpG adası içinde bulunmakta, metilasyon arttıkça enzimin kesim yeteneği azalmaktadır.

StB12.3, hasta ve taşıyıcı bireylerde CGG tekrarlarının amplifikasyonunu tespit eden DNA probudur (54). Bu kesim sonucunda normal erkeklerde 2.8 kb'lik aktif X'e ait fragment, normal dişilerde ise iki X olduğundan 2.8 kb aktif, 5.2 kb inaktif X'e ait fragmentler görülmektedir. CGG tekrarlarındaki artış ayrı ayrı veya her iki X kromozomu üzerinde de meydana gelebilmektedir.

Frajil X sendromlu ailelerde yapılan moleküler çalışmalar, mutasyonun aile içindeki segragasyonunun aydınlatılmasında, sitogenetik olarak belirlenemeyen taşıyıcı dişi ve erkeklerin saptanmasında önemli sonuçlar ortaya koymuştur (68-77). Direkt DNA analizi yöntemlerinin geliştirilmesi ile, merkez laboratuvarlar arasında, StB12.3 probu ile frajil X tarama programlarında genotip-fenotip ilişkisi üzerinde durulmuştur (78). Rousseau ve arkadaşları 1991 yılında, 63 aileden 511 ve 19 tek birey olmak üzere, toplam 530 kişide Southern blot analizi ile StB12.3 probu kullanarak yaptıkları çalışmada, hem mutasyon tiplerini hem de metilasyon derecelerini belirlemişlerdir. 103 erkek ve 31 dişide full mutasyon, full mutasyonluların % 15' inde mozaisizm, hasta çocukların annelerinin tümünün ya premutasyon yada full mutasyon taşıdıklarını ortaya koymuşlardır (79). Yine Tejada ve arkadaşları sitogenetik olarak incelemiş oldukları 11 frajil X sendromlu ailenin 123 bireyinde, StB12.3 probu kullanarak yaptıkları direkt DNA analizlerinde, mutasyon tiplerini ve mutasyonların ailesel geçişlerini göstermişlerdir (73). Macpherson ve arkadaşları, 33 ailedeki 217 kişide, StB12.3 probu ve Southern blot yöntemi ile yaptıkları çalışmada, sitogenetik ve moleküler sonuçlarla zeka düzeyleri arasındaki ilişki üzerinde durmuşlardır (74). Ramos ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları çalışmada, 396 hasta içinde sitogenetik olarak frajil X pozitif olan 39 erkek ve 6 dişide full mutasyon, 16 zorunlu taşıyıcı dişide ise premutasyon ayrıca, frajil X sendromu hikayesi bulunan 124 hastadan 5 erkekte ve 25 dişide premutasyon bulmuşlardır (77). Visanen ve arkadaşları 1994 de, 27 frajil X pedigrisinde yer alan 465 kişinin Southern blot yöntemi ve StB12.3, StB12.xx problemleriyle FMR-1 genindeki mutasyonları taradıklarında, anormal metilasyon taşıyan full mutasyonlu erkeklerin tümünün, dişilerin % 50' sinin klinik ifade ile korelasyon gösterdiği, buna karşın premutasyonlu bireylerin normal olduğunu göstermişlerdir (76). Öğrenme güçlüğü nedeniyle özel okullara devam eden 154 çocukta yapılan moleküler çalışmada, 4 çocukta FMR-1 geninde, full mutasyona eşit CGG tekrarları saptanmış, bu bulgular ek sitogenetik ve moleküler çalışmalarla da desteklenmiştir (80).

Çalışmamızın amacı; daha önce sitogenetik olarak çalışılan ailelerin, hem frajil X pozitif hem de negatif tüm bireylerinin direkt DNA analizini yaparak, mutasyon tiplerini, dolayısıyla taşıyıcı dişi ve erkek bireyleri belirlemek, sitogenetik olarak kesin sonuç verilemediğinden prenatal tanı için temel oluşturmaktır. Ayrıca, sonuçlara göre; genetik danışma vermek, sitogenetik ve moleküler verileri karşılaştırarak aile içi ve aileler arasındaki FMR-1 geninin durumunu, kendi popülasyonumuz için değerlendirmektir.

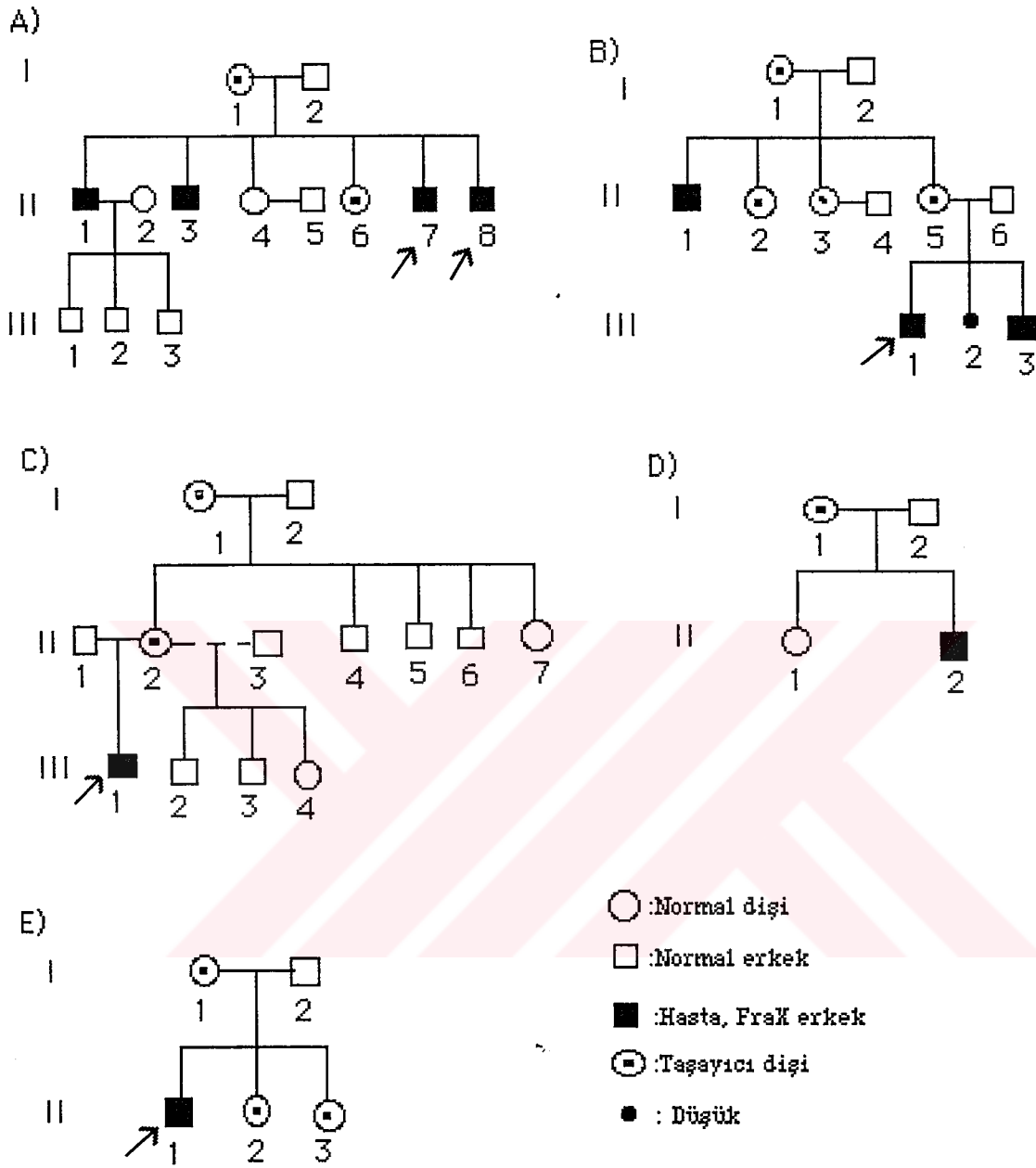


GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamıza alınan aileler,1988-1994 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı tarafından yürütülen araştırma projelerinden ve rutin laboratuvarın sitogenetik analizlerinden ortaya çıkan probandların ailelerinden oluşmaktadır.

A)Aileler

Çalışmamıza aldığımız beş ailenin, sitogenetik analiz sonuçlarına göre çizilen pedigrileri Şekil 8' de görülmektedir. GTG yöntemi ile sitogenetik olarak saptanan 5 proband ve onların ailelerinde bulunan taşıyıcılar ile hastalar, tanımlayıcı sembollerle ifade edilmiştir.



Şekil 8. Frañil-X sendromlu 5 ailenin pedigrileri.

A: A Ailesi, B: Y Ailesi, C: B Ailesi, D: Ş Ailesi, E: TR Ailesi

B) Periferik Kandan DNA İzolasyonu (Salting Out Yöntemi)
(66,81).

Kullanılan Solüsyonlar:

Lizis tampon : 155 mM NH₄Cl
10 mM KHCO₃
1 mM EDTA(pH 7.4)

WBL(white blood lysis) tampon: 0.1 M NaCl
0.025 M EDTA(pH 7.4)

Proteinaz K (Boehringer):10 mg/ml olacak şekilde 10 mM Tris HCl
(pH 8.0) ile çözüldü

TE Tamponu : 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
1 mM EDTA(pH 8.0)

SDS : %10'luk stok solüsyon

Amonyum asetat : 9.5 M

Etanol: % 99'luk.

İşlemler:

Steril koşullarda hastalardan 10 ml'lik K₃EDTA'lı tüplere 10 ml venöz kan alınarak, daha sonra 50 ml'lik polipropilen tüplere transfer edildi. Üzerine 1:3 oranında lizis tampon eklendi. +4 °C'de 15-20 dakika inkübe edildi, arada bir karıştırılarak lizis gerçekleştirildi. Süre sonunda, +4 °C'de 10 dakika,1500 rpm'de santrifüj (Sigma 3K 10) edildi. Dökelti atıldı ve çökelti tamamen homojenize edilerek üzerine 15 ml lizis tampon eklendi, +4 °C'de 10 dakika, 1500 rpm'de santrifüj edildi. Dökelti atıldı, çökelti tamamen homojenize edildi. Üzerine 9.4 ml WBL tampon, 100 µl proteinaz K, 500 µl SDS'den eklenerek 56 °C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her mililitre solüsyon başına 0.37 ml 9.5 M amonyum asetat eklendi. İyice karıştırıldıktan

sonra oda ısısında, 25 dakika, 3500 rpm'de santrifüj edildi. Çöken kısım yerinden oynatılmadan üst kısım steril 50 ml' lik santrifüj tüpüne alındı. Üzerine 1:2 oranında % 99' luk absolü isopropanol eklenerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Çöken DNA % 70'lik alkol içine alınarak yıkandı. Alkol dökülerek ependorf Speed Vac'a (Savant) yerleştirilerek kurutuldu ve 250 µl TE içinde çözüldü. DNA örneklerinin saflığı spektrofotometrede (Schimatzu-UV-Vis) 260 ve 280 nm dalga boyundaki sonuçları oranlanarak hesaplandı. DNA örneklerinin konsantrasyonu, çift iplikli DNA için 260 nm dalga boyunda 50 µg/ml olmasından yola çıkılarak bulundu.

Buna göre: $1 \text{ OD}=50 \text{ µg/ml}$, $50 \text{ µg/ml} \times \text{OD} \times \text{dilüsyon katsayısı} = \text{µg/ml}$ cinsinden DNA konsantrasyonu formülü uygulandı ve minijel ile DNA'ların elektroforetik kontrolleri yapıldı. DNA'lar +4 °C'de saklandı.

C) Genomik DNA'ların Restriksiyon Enzimler İle Kesimleri

Frajil X sendromlu ailelerin tüm bireylerinde mutasyon ve metilasyonun gösterilmesi için ikili enzim kesimi yapıldı. Genomik DNA'nın 10 µg'ı kullanılarak iki ayrı kesim yöntemi kullanıldı.

Birinci yöntemde kesim için kullanılan EcoRI (Sigma) ve metilasyon sensitif olan EagI (Sigma) enzimleri reaksiyon ortamına aynı anda eklendi.

İkinci yöntemde ise, genomik DNA önce EcoRI ile kesildi, kesilen DNA alkolle çöktürüldü, kurutuldu, tekrar suda çözüldü. Her bir örnek tekrar EagI enzimi ile kesildi. Her iki yöntem denendikten sonra çalışmalarda daha iyi sonuç veren ikinci yöntem kullanıldı.

EcoRI ile kesim

<u>Enzim</u>	<u>Tanıma dizisi</u>	<u>Optimal çalışma ısısı</u>
EcoRI	5'-G/AATTC-3'	37 °C

Reaksiyon ortamı(100 µl)

DNA	(10 µg)
H ₂ O	100 µl
Tampon H	10µl
EcoRI(10 U/µl)	5µl

Reaksiyon ortamının 37 °C'de 1 gece inkübasyondan sonra enzimin kesim kontrolü yapıldı. Kesim örneğinden 5 µl alınarak test jelinde (% 1'lik agaroz jeli) kontrol edildi. Kesimler istenildiği gibi gerçekleştiğinden, kesim ortamındaki DNA'lar 100 µl TE (20:1) ve 50 µl 7.5 M amonyum asetat eklenip karıştırılması ve üzerine 800 µl soğuk(-20 °C) absolü etanolün eklenmesi ile çöktürüldü. Tüpler 15 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. DNA'lar % 70'lik etanol ile yıkandı, kurutuldu ve 37 °C'de çalkalamalı su banyosu kullanılarak 80 µl suda çözüldü.

EagI İle Kesim

Reaksiyon ortamı (50 µl);

EcoRI ile kesilmiş DNA	40 µl
EagI tampon	5 µl
EagI(10 U/µl)(Sigma)	5 µl

<u>Enzim</u>	<u>Tanıma dizisi</u>	<u>Optimal çalışma ısısı</u>
EagI	5'-C/GGCCG- 3'	37 °C

Lambda DNA EcoRI-HindIII kesimi moleküler ağırlık standardı kullanılarak, fragment büyüklükleri değerlendirildi.

D) Southern Analizi İçin Jel Hazırlanması Ve Blotting İşlemi(64,66)

Kullanılan solüsyonlar:

10X Loening tamponu: 350 mM Tris
300 mM NaH₂PO₄.H₂O
10 mM EDTA(pH 7.4)

% 1 Agaroz Jel %1 agaroz(w/v) 1X Loening tampon içinde hazırlandı.

Etidyumbromid 10 mg/ml

10X Yükleme tamponu: %25 Bromfenol mavisi
% 0.25 Ksilensiyanol

1XLoening's tamponunun 250 ml'si ile %1'lik agaroz jel hazırlandı, DNA'yı UV altında görüntüleyebilmek için 0.5 µg/ml olacak şekilde Etidyumbromid eklendi, jel 20 x 25 cm boyutlarında dökülerek, yatay elektroforez tankına yerleştirildi. Loening's tampon içinde 60 voltta gece boyunca yürütüldü ve UV transillüminatörde (Herolab UVT-20M) kontrol edilip fotoğraflandı.

Blotting İşlemi:

Kullanılan solüsyonlar:

0.25 M HCl

Denatürasyon solüsyonu: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl

Nötralizasyon solüsyonu: 0.5 M Tris-HCl(pH 7.4), 1.5 M NaCl

10XSSC tampon : 3 M NaCl, 0.3 M Na-Sitrat

2XSSC tampon : 0.3 M NaCl,0.03 M Na-sitrat

İşlemler

Elektroforezden sonra jel 0.25 M HCl içinde yaklaşık 20-25 dakika, mavi olan yükleme tamponunun rengi sarıya değişinceye kadar bekletildi. Jel bidistile su ile yıkanarak, 30 dakika denatürasyon tamponu içinde çalkalanarak yükleme tamponunun rengi normale dönünceye kadar inkübe edildi. Süre sonunda denatürasyon solüsyonu dökülerek nötralizasyon tamponunda 20-25 dakika çalkalandı. Tankın içine 1 lt 10XSSC tamponu boşaltıldı. Yerleştirilen cam levha üzerine jelin boyutlarına göre, düzeneğe sırasıyla 3 MM Whatman kağıdı, tampondan ıslatılan 2 tane 3 MM , sonra ters çevrilen jel üzerine 2XSSC'de 5 dakika bekletilen naylon membran (Hybond N+, Amersham), tekrar bunun üzerine tamponda ıslatılmış 3 MM filtre kağıdı, üzerine de yaklaşık 8-10 cm yüksekliğinde kağıt havlu(Selpak) yerleştirilerek, yaklaşık 0,5 Kg'lık ağırlık konuldu ve gece boyunca bekletildi, gerektiğinde üstteki kağıtlar değiştirildi. Süre sonunda membran belli bir köşesinden kesilerek düzenekten çıkarıldı. Membran 2XSSC solüsyonu ile yıkandı. Oda ısısında kurutulan membran, 80°C'de 2 saat tutularak DNA'lar fikse edildi ve membranlar 3 MM arasında, +4°C'de saklandı.

E) StB12.3 Probu Eldesi

Stab kültür ortamında gönderilen (J.L.Mandel,Fransa) E.coli suşu(XL1-Blue) içindeki plazmidte (pBluescript II KS-; 2.9 Kb) yer alan StB12.3 (1.2 Kb) probu, 50 µg/ml ampisilin (Sigma) içeren LB (Luria-Bertani) besi yerinde çoğaltıldı.

Bakterilerin çoğaltılması

Kullanılan besi ortamı LB(Luria-Bertani) Besi ortamı:

- %1 gr Bacto-Tripton
- %0.5 gr Bacto maya ekstraktı
- %1 gr NaCl
- 50 µg/ml Ampisilin

İşlemler

Steril 10 ml'lik vidalı kapaklı bir tüpte, ampisilin içeren LB besi ortamına stab kültürden ekim yapılarak 37°C'de gece boyu inkübe edildi. Süre sonunda, kültür 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek dökelti atıldı ve çökelti 1 ml LB besi ortamında çözüldü. Ampisilin içeren, LB agardan hazırlanmış petri kaplarına azaltma yöntemi ile ekim yapıldı. Petriler ters çevrilerek 37°C'de gece boyu inkübe edildi. Bu kültürlerden alınan tek koloniden 10 ml LB besi ortamına ekim yapıldı, gece boyu inkübe edilerek çoğaltıldı. Bu kültür ortamınının 8 ml'si 1.5 ml'lik ependorf tüplere bölündü, kalan 2 ml kültür % 20 oranında olacak şekilde steril gliserol (Sigma) ile karıştırılarak -70 °C derin dondurucuda saklandı.

Bakterilerin Toplanması

Ependorflara bölünen kültür ortamı 1500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Mümkün olduğu kadar üst sıvı ortam uzaklaştırıldı.

Plazmid DNA'nın Eldesi

Kullanılan solüsyonlar

Solüsyon I : 50 mM Glikoz
 25 mM Tris (pH 8.0)
 10 mM EDTA

Solüsyon II : 0.2 M NaOH,
 %1 SDS

Solüsyon III: 3 M Potasyum Asetat (pH 4.8)

İşlemler

Elde edilen bakteriler üzerine solüsyon I'den 100 µl ilave edilerek vortekste karıştırıldı. Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Tüpe taze hazırlanmış solüsyon II'den 200 µl eklendi, ters çevrilerek karıştırıldı. Buz içinde 5 dakika tutuldu. Üzerine solüsyon III'den 150 µl eklenerek karıştırıldı. Buz içinde 5 dakika bekletildi. Beyaz bir çökelti oluştu. Tüpler 12 000 rpm'de , +4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Plazmid içeren üst faz temiz ependorflara alındı. Üzerine yaklaşık 2.5 hacim (450 µl) -20°C'de bekletilen soğuk % 99' luk etanol eklendi, alt-üst edilerek karıştırıldı. Plazmid DNA'sı, -20 °C'de 30 dakika süreyle çöktürüldü. 12 000 rpm'de, +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst faz atılarak, plazmid DNA yine soğuk % 70'lik etanolla yıkandı, 37°C'de kurutuldu ve 50 µl steril bidistile suda çözüldü. DNaz içermeyen RNaz (Boehringer)'dan 0.5 µl eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Satüre Fenolun eşit hacmi ile bir, Kloroform-İzoamilalkol(24:1)(Sigma)' ün eşit hacmi ile birer defa muamele edilerek, her iki safhada da 12 000 rpm, 25°C'de 15 saniye santrifüj edildi. DNA içeren üst sulu faz alındıktan sonra, üzerine final konsantrasyonu 0.1 M olacak şekilde 4 M NaCl'den 1.25 µl eklenerek yavaşça karıştırıldı, 2.5 hacim soğuk %99'luk etanol ilave edilerek yeniden karıştırıldı. -20°C'de 30 dakika bekletildi. Süre sonunda 12 000 rpm'de ,+4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Çöken DNA kurutuldu ve 20 µl steril bidistile suda çözülerek +4°C'de saklandı.

Prob StB12.3'ün Plazmidinden çıkarılması

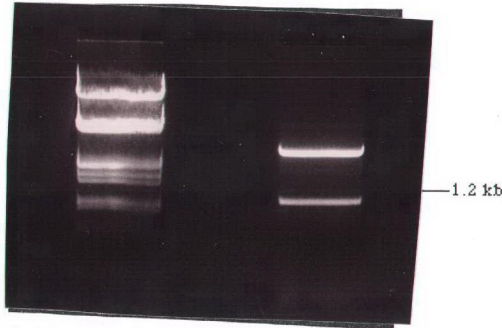
Plazmidinden probun çıkarılması için 15 µl plazmid DNA'sı, PstI enzimi(Sigma) ile 37°C'de gece boyu inkübe edilerek kesildi.

	<u>Tanıma dizisi</u>	<u>Optimal çalışma ısısı</u>
PstI Enzimi	5'-CTGCA/G-3'	37°C

Reaksiyon ortamı(50 µl):

- 15 µl Plazmid DNA(0.01 µg/µl)
- 5 µl 10X PstI enzim tamponu(Sigma)
- 2 µl (20 U) PstI
- 28 µl dH₂O

Süre sonunda kesim işlemi, % 1'lik agaroz jel hazırlanarak kontrol edildi. Probuun toplam kesim ortamından ayrıştırılması için jelden elüsyon yöntemi kullanıldı (66). Toplam kesim üzerine 5 µl 3M sodyum asetat ilave edilerek, karıştırıldı. -20°C'deki % 99' luk etanolden 2 hacim eklendi, alt üst edilip, -70°C'de 20 dakika bekletildi. 12 000 rpm'de, 15 dakika, oda ısısında santrifüj edildi. Üst kısım döküldü, -20°C'deki % 70' lik etanolden 1 ml eklendi , alt üst edildikten sonra 12 000 rpm'de, 10 dakika, oda ısısında santrifüj edildi. Üst kısım atılarak, 37°C'lik etüvde ağız açık kurutuldu, 20 µl steril bidistile suda çözüldü. Tekrar % 1'lik agaroz jel hazırlanarak örnek tümüyle yüklendi, 80 voltta Lambda-EcoRI+HindIII DNA standardına karşılık yürütülerek, bandların ayrılması sağlandı. UV ışığı altında probun bulunduğu band belirlenerek ,bandın önünde ve arkasında steril bisturi ile kesikler açıldı (Şekil 9). Bu kesikler içine bir pens ile NA-45 membranları (Schleicher-Schuell) yerleştirilerek elektroforetik işleme devam edildi. Probuun bu membrana geçmesi sağlandı. UV ışığı altında membran kontrol edilerek içinde 0.5XTE,1.5 M NaCl (pH 7.3) bulunan ependorf tüpüne alındı. Tüp su banyosunda 65°C' de 30 dakika inkübe edildikten sonra, 12 000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Dökelti başka bir ependorfa alındı ve üzerine % 99'luk etanol eklenerek hafifçe karıştırıldı, -70°C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, 20 dakika 12 000 rpm'de santrifüj edilerek çökelti % 70'lik etanol ile yıkandı. Kurutulduktan sonra 20 µl suda çözüldü. Uzun süreli saklamak için -20°C'ye kaldırıldı.



Şekil 9. StB12.3 probunun PstI enzimi ile kesilerek bulunduğu plazmidten çıkarılması. DNA standardı: Lambda-EcoRI+HindIII kesimi

Probun İşaretlenmesi

StB12.3 prob DNA'sının 50 ng'ı, multiprime işaretleme kiti (Fermantas) ile 50 μ Ci α -³²P-dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham) kullanılarak işaretleme yapıldı. Reaksiyon ortamı ependorf tüpüne hazırlanırken aşağıdaki sıra izlendi.

Kullanılan Solüsyonlar ve İşlemler

Reaksiyon ortamı(50 μ l):

- 10 μ l prob DNA'sı
- 10 μ l random primer
- 20 μ l dH₂O

vorteksle karıştırıldı ve 3-5 saniye santrifüj edildi. Kaynar su içinde 5 dakika inkübe edildi. Buz içinde soğutularak bekletilmeksizin santrifüj edildi.

- 3 μ l Mix C
- 5 μ l alfa-³²P-dCTP
- 1 μ l Klenow enzimi(3Ü)
- vorteks
- 3-5 saniye santrifüj
- 37°C'de 10 dakika
- 4 μ l dNTP
- 37°C'de 5 dakika
- 1 μ l 0.5 M EDTA(pH 8.0)

F) Prehibridizasyon ve Hibridizasyon

Kullanılan Solüsyonlar

20XSSPE tamponu:

- 3.6 M NaCl
- 0.2 M NaH₂PO₄.H₂O
- 0.02 M EDTA(pH 7.4)

50XDenhardt's çözeltisi:

- %1 Ficoll-400
- %1 PVP(polyvinyl-pyrrolidone)
- %1 BSA(Bovin serum albumin)

Prehibridizasyon/Hibridizasyon solüsyonu

Stok	Final Konsantrasyon	Kullanılan Solüsyon
20X SSPE	5X SSPE	25 ml
50X Denhardt's	5X Denhardt's	10 ml
% 10 SDS	% 0.5 SDS	5 ml
dH ₂ O		60 ml
Toplam		100 ml

İşlemler

Prehibridizasyon: hibridizasyon solüsyonundan 25 ml alınarak hibridizasyonun yapılacağı kapaklı plastik kaba konuldu. Membran hava kabarcığı kalmayacak şekilde solüsyon içine yatırıldı ve çalkalamalı su banyosunda 65°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İşaretlenen prob 95°C'de veya kaynar suda 5 dakika denatüre edildi, 5 dakika buzda bekletildi.

Hibridizasyon: işaretli denatüre prob, hibridizasyon kabının bir kenarından eklendi ve homojenize olması için hafifçe karıştırıldı. Hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi. 65°C'de 12 saat inkübasyona bırakıldı.

Yıkama: süre sonunda, membranlar alınarak sırasıyla 2XSSPE, % 0.1 SDS' de oda ısısında iki defa 10'ar dakika, 1XSSPE, % 0.1 SDS'de bir defa 65°C'de 30 dakika yıkanması sağlandı. Yıkanan membranlar 3 MM filtre kağıdı arasında oda ısısında kurutuldu. 1 MM filtre kağıdı üzerine kenarlarından bandlanarak yerleştirildi. Membranın

pozisyonunu belirlemek için 1 MM üzerine radyoaktif noktalar konuldu.

G) Otoradyografik İşlem

Yıkama ve kurutma işlemleri tamamlanan membranlar, saran wrap ile düzgün bir şekilde kaplandı. Karanlık oda düzeneği sağlandıktan sonra, yoğunlaştırıcısı olan film kasetlerine film (Hyperfilm, Amersham) yerleştirilerek, membranlarla birlikte kaset içinde kaymamaları için tespit edildi. Membranın işaretli kenarına gelen filmin köşesi kıvrılarak, ikinci bir işaret daha yapıldı. Sıkıca kapatılan film kasetleri -70°C 'de 1-3 gün süreyle bekletildi ve otomatik developer (Toshiba)' da banyo edilerek değerlendirmeye alındı.

H) Densitometrik Analiz

Otoradyografik işlemden sonra filmler bilgisayar bağlantılı, taramalı densitometre (LKB Bromma, Ultrascan XL, enhanced laser densitometer, A.B.D.) ile değerlendirildi. Negatif kontrol olarak, normal insan (hem dişi hem de erkek bireyler) DNA'sından elde edilen bandlar oranlandı.

BULGULAR

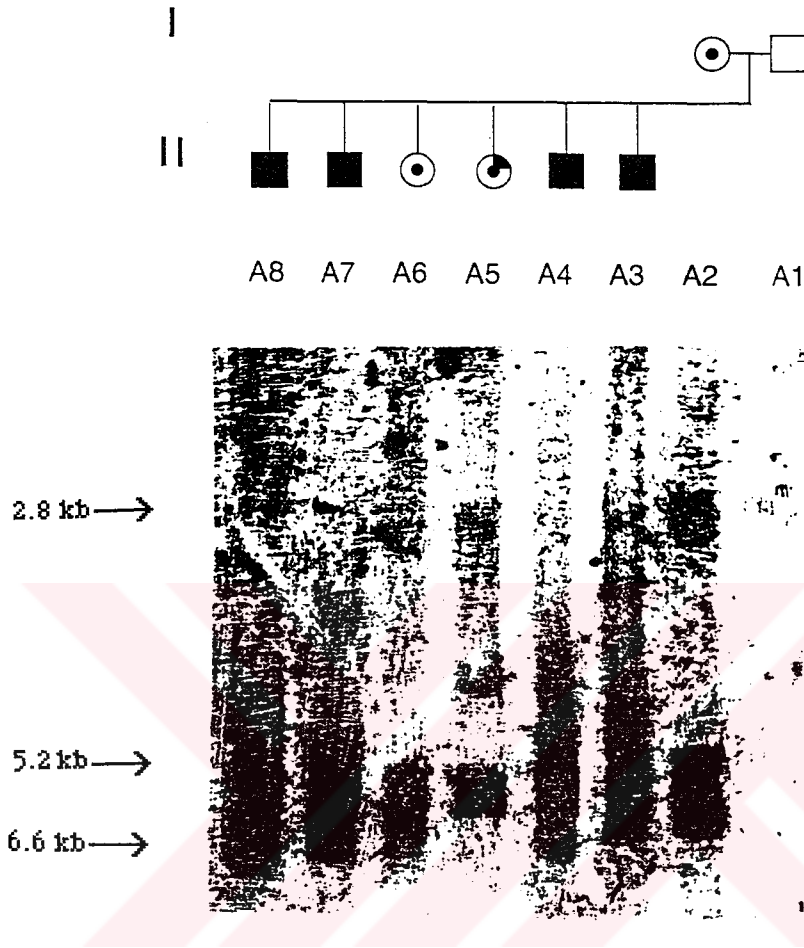
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı tarafından yürütülen projelerden ve rutin sitogenetik analizlerden saptanan 5 olgunun ailelerinin pedigrileri incelenerek, DNA izole edilecek bireyler saptandı. A ailesinden 8, Y ailesinden 8, B ailesinden 6, Ő ailesinden 4 ve TR ailesinden 5 olmak üzere (16 erkek ve 15 dişi) toplam 31 bireyden alınan kanlardan DNA'lar izole edildi. Olgulara ait DNA'ların spektrofotometrik lmleri ve miktarları Tablo 2'de belirtilmiŐtir.

Tablo 2. Frajil X sendromlu aile üyelerinden elde edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları

<u>Aileler</u>	<u>OD₂₆₀</u>	<u>OD₂₈₀</u>	<u>OD₂₆₀/OD₂₈₀</u>	<u>Konsantrasyon</u> <u>(μg/uI)</u>
<u>A- AİLESİ</u>				
A-1	0.104	0.054	1.9	0.52
A-2	0.088	0.047	1.85	0.442
A-3	0.060	0.034	1.76	0.3
A-4	0.139	0.076	1.75	0.62
A-5	0.051	0.026	1.9	0.255
A-6	0.128	0.070	1.82	0.619
A-7	0.216	0.120	1.8	1.08
A-8	0.312	0.175	1.78	1.56
<u>Y- AİLESİ</u>				
Y-1	0.033	0.019	1.75	0.165
Y-2	0.181	0.100	1.81	0.905
Y-3	0.268	0.153	1.75	1.34
Y-4	0.708	0.361	1.9	3.54
Y-5	0.256	0.140	1.82	1.28
Y-6	0.188	0.107	1.76	0.94
Y-7	0.127	0.068	1.86	0.635
Y-8	0.624	0.350	1.78	3.12
<u>B- AİLESİ</u>				
B-1	0.111	0.061	1.81	0.555
B-2	0.120	0.068	1.76	0.6
B-3	0.183	0.098	1.86	0.915
B-4	0.166	0.086	1.9	0.83
B-5	0.152	0.082	1.85	0.76
B-6	0.154	0.083	1.85	0.77
<u>Ş- AİLESİ</u>				
Ş-1	0.353	0.186	1.89	1.765
Ş-2	0.208	0.105	1.9	1.040
Ş-3	0.216	0.109	1.88	1.080
Ş-4	0.177	0.092	1.9	0.885
<u>TR- AİLESİ</u>				
TR-1	0.263	0.149	1.76	1.315
TR-2	0.120	0.063	1.9	0.6
TR-3	0.220	0.119	1.84	1.1
TR-4	0.153	0.086	1.77	0.765
TR-5	0.114	0.066	1.72	0.570

Frajil X sendromlu ailelerin tüm bireylerinin blotting ve hibridizasyon sonrası otoradyografi sonuçları ile sitogenetik olarak bulunmuş frajil X (%) oranları, bireylerin pre, full ve mozaik mutasyon tipleri ve zeka düzeylerini içeren veriler, her aile için düzenlenmiş olan tablolarda ve şekillerde görülmektedir. (Tablo3-7)

1) A ailesi ile ilgili veriler



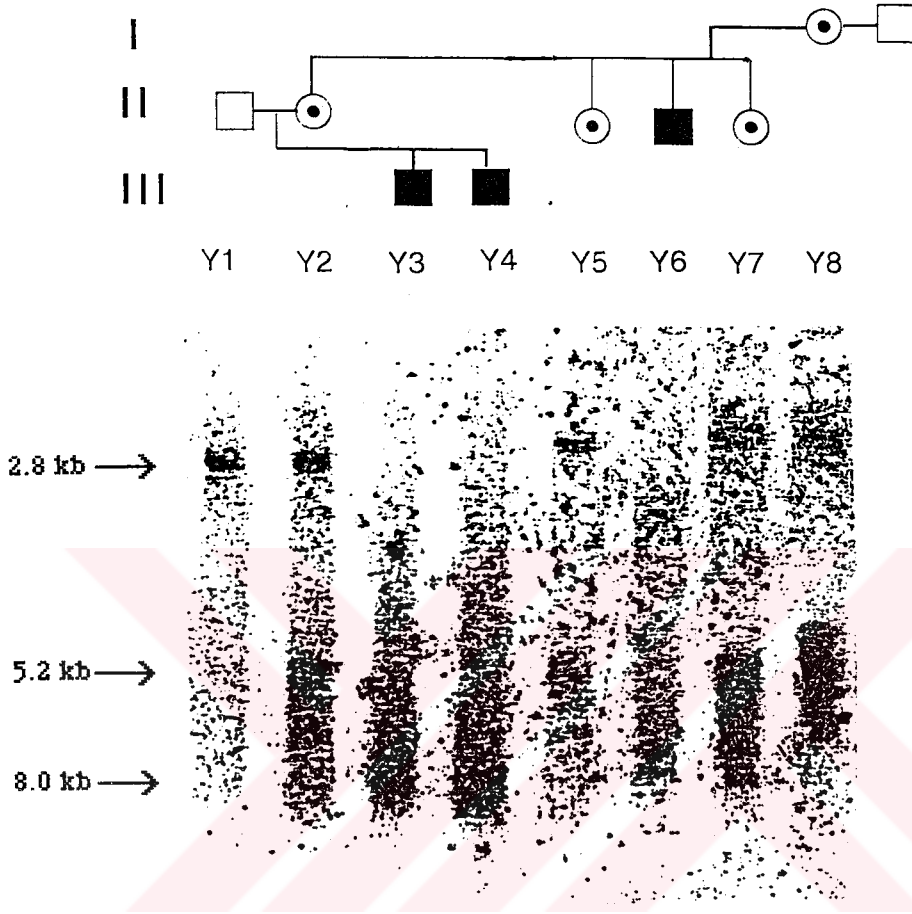
Şekil 10- A ailesinin blotting ve hibridizasyon sonrası otoradyografik sonuçlar

Tablo 3- A ailesinin direkt DNA analizi sonuçları ve ailenin diğer verileri ile arasındaki ilişkileri.

A-Ailesi Bireyleri	Cinsiyet	Kuşak	Fra (X) Kromozom %	Mutasyon			Zeka
				Pre	Full kb	Moz.	
A1	E	1	-		-		Normal
A2	K	1	8		6.2		Normal
A3	E	2	8		6.6		Geri
A4	E	2	13		6.6		Geri
A5	K	2	-		6.0	4.0	Normal
A6	K	2	13		6.2		Hafif
A7	E	2	3		6.6		Geri
A8	E	2	8		6.6		Geri

* Full mutasyonlardaki CGG trinükleotid tekrarlarının artışı $5.2+\Delta = 0.8-1.4$ kb arasındadır. E; Erkek , K; Kadın , pre; premutasyon, full; full mutasyon, moz; mozaik mutasyon,**A5; Mozaik mutasyon taşıyıcısı

2) Y ailesi ile ilgili veriler



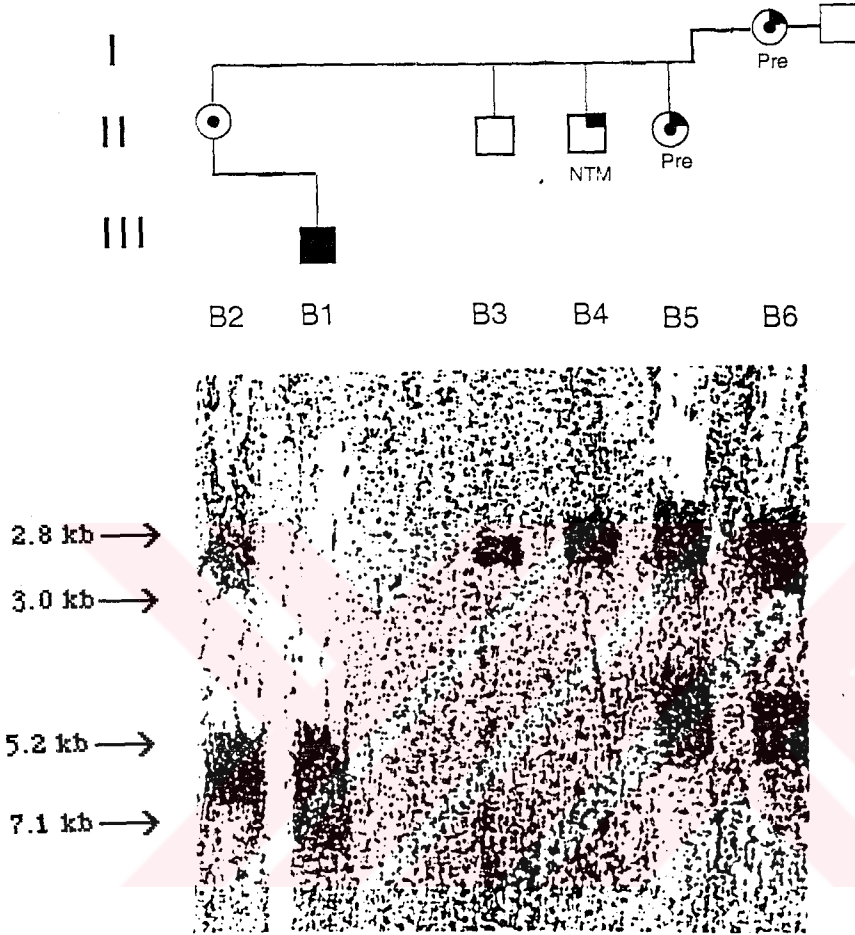
Şekil 11.Y Ailesinin blotting ve hibridizasyon sonrası otoradyografik sonuçları.

Tablo 4.Y Ailesinin direkt DNA analizi sonuçları ve ailenin diğer verileri arasındaki ilişkileri.

Y-Ailesi Bireyleri	Cinsiyet	Kuşak	Fra (X) Kromozom %	Mutasyon		Zeka
				Pre	Full kb	
Y1	E	2	-	-	-	Normal
Y2	K	2	2		6.1	Normal
Y3	E	3	7		8.0	Geri
Y4	E	3	32		8.0	Geri
Y5	K	2	2		6.2	Normal
Y6	E	2	16		7.5	Geri
Y7	K	2	3		6.1	Normal
Y8	K	1	2		6.0	Normal

* Full mutasyonlardaki CGG trinükleotid tekrarlarının artışı $5.2+\Delta=0.8-2.8$ kb arasındadır. E;Erkek, K;Kadın pre;premutasyon, full;full mutasyon, moz; mozaik mutasyon.

3) B Ailesi ile ilgili veriler



Şekil 12. B Ailesinin blotting ve hibridizasyon sonrası otoradyografi sonuçları.

Tablo 5. B Ailesinin direkt DNA analizi sonuçları ve ailenin diğer verileri arasındaki ilişkileri.

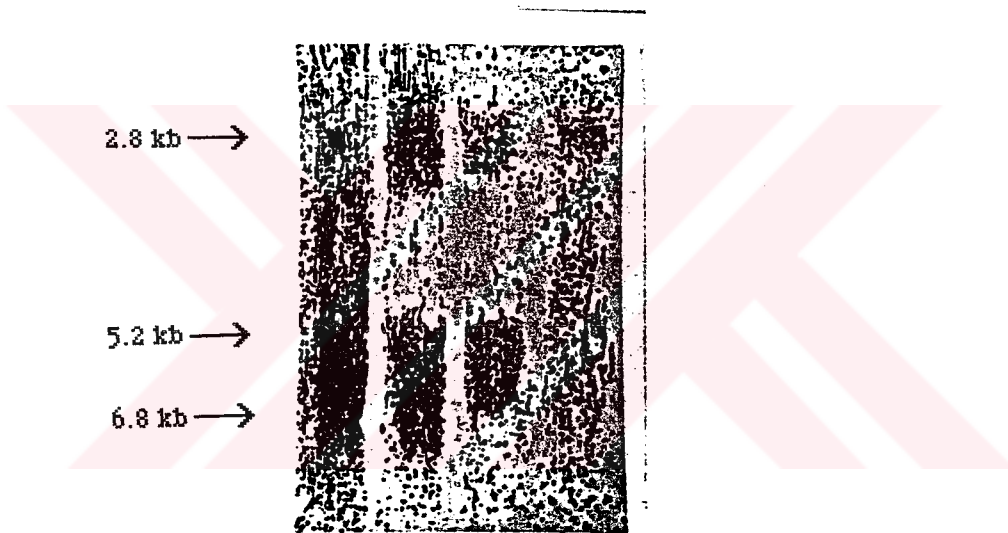
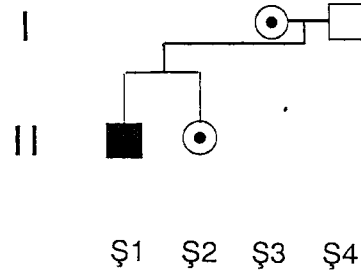
B-Ailesi Bireyleri	Cinsiyet	Kuşak	Fra (X) Kromozom %	Mutasyon		Zeka
				Pre	Full kb	
B1	E	3	20		7.1	Geri
B2	K	2	3		7.1	Hafif
B3	E	2	-		-	Normal
B4	E	2	-	3.0		Normal
B5	K	2	-	3.0		Normal
B6	K	1	2	3.0		Normal

*Full mutasyonlardaki CGG trinükleotidlerinin artışı $5.2+\Delta=1.9$ kb'dir.

*Premutasyonlardaki CGG artışı $2.8+\Delta=0.2$ Kb'dir.

E; Erkek, K; Kadın, pre; premutasyon, full;full mutasyon, moz;mozaik mutasyon.

4) Ş Ailesi ile ilgili veriler



Şekil 13. Ş Ailesinin blotting ve hibridizasyon sonrası otoradyografi sonuçları.

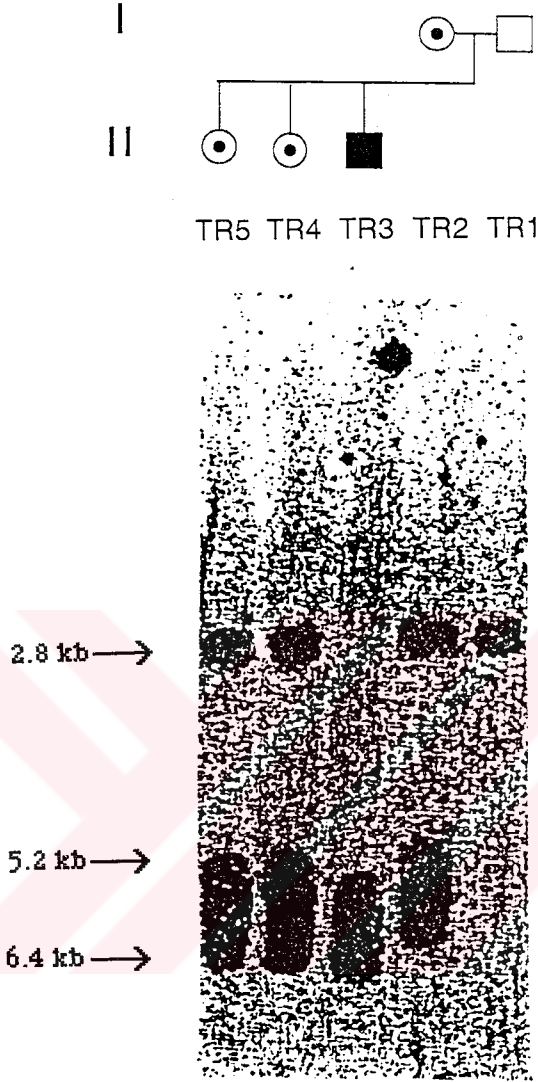
Tablo 6. Ş Ailesinin direkt DNA analizi sonuçları ve ailenin diğer verileri arasındaki ilişkileri.

Ş-Ailesi Bireyleri	Cinsiyet	Kuşak	Fra (X)	Mutasyon		Zeka
			Kromozom %	Pre	Full kb	
Ş1	E	2	13		6.8	Geri
Ş2	K	2	2		6.3	Normal
Ş3	K	1	2		6.3	Normal
Ş4	E	1	-		-	Normal

*Full mutasyonlardaki CGG trinükleotidlerinin artışı $5.2+\Delta=1.1-1.5$ kb arasındadır.

E;Erkek, K; kadın, pre; premutasyon, full; full mutasyon, moz; mozaik mutasyon.

5) TR Ailesi ile ilgili veriler



Şekil 14. TR-Ailesinin blotting ve hibridizasyon sonrası otoradyografi sonuçları.

Tablo 7. TR Ailesinin direkt DNA analizi sonuçları ve ailenin diğer verileri arasındaki ilişkileri

TR-Ailesi Bireyleri	Cinsiyet	Kuşak	Fra (X)		Mutasyon		Zeka
			Kromozom	%	Pre	Full kb	
TR1	E	1	-	-	-	-	Normal
TR2	K	1	5	5	6.3	6.3	Normal
TR3	E	2	18	18	6.4	6.4	Geri
TR4	K	2	16	16	6.3	6.3	Hafif
TR5	K	2	2	2	6.4	6.4	Geri

*Full mutasyonlardaki CGG trinükleotidlerinin artışı $5.2+\Delta=1.2-1.3$ kb arasındadır.

E; Erkek, K; Kadın, pre; pre mutasyon, full; full mutasyon.

Bu sonuçlara göre normal erkekler 2.8 kb, normal dişiler ise 2.8 kb ve 5.2 kb'lik fragmentler gösterdiler. Bunlardan 2.8 kb olan fragment EagI enzimi ile kesilen, metillenmemiş DNA bulunan aktif X kromozomuna, 5.2 kb'lik fragment ise EagI ile kesilmeyen, sadece EcoRI kesim aralıklarını içeren, metillenmiş DNA bulunan inaktif X kromozomuna ait fragment olarak görüldü. Normal taşıyıcı erkek (NTM) (B4) ve premutasyon taşıyıcı dişilerde (B5 ve B6) $2.8 + \Delta = 3.0$ kb ($\Delta = 0.2$ kb CGG trinükleotid artışı) fragment belirlendi. Klinik olarak hasta ve sitogenetik olarak frajile X pozitif olan erkek ve dişilerin hepsinin 6.0-8.0 kb arasında değişen ($\Delta = 0.8-8.0$ kb) full mutasyon taşıdıkları görüldü.

Sitogenetik olarak negatif, zekası normal olan dişi birey A5'in direkt DNA analizinde 2.8 kb'lik normal fragmentle birlikte, 6.0 kb ve 4.0 kb iki fragment taşıdığı ve mozaik mutasyon gösterdiği saptandı. Hasta erkeklerin annelerinin hepsinin full mutasyon taşıyıcısı olduğu ve anormal derecede metilasyon gösterdikleri tespit edildi. Full mutasyonlu erkeklerin tümü ağır zeka gerisi iken, premutasyonlu erkek ve dişilerin normal zekaya sahip oldukları görüldü. Mozaik mutasyon hariç, full mutasyon taşıyan dişilerin hepsi sitogenetik olarak pozitif ve zekaları normal, ancak iki dişi bireyin hafif zeka geriliğine sahip oldukları görüldü. Full mutasyonlu erkeklerde frajil X görülme oranı bir kişide %3 (A7), diğerlerinde % 8-32 arasında iken, dişilerde genelde %2-3, %8 ve 16 arasında değiştiği belirlendi. Ailelerde kuşak sayısı arttıkça sitogenetik ifadenin ve CGG trinükleotid tekrarlarının artış eğilimi gözlemlendi.

TARTIŞMA

Frajil X sendromu, kalıtsal zeka geriliğinin en genel nedenlerinden biri olduğundan, son yıllarda hastalığın doğum öncesi ve sonrası tanısı büyük önem kazanmıştır. Son beş yıla kadar olguların teşhis edilmesi ile ilgili kullanılan tek yöntem özel koşullu sitogenetik yöntemler olmuştur. Bugün sitogenetik olarak çözülemeyen olgularda ve prenatal tanıda güvenilir sonuçların elde edildiği değişik moleküler yöntemler kullanılmaktadır (79,82-84).

Frajil X sendromunun teşhisi ve ailesel geçişinin incelenmesinde en etkili moleküler yöntem Rousseau ve arkadaşlarının 1991 yılında Frajil X sendromlu 63 ailede mutasyonları saptamak için tanımladıkları EcoRI ve metilasyon sensitif enzim olan EagI enzimlerinin ikili enzim kesimi, Southern blot transferi ve mutasyona özgül StB12.3 probunun kullanıldığı yöntem olmuştur(79). Bu yöntem mutasyon tipini ortaya koyarken, aynı zamanda EagI enziminin metilasyona sensitif olması ile de mutasyonun nedeni olan CGG tekrarlarının metilasyona uğrayıp uğramadıklarını ve fenotipe yansımalarını ortaya çıkarmaktadır(68-80). Frajil X sendromlu ailelerin tüm bireylerinde yapılan çalışmalarla, aile üyelerinin normal, pre, full ve mozaik mutasyonları belirlenmiştir(67-80). Tejada ve arkadaşları sitogenetik olarak incelemiş oldukları 11 frajil X

sendromlu ailenin 123 bireyinde ve 8 kontrolde, StB12.3 probunu kullanarak yaptıkları direkt DNA analizlerinde, 5 mozaik birey, 21 full mutasyonlu olgu saptamışlardır. Sitogenetik olarak % 2-47 oranında frajil X pozitif olan dişilerde full mutasyon gözlenirken, % 1 frajil X pozitif bulunan bir dişide premutasyon gözlemiştir (73). Yine, Vaisanen ve arkadaşları 1994 yılında StB12.3 probu, EcoRI+EagI ikili kesimi ile yaptıkları 27 frajil X sendromlu olgunun ailelerinde 282 kişi incelemişler, pre, full ve mozaik mutasyonların klinik ile korelasyon gösterdiğini, üç kuşaklı bir ailede de premutasyondan full mutasyona geçişi ve bu mutasyonlarda sitogenetik ifadenin değişkenliğini ortaya koymuşlardır (76).

Rousseau ve arkadaşları 1994 yılında, 14 merkezin sonuçlarını yayınlamaları populasyon çalışmalarının önemli olacağını ortaya koymuşlar, genel populasyonda frajil X premutasyonunun yaklaşık % 0.9 olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca klinik, sitogenetik ve moleküler bulgular arasında tam bir korelasyon bulmuşlardır (78).

Çalışmamızda daha önce sitogenetik olarak analizleri yapılmış frajil X sendromlu 5 ailenin 16 erkek, 15 dişi toplam 31 bireyinde, laboratuvarımızda değiştirerek uyguladığımız DNA izolasyon yöntemi, EcoRI ve EagI enzimleri ile ikili kesim, Southern blot ile transfer ve FMR-1 genindeki CGG tekrarlarının artışı saptayan StB12.3 probu kullanarak incelemeler yapıldı. Ailelere ilave 4 erkek birey kontrol olarak kullanıldı. StB12.3 probu ile elde edilen full mutasyonlar ile hasta erkekler arasında "full mutasyon ile zeka geriliği arasında % 100" tam korelasyon bulunurken, full mutasyon taşıyan dişilerin 11 tanesi (% 73.3) normal, 3 tanesi (% 20) hafif zeka gerisi, 1 tanesi (% 6.7) ağır zeka geriliğine sahipti. Bu sonuçlar Macpherson ve arkadaşlarının 33 frajil X sendromlu ailede, StB12.3 probu kullanarak elde ettikleri sonuçlarla karşılaştırıldığında full mutasyonlu erkeklerin hepsinin hasta, onlardan da ancak full mutasyon taşıyıcısı dişilerin % 50 sinin zeka gerisi olduğu görülmektedir(74). Bizim bulgularımızda, full mutasyonlu dişilerde görülen zeka geriliği oranının (% 26.7) düşük olması örnek sayısının az olmasından

kaynaklanabilir. Ancak genel çalışmaların sonuçlarındaki 1/3 zeka geriliği oranına uygun görülmektedir.

B ailesinde normal zekalı, premütasyon taşıyan anne olan B6'nın 2 kız 2 erkek çocuğu bulunmaktadır. Premütasyonlu B4 erkek(NTM) ile premütasyonlu kız kardeşi B5'in fenotipleri ve zekaları normal iken, yine premütasyon taşıyan kız kardeşleri B2'nin fenotipik olarak normal fakat hafif zeka geriliğine sahip olduğu görülmüştür. B2'nin erkek çocuğunda (B1) ise full mutasyon ve ağır zeka geriliği saptanmıştır. Sitogenetik ve moleküler tekniklerle bulunan sonuçlar karşılaştırıldığında B3, B4 ve B5' de fraXq27.3 sitogenetik olarak gözlenmemiştir. En yüksek oran ise B1 full mutasyonlu olguda bulunmaktadır (Tablo 5). Bu sonuçlar FMR-1 geninin 5' ucunda birinci ekzonda yer alan CGG tekrarlarının amplifikasyonla arttığını ve insitabilite gösterdiğini, pre ve full mutasyonlarda metilasyon derecesinin değişik olduğunu ve fenotipi nasıl etkilediğini ortaya koymaktadır. B-Ailesinin bu kalıtım biçimi, Sherman paradoksu ikilemi ile uygunluk göstermektedir.

A-Ailesinde mozaik mutasyon(6.0 kb ve 4.0 kb) taşıyan A5 dişi bireyi, sitogenetik olarak negatif olup, normal zekaya sahip bulunmaktadır. 6.2 kb full mutasyonu taşıyan anne(A2) normal zekalı, %8 frajil X kromozomlu iken, aynı büyüklükte fragment taşıyan kız kardeş(A6)'de ise hafif zeka geriliği ve %13 frajil X kromozomu gözlenmiştir. Zeka geriliği olan A7'de ise % 3 frajil X kromozomu bulunmuşken, full mutasyon saptanmıştır. Bu sonuçlar sitogenetik oranlar ile moleküler sonuçların uyumsuzluğunu açıkça göstermektedir. Sadece moleküler bulgular ile fenotip değerlendirildiğinde ise, aile içinde CGG tekrarlarının metilasyona ve amplifikasyona bağlı olarak fenotipi etkilediğini göstermektedir. FMR-1 genindeki CGG tekrarlarının artışı ve artışa bağlı olarak CpG adalarının metilasyonunun artması, FMR-1 geninin ürünü protein FMRP'nin transkripsiyonunun azalması veya olmaması ile paralellik gösterdiğine ilişkin çalışmalar yapılmıştır(49-51,85-87). Çalıştığımız ailelerde aile içi ve aileler arasında benzer büyüklükte mutasyon taşıyan bireyler arasındaki fenotipik farklılıklar, CpG adalarının

metilasyon farklılığı dolayısıyla FMRP'nin bozulan transkripsiyonundan kaynaklanabilir.

Frajil X kromozomunun bütün metafazlarda bulunmayışı ve cinsiyete bağlı farklılıklar göstermesi tam olarak açıklanamamıştır. Ancak, erkeklerde bir tane X kromozomu bulunduğundan genellikle oran yüksek bulunmaktadır. Bizim ailelerimizde de, aile içi ve aileler arasında cinsiyet ve frajil X ekspresyonu arasında ters bir korelasyon gözlenmiştir. Genelde full mutasyonlu erkeklerde frajil X %'si yüksek iken, full mutasyon taşıyıcısı dişilerde düşük bulunmuştur. Bu bulgular, daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir(8,9,20).

Moleküler çalışmaları başlatmamıza neden olan Y ailesinin Y2 bireyinin daha önce frajil X sendromlu bir oğlu olup kendisi taşıyıcı olduğundan, başka bir kentte ve merkezde, amniyosentez ile prenatal tanıya gidilmiş, 70 metafaz analiz edilmiş ve sonuçlar normal olarak değerlendirilmiştir. Aile, tüm endişelerine rağmen, sitogenetik belirlemeler geciktiğinden, hamilelik de ilerlediğinden doğuma karar vermiştir. Doğum sonrası bizim laboratuvarımıza başvuran ailenin bu çocuğunda % 32 oranında frajil X kromozomu saptanmıştır. Direkt DNA analizinde bu bireyin 8.0 kb fragmentle full mutasyon taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. Bugün prenatal tanıda artık moleküler yöntem kullanılmaktadır (88-92). Ayrıca premutasyon taşıyan erkek de sitogenetik olarak negatif bulunabilmektedir(78). B-Ailesinden NTM B4 ve B5 sitogenetik olarak negatif, anneleri B6, %2 pozitif olarak gözlenmiştir (Tablo 5). İncelenen metafazlarda frajil X kromozomunun görülme yüzdesi, frajil X kromozomu taşıyan bireyin cinsiyetine, yaşına ve elde edilen kültür ortamlarının içeriğine, pH'sına, hatta yaymaya göre değişebilmektedir (8,9,20). Kullanılan kültür ortamlarının ve kromozom elde etme yöntemlerinin aynı olmasına karşın, olgularımızda görülen % frajil X oranlarının değişken olması, bu koşullardan bir yada birkaçının etkisinden olabilir. Bu sonuçlar aile çalışmalarında sitogenetik yöntemlere ilave moleküler yöntemlerin kullanılması gerektiğini göstermektedir.

Aile içindeki bireylerin buldukları kuşaklara bakıldığında, genellikle aynı kuşakta yer alan bireylerde, CGG tekrarlarının artışında aynı ve yakın oran gözlenirken, kuşaklar arasında farklı olduğu görülmektedir. Özellikle, üç kuşaklı olan Y ve B-Ailelerinde birinci kuşaktan üçüncü kuşağa olan geçişte CGG tekrarlarının artışında önemli farklılıklar vardır.(Tablo 4, 5). Ölçüm sapmaları olabileceği gibi, belirgin farklılıklar gözlenmektedir. Yapılan linkaj analizi çalışmalarında, kuşaklardaki bu CGG tekrarlarındaki artışın eşit olmayan kross over mekanizması ile gerçekleştiği görüşü ortaya çıkmıştır (36,38). Stabil olmayan CGG tekrarlarının artışında veya delesyonunda , her 10 CGG tekrarından sonra 0-3 tane bulunan AGG sekanslarının önemli rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (93-95). Bu instabilite nedeniyle 17 ekzonu bulunan FMR-1 geninin, alternatif kırılmalar yaptığı, buna bağlı olarak defekt protein üretebileceği gözlenmiştir (47,49). Protein, mRNA veya dizi analizleri yapıldığında, bizim olgularımızdaki klinik ve mutasyonlar arasındaki ilişki daha sağlıklı tartışılabilir.

FMR-1 geninde, CGG tekrarlarının artışlarından başka, bu genin dahil olduğu bölgenin delesyonlarının da frajil X sendromuna neden olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (55-63). FMR-1 geninin bulunduğu FRAXA(Xq27.3) lokusuna yakın farklı iki frajil bölge; FRAXE(Xq28) ve FRAXF(Xq27.3-q28) tanımlanmış, bunlardan FRAXE'nin orta derecede zeka geriliği ile ilgili geni taşıyabileceği, GCC tekrarlarından oluştuğu ancak kesinlik kazanmadığı bildirilmiştir (10,12,96,97).

Frajil X sendromu ile ilgili ailesel ve populasyon çalışmaları arttıkça, sendromdan sorumlu genin yapısı, fonksiyonu, çalışma mekanizması, ürünü ve görevleri hakkında daha çok bilgi edinilecektir. FMR-1 genindeki CGG tekrarlarının polimorfik olması, toplumların bu gen açısından taramalar yaparak risk grubunu oluşturan premutasyonlu bireyleri belirlemeleri zorunluluğunu ortaya çıkarmaktadır. Dünya'da, bu konuda yoğun çalışmalar başlatılmıştır (98-107).

Sonuç olarak, bulgularımızın fragil X sendromunun moleküler düzeyde incelenmesi için başlangıç olmasında, araştırmada kullanılacak yöntemin belirlenmesinde, řu anda sendromu taşıyan ailelerde mutasyonları belirleyerek takibe alınmasında, genetik danışma vererek bilgilendirmede, örnek sayısının az olmasına rağmen Dünya literatürüne uygunluk göstermesi ve toplumumuz hakkında bilgi verici olması bakımından önemli olduğu düşüncesindeyiz.



ÖZET

Frajil X sendromu, ailesel zeka geriliğinin en genel nedeni olup, FMR-1 geninin 5'ucunda UTR bölgesinde stabil olmayan CGG tekrarlarının artışı ile karakterize bir sendromdur. Frajil X sendromlu 5 ailenin 16 erkek ve 15 dişi toplam 31 bireyinde DNA izolasyonu, EcoRI ve EagI ikili enzim kesimi, Southern blot ve FMR-1 genindeki CGG artışını tespit eden StB12.3 probu kullanarak hem CGG tekrarlarının uzaması hemde CpG adasının metilasyon durumunu belirlemek için moleküler çalışmalar yapıldı. Sonuçta, full mutasyon ($\Delta=0.8-2.8$ kb) taşıyan 10 erkek, ağır mental retardasyon ile % 100 korelasyon gösterirken, full mutasyon taşıyan dişilerin 11(%73) 'nin normal, 3(% 20) ünün hafif ve 1(% 6.7) nin de ağır olmak üzere farklı zeka düzeylerine sahip oldukları belirlendi. Bir dişi bireyde mozaik mutasyon(6.0 ve 4.0 kb) bulundu, ancak zekasının normal olduğu, frajil X kromozomu taşımadığı görüldü. Aynı aileden 3 üyenin premutasyon ($\Delta =0.2$ kb) taşıdığı, bunlardan annenin % 2 oranında frajil X taşıdığı saptandı. Ayrıca, özellikle 3 kuşaklı ailelerde olmak üzere kuşaklar arasında CGG tekrarlarının arttığı gözlemlendi.

Bulgularımızda da görüldüğü gibi, klinik bulguları frajil X sendromuna uyan bireylerle, frajil X sendromlu ailelerde sitogenetik olarak negatif olan bireylerde, kesinlikle direkt DNA analizinin

yapılmasının zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Bu teknik sitogenetik olarak tam belirlenemeyen, kliniği değişebilen taşıyıcı dişi, mozaik ve NTM'lerin gösterilmesi için önemlidir. Frajl X sendromunun prenatal tanısında, amniyosentez'den sonra, koryon biyopsisinde de rutin olarak yapılan direkt DNA analizi sonuçlarının, sitogenetik analizlerden daha güvenilir olduğu ortaya çıkmıştır.



SUMMARY

Fragile X syndrome which is the most common cause of familial mental retardation is a syndrome characterized with the increased of an unstable repeated CGG trinucleotide sequence in the 5' untranslated region of the FMR-1 gene. We have screened among 31 members (16 males and 15 females) of 5 families with fragile X syndrome by direct DNA testing of FMR-1 locus for the determination of both size of CGG repeats expansion and methylation status of the CpG island using EcoRI and EagI double digestion, Southern blotting and StB12.3 probe that detects the CGG repeats. As a conclusion while 10 males with full mutation ($\Delta=0.8-8.0$ kb) had severe mental retardation with 100% correlation, it was determined that females carrying the full mutation with different mental status whose of 11(73%), 3(20%), and 1(6.7%) had normal, borderline and severe mental retardations, respectively. Mosaic mutation (6.0 and 4.0) has been found in a female with normal mentality, not carrying fragile X chromosome. Three members of the same family had the premutation ($\Delta=0.2$ kb) and one of them was mother who had 2% fragile X chromosomes. Also, we have observed increasing of CGG repeats between the generations, especially in families with three generation

As seen our results, if the probands have the clinical findings relevant to frajil X syndrome or members of families with fragile X syndrome are cytogenetically negative, it has been arisen that direct DNA analysis should do in these cases certainly. Direct DNA analysis is particularly important for diagnosing the uneffected carrier females, mosaic cases and NTMs. In prenatal diagnosis of fragile X syndrome, it was shown that the results of direct DNA analysis which can be routinely carried out using a chorionic villus sample as well as amnionsentesis are more reliable than cytogenetic method.



KAYNAKLAR

- 1- Penrose, LS.: A clinical and genetic study of 1280 cases of mental defect. Medical Research Council Special Report Series 229, 1938.
- 2- Martin, JP., Bell, J.: A pedigree of mental defect showing sex-linkage. J Neurol Psychiatry, 6: 151-154, 1943.
- 3- Lubs, HA.: A marker X chromosome. Am J Hum Genet, 21: 231-244, 1969.
- 4- Sutherland, GR.: Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. Science, 197: 265-266, 1977.
- 5- Sutherland, GR.: Fragile chromosomes. Int Rev Cytol, 81: 63-73 1983.
- 6- Sutherland, GR.: Heritable fragile sites on human chromosomes. XII. Population Cytogenetics. Ann Hum Genet, 49: 153-161, 1985.

- 7- Sutherland, GR.: The enigma of the fragile X chromosome. TIG, April: 108-112, 1985.
- 8- Jacky, P.: Cytogenetics. In: Hagerman, RJ., Silverman, AC., eds. Fragile X syndrome: diagnosis, treatment, and research. Baltimore, Johns Hopkins Press, 98- 145, 1991.
- 9- Jacky, P., Ahuja, YR., Anyane-Yeboah, K., Breg, WR., Carpenter, NJ., et al.: Guidelines for the preparation and analysis of the fragile X chromosome in lymphocytes. Am J Med Genet, 38: 400- 403, 1991.
- 10- Allingham-Hawkins, DJ., Ray, PN.: FRAAXE expansion is not a common etiological factor among developmentally delayed males. Am J Hum Genet, 56: 72-76, 1995.
- 11- Gedeon, AK., Keinanen, M., Ades, LC., Kaariainen, H., Gecz, J., et al.: Overlapping submicroscopic deletions in Xq28 in two unrelated boys with developmental disorders: Identification of a gene near FRAAXE. Am J Hum Genet, 56: 907- 914, 1995.
- 12- Chakrabarti, L., Knight, SJL., Flannery, AV., Davies, KE.: A candidate gene for mild mental handicap at the FRAAXE fragile site. Hum Mol Genet 5(2); 275-282, 1996.
- 13- Oostra, BA., and Halley, DJJ.: Complex behavior of simple repeats: The fragile X syndrome. Pediatric Research 38(5); 629-637, 1995.
- 14- Turner, G., Opitz, JM., Brown, WT., Davies, KE., Jacobs, PA., et al.: Conference report: Second international workshop on the fragile X and X-linked mental retardation. Am J Med Genet, 23: 11-67, 1986.
- 15- Webb, T., Thake, A., Todd, J.: Twelve families with fragile (Xq27). J Med Genet, 23: 400-406, 1986.

16- Mulley, JC., Sutherland, GR.: Letter to editor: Fragile X transmission and the determination of carrier probabilities for genetic counselling. *Am J Med Genet*, 26: 987-990, 1987.

17- Schinzel, A., Largo, RH.: The fragile X syndrome(Martin-Bell syndrome). Clinical and cytogenetic finding in 16 prepubertal boys and in 4 of their 5 families. *Helv Paediat Acta*, 40: 133-152,1985.

18- Rogers, RC., Simensen, RJ.: Fragile X syndrome: A common etiology of mental retardation. *Am J Mental Defic*, 91(5): 445-449,1987.

19-Sherman, S.: Epidemiology. In: Hagerman, RJ., Silverman, AC.,eds. *Fragile X syndrome: diagnosis, treatment, and research*. Baltimore; Johns Hopkins Press, 69- 97, 1991.

20- Hagerman, RJ.: Physical and behavioral phenotype. In: Hagerman, RJ., Silverman, AC., eds. *Fragile X syndrome : diagnosis, treatment, and research*. Baltimore; Johns Hopkins Press, 3-68,1991.

21- Gustouson, K-H., Blomquist, H., Holgrem, G.: Prevalence of fragile X syndrome in mentally retarded children in a Swedish Country. *Am J Med Genet*, 23; 581-588,1986.

22- Webb, TP., Bunday,SE.,Thake,AI.,Todd,J.: Population incidence and segregation ratios in Martin-Bell syndrome. *Am J Med Genet*, 23; 573-580,1986.

23- Sherman, SL., Rogatko, A., Turner, G.: Recurrence risks for relatives in families with an isolated case of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, 31: 753-765,1988.

24- Nussbaum, RL., Airhart, SD., Ledbetter, DH.: Recombination and amplification of pyrimidine rich sequences may be responsible for initiation and progression of the Xq27 fragile site: An hypothesis. *Am J Med Genet*, 23: 715- 721, 1986.

25-Warren, ST.: Fragile X syndrome: A hypothesis regarding the molecular mechanism of the phenotype. *Am J Med Genet*, 30:681-688,1988.

26- Richards, RI., Shen, Y., Holman, K., Kozman, H., Hyland, VJ., et al.: Fragile X syndrome : Diagnosis using highly polymorphic microsatellite markers. *Am J Hum Genet*, 48: 1051- 1057,1991.

27- Richards, RI., Holman, K., Kozman, H., Kremer, E., Lynch, M., et al.: Fragile X syndrome: genetic localisation by linkage mapping of two microsatellite repeats FRAXAC1 and FRAXAC2 which immediately flank the fragile site. *J Med Genet*, 28: 818-823,1991.

28- Nakahori, Y., Knight, SJL., Holland, J., Schwartz, C., Roche, A., et al.: Molecular heterogeneity of the fragile X syndrome. *Nucleic Acids Research*, 19(16): 4355- 4359, 1991.

29- Bell, MV., Hirst, MC., Nakahori, Y., MacKinnon, RN., Roche, A., et al.: Physical mapping across the fragile X : Hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell*, 64: 861- 866, 1991.

30- Oberle, I., Russeau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., et al.: Instability of a 550 - base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*, 252: 1097-1102,1991.

31- Hirst, MC., Rack, K., Nakahori, Y., Roche, A., Bell, MV., Flynn, G., et al.: A YAC contig across the fragile X site defines the region of fragility. *Nucleic Acids Research*, 19(12): 3283-3288, 1991.

32-Dietrich, A., Kioschis, P., Monaco, AP., Gross, B., Korn, B., et al. : Molecular cloning and analysis of the fragile X region in man. *Nucleic Acids Research*, 19(10): 2567-2572, 1991.

33- Verkerk, AJMH., Pieretti, M., Sutcliffe, JS., Fu, Y-H., Kuhl,DPA., et al.: Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, 65: 905-914, 1991.

34- Yu, S., Pritchard, M., Kremer, E., Lynch, M., Nancarrow, J., et al.: Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science*, 252:1179-1181,1991.

35- Fu, Y-H., Kuhl, DPA., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, JS., et al.: Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: Resolution of the Sherman paradox. *Cell*, 67: 1047-1058,1991.

36- Hulsebos, TJM., Oostra, BA., Broersen, S., Smits, A., van Oost, BA., et al.: New distal marker closely linked to the fragile X locus. *Hum Genet*, 87: 369-372, 1991.

37- Oberle, I., Boue, J., Croquette, MF., Voelckel, MA., Mattei, MG., Mandel, JL.: Three families with high expression of a fragile site at Xq27.3 , lack of anomalies at the FMR-1 CpG island, and no clear phenotypic association. *Am J Med Genet*, 43: 224- 231, 1992.

38-Yu, S., Mulley, J., Loesch, D., Turner, G., Donnely, A., Gedeon, A., et al.: Fragile X syndrome : Unique genetics of the heritable unstable element. *Am J Hum Genet*, 50: 968-980, 1992.

39- Pieretti, M., Zhang, F., Fu, Y-H., Warren, ST., Oostra, BA., Caskey, CT., Nelson, DL. : Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell*, 66: 817-822,1991.

40- Pergolizzi, RG., Erster, SH., Goonewardena, P., Brown, WT.: Detection of full fragile X mutation. *Lancet*, 339: 271-272,1992.

41- van Oost, BA., Smits, APT., Dreesen, JCFM., van den Ouweland, AMW., Oostra,BA.: Validation of linkage-based DNA-diagnosis of fragile X gene carriers with the CGG repeat probe. *Am J Med Genet*, 43: 320- 327, 1992.

42- Mulley, JC., Yu, S., Gedeon, AK., Donnely, A., Turner,G., Loesch,D., et al. : Experience with direct molecular diagnosis of fragile X . *J Med Genet*, 29: 368-374, 1992.

43- Knight, SJL., Hirst, MC., Roche, A., Christodoulou, Z., Huson, SM., et al. : Molecular studies of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, 43: 217-233, 1992.

44- Caskey, CT., Pizzuti, A., Fu, Y-H., Fenwick Jr, RG., Nelson, DL.: Triplet repeat mutations in human disease. *Science*, 256: 784-789,1992.

45- Snow, K., Doud, LK., Hagerman, R., Pergolizzi, RG., Erster, SH., Thibodeau, SN.: Analysis of a CGG sequence at the FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *Am J Hum Genet*, 53: 1217- 1228,1993.

46- Eichler, EE., Richards, S., Gibbs, RA., Nelson, DL.: Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet*, 2(8): 1147- 1153, 1993.

47- Verkerk, AJMH., de Graaff, E., de Boulle, K., Eichler, EE., Konecki, DS., et al.: Alternative splicing in the fragile X gene FMR-1. *Hum Mol Genet*, 2(4): 399-404,1993.

48-Hansen, RS., Canfield, TK., Lamb,MM., Gartler,SM., Laird, CD.: Association of fragile X syndrome with delayed replication of the FMR-1 gene. *Cell*, 73: 1403-1409,1993.

49- Ashley Jr, CT., Wilkinson, KD., Reines, D., Warren, ST.: FMR1 protein: Conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science*, 262: 563-566,1993.

50- Siomi, H., Siomi, MC., Nussbaum,RL., Dreyfuss, G.: The protein product of the fragile X gene, FMR-1, has characteristics of an RNA binding protein. *Cell*, 74: 291-298,1993.

51- Hori, T., Yamauchi, M., Seki, N., Ikuko, K.: Heritable unstable DNA sequences and hypermethylation associated with fragile X syndrome in Japanese families. *Clin Genet*, 43: 34-38, 1993.

52- de Graaff, E., Willemsen, R., Zhong, N., de Die-Smulders, CEM., Brown,WT., et al.: Instability of the CGG repeat and expression of the FMR1 protein in a male fragile X patient with a lung tumor. *Am J Hum Genet*, 57: 609- 618, 1995.

53- Turk, J.: Fragile X syndrome. *Arch Dis Child*, 72: 3-5,1995.

54-Tarleton, JC., Saul, RA.: Molecular genetic advances in fragile X syndrome. *J Pediatrics*, 122(2): 169-185,1993.

55- Brown, WT.: The molecular biology of the fragile X mutation. In: Hagerman, RJ., Silverman, AC., eds. *Fragile X syndrome: diagnosis, treatment, and research*. Baltimore; Johns Hopkins Press, 146-172, 1991.

56-Wöhrle, D., Kotzot, D., Hirst, MC., Manca, A., Korn, B., Schmidt,A., et al.: A microdeletion of less than 250 kb, including the proximal part of the FMR-1 gene and the fragile X site , in a male with the clinical phenotype of fragile X syndrome. *Am J Hum Genet*, 51: 299-306, 1992.

57- Clarke, JTR., Wilson, PJ., Morris, CP., Howood, JJ., Richards,RI., et al.: Characterization of a deletion at Xq27-28 associated with unbalanced inactivation of the nonmutant X chromosome. *Am J Hum Genet*, 51: 316-322, 1992.

58-Mornet, E., Jokic, M., Tejada,I., Deluchat, C., Boue, J.,Boue, A.: Affected sibs with fragile X syndrome exhibit an age-dependent decrease in the size of the fragile X full mutation. *Clin Genet*, 43: 157-159,1993.

59- Lugenbeel, KA., Peier, AM., Carson, NL., Chudly, AE., Nelson,DL.: Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. *Nature Genetics*,10: 483-485,1995.

60- Quan, F., Zozana, J., Gunter, K., Peterson, KL., Magenis, RE., Popovich, BW.: An atypical case of fragile X syndrome caused by a deletion that includes the FMRI gene. *Am J Hum Genet*, 56: 1042-1051, 1995.

61- Dahl, N., Hu, LJ., Chery, M., Fardeau, M., et al.: Myotubular myopathy in a girl with a deletion at Xq27-q28 and unbalanced X inactivation assigns the MTM1 gene to a 600 kb region. *Am J Hum Genet*, 56;1108-1115,1995.

62-Antinolo, G., Borrego, S., Cabeza, JC.,Sanchez, R., Sanchez, J., Sanchez, B.: Reverse mutation in fragile X syndrome.(Letters to the Editor). *Am J Hum Genet*, 58: 237-239,1996.

63-Mila, M., Castellvi, S., Sanchez, A., Lazaro, C., Villa, M., Estivil, X.: Mosaicism for fragile X syndrome full mutation and deletions within the CGG repeat of the FMR-1 gene. *J Mol Genet*, 33;338-340,1996.

64- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory), New York, Second Ed., 1.25, 1982.

65- Saiki, R.K., Gelfond, S., Stoffel, S.S., et al.: Primer -directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239;487, 1988.

66- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory), New York, Second Ed., E4, 1989.

67- Rousseau, F., Heitz, D., Biancalana, V., Oberle, I., Mandel, J.L.: On some technical aspects of direct DNA diagnosis of the fragile X syndrome. Am J Med Genet, 43;197-207, 1992.

68- Murphy, P.D., Watson, M.S., Shapiro, L.R., Wilmot, P.L., Breg, W.R.: DNA-based genetic testing in fifty fragile X families. Am J Med Genet, 38: 305-310, 1991.

69- Fryns, J.P., Curfs, L.M.G., Cassiman, J.J., van den Berghe, H.: The fragile X syndrome after the discovery of the FMR-1 gene. The clinical geneticist faced with the unrevelled enigmas and persisting difficulties in genetic counseling. Genetic Counseling, 3(4): 175-177, 1992.

70- Romain, D.R., Chapman, C.J. : Fragile site Xq27.3 in a family without mental retardation. Clin Genet, 41: 33-35, 1992.

71- Smits, A., Smeets, D., Dreesen, J., Hamel, B., de Haan, A., et al.: Parental origin of the fra(X) gene is a major determinant of the cytogenetic expression and the CGG repeat length in females carriers. Am J Med Genet, 43: 261-267, 1992.

72- Migeon, BR.: Concerning the role of X- inactivation and DNA methylation in fragile X syndrome. *Am J Med Genet*, 43: 291- 298, 1992.

73- Martinez, F., Badia, L., Prieto, F.: A fragile X family with high penetrance in females: risk heterogeneity? *Clin Genet*, 42:22-26,1992.

74- Tejada, I., Mornet, E., Biancalana, V., Oberle, I., Boue, J., et al.: Direct DNA analysis of fragile X syndrome in Spanish pedigrees. *Am J Med Genet*, 43: 282-290, 1992.

75- Macpherson, J., Harvey, J., Curtis, G., Webb, T., Heitz, D., et al. : A reinvestigation of thirty three fragile (X) families using probe StB12.3. *Am J Med Genet*, 43: 905-912, 1992.

76- Ramos, FJ., Eunpu, DL., Finucane, B., Pfedner, EG.: Direct DNA testing for fragile X syndrome. *AJDC*, 147: 1231-1235,1993.

77- Vaisanen, M-L., Kahkönen, M., Leisti, J.: Diagnosis of fragile X syndrome by direct mutation analysis. *Hum Genet*, 93: 143-147,1994.

78- Rousseau, F., Heitz, D., Tarleton, J., MacPherson, J., Malmgren, H., et al. : A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile X syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3 : The first 2,253 cases. *Am J Hum Genet*, 55: 225-237,1994.

79- Rousseau, F., Heitz, D., Biancalana, V., Blumenfeld, S., Kretz, C., et al.: Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 325(24): 1673- 1681,1991.

80- Slaney, SF., Wilkie, AOM., Hirst, MC., Charlton, R., McKinley, M., et al.: DNA testing for fragile X syndrome in schools for learning difficulties. *Arch Dis Child*, 72: 33-37, 1995.

81- Miller, SA., Dykes, DD., Polesky, HF.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16(3):1215,1988.

82- Erster, SH., Brown, WT., Goonewardena, P., Dobkin, CS., Jenkins, EC., Pergolizzi, RG. : Polymerase chain reaction analysis of fragile X mutations. *Hum Genet*, 90: 55-61, 1992.

83- Willemsen, R., Mohkamsing, S., de Vries, B., Devys, D., van den Ouweland, A., et al.: Rapid antibody test for fragile X syndrome. *Lancet*, 345: 1147-1148,1995.

84- Mueller, OT., Hartsfield, JK Jr., Amor, MJ., et al.: Fragile X syndrome, discordant levels of CGG repeats mosaicism in two brothers. *Am J Med Genet* , 60(4);302-306, 1995

85- Oostra, BA., Verkerk, AJMH.: The fragile X syndrome: Isolation of the FMR-1 gene and characterization of the fragile X mutation(review). *Chromosoma*, 101: 381:387, 1992.

86- Ashley, AE., Sherman, SL.: Population dynamics of a meiotic/mitotic expansion model for the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet*. 57:1414-1425,1995.

87- Ashley, CT.,Warren, ST.: Trinucleotide repeat expansion and human disease.*Annu.Rev.Genetics*, 29: 703-728, 1995.

88- Sutherland, GR., Gedeon, A., Korman, A., Donnelly, A.,Byard, RW., et al.: Prenatal diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of the unstable DNA sequence. *N Eng J Med*, 325(24): 1720-1722,1991.

89- Shapiro, LR., Wilmot, PL., Murphy, PD. : Prenatal diagnosis of the fragile X syndrome: Possible end of the experimental phase for amniotic fluid. *Am J Med Genet*, 38: 453-455,1991.

90- Yamauchi, M., Nagata, S., Seki, N., Tayama, Y., Harada, N., et al.: Prenatal diagnosis of fragile X syndrome by direct detection of the dynamic mutation due to an unstable DNA sequence. *Clin Genet*,44: 169-172,1993.

91-Brown, WT., Houck, GE., Jeziorowska, A., Levinson, FN., Ding, X., et al.: Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. *JAMA*, 270(13): 1569-1575,1993.

92- Ryynanen, M., Kirkinen, P., Mannermaa, A., Saarikoski, S.: Carrier diagnosis of the fragile X syndrome- A Challenge in antenatal clinics. *Am J Obstet Gynecol*, 172: 1236-1239,1995.

93- Eicher, EE., Holden, JJA., Popovich, BW., et al.: Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nature Genetics*, 8;88-94, 1994.

94- Zhong, N., Yang, W., Dobkin, C., Brown, WT.: Fragile X gene instability: anchoring AGGs and linked microsatellites. *Am J Hum Genet*, 57: 351-361, 1995.

95-Eichler, EE., Macpherson, JM., Murray,A., Jacobs,PA.,et al.: Haplotype and interspersed analysis of the FMR-1 CGG repeat identifies two different mutational pathways for the origin of the fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet* 5(3);319-330,1996.

96- Knight, SJL., Flannery, AV., Hirst, MC., Campbell, L., Christodoulou, Z., et al.: Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAAXE mental retardation. *Cell*, 74: 127-134, 1993.

97- Hamel, BCJ., Smits, APT., de Graaff, E., Smeets, DFCM., Schoute, F., et al.: Segregation of FRAAXE in a large family: Clinical, psychometric, cytogenetic, and molecular data. *Am J Hum Genet*, 55: 923- 931, 1994

98- Loesch, DZ., Huggins, RM.: Fixed and random effects in the variation of the finger ridge count: A study of Fragile X families. *Am J Hum Genet*, 50: 1067- 1076, 1992.

99-Staley, LW., Hull,CE., Mazzocco, MMM.,et al.: Molecular-Clinical correlations in children and adults with fragile X syndrome . *AJDC* 147;723-726,1993.

100- Wiegers, AM., Vries,LBA., Curfs,LMG., Fryns,JP.: Identical psychological profile and behavior pattern in different types of mutation in the FMR-1 region. *Clin. Genet* 43;326-327,1993.

101- Reiss, AL., Freund,L., Abrams, MT., Boehm, C., Kazazian, H.: Neurobehavioral effects of the fragile X premutation in adult women: A controlled study. *Am J Hum Genet*, 52: 884- 894, 1993.

102- Warren, ST.,and Ashley, CT.: Triplet repeat expansion mutations; The example of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci*, 18;77-99,1995.

103- Sherman, SL.: The high prevalence of fragile X premutation carrier females: Is this frequency unique to the French Canadian Population? *Am J Hum Genet*, 57: 991-993, 1995.

104- Fisch, GS., Snow, K., Thibodeau, SN., Chalifaux, M., Holden, JJA., Nelson, DL., et al.: The fragile X premutation in carriers and its effect on mutation size in offspring. *Am J Hum Genet*, 56: 1147-1155, 1995.

105- Loesch, DZ., Huggins, R., Petrovic, V., Slater, H.: Expansion of the CGG repeat in fragile X in the FMRI gene depends on the sex of the offspring. *Am J Hum Genet*, 57: 1408-1413,1995.

106- Rousseau, F., Rouillard, P., Morel, M-L., Khandjian, EW., Morgan, K.: Prevalence of carriers of premutation-size alleles of the FMRI gene-and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet*, 57 : 1006-1018,1995.

107- Hagerman, RJ., Lugenbeel, K., McLean, SD., Taylor, A.: Learning-disabled males with a fragile X CGG expansion in the upper premutation size range. *Pediatrics*, (97)(1) : 122-126,1996.

