

## Zihinsel Özürlü ve Öğrenme Güçlüğü Olduğu Populasyonlarda DNA ve Sitogenetik Analizler ile Frajil X Sendromlarının Taranması\*

Dr. Nurten KARA<sup>1</sup>, Dr. Hasan BAĞCI<sup>1</sup>, Dr. Recep SANCAK<sup>2</sup>

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji<sup>1</sup>, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları<sup>2</sup> Anabilim Dalları, SAMSUN

✓ Frajil X sendromu kalıtsal mental retardasyonun en yaygın formudur. Hastalık sitogenetik olarak görülebilen (FRAXA) Xq27.3'teki frajil bölge ile ilişkili olup FMRI olarak adlandırılan genin içinde (CGG)n tekrarının artmasıyla oluşmaktadır.

Bu çalışma, toplam 154 birey üzerinde yapılmış olup bunların 82'si frajil X şüpheli grup diğerleri ise normal kontrol grubudur. Şüpheli grup, Samsun'da Milli Eğitim Bakanlığı Rehberlik Araştırma Merkezine bağlı, İlk öğretim okullarının öğrenme güçlüğü çeken özel alt sınıf öğrencileri ve zihinsel özürlülerin eğitildiği merkezlerden seçildi.

Çalışmada DNA ve sitogenetik analiz olmak üzere iki analiz uygulandı. DNA analizi için periferik kandan elde edilen DNA ile PCR yapılarak normal ve küçük premutasyonlu (taşıyıcı) bireyler belirlendi. Daha sonra, Southern blot ve nonradyoaktif hibridizasyon uygulanarak, taşıyıcı (premutasyon) ve hasta (full mutasyon) kişiler belirlendi.

PCR sonucunda, frajil X şüpheli grupta CGG tekrar sayısının 7 ile 60 arasında değiştiği, alellerin %94'ünün 40 tekrarın altında olduğu ve en sık gözlenen alelin (%15) 31 tekrarlı olduğu belirlendi. Ayrıca bu grupta bir erkek çocukta premutasyonlu (60 tekrar) bir alel gözlemlendi. Kontrol grubunda ise CGG tekrar sayısının 9 ile 55 arasında değiştiği ve alellerin %91'inde tekrar sayısının 40'ın altında olduğu gözlemlendi. En sık görülen alelin (%15) 30 CGG tekrarlı olduğu belirlendi. Bu gruptan bir erkekte premutasyonlu (55 tekrarlı) bir alel gözlemlendi.

Southern blot ve non-radyoaktif hibridizasyon sonunda frajil X şüpheli gruptan bir erkek çocukta full mutasyon gözlemlendi. Bu çocuğun, iki erkek ve bir kız kardeşinin full mutasyonlu (hasta) olduğu, diğer kız kardeş ve annesinin ise premutasyonlu oldukları belirlendi.

Sitogenetik analizde ise full mutasyonlu çocuğun, frajil X pozitif (%12) olduğu belirlendi. Frajil X şüpheli gruptan diğer bir erkek çocuk ve annesinde, 9 nolu kromozomda perisentrik inversiyon belirlendi. Bu çocukta ve annesinde frajil X negatifti.

Samsun'da yapılan bu çalışma ile halk sağlığı açısından önemli bir sorun olan frajil X sendromu sıklığının, şüpheli populasyonda yaklaşık%1 olduğu bulundu.

**Anahtar kelimeler:** Frajil X sendromu, zihinsel gerilik, öğrenme güçlüğü, DNA ve sitogenetik analiz

✓ **Screening of the Fragile X Syndromes with DNA and Cytogenetic Analysis in Populations with Learning Difficulties and Mental Retardation**

Fragile X syndrome is the most common inherited cause of mental retardation. The disorder is associated with a cytogenetically visible fragile site (FRAXA) at Xq27.3, caused

\* Bu çalışmanın bir bölümü 21-24 Eylül 1998'de İzmir'de yapılan 5. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi'nde poster olarak sunulmuştur.

by amplification of a (CGG)<sub>n</sub> repeat sequence within the gene at locus designated FMR1. This study was conducted on a total of 154 subjects, 82 of them are from fragile X suspected group, others from normal control group. The suspected group was selected from the special "subclasses" for students with learning difficulties, of primary schools under the auspice of the National Ministry of Education (of the Republic of Türkiye) in Samsun, and from the centers for special training, education and rehabilitation of mentally retarded individuals.

In this study, DNA and cytogenetics analyses were used to screen individuals for CGG amplifications.

For DNA analysis, DNAs were extracted from peripheral blood samples; normal and small premutation (carrier) individuals were identified by PCR amplification. The carriers (premutation) and affected (full mutation) were identified by Southern blot and non-radioactive hybridization.

According to the PCR results, CGG repeat numbers of the fragile X suspected population ranged between 7 to 60; 94%alleles having fewer than 40 repeats. The most frequent allele (15%) had 31 repeats. Also, there was a male child with a premutation allele (60 repeats). In control group, the CGG alleles ranged from 9 to 55 repeats. The most frequent allele (15%) had 30 repeats. Also, in this group included was a male with a premutation allele (55 repeats).

A male child with a full mutation was identified in the fragile X suspected group by Southern blot and non-radioactive hybridization. Both of the proband's two brothers and one of his two sisters had full mutations; his mother and his other sister had premutations.

In cytogenetic analysis, the male child with full mutation was found fragile X positive (12%). In the fragile X suspected group, another male child and his mother were found to carry pericentric inversions on one of their chromosomes 9s.

The incidence of the fragile X syndrome, which is an important public health concern, in our suspected study group was found to be approximately 1%, as determined by this study carried out in Samsun.

**Key words:** *Fragile X syndrome, mental retardation, learning difficulties, DNA and cytogenetic analyses*

## GİRİŞ

X kromozomu ile bağlantılı bir mental retardasyon sendromu olan frajil X, kalıtsal mental retardasyonunun en yaygın formudur. Sendrom yaklaşık olarak erkeklerde 1/4000, kadınlarda ise 1/8000 sıklıkta görülür<sup>(1,2)</sup>. Taşıyıcı sıklığı 1/866'dır<sup>(3)</sup>.

Frajil X sendromlularda bir çok fenotipik özellik görülebilir. Çok yaygın gözlenen bazı fiziksel ve davranış özellikleri şunlardır: ciddi veya ılımlı mental retardasyon, büyük baş, uzun yüz, büyük dışa çıkık kulaklar, yüksek kavimli damak, hiperekstensibil parmak eklemeleri, düz taban, büyük testis. Yaygın görülen davranış problemleri, hiperaktivite ve

otistik (el çırpma, zayıf göz kontağı, kelimeleri tekrarlama) görünümüdür<sup>(4,5)</sup>.

Sendrom X kromozomunun uzun kolu distalinde Xq27.3'deki frajil bölge ile ilişkilidir. Rutin metafaz kromozomu çalışmalarında frajil bölge görülmez. Fakat kültür şartları değiştirildiğinde (indükleyici ajanlar kullanıldığında ve primidin nükleotid öncüllerinin yokluğunda) frajil bölge görülebilir. Buna rağmen çalışılan metafaz kromozomlarında frajil bölgenin görülme sıklığı %50'den daha azdır<sup>(6,7)</sup>.

Frajil X sendromlu vakaların en az %98'de hastalık, FMR1 geninin 5' ucunda yer alan CGG tekrarlarının ekspansiyonundan

kaynaklanır<sup>(8)</sup>. FMR1 geni, içinde 17 ekzonu olan yaklaşık 38 kb'lık bir bölgeyi kapsar<sup>(9,10)</sup>. Normal FMR1 geni genel populasyonda polimorfiktir<sup>(9,11)</sup> ve yaklaşık 6-54 CGG trinükleotid kopyası içerir. Normal tekrar dizilimi aralığında gösterilen ve gri zon olarak kabul edilen 35-54 CGG tekrarlı allelerin premutasyona meyilli olduğu öne sürülmektedir<sup>(12)</sup>. Frajil X sendromunda CGG tekrarıyla meydana gelen, "premutasyon" ve "full mutasyon" olmak üzere iki tip mutasyon vardır. Premutasyonlu kadın ve erkekde 55-200 CGG tekrarı vardır. Bunlar taşıyıcı olup etkilenmemişlerdir. Fenotip ve sitogenetik olarak normaldirler. Premutasyon anneden çocuğuna geçerken stabil değildir, genişleyerek full mutasyona dönüşebilmektedir. Full mutasyonlu etkilenmiş bireylerde CGG tekrar sayısı 200-2000 arasında olup zeka geriliği, belirgin fenotipik özellikler ve davranış bozukluğu gözlenir. Ayrıca, sitogenetik olarak X kromozomunda frajilite gözlenir<sup>(12-15)</sup>. Tekrar sayısı 200 kopyanın üzerinde olduğu zaman FMR1 mRNA düzeyleri ve protein ekspresyonu azalır veya hiç olmaz. FMR1 ifadesindeki bu değişim FMR1 geninin promoter bölgesindeki "CpG adacığ"ındaki sitozinlerin metilasyonu ile ilişkilidir<sup>(16)</sup>. FMR1 gen ürünü, FMRP' (Frajil X mental retardasyon proteini) bir RNA bağlanma proteinidir<sup>(17)</sup>. FMRP sitoplazmada lokalize olan bir proteindir<sup>(18)</sup>. Northern analiziyle genin, insan dokularının çoğunda (beyin, testis, plasenta, akciğer, böbrek ve kalpte) eksprese olduğu gösterilmiştir<sup>(19)</sup>.

Frajil X sendromunun prenatal tanı, taşıyıcı tayini ve klinik tanısında uygulanan DNA testi kısa sürede yapılabilmesi ve ekonomik oluşu nedeniyle sitogenetik testten daha kullanışlıdır. DNA testinin güvenilirliği daha yüksektir. Çünkü, taşıyıcılarda ve nadiren, CGG sayısının artmasına rağmen,

metilasyonun olmadığı etkilenmiş bireylerde sitogenetik anomali (fracil X) görülmez. Böyle kişiler ancak DNA testi ile belirlenebilir<sup>(20,21)</sup>.

Frajil X'in moleküler tanısı PCR ve Southern blot ile yapılmaktadır. PCR ile normal ve premutasyonlu bireyler, Southern blot ile premutasyonlu ve full mutasyonlu bireyler belirlenmektedir. Southern blot özellikle full mutasyonluların tayini için zorunlu bir metodur. FMR1 geninin 5' ucunda CpG adasının DNA metilasyon analizi postnatal teşhiste ilave bir teşhis olup FMR1 geninin inaktivasyonunu belirlemeye yardımcı olur<sup>(3)</sup>.

Frajil X sendromu için özgül bir tedavi yoktur. Ancak semptomatik tedavi, konuşma tedavisi, özel eğitim, ve spor çalışmaları gibi uygulamalar hastalığın semptomlarını hafifletmede yararlıdır<sup>(22)</sup>. Bu hastalığın sıklığının azaltılması için yaygın tarama testleri ve genetik danışmanlık önerilmektedir<sup>(3)</sup>.

Bu çalışmanın amacı, Samsun ve çevresinde, İlköğretim okullarındaki öğrenme güçlüğü olan, özel alt sınıf öğrencileri ile özürülülerin eğitildiği kurumlarda bulunan, frajil X şüpheli çocuklar ve ailelerine yönelik olarak hastaları ve taşıyıcıları DNA testi ile belirlemek ve sitogenetik test ile de hasta kişilerde frajil bölgeyi gözlemektir. Çalışmanın diğer bir amacı da yörede ilk kez yapılan bu araştırma ile halkın frajil X sendromu konusunda bilinçlendirilmesi ve daha sağlıklı nesillerin oluşumuna katkıda bulunmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Çalışılan Populasyon:

Samsun'da Milli Eğitim Bakanlığı, Rehberlik Araştırma Merkezine bağlı olan 14 ilköğretim okulunun özel alt sınıflarında ve zihinsel özürülülerin bulunduğu merkezlerde,

çoğunluğu çocuk toplam 700 kişi frajil X sendromu için incelemeye alındı. Sendromun belirgin fenotipik özelliklerinden en az ikisine sahip, yaşları 7-20 arasında değişen ve Stanford-Binet testiyle IQ düzeyleri 25-75 arasında olduğu tesbit edilen,%95'i çocuk olan 75 kişi ve çocuklardan ikisinin aile üyeleri de dahil olmak üzere, toplam 82 kişi DNA testi (PCR ve Southern blot) ve sitogenetik analize tabi tutuldu. Frajil X şüphesiyle incelenen bireylerin 24'ü kız, 58'i erkekti. Ayrıca kontrol grubu olarak, yaşları 20'nin üzerinde olan sağlıklı ve çoğunluğu üniversitemiz personeli, 39 kadın ve 33 erkekten oluşan toplam 72 kişiye polimeraz zincir reaksiyonu uygulanarak CGG allel sıklığına bakıldı.

#### DNA ve Sitogenetik Analizleri:

DNA, periferik kandan standart "Salting out" yöntemiyle izole edildi<sup>(23,24)</sup>. Frajil X'in tanısı için PCR<sup>(25,26)</sup> ve Southern blot olmak üzere iki tip analiz uygulandı<sup>(27)</sup>. PCR ile çoğaltılamayan DNA örnekleri Southern blot ve chemilüminescent teknik ile test edildi. Ayrıca frajil X fenotipik özelliklerine sahip olan ve PCR amplifikasyonu yapıldığında ürün gözlenmeyen bireylere periferik kandan mikrokültür tekniği<sup>(28)</sup> ile sitogenetik analiz yapıldı.

**Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR):** Polimeraz zincir reaksiyonu, 82 frajil X şüpheli ve 72 sağlıklı kontrol grubu bireyler olmak üzere toplam 154 kişiye uygulandı. Kullanılan primer çiftlerinden biri Cao ve arkadaşları tarafından kullanılan, pfx3 ve pfxa3 primer çiftidir<sup>(25)</sup>. Pfx3 ve pfxa3 primerleri Fu ve arkadaşlarının tanımladığı, CGG tekrarı ve CpG adası içeren 1 kb'lık PstI fragmenti içindedir<sup>(9)</sup>. İkinci primer çifti Brown'un 1 ve 3 nolu primerlerinin oluşturduğu çifttir<sup>(26)</sup>.

Kullanılan primer çiftleri:

Pfx3: 5'-ACCTCTGCAGAAATGGGCCGTTCTG  
GCCCTC-3'

Pfxa3: 5'- CGGAATTCGCTAGCGCCGGGAGCC  
CGCCCCGAGAGGT-3'

Yukarıda verilen primerler ile 560 baz çifti (bp) uzunluğunda ve 29 CGG tekrarı içeren bir PCR ürünü oluşur. Bu primer çifti normal ve küçük premütasyonların çoğaltılması için uygundur.

Primer 1: 5'-GACGGAGGCGCCGCTGCCAG G-3'  
Primer 3: 5'-GTGGGCTGCGGGCGCTCGAGG-3'

Primer 1 ve 3, 152 bp uzunluğunda ve 30 triplet tekrarı içeren bir ürün oluşturur. Bu primerler, premütasyon ve küçük full mutasyonluların çoğaltılması için kullanılmaktadır. Bu primer çifti ilk iki PCR reaksiyonunda çoğaltılamayan DNA örneklerinin amplifikasyonunda kullanıldı.

Frajil X şüpheli bireylerin, DNA'larında yapılan ilk PCR çalışmasında, reaksiyon karışımında 50 mM Tris pH:8.3, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, deoksiribonükleotid trifosfatların her birinden 200 µM, %12.5 DMSO, 200 ng kalıp DNA, 0.4 µM her primerden (pfx3 ve pfxa3) ve enzim olarak Taq polimerazdan (Fermantas) daha termostabil olan 1.25 U Pfu polimeraz (Stratagene)-kullanıldı. Reaksiyon karışımları 0.2 ml'lik PCR tüplerine (Costar) aktarıldıktan sonra örnekler termosaykıla (Ericomb) yerleştirildi. Amplifikasyon başlangıç denatürasyonundan (96 °C'de 5 dakika) sonra enzim ilavesiyle ("hot start") ve 35 döngüde (96 °C'de 1 dakika denatürasyon, 60 °C'de 1 dakika anneling, 72 °C'de 2 dakika ekstensiyon) ve 72 °C'de 10 dakika son ekstensiyon şartlarında yürütüldü.

Birinci tip PCR sonucunda çoğaltılmayan (Jel elektroforezinde bant gözlenmeyen) DNA örnekleri Cao'nun<sup>(25)</sup> ve Brown'un<sup>(26)</sup> yöntemleri modifiye edilerek yeniden çalışıldı. İkinci tip PCR karışımı, 50 mM Tris pH 8.3, 1 veya 2 mM MgCl<sub>2</sub>, %5 DMSO, %5 Gliserol, 200 µM her deoksiribonükleotid trifosfat (dGTP hariç), 120 µM 7-deaza-dGTP (%60), 80 µM dGTP (%40), her primerden (pfx3 ve

pfxa3) 0.4 µM ve enzim 1.25 U Taq polimeraz olacak şekilde hazırlandı. Enzim "hot start" (95 °C'de 5 dakika) olarak konduktan sonra 1 ünite de reaksiyonun ortalarında ilave edildi. Amplifikasyon 40 döngü (95 °C'de 20 saniye, 60 °C'de 10 saniye annealing, 72 °C'de 90 saniye ekstensiyon) ve 72 °C'de 5 dakika son ekstensiyon şartlarında yapıldı.

Üçüncü tip bir PCR yaklaşımı ise ilk iki tip reaksiyonda çoğaltılmayan DNA örneklerine uygulandı. Bunun için ikinci tip PCR'daki reaksiyon karışımı içinde pfx3ve pfxa3 yerine primer 1 ve 3 kullanıldı. Amplifikasyon, 94 °C'de 2 dakikalık beklemeyi takiben "hot start" olarak ve 35 döngü (94 °C'de 30 saniye, 61 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika) ve 72 °C'de 2 dakikalık son ekstensiyon şartlarında yürütüldü. PCR ürünleri %1.5 - 2'lik resophore agaroz (Eurobio) içinde elektroforetik olarak ayrıştırıldı.

Elektroforez (Consort) 125 volt'da 2,5-3 saat süreyle yapıldı. Elektroforez sonunda jel UV transillüminatörde (Vilber Lourmart) incelenerek markır ve bantların kuyulardan uzaklığı ölçüldü. Bantların boyları (bp), markır DNA'ların gittikleri mesafelerden yararlanarak SPSS 6.0 altında iki parametrelili üstel model seçilerek hesaplandı;  $y = \alpha e^{\beta x}$ ;  $y =$  baz çifti (bp),  $x =$  uzaklık (mm),  $e = \beta \cdot x$  (doğal logaritma),  $\alpha$  ve  $\beta$  regresyon denkleminin katsayılarıdır.

**Southern Blot:** PCR ile çoğaltılmayan frajil X şüphelilerin DNA örnekleri Southern blot tekniği ile analiz edildi. Bunun için, DNA örnekleri önce Brown'un<sup>(26)</sup> koşullarında iki tip restriksiyon enzimi, EcoRI (5'-G AATTC-3') (Fermentas) ve metilasyona duyarlı Eco521 (5'-C GGCCG-3') (Fermentas) ile kesildi. Kesilen DNA örnekleri %0,8'lik agaroz jel'de 20 volt'da 20 saat süreyle TAE buffer içinde ayrıştırıldı. Bunu takiben DNA bantları Sambrook, Fritsch ve Maniatis<sup>(27)</sup>'in yöntemi uygulanana-

rak, nötral şartlar altında pozitif yüklü naylon membrana aktarıldılar. Daha sonra membran nonradyoaktif yöntem uygulanarak digoksinin işaretli frajil X probu (pFxa1NHE) ile hibridize edildi. Arkasından kemilüminesans substrat (CSPD) ile muamele edildikten sonra X ray film ile 24 saat oda ısısında tutuldu<sup>(29)</sup>. Belirli süreler sonunda film otomatik banyoda yıkandı. DNA bantlarının boyları, markır DNA' parçacıklarının gidiş hızları göz önüne alınarak, PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde uygulanan istatistik model ile belirlendi. Kullanılan markır (Oncor) karışımı (Hind III ile kesilmiş lambda λ DNA'sı) içinde bulunan bantların uzunlukları 23.1 9.4 6.6 4.4 2.3 2.0 1.0 0.56 0.125 kb'dır<sup>(29)</sup>.

**Sitogenetik Çalışma:** Frajil X şüpheli bireylerden Moorhead'in<sup>(28)</sup> mikrokültür veya tüm kan yöntemiyle, iki değişik ortamda lenfosit kültürü yapılarak<sup>(30)</sup>, Tripsin-Giemsa G- bantlama metoduyla kromozomlar incelendi<sup>(30,31)</sup>.

Frajil X şüpheli her birey için besi ortamı olarak düşük folatlı ve FUDR (0.1 µM) ile indüklenen ortamlar kullanıldı<sup>(30)</sup>. Erkeklerde 75 kızlarda ise 100'er metafaz incelendi ve frajil X gözlenen hastaların karyotipleri görüntü analiz sistemiyle (PCI Image Analyzer) yapıldı.

## BULGULAR

**Fiziksel Bulgular:** Fenotip açısından yapılan değerlendirmede frajil X'in en az iki karakteristik özelliği ve aile öyküsü dikkate alındı. Aile öyküsünde birden fazla mental retardasyon olan ve hiçbir hastalıkla ilişkilendirilmeyen bireylere öncelik verildi. Moleküler (PCR ve Southern blot) ve sitogenetik analiz ile belirlediğimiz, frajil X pozitif bireyler, mental retardasyon ve frajil X'in belirgin fenotipik özelliklerine (uzun ince yüz, dışa çıkık büyük kulak, dışa çıkık

çene ve büyük testis) sahiptiler. Taşıyıcı olanlar ise normal popülasyonda gözlenen fenotipik özelliklere sahiptiler. İncelenen 700 kişinin içinde, frajil X şüphelilerin dışındakiler Down sendromlu, serebral palsili ve menenjit gibi ateşli hastalığa bağlı zihinsel özürülülerden oluşuyordu.

**Moleküler Bulgular:** Moleküler çalışma PCR ve Southern blot olmak üzere iki aşamada yapıldı. Frajil X şüpheli 82 kişide FMR1 geninde CGG trinükleotid tekrarına dayalı mutasyon olup olmadığını belirlemek amacıyla PCR ve agaroz jel elektroforezi ile DNA testi yapıldı. Aynı çalışma 72 kontrol grubu bireyde, CGG allel sıklığını belirlemek amacıyla yapıldı. Kontrol grubu ve frajil X şüpheliler üzerinde yapılan bu test ile normal ve küçük premutasyonlu (taşıyıcı) bireyler belirlendi. PCR ile çoğaltılamayan, full mutasyonlu (hasta) olabilecekleri düşünülen bireylerin DNA örnekleri Southern blot yapılmak üzere ayrıldı.

İki değişik reaksiyon karışımı ve iki primer çifti ile yapılan PCR'lar sonucunda, normal ve küçük premutasyonlu bireyler belirlendi. Buna göre frajil X şüpheli grupta, CGG tekrar sayısının 7 ile 60 arasında değiştiği, allellerin %94'ünde tekrar sayısının 40'tan az ve en sık (%15) gözlenen allelin 31 tekrarlı olduğu belirlendi. Ayrıca hasta grubundan bir erkek çocukta premutasyonlu (60 tekrar) bir allel gözlemlendi. Kontrol grubunda ise CGG tekrar sayısının 9 ile 55 arasında değiştiği ve allellerin %91'inde tekrar sayısının 40'ın altında olduğu gözlemlendi. En sık (%15) gözlenen allelin 30 tekrarlı olduğu belirlendi. Kontrol grubunda bir erkekte premutasyonlu (55 tekrarlı) bir allel gözlemlendi (Tablo). Frajil X şüpheli grup ve kontrol grubunda CGG allel sıklığı ile birlikte gri zon ve premutasyon allelleri de Şekil 1'de görülmektedir.

Frajil X şüpheli gruptan 14 bireyin PCR sonuçları Şekil 2'de görülmektedir. 1. kuyuda ki bant örneği gri zonda, 51 CGG tekrarıdır. Diğerleri de normal CGG tekrarlı bantlardır. PCR ile çoğaltılamayan, frajil X şüpheli gruptan 12 ve kontrol grubundan 6 kişinin örneklerine Southern blot uygulandı.

Southern blot ve nonradyoaktif hibridizasyon yapılan bireyler arasında, frajil X şüpheli gruptan bir erkekte (H-22) full mutasyon olduğu belirlendi. H-22'nin pedigrisi Şekil 3'de ve Southern blot sonucu ise Şekil 4'de görülmektedir. Full mutasyonlu olan H-22'nin iki erkek kardeşi (A-1, A-3) ve bir kız kardeşinin de (A-2) full mutasyonlu olduğu, ancak bunlardan kız kardeşin zihinsel olarak erkek kardeşlerden çok daha iyi olduğu gözlemlendi. Kız kardeşlerden (A-2)'de 6.6 kb'ın üzerinde sibir ve erkek kardeşlerden (A-3)'de ise 6.6 kb'da full mutasyon bandı gözlemlendi. Frajil X sendromunun kalıtımı göz önüne alındığında taşıyıcı olması gereken annede (A-5) belirgin bir bant gözlemlenemedi. Aynı ailede diğer kız kardeşin de (A-4) premutasyonlu (taşıyıcı) olduğu belirlendi (Şekil 5).

Frajil X şüpheli grupta, elde edilen sonuçlara göre frajil X sendromunun sıklığının yaklaşık %1 olduğu bulundu

**Sitogenetik Bulgular:** Yapılan inceleme sonucunda sadece bir erkekte (H-22) incelenen 200 metafazda, %12 oranında frajil X kromozomu gözlemlendi (Şekil 6). Sitogenetik analiz için ikinci kez kan örneği almamıza izin vermedikleri için bu hastanın annesi ve kardeşlerine sadece DNA testi yapabildik. DNA testi ile bu ailenin hasta ve taşıyıcı olan bireylerini belirledik. Kromozom analizlerinde gözlenen ikinci bir abnormal kromozom yapısı, frajil X şüpheli bir erkek çocuk (H-73) ve annesinde gözlenen 9 no.lu kromozomdaki perisentrik inversiyondur. Bu çocukta frajil X negatiftir.

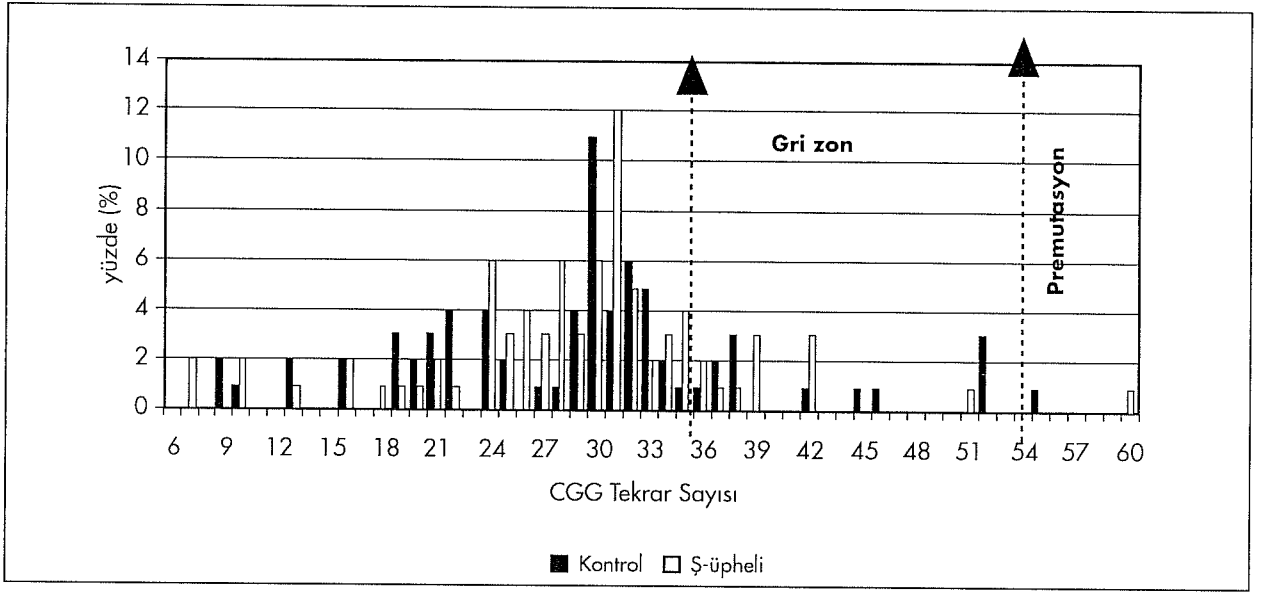
Tablo. Kontrol Grubu ve Frajil X Şüpheli Grupta CGG Tekrarlarının Dağılımı.

CGG tekrar sayısı	Kontrol grubu*	Frajil-X şüpheli**	Toplam***	%		
				Kontrol grubu	Frajil-X şüpheli	Toplam
7		2	2	0.00	2.44	1.30
9	2		2	2.78	0.00	1.30
10	1	2	3	1.39	2.44	1.95
13	2	1	3	2.78	1.22	1.95
16	2	2	4	2.78	2.44	2.60
18		1	1	0.00	1.22	0.65
19	3	1	4	4.17	1.22	2.60
20	2	1	3	2.78	1.22	1.95
21	3	2	5	4.17	2.44	3.25
22	4	1	5	5.56	1.22	3.25
24	4	6	10	5.56	7.32	6.49
25	2	3	5	2.78	3.66	3.25
26		4	4	0.00	4.88	2.60
27	1	3	4	1.39	3.66	2.60
28	1	6	7	1.39	7.32	4.55
29	4	3	7	5.56	3.66	4.55
30	11	6	17	15.28	7.32	11.04
31	4	12	16	5.56	14.63	10.39
32	6	5	11	8.33	6.10	7.14
33	5	2	7	6.94	2.44	4.55
34	2	3	5	2.78	3.66	3.25
35	1	4	5	1.39	4.88	3.25
36	1	2	3	1.39	2.44	1.95
37	2	1	3	2.78	1.22	1.95
38	2	1	3	2.78	1.22	1.95
39		3	3	0.00	3.66	1.95
42	1	3	4	1.39	3.66	2.60
45	1		1	1.39	0.00	0.65
46	1		1	1.39	0.00	0.65
51		1	1	0.00	1.22	0.65
52	3		3	4.17	0.00	1.95
55	1		1	1.39	0.00	0.65
60		1	1	0.00	1.22	0.65
<b>Toplam</b>	<b>72</b>	<b>82</b>	<b>154</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>

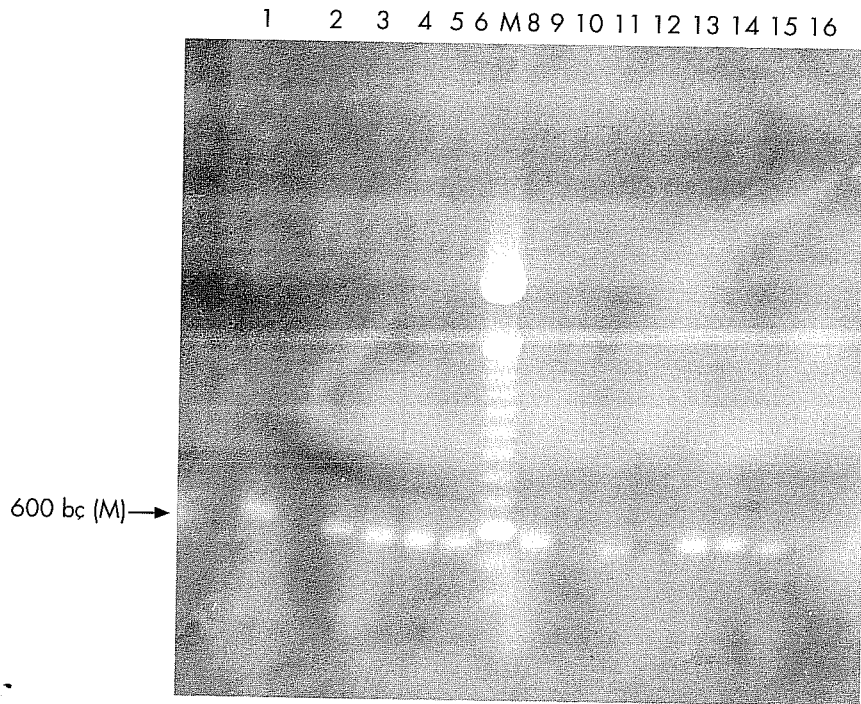
\* Kontrol grubu birey sayısı

\*\* Frajil X şüpheli birey sayısı

\*\*\* Kontrol grubu ve frajil X şüpheli birey sayısının toplamı

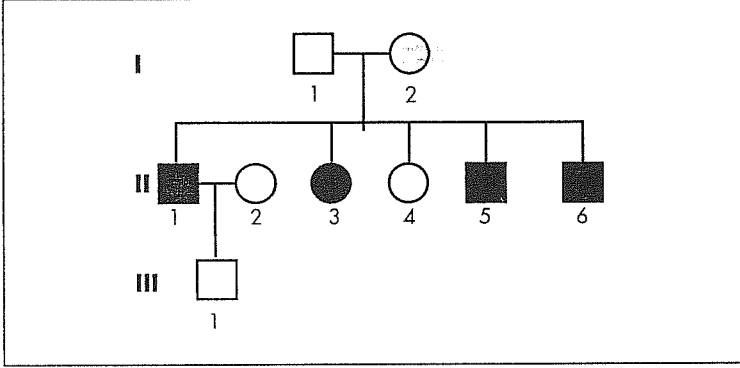


Şekil 1. Kontrol grubu ve frajil X şüpheli gruplarda CGG allel sıklığı; 35 tekrardan küçük, 35-52 tekrarlı (gri zon) normal alleller ve 54 tekrardan büyük premütasyonlu alleller görülmektedir.

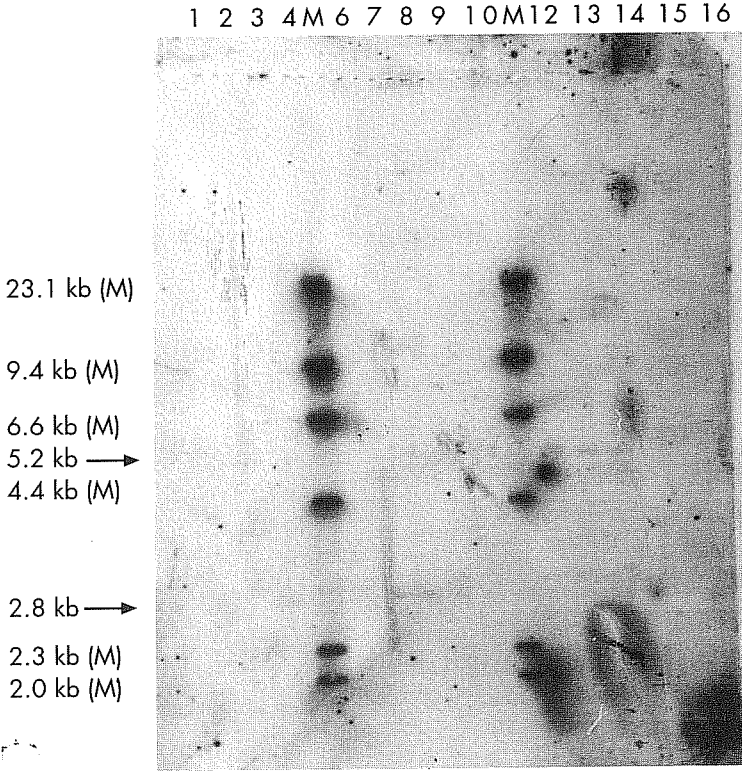


Şekil 2. Frajil X şüpheli grupta PCR sonuçları. Şeklin sol bölümünde 1. kuyudaki bant (51 bp) gri zondadır.





Şekil 3. H-22'nin pedigrisi. I. kuşakta 2: (A-5), II. Kuşakta 1: (A-1), 3: (A-2), 4: (A-4), 5: (A-3), 6: (H-22)



Şekil 4. 4. kuyuda (H-6), 2.8 ve 5.2 kb'lık normal iki bant; 6. kuyuda erkek çocukta (H-22), 6.6 kb'lık full mutasyon bandı; 7, 8 ve 9. kuyuda üç erkekte de 2.8'lik normal bantlar; 12. kuyuda kontrol grubu bir kadında 5,2'de çift bant, 13 ve 14. kuyulardaki kontrol grubu erkek bireylerde ise 5.2'de normal bantlar görülmektedir.

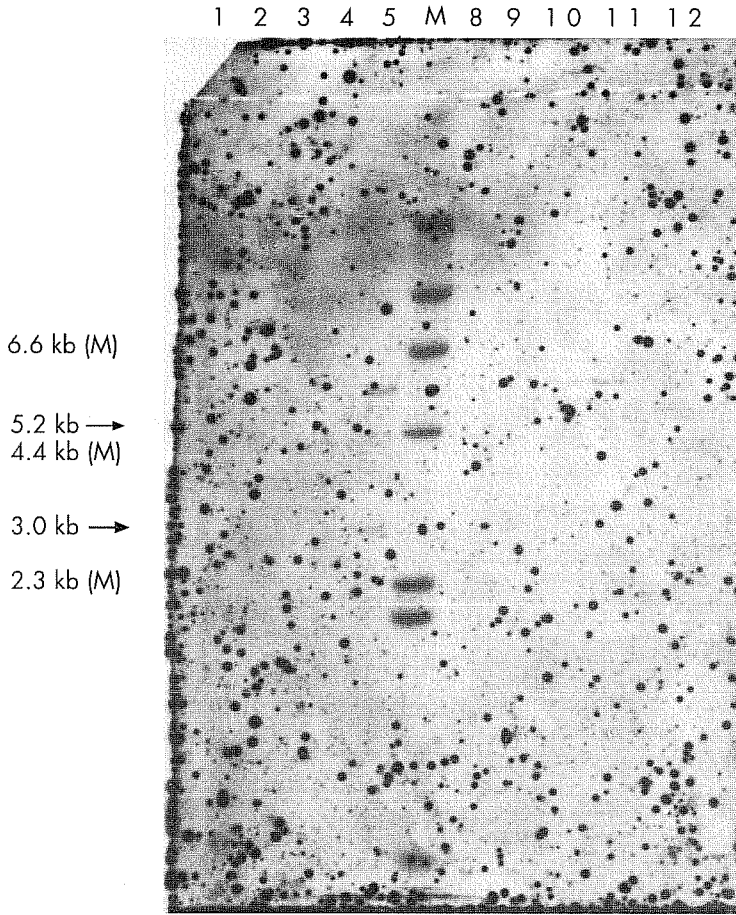
### TARTIŞMA

Mental retardasyonluların yaklaşık %20'sini X bağlantılı kalıtsal mental retardasyonlular oluşturmaktadır<sup>(32)</sup>. Frajil X sendromlular ise X bağlantılı mental retardasyonluların (XLMR) yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır<sup>(32,33)</sup>.

Bu çalışmada, PCR ile analiz edilen frajil X şüpheli grupta CGG tekrar sayısının 7 ile 60 arasında değiştiği, allellerin %94'ünün 40 tekrarın altında olduğu ve en sık gözlenen allelin (%15) 31 tekrarlı olduğu belirlendi. Bu grupta PCR ile premutasyona sahip 60 CGG tekrarlı bir erkek çocuk belirlendi. Bunlar arasında 12 kişinin DNA'ları PCR ile çoğaltılamadı.

Kontrol grubunda ise CGG tekrar sayısının 9-55 arasında değiştiği, allellerin %92'sinde tekrar sayısının 40'ın altında olduğu ve en sık gözlenen allelin (%15) 30 tekrarlı olduğu belirlendi. Bu grupta da premutasyonlu 55 tekrarlı bir kişi belirlendi. Kontrol grubundan 6 kişinin DNA'sı PCR ile çoğaltılamadı.

Bu çalışmaya benzer bir populasyon çalışmasında, 50 erkek ve 197 kadında PCR yapılmış ve CGG tekrarının 13-61 arasında değiştiği ve en yaygın allelin (%35) 30 tekrarlı olduğu belirlenmiştir. En yüksek CGG tekrarı kadınlarda 61, erkeklerde ise 52 olarak bulunmuştur<sup>(34)</sup>. CGG allel dağılımı ile ilgili diğer bir populasyon çalışmasında, CGG tekrarının 9-106 arasında değiştiği, allellerin %97'sinin 40 tekrarın altında olduğu belirlenmiştir. Tekrar sayısı 40 ile 60 arasında olan allellerin po-



Şekil 5. 5. Kuyuda (A4), 3 kb'lık premutasyon ve 5.2'de normal bant; 9 ve 10'cu kuyularda 5.2 kb'lık bantlar görülmektedir.

tansiyel olarak stabil olmadığı kabul edilmiştir<sup>(35)</sup>.

İnsanların %90'ından fazlasında CGG tekrar sayısının 40'ın altında olduğu belirlenmiştir. İlk çalışmalarda en yaygın CGG tekrar sayısı 29, daha sonraki çalışmalarda ise 30 olarak bulunmuştur<sup>(9,34)</sup>.

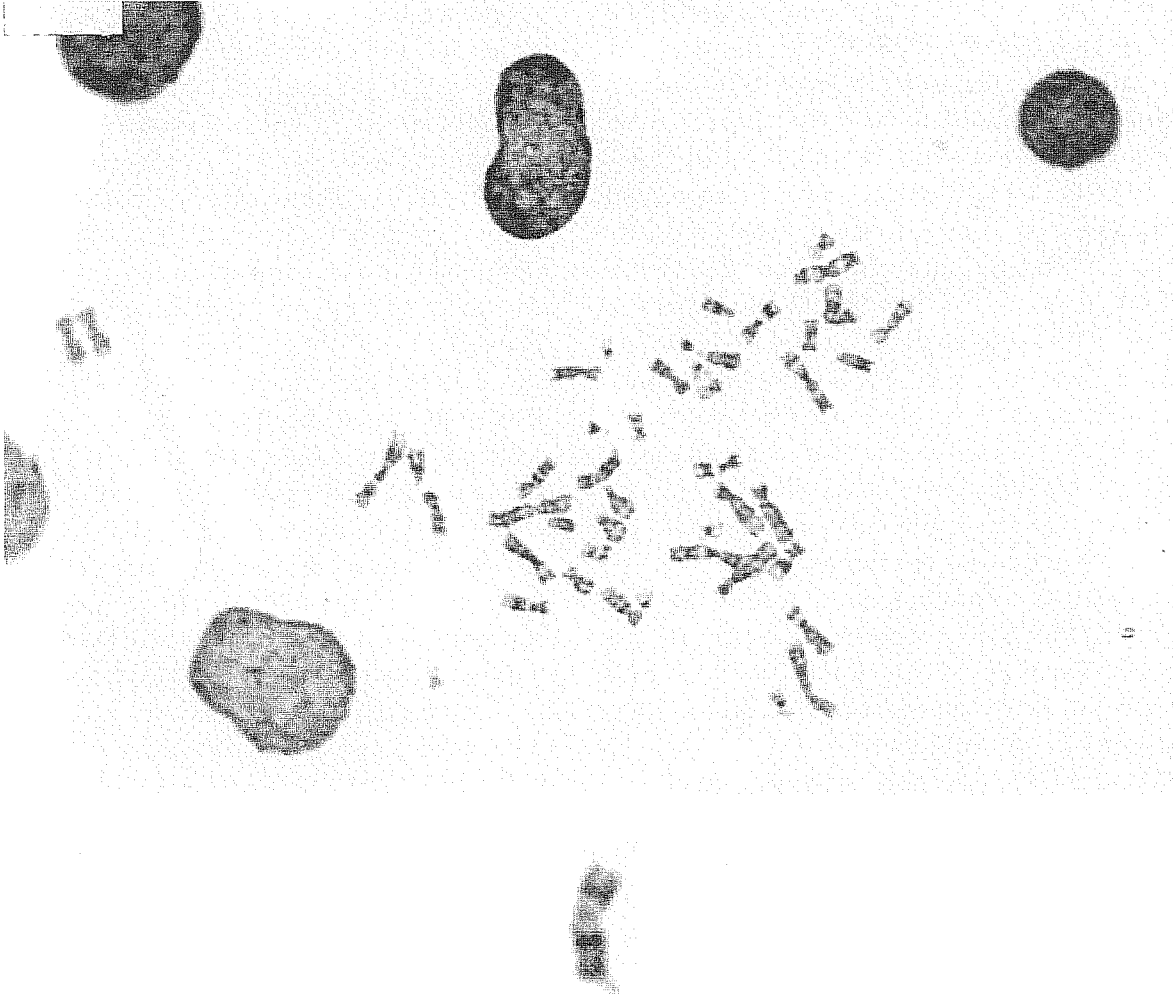
PCR için iki ayrı primer ve reaksiyon karışımı hazırladık. İlk kullanılan primer çifti Cao ve arkadaşları tarafından düzenlenen pfx3 ve pfxa3 primer çiftiydi<sup>(25)</sup>. Bu primer çifti AT'ce zengin olduğu için yüksek denatürasyon ısısı gerektirmiyordu. Bu primerler ile çoğaltılan 560 bp'lik ürünün 286

bp'lik 5' bölgesinin AT'ce zengin oluşu etidyum bromid ile görüntü elde etmeyi kolaylaştırmaktadır. Bu primer çifti ile birlikte normal ve premutasyonlu aleller çok rahat çoğaltılabildi. Normal aleller, Pfu polimeraz enzimi, %12.5 DMSO ve 7-deaza-dGTP'siz ortamda PCR ile başarıyla amplifiye edildi. Agaroz jelde DNA bantları da çok parlak olarak görüldü.

Pfu polimeraz ile yapılan PCR, mental retardasyonlu erkeklerde hızlı bir başlangıç taraması yapmak için kullanılmıştır<sup>(36,37)</sup>. Diğer termotabil DNA polimeraz enzimleri ile aynı başarı elde edilemedi. Taq polimeraz enzimi ile birlikte, %60 7-deaza-dGTP: %40 dGTP ve %5 DMSO ve %5 Gliserol kullandığımızda PCR ürünü elde edildi. Bizim sonuçlarımıza benzer şekilde gliserol ve DMSO kombinasyonunun sadece gliserol kullanımından daha etkili olduğu rapor edilmiştir<sup>(38)</sup>. Reaksiyon karışımı içinde %5-20 oranında gliserol bulunmasının "annealing" ısısını düşürdüğü belirlenmiştir. Gliserolün primerlerin Tm'ini de et-

kileyebileceği öne sürülmüştür<sup>(39)</sup>. 7-deaza-dGTP'nin %60 oranında kullanımı amplifikasyonun gerçekleşmesini sağlamakla birlikte PCR ürünlerinin EtBr ile görüntülenmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle PCR ürünlerinin jelde gözlenmesi zorluğu yaşandı. Gözlemlerimize benzer şekilde modifiye baz (7-deaza-dGTP) içeren DNA'nın etidyum bromid ile soluk boyandığı belirtilerek<sup>(40)</sup>, 7-deaza-dGTP'nin etidyum bromid ile floresan kaybına neden olduğu rapor edilmiştir<sup>(41, 42)</sup>.

Cao ve arkadaşları<sup>(25)</sup>, reaksiyon karışımında aynı primerler (pfx3 ve pfxa3), 1 (g kalıp DNA, %10 DMSO ve %75 7-deaza-



Şekil 6. H-22'nin frajil X kromozomunun gözleendiği metafaz kromozomları ve parsiyel karyotipi

dGTP: %25 dGTP kullanmış ve normal bireylerde PCR ürünü bantları oldukça yoğun olarak görebilmişlerdir. Ancak biz aynı şartlarda hiç bant gözleyemedik. Buna neden olarak kalıp olarak kullandığımız DNA'nın yeterince saf olmayıp, fazla miktarda alınan DNA'nın (1 µg) içindeki kontaminantların PCR'ı inhibe ettiğini düşündük. DNA konsantrasyonunu düşürdüğümüzde PCR ürünleri elde edilebildi. Ayrıca biz 7-deaza-dGTP oranını %60'a indirdik. Bu şekilde PCR ürünleri daha iyi görüldü. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada 1:1 oranındaki

7-deaza-dGTP:dGTP'nin PCR ürünlerinin oluşumunu zorlaştırmadığı görülmüştür<sup>(36)</sup>.

Frajil X şüpheli grup ile kontrol grubunda yapılan ilk PCR taramasında DNA'ları çoğaltılamayan bireyler için primer 1 ve 3'den oluşan ikinci bir primer çifti kullanıldı. Bu primer çifti 150 bp'lik bir bölgenin çoğalmasını sağlıyor ve elde edilen ürün 30 CGG tekrarına karşılık geliyordu. Çoğaltılan bölge küçük olduğu için bu primer çifti premütasyonlu alellerin çoğaltılmasını kolaylaştırıyordu. Reaksiyon karışımında 1 mM MgCl<sub>2</sub>, %10 DMSO, 0.2 µg kalıp DNA, %60 7-deaza-

dGTP: %40 dGTP ve Taq polimeraz kullanıldı. PCR ürünleri elde edildi. Ancak bantlar zayıf görünüyordu. Bu yüzden fotoğraflarını elde edemedik. Çoğaltılabilen örneklerin normal CGG tekrarlarına sahip oldukları belirlendi.

PCR ile çoğaltılmayan DNA'larla yapılan Southern blot sonucunda bir erkek çocuğun frajil X full mutasyonlu olduğu belirlendi. Düşük folik asit içeren TC Medium 199 ve FUdR (0.1 mM final konsantrasyon)'li ortamlar kullanılarak yürütülen sitogenetik analizde, frajil X kromozom oranı %12 idi. Düşük folatlı ortamda frajil X sıklığının FUdR'li ortama göre daha düşük olduğu görüldü. Benzer sonuçlar Jenkins ve arkadaşlarınınca da rapor edilmiştir<sup>(7)</sup>.

Frajil X pozitif olan hastanın ailesine yapılan DNA testi sonucunda, ailede ilk belirlenen kardeş de dahil olmak üzere üç erkek ve bir kız kardeşin de hasta olduğu, diğer kızkardeşin ve annelerinin ise taşıyıcı oldukları belirlendi. Bu ailenin diğer bireylerine, DNA testinden sonra ikinci kez kan örneği vermek istemedikleri için sitogenetik analiz yapılamadı. Çalıştığımız frajil X şüpheli popülasyonda frajil X sıklığının yaklaşık %1 olduğu belirlendi.

Frajil X testi için seçilen, özel eğitim alan, öğrenme güçlüğü gözlenen 254 çocuk üzerinde yapılan direkt DNA testi (Southern blot) sonucunda 4 kişinin full mutasyonlu olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık premutasyonlu hiç kimsenin olmadığı gözlenmiştir<sup>(44)</sup>. Yine periferik kandan Southern blot analiziyle öğrenme güçlüğü gözlenen 154 çocuktan 4'ünün frajil X sendromlu olduğu belirlenmiştir<sup>(45)</sup>.

Japonya'da mental retardasyonluların bulunduğu enstitülerde sitogenetik metod ile yapılan FXS çalışmasında sıklığın %5.3 olduğu<sup>(46)</sup> ancak daha sonra mental retardasyonlu ve öğrenme güçlüğüne sahip popülasyonlarda, PCR ve Southern blot ana-

liziyle yapılan çalışmada frajil X sıklığının %2-5 arasında olduğu belirlenmiştir<sup>(5,47)</sup>.

Frajil X şüpheliler arasında bir erkek çocukta ve annesinde 9 nolu kromozomda perisentrik inversiyon gözledik. Bu vaka frajil X negatifti. Bulgularımıza paralel olarak, mental retardasyon ve psikiyatrik hastalık olan gruplarda yapılan çalışmalarda, perisentrik inversiyon sıklığında artış olduğu belirlenmiştir<sup>(48,49)</sup>.

1992 yılına kadar FRAXA (Xq27.3) lokusunda oluşan frajil bölgenin tayini için tek kullanışlı test sitogenetik analizdi. Şimdi bu testin yerini kısa süreli ve daha güvenilir olan DNA analizi almıştır<sup>(5,50)</sup>. Frajil X tarama programlarında premutasyonlu, taşıyıcı olan bireylerin sitogenetik analizle belirlenmesi mümkün değildir. Bu nedenle DNA testinin yapılması zorunludur<sup>(51,52)</sup>. Frajil X DNA testlerinin sonuçlarına bakılarak moleküler diagnostik analizin duyarlılığının %99 olduğu belirlenmiştir<sup>(53,54)</sup>. Son bulguların ışığında frajil X'in sıklığı yeniden değerlendirildiğinde erkek popülasyonda sitogenetik çalışmanın, DNA analizinden daha yüksek oranda frajil X pozitif sonuç verdiği ve bu nedenle bir çok yanlış pozitif sonuçların rapor edildiği öne sürülmüştür<sup>(1,51,52,55,56)</sup>. Diğer taraftan etkilenmiş kadınlarda yapılan sitogenetik testde de çok sık yanlış negatif sonuçlar belirlenmiştir<sup>(50)</sup>.

Mutasyon taraması (premutasyon ve full mutasyon) genomik DNA, EcoRI veya Hind III enzimleri ile kesilerek ve CGG artışına bakılarak da yapılmaktadır<sup>(25,36,57)</sup>.

Sonuç olarak frajil X şüpheli grubumuzda full mutasyon sıklığının yaklaşık olarak %1 bulunması, bu mutasyonun normal popülasyonlarda çok daha düşük olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle frajil X sendromu tarama testlerinin olgu saptanması ve endikasyon gösteren gruplar dışında yapılması pratik ve ekonomik olmayabilir.

FMR1 geni CGG tekrarının stabilitesini sağlayan AGG trinükleotidlerinin, Türk populasyonunda sayısının (DNA dizi analizi yöntemiyle) belirlenmesi gen yapısının anlaşılmasında ve gelecekte hastalığın insidansının ne olacağına tahmin edilmesinde yararlı olacaktır.

### TEŞEKKÜR

*Bu çalışmayı destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Araştırma Fonu'na ve sitogenetik analizlerde görüşlerine başvurduğumuz, anabilim dalımız öğretim üyeleri, Prof. Dr. Gülsen Ökten ve Doç. Dr. Mehmet Elbistan'a teşekkür ederiz.*

Geliş tarihi : 31.03.2000

Yayına kabul tarihi : 04.07.2000

Yazışma adresi:

Dr. Nurten KARA

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

55139 Kurupelit, SAMSUN

### KAYNAKLAR

1. Turner G, Webb T, Wake S, et al. Prevalance of fragile X syndrome. Am J Med. Genet 1996; 64: 196-197.
2. Turner G, Robinson H, Wake S, et al. Case finding for the fragile X syndrome and its consequences. BMJ 1997; 315: 1223-1226.
3. Nussbaum RL, Ledbetter DH, The fragile X syndrome. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases. Vol: I, Seventh edition, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, 1995; 795-810.
4. Hagerman RJ, Physical and behavioral phenotype. In: Fragile X Syndrome: Diagnosis, Treatment and Research, Hagerman RJ, Cronister A, Second edit., Baltimore, Johns hopkins Univ. Press, 1996; 3-87.
5. Hecimovic S, Barisic I, Pavelic K, DNA analysis of the fragile X syndrome in an at risk pediatric population in Croatia: simple clinical preselection in criteria can considerably improve the cost-effectiveness of fragile X screening studies. Hum Hered 1998; 48: 256-265.
6. Jacky PB, Ahuja YR, Anyane-Yeboah K, et al. Guidelines for the preparation and analysis of the fragile X chromosome in lymphocytes. Am J Med Genet 1991; 38: 400-403.
7. Jenkins EC, Genovese M, Duncan CJ, et al. Occurrence of aneuploidy for the X chromosome in over 1300 unrelated specimens screened for the fragile X chromosome. Am J Med Genet 1994a; 51: 452-453.
8. Gunter C, Paradee W, Crawford DC, et al. Re-examination of factors associated with expansion of CGG repeats using a single nucleotide polymorphism in FMR1. Hum Mol Genet 1998; 7 (12): 1935-1946.
9. Fu YH, Kuhl DPA, Pizzuti A, et al. Variation of the CGG repeat at fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. Cell 1991; 67: 1047-1058.
10. Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, et al. Fine structure of the human FMR1 gene. Hum Mol Genet, 1993; 3(4): 685-686.
11. Brown WT, Houck GE, Jeziorowska A, et al. Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. J Am Med Assoc 1993; 270: 1569-1575.
12. Zhong N, Yang W, Dobkin C, et al. Fragile X gene instability: Anchoring AGGs and linked microsatellites. Am J Hum Genet. 1995; 57: 351-361.
13. Oberle I, Rousseau F, Heitz D, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. Science 1991; 252: 1097-1102.
14. Vaisanen ML, Kahkonen M, Leisti J, Diagnosis of fragile X syndrome by direct mutation analysis. Hum. Genet 1994; 93: 143-147.
15. Fisch GS, Snow K, Thibodeau SN, et al. The fragile X premutation in carriers and its effect on mutation size in offspring. Am J Hum Genet. 1995; 56: 1147-1155.
16. Fry M, Loeb LA. The fragile X syndrome d(CGG)n

- nucleotide repeats form a stable tetrahelical structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4950-4954.
17. Eberhart DE, Malter HE, Feng Y, et al. The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1083-1091.
  18. Warren ST, Ashley CT. Triplet repeat expansion mutations: The example of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18: 77-99.
  19. Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, et al. Tissue specific expression of FMR1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet* 1993; 3: 36-43.
  20. Halley D, Van Den Ouweland A, Deelen W, et al. Strategy for reliable prenatal detection of normal male carriers of the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 1994; 51: 471-473.
  21. Von Koskull H, Gahnberg N, Salonen R, et al. FRAXA locus in fragile X diagnosis: family studies, prenatal diagnosis, and diagnostic of sporadic cases of mental retardation. *Am J Med Genet* 1994; 51: 486-489.
  22. Hagerman R. Fragile X: Treatment of Hyperactivity. *Pediatrics* 1997; 99(5): 753.
  23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA human nucleated cells. *Nuc Ac Res* 1988; 16: 1215.
  24. Levinson G, Maddalena A, Palmer FT, et al. Improved sizing of fragile X CGG repeats by nested polymerase chain reaction. *Am J Med Genet* 1994; 51: 527-534.
  25. Cao J, Tarleton J, Barberio D, et al. A simple fragile X PCR assay with 7-deazaguanine-substituted DNA visualized by ethidium bromide. *Mol Cell Prob* 1994; 8: 177-180.
  26. Brown WT. Mol Analysis of fragile X syndrome. In: *Current Protocols in Human Genetics*. New York, Wiley, 1994; 9.5.1-9.5.14.
  27. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Second Edition, Book 1.2.3., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.
  28. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960; 20: 613-616.
  29. Oncor. Fragile X Chemi. Sure Blot CHEMI Hybridization and Detection Kit Catalog number S4250-Kit, Instruction Manual, Gaithersburg, MD 20877. 1996
  30. Verma RS, Babu A. *Tissue Culture Techniques and Chromosome Preparation, Banding Techniques, Specialized Techniques*. In: *Human Chromosomes. Principles and Techniques*. Second Ed., McGraw-Hill, Inc: USA 1995: 11-14, 74-75, 137-143.
  31. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971; 2: 271-272.
  32. Opitz JM. On the gates of hell and a most unusual gene. *Am J Med Genet* 1986; 23: 1-10.
  33. Turner G, Opitz JM, Brown WT, et al. Conference report: Second International Workshop on the Fragile X and on X-linked Mental Retardation. *Am J Med Genet* 1986; 23: 11-67.
  34. Snow K, Doud LK, Hagerman R, et al. Analysis of a CGG sequence at the FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 1217-1228.
  35. Dawson AJ, Chodirker BN, Chudley AE. Frequency of FMR1 premutations in a consecutive newborn population by PCR screening of Guthrie blood spots. *Biochem Mol Med* 1995; 56: 63-69.
  36. Chong SS, Eichler AE, Nelson DL, et al. Robust amplification and ethidium-visible detection of the fragile X syndrome CGG repeat using Pfu Polymerase. *Am J Med Genet* 1994; 51: 522-526.
  37. Condorelli DF, Milana G, Dell'Albani P, et al. Routine clinical application of the FRAXA Pfu PCR assay: limits and utility. *Clin Genet* 1996; 50: 366-371.
  38. Cheng S, Fockler C, Barnes WM, et al. Effective amplification of long targets from cloned insert and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5695-5699.
  39. Lu YH, Negre S. Use of glycerol for enhanced

- efficiency and specificity of PCR amplification. *TIG* 1993; 9: 297.
40. Latimer LJ, Lee JS. Ethidium bromide does not fluoresce when intercalated adjacent to 7-deaza-guanine in duplex DNA. *J Bio Chemi* 1991; 266: 13489-13491.
  41. Innis MI. *Protocols: A guide to PCR with 7-deaza-2'-deoxysguanosine triphosphate*. In: *PCR Methods and Application*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ et al. San Diego: Academic Press. 1990.
  42. Boehringer Mannheim. Use of 7-deaza-dGTP to amplify DNA by PCR. *BM Biochemica*. 1991; 14-16.
  43. Jenkins EC, Duncan CJ, Sanz MM, et al., Progress toward an internal control system for fragile-X induction by 5-Fluorodeoxyuridine in whole-blood cultures. *Pathobiology* 1990 58, 236-240.
  44. Jacobs PA, Bullman H, Macpherson J, et al. Population studies of fragile X: a molecular approach. *J Med Genet* 1993; 30: 454-459.
  45. Slaney SF, Wilkie AOM, Charlton R, et al. DNA testing for fragile X syndrome in schools for learning difficulties. *Arch Dis Child* 1995; 72: 33-37.
  46. Arinami T, Kondo I, Nakajima S. Frequency of the fragile X syndrome in Japanese mentally retarded males. *Hum Genet* 1986; 73: 309-312.
  47. Hofstee Y, Arinami T, Hamaguchi H. Comparison between the cytogenetic test for fragile X and the molecular analysis of the FMR-1 gene in Japanese mentally retarded individuals. *Am J Med Genet* 1994; 51: 466-470.
  48. Funderburk SJ, Spence MA, Sparkes RS. Mental retardation associated with "balanced" chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 1977; 29: 136-141.
  49. Jacobs PA, Matsuura JS, Mayer M. A cytogenetic survey of an institution for the mentally retarded: chromosome abnormalities. *Clin Genet* 1978; 13: 37-60.
  50. Hecimovic S, Barisic I, Müller A, et al. Expand long PCR for fragile X mutation detection. *Clin Genet* 1997; 52: 147-154.
  51. Tranabjaerg L, Lubs HA, Borghgraef M, et al. Seventh international Workshop on the Fragile X and X-linked mental retardation. *Am J Med Genet* 1996; 64: 1-14.
  52. Sherman S. Epidemiology. In: *Fragile X Syndrome -Diagnosis, Treatment and Research*. Hagerman, RJ, Cronister, A, Second Edit., Baltimore, Johns Hopkins Press, 1996: 165-192.
  53. Rousseau F, Heitz D, Tarleton J, et al. A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile X syndrome, using direct diagnosis with prope StB12.3: the first 2253 cases. *Am J Hum Genet* 1994a; 55: 225-237.
  54. Rousseau F, Rouillard P, Morel ML, et al. Prevalance of carriers of premutation-size alleles of the FMR1 gene- and implications for the population genetics of the fragile X syndrome. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1006-1018.
  55. Murray A, Youings S, Dennis N, et al. Population screening at the FRAXA and FRAXE loci: molecular analyses of boys with learning difficulties and their mothers. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 727-735.
  56. Morton JE, Bunday S, Webb TP, et al. Fragile X syndrome is less common than previously estimated. *J Med Genet* 1997; 34: 1-5.
  57. Verkerk AJMH, De Vries BBA, Niermeijer MF, et al. Intragenic probe used for diagnostics in fragile X families. *Am J Med Genet* 1992; 43: 192-196.

