

**дефектолошка стручно-научна
проблематика**

Ана МОМИРОВСКА *

ФРАГИЛНИОТ Х-СИНДРОМ И МЕНТАЛНАТА РЕТАРДАЦИЈА**Клиничка слика**

Главен симптом кај пациентите со фрагилен Х-синдром е менталната ретардација. Степенот на менталната ретардација (MR) кај мажи може да варира од најтешка до гранична форма на MR. Жените носители на дефектниот ген отстапуваат од ова правило: една третина од нив се со тешка ментална ретардација, друга третина се со гранична форма на MR и третата третина се сосема нормални (Mandel et al., 1992).

Покрај менталната ретардација пациентите имаат и други физички недостатоци: долги и проминентни уши, долгнавесто лице, високо поставено непце, страбизам, кај мажите присутен е макроорхидизам, слаб мускулен тонус, рамни стапала, слаб вид (Hagerman et al., 1984), понекогаш се јавуваат и абнормалности на срцевите валвули (Hagerman et Synhorst, 1984). Заради овие карактеристики се смета дека постои „типичен изглед“: Од овој „типичен изглед“: долги уши и долгнавесто лице, отстапуваат децата и жените (Carmi et. al., 1984).

Пациентите со фрагилен Х-синдром неретко се карактеризираат и со други тешкотии во однесувањето. Постои неконтролирана гестикација, хипер активно однесување, пореметено внимание, анксиозност како и говорно јазични грешки или алалиа (Kinnell, 1982). Мислењето дека аутизмот е манифестација на Фрагилниот Х-синдром е ревидирано од страна на Клауск и соработниците, кој сугерира дека експанзијата во FMR 1 генот најверојатно не е поврзана со појава на аутизам (Klauck et al., 1997).

Цитогенетски наоди

Дијагностиката на фрагилниот Х-синдром се базира врз цитогенетски испитувања каде клеточната култура се одгледува во недостиг на фолна киселина (Southerland, 1977, Glower, 1981). При такви услови се јавува фрагилно место на Х-хромозомот на позицијата Хq27.3 (FRAXA). Цитогенетските анализи на клетките во метафаза покажуваат фрагилни хромозоми во помалку од 60% од клетките (Giraud et al. 1976; Harvey et al., 1977; Sutherland, 1977). Меѓутоа цитогенетскиот тест има ограничувања, особено при тестирање на носители и покажува разлики во осетливоста меѓу одделни

* Авторот на трудот е од Истражувачки центар за генетско инженерство и биотехнологија, Македонска академија на науките и уметностите

индивиду и одделни лаборатории (Wang et al., 1993). Исто така интерпретацијата на резултатите е отежната заради присуство и на други фрагилни места на X-хромозомот: FRAXD, FRAXE и FRAXF (ISCN, 1978; Hecht et al., 1989).

Молекуларни основи на фрагилниот X-синдром

Во 1991 година е откриен FMR 1 генот (Yu et al., 1991). Утврдено е дека тој содржи репетитивна тринуклеотидна секвенца (CGG) близу до 5' крајот. Мутацијата на FMR 1 генот всушност претставува експанзија на оваа повторувачка секвенца. Бројот на CGG повторувањата во нормалната популација изнесува од шест до педесет повторувања. Мутациите се поделени во две главни групи: премутации со 50 до 200 повторувања и полни мутации со повеќе од 200 повторувања (Yu et al., 1992; Eichler et al., 1993). Утврдено е дека нема јасна граница меѓу горниот лимит за нормалната популација и долниот лимит на премутациите. Заради тоа алелите со 45–55 повторувања спаѓаат во таканаречена „сива зона“ (Hagerman et Silverman, 1991).

Покрај експанзијата на репетитивната секвенца која во најголем број случаи е причина за настанување на фрагилен X-синдром се опишани и други дефекти во генот FMR 1 што даваат ист фенотип: тоа се точкести мутации во функционално важни делови на генот и неколку делеции (Gedeon et al., 1992; Wohrle et al., 1992; De Bouille et al., 1993; Tarleton et al., 1993; Meijer et al., 1994; Siomi et al., 1994; Hirst et al., 1995; Quan et al., 1995; Wang et al., 1997; Vincent et al., 1998;).

Наследување

Некои од алелите што ѝ припаѓаат на „сивата“ група се нестабилни и експандираат од генерација во генерација преминувајќи во премутации, додека други се стабилни и се наследуваат непроменети (Hagerman and Silverman, 1991).

Премутациите преминуваат во полна мутација за време на мејозата на женските репродуктивни клетки. Колку е поголем бројот на рипитите во премутацијата толку е поголема веројатноста дека во поколението ќе се јави експанзија во вид на полна мутација (Laird, 1987; Mandel et al., 1992).

Мажите и жените носители на премутација се без манифестна клиничка слика. Мажите носители се нарекуваат „нормални мажи-преносители“ (Sherman et al., 1985); **нивната мутација речиси непроменета се пренесува на нивните ќерки, кои од своја страна, се без манифестна клиничка слика, но носат ризик да имаат болно потомство. Болеста се манифестира претежно кај нивните синови.** Сепак и кај некои жени, носители на полна мутација се јавува манифестна клиничка слика (при лионизацијата настанува метилација на здравиот X-хромозом).

Пренесувањето на мутацијата на FMR 1 генот не соодветствува со класичното наследување по Мендел. Првична хипотеза за начинот на пренесување на мутацијата во FMR 1 генот постави Шерман (Sherman et al. 1985) и се нарекува шерманов парадокс (Fu et al. 1991). Тој првпат укажа

дека мутацијата перзистира низ генерациите (Nolin et al., 1996) и се развива–експандира при што дефинитивната полна мутација настанува по пренесување на мутацијата од жена на машкото потомство. Ваквиот вид на мутации се именува како динамична мутација (Richards et al. 1992).

Се претпоставува дека експанзијата од нормален во премутационен алел се случува во текот на раниот ембрионален развој (Devys et al. 1992, Wohrle et al., 1993). Имајќи предвид дека експанзијата настанала во повеќеклеточниот ембрион, јасно е дека таа варира од клетка во клетка и кај носителите на дефектен ген често се јавува хетерогеност во алелната големина. Некои афектирани индивидуи имаат и полна мутација и премутација во крвта.

Патогенеза

Експанзијата на тринуклеотидната секвенца за повеќе од 200 повторувања (полна мутација) речиси секогаш е поврзана со метилација на промоторниот дел од генот (Rousseau et al., 1992) од што следува негова инактивација, односно отсуство на синтеза на FMR 1 протеинот (Bell et al., 1991; Hinds et al., 1993; McConkie-Rosell et al., 1993). Оваа генска инактивација е важен настан во патогенезата на фрагилниот X-синдром. Но, и покрај тоа што е јасно дека состојбата со метилацијата влијае врз фенотипот, сепак клиничката слика варира, особено е непостојана кај жените. Се претполага дека кај определени индивидуи постои определена синтеза на FMR 1 протеин (de Vries et al., 1995), заради некомплетна метилација или заради присуство на мозаицизам. Тежината на клиничката слика директно зависи од количината на FMR 1 протеинот во ткивата или од неговата функционалност (Verheij et al., 1993; Lugenbeel et al., 1995).

Најголеми количини на mPHK за протеинскиот продукт на FMR 1 генот се откриени во ткивата на мозокот и во тестисите (Abitbol et al., 1993; Bachner et al., 1993; Abrams et al., 1999). По својата функција се смета дека тоа е цитоплазматски РНК врзувачки протеин (Devys et al., 1993; Siomi et al., 1993; Eberhart et al., 1996) и дека има важна улога во функцијата на рибозомите (Khandjian et al., 1996). Сè уште во целост не е објаснет механизмот како дефектот на овој протеин влијае врз активноста на мозокот и на интелигенцијата.

Молекуларна дијагностика

Современиот пристап опишан во литературата укажува на тоа дека при дијагностицирањето на FHS треба да се уважат препораките што ги дава и американскиот колеџ за Медицинска генетика за тоа кои сè индивидуи треба да бидат тестирани за FHS (Park et al., 1994), а тоа се:

1. **Индивидуи од двата пола со менталана ретардација, застој во развојот, аутизам, особено ако имаат:**
 - физички карактеристики и нарушувања на однесувањето што се типични за фрагилен X–синдром;
 - фамилијарна историја на фрагилниот X–синдром; или

- недијагностицирана ментална ретардација.
2. **Индивидуи што бараат генетско советување и што имаат:**
 - фамилјарна историја на фрагилен X-синдром или
 - фамилјарна историја на недијагностицирана ментална ретардација.
 3. **Фетуси кај мајки носители;**
 4. **Пациенти кај кои резултатот од цитогенетското испитување не се совпаѓа со клиничката слика. Тука спаѓаат пациентите кои имаат клиничка индикација, но имаат негативен или несигурен резултат и пациентите со атипичен фенотип кои имаат позитивен тест.**

Во истата препорака која ја дава Американскиот колеџ за медицинска генетика, се истакнува дека: „DNK методот е метод на избор доколку индивидуата се тестира само за FHS и со тоа поврзаната експанзија на три-нуклеотидната повторувачка секвенца на FMR 1 генот”.

Оваа препорака, пред сè, се базира врз можностите што ги нуди DNK-технолозијата за прецизно определување на молекуларниот дефект. Од аспект на денешните научни познавања за фрагилниот X-синдром се смета дека цитогенетскиот тест кој порано се користеше е надминат и сè поголем е бројот на лабораториите што го напуштаат цитогенетскиот пристап и ги користат техниките на молекуларната биологија за дијагностицирање.

Може да се издвојат **два основни метода** што се применуваат како молекуларни методи на избор за дијагностицирање. **Првиот метод** е Southern blot анализа на Eco R I или Eco R I/Eag I дигестираните DNK примероци (Rouseau et al. 1991). За случаите каде што постои сомневање за тоа дали експандираниот фрагмент е премутација се сугерира дигестија со HIND III ензимот (Storm et al., 1998).

Нормален наод кај Eco R I-дигестите од нормални индивидуи се смета присуството на фрагмент со големина 5.2 кб, а кај Eco R I/Eag I дигестиите два на нормални фрагменти од 5.2 и 2.8 кб кај жени и 2,8 кб фрагмент кај мажи. Кај пациентите со фрагилен X-синдром се добива зголемен фрагмент чија должина зависи од степенот на експанзијата на CGG-триплетите. Со примена на Southern blot се детектираат полми мутации и премутации.

Вториот метод најчесто користен за дијагностицирање на болеста е PCR-методот, при што се овозможува определување на бројот на три-нуклеотидните повторувања во нормалните и премутационите алели (Snow et al. 1993). Во литературата се опишани поголем број на PCR протоколи. Заедничко за сите нив е дека се работи за модификувани протоколи заради тоа што CG “rich” регионите се тешко подложни на амплификација.

Со помош на PCR-методот може да се определи бројот на повторувањата во нормалните и премутационите алели. Патолошки наод се смета дека е недостигот на амплификациски продукт по извршената реакција на амплификација. Присуството на голем број на CGG-повторувања во промоторната регија на FMR 1-генот кај пациентите со FHS ја оневозможува амплификацијата.

Од 1991 директното тестирање на FMR 1-генот е метод на избор и за пренатална дијагноза. При тоа како појдовен материјал се користат хорионски вили или амнионска течност (Dobkin et al. 1991). Примарно се определува бројот на повторувањата кај родителите и доколку кај мајката се откријат нормални алели тогаш се очекува и поколението да биде нормално. Во случај на присуство на мутација кај мајката се определува полот на детето со PCR-метод. Доколку детето е машко и кај него се открие еден нормален алел, се заклучува дека детето е нормално. Кај женските фетуси за нормален наод се смета доколку кај него се откријат две нормални алели со различен број повторувања применувајќи PCR-метод. Во случаите кога кај мајката ќе се открие само еден сет на фрагменти со нормален број на повторувања (во тој случај мајката е можеби хомозигот за нормални алели или се амплифицирал само едниот-нормалниот алел, а мутираниот заради големиот број CG-врски не се амплифицирал), анализата се дополнува со Southern blot што дефинитивно ќе укаже на тоа дали фетусот е здрав или не.

Молекуларниот пристап се користи и во Истражувачкиот центар за генетско инженерство и биотехнологија, Македонска академија на науките и уметностите, за дијагностицирање на пациенти со Фрагилен X-синдром.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Abitbol, M.; Menini, C.; Delezoide, A.-L.; Rhyner, T.; Vekemans, M.; Mallet, J.: Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nature Genet.* 4: 147-153, 1993.
2. Abrams, M. T.; Kaufmann, W. E.; Rousseau, F.; Oostra, B. A.; Wolozin, B.; Taylor, C. V.; Lishaa, N.; Morel, M.-L.; Hoogeveen, A.; Reiss, A. L.: FMR1 gene expression in olfactory neuroblasts from two males with fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 82: 25-30, 1999.
3. Bachner, D.; Steinbach, P.; Wohrle, D.; Just, W.; Vogel, W.; Hameister, H.; Manca, A.; Poustka, A.: Enhanced Fmr-1 expression in testis. (Letter) *Nature Genet.* 4: 115-116, 1993.
4. Bell, M. V.; Hirst, M. C.; Nakahori, Y.; MacKinnon, R. N.; Roche, A.; Flint, T. J.; Jacobs, P. A.; Tommerup, N.; Tranebjaerg, L.; Froster-Iskenius, U.; Kerr, B.; Turner, G.; Lindenbaum, R. H.; Winter, R.; Pembrey, M.; Thibodeau, S.; Davies, K. E.: Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. *Cell* 64: 861-866, 1991.
5. Carmi, R.; Meryash, D. L.; Wood, J.; Gerald, P. S.: Fragile-X syndrome ascertained by the presence of macro-orchidism in a 5-month-old infant. *Pediatrics* 74:883-886, 1984.
6. De Boule, K.; Verkerk, A. J. M. H.; Reyniers, E.; Vits, L.; Hendrickx, J.; Van Roy, B.; Van Den Bos, F.; de Graaff, E.; Oostra, B. A.; Willems, P. J.: A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nature Genet.* 3: 31-35, 1993.
7. de Vries, B. B. A.; Robinson, H.; Stolte-Dijkstra, I.; Tjon Pian Gi, C. V.; Dijkstra, P. F.; van Doorn, J.; Halley, D. J. J.; Oostra, B. A.; Turner, G.; Niermeijer, M. F.: General overgrowth in the fragile X syndrome: variability in the phenotypic expression of the FMR1 gene mutation. *J. Med. Genet.* 32: 764-769, 1995.
8. Devys, D.; Biancalana, V.; Rousseau, F.; Boue, J.; Mandel, J. L.; Oberle, I.: Analysis of full fragile X mutations in fetal tissues and monozygotic twins indicate that abnormal methylation and somatic heterogeneity are established early in development. *Am. J. Med. Genet.* 43: 208-216, 1992.
9. Devys, D.; Lutz, Y.; Rouyer, N.; Bellocq, J.-P.; Mandel, J.-L.: The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nature Genet.* 4: 335-340, 1993.
10. Dobkin, C. S.; Ding, X.-H.; Jenkins, E. C.; Krawczun, M. S.; Brown, W. T.; Goonewardena, P.; Willner, J.; Benson, C.; Heitz, D.; Rousseau, F.: Prenatal diagnosis of fragile X syndrome. *Lancet.* 338: 957-958, 1991.

11. Eberhart, D. E.; Malter, H. E.; Feng, Y.; Warren, S. T.: The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum. Molec. Genet.* 5: 1083-1091, 1996.
12. Eichler, E. E.; Richards, S.; Gibbs, R. A.; Nelson, D. L.: Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum. Molec. Genet.* 2: 1147-1153, 1993.
13. Fu, Y.-H.; Kuhl, D. P. A.; Pizzuti, A.; Pieretti, M.; Sutcliffe, J. S.; Richards, S.; Verkerk, A. J. M. H.; Holden, J. J. A.; Fenwick, R. G., Jr.; Warren, S. T.; Oostra, B. A.; Nelson, D. L.; Caskey, C. T.: Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67: 1047-1058, 1991.
14. Gedeon, A. K.; Baker, E.; Robinson, H.; Partington, M. W.; Gross, B.; Manca, A.; Korn, B.; Poustka, A.; Yu, S.; Sutherland, G. R.; Mulley, J. C.: Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion. *Nature Genet.* 1: 341-344, 1992.
15. Glover, T. W.: FUDR induction of the X-chromosome fragile site: evidence for the mechanism of folic acid and thymidine inhibition. *Am. J. Hum. Genet.* 33: 234-242, 1981.
16. Hagerman, R. J.; Synhorst, D. P.: Mitral valve prolapse and aortic dilatation in the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 17: 123-131, 1984.
17. Hagerman, R. J.; Van Housen, K.; Smith, A. C. M.; McGavran, L.: Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 17: 111-121, 1984.
18. Hagerman, R. J.; Silverman, A. C.: *Fragile X syndrome: Diagnosis, treatment, and Research.* Baltimore: Johns Hopkins University Press., 1991
19. Hecht, F.; Cannizzaro, L. A.; Hecht, B. K.: Gene symbols for fragile sites: a proposal. (Letter) *Hum. Genet.* 82: 394, 1989.
20. Hinds, H. L.; Ashley, C. T.; Sutcliffe, J. S.; Nelson, D. L.; Warren, S. T.; Housman, D. E.; Schalling, M.: Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nature Genet.* 3: 36-43, 1993.
21. Hirst, M.; Grewal, P.; Flannery, A.; Slatter, R.; Maher, E.; Barton, D.; Fryns, J.-P.; Davies, K.: Two new cases of FMR1 deletion associated with mental impairment. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 67-74, 1995.
22. Hirst, M. C.; Knight, S. J. L.; Christodoulou, Z.; Grewal, P. K.; Fryns, J. P.; Davies, K. E.: Origins of the fragile X syndrome mutation. *J. Med. Genet.* 30: 647-650, 1993.
23. ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1978). *Cytogenet. Cell Genet.* 21: 309-404, 1978.
24. Khandjian, E. W.; Corbin, F.; Woerly, S.; Rousseau, F.: The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nature Genet.* 12: 91-93, 1996.
25. Kinnell, H. G.: Fragile-X disorder associated with antisocial personality. (Letter) *Lancet* II: 1104, 1982.
26. Kirchgessner, C. U.; Warren, S. T.; Willard, H. F.: X inactivation of the FMR1 fragile X mental retardation gene. *J. Med. Genet.* 32: 925-929, 1995.
27. Klauck, S. M.; Munstermann, E.; Bieber-Martig, B.; Ruhl, D.; Lisch, S.; Schmotzer, G.; Poustka, A.; Poustka, F.: Molecular genetic analysis of the FMR-1 gene in a large collection of autistic patients. *Hum. Genet.* 100: 224-229, 1997.
28. Kunst, C. B.; Zerylnick, C.; Karickhoff, L.; Eichler, E.; Bullard, J.; Chalifoux, M.; Holden, J. J. A.; Torroni, A.; Nelson, D. L.; Warren, S. T.: FMR1 in global populations. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 513-522, 1996.
29. Laird, C. D.: Proposed mechanism of inheritance and expression of the human fragile X syndrome of mental retardation. *Genetics* 117: 587-599, 1987.
30. Levinson, G.; Maddalena, A.; Palmer, T.F.; Harton, L.G.; Bick, P.D.; Howard-Peebles, N.P.; Black, H.S.; Schulman, D.J.: Improved sizing of fragile X CGG repeats by nested polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 51: 527-534, 1994.

31. Lugenbeel, K. A.; Peier, A. M.; Carson, N. L.; Chudley, A. E.; Nelson, D. L.: Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. *Nature Genet.* 10: 483-485, 1995.
32. Mandel, J.-L.; Hagerman, R.; Froster, U.; Brown, W. T.; Jenkins, E. C.; Jacobs, P.; Turner, G.; Lubs, H.; Neri, G.: Fifth International Workshop on the Fragile X and X-Linked Mental Retardation. *Am. J. Med. Genet.* 43: 5-27, 1992.
33. McConkie-Rosell, A.; Lachiewicz, A. M.; Spiridigliozzi, G. A.; Tarleton, J.; Schoenwald, S.; Phelan, M. C.; Goonewardena, P.; Ding, X.; Brown, W. T.: Evidence that methylation of the FMR-1 locus is responsible for variable phenotypic expression of the fragile X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 53: 800-809, 1993.
34. Meijer, H.; de Graaff, E.; Merckx, D. M. L.; Jongbloed, R. J. E.; de Die-Smulders, C. E. M.; Engelen, J. J. M.; Fryns, J.-P.; Curfs, P. M. G.; Oostra, B. A.: A deletion of 1.6 kb proximal to the CGG repeat of the FMR1 gene causes the clinical phenotype of the fragile X syndrome. *Hum. Molec. Genet.* 3: 615-620, 1994.
35. Nolin, S. L.; Lewis, F. A., III; Ye, L. L.; Houck, G. E., Jr.; Glicksman, A. E.; Limprasert, P.; Li, S. Y.; Zhong, N.; Ashley, A. E.; Feingold, E.; Sherman, S. L.; Brown, W. T.: Familial transmission of the FMR1 GCC repeat. *Am. J. Hum. Genet.* 59: 1252-1261, 1996.
36. Park, V.; Howard-Peebles, P.; Sherman, S.; Taylor, A.; Wulfsberg, E.: Policy statement: American College of Medical Genetics. Fragile X syndrome: diagnostic and carrier testing. *Am. J. Med. Genet.* 53: 380-381, 1994.
37. Poncz, M.; Solowiejczyk, D.; Harpel, B.; Mory, Y.; Schwartz, E.; Surrey, S.: Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood: Analysis of b-like globin genes. *Hemoglobin*, 6:27, 1982.
38. Quan, F.; Grompe, M.; Jakobs, P.; Popovich, B. W.: Spontaneous deletion in the FMR1 gene in a patient with fragile X syndrome and cherubism. *Hum. Molec. Genet.* 4: 1681-1684, 1995.
39. Quan, F.; Zonana, J.; Gunter, K.; Peterson, K. L.; Magenis, R. E.; Popovich, B. W.: An atypical case of fragile X syndrome caused by a deletion that includes the FMR1 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 56: 1042-1051, 1995.
40. Richards, R. I.; Sutherland, G. R.: Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. *Cell* 70: 709-712, 1992.
41. Rousseau, F.; Heitz, D.; Biancalana, V.; Blumenfeld, S.; Kretz, C.; Boue, J.; Tommerup, N.; Van Der Hagen, C.; DeLozier-Blanchet, C.; Croquette, M.-F.; Gilgenkrantz, S.; Jalbert, P.; Voelckel, M.-A.; Oberle, I.; Mandel, J.-L.: Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *New Eng. J. Med.* 325: 1673-1681, 1991.
42. Rousseau, F.; Heitz, D.; Mandel, J.-L.: The unstable and methylatable mutations causing the fragile X syndrome. *Hum. Mutat.* 1: 91-96, 1992.
43. Rousseau, F.; Heitz, D.; Tarleton, J.; MacPherson, J.; Malmgren, H.; Dahl, N.; Barnicoat, A.; Mathew, C.; Mornet, E.; Tejada, I.; Maddalena, A.; Spiegel, R.; Schinzel, A.; Marcos, J. A. G.; Schorderet, D. F.; Schaap, T.; Maccioni, L.; Russo, S.; Jacobs, P. A.; Schwartz, C.; Mandel, J. L.: 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.
44. Sherman, S. L.; Jacobs, P. A.; Morton, N. E.; Froster-Iskenius, U.; Howard-Peebles, P. N.; Nielsen, K. B.; Partington, M. W.; Sutherland, G. R.; Turner, G.; Watson, M.: Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum. Genet.* 69: 289-299, 1985.
45. Siomi, H.; Choi, M.; Siomi, M. C.; Nussbaum, R. L.; Dreyfuss, G.: Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* 77: 33-39, 1994.
46. Siomi, H.; Siomi, M. C.; Nussbaum, R. L.; Dreyfuss, G.: The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* 74: 291-298, 1993.
47. Snow, K.; Doud, L. K.; Hagerman, R.; Pergolizzi, R. G.; Erster, S. H.; Thibodeau, S. N.: 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.
48. Southerland, G.R.: Fragile sites on human chromosomes; demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* 197: 265-266, 1977.

49. Tarleton, J.; Richie, R.; Schwartz, C.; Rao, K.; Aylsworth, A. S.; Lachiewicz, A.: An extensive de novo deletion removing FMR1 in a patient with mental retardation and the fragile X syndrome phenotype. *Hum. Molec. Genet.* 2: 1973-1974, 1993.
50. Turner, G.; Webb, T.; Wake, S.; Robinson, H.: Prevalence of fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 64: 196-197, 1996.
51. Verheij, C.; Bakker, C. E.; de Graaff, E.; Keulemans, J.; Willemsen, R.; Verkerk, A. J. M. H.; Galjaard, H.; Reuser, A. J.J.; Hoogeveen, A. T.; Oostra, B. A.: Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* 363: 722-724, 1993.
52. Vincent, J. B.; Gurling, H. M. D.: Point mutation in intron 10 of FMR1 is unlikely to be a cause of fragile X syndrome. (Letter) *Hum. Mutat.* 12: 431 only, 1998.
53. Wang, Q.; Green, E.; Barnicoat, A.; Garrett, D.; Mullakey, M.; Bobrow, M.; Matew, G. C.: Cytogenic versus DNA diagnosis in routine referrals for fragile X syndrome. *Lancet.* 342: 1025-1026, 1993.
54. Wang, Y.-C.; Lin, M.-L.; Lin, S. J.; Li, Y.-C.; Li, S.-Y.: Novel point mutation within intron 10 of FMR-1 gene causing fragile X syndrome. *Hum. Mutat.* 10: 393-399, 1997.
55. Wohrle, D.; Hennig, I.; Vogel, W.; Steinbach, P.: Mitotic stability of fragile X mutations in differentiated cells indicates early post-conceptual trinucleotide repeat expansion. *Nature Genet.* 4: 140-142, 1993.
56. Wohrle, D.; Kotzot, D.; Hirst, M. C.; Manca, A.; Korn, B.; Schmidt, A.; Barbi, G.; Rott, H.-D.; Poustka, A.; Davies, K.E.; Steinbach, P.: 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. Youings, A. S.; Murray, A.; Dennis, N.; Ennis, S.; Lewis, C.; McKechnie, N.; Pound, m.; Sharrock, A.; Jacobs, P.: FRAXA and FRAXE: the results of five year survey. *J. Med. Genet.* 37: 415-421, 2000.
58. Yu, S.; Mulley, J.; Loesch, D.; Turner, G.; Donnelly, A.; Gedeon, A.; Hillen, D.; Kremer, E.; Lynch, M.; Pritchard, M.; Sutherland, G. R.; Richards, R. I.: Fragile-X syndrome: unique genetics of the heritable unstable element. *Am. J. Hum. Genet.* 50: 968-980, 1992.
59. Yu, S.; Pritchard, M.; Kremer, E.; Lynch, M.; Nancarrow, J.; Baker, E.; Holman, K.; Mulley, J. C.; Warren, S. T.; Schlessinger, D.; Sutherland, G. R.; Richards, R. I.: Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 252: 1179-1181, 1991.

Ana MOMIROVSKA

FRAGILE X-SYNDROME AND MENTAL RETARDATION

Fragile X-Syndrome is the most common inherited form of mental retardation. The disease is caused by defect of the fragile X mental retardation gene (FMR 1), located on X chromosome, due to expansion of the repetitive CGG sequence in the promoter region. The modern approach for diagnosis of the disease is based on the use of direct DNA analysis of the FMR 1 gene. Recombinant DNA technology techniques overcome the deficiencies of the cytogenetic test, such as large number of false positive results.

In the molecular diagnostics of Fragile X-Syndrome, two basic DNA methods are used: a) Southern blot analysis of Eco RI or Eco R I/Eag I digested DNA samples and b) PCR for amplification of CG rich regions. Southern blot is used for detection of full mutations and premutations, and PCR for normal and premutation alleles sizing.